



HAL
open science

Les récepteurs histidine kinases : structure et distribution chez les eucaryotes et caractérisation fonctionnelle chez l'espèce *Scedosporium apiospermum* rencontrée au cours de la mucoviscidose.

Anaïs Hérivaux

► **To cite this version:**

Anaïs Hérivaux. Les récepteurs histidine kinases : structure et distribution chez les eucaryotes et caractérisation fonctionnelle chez l'espèce *Scedosporium apiospermum* rencontrée au cours de la mucoviscidose.. Médecine humaine et pathologie. Université d'Angers, 2018. Français. NNT : 2018ANGE0030 . tel-02918004

HAL Id: tel-02918004

<https://theses.hal.science/tel-02918004>

Submitted on 20 Aug 2020

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

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

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE D'ANGERS
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

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

Par

Anaïs HERIVAUX

« Les récepteurs histidine kinases : structure et distribution chez les eucaryotes et caractérisation fonctionnelle chez l'espèce *Scedosporium apiospermum* rencontrée dans la mucoviscidose »

Thèse présentée et soutenue à ANGERS, le 16 Octobre 2018

Unité de recherche : Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène, EA 3142, Université d'Angers

Rapporteurs avant soutenance :

Muriel CORNET	Professeur des Universités – Praticien Hospitalier, CHU de Grenoble, Université de Grenoble Alpes
Marie-Noëlle ROSSO	Directeur de Recherches, INRA, Université Aix-Marseille

Composition du Jury :

Président du jury Thomas GUILLEMETTE	Professeur des Universités, INRA, Université d'Angers
Rapporteurs Muriel CORNET	Professeur des Universités – Praticien Hospitalier, CHU de Grenoble, Université de Grenoble Alpes
Marie-Noëlle ROSSO	Directeur de Recherches, INRA, Université Aix-Marseille
Examineurs Sabine FILLINGER	Directeur de Recherches, INRA, Université Paris-Saclay
Vincent COURDAVAULT	Maître de Conférences, Université de Tours
Directeur de thèse Nicolas PAPON	Professeur des Universités, Université d'Angers
Co-directeur de thèse Jean-Paul LATGE	Professeur, Institut Pasteur, Paris
Co-encadrante de thèse Amandine GASTEBOIS	Maître de conférences, Université d'Angers

*« Every great dream begins with a dreamer.
Always remember, you have within you the strength, the patience,
and the passion to reach for the stars to change the world. »*

Harriet TUBMAN

REMERCIEMENTS

Trois ans, 1096 jours, 26304 heures, ... Voici un nouveau chapitre qui se clôt pour laisser place à une nouvelle page blanche. A travers ces quelques lignes je tiens à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à ce travail.

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury qui ont accepté d'évaluer mon travail (et qui détiennent le jugement final, le Saint Graal !!!). Le Pr. Muriel CORNET et le Dr. Marie-Noëlle ROSSO qui ont accepté la lourde charge d'être rapporteurs. Le Dr. Sabine FILLINGER qui a accepté d'être membre de mon jury. Le Pr. Thomas GUILLEMETTE et le Dr. Vincent COURDAVAULT d'avoir une fois de plus accepté ma sollicitation et pour vos précieux conseils au cours des différents Comités de Suivi de Thèse.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à mon équipe encadrante. Tout d'abord au Pr. Nicolas PAPON, mon directeur de thèse. Merci de m'avoir fait confiance au détour d'un café sur un banc de la faculté, ce qui restera pour moi l'entretien le plus original. J'espère avoir été à la hauteur de vos espérances. Merci pour votre mémoire hors pair et vos corrections plus que précieuses. Merci de m'avoir donné l'envie de me dépasser pendant ces trois ans. Au Pr. Jean-Paul LATGE, mon co-directeur de thèse, qui m'a énormément impressionnée mais qui se révèle être une personne abordable aussi bien scientifiquement qu'humainement. Merci pour vos conseils, d'avoir compris mes attentes pour la suite de mon parcours et de m'avoir aiguillée. Enfin, au Dr. Amandine GASTEBOIS ! Le « grade » de co-encadrante ne reflète pas du tout l'engagement que tu as eu tout au long de mon travail. Je ne m'étends pas plus ici car ces quelques lignes ne suffiraient pas à exprimer toute la gratitude que j'ai pour toi. Enfin, au Pr. Jean-Philippe BOUCHARA pour son accueil au sein de son laboratoire le « Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène » EA3142.

J'adresse également mes sincères remerciements à l'ensemble des personnes qui m'ont accompagnée lors de mes premiers pas en tant qu'enseignante à la Faculté de Pharmacie d'Angers et à l'Institut Supérieur de la Santé et des Bioproduits d'Angers. Au Pr. Gérald LARCHER qui m'a non seulement permis d'enseigner en biochimie mais me suit depuis mes premiers pas en recherche et m'a permis de trouver ce contrat de thèse. Aux Pr. Véronique MARCHAIS et Matthieu EVEILLARD et au Dr. Caroline DESHAYES qui m'ont fait confiance lors des enseignements en microbiologie. Bien évidemment aux petites mains qui étaient présentes à mes côtés au cours des différentes séances de travaux pratiques : Adeline, Corinne, Orianne et Magali.

Merci évidemment à tous les membres de l'équipe pour ces nombreuses soirées conviviales et de m'avoir aussi bien intégrée. Les « bébés » doctorants, bon courage pour la suite de votre thèse. Il vous reste encore (ou plus que) deux ans qui vont passer extrêmement vite donc profitez ! Merci également à

toutes les petites mains que j'ai eu le plaisir d'encadrer au cours de ces trois années et plus particulièrement Emeline et Margot qui ont réalisé un travail formidable.

Une thèse ce n'est pas seulement un apprentissage scientifique, c'est également une belle leçon de vie. Trois ans dans un laboratoire à côtoyer des personnes formidables. C'est pourquoi je tiens à remercier plus particulièrement Amandine, Charlotte, Julia, Patrick et Sandrine. Merci à vous pour votre soutien dans les bons comme dans les mauvais moments, merci d'avoir été à mon écoute, merci de m'avoir relevée quand le moral n'y était plus. Amandine, merci encore pour ton soutien sans faille, nos nombreuses discussions scientifiques (mais pas que). Tu es une co-encadrante formidable ! Patrick, merci pour ton immense expertise en biologie moléculaire, ces heures à tes côtés à la paillasse me manqueront (et même radio Nova !) ainsi que nos arrivées matinales. Bonne continuation à toi ! Merci à toi la miss Charlotte pour ta gaieté au laboratoire, pour avoir été ma co-équipière de sport et pour avoir partagé toutes ses activités à l'extérieur du laboratoire.

Merci bien sûr aux anciennes doctorantes. Il y a presque un an je vous voyais soutenir votre thèse. Maintenant que j'y suis, je ne sais pas vraiment si j'ai envie que ça se termine (même si la rédaction de thèse est une étape douloureuse). Tatiana, au fil des mois j'ai découvert qu'on avait plus de points communs qu'on aurait pu le croire au départ. Tu es un très bel exemple de réussite et je te souhaite tout le meilleur pour ce nouveau poste ! Cindy, impossible de ne pas te mentionner. Je pense que je dois surtout te remercier de m'avoir supportée pendant deux ans ! Deux ans que je pourrais résumer par : discussions (nombreuses), écoute, soutien, moments de convivialité, ... Je te souhaite également le meilleur pour ton futur poste de Maître de Conférences !

Enfin, un énorme merci au petit **Wilfried**. Si on m'avait dit que j'allais trouver « un double » au cours de ma thèse je n'y aurais pas cru. « Double » scientifique, « double » dans le travail, « double » dans le soutien, « double » dans les moments de détente à l'extérieur du travail, ... Le seul regret, n'avoir partagé le bureau avec toi qu'une seule année. Jeune Padawan, que la force soit avec toi pour ces deux années à venir !

Enfin, il m'est impensable de ne pas remercier mes piliers : **ma famille**.

Merci à mes grands-parents, à ma tata Pacrichia et mon tonton Runo, à ma marraine Christelle et JP. Merci à ma doudoune de sœur Arianne et à François, ainsi qu'à mon frère Sylvain. Un énorme merci également à Kévin, Lysiane, Sébastien et à la petite bouille d'Alexis qui apporte plein de bonheur à sa tata. Merci à vous d'avoir été présents au quotidien et de vous être intéressés à mon parcours. Vous avez toujours été de bons conseils, été là pour me soutenir et m'aérer l'esprit. Un grand merci en plus à Kévin (et ma maman) qui a pris le temps de relire avec attention mon manuscrit à la recherche de la moindre petite faute d'orthographe. Merci à mon Igloo pour son soutien infaillible, à travers des siestes interminables à mes côtés lorsque j'étais scotchée à l'ordinateur.

Mamouguy et Babouguy, je pensais que les mots allaient me venir spontanément mais finalement c'est la page blanche tellement ces quelques lignes me semblent ridicules en comparaison de tout ce que je vous dois. C'est aujourd'hui grâce à vous si je touche du doigt le métier vers lequel j'ai souhaité m'orienter. Finalement, j'ai aussi attrapé le virus de l'enseignement. Merci à vous de m'avoir encouragée, de m'avoir poussée à poursuivre cette voie malgré le doute qui parfois peut s'installer. Et après ces 10 années je peux enfin vous dire officiellement que les études sont terminées !!!

Mon Flo, on arrive au bout de cette deuxième thèse !!! Cette fois je peux te le dire : C'EST FINI !!! Que d'épreuves surmontées tout ce temps ... Avec le recul je sais combien ces trois années ont pu être difficiles pour toi. Un grand merci pour ton soutien infaillible, pour ton réconfort, pour tes petits plats, pour tes qualités de « femme de ménage », ... Merci d'avoir su me dire « stop » pour me sortir un peu la tête de cette intense thèse. Tu as été ma bouffée d'oxygène en de nombreuses occasions. Maintenant à nous la liberté !!! ILY.

Enfin, à toi ma thèse. Toi que j'ai aimée autant que détestée, toi qui m'as fait vibrer tant de fois mais qui m'as également fait couler « quelques » larmes. Mais surtout merci à toi car pendant ces trois années j'ai pu me révéler et grandir professionnellement.

Chers lecteurs, je vous souhaite (enfin je l'espère), une bonne lecture !

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS	1
LISTE DES TABLEAUX	4
ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE	10
1. Mucoviscidose.....	12
2. Le genre <i>Scedosporium</i>	38
3. Les histidine kinases : cibles thérapeutiques potentielles.....	68
4. Outils moléculaires	78
OBJECTIFS	95
PARTIE EXPERIMENTALE	98
Partie 1. Les histidines kinases : structure et distribution chez les eucaryotes	100
1. Introduction générale	101
2. L'étude de la structure et de la distribution des histidine kinases chez les champignons « inférieurs » (<i>Early Diverging Fungi</i>) : première description de protéines fongiques homologues aux récepteurs à hormones végétales	101
3. L'étude de la structure et de la distribution des histidine kinases chez les Saccharomycotina montre une perte progressive de ces protéines au cours de l'évolution des levures bourgeonnantes	115
4. Structure et distribution des histidines kinases chez les eucaryotes	128
Partie II. Les histidine kinases : caractérisation fonctionnelle chez <i>Scedosporium apiospermum</i>	218
1. Introduction générale	219
2. Matériels et méthodes	220
3. Identification de gènes codant des histidine kinases chez <i>S. apiospermum</i> IHEM 14462 et comparaison avec les autres espèces du genre <i>Scedosporium</i>	236
4. Marqueurs de sélection	246
5. Etude fonctionnelle des gènes histidine kinases chez <i>S. apiospermum</i>	258
Partie III. Développement d'outils moléculaires adaptés à <i>Scedosporium apiospermum</i>	304
1. Introduction générale	305
2. Casette de fluorescence	305

3.	Cassette de bioluminescence	318
4.	Conclusion générale	331
	DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	333
	BIBLIOGRAPHIE	343
	ANNEXES	362

LISTE DES ABREVIATIONS

4-PFP : 4-Para-Fluoro-Phénylalanine
 5-FAA : Acide 5-Fluoro-Anthranilique
 5-FOA : Acide 5-Fluoro-Orotique
 AAA : Alpha-Amino-Adipate
 ABPA : Aspergillose Broncho-Pulmonaire Allergique
 ACT1 : Actine
 ADN : Acide DésoxyriboNucléique
 AINS : Anti-Inflammatoire Non Stéroïdien
 ANR : Agence Nationale de la Recherche
 ARNm : Acide Ribonucléique Messenger
 ATP : Adénosine TriPhosphate
 CF : *Cystic Fibrosis*
 CFP : *Cyan Fluorescent Protein*
 CFTR : *Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*
 CgflUCopt : Luciférase de la luciole optimisée pour l'espèce *Candida glabrata*
 CMI : Concentration Minimale Inhibitrice
 Cre/loxP : *Causes recombination/locus of crossover in Phage P1*
 CRISPR : *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*
 DMSO : Di-Méthyl SulfOxyde
 EDF : *Early Diverging Fungi*
 EDTA : Ethylène-Diamine-Tétra-Acétique
 ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
 F508del : Délétion de la phénylalanine en position 508 du gène *CFTR*
 FLP/FRT : Flippase/*FLP recombinase target*
 fLUC : Luciférase de la luciole (*Photinus pyralis*)
 GEIHP : Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène
 GFP : *Green Fluorescent Protein*
 HK : Histidine Kinase
 HHK : Histidine Kinase Hybride
 HOG : *High Osmolarity Glycerol*
hph : Gène de résistance à l'hygromycine B
 HygB : Hygromycine B
 IBL : Imagerie de BioLuminescence
 IBPA : Infection Broncho-Pulmonaire Allergique

IHEM : *Institute of Hygiene and Epidemiology Mycology*
 IMH3B : Gène de résistance à l'acide mycophénolique
 ITS : *Internal Transcribed Spacer regions*
 JGI : *Joint Genome Institute*
 kb : Kilo-paire de bases
 LB : Luria Bertani
 LBA : Lavage Broncho-Alvéolaire
 LGT : *Lateral Gene Transfer*
 LUC : Luciférase
 Mabs : Anticorps monoclonaux
 MAPK : *Mitogen-Activated Protein Kinase*
 MLST : MultiLocus Sequence Typing
 NCBI : *National Center for Biotechnology Information*
 neo : Gène de résistance à la généticine
 NHEJ : *Non-Homologous End Joining*
 pb : Paire de bases
 PcFLP : Flippase optimisée pour l'espèce *Penicillium chrysogenum*
 PCR : *Polymerase Chain Reaction*
 PCR ESI-TOF/MS : *PCR ElectoSpray Ionization-Time Of Flight/Mass Spectrometry*
 PDA : *Potato Dextrose Agar*
 Phe508del : Délétion de la phénylalanine en position 508 du gène *CFTR*
 Phleo : Phléomycine
 pKS : Plasmide Bluescript II KS +
 PNN : PolyNucléaires Neutrophiles
 RAPD : Random Amplified Polymorphic DNA
 RF : Région Flaquante
 RFP : *Red Fluorescent Protein*
 SAR : Straménophiles, Alvéolates, Rhizaria
 SASM : *Staphylococcus aureus* Sensible à la Méthicilline
 SARM : *Staphylococcus aureus* Résistant à la Méthicilline
 SBPA : Scédosporiose Broncho-Pulmonaire Allergique
 Ser/Thr kinase : Sérine/Thréonine kinase
 Shble : Gène de résistance à la phléomycine
 SMC : Site Multiple de Clonage
 SNC : Système Nerveux Central
 TAE : Tris-Acétate EDTA
 TCS : *Two-Component System*
 TE : Tris-EDTA

TEF1 : *Translational Elongation Factor EF-1 alpha*

TIR : Trypsine ImmunoRéactive

Tyr kinase : Tyrosine kinase

URA5 : Orotate phosphoribosyltransférase

X-Gal : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside

YCB : *Yeast Carbon Base*

YFP : *Yellow Fluorescent Protein*

yeGFP : *Yeast-enhanced GFP*

YNB : *Yeast Nitrogen Base*

YPD : *Yeast Peptone Dextrose*

YPDA : *Yeast Peptone Dextrose Agar*

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I. Evolution de la clinique en fonction de l'âge des patients atteints de mucoviscidose.....	23
Tableau II. Caractéristiques culturelles et morphologiques des espèces appartenant au genre <i>Scedosporium/Pseudallescheria</i>	39
Tableau III. Essais de sensibilité de <i>S. apiospermum</i> IHEM 14462 à différents marqueurs de sélection	231
Tableau IV. Tests phénotypiques de sensibilité aux stressés menés sur <i>S. apiospermum</i> IHEM 14462 et la souche mutante <i>HHKIIIΔ</i>	234
Tableau V. Identification des gènes codant les protéines HHKs chez <i>Scedosporium apiospermum</i> IHEM 14462.....	237
Tableau VI. Identification des gènes codant les protéines HHKs chez <i>Scedosporium apiospermum</i> HDO1	238
Tableau VII. Identification des gènes codant les protéines HHKs chez <i>Scedosporium aurantiacum</i> WM 09.24.....	239
Tableau VIII. Identification des gènes codant les protéines HHKs chez <i>Scedosporium boydii</i> IHEM 23826	240
Tableau IX. Identification des gènes codant les protéines HHKs chez <i>Scedosporium dehoogii</i> 120008799-01/4	241
Tableau X. Vecteurs plasmidiques utilisés dans les stratégies de clonage des cassettes de délétion des gènes <i>HHKs</i>	256
Tableau XI. Souches générées au cours des essais de transgénèse	257
Tableau XII. Amorces utilisées pour le développement des cassettes de délétion et de complémentation du gène <i>HHKIII</i>	259
Tableau XIII. Amorces utilisées pour le développement des cassettes de délétion du gène <i>HHKX</i>	260
Tableau XIV. Sensibilité des sites de restriction enzymatiques, utilisés au cours des différentes stratégies de clonage dans cette étude, aux méthylases bactériennes	282
Tableau XV. Amorces utilisées pour le développement des cassettes de délétion des gènes <i>HHKV, VI, VIII</i> et <i>XI_1</i>	294
Tableau XVI. Vecteurs plasmidiques utilisés dans les stratégies de clonage de la cassette de fluorescence	309
Tableau XVII. Amorces utilisées pour la construction de la cassette de fluorescence	309
Tableau XVIII. Tableau d'usage des codons pour <i>Scedosporium apiospermum</i> IHEM 14462	319
Tableau XIX. Vecteurs plasmidiques utilisés dans les stratégies de clonage de la cassette de bioluminescence	320
Tableau XX. Amorces utilisées pour le développement de la cassette de bioluminescence	321

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Evolution du nombre de patients atteints de mucoviscidose et proportions des enfants et des adultes impactés par la maladie, A. en France et B. en Europe	11
Figure 2. Prévalence de la mucoviscidose par département français	13
Figure 3. Prévalence mondiale de la mucoviscidose à la naissance et distribution mondiale des mutations du gène <i>Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator (CFTR)</i>	14
Figure 4. Structure du gène <i>CFTR</i> identifié en 1989 sur le bras long du chromosome 7 (q31.2)	15
Figure 5. Structure de la protéine CFTR.....	15
Figure 6. Cascade de phosphorylation activant le canal chlore de la protéine CFTR	15
Figure 7. Classification des mutations du gène CFTR en fonction de leur impact sur la protéine CFTR ...	17
Figure 8. Physiopathologie de l'atteinte pulmonaire au cours de la mucoviscidose	19
Figure 9. Diagnostic de la mucoviscidose.....	21
Figure 10. Principaux organes impactés par la mucoviscidose	21
Figure 11. Avancées thérapeutiques dans le cadre de la mucoviscidose.....	25
Figure 12. Proportions des infections bactériennes chez les patients atteints de mucoviscidose	31
par classe d'âge	31
Figure 13. Fréquence et pouvoir pathogène des principales espèces fongiques rencontrées dans les voies aériennes des patients atteints de mucoviscidose et qui n'ont pas reçu de greffe	33
Figure 14. Positionnement du genre <i>Scedosporium</i> au sein du règne fongique, d'après le JGI	37
Figure 15. Schématisation des ascospores décrites chez les Microascaceae	37
Figure 16. Phylogénie actuelle des espèces du genre <i>Scedosporium</i>	41
Figure 17. Description des organes pouvant être colonisés et/ou infectés par <i>Scedosporium</i>	48
Figure 18. Aspects microscopiques des espèces du genre <i>Scedosporium</i>	55
Figure 19. Aspect macroscopique et microscopique de 5 espèces du genre <i>Scedosporium</i>	58
Figure 20. Marqueurs nutritionnels, antimétabolites et voies de biosynthèse respectives	77
Figure 21. Schématisation de la stratégie d'inactivation de gènes par recombinaison homologue	79
Figure 22. Intérêt de l'ingénierie d'une souche réceptrice <i>ku70Δ</i> , <i>ku80Δ</i> ou <i>lig4Δ</i> chez les champignons filamenteux	81
Figure 23. La superfamille des recombinases	83
Figure 24. Mécanismes de la recombinaison site-spécifique.....	84
Figure 25. Mécanismes moléculaires mis en jeu dans les systèmes d'inactivation multiple de gènes <i>Cre/loxP</i> , <i>FLP/FRT</i> et β - <i>rec/six</i>	84
Figure 26. Stratégies de recyclage du marqueur de résistance aux drogues à l'aide des systèmes d'inactivation multiple de gènes <i>Cre/loxP</i> , <i>FLP/FRT</i> et β - <i>rec/six</i>	85

Figure 27. Schématisation des systèmes d'inactivation multiple de gènes Cre/ <i>loxP</i> , FLP/ <i>FRT</i> et β -rec/ <i>six</i> , développés chez les champignons filamenteux.	87
Figure 28. Schématisation d'un système d'expression	89
Figure 29. Imagerie de bioluminescence chez les pathogènes fongiques.....	91
Figure 30. Protéines fluorescentes et applications chez les champignons	93
Figure 31. Phylogénie de 80 espèces levuriformes	116
Figure 32. Principe de la construction d'une cassette d'inactivation par PCR fusion	225
Figure 33. Schématisation du montage permettant le transfert neutre de l'ADN lors du Southern blot.	229
Figure 34. Phylogénie estimée des séquences histidine kinases hybrides prédites des espèces du genre <i>Scedosporium</i>	243
Figure 35. Sensibilité des spores de la souche <i>Scedosporium apiospermum</i> IHEM 14462 aux différents marqueurs nutritionnels testés, après 7 jours de culture	247
Figure 36. Génération de mutants spontanés auxotrophes au tryptophane chez <i>S. apiospermum</i> IHEM 14462.....	248
Figure 37. Génération de mutants spontanés auxotrophes à l'uracile et/ou l'uridine chez <i>S. apiospermum</i> IHEM 14462	249
Figure 38. Sensibilité des spores de la souche <i>Scedosporium apiospermum</i> IHEM 14462 aux différentes drogues testées, après 7 jours de culture	251
Figure 39. Sensibilité des protoplastes de la souche <i>Scedosporium apiospermum</i> IHEM 14462 aux différentes drogues testées, après 7 jours de culture	253
Figure 40. Construction des cassettes de délétion AHHKIII.7 et AHHKX.7 dans le vecteur plasmidique pAN7-1, AHHKIII.8 et AHHKX.8 dans le vecteur plasmidique pAN8-1	261
Figure 41. Amplification des fragments 5'RF et 3'RF des gènes <i>HHKIII</i> et <i>HHKX</i> nécessaires à la construction des cassettes de délétion AHHKIII.7, AHHKIII.8, AHHKX.7 et AHHKX.8 par clonage dans les plasmides pAN7-1 et le pAN8-1	263
Figure 42. Construction des cassettes de délétion AHHKIII.F et AHHKX.F par PCR fusion	263
Figure 43. Amplification des fragments de PCR nécessaires à la construction des cassettes de délétions AHHKIII.F et AHHKX.F et génération des cassettes de délétion par PCR fusion	264
Figure 44. Amplification des fragments 5'RF et 3'RF des gènes <i>HHKIII</i> et <i>HHKX</i> nécessaires à la construction des cassettes de délétion AHHKIII.1 et AHHKX.1 par clonage dans le pPV189.....	264
Figure 45. Construction des cassettes de délétion AHHKIII.1 et AHHKX.1 dans le vecteur plasmidique pPV189	266
Figure 46. Vérification des constructions plasmidiques pAHHKIII.1 et pAHHKX.1	267
Figure 47. Stratégie globale d'inactivation de gènes adoptée au laboratoire pour <i>S. apiospermum</i>	269
Figure 48. Caractérisation moléculaire des transformants AHSaHHKIII.1 par PCR	272
Figure 49. Caractérisation moléculaire des transformants AHSaHHKIII.1.111A et AHSaHHKIII.2.2B, 8A, 10C et 32A par Southern blot	274

Figure 50. Caractérisation moléculaire des transformants AHSaHHKIII.1.111A et AHSaHHKIII.2.2B, 8A, 10C par Southern blot	274
Figure 51. PCR de vérification de l'excision du marqueur de sélection à l'hygromycine B chez les mutants AHSaHHKIII.2.....	276
Figure 52. Caractérisation moléculaire des transformants AHSaHHKIII.2.X228 et Y19 par Southern blot	276
Figure 53. Amplification des fragments de PCR nécessaires à la construction de la cassette de complémentation du gène <i>HHKIII</i> par clonage dans la pBluescript II KS +	278
Figure 54. Construction de la cassette de complémentation AHHKIII.R dans le vecteur plasmidique pBluescript II KS +.....	279
Figure 55. Excision du fragment HPH_R du pGEM [®] -T Easy	281
Figure 56. Amplification des fragments de PCR HPH_Rbis nécessaire à la construction de la cassette de complémentation du gène <i>HHKIII</i> par clonage dans la pBluescript II KS +	281
Figure 57. Etudes phénotypiques des mutants AHSaHHKIII : aspect macroscopique	284
Figure 58. Etudes phénotypiques des mutants AHSaHHKIII : aspect microscopique	286
Figure 59. Etude phénotypique des mutants AHSaHHKIII : sensibilité aux stressés	287
Figure 60. Iprodione, protéine HHKIII et régulation de la voie HOG (pour <i>High Osmolarity Glycerol</i>)..	290
Figure 61. Caractérisation moléculaire des transformants AHSaHHKX.F par Southern blot.....	292
Figure 62. Caractérisation moléculaire des transformants AHSaHHKX.1 par Southern blot	292
Figure 63. Amplification des fragments 5'RF et 3'RF des gènes <i>HHKV</i> , <i>HHKVI</i> , <i>HHKVIII</i> et <i>HHKXI_1</i> nécessaires à la construction des cassettes de délétion AHHKV.7, AHHKVI.7, AHHKVIII.7 et AHHKXI_1.7 par clonage dans le plasmide pAN7-1.....	295
Figure 64. Construction des cassettes de délétion AHHKV.1 et AHHKXI_1.1 dans le vecteur plasmidique pAN7-1	297
Figure 65. Amplification des fragments 5'RF et 3'RF des gènes <i>HHKV</i> , <i>HHKVI</i> , <i>HHKVIII</i> et <i>HHKXI_1</i> nécessaires à la construction des cassettes de délétion AHHKV.1, AHHKVI.1, AHHKVIII.1 et AHHKXI_1.1 par clonage dans le pPV189	299
Figure 66. Construction des cassettes de délétion AHHKV.1, AHHKVI.1, AHHKVIII.1 et AHHKX.1 dans le vecteur plasmidique pPV189	300
Figure 67. Vérification des constructions plasmidiques pAHHKV.1, pAHHKVI.1, pAHHKVIII.1 et pAHHKXI_1	301
Figure 68. Schématisation de la cassette de fluorescence	306
Figure 69. Optimisation de la taille de la cassette de sélection à l'hygromycine B	306
Figure 70. Amplification des fragments de PCR nécessaires à la construction de la cassette de fluorescence par clonage dans le plasmide pAYCU171.....	310
Figure 71. Construction de la cassette de fluorescence par clonage dans le plasmide pAYCU171.....	311
Figure 72. Vérification de la construction plasmidique pAHSaGFP.2.....	313
Figure 73. Fluorescence chez <i>Scedosporium apiospermum</i> IHEM 14462	313

Figure 74. Amplification du fragment yeGFP_F1	314
Figure 75. Amplification du fragment de PCR nécessaire à la construction de la cassette de fluorescence par clonage dans le plasmide pAHSaGFP.2	314
Figure 76. Construction de la cassette de fluorescence par clonage dans le plasmide pAHSaGFP.2	315
Figure 77. Vérification de la construction plasmidique pAHSaGFP.3	317
Figure 78. Schématisation de la cassette de bioluminescence	317
Figure 79. Construction de la cassette de fluorescence par PCR fusion	322
Figure 80. Amplification des fragments de PCR nécessaires à la construction de la cassette de bioluminescence par PCR fusion	322
Figure 81. Résultats de la PCR fusion	324
Figure 82. Construction de la cassette de bioluminescence par clonage dans le pBluescript II KS + ...	325
Figure 83. Amplification des fragments de PCR nécessaires à la construction de la cassette de bioluminescence par clonage dans le pBluescript II KS +	327
Figure 84. Excision du fragment CgflUC_2 du pGEM [®] -T Easy	328
Figure 85. Amplification des seconds fragments de PCR nécessaires à la construction de la cassette de bioluminescence par clonage dans le pBluescript II KS +	329
Figure 86. Construction de la cassette de bioluminescence par clonage dans le pAHSaGFP.2	330

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

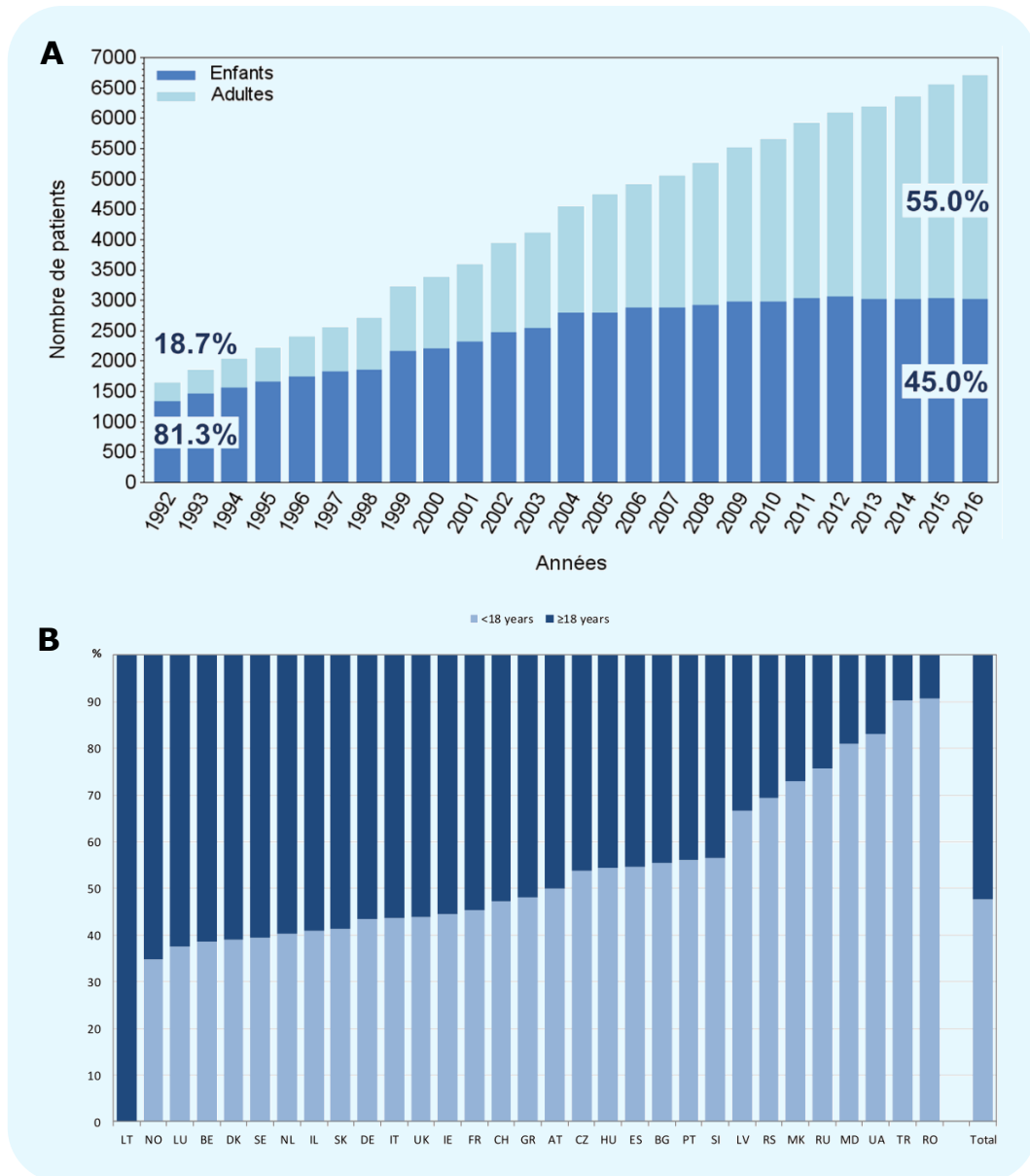


Figure 1. Evolution du nombre de patients atteints de mucoviscidose et proportions des enfants et des adultes impactés par la maladie, A. en France et B. en Europe, de Bellis *et al.* (2017) et ECFSPR (2017).

1. Mucoviscidose

La mucoviscidose, ou encore fibrose kystique (CF en anglais pour *cystic fibrosis*), a été décrite pour la première fois à la fin des années 30 (Andersen, 1938). C'est une maladie génétique rare caractérisée par la transmission autosomique récessive de deux allèles défectueux, qui touche à la fois les enfants et les adultes. Il s'agit du désordre génétique le plus fréquemment observé dans la population caucasienne (Europe, Amérique du Nord et Australie) (Fanen *et al.*, 2014). Bien que la prise en charge s'améliore de jour en jour, cette pathologie chronique évolutive n'est pas anodine puisqu'elle peut encore aujourd'hui entraîner la mort du sujet (Bellis *et al.*, 2017) et qu'aucun traitement curatif n'est disponible à ce jour. De nombreuses revues détaillent l'ensemble des aspects attenants à ce désordre génétique (Ratjen et Döring, 2003 ; Davis, 2006 ; Romey, 2006 ; O'Sullivan et Freedman, 2009 ; Boyle et De Boeck, 2013 ; Cant *et al.*, 2014 ; Fanen *et al.*, 2014 ; Amaral, 2015 ; Elborn, 2016 ; Panrajape & Mogayzel, 2018).

1.1. Epidémiologie

1.1.1. Populations affectées

En France, l'incidence de la mucoviscidose est estimée à environ 1 naissance sur 4500 (Bellis *et al.*, 2017). En 2016, environ 6760 patients atteints de mucoviscidose ont été recensés en France contre 44 720 en Europe (ECFSPR, 2017). En France, environ 180 nouveaux patients ont été diagnostiqués en 2016 (Bellis *et al.*, 2017). Auparavant la mucoviscidose impactait majoritairement les enfants. Actuellement, avec la mise en place du dépistage néo-natal, la kinésithérapie et les traitements antimicrobiens, la tendance s'inverse et la mucoviscidose impacte principalement la vie des adultes (Elborn, 2016). En France, les adultes comptent pour 55% de l'effectif total (Figure 1.A) (Bellis *et al.*, 2017) contre 52,5% en Europe (Figure 1.B) (ECFSPR, 2017). Cette pathologie touche indifféremment les hommes et les femmes (Bellis *et al.*, 2017 ; ECFSPR, 2017).

D'autre part, la prévalence de cette maladie est très variable d'une région du monde à une autre, mais également en fonction des régions dans un même pays. Par exemple en France, la prévalence de la mucoviscidose est plus élevée à l'Ouest, au Nord et au Sud-Est du pays ainsi qu'au Nord de la Corse et en Guyane (Figures 2 et 3) (Bellis *et al.*, 2017).

1.1.2. Espérance de vie

Dans les années 50, l'espérance de vie des patients mucoviscidosiques n'était que de quelques mois. Elle est aujourd'hui supérieure à 40 ans dans les pays industrialisés (Elborn, 2016 ; ECFSPR, 2017). Parmi les patients recensés en France, 11,3% ont plus de 40 ans bien que l'âge moyen de la population mucoviscidosique reste jeune puisqu'il est de 22 ans (Bellis *et al.*, 2017). La prise en charge multidisciplinaire et l'amélioration de la qualité de vie des patients contribuent à l'allongement de l'espérance de vie de cette population (ex. kinésithérapie, antibiothérapie, ré-équilibrage des déficits nutritifs) (Cohen-Cyberknoh *et al.*, 2011). D'autre part, les connaissances sur l'origine de la maladie, la

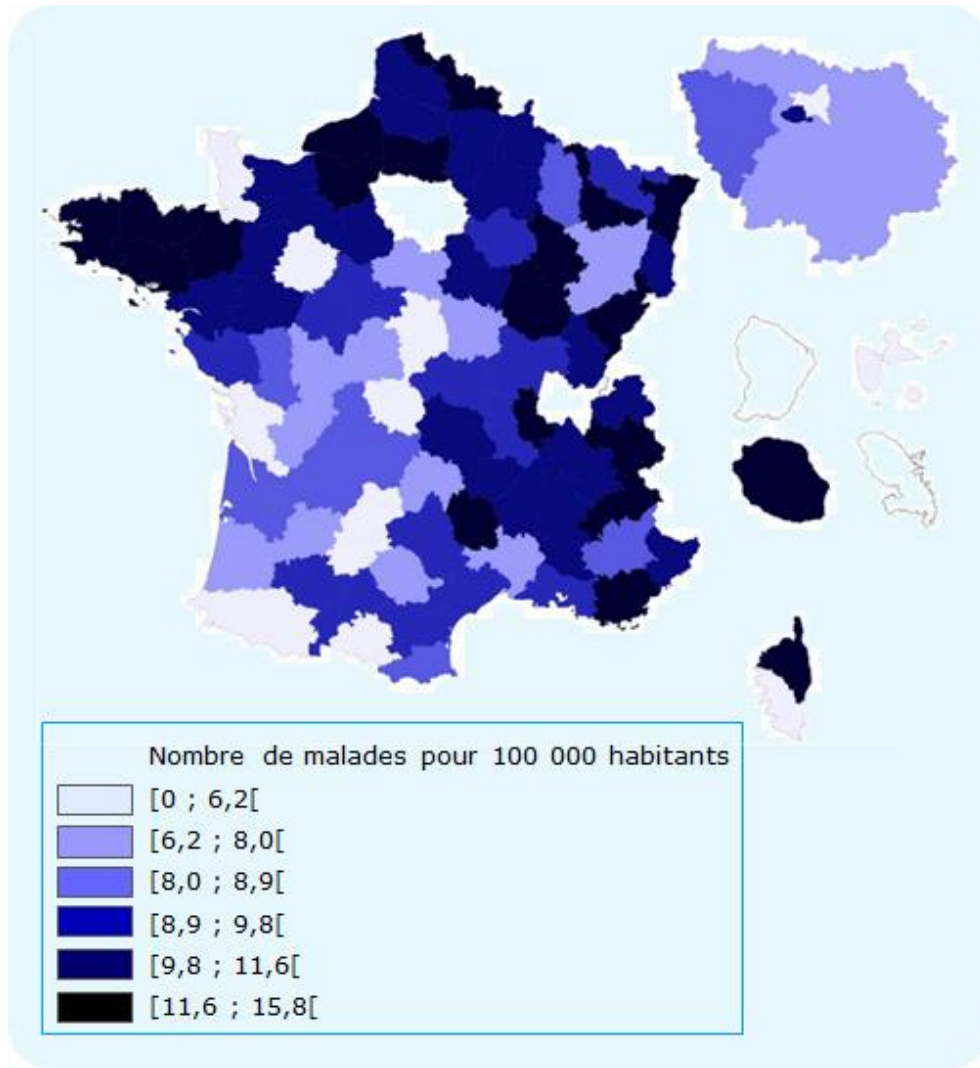


Figure 2. Prévalence de la mucoviscidose par département français, de Bellis et al. (2017).

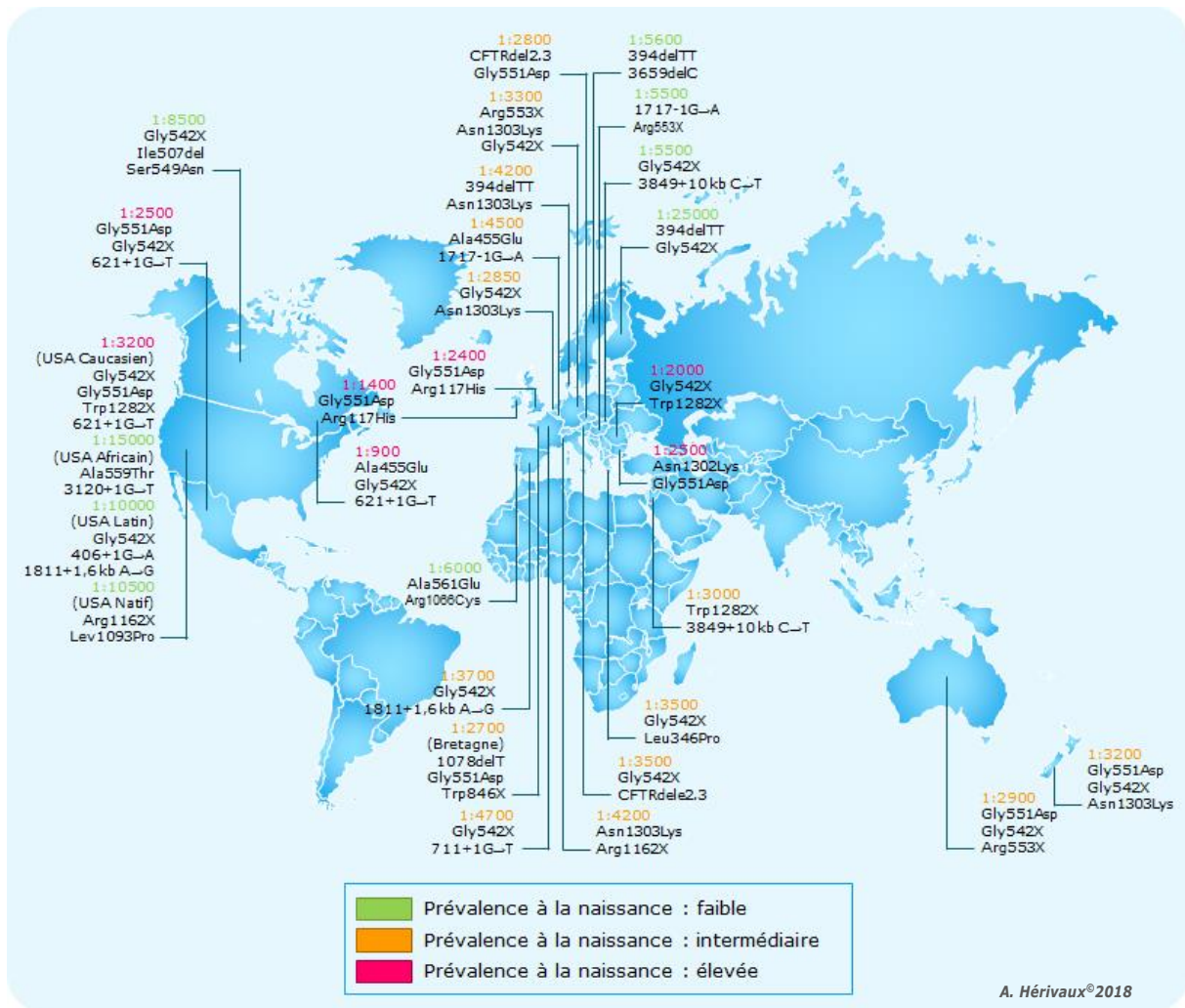


Figure 3. Prévalence mondiale de la mucoviscidose à la naissance et distribution mondiale des mutations du gène *Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator (CFTR)*, d'après O'Sullivan et Freedman (2009) et Servier Medical Art.

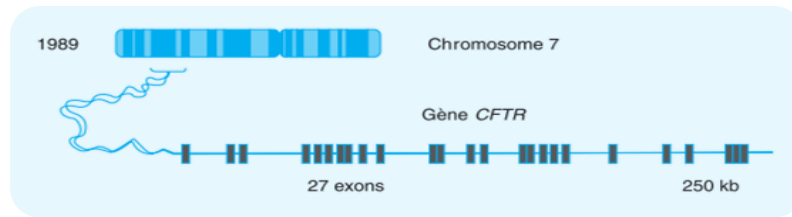


Figure 4. Structure du gène *CFTR* identifié en 1989 sur le bras long du chromosome 7 (q31.2), d'après Romey (2006).

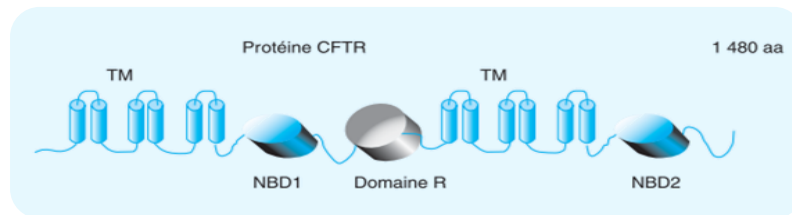


Figure 5. Structure de la protéine *CFTR*, d'après Romey (2006).

La protéine *CFTR* correspond à un canal chlore qui se compose de deux régions transmembranaires hydrophobes (TM) qui elles-mêmes se composent de six hélices α , de deux domaines de liaison à des nucléotides (NBD pour Nucleotide Binding Domains) dont des séquences de liaison à l'ATP et d'un unique domaine de régulation cytoplasmique R comportant probablement des sites de phosphorylation de la protéine kinase A.

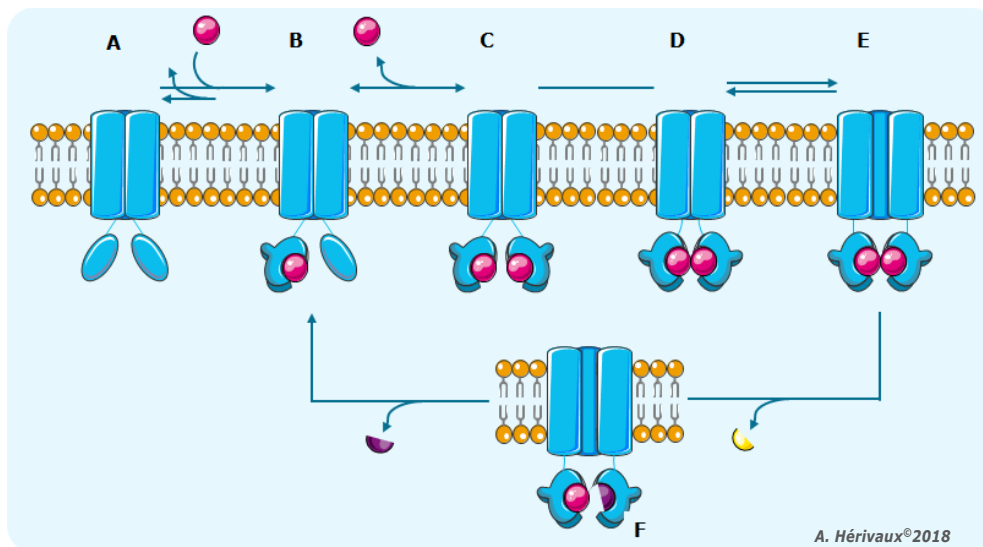


Figure 6. Cascade de phosphorylation activant le canal chlore de la protéine *CFTR*, d'après Gadsby et al. (2006) et Servier Medical Art.

A. Le canal chlore est initialement fermé. Le domaine R n'est pas représenté ici. **B.** Une molécule d'ATP (Adénosine Tri-Phosphate, en rose) se fixe au domaine NBD1 (Nucleotide Binding Domain) (en bleu). **C.** Une seconde molécule d'ATP se fixe au domaine NBD2. **D.** Une modification de conformation permet aux deux domaines NBD de se rapprocher formant ainsi un hétérodimère. **E.** La modification de conformation permet l'ouverture du canal chlore. **F.** La conformation ouverte est déstabilisée suite à l'hydrolyse de la molécule d'ATP fixée au NBD2, libérant un phosphate inorganique. La perte du phosphate inhibe l'hétérodimère. La molécule d'ADP (Adénosine Di-Phosphate) du domaine NBD2 est relarguée ce qui entraîne la fermeture du canal chlore.

structure du gène *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* (*CFTR*) et la fonction de la protéine correspondante ont permis le développement de nouvelles thérapies (Cohen-Cyberknoh *et al.*, 2011). Actuellement la principale cause de mortalité chez les patients atteints de mucoviscidose reste la détresse respiratoire pour les individus qui ne reçoivent pas de greffe de poumons. La dégradation de la fonction respiratoire est associée aux infections et à l'inflammation chronique des voies ariennes (Cant *et al.*, 2014 ; Elborn, 2016).

L'augmentation de l'espérance de vie est aussi la conséquence de la mise en place du dépistage néonatal qui repose sur la détection de la trypsine immunoréactive (TIR). Elle reflète la fonction pancréatique et permet une prise en charge précoce et adaptée du patient, notamment en Europe (O'Sullivan et Freedman, 2009 ; Elborn, 2016). En France, il a été instauré au début des années 2000 et en 2016, 50% des patients ont été diagnostiqués dans les deux mois après leur naissance grâce à ce test (Bellis *et al.*, 2017). Cependant, il faut rester prudent car il se peut que le diagnostic chez le nourrisson ne soit pas confirmé mais que celui-ci développe les symptômes de la mucoviscidose en vieillissant, vers l'âge de 20 ans (ex. bronchiectasie, pancréatite, infertilité) (Elborn, 2016). Ce retard s'explique par la synthèse d'une protéine CFTR qui a conservé une activité résiduelle. Bien que pris en charge tardivement, cette catégorie de patients présente tout de même une espérance de vie élevée puisque le phénotype développé sera moins sévère dans l'ensemble.

1.2. Anomalie génétique

1.2.1. Gène *CFTR*

Le gène *CFTR* a été identifié en 1989 sur le bras long du chromosome 7 (7q31.2) (Kerem *et al.*, 1989 ; Riordan *et al.*, 1989 ; Rommens *et al.*, 1989). Il se compose de 250 kb entrecoupées de 27 exons (Figure 4) (Romey, 2006).

1.2.2. Protéine *CFTR*

La glycoprotéine *CFTR*, codée par le gène *CFTR*, est une protéine membranaire de 1480 acides aminés qui s'exprime au pôle apical des cellules épithéliales d'origines variées (ex. glandes sudoripares, sinus, poumons, pancréas, foie, appareil reproducteur) (Figure 5) (Collins *et al.*, 1992). Elle appartient à la famille des transporteurs ATP-binding cassette puisque son activité est ATP-dépendante (Figure 6). Elle correspond à un canal ionique qui est impliqué dans les échanges d'ions chlorures principalement, et d'ions bicarbonates à plus petite échelle, entre la cellule épithéliale et l'environnement extracellulaire. Elle régule également le tunnel épithélial sodique. Ces échanges ioniques influencent les caractéristiques du mucus extracellulaire des cellules épithéliales (hydratation, viscosité, pH) (Collins, 1992 ; Boyle et De Boeck, 2013 ; Cant *et al.*, 2014 ; Elborn, 2016).

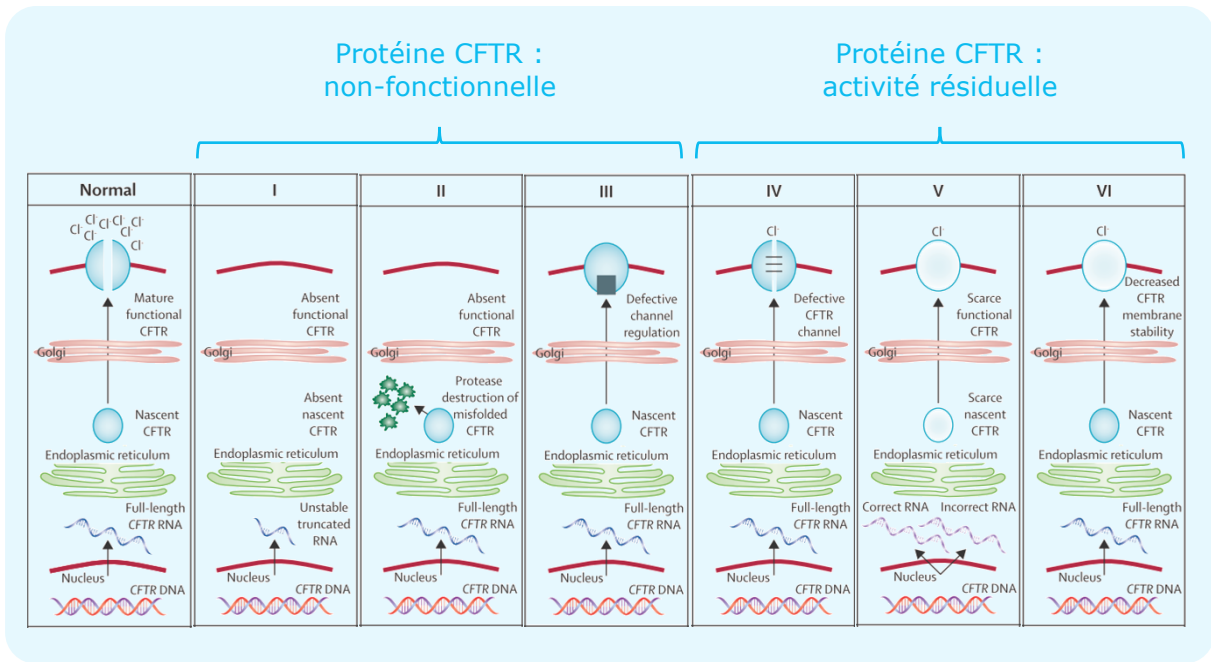


Figure 7. Classification des mutations du gène CFTR en fonction de leur impact sur la protéine CFTR, d'après Boyle et De Boeck (2013).

1.2.3. Origine de la mucoviscidose

La mucoviscidose est la conséquence de la mutation du gène *CFTR*. De plus, la transmission étant autosomique récessive, le patient qui possède le phénotype de la mucoviscidose est porteur d'une mutation sur chacun des deux allèles du gène, qualifiés d'allèles récessifs.

Aujourd'hui, plus de 2000 mutations ont été identifiées ([Cystic Fibrosis Centre HfSC. The CFTR Mutation Database](#)). La distribution géographique des mutations dans la population est variable (**Figure 3**). Seule une vingtaine d'entre elles ont une fréquence supérieure à 0.1% dans la population. La majorité des mutations sont donc ponctuelles dans la population mucoviscidosique c'est-à-dire famille-dépendantes ([Bobadilla et al., 2002](#)). La mutation du gène *CFTR* entraînant la délétion récessive de la phénylalanine en position 508 du gène *CFTR* (F508del ou Phe508del) ([Cant et al., 2014](#)) est la mutation la plus fréquemment identifiée dans la population caucasienne du Nord de l'Europe ([Elborn, 2016](#) ; [ECFSPR, 2017](#)). Dans le monde, 90% de la population atteint de mucoviscidose présenterait cette mutation sur au moins un des deux allèles du gène *CFTR* parmi lesquels 50% seraient homozygotes pour cette mutation ([Boyle et De Boeck, 2013](#)). En France et en Europe, plus de 80% des patients possèdent au moins un allèle impacté par cette mutation ([Bellis et al., 2017](#) ; [ECFSPR, 2017](#)).

Les mutations du gène *CFTR* sont réparties selon six classes (**Figure 7**) ([Welsh and Smith, 1993](#) ; [Boyle et De Boeck, 2013](#) ; [Cant et al., 2014](#) ; [Amaral, 2015](#) ; [Elborn, 2016](#)). Chaque classe est associée à un effet particulier concernant la fonction, la structure, la stabilité ou la régulation de l'expression de la protéine ([Boyle et De Boeck, 2013](#) ; [Fanen et al., 2014](#)). Plus précisément, i) la classe I agit dans le noyau cellulaire et engendre la synthèse partielle de la protéine *CFTR* via la présence de codons stop prématurés qui entraînent la production d'un ARN instable et tronqué et/ou des insertions et délétions qui décalent le cadre de lecture, ii) la classe II impacte la maturation de la protéine, pourtant synthétisée entièrement, empêchant l'adressage de la protéine à la membrane apicale de la cellule épithéliale qui sera alors dégradée par des protéases dans le réticulum endoplasmique puisque sa glycosylation ne sera pas possible, iii) la classe III perturbe la régulation du canal chlore en empêchant la fixation de l'ATP et donc l'ouverture du canal au niveau de la membrane cellulaire, iv) la classe IV dénature la structure du canal chlore et donc sa stabilité au niveau de la membrane de la cellule épithéliale ce qui diminuera la sélectivité et la conductance du canal ionique, v) la classe V diminue l'abondance et la stabilité des transcrits de la protéine *CFTR* dans le noyau de la cellule, qui est pourtant complètement fonctionnelle, limitant son adressage au pôle apical de la cellule épithéliale, et enfin vi) la classe VI, bien que rarement décrite, altère la stabilité de la protéine *CFTR* à la membrane apicale donc diminue son taux de fonctionnalité et entraîne la dégradation précoce de la protéine. En résumé, les classes I à III qui comprennent les mutations les plus communément retrouvées dans la population mondiale aboutissent à la non-fonctionnalité de la protéine *CFTR*, d'où un phénotype sévère souvent associé à une insuffisance hépatique. En revanche, les classes IV à VI sont associées à une activité résiduelle de la protéine *CFTR* donc l'atteinte pulmonaire est moins importante tout comme pour le pancréas et le foie ([Ratjen et Döring, 2003](#)). Certaines mutations peuvent

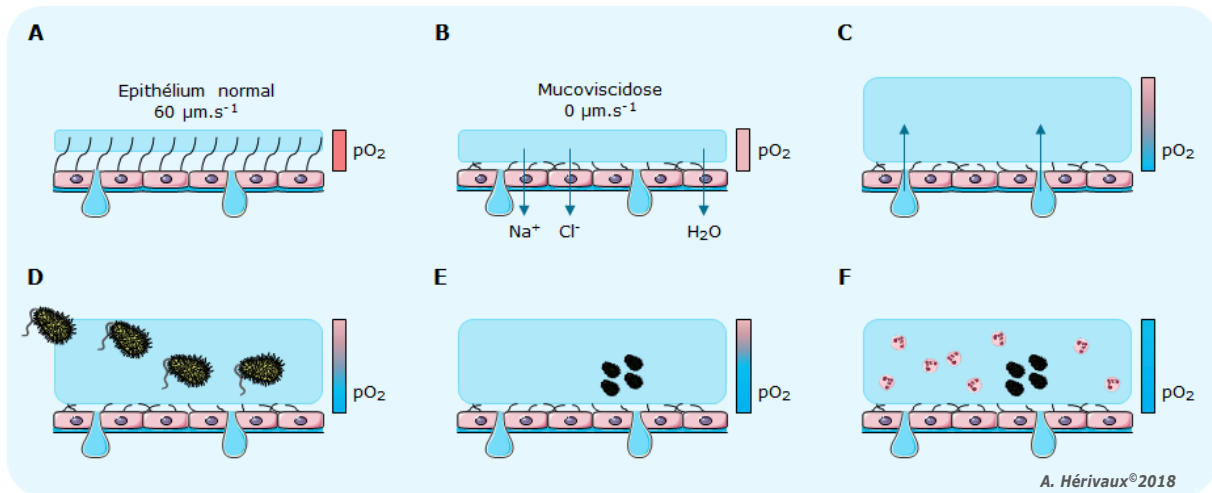


Figure 8. Physiopathologie de l'atteinte pulmonaire au cours de la mucoviscidose, d'après Ratjen et Döring (2003).

Le mucus est représenté en bleu ; les cellules épithéliales pulmonaires sont représentées par les rectangles roses ; le gradient d'oxygène est représenté sur la droite de chaque illustration : en rouge s'il n'y a pas d'hypoxie et en bleu si l'environnement est hypoxique. **A.** Chez l'individu sain, les échanges d'ions chlorures et sodiums sont équilibrés permettant une hydratation normale du mucus, qui est présent en fine couche. La clairance muco-ciliaire est efficace. En revanche, chez l'individu atteint de mucoviscidose, **B.** le mucus est épais et visqueux à cause de l'hyposécrétion d'ions chlorures et l'hyperabsorption d'ions sodiums qui entraînent une absorption anormale d'eau et la déshydratation du mucus. La clairance muco-ciliaire est donc déficiente. **C.** La sécrétion excessive de mucus va obstruer les voies aériennes et un gradient d'oxygène se met en place. **D.** L'hypoxie est détectée par les bactéries qui vont pénétrer dans le mucus et y rester piégées, jusqu'à **E.** s'y développer et engendrer une infection voire une colonisation. **F.** La réponse immunitaire du patient se développe conduisant à l'inflammation des voies aériennes par la sécrétion importante de polynucléaires neutrophiles dont l'action n'est pas optimale à cause de l'hypoxie du mucus.

être affiliées à plusieurs classes à la fois. Par exemple, la mutation F508del généralement associée à la classe II des mutations présente également des défauts qui s'apparentent aux classes III et VI (Amaral, 2015).

Une nouvelle classification des mutations affectant le gène *CFTR* a été proposée en 2008. Elle associe la mutation au phénotype qu'elle entraîne et propose quatre groupes distincts. Ainsi, i) le groupe A entraîne la mucoviscidose classique, ii) le groupe B induit la mucoviscidose non classique, iii) le groupe C ne semble pas entraîner de conséquences cliniques, et iv) le groupe D pour lequel l'impact des mutations du gène *CFTR* sur l'organisme n'est pas bien défini (Castellani *et al.*, 2008). Cependant, cette catégorisation est limitante car le génotype ne reflétant pas le niveau de l'atteinte pulmonaire chez le patient elle ne doit en aucun cas servir de facteur pronostic. Les notions de « mucoviscidose classique » et « mucoviscidose non classique » seront détaillées ultérieurement (cf Analyse bibliographique, 1.4. Manifestations cliniques).

1.2.4. Conséquences d'une protéine CFTR déficiente

Suite à la mutation du gène *CFTR*, la protéine CFTR qui en résulte sera déficiente. Des anomalies de transport des ions chlorures et sodium (hyper réabsorption de fluides et de sodium) entraîne la déshydratation du mucus qui devient épais et visqueux et qui s'accumule notamment dans les poumons des patients. La clairance muco-ciliaire est donc affectée (Boyle et De Boeck, 2013 ; Cant *et al.*, 2014 ; Elborn, 2016). Des anomalies dans le transport des ions bicarbonates sont également observées entraînant une modification du pH à la surface de l'épithélium pulmonaire. Ainsi, les peptides antimicrobiens issus de l'immunité innée voient leur action pH-dépendante diminuée, ce qui explique le développement possible d'infections bactériennes par ces patients. Le pH joue également un rôle important dans les propriétés intrinsèques du mucus (Elborn, 2016). Ainsi, les micro-organismes se retrouvent piégés dans le mucus de l'épithélium respiratoire et ne peuvent être évacués à cause d'une clairance muco-ciliaire défectueuse. Les infections entraînent alors l'inflammation des voies respiratoires qui perdurera et favorisera le développement de nouvelles infections (Figure 8).

1.3. Diagnostic

Le diagnostic de la mucoviscidose est envisagé si l'individu présente des symptômes cliniques, s'il existe un contexte familial ou si le dépistage néo-natal est positif (augmentation de la TIR sanguine pendant la vie fœtale et les premiers mois de vie du nourrisson qui reflète une anomalie pancréatique (Bellis *et al.*, 2017)). Le premier examen d'orientation réside sur le test de la sueur et sa concentration en chlore. Si la concentration en ions chlorures est supérieure à 60 mmol.L⁻¹ sur deux dosages successifs, alors le diagnostic de mucoviscidose est avéré. Si la concentration en ions chlorures de la sueur est comprise entre 40 et 60 mmol.L⁻¹, le diagnostic est incertain et le clinicien procèdera au génotypage des principales mutations. Le diagnostic est confirmé si les 2 allèles du gène *CFTR* sont mutés. En revanche il est écarté si aucune mutation n'est retrouvée sur aucun des deux allèles. Cependant, si un seul allèle est muté, les investigations sont poursuivies. Les cliniciens recherchent par exemple des anomalies pulmonaires ou

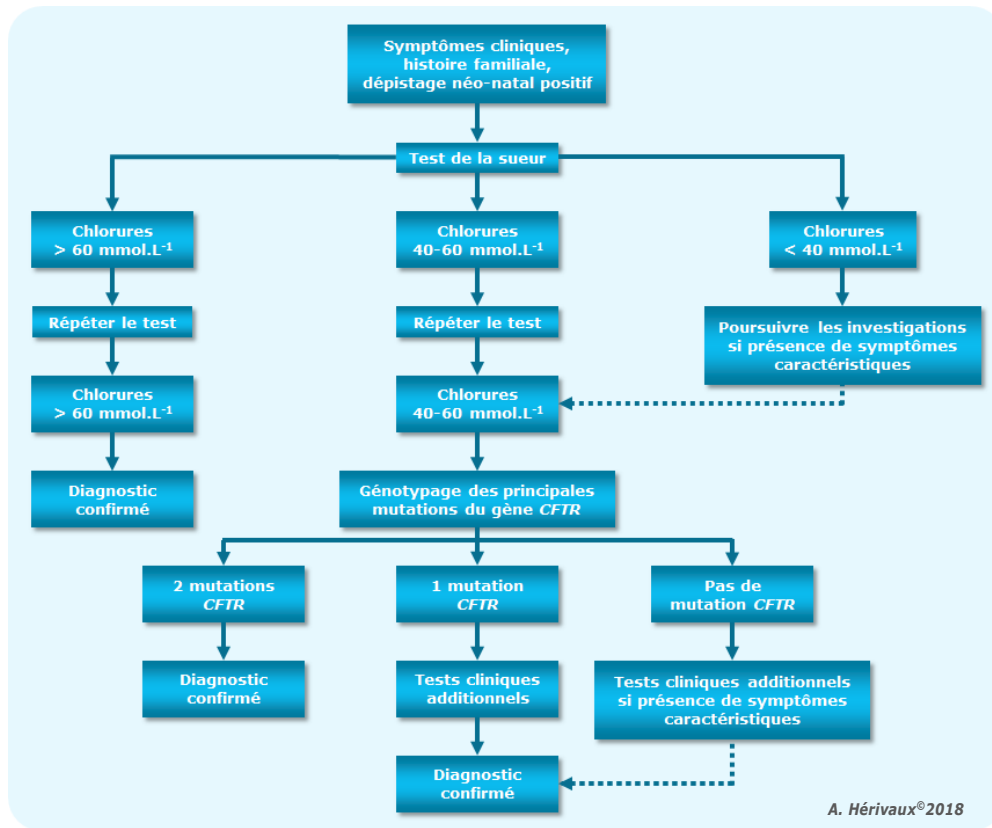


Figure 9. Diagnostic de la mucoviscidose, d'après Ratjen et Döring (2003).

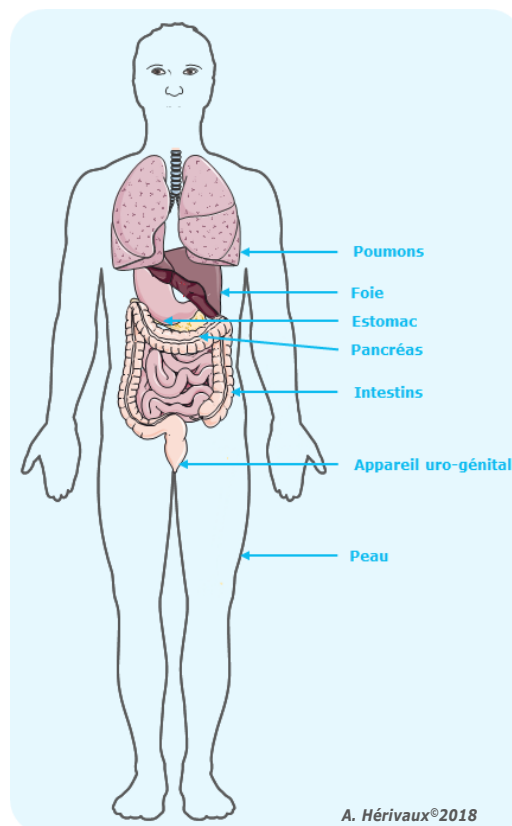


Figure 10. Principaux organes impactés par la mucoviscidose, d'après Fanen (2014), Amaral (2015) et Servier Medical Art.

hépatiques caractéristiques de la pathologie (**Figure 9**) (Ratjen et Döring, 2003 ; Amaral, 2015 ; Bellis *et al.*, 2017 ; Paranjape et Mogayzel, 2018). Il est important de garder en mémoire que pour développer des symptômes, l'individu doit posséder 2 allèles récessifs. S'il n'en possède qu'un, il peut transmettre son allèle déficiente à sa descendance mais n'est pas lui-même malade. Parfois, même en présence de deux allèles récessifs, le patient peut être asymptomatique ce qui complique le diagnostic.

1.4. Manifestations cliniques

Les manifestations cliniques liées à la mucoviscidose touchent les organes munis d'un épithélium tels que les poumons, les intestins, le pancréas, le foie, les organes reproducteurs et les glandes sudoripares (**Figure 10**) (Bellis *et al.*, 2017). La mucoviscidose est une pathologie chronique qui va progressivement entraîner l'obstruction de l'organe considéré, son infection, son inflammation jusqu'à ce qu'il ne soit plus fonctionnel (Cant *et al.*, 2014). La symptomatologie de la mucoviscidose est extrêmement hétérogène d'un individu à un autre, il est donc difficile d'établir des généralités (Bellis *et al.*, 2017). En revanche, il a été observé que la symptomatologie des patients évolue avec l'âge (**Tableau I**). Ici ne seront développées que les manifestations cliniques les plus couramment décrites chez les patients.

1.4.1. Différents phénotypes

La clinique de la mucoviscidose se divise en deux phénotypes : i) la mucoviscidose classique et ii) la mucoviscidose non classique (Fanen *et al.*, 2014). Dans le premier cas, le plus souvent les patients souffrent de dysfonctionnements multi-organes (foie, pancréas, poumon, ...). La concentration en chlore lors du test de la sueur est supérieure à 60 mmol.L^{-1} . L'issue fatale est généralement la conséquence de la dégradation progressive de la fonction respiratoire. Au moins une mutation est identifiée sur chacun des allèles du gène *CFTR*. En revanche, dans le cas non classique, le patient présente au moins une caractéristique phénotypique de la maladie et la symptomatologie est moins brutale que dans le cas précédent. La sueur révèle une concentration en ions chlorures normale ou à la limite des concentrations physiologiques rapportées chez une personne saine ($\leq 60 \text{ mmol.L}^{-1}$). Il se peut qu'un seul organe soit touché par la maladie. Malgré cette catégorisation des phénotypes, il existe en réalité une très grande hétérogénéité des symptômes, même pour deux patients qui possèdent la même mutation (Romey, 2006).

1.4.2. Atteintes du revêtement cutané

La mucoviscidose a été caractérisée dès sa découverte par une concentration anormalement élevée en chlorure de sodium dans la sueur des patients. Cette caractéristique a même été à l'origine du test de la sueur. La concentration physiologique moyenne chez l'adulte sain est inférieure à 60 mmol.L^{-1} . Malgré tout, 2% des patients présentent des concentrations normales en chlorure de sodium dans la sueur (Vankeerberghen *et al.*, 2002). C'est pourquoi le diagnostic de la mucoviscidose ne doit pas reposer uniquement sur ce test.

Tableau I. Evolution de la clinique en fonction de l'âge des patients atteints de mucoviscidose, d'après O'Sullivan et Freedman (2009) et Elborn (2016).

	0-10 ans	10-20 ans	20-35 ans	> 35 ans
Voies respiratoires	<ul style="list-style-type: none"> • Obstruction • Bronchiectasie 	<ul style="list-style-type: none"> • Bronchiectasie • Sinusite 	<ul style="list-style-type: none"> • Bronchiectasie • Hémoptysie • Pneumothorax 	<ul style="list-style-type: none"> • Détresse respiratoire sévère • Transplantation
Infections pulmonaires dominantes	<ul style="list-style-type: none"> • <i>S. aureus</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>S. aureus</i> • <i>P. aeruginosa</i> (intermittence) • ABPA 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>P. aeruginosa</i> • Autres Gram - 	-
Pancréas	<ul style="list-style-type: none"> • Insuffisance 	-	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Diabetes mellitus</i> 	-
Foie	<ul style="list-style-type: none"> • Dysfonctionnement 	<ul style="list-style-type: none"> • Stéatose hépatique • Fibrose du foie 	<ul style="list-style-type: none"> • Hypertension portale • Cirrhose 	<ul style="list-style-type: none"> • Transplantation
Intestins	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Meconium ileus</i> • Prolapsus rectal 	-	<ul style="list-style-type: none"> • Obstruction intestinale 	-
Système endocrinien	<ul style="list-style-type: none"> • Déshydratation • Hypochlorémie • Hyponatrémie 	<ul style="list-style-type: none"> • Calculs rénaux 	<ul style="list-style-type: none"> • Insuffisance rénale 	-
Appareil uro-génital	<ul style="list-style-type: none"> • Canaux déférents anormaux 	-		-
Autres	-		<ul style="list-style-type: none"> • Arthrose • Ostéoporose 	

ABPA : Aspergillose broncho-pulmonaire allergique ; *P. aeruginosa* : *Pseudomonas aeruginosa* ; *S. aureus* : *Staphylococcus aureus*.

1.4.3. Atteintes gastro-intestinales et endocriniennes

Le déséquilibre ionique entraîné par la mucoviscidose au sein des cellules épithéliales, associé à la déshydratation, peut entraîner l'obstruction voire l'atrophie des canaux sécréteurs du foie et du pancréas.

Huit patients sur 10 souffrent d'insuffisance hépatique. En effet, la sécrétion des sucs pancréatiques étant insuffisante, la neutralisation du contenu gastrique ne peut se faire. L'acidité gastrique est donc à l'origine de reflux gastro-œsophagiens fréquemment observés chez les patients atteints de mucoviscidose (Strausbaugh *et al.*, 2007 ; O'Sullivan et Freedman, 2009). D'autre part, le pH gastrique restant acide, les enzymes pancréatiques ne seront donc pas fonctionnelles puisqu'elles expriment leurs activités enzymatiques à pH alcalin. Ainsi, les glucides, les lipides et les protéines ne sont pas digérés et un syndrome de malabsorption peut être observé. La principale complication de la mucoviscidose au niveau gastro-intestinale est le *diabetes mellitus* qui est une forme sévère de diabète qui présente à la fois les caractéristiques des diabètes I et II, développés par le sujet non-mucoviscidosique (Ratjen et Döring, 2003). Il est le résultat du phénomène d'autodigestion des cellules pancréatiques entraînant par défaut un déficit en insuline (Strausbaugh *et al.*, 2007).

L'insuffisance hépatique est retrouvée chez 9 patients sur 10. Les enzymes hépatiques étant déficitaires, un syndrome de malabsorption des nutriments dont les graisses, les protéines et les vitamines liposolubles A, D, E et K est observé (Ratjen et Döring, 2003 ; O'Sullivan et Freedman, 2009). Il s'agit de la seconde cause de mortalité chez ces patients après l'atteinte pulmonaire. Les complications peuvent s'illustrer par une cirrhose ou une hypertension portale (Ratjen et Döring, 2003 ; Strausbaugh *et al.*, 2007 ; O'Sullivan et Freedman, 2009 ; Elborn, 2016).

La malabsorption des nutriments s'accompagne généralement d'anorexie, de douleurs abdominales et de constipation (Elborn, 2016).

Enfin, dès la naissance certains nouveau-nés présentent une occlusion intestinale appelée *meconium ileus* (Davis, 2006 ; Strausbaugh *et al.*, 2007 ; O'Sullivan et Freedman, 2009).

1.4.4. Atteintes de l'appareil uro-génital

L'infertilité touche quasiment l'ensemble des hommes atteints de mucoviscidose mais ne les empêche pas d'avoir des enfants. En effet, les troubles sont essentiellement anatomiques (ex. vésicules séminales absentes ou dilatées, canaux déférents absents, ...). L'appareil reproducteur de la femme mucoviscidosique ne présente pas d'anomalies à part une éventuelle déshydratation de la glaire cervicale (Vankeerberghen *et al.*, 2002 ; Ratjen et Döring, 2003 ; O'Sullivan et Freedman, 2009).

1.4.5. Atteintes pulmonaires

Le principal organe impacté par la mucoviscidose est le poumon avec l'obstruction progressive des voies aériennes à cause d'un mucus épais et visqueux qui s'accumule ainsi qu'un déficit de la clairance muco-ciliaire, induisant des infections bactériennes et une inflammation chronique liée à l'accumulation de

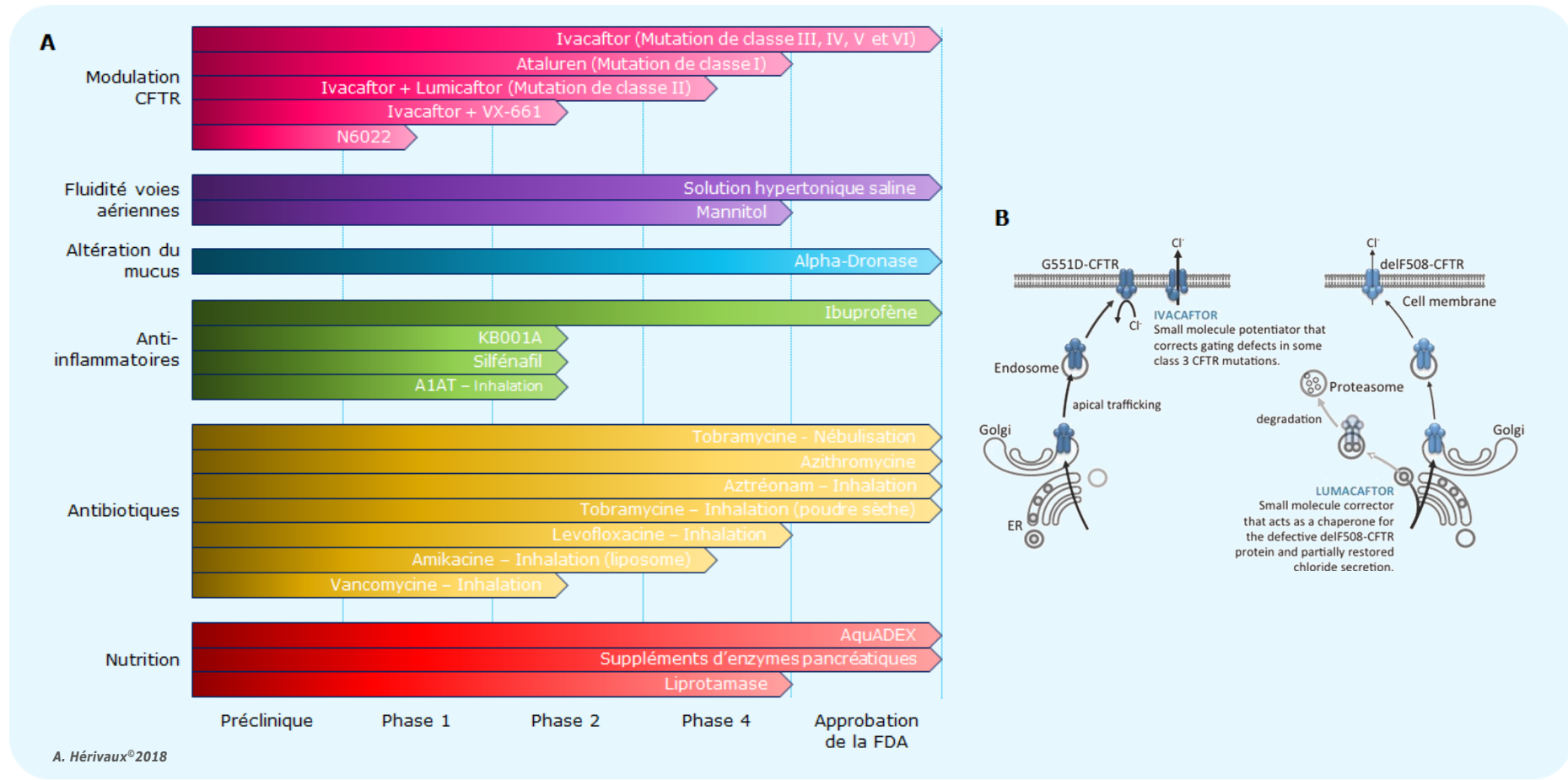


Figure 11. Avancées thérapeutiques dans le cadre de la mucoviscidose, d'après Fanen (2014) et Pittman et Ferkol (2015).

A. Molécules approuvées par l'US Food and Drug Administration (FDA) ou en cours d'évaluation. **B.** Mécanisme d'action de la molécule activatrice ivacaftor et de la molécule correctrice lumacaftor.

polynucléaires neutrophiles (PNN), d'interleukine-8 et de protéines pro-inflammatoires. L'atteinte pulmonaire, qui n'est pas décrite à la naissance de l'enfant, est la principale cause de mortalité chez les patients (Ratjen et Döring, 2003 ; Davis, 2006 ; Strausbaugh *et al.*, 2007 ; O'Sullivan et Freedman, 2009 ; Elborn, 2016).

Les infections pulmonaires rencontrées au cours de la mucoviscidose seront développées plus en détail ultérieurement (cf **Analyse bibliographique, 1.6. Complication : colonisation et infections respiratoires**).

1.5. Traitement

1.5.1. Traitement symptomatique

Le traitement de première intention dans le cadre de la mucoviscidose est un traitement symptomatique. En effet, la mucoviscidose entraîne un large panel de symptômes touchant un grand nombre d'organes. Le traitement symptomatique vise à améliorer la qualité de vie du patient mais n'agit pas directement sur l'origine de la maladie en elle-même (**Figure 11.A**) (Bellis *et al.*, 2017 ; ECFSPR, 2017).

a) Traitements des troubles gastro-intestinaux et des déficits endocriniens

Les cellules épithéliales pancréatiques et biliaires peuvent être obstruées par du mucus dès le développement *intra-utero*. Ainsi, dès la naissance le nouveau-né peut présenter des déficits pancréatiques dans les cas les plus sévères à cause d'une pancréatite obstructive chronique. Généralement les patients présentant des mutations de classes IV, V et VI ne sont pas affectés par ce phénomène, ou ils développeront une insuffisance pancréatique ultérieurement avec l'âge. Le traitement consiste à instaurer des enzymes pancréatiques de substitution avec un apport énergétique adapté (Davis, 2006). En effet, les patients connaissent un déficit enzymatique qui entraîne une malabsorption des substances nutritives et de la diarrhée associées à une perte de l'appétit le plus souvent (Cohen-Cyberknoh *et al.*, 2011). Cependant, le pH gastrique n'étant pas suffisamment alcalinisé, ces enzymes de substitution sont peu actives. C'est pourquoi des molécules inhibant l'acidité gastrique peuvent y être associées (Davis, 2006). Dans les formes les plus sévères, la transplantation doit être envisagée (Ratjen et Döring, 2003 ; Davis, 2006 ; O'Sullivan et Freedman, 2009 ; Elborn, 2016).

b) Traitement des infections bactériennes

La prévention des infections bactériennes est un enjeu majeur dans le contexte de la mucoviscidose, puisqu'il a été démontré la transmission croisée de pathogènes par voie aéroportée d'un patient à un autre via les gouttelettes de Flügge ou à partir de réservoirs environnementaux. La mise en place de mesures d'hygiène et de protocoles d'isolement est ainsi nécessaire (Cohen-Cyberknoh *et al.*, 2011 ; Elborn, 2016).

L'infection bactérienne est l'une des causes majeures de mortalité chez les patients atteints de mucoviscidose. Ils développent en premier des infections à *Staphylococcus aureus* souvent sensible à la méthicilline (SASM) puis *Haemophilus influenzae* suivi de *Pseudomonas aeruginosa*. De nombreux protocoles thérapeutiques encouragent une antibiothérapie par voie orale dès l'isolement de l'un de ces micro-organismes, même en l'absence de signes cliniques. Un traitement anti-staphylocoque favorise la colonisation des poumons par *P. aeruginosa*. Cette dernière ne peut être totalement éradiquée, même avec un traitement adapté en intraveineux, car ce pathogène développe rapidement des résistances. La précocité de la mise en place d'une antibiothérapie contre *P. aeruginosa* diminue cependant le risque de persistance de la bactérie (Ratjen et Döring, 2003 ; O'Sullivan et Freedman, 2009 ; Elborn, 2016).

Récemment, des bactéries anaérobies strictes ont été identifiées dans les poumons des patients atteints de mucoviscidose (Elborn, 2016). Cette catégorie de bactéries est également retrouvée chez l'individu sain. Il a été démontré que la présence d'une flore bactérienne hétérogène dans les poumons des patients était associée à une meilleure fonction pulmonaire que lorsqu'une seule espèce prédominait, d'où la remise en question de l'instauration d'une antibiothérapie systématique en prophylaxie chez les enfants ou les nouveaux diagnostiqués.

c) Contrôle de l'inflammation

Dans le contexte mucoviscidosique, les voies aériennes sont inflammées chroniquement à cause d'une forte proportion de PNN et de cytokines pro-inflammatoires ainsi qu'un déficit en facteurs anti-inflammatoires (Cohen-Cyberknoh *et al.*, 2011). Plusieurs thérapies anti-inflammatoires permettent la diminution des exacerbations et améliorent la fonction pulmonaire (Davis, 2006 ; Elborn, 2016).

L'inflammation chronique des voies aériennes est majoritairement due à l'accumulation de PNN. Ainsi, le traitement consiste à utiliser des drogues possédant des effets pléiotropiques sur les PNN, qui bloquent spécifiquement la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires ou qui ciblent spécifiquement des composants constituant les PNN. Les corticostéroïdes (ex. prednisone par voie orale) ont prouvé leur efficacité dans le maintien de la fonction respiratoire et la diminution de la fréquence des exacerbations. L'inhalation de stéroïdes permet de contrecarrer les effets indésirables observés par voie orale mais des bénéfices ont uniquement été observés sur l'inflammation de l'épithélium mais pas sur la fonction respiratoire. Les anti-inflammatoire non stéroïdiens (AINS) (ex. ibuprofène à forte dose) limitent le déclin de la fonction respiratoire mais plus particulièrement chez le jeune patient. Cependant, les AINS possèdent de nombreux effets indésirables. S'ils sont utilisés à doses trop faibles, ils vont favoriser l'influx de PNN dans les poumons. S'ils sont utilisés à doses trop élevées, des troubles gastro-intestinaux peuvent être observés, dont une atteinte rénale (Ratjen et Döring, 2003).

D'autre part, la destruction des PNN présents en grande quantité libère une quantité importante de sérine protéases qui participent à la dégradation chronique de l'épithélium. Des inhibiteurs de protéases peuvent donc être proposés tel que l'inhibiteur de l'alpha1-protéinase qui a prouvé une certaine efficacité.

Il en résulte un retour à la normale de l'expression des PNN et la diminution de l'hypersécrétion de mucus (Ratjen et Döring, 2003).

d) Élimination du mucus

L'élimination du mucus, en excès dans les voies aériennes des patients, est un élément clé dans l'amélioration de la qualité de vie du patient (Cohen-Cyberknoh *et al.*, 2011). Une séance de kinésithérapie quotidienne est recommandée chez tous les patients atteints de mucoviscidose. D'autre part, il leur est également préconisé d'effectuer des exercices d'aérobic en parallèle qui stimulent l'inspiration profonde et la toux.

Le mucus des patients atteints de mucoviscidose est épais et visqueux. C'est pourquoi des mucolytiques sont prescrits. La dornase alfa ou le pulmozyme sont deux désoxyribonucléases humaines recombinantes qui après une inhalation quotidienne dégradent l'ADN des nombreux PNN présents dans les voies aériennes des patients, qui sont en grande partie responsables de la viscosité du mucus et de l'inflammation. La réhydratation du mucus peut également constituer une alternative. Ainsi des agents osmotiques, comme des solutions salines hypertoniques ou le mannitol, peuvent être prescrits. Il a été démontré que ces agents pouvaient également jouer un rôle dans l'activation de la clairance du mucus via les cils et la toux. Tout en améliorant la fonction pulmonaire, ces agents diminuent le risque d'infection et l'inflammation chronique des voies aériennes (Ratjen et Döring, 2003 ; Elborn, 2016).

e) Traitement des exacerbations

Le patient est très souvent touché par une exacerbation de la maladie se traduisant par des épisodes au cours desquels la toux et la production de mucus sont intensifiés et associés à des difficultés respiratoires, des hémoptysies, de la fatigue, une inflammation aiguë et une augmentation légère de la charge bactérienne (Cohen-Cyberknoh *et al.*, 2011). Des molécules peuvent réduire la fréquence de ces exacerbations (ex. dornase alfa, l'azythromycine par voie orale, des antibiotiques inhalés comme la tobramycine, la colistine, l'aztreonam, la lévofloxacine). Des solutions salines hypertoniques ou encore du mannitol peuvent également être prescrits. En fonction de la gravité de l'épisode, une assistance respiratoire peut être mise en place en parallèle. Le traitement de l'exacerbation est une urgence vitale car si elle persiste elle entraîne une diminution de la fonction respiratoire et donc réduit les chances de survie de l'individu (Elborn, 2016).

f) Greffe de poumons

Lorsque l'inflammation des voies respiratoires et les infections pulmonaires deviennent chroniques, le patient développe une détresse respiratoire aiguë qui nécessite une greffe de poumons. Ce traitement d'urgence est de moins en moins fréquent chez les jeunes enfants mais reste souvent le dernier recours chez les patients adultes. Aujourd'hui, la transplantation pulmonaire est une opération chirurgicale maîtrisée. En France, on dénombre 80 à 100 transplantations par an (Bellis *et al.*, 2017). La seule limite à

ce traitement est le peu d'organes disponibles par rapport au nombre de receveurs potentiels (Ratjen et Döring, 2003 ; Davis, 2006 ; O'Sullivan et Freedman, 2009 ; Elborn, 2016).

1.5.2. Traitement étiologique

Pendant longtemps, le traitement de la mucoviscidose a été uniquement symptomatique. Avec les avancées scientifiques, les cliniciens se sont orientés vers le développement de traitements étiologiques qui s'intéressent directement aux origines génétiques de la mucoviscidose (Romey, 2006). Grâce à ces nouvelles stratégies, la communauté scientifique espère un jour pouvoir traiter la mucoviscidose elle-même, ce qui de surcroît éliminerait la symptomatologie qui lui est associée.

a) Thérapie génique

La thérapie génique a constitué un nouvel espoir pour les patients atteints de mucoviscidose dès le début des années 90. En effet, avec l'essor des techniques de biologie moléculaire, les chercheurs se sont accordés pour produire *in vitro* le gène *CFTR* sauvage afin de corriger l'anomalie moléculaire à l'origine de la maladie. Cependant, jusqu'à ce jour aucun essai n'a été concluant. En effet, l'introduction de cet ADN dans la cellule épithéliale est compliquée car aucun vecteur n'est optimisé pour permettre cette action (O'Sullivan et Freedman, 2009 ; Amaral, 2015 ; Elborn, 2016).

b) Thérapies innovantes

Face à l'échec de la thérapie génique, mais toujours dans l'objectif de s'intéresser à l'origine de la mucoviscidose, le développement thérapeutique s'est orienté vers des thérapies innovantes dites pharmacologiques. Ces nouvelles molécules ont pour objectif de corriger spécifiquement la fonction de la protéine CFTR tout en considérant la classe de mutation donnée, c'est-à-dire que pour une mutation donnée un traitement correspond. Ainsi, des molécules modulatrices, activatrices ou correctrices des dysfonctionnements de la protéine CFTR ont été développées (Figures 11.A et B) (Amaral, 2015 ; Elborn, 2016). Ces thérapies innovantes, une fois leur efficacité prouvée, pourraient être instaurées chez le nouveau-né dès que le diagnostic de mucoviscidose est posé, ne permettant pas à la maladie de se développer et donc limitant les atteintes multi-viscérales qui en découlent (Elborn, 2016).

Le développement de telles molécules thérapeutiques constitue un challenge considérable, en particulier pour les mutations des classes I et II puisque la protéine CFTR est totalement absente de la membrane des cellules épithéliales (Romey 2006).

Concernant la classe I, la protéine CFTR est totalement absente à cause de la maturation précoce des ARNm transcrits. La première stratégie reposait sur l'utilisation des aminoglycosides (ex. gentamicine, tobramycine). Cette famille d'antibiotiques agit en effet sur la traduction des ARNm en protéines par le ribosome mais conduit à des erreurs. Ainsi, ces antibiotiques pourraient induire une erreur dans la lecture des codons stops prématurés résultant de la mutation de classe I et permettre la synthèse de la protéine CFTR dans sa totalité. Seulement, les aminoglycosides pourraient induire d'autres erreurs délétères lors de la traduction de la protéine (Romey, 2006 ; Amaral, 2015 ; Elborn, 2016). L'Ataluren ou PTC124 est une

seconde molécule qui présente la même capacité que les aminoglycosides. Des études cliniques de phase II ont démontré la correction des échanges ioniques et de la fonction respiratoire mais ces bénéfices dans des études cliniques de phase III sont moins probants (O'Sullivan et Freedman, 2009 ; Amaral, 2015 ; Elborn, 2016). L'association avec des aminosides, prescrits dans le traitement des infections pulmonaires bactériennes chez ces mêmes patients, pourrait inhiber l'action de l'Ataluren.

Les molécules ciblant les mutations de classe II visent à corriger le défaut de maturation de la protéine CFTR, c'est-à-dire son repliement et son adressage. Plusieurs stratégies sont proposées : i) l'augmentation du processus de maturation via l'administration de molécules chaperonnes tel que le glycérol ou de molécules de faible poids moléculaire telles que le myoinositol, la bétaine ou la taurine, ii) l'inhibition de l'interaction de la protéine CFTR avec les acteurs du système du contrôle qualité du réticulum endoplasmique par le Buphényl® (sodium 4-phénylbutyrate), et iii) l'inhibition des pompes à calcium qui régulent l'activité des molécules chaperonnes à l'aide du curcumin (Romey 2006). D'autre part, la mutation F508del qui est la plus commune des mutations chez les patients mucoviscidosiques appartient à cette classe. Il a été démontré qu'une incubation à température basse des cellules porteuses de cette mutation améliorerait la maturation de la protéine CFTR (Romey 2006 ; Amaral, 2015).

Des molécules activatrices telles que la génistéine ou le CPX (8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine) peuvent s'appliquer aux classes III et IV puisqu'elles augmentent la fréquence et la durée de l'ouverture du canal chlore muté (Romey 2006 ; O'Sullivan et Freedman, 2009).

Une molécule qualifiée de molécule activatrice, l'ivacaftor (ou VX-770), est applicable à l'ensemble des classes de mutations, sauf la I (Elborn, 2016). Elle favorise l'adressage correct de la protéine CFTR au pôle apical de la cellule épithéliale. Cependant, pour la classe II, et plus particulièrement pour la délétion F508del, il a été démontré que l'action de l'ivacaftor seul n'était pas suffisante. C'est pourquoi on y associe une molécule correctrice, le lumacaftor (ou VX 809) ou le VX-661 (Romey 2006 ; O'Sullivan et Freedman, 2009 ; Fanen *et al.*, 2014 ; Amaral, 2015 ; Elborn, 2016 ; Paranjape et Mogayzel, 2018). En France, 12% des patients en 2016 bénéficiaient de l'association ivacaftor/lumacaftor (Bellis *et al.*, 2017).

Bien qu'encourageantes, la majorité de ces nouvelles stratégies thérapeutiques sont encore en cours d'évaluation.

1.6. Complications : colonisation et infections respiratoires

Au sein des poumons des patients atteints de mucoviscidose, les pathogènes sont piégés dans le mucus épais et visqueux. De plus, le mucus mucoviscidosique est hypoxique, ce qui favorise le développement d'infections. La clairance muco-ciliaire est altérée donc les micro-organismes inhalés ne peuvent pas être éliminés des voies aériennes des patients. Ainsi, ils peuvent développer une colonisation des voies aériennes qui peut s'orienter vers la chronicité et des infections. D'autre part, les agents pathogènes participent à la dégradation progressive et à l'inflammation chronique de l'épithélium bronchique, altérant la fonction respiratoire.

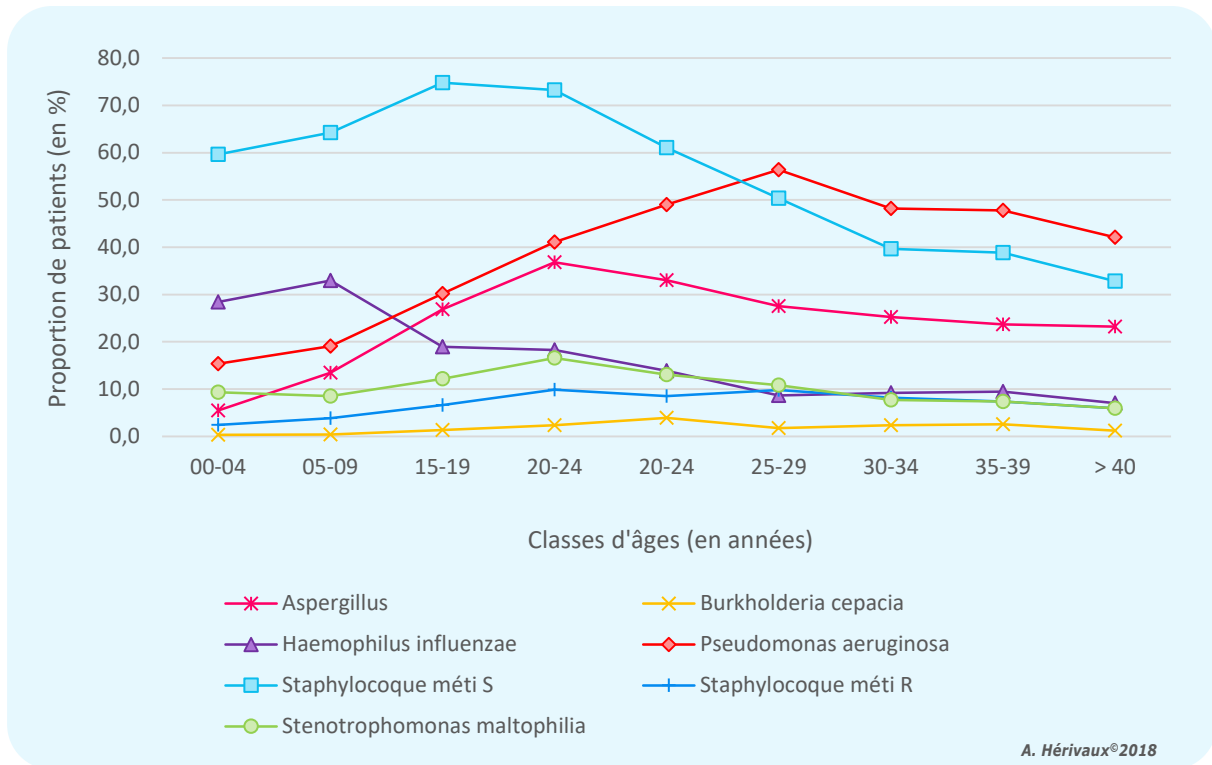


Figure 12. Proportions des infections bactériennes chez les patients atteints de mucoviscidose par classe d'âge, d'après Bellis et al. (2016).

1.6.1. Infections virales

Les patients atteints de mucoviscidose peuvent développer des infections virales dès le plus jeune âge. Il a cependant été démontré que les espèces virales impliquées (majoritairement les rhinovirus, le virus syncytial respiratoire, les virus influenza A et B), la fréquence chez les sujets et l'occurrence saisonnière de ces infections étaient similaires aux infections virales développées par des sujets sains. Cependant, dans le contexte mucoviscidosique les infections virales sont souvent plus sévères et la résolution est plus longue. De plus, elles favoriseraient la colonisation bactérienne des voies respiratoires et le pouvoir pro-inflammatoire des bactéries (Lipuma, 2010 ; Gilligan, 2014 ; Elborn, 2016).

1.6.2. Infections bactériennes

a) Nature des infections bactériennes

Les patients développent majoritairement des infections bactériennes aux *S. aureus* résistants à la méthicilline (SARMs) et à *H. influenzae*, des bactéries souvent retrouvées en pathologie humaine. Ces infections favorisent la bronchiectasie qui représente un terrain favorisant au développement de pathogènes opportunistes à Gram négatif. Parmi ces bactéries, l'espèce la plus représentée est *P. aeruginosa* suivie de *Stenotrophomonas maltophilia* et *Achromobacter xylosoxidans*. Contrairement aux deux premières espèces citées et dans ce contexte particulier, les germes opportunistes à Gram négatif sont souvent capables d'acquérir des résistances vis-à-vis des principales familles d'antibiotiques. De ce fait, l'antibiothérapie par voie orale étant souvent infructueuse, il est nécessaire d'instaurer une antibiothérapie par voie intraveineuse. Tandis que la fréquence des infections à *Burkholderia cenocepacia* diminue, celle des mycobactéries non-tuberculeuses augmente (ex. *Mycobacterium abscessus* et *Mycobacterium avium-intracellulare*). Elles sont d'autant plus difficiles à traiter que ces espèces présentent de nombreuses résistances acquises aux principales familles d'antibiotiques (Lipuma, 2010 ; Gilligan, 2014 ; Elborn, 2016).

D'autre part, les bactéries sont capables de coloniser les voies aériennes des patients. Van Grunderbeeck *et al.* (2010) ont reporté une colonisation bactérienne chez 76% des patients inclus dans l'étude dont 67% présentaient une colonisation chronique à *P. aeruginosa*.

b) Vue d'ensemble en France

D'après les données recueillies dans le Registre Français de la Mucoviscidose de 2016, il s'avère que les SASMs et *P. aeruginosa* sont les principales espèces bactériennes responsables d'infections bactériennes tout au long de la vie du patient. Les fréquences respectives dans la population mucoviscidosique totale sont de 61% et 38% (Bellis *et al.*, 2016).

Il est également intéressant d'observer que la nature des infections bactériennes varie en fonction de l'âge du patient atteint de mucoviscidose (Figure 12). Ainsi, de 0 à 29 ans environ les infections dues à des SASMs prédominent. A partir de 29 ans ce sont les infections à *P. aeruginosa* qui prennent le dessus. D'autre part, chez le nouveau-né et jusqu'à l'âge de 9-10 ans les enfants sont sujets à des infections à *H.*

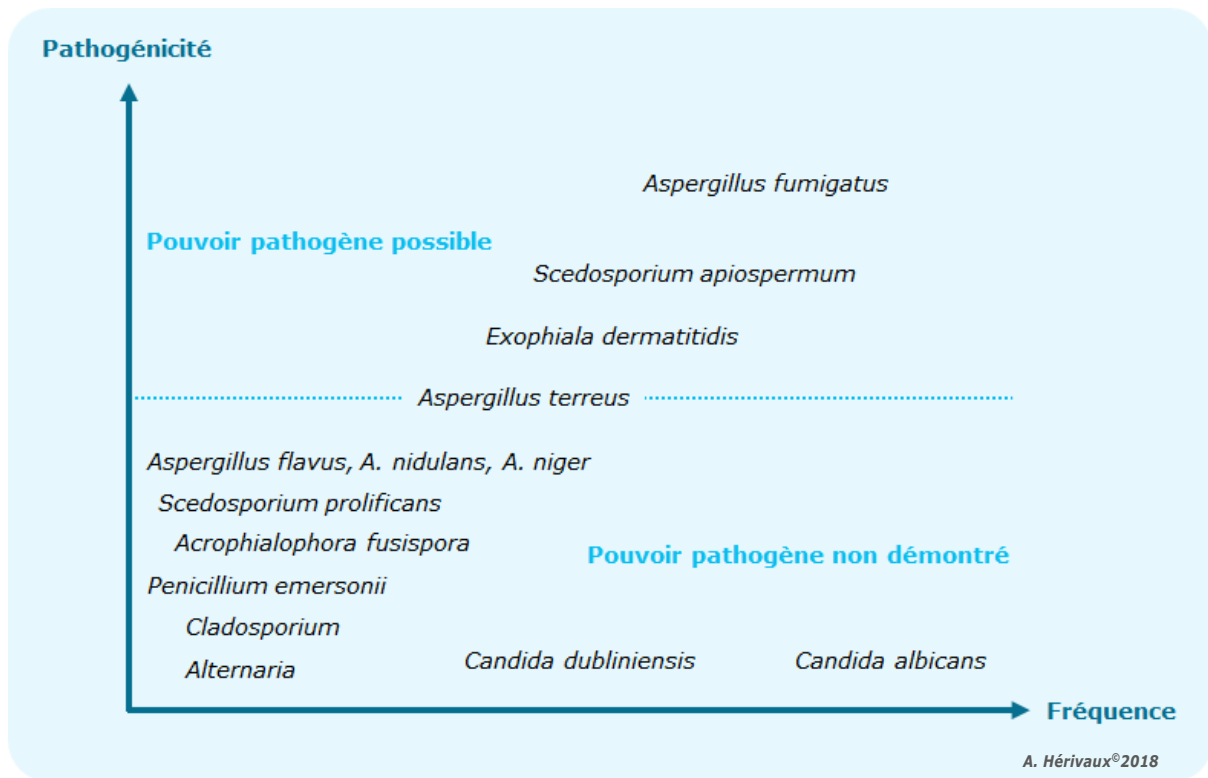


Figure 13. Fréquence et pouvoir pathogène des principales espèces fongiques rencontrées dans les voies aériennes des patients atteints de mucoviscidose et qui n'ont pas reçu de greffe, d'après Cimon et al. (2008).

influenzae, ce qui les placent en seconde position après les infections aux SASMs mais devant les infections à *P. aeruginosa*. La fréquence des infections dues à *B. cepacia*, aux SARMS et à *S. maltophilia* sont relativement constantes au cours de la vie des patients et faibles puisqu'elles sont recensées chez moins de 10% des patients (Bellis *et al.*, 2016).

1.6.3. Colonisation et infections fongiques

Jusqu'à présent, seules les infections bactériennes ont été mentionnées puisque ce sont les infections qui dominent dans le contexte mucoviscidosique. Cependant, dans un second temps, les patients peuvent développer des colonisations et/ou des infections fongiques. Seules les principales espèces fongiques isolées seront détaillées ici.

La clairance muco-ciliaire défectueuse empêche l'évacuation des spores inhalées qui seront piégées dans le mucus bronchique épais et visqueux. Un traitement antibiotique est instauré dès lors que le patient présente une infection, voire une colonisation bactérienne. Ainsi, les protéases libérées par ces micro-organismes fragilisent l'épithélium bronchique et le patient présentera un léger déficit immunitaire lié à la prise d'antibiotiques. L'inhalation de corticostéroïdes pour limiter l'inflammation chronique des voies aériennes favorise également le développement des espèces fongiques (Pihet *et al.*, 2009 ; Van Grunderbeeck *et al.*, 2010). Les infections fongiques sont donc généralement concomitantes aux infections bactériennes et/ou virales.

Actuellement, il n'existe aucune standardisation de la démarche diagnostique des infections fongiques pulmonaires. Les résultats sont donc difficilement comparables d'une étude à une autre (Borman *et al.*, 2010 ; Coron *et al.*, 2018). Standardiser l'isolement et l'identification des espèces fongiques, via l'examen direct, l'utilisation de milieux standards et semi-sélectifs pour la culture et le diagnostic sérologique, permettrait de mieux appréhender l'épidémiologie de ces infections.

Certaines généralités ont tout de même été dressées. Chez les patients non greffés, certaines espèces seront uniquement responsables d'une colonisation asymptomatique des poumons des patients alors que d'autres espèces peuvent exercer leur pouvoir pathogène qui le plus souvent se manifeste sous la forme d'infections broncho-pulmonaires allergiques (IBPA) (eg. *Aspergillus* spp. (ABPA), *Scedosporium* spp. (SBPA)) (Figure 13) (Cimon *et al.*, 2008 ; Gilligan, 2014). Chez les patients greffés, ces champignons peuvent être responsables d'infections disséminées qui peuvent être fatales.

a) Levures

Les levures du genre *Candida*, et plus particulièrement *Candida* spp., sont fréquemment isolées dans les crachats de poumons mucoviscidosiques. En effet, plusieurs études ont permis leur isolement chez 60% à 75% des patients inclus dans les études (Cimon *et al.*, 2008 ; Lipuma, 2010). L'isolement de *C. albicans* dans le crachat d'un patient est compliqué à interpréter puisque cette espèce est naturellement retrouvée dans les flores commensales et notamment la flore oro-pharyngée (Lipuma, 2010). Chez le patient non greffé, elle est uniquement responsable de colonisation (Cimon *et al.*, 2008). Les autres

espèces de *Candida* qui sont moins fréquemment isolées dans ce contexte sont *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis* et *C. tropicalis*.

b) Champignons filamenteux

Aspergillus fumigatus

Il s'agit de l'espèce fongique filamenteuse la plus communément isolée dans les poumons des patients atteints de mucoviscidose. Elle est responsable de la colonisation des poumons chez 57% des patients en moyenne, ce qui en fait la première espèce fongique filamenteuse responsable de colonisation chronique dans la mucoviscidose (Pihet *et al.*, 2009). A souligner qu'*A. fumigatus* est rarement isolé chez le jeune enfant (Pihet *et al.*, 2009). En fonction des études, sa prévalence est estimée entre 6 et 60%. Ce pathogène peut être à l'origine de réactions allergiques inflammatoires aussi connues sous le nom d'ABPA et d'infections disséminées en particulier suite à la transplantation pulmonaire (Cimon *et al.*, 2008 ; Pihet *et al.*, 2009 ; Lipuma, 2010).

En France, d'après les données du Registre Français de la Mucoviscidose de 2016, les infections aspergillaires sont présentes tout le long de la vie du patient mais leurs proportions restent inférieures à celles des infections aux SASMs et à *P. aeruginosa*. La proportion de patients présentant des infections aspergillaires ne cesse d'augmenter de 0 à 24 ans (moins de 10% à environ 40%) pour diminuer légèrement après 24 ans puisque chez les patients âgés de plus de 40 ans, *Aspergillus* spp. est isolé chez seulement 20% des patients (Figure 12) (Bellis *et al.*, 2016).

D'autres espèces appartenant au genre *Aspergillus* sont également isolées dans le contexte mucoviscidosique, mais à moindre échelle (*A. flavus*, *A. niger*, *A. nidulans*) (Cimon *et al.*, 2008 ; Pihet *et al.*, 2009 ; Lipuma, 2010). *A. terreus*, bien que peu isolé (2 à 6% des patients) est la troisième espèce fongique filamenteuse responsable de colonisation pulmonaire. Elle peut également engendrer des ABPA.

***Scedosporium* spp.**

Ce champignon peut entraîner une colonisation ou une infection (SBPA) dans les poumons des patients mucoviscidosiques non greffés (Cimon *et al.*, 2008 ; Lipuma, 2010). Dans ce contexte, *Scedosporium apiospermum* a été retrouvé chez 10% des patients mucoviscidosiques en Australie contre 8,6% dans une étude menée en France et 14% en Allemagne (Cimon *et al.*, 2008 ; Lipuma, 2010). C'est actuellement le second champignon filamenteux capable de coloniser chroniquement les voies respiratoires des patients atteint de mucoviscidose (Pihet *et al.*, 2009 ; Van Grunderbeeck *et al.*, 2010).

Les infections pulmonaires à *Scedosporium* spp. dans le contexte mucoviscidosique seront plus détaillées dans la partie suivante (cf Analyse bibliographique, 2. *Scedosporium* spp.).

Lomentospora prolificans

L. prolificans est un champignon filamenteux qui a longtemps été considéré comme appartenant au genre *Scedosporium*. Récemment, Ramirez-Garcia *et al.* (2018) ont totalement dissocié le genre *Lomentospora* du genre *Scedosporium*. Cette espèce est responsable d'infections pulmonaires et a été

retrouvée chez 12% des patients atteints de mucoviscidose dans une étude qui incluait 162 patients (Lipuma, 2010).

Exophiala dermatitidis

E. dermatitidis est un champignon dimorphique puisqu'à 37°C il a l'aspect d'une levure noire alors qu'à température ambiante il développe une morphologie mycélienne. Il est décrit dans les infections pulmonaires chez les patients atteints de mucoviscidose depuis les années 1990 et sa prévalence s'étend de 1% à 16% en Europe (Lipuma, 2010). Ce champignon peut entraîner essentiellement une colonisation ou une infection (pneumopathie) dans les poumons des patients mucoviscidosiques (Cimon et al., 2008 ; Lipuma, 2010).

1.7. Conclusion

La mucoviscidose, bien que qualifiée de maladie rare, ne doit pas être sous-estimée dans la population mondiale. Grâce au dépistage néonatal et à la compréhension de la physiopathologie de la maladie, la prise en charge et la qualité de vie des patients se sont largement améliorées avec en parallèle une augmentation de l'espérance de vie des patients.

Les traitements à l'origine essentiellement symptomatiques s'accordent aujourd'hui à développer de nouvelles molécules pour traiter l'origine génique et protéique de la maladie (le gène *CFTR* et la protéine CFTR). Malgré des résultats prometteurs, de nombreuses années de recherche et de développement sont encore nécessaires afin de proposer un traitement curatif aux patients.

La mucoviscidose est caractérisée par une atteinte multi-viscérale mais elle touche plus particulièrement les poumons. Les voies respiratoires des patients sont malmenées par une inflammation chronique, une dégradation progressive de l'épithélium respiratoire, la production continue d'un mucus épais et visqueux empêchant la clairance muco-ciliaire de se réaliser, et enfin des infections en continu qui sont tout d'abord d'origine bactérienne puis fongique. Depuis quelques années, un champignon filamenteux émerge : *S. apiospermum*. Grâce à l'amélioration des techniques d'isolements et d'identification, ce champignon à croissance lente et peu sporulant est révélé au grand jour. Ainsi, il est le second champignon filamenteux, après *A. fumigatus*, responsable de la colonisation chronique des poumons des patients atteints de mucoviscidose.

C'est pourquoi le Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène (GEIHP) EA3142, dans lequel je réalise ma thèse, mène ses recherches sur la compréhension de la pathogénicité de ce champignon mais aussi sur le développement de nouvelles méthodes diagnostiques et l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques. La prochaine sous-partie de l'analyse bibliographique s'intéresse à la biologie et à l'épidémiologie des espèces appartenant au genre *Scedosporium*.

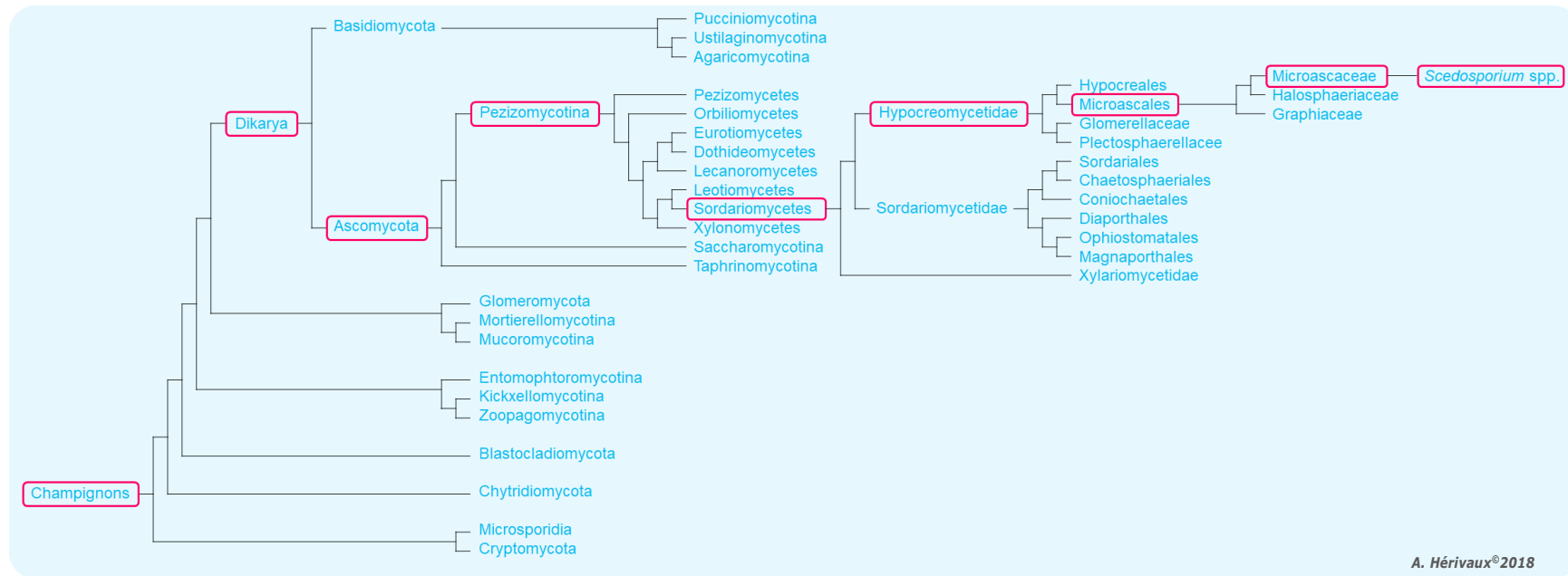


Figure 14. Positionnement du genre *Scedosporium* au sein du règne fongique, d'après le JGI, Hongsanam *et al.* (2017) et Spatafora *et al.* (2017).

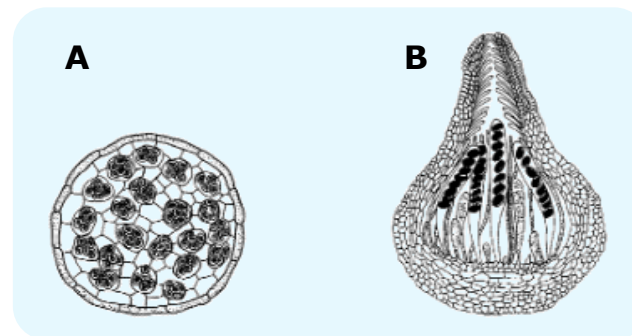


Figure 15. Schématisation des ascospores décrites chez les Microascaceae, d'après Pöggeler *et al.* (2006).

A. Cléistothèce. **B.** Périthèce.

2. Le genre *Scedosporium*

Les travaux exposés dans ce manuscrit s'articulent uniquement autour de la souche *S. apiospermum* IHEM 14462. Cependant, il nous semblait intéressant de traiter l'ensemble des espèces du genre *Scedosporium* dans cette sous-partie, pour lesquelles de nombreuses revues sont disponibles (Guarro *et al.*, 2006 ; Cortez *et al.*, 2008 ; Cimon *et al.*, 2015 ; Ramirez-Garcia *et al.*, 2018).

2.1. Taxonomie et phylogénie

2.1.1. Taxonomie du genre *Scedosporium*

Au sein du règne des Fungi, le genre *Scedosporium* regroupe plusieurs espèces filamenteuses appartenant au sous-règne des Dikarya, à la division des Ascomycètes, au sous-embranchement des Pezizomycotina, à la classe des Sordariomycètes, la sous-classe des Hypocreomycetidae, l'ordre des Microascales et la famille des Microascaceae (Figure 14).

Le règne des Fungi regroupe des organismes eucaryotes unicellulaires (levures) et pluricellulaires (moisissures et champignons supérieurs). Les Ascomycètes sont des levures et des champignons qui produisent des spores (ascospores) à l'intérieur d'asques. Le sous-embranchement des Pezizomycotina regroupe la majorité des espèces classées parmi les Ascomycètes. Ces espèces sont dites filamenteuses puisqu'elles se développent sous la forme d'hyphes. De nombreux champignons phytopathogènes et pathogènes de l'Homme sont classés parmi les Sordariomycètes (ex. *Magnaporthe grisea*, *Fusarium* spp.). La classification des espèces en tant que Hypocreomycetidae repose sur des critères de biologie moléculaire essentiellement. Les espèces regroupées dans l'ordre des Microascales sont de potentielles pathogènes de l'Homme telles que celles appartenant aux genres *Scopulariopsis* et *Microascus*. La famille des Microscaceae se caractérise par la formation de deux types d'ascospores : i) les cléistothèces, qui sont des sphères closes appelées ascocarpes qui libèrent les ascospores en se déchirant à maturité et ii) les périthèces, qui sont des ascocarpes non clos munis d'un ostiole qui permet la libération des ascospores (Figure 15) (Cortez *et al.*, 2008).

2.1.2. Phylogénie de *Scedosporium* spp.

Les connaissances sur les espèces fongiques ne cessent de se développer, notamment les connaissances moléculaires liées au séquençage massif de nombreux génomes. Ainsi, la phylogénie des champignons est en perpétuelle évolution, et le genre *Scedosporium* n'y échappe pas.

a) Découverte des espèces du genre *Scedosporium*

Le premier isolat du genre *Scedosporium*, *Monosporium apiospermum*, issu d'un mycétome à grains blancs a été décrit en 1911 par Saccardo. Huit années plus tard, Castellani et Chalmers renomment cette souche *Scedosporium apiospermum*. En 1922, Shear analyse un isolat clinique retrouvé dans un mycétome, décrit le cycle de vie du champignon et l'identifie comme *Allescheria boydii*. Jusque dans les années 1940, *S. apiospermum* et *A. boydii* étaient considérés comme deux agents différents, tous les deux

Tableau II. Caractéristiques culturales et morphologiques des espèces appartenant au genre *Scedosporium/Pseudallescheria*, d'après Gilgado *et al.* (2005, 2008).

	Stade téléomorphe	Stade anamorphe	Stade Graphium (2 nd anamorphe)	Temp. de croissance optimale (°C)	Temp. de croissance maximale (°C)	Synthèse d'un pigment (PDA, 25°C)	Conidies	Aleuries
Clade 1	Inconnu	<i>S. aurantiacum</i>	+	37	45	+ (orangé)	Cylindrique ou en forme de bouteille	Ovoïde, paroi épaisse
Clade 2	<i>P. minutispora</i>	<i>S. minutispora</i>	+	37	40	-	Cylindrique	Ellipsoïdale à ovoïde, paroi mince
Clade 3	Inconnu	<i>S. dehoogii</i>	-	25	40	-	Cylindrique ou en forme de bouteille	Ovoïde, paroi mince
Clade 4	<i>P. apiosperma</i>	<i>S. apiospermum</i>	+	37	40	V	Cylindrique	(Sub)globuleuse, paroi épaisse
Clade 5	<i>P. boydii</i> et espèces apparentées ^a	<i>S. boydii</i> et espèces apparentées ^a	+	37	40	V	Cylindrique	(Sub)globuleuse, paroi épaisse

V : variable

^a *S. angusta*, *S. ellipsoidea* et *S. fusoidea*

responsables de mycétomes. Ensuite, Emmons a démontré que le premier était l'anamorphe du second, car ces deux espèces possédaient une morphologie semblable et qu'ils induisaient la même symptomatologie. En 1970, le téléomorphe *A. boydii* a été renommé *Petriellidium boydii* puis *Pseudallescheria boydii* en 1982 (Cortez et al., 2008).

b) Evolution phylogénétique de *Scedosporium* spp.

A partir des années 1990, des études phylogénétiques ont démontré que *P. boydii* et les espèces apparentées présentaient une grande variabilité génétique (De Hoog et al., 1994; Issakainen et al., 1997; Rainer et al., 2000).

Auparavant, les scientifiques élaboraient la taxonomie des espèces fongiques en distinguant la forme anamorphe (forme asexuée) ou téléomorphe (forme sexuée) du champignon (Hawksworth et al., 2011). Ainsi, il a longtemps été considéré que le genre *Scedosporium* regroupait trois espèces fongiques : i) *S. apiospermum*, la forme anamorphe de ii) *Pseudallescheria boydii* et iii) *S. prolificans*. *P. boydii* étant considéré comme la forme responsable des scédosporioses (Cortez et al., 2008). En revanche, aucune forme téléomorphe de *S. prolificans* n'était décrite (Cortez et al., 2008). Actuellement, l'appellation « *Pseudallescheria* » a été abandonnée au profit de l'appellation « *Scedosporium* » (Lackner et al., 2014c).

En 2005, une première révision majeure de la taxonomie du genre *Scedosporium* a été proposée par Gilgado et al., (Gilgado et al., 2005). Des études morphologiques (macroscopiques et microscopiques) (Tableau II), des tests physiologiques (température optimale de croissance) (Tableau II) et biochimiques (assimilation des hydrates de carbone), ainsi que moléculaires (séquençage des séquences nucléotidiques des régions ITS1 et ITS2 (pour *Internal Transcribed Spacer Regions*) de la sous-unité 58S des ARN ribosomiaux, séquençage partiel du gène codant la calmoduline (CAL) et de deux régions du gène codant la β -tubuline (TUB et BT2)) ont été conduites sur une soixantaine d'isolats cliniques et environnementaux provenant de différentes régions du monde. Il a été mis en évidence que *P. boydii*/*S. apiospermum* formaient en fait un complexe d'espèces se composant de *P. angusta*, *P. ellipsoidea* et *P. fusioidea*. De plus, deux nouvelles espèces phylogénétiquement proches du complexe ont été identifiées, il s'agit de *P. minutispora* et *S. aurantiacum*.

Une seconde révision a permis de caractériser *S. apiospermum* et *P. boydii* comme deux espèces distinctes et d'identifier une nouvelle espèce, *S. dehoogii* (Tableau II) (Zeng et al., 2007 ; Gilgado et al., 2008 ; Lackner et al., 2012b, 2014c ; Chen et al., 2016).

En 2010 une nouvelle espèce dénommée *S. deficiens* a été identifiée. Elle semblerait phylogénétiquement proche de *S. dehoogii* (Rainer et Kaltseis, 2010). Puis en 2016 c'est *S. cereisporum* qui a été caractérisée comme nouvelle espèce phylogénétiquement proche de *S. aurantiacum* (Crous et al., 2016).

En parallèle de la description de nouvelles espèces du genre *Scedosporium*, des révisions concernant la nomenclature des champignons ont été établies suite à la déclaration d'Amsterdam « *One fungus – One name* » en 2011. Ainsi la nomenclature binomiale basée sur la forme anamorphe ou

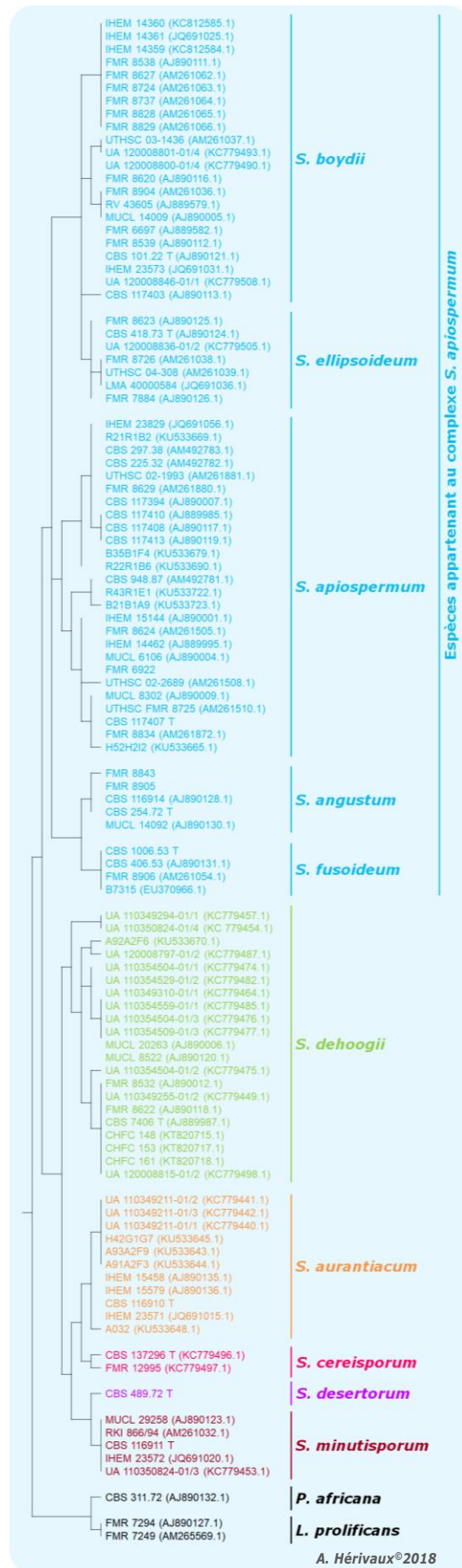


Figure 16. Phylogénie actuelle des espèces du genre *Scedosporium*, d'après Ramirez-Garcia *et al.* (2018).

téléomorphe du champignon a été bannie (Hawksworth *et al.*, 2011). De plus, la dénomination *Pseudallescheria* a été abandonnée en 2014 (Lackner *et al.*, 2014c).

Très récemment, une nouvelle étude phylogénétique a été menée et permet aujourd’hui de dénombrer 10 espèces fongiques au sein du genre *Scedosporium* (Figure 16) (Ramirez-Garcia *et al.*, 2018). Parmi ces espèces on retrouve *S. aurantiacum*, *S. cereisporum*, *S. dehoogii*, *S. desertorum* et *S. minutisporum*. Les cinq autres espèces forment le complexe *S. apiospermum* : *S. angustum*, *S. apiospermum sensu stricto*, *S. boydii*, *S. ellipsoideum* et *S. fusarium*. De plus, *L. prolificans* semblerait ne pas être liée aux espèces du genre *Scedosporium* et constituerait donc le genre *Lomentospora* à part entière (Lackner *et al.*, 2014c ; Ramirez-Garcia *et al.*, 2018).

2.2. Distribution environnementale et clinique des *Scedosporium*

La compréhension de l’épidémiologie des infections à *Scedosporium* spp. est essentielle. De plus, en s’intéressant à l’écologie des espèces du genre *Scedosporium* il est possible d’identifier de potentiels réservoirs et ainsi de pouvoir lutter plus efficacement contre la dissémination de ces moisissures et prévenir les colonisations/infections chez l’Homme sain, en mettant en place des mesures préventives (Guarro *et al.*, 2006 ; Cortez *et al.*, 2008 ; Cimon *et al.*, 2015 ; Ramirez-Garcia *et al.*, 2018 ; Rougeron *et al.*, 2018).

2.2.1. Niches environnementales

Pour commencer, il est essentiel de garder en mémoire le fait que les *Scedosporium* sont des moisissures saprophytes du sol. Enfin, elles sont thermotolérantes et halophiles, capables de survivre en conditions d’hypoxie ou d’hyperosmie (De Hoog *et al.*, 1994).

a) Niches dans l’environnement extérieur

D’après les caractéristiques précédemment mentionnées, les *Scedosporium* sont des moisissures capables de survivre dans les environnements fortement impactés par l’activité humaine comme les zones polluées, généralement peu oxygénées mais à fortes pression osmotique et riches en nutriments. C’est pourquoi on les retrouve notamment dans les marais, les boues des fossés, le fond des étangs et des mares, les effluents des usines de traitement des eaux usées, les boues côtières, les eaux salées et saumâtres. Quelques études ont rapporté la présence d’espèces du genre *Scedosporium* dans des échantillons d’eau pouvant provenir de piscines publiques (Guarro *et al.*, 2006 ; Ramirez-Garcia *et al.*, 2018 ; Rougeron *et al.*, 2018). De plus, ces champignons ont été isolés à partir d’autres niches environnementales riches en nutriments telles que les sols, le lisier du bétail et des volailles, le guano des chauves-souris, des poulets ou des merles (Guarro *et al.*, 2006 ; Rougeron *et al.*, 2018).

Plusieurs études ont permis d’appréhender la raison pour laquelle certaines niches écologiques sont particulièrement riches en *Scedosporium* spp. Il existe une première corrélation entre l’abondance de *Scedosporium* spp. et l’impact de l’activité humaine. Des souches ont été particulièrement isolées à partir des sols de zones agricoles, des aires de jeux pour enfants et des alentours des villes (Ramirez-Garcia *et*

al., 2018). La concentration en azote dans l'environnement semble être positivement corrélée avec la densité en moisissures (Kaltseiss *et al.*, 2009). Des températures élevées, avoisinant les 30°C, sont également corrélées avec l'augmentation de la densité fongique, en particulier pour *S. apiospermum* et *S. dehoogii* (Ramirez-Garcia *et al.*, 2018). Le pH du milieu est également un facteur déterminant. Le pH optimum des souches de *Scedosporium* spp. a été défini entre 6 et 8. C'est pourquoi, ces moisissures sont très peu retrouvées dans les sols des zones forestières (pH acide) ou le sable des dunes côtières (pH basique).

Enfin, la capacité de *Scedosporium* spp. à survivre dans les zones hautement polluées a poussé la curiosité scientifique à s'intéresser à la capacité de ces champignons à dégrader des composés aliphatiques et aromatiques, et donc leur potentiel dans le domaine de la bioremédiation (Ramirez-Garcia *et al.*, 2018 ; Rougeron *et al.*, 2018).

b) Niches dans l'environnement intérieur

A ce jour, peu d'informations sont disponibles concernant d'éventuelles niches environnementales domestiques. Une première étude conduite en 1989 en milieu hospitalier a permis, suite à l'analyse de la terre de cinq plantes en pot, de mettre en évidence la présence de *S. apiospermum* (Summerbell *et al.*, 1989). Ainsi, les plantes en pot ont été identifiées comme de potentiels réservoirs de champignons opportunistes pathogènes de l'Homme, dont *S. apiospermum*, pouvant expliquer la contamination notamment des patients immunodéprimés. En 2007, une étude environnementale complémentaire a été menée au domicile de six patients atteints de mucoviscidose, afin de déterminer l'origine de la colonisation des voies aériennes de ces patients par *S. apiospermum* (Sidot *et al.*, 2007). Tous les échantillons prélevés se sont révélés négatifs (air : n = 18, eau : n = 9) à *S. apiospermum*, à l'exception d'un prélèvement de surface (n = 52) et de 72% des échantillons de terre de plantes en pot (41/57).

Suite à ces observations, des recommandations ont pu être prodiguées afin de limiter la colonisation des voies aériennes des patients atteints de la mucoviscidose par *S. apiospermum* : i) l'éradication des plantes en pot au domicile du patient et dans les unités de soins ou ii) l'addition d'antifongiques actifs contre *S. apiospermum* dans la terre des plantes en pot.

2.2.2. Distribution géographique

Les *Scedosporium* spp. sont décrits comme des champignons cosmopolites. Cependant, en fonction de la zone géographique du globe, donc du climat, des différences dans la distribution des espèces du genre *Scedosporium* spp. sont observées. Ainsi, ce sont des espèces fongiques principalement retrouvées dans les régions tempérées du globe terrestre, et à fréquence plus modérée dans les régions tropicales.

a) En France

Une étude environnementale a été menée dans la région des Pays de la Loire en France. Parmi les 119 échantillons provenant de 11 types différents de zones impactées par l'activité humaine, sur 368

Scedosporium spp. isolés, seuls 259 isolats ont pu être identifiés jusqu'au rang de l'espèce (Rougeron et al., 2015).

Tout d'abord, des espèces du genre *Scedosporium* ont été isolées dans 40% des échantillons de sol. La répartition des *Scedosporium* spp. variait en fonction du type de sol prélevé. En effet, aucune souche n'a été isolée des prélèvements réalisés en forêts et seulement 13% (2/15) des échantillons provenant de vignobles dont le sol n'a pas été enrichi. Cependant, 92% (11/12) des échantillons issus de zones agricoles étaient positifs, tout comme 40% à 60% des échantillons provenant des rives de rivières, des parcs urbains, des zones de jeux, des zones industrielles et des usines recyclant les eaux usées, et 33% (3/9) des échantillons du littoral. Ces résultats obtenus en France concordent avec ceux obtenus auparavant lors d'études menées dans d'autres régions du monde (Kaltseis et al., 2009 ; Harun et al., 2010) et confirment le fait que les espèces du genre *Scedosporium* sont aptes à se développer dans les sols contaminés par les hydrocarbures comme les sols saturés en huile. Mais ces observations sont également en accord avec la capacité de ces moisissures à dégrader des composés aromatiques ou des composés aliphatiques linéaires (Rougeron et al., 2018) ainsi que sa capacité à utiliser le gaz naturel (Guarro et al., 2006).

De plus, 33% à 50% des échantillons de sols prélevés à proximité de points d'eau étaient positifs, confirmant le risque de se contaminer par *Scedosporium* spp. suite à un syndrome de quasi-noyade dû à l'aspiration d'eau issue des égouts, hautement polluée, stagnante ou boueuse.

Dans l'Ouest de la France, *S. dehoogii* est l'espèce la plus fréquemment isolée parmi les *Scedosporium* spp. alors que dans cette étude *S. minutispora* a été isolé une seule fois. Cependant cet dernier possède une température optimale de croissance de 25°C or les ensemencements étaient incubés à 37°C dans cette étude donc la proportion de cette espèce a pu être sous-estimée. *S. apiospermum*, *S. aurantiacum* et *S. boydii* sont retrouvés en proportions équivalentes (22,2%, 18,8% et 19,5% respectivement). L'ensemble de ces espèces est ubiquitaire dans les sols français urbains ou ruraux.

b) Dans le monde

Plusieurs études visant à apprécier la distribution des différentes espèces de *Scedosporium* ont été conduites sur des prélèvements de sols dans des zones naturelles ou impactées par l'activité de l'Homme, en 2009 en Autriche et aux Pays-Bas (Kaltseis et al., 2009) et en 2010 en Australie dans la région de Sydney (Harun et al., 2010).

En Autriche, *S. apiospermum* et *S. dehoogii* sont fréquemment retrouvés dans les environnements impactés par l'activité humaine donc dans les zones industrielles (Kaltseis et al., 2009). Cependant, *S. dehoogii* se développe principalement dans les zones industrielles alors que *S. apiospermum* est plus fréquemment retrouvé dans les sols agricoles, dans les parcs ou les aires de jeux. Ces résultats sont étonnants puisqu'en clinique il a été démontré que *S. boydii*, suivi de *S. apiospermum*, étaient les deux espèces les plus fréquemment isolées alors que *S. dehoogii* ne l'est que très rarement. De plus, *S. boydii* n'a été que très peu isolé dans les prélèvements de sol. *S. aurantiacum* a été retrouvé à fréquence égale,

mais minime, dans les prélèvements environnementaux et cliniques. Enfin, *S. minutisporum* n'a été isolé que très rarement, et uniquement dans les échantillons du sol des zones industrielles.

En Australie, c'est *S. aurantiacum* qui était majoritairement isolé (54,6%) bien que *S. dehoogii* et *S. apiospermum* étaient fréquemment isolés des prélèvements réalisés en zones urbaines (*S. apiospermum* était notamment retrouvé dans les aires de jeux). *P. boydii* était la seule espèce retrouvée dans toutes les zones de prélèvement réalisées. Enfin, *S. dehoogii* n'a été retrouvé que dans la région centrale de Sydney (Harun *et al.*, 2010).

2.2.3. Epidémiologie clinique

Les scédosporioses sont les infections dues à *Scedosporium* spp., pouvant générer des infections du tissu cutané et sous-cutané jusqu'à des infections disséminées, notamment chez le patient immunodéprimé (cf. [Analyse bibliographique, 2.4. Scédosporioses](#)). *Scedosporium* spp. sont considérés comme des pathogènes « émergents », non pas parce qu'ils ont été récemment décrits mais parce qu'ils sont plus fréquemment isolés, de par le développement de milieux semi-sélectifs favorisant leur croissance (cf [Analyse bibliographique, 2.5. Diagnostic](#)).

a) Scédosporioses

Des groupes à risques ont pu être identifiés dans le cas des infections à *Scedosporium* spp. : i) les individus présentant une infection chronique des poumons telle que la mucoviscidose, ii) la pseudo-noyade ou encore iii) le statut immunitaire du patient. De plus, la gravité de l'infection dépend de l'organe touché et de la sensibilité aux antifongiques de l'espèce concernée (Ramirez-Garcia *et al.*, 2018).

Les individus immunodéprimés (transplantation d'organe, greffe de moëlle osseuse, cancer, patient VIH, ...) sont particulièrement sujets aux scédosporioses invasives. La gravité de ces infections réside dans le fait qu'un fort taux de mortalité y est associé.

Chez le patient immunocompétent, la majorité des cas de scédosporioses reportées est liée à l'inoculation traumatique du champignon, conduisant à des infections du tissu cutané et sous-cutané ou encore à la colonisation des poumons. Ces individus sont également sujets à des infections cérébrales suite à un évènement de pseudo-noyade et l'inhalation accidentelle de spores.

b) Cas particulier : la mucoviscidose

Les espèces du genre *Scedosporium*, et plus particulièrement *S. apiospermum* et *S. boydii*, sont les champignons filamenteux les plus fréquemment isolés, après *A. fumigatus*, au cours de la colonisation des poumons des patients dans le contexte de la mucoviscidose (Ramirez-Garcia *et al.*, 2018). Des études ont reporté des fréquences d'isolation de *Scedosporium* spp. à hauteur de 3,3 à 11,6% des cas dans ce contexte (Cimon *et al.*, 2000 ; Blyth *et al.*, 2010b ; Paugam *et al.*, 2010).

Toujours dans ce même contexte, la répartition géographique des espèces *Scedosporium* est variable d'une région du monde à une autre (Blyth *et al.*, 2010b ; Zouhair *et al.*, 2013). Par exemple,

l'espèce *S. boydii* prédomine dans l'Ouest de la France dans le contexte mucoviscidosique alors que souvent peu isolée dans les prélèvements environnementaux (Zouhair *et al.*, 2013). On retrouve ensuite *S. apiospermum* et *S. aurantiacum* dans les mêmes proportions dans les échantillons de patients mucoviscidosiques et dans les échantillons de l'environnement. Enfin, l'espèce *S. minutisporum* était également identifiée mais à moindre échelle par rapport aux autres espèces du genre, tout comme dans les études environnementales. En revanche, *S. dehoogii* est fréquemment isolé dans l'environnement mais n'a jusqu'à ce jour jamais été isolé chez les patients atteints de mucoviscidose (Rougeron *et al.*, 2015). Observation étonnante puisque cette espèce a été identifiée comme la plus virulente après inoculation chez l'animal (Gilgado *et al.*, 2009). En Allemagne, c'est *S. apiospermum* qui est le plus fréquemment isolé, suivi de *S. boydii*, *S. aurantiacum* puis *S. minutisporum* (Sedlacek *et al.*, 2015). En Australie, *S. aurantiacum* est la principale espèce identifiée suivie de *S. apiospermum* (Blyth *et al.*, 2010b).

2.3. Pathogénie

2.3.1. Facteurs de virulence

Les données disponibles concernant les facteurs de virulence de *Scedosporium* spp. restent encore aujourd'hui limitées. Cependant, un certain nombre d'acteurs semblent impliqués dans la virulence de ces champignons : la mélanine, les enzymes glycoprotéolytiques, les enzymes du stress oxydatif. Ainsi, il est essentiel que l'hôte soit capable de développer une réponse immunitaire efficace pour lutter contre ces pathogènes.

a) Métallo- et sérines-protéases

Les métallo-protéases et les sérines protéases sont des enzymes protéolytiques qui dégradent les tissus de l'hôte.

Les métallo-protéases, supposées dépendantes au zinc et présentant une activité optimale à pH 5,5, sont capables de détruire la laminine et le fibrinogène des cellules de l'hôte. Ces enzymes permettraient au champignon d'échapper aux cellules immunitaires de l'hôte puisque le fibrinogène active les macrophages et les monocytes (Cortez *et al.*, 2008 ; Ramirez-Garcia *et al.*, 2018).

Les sérines protéases sont des protéines qui possèdent la faculté de dégrader le fibrinogène d'origine humaine. Ainsi, elles participeraient à la pathogénie de *Scedosporium* spp. car seraient responsables en partie de l'inflammation et de la dégradation des tissus donc permettraient au champignon d'envahir plus facilement les cellules de l'hôte (Cortez *et al.*, 2008 ; Ramirez-Garcia *et al.*, 2018).

b) Sidérophores

Le neurotropisme de *Scedosporium* spp. peut s'expliquer par la présence de sidérophores, qui sont des molécules sécrétées uniquement en condition de stress (l'acide dimérumique et le N(α)-méthyl coprogène B). En effet, ces protéines sont dépendantes du fer or le SNC (système nerveux central) contient du fer libre alors qu'on en retrouve peu dans le sérum humain (Cortez *et al.*, 2008 ; Ramirez-Garcia *et al.*,

2018). Ainsi les sidérophores permettent l'entrée du fer extracellulaire dans les cellules fongiques en le chélatant.

c) Composants de la paroi cellulaire

Les composants de la paroi de la cellule fongique peuvent participer à la pathogénicité de *Scedosporium* spp. (Ramirez-Garcia *et al.*, 2018). Par exemple, les peptidorhamnmannanes participent à l'adhésion des cellules fongiques et leur endocytose dans les tissus de l'hôte. D'autre part, les alpha-glucanes sont des polysaccharides glyco-géniques qui se lient aux *Toll-Like Receptors* et activent la réponse immunitaire de l'hôte, ou encore des glycosphingolipides, les glucosylcéramides, qui participent à la croissance et à la différenciation des cellules fongiques.

Un ultime composant de la paroi des spores pouvant jouer un rôle dans la pathogénie de *Scedosporium* spp. est la mélanine, issue de l'oxydation de composés phénoliques (1,8-dihydroxynaphtalène). Ce sont des pigments bruns à noirs de haut poids moléculaires qui apportent cette coloration caractéristique grisâtre-brunâtre aux colonies âgées, puisque ces pigments sont produits par les spores. La mélanine participerait à la pathogénicité des espèces du genre *Scedosporium* en les protégeant des stress environnementaux et des mécanismes de défense de l'hôte (Cortez *et al.*, 2008 ; Ramirez-Garcia *et al.*, 2018).

d) Enzymes du stress oxydatif

Des enzymes du stress oxydatif, superoxyde dismutases Cu/Zn et catalases, permettent l'échappement du champignon à la réponse immunitaire de l'hôte (Ramirez-Garcia *et al.*, 2018). En effet, le principal mécanisme de défense de l'hôte développé par les macrophages face à un pathogène est la production d'espèces réactives de l'oxygène.

2.3.2. Réponse immunitaire de l'hôte

Une étude a démontré que selon l'organe fongique ciblé, les cellules immunitaires mises en jeu ne seront pas les mêmes. Ainsi, la dégradation des hyphes est réalisée via l'action des leucocytes alors que les conidies seront phagocytées via les macrophages (Gil-Lamaignere *et al.*, 2003).

En revanche, l'interleukine IL-15 pourtant très active dans la réponse immunitaire de l'hôte face à une infection à *L. prolificans* en favorisant le développement des leucocytes polynucléaires et du stress oxydatif ne l'est pas dans le cas des infections à *Scedosporium* spp. (Kershaw *et al.*, 1990). Cette observation semble liée à la haute virulence intrinsèque des espèces du genre *Scedosporium*, notamment observée chez *S. apiospermum*.

2.4. Scédosporioses

Les espèces appartenant au genre *Scedosporium* sont des pathogènes opportunistes. Il peuvent être à l'origine d'une simple colonisation ou de manifestations cliniques, appelées scédosporioses, allant

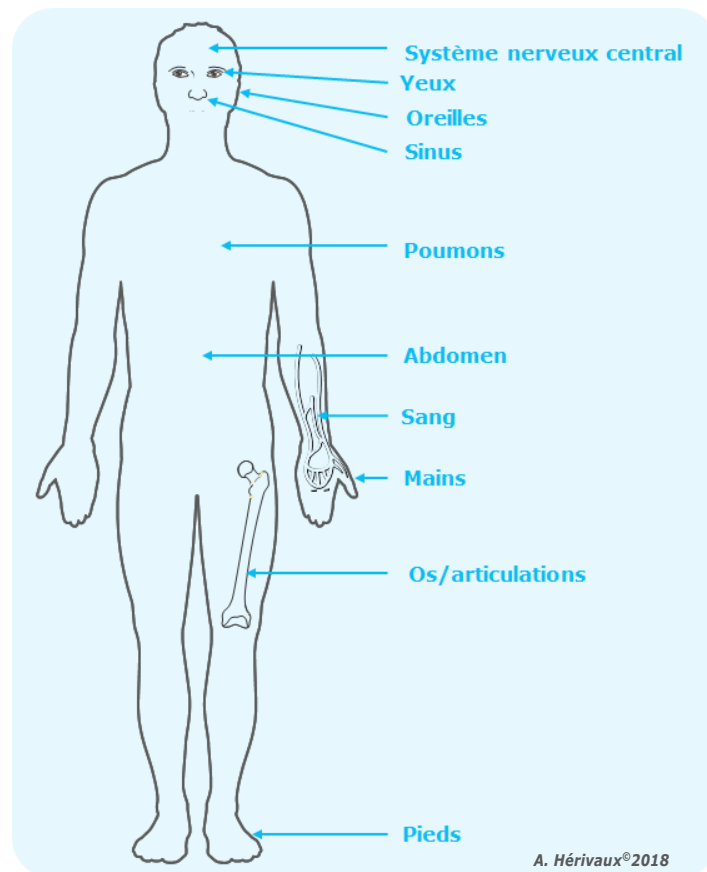


Figure 17. Description des organes pouvant être colonisés et/ou infectés par *Scedosporium*, d'après Cortez *et al.* (2008) et Servier Medical Art.

de la simple infection superficielle à l'infection systémique pouvant entraîner la mort, particulièrement chez le patient immunodéprimé (**Figure 17**) (Guarro *et al.*, 2006 ; Cortez *et al.*, 2008 ; Cimon *et al.*, 2015 ; Ramirez-Garcia *et al.*, 2018).

Le choix a été fait de développer ici les principales scédosporioses, en nous intéressant également au cas particulier des patients mucoviscidosiques et aux conséquences d'une colonisation pulmonaire.

2.4.1. Contamination

Différentes formes de scédosporioses peuvent être contractées par les patients en fonction de la porte d'entrée du pathogène et du statut immunitaire du patient. Les infections localisées, telles que les mycétomes sous-cutanés ou les infections ostéo-articulaires sont généralement dues à une inoculation traumatique du champignon (ex. souillure d'une plaie avec de la terre, piqûre avec une épine de rosier ou un bout de bois, blessure avec des outils de jardinage souillés de terre) et généralement décrites chez les patients immunocompétents. Les infections du SNC peuvent être la conséquence d'un syndrome de pseudo-noyade, au cours duquel le patient immunocompétent inhale involontairement de l'eau stagnante souillée par le champignon (ex. accident de la route, tsunami). L'inhalation de spores, bien que peu décrites dans les prélèvements d'air, peut être à l'origine d'infections broncho-pulmonaires ou encore d'infections disséminées généralement chez le patient immunodéprimé ou traumatique (Walsh *et al.*, 2004 ; Cimon *et al.*, 2015).

2.4.2. Scédosporioses localisées

Ces scédosporioses sont la conséquence d'une inoculation traumatique du champignon chez des personnes saines et immunocompétentes (Walsh *et al.*, 2004 ; Guarro *et al.*, 2006 ; Cimon *et al.*, 2015). La résection chirurgicale du champignon est généralement associée à un traitement antifongique (Guarro *et al.*, 2006 ; Cortez *et al.*, 2008 ; Cimon *et al.*, 2015 ; Ramirez-Garcia *et al.*, 2018).

a) Infections cutanées

L'identification de *Scedosporium* spp. est compliquée de prime abord puisque la clinique de ces infections n'est pas spécifique à ce genre fongique. En effet, les infections cutanées dues à *Aspergillus* spp. ou *Fusarium* spp. présentent également des ecchymoses, des papules nécrotiques et hémorragiques, des plaques érythémateuses ou des nodules (Ramirez-Garcia *et al.*, 2018).

b) Eumycétomes

Deux catégories de mycétomes sont à différencier : i) les actinomycétomes d'origine bactérienne et ii) les eumycétomes ayant pour origine les champignons filamenteux dont *Scedosporium* spp. pour 10% des mycétomes recensés (Walsh *et al.*, 2004 ; Cortez *et al.*, 2008 ; Jimenez et Salvo, 2011 ; Bonifaz *et al.*, 2014). La première description d'un mycétome à *S. apiospermum* a été réalisée par Shear dans les années 1920. Cette espèce est particulièrement identifiée dans les mycétomes de patients issus des climats tempérés et humides (ex. Europe, Etats-Unis). Tous les eumycétomes liés à des champignons filamenteux

sont des cas d'importation à l'exception de l'eumycétome à *Scedosporium* qui est acquis (Castro *et al.*, 1993 ; Walsh *et al.*, 2004). Toutefois, des eumycétomes à *Scedosporium* sont également reportés, à moindre échelle, dans les climats arides (ex. Inde, Afrique du Nord) (Venugopal et Venugopal, 1995 ; Ahmed *et al.*, 2004). *S. boydii* est la principale espèce du genre *Scedosporium* responsable de mycétomes.

Le mycétome est une manifestation chronique et non douloureuse de par la sécrétion probable d'un anesthésiant local (Jimenez et Salvo, 2011) résultant de l'inoculation traumatique de l'agent pathogène chez l'individu sain (ex. épines, écharde de bois, abrasion ou blessures avec des outils jardinage ou agricoles). Les membres inférieurs (pieds et jambes) sont principalement touchés par ces manifestations. L'infection de la peau et des tissus sous-cutanés, qui peut s'étendre aux articulations et aux os, est progressive bien que la lésion aux marges bien définies reste localisée pour une longue période (Queiroz-Telles *et al.*, 2003). Des nodules granulomateux suppuratifs, associés à une tuméfaction et une nécrose localisée, sont souvent observés. Ils renferment des grains, correspondant à des amas de champignon associés à des débris inflammatoires, blanc-jaunâtres ayant l'aspect de graines de figues, caractéristiques du mycétome mais pas du mycétome à *Scedosporium* spp. (Rippon et Carmichael, 1976). Les examens cliniques et radiologiques ne sont pas discriminatoires puisque similaires à ceux causés par d'autres champignons (Cortez *et al.*, 2008 ; Cimon *et al.*, 2015).

c) Arthrites et ostéomyélites

Chez les patients immunocompétents, l'inoculation traumatique ou chirurgicale de *Scedosporium* spp. par effraction du tissu sous-cutané ou l'injection intra-articulaire de corticoïdes peut conduire à des arthrites (ex. genou, épaule) et des ostéomyélites. Chez les patients immunodéprimés, ces infections peuvent être observées mais résultent généralement d'une dissémination hématogène du champignon, potentiellement suite à une greffe. L'articulation la plus touchée est le genou, suivi de l'épaule puis des articulations des doigts de la main et du pied pour les arthrites alors que les pieds sont la localisation principale des ostéomyélites à *Scedosporium* spp. (Cimon *et al.*, 2015). Les espèces les plus impliquées dans ces infections sont *S. apiospermum* et *S. boydii* (Taj-Aldeen *et al.*, 2015).

Les signes cliniques, pouvant se déclarer très longtemps après l'inoculation du champignon dans le cas des arthrites, sont non spécifiques et incluent œdème, érythème, douleur, perte de fonction et hyperthermie localisée (Cortez *et al.*, 2008 ; Cimon *et al.*, 2015). Dans le cas des ostéomyélites, le point d'appel correspond à des douleurs ostéo-articulaires post-traumatiques (Cimon *et al.*, 2015). La culture du liquide synovial peut se révéler négative donc le diagnostic de ces infections est compliqué (Guarro *et al.*, 2006). Lors de l'examen histologique, le praticien est capable d'observer des filaments hyalins mais pas de grains contrairement aux mycétomes. De plus, même si la radiographie peut s'avérer normale, l'imagerie par résonance magnétique peut affirmer le diagnostic.

d) Infections oculaires

Les infections oculaires à *Scedosporium* spp. chez les patients immunocompétents sont généralement la conséquence d'un traumatisme, d'une chirurgie ou de la dissémination du champignon à

partir d'un site adjacent. Il s'agit généralement de kératites ou d'endophtalmies à *S. apiospermum* ou *S. boydii* (Cimon *et al.*, 2015). Chez les patients immunodéprimés, l'infection de l'œil peut faire suite à la dissémination hématogène du champignon, un épisode de nutrition parentérale, une chimiothérapie ou l'injection intraveineuse de médicaments (Cortez *et al.*, 2008). Dans ce cas, la majorité des infections oculaires sont des endophtalmies (Cimon *et al.*, 2015).

La clinique n'est pas spécifique (ulcération douloureuse et purulente de la cornée, douleurs localisées, photophobie, diminution de l'acuité visuelle, larmoiements, rougeur). Des lésions grises à blanches à marges irrégulières et aux bordures surélevées pour la kératite ou à marges régulières pour l'endophtalmie sont observées lors de l'examen de l'œil. L'agent *Scedosporium* est extrêmement difficile à identifier, retardant le diagnostic ou pouvant l'aggraver. En effet, si le diagnostic mycologique n'est pas établi, le praticien prescrira des antibiotiques et/ou des corticoïdes en première intention or ces molécules favoriseront la dissémination de la scédosporiose (Cimon *et al.*, 2015).

2.4.3. Scédosporioses pulmonaires

Le champignon *Scedosporium* spp. a la capacité de coloniser asymptomatiquement, ou non, les cavités naturelles comme les sinus, le conduit auditif ou encore les poumons. Nous nous focaliserons ici sur la colonisation des poumons chez les patients qui présentent un terrain pulmonaire sensible (ex. patient ayant conservé des cavités suite à la tuberculose, à la sarcoïdose, troubles pulmonaires chroniques comme la mucoviscidose) (Guarro *et al.*, 2006 ; Cortez *et al.*, 2008 ; Cimon *et al.*, 2015 ; Ramirez-Garcia *et al.*, 2018).

a) Scédosporiome

Le scédosporiome, aussi appelé boule fongique pulmonaire ou mycétome pulmonaire, est cliniquement similaire à un aspergillome (Guarro *et al.*, 2006 ; Cortez *et al.*, 2008 ; Cimon *et al.*, 2015). Ainsi, les symptômes non spécifiques les plus fréquemment observés sont la fièvre, la toux, les expectorations et des hémoptysies. Lors de l'examen radiologique, des images en « grelots » sont recherchées. Le diagnostic fongique est réalisé sur des expectorations, une aspiration bronchique, un liquide de lavage broncho-alvéolaire (LBA) ou encore une biopsie ou une ponction. Cependant, les cultures sont parfois négatives. L'examen histologique ou la recherche d'anticorps spécifiques peuvent venir compléter la démarche diagnostique (Guarro *et al.*, 2006 ; Cimon *et al.*, 2015).

b) Scédosporioses broncho-pulmonaires allergiques

Les principaux agents cliniques d'IBPA sont les *Aspergillus* spp. Cependant, les espèces du genre *Scedosporium* sont à l'origine de 3% des mycoses BPA (Cimon *et al.*, 2000). Ces affections engendrent une détérioration de la fonction respiratoire des patients (Ramirez-Garcia *et al.*, 2018) avec des bronchospasmes, des bronchectasies, des infiltrats pulmonaires visibles en imagerie. Le champignon peut être isolé à partir d'expectorations. Malgré des réactions d'hypersensibilité immédiate à immunoglobulines E et semi-retardée à complexes immuns, aucun outil diagnostique d'hypersensibilité immédiate n'est

disponible pour *Scedosporium* spp. (Guarro *et al.*, 2006 ; Cortez *et al.*, 2008 ; Cimon *et al.*, 2015 ; Ramirez-Garcia *et al.*, 2018).

2.4.4. Scédosporioses systémiques invasives

Scedosporium spp. peut être responsable d'infections disséminées via sa capacité à envahir les vaisseaux et à sporuler dans les tissus. Le point de départ de ces infections est variable : les poumons, la peau ou toute autre source d'infection localisée dans le sang. Les manifestations cliniques varient en fonction du point de départ de l'infection, du statut immunitaire du patient ou de l'évolution de la maladie. Ce sont généralement des infections sévères qui touchent les individus immunodéprimés sévères (ex. hémopathies malignes, patients greffés ou transplantés, chimiothérapie, infection par le VIH, granulomatose septique chronique, lupus érythémateux disséminé) (Cimon *et al.*, 2015 ; Ramirez-Garcia *et al.*, 2018).

On parle d'infection disséminée lorsqu'au moins trois organes différents sont atteints simultanément (Caira *et al.*, 2008).

a) Scédosporioses pulmonaires invasives

Les voies aériennes représentent la porte d'entrée principale des spores du champignon. Ainsi, des scédosporioses pulmonaires sont observées (Walsh *et al.*, 2004). Ces infections sont rarement décrites chez les patients immunocompétents sauf en cas de syndrome de « pseudo-noyade ».

La fièvre est le principal signe clinique, avec la dyspnée, une douleur de la poitrine, la toux et de potentielles hémoptysies. L'examen radiologique peut révéler des infiltrats et des nodules non spécifiques. De nombreuses infections à *S. apiospermum* et *S. boydii* sont décrites (Cortez *et al.*, 2008 ; Cimon *et al.*, 2015). Le champignon peut facilement disséminer par voie systémique vers les tissus cutanés ou cérébraux à partir du poumon (Cimon *et al.*, 2015).

b) Endocardites et infections intravasculaires

Les endocardites et les infections intravasculaires sont peu retrouvées dans les infections à *Scedosporium* spp. et résultent le plus souvent d'une chirurgie, parfois plusieurs années après l'évènement (O'Bryan *et al.*, 2002 ; Husain *et al.*, 2005). En revanche, si elles sont développées, un fort taux de mortalité leur est associé. D'où la nécessité de rester prudent devant ces manifestations (Roberts *et al.*, 1977).

c) Atteintes du système nerveux central

Scedosporium spp. possède un tropisme pour le SNC. Généralement, l'infection du SNC est la manifestation sévère, et généralement fatale avec un taux de mortalité supérieur à 75%, d'une infection disséminée (Cortez *et al.*, 2008 ; Cimon *et al.*, 2015). Dans le cas des patients immunodéprimés, cette localisation peut résulter d'une pathologie nécessitant un traitement immunosuppresseur ou d'une pathologie hématologique (Castiglioni *et al.*, 2002 ; Husain *et al.*, 2005). Chez les immunocompétents,

cette infection est rarement la conséquence d'un traumatisme ou d'une dissémination à partir des sinus nasaux (Bryan *et al.*, 1980 ; Berenguer *et al.*, 1989). En revanche, la dissémination hémotogène du champignon à partir des poumons peut arriver chez le patient immunocompétent suite à l'aspiration accidentelle de spores présentes dans l'eau stagnante (ex. accident, tsunami) lors d'un syndrome de « pseudo-noyade ». Les symptômes peuvent se développer de quelques jours après l'inhalation à plusieurs semaines (Guarro *et al.*, 2006 ; Cimon *et al.*, 2015).

Les principales manifestations cliniques sont des abcès cérébraux et des méningites, entraînant céphalées, fièvre, déficits neurologiques, douleur au niveau de la nuque, photophobie et vomissements (Guarro *et al.*, 2006 ; Cortez *et al.*, 2008 ; Cimon *et al.*, 2015). Lors des examens, les cliniciens doivent interpréter les résultats avec une très grande précaution puisqu'ils peuvent s'avérer normaux ou négatifs (Poza *et al.*, 2000). Cependant, la ponction ou la biopsie d'un abcès cérébral peuvent permettre une identification du champignon. *S. apiospermum* est le principal agent suivi de *S. aurantiacum* et *S. boydii* (Tintelnot *et al.*, 2008).

2.4.5. Cas particulier : la mucoviscidose

Dans le cas particulier de la mucoviscidose, les biologistes s'accordent à différencier une infection pulmonaire d'une colonisation à *Scedosporium* spp.

a) Infection pulmonaire

Les caractéristiques d'une infection pulmonaire sont : une augmentation de la production de mucus, l'isolement au moins deux fois en six mois de la même espèce dans les crachats ou les LBA, des infiltrats pulmonaires, l'échec d'une antibiothérapie, la diminution de la fonction pulmonaire et enfin l'exclusion d'une ABPA ou d'une infection bactérienne (Ramirez-Garcia *et al.*, 2018).

b) Colonisation pulmonaire

La colonisation des poumons des patients atteints de mucoviscidose par *Scedosporium* spp. intervient rarement avant l'adolescence (Cimon *et al.*, 2000). *S. apiospermum* est le second champignon filamenteux capable de coloniser les poumons des patients mucoviscidosiques, après *A. fumigatus*, d'après Cimon *et al.* (2000). De plus, la chronicité de la colonisation a été relevée, se caractérisant par la présence d'une souche de *Scedosporium* spp. prédominante sur plusieurs années dans le mucus bronchique de l'individu en question (Defontaine *et al.*, 2002 ; Blyth *et al.*, 2010b ; Lackner *et al.*, 2011). Le point de départ de la contamination est cependant incertain puisque les spores de ces champignons sont très peu décrites dans les prélèvements d'air.

Toutefois, la colonisation à *Scedosporium* spp. est décrite sur des terrains favorisant. En effet, les patients atteints de mucoviscidose sont tout d'abord prédisposés aux infections bactériennes, qui nécessitent une antibiothérapie. Ainsi, les patients présentent une légère immunodépression et des lésions tissulaires laissant place aux infections fongiques. La colonisation des poumons à *Aspergillus* spp. précède généralement une colonisation à *Scedosporium* spp. (Cimon *et al.*, 2015).

La colonisation, asymptomatique au départ, semble pouvoir être à l'origine de symptômes pouvant conduire à une inflammation chronique de l'appareil respiratoire et donc au dysfonctionnement de la fonction respiratoire mais également à des infections disséminées chez les patients immunodéprimés, notamment dans le cadre d'une greffe de poumons ou en présence de déficits hématologiques sévères (Guarro *et al.*, 2006 ; Cimon *et al.*, 2015 ; Ramirez-Garcia *et al.*, 2018).

Afin de faciliter le diagnostic de colonisation, des outils de biologie moléculaire sont actuellement en cours de développement mais non commercialisés jusqu'à ce jour (Lu *et al.*, 2011 ; Gu *et al.*, 2014). En effet, la culture permet d'isoler l'espèce présente dans les poumons des patients mais ne permet pas de différencier une colonisation d'une réelle infection. Or la distinction est nécessaire car la prise en charge du patient ne sera pas la même.

2.4.6. *Scedosporium* spp. et pathologie animale

Peu de données concernant l'épidémiologie animale de *Scedosporium* spp. sont disponibles. Cependant, l'aptitude de ces champignons à se développer jusqu'à 42°C et leur présence notamment dans les eaux circulantes amène l'hypothèse que les animaux sauvages à sang chaud pourraient constituer un réservoir naturel de *Scedosporium* spp. (Guarro *et al.*, 2006). Quelques études ont décrits la présence de *S. apiospermum* chez des animaux sauvages et domestiques (ex. rongeurs, pigeons, vaches, reptiles et amphibiens, chevaux, chiens, chats, ...), responsables généralement d'infections localisées. Quelques infections disséminées sont décrites mais l'atteinte du SNC reste rare par exemple (Guarro *et al.*, 2006 ; Rougeron *et al.*, 2018).

2.5. Diagnostic

Le diagnostic des scédosporioses se doit d'être rapide et précis de manière à différencier une colonisation d'une réelle infection et ainsi initier un traitement adéquat et dans les délais les plus brefs (Guarro *et al.*, 2006 ; Cortez *et al.*, 2008 ; Cimon *et al.*, 2015 ; Ramirez-Garcia *et al.*, 2018), puisqu'en effet certaines scédosporioses peuvent entraîner la mort, notamment chez les patients atteints de mucoviscidose (Accurso, 2007 ; Elizur *et al.*, 2008).

A cause de méthodes de détection non standardisées, notamment dans le cadre de la mucoviscidose, et d'une culture lente, aujourd'hui encore le diagnostic des infections à *Scedosporium* spp. est difficile à établir (Borman *et al.*, 2010 ; Ramirez-Garcia *et al.*, 2018). De plus, les tableaux cliniques des scédosporioses sont souvent identiques à de nombreuses autres mycoses. Diagnostiquer les espèces du genre *Scedosporium* dans les infections fongiques est un réel défi pour les biologistes.

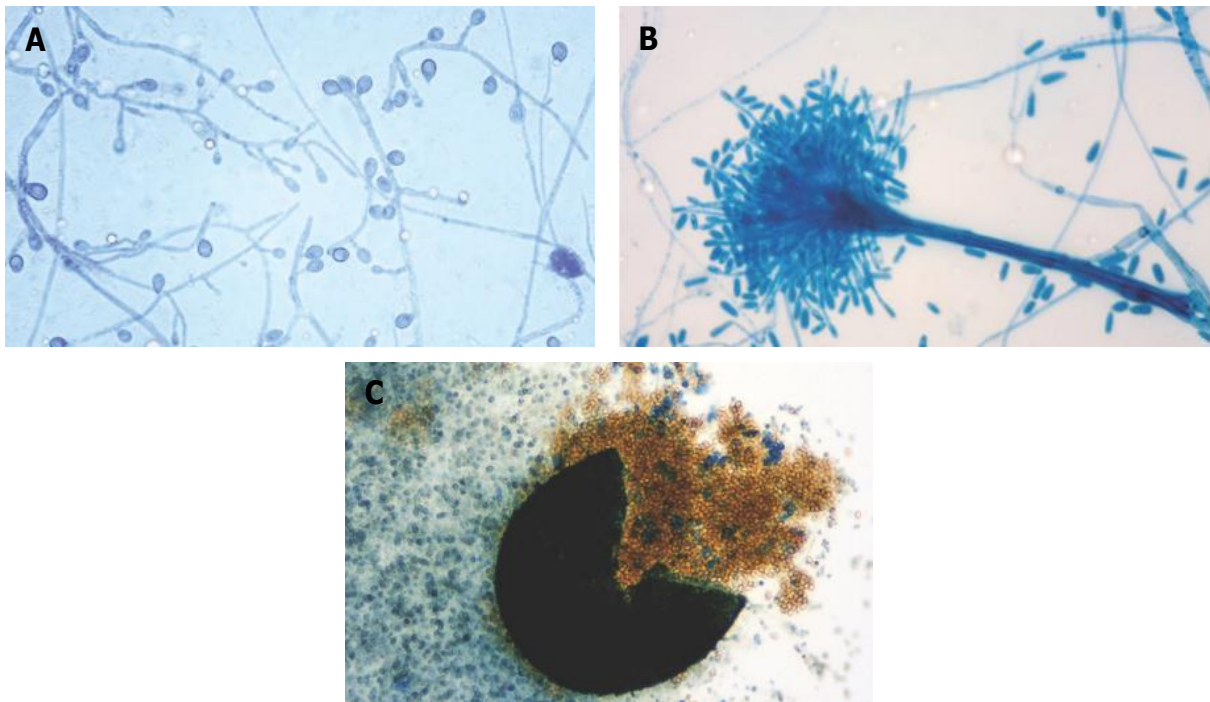


Figure 18. Aspects microscopiques des espèces du genre *Scedosporium*, d'après Cimon *et al.* (2015).

A. Aleuries disposées directement à la surface du filament ou à l'extrémité de cellules conidiogènes et hyphes solitaires (Objectif x40). **B.** Forme *Graphium* caractérisée par la présence de conidiophores disposés parallèlement (Objectif x20). **C.** Cléistothèce brun foncé, arrivé à maturité, libérant des ascospores brunes (Objectif x10).

2.5.1. Examen mycologique

L'examen mycologique, qui repose dans un premier temps sur l'examen direct puis la culture, permet au biologiste aguerri en mycologie de s'orienter vers le diagnostic de scédosporiose (Walsh *et al.*, 2004 ; Guarro *et al.*, 2006 ; Cortez *et al.*, 2008 ; Gilgado *et al.*, 2008, 2010 ; Cimon *et al.*, 2015).

a) Examen direct

Principe

L'examen direct du prélèvement permet d'observer au microscope des éléments fongiques permettant l'orientation du diagnostic vers une infection à *Scedosporium* spp. Lorsque le prélèvement est issu d'un mycétome sous-cutané, le biologiste recherchera des grains fongiques blanc-jaune. Dans tous les autres prélèvements (ex. biopsie de tissus, pus des lésions sous-cutanées, LBA) l'examen repose sur la recherche de filaments libres.

Aspect microscopique

En microscopie, différentes morphologies peuvent être observées chez *Scedosporium* spp. en fonction de l'âge de la culture au moment de l'observation.

La multiplication végétative du champignon, aussi appelée conidiogénèse ou reproduction asexuée, peut se réaliser selon deux schémas. Le mode thalique solitaire, aussi appelé mode thalique terminal, est le plus communément observé. Il s'agit d'éléments latéraux ou terminaux du filament qui s'individualisent en spores, aussi appelées aleuries ou conidies. Ainsi, chez les espèces *Scedosporium* des aleuries unicellulaires à base tronquée et paroi lisse se forment directement sur les filaments, ou hyphes, hyalins végétatifs septés ou à l'extrémité de fins conidiophores qui sont eux à angle droit par rapport au filament. La forme des conidies brunes à maturité est variable d'une espèce à une autre (5-6 µm de large sur 6-14 µm de long) (**Tableau II**). Lorsqu'il s'agit du second mode de conidiogénèse, le stade Graphium est décrit. Des cellules conidiogènes, ou annelides, regroupées en corémies (les conidiophores sont en amas, parallèles les uns aux autres) sont alors observées. Des conidies hyalines, unicellulaires, plus petites (2-3 µm de large sur 5-7 µm de long), plus fines et allongées sont présentes à leur extrémité (**Figure 18**). Le stade Graphium n'est pas décrit chez tous les *Scedosporium* spp. En effet, il a été observé chez des isolats de *S. apiospermum* mais jamais pour *S. dehoogii* par exemple (Gilgado *et al.*, 2008).

Lorsque le champignon est plus âgé (au-delà de trois semaines de culture), la reproduction sexuée peut être observée. La forme sexuée, ou cléistothèce, se caractérise par une paroi fine, une coloration jaunâtre-brunâtre, une forme arrondie (140-180 µm de diamètre) qui renferme des asques octosporés sphériques à paroi très fine contenant plusieurs ascospores unicellulaires et ovoïdes à elliptiques et de couleur cuivrée (4-5 µm de large sur 7-9 µm de long) (**Figure 18**) (**Tableau II**). Cette structure est rarement observée en microscopie (Gilgado *et al.*, 2008).

b) Cultures

Principe

Scedosporium spp. sont des champignons non exigeants et sont donc cultivables sur des milieux utilisés en routine comme le milieu Sabouraud, les géloses au sang ou les géloses chocolat. Il est cependant important de garder à l'esprit quelques éléments clés concernant la croissance de ces espèces. Tout d'abord, la température optimale de croissance de ces champignons n'est pas de 37°C pour tous. D'autre part, l'examen macroscopique et microscopique des cultures fongiques demandent une expertise du biologiste. De plus, il est difficile de différencier deux espèces du genre *Scedosporium* seulement à partir de la culture fongique (même si des différences culturelles, l'évaluation d'activités enzymatiques ou la consommation des carbohydrates permet de distinguer les espèces principales) (Horré *et al.*, 2011 ; Kaur *et al.*, 2015). Enfin, les espèces du genre *Scedosporium* poussent lentement. C'est pourquoi l'utilisation de milieux semi-sélectifs est essentielle à l'isolement des espèces du genre *Scedosporium*, afin de ne pas sous-estimer l'occurrence de ces moisissures dans les infections fongiques (Rainer *et al.*, 2008).

Les milieux semi-sélectifs sont particulièrement préconisés pour les échantillons polymicrobiens (Summerbell, 1993 ; Cimon *et al.*, 2000 ; Horrre *et al.*, 2009 ; Horrre et Marklein, 2009 ; Blyth *et al.*, 2010a ; Shin *et al.*, 2013 ; Sedlacek *et al.*, 2015 ; Hong *et al.*, 2017 ; Coron *et al.*, 2018). Par exemple, dans les LBAs ou les sécrétions respiratoires de patients atteints de mucoviscidose, les *Scedosporium* spp. peuvent être en compétition avec des *Aspergillus* spp. ou des *Candida* spp. qui se développent rapidement sur les milieux de culture. Ainsi, l'addition de molécules inhibitrices dans le milieu de culture peut favoriser la croissance des *Scedosporium* spp.

Différents milieux semi-sélectifs envers les espèces du genre *Scedosporium* sont décrits dans la littérature :

i) la gélose Sabouraud additionnée d'antibiotiques et notamment de cycloheximide qui inhibe la croissance d'*A. fumigatus*, un champignon à croissance rapide qui envahit rapidement le milieu gélosé (Cimon *et al.*, 2000),

ii) la gélose au dichloran-rose Bengale additionnée de chloramphénicol et de bénomyl (DRBC-bénomyl) (King *et al.*, 1979 ; Summerbell, 1993). Le dichloran, le rose Bengale et le chloramphénicol ralentissent la croissance bactérienne. Le rose Bengale permet également une meilleure observation des levures en leur conférant une coloration rose sur ce milieu. Le bénomyl inhibe la croissance d'un certain nombre de champignons filamenteux permettant ainsi à *Scedosporium* spp. de se développer. Le tergitol est un composé qui lui inhibe la croissance des Mucorales,

iii) le milieu SceSel+ contient deux molécules dont l'activité antifongique se complète (le bénomyl et le dichloran) mais qui ne présentent pas d'action délétère pour la croissance des espèces du genre *Scedosporium* (Summerbell, 1993 ; Rainer *et al.*, 2008) ainsi que des antibiotiques pour limiter la croissance bactérienne (Rainer *et al.*, 2008). Ce milieu a été testé sur des souches environnementales (Rainer *et al.*, 2008) et cliniques (Horrre *et al.*, 2009 ; Horrre et Marklein, 2009 ; Blyth *et al.*, 2010a ; Sedlacek *et al.*, 2015),

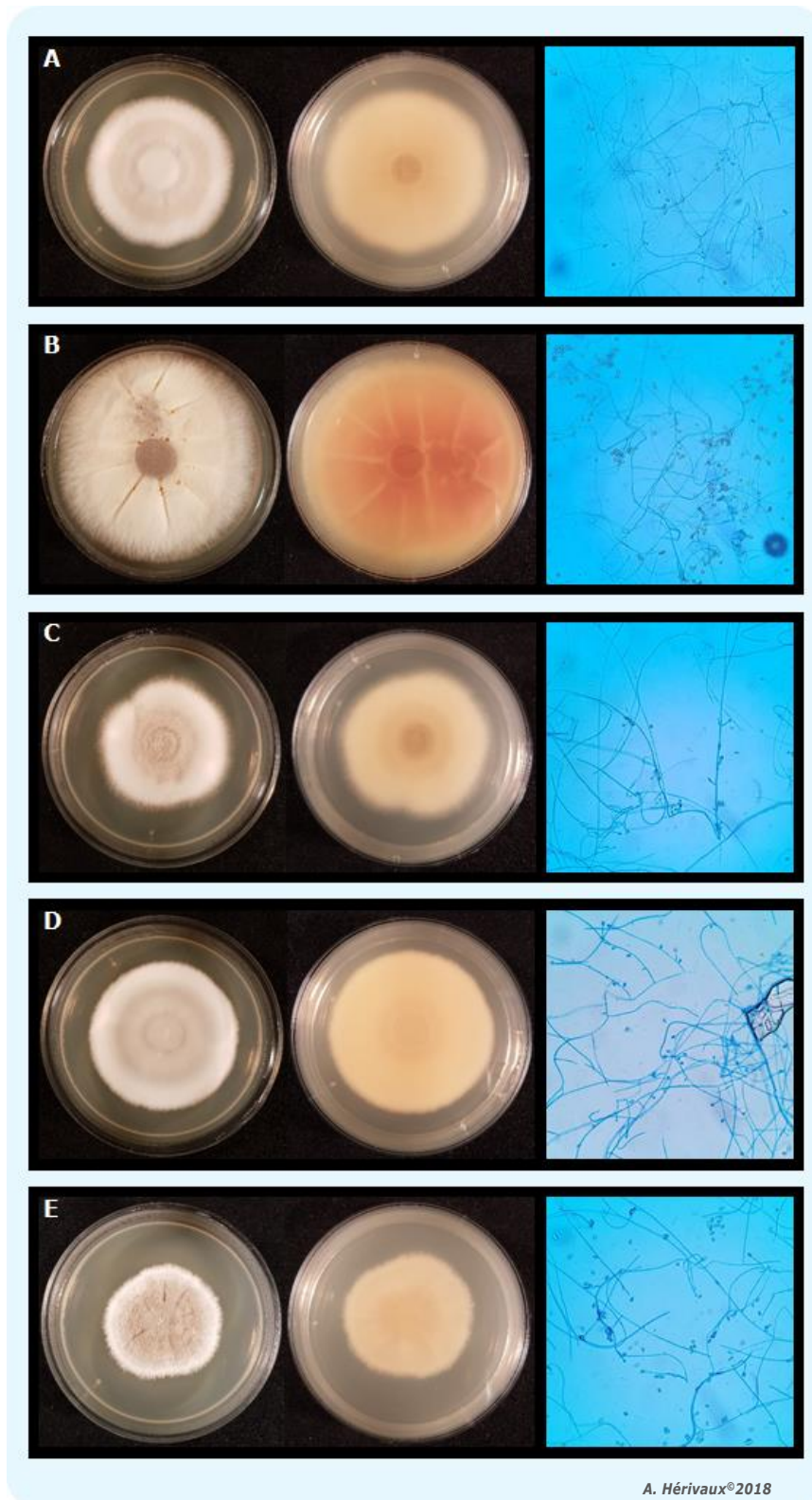


Figure 19. Aspect macroscopique et microscopique de 5 espèces du genre *Scedosporium*.

Les cultures ont été réalisées sur le milieu YPDA (pour Yeast Peptone Dextrose Agar) pendant 7 jours à 25°C. Les observations microscopiques ont été observées à l'objectif x40 après coloration du mycélium au bleu lactique.

A. *S. apiospermum* 23580. **B.** *S. aurantiacum* IHEM 23680. **C.** *S. boydii* 23574. **D.** *S. dehoogii* 120008799. **E.** *S. minutisporum* 23833.

iv) le milieu Scedo-Select III (Pham et al., 2015) se compose du 4-hydroxy-benzoate comme source de carbone, de sulfate d'ammonium et de deux molécules sélectives, le dichloran et le bénomyl. Ce milieu présente une meilleure sensibilité et sélection des espèces *Scedosporium* que le milieu SceSel+. Cependant ce milieu a uniquement été testé sur des souches environnementales.

Récemment, un protocole standardisé de détection des principaux champignons responsables de la colonisation des poumons des patients atteints de mucoviscidose a été proposé par le projet

« MucoFong ». Il est préconisé de mettre en culture deux milieux standards permettant la croissance de nombreux *Aspergillus* spp. et levures. Puis, en parallèle, deux milieux semi-sélectifs permettant aux *Scedosporium* spp. et *E. dermatitidis* à croissance lente de se développer. De plus, il est conseillé de prolonger la culture jusqu'à 2 semaines (Coron et al., 2018). Cependant, ces différents milieux ne sont pas commercialisés.

Concernant les prélèvements de liquide céphalo-rachidien, le biologiste doit être très prudent car il se peut que *Scedosporium* spp. pousse au bout de plusieurs semaines voire ne pousse pas du tout (Shih et Lee, 1984 ; Yoo et al., 1985 ; Albernaz et al., 1996).

Aspect macroscopique

Les champignons du genre *Scedosporium* sont non exigeants donc capables de se développer sans difficulté sur les milieux de croissance utilisés usuellement pour la culture fongique, tels que le milieu *Yeast Peptone Dextrose Agar* (YPDA) ou *Potato Dextrose Agar* (PDA). Cependant la croissance est lente, non extensive (3 à 4 cm de diamètre) et le champignon développe des colonies caractéristiques en seulement 4 à 5 jours de culture. De plus, la température optimale de croissance de ces espèces est de 37°C à l'exception de *S. dehoogii* pour lequel la croissance est optimale à 25°C. Cependant, ils sont thermotolérants puisqu'ils peuvent croître jusqu'à des températures avoisinant 40°C, voire 45°C pour *S. aurantiacum* (Tableau II).

Au recto, les colonies sont cotonneuses, laineuses, blanchâtres au début de la croissance des moisissures puis elles deviennent grises à noires ou brunes en vieillissant. Ce phénomène s'explique par la production d'organes de fructification, les spores, qui produisent un pigment coloré, la mélanine. Il est rapporté que la capacité de sporulation de *Scedosporium* spp. peut diminuer avec le nombre de repiquages. Au verso, une coloration foncée est généralement visible. A l'exception de *S. aurantiacum* qui produit un pigment jaune-orangé (Figure 19).

2.5.2. Méthodes diagnostiques complémentaires

a) Examen histologique microscopique

Afin de réaliser un examen histologique des biopsies (de tissus cutanés ou sous-cutanés, ou dans le cadre d'une infection profonde), les échantillons peuvent être au préalable colorés à l'acide de Schiff ou l'imprégnation argentique qui colorent spécifiquement la paroi des champignons, permettant ainsi une meilleure visualisation au microscope. Lorsqu'il s'agit d'un prélèvement inflammatoire, l'hémalun-éosine-

safran est utilisé pour visualiser les filaments. Généralement, le biologiste visualise des filaments mycéliens septés libres cependant, dans le cas du mycétome, des grains résultants d'un enchevêtrement de filaments sont observés (Cimon *et al.*, 2015).

Il est cependant difficile de différencier microscopiquement les différentes espèces filamenteuses chez les Ascomycètes telles qu'*Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. ou *Scedosporium* spp. (Shin et Lee, 1984). En effet, ces champignons possèdent des hyphes réguliers, septés et hyalins. Le branchement dichotomique des filaments d'*Aspergillus* spp. et de *Fusarium* spp. diffère des branchements irréguliers et à angle droit de *Scedosporium* spp. (Fessler et Brown, 1989 ; Hachimi-Idrissi *et al.*, 1990 ; Walts, 2001 ; Walsh *et al.*, 2004 ; Cortez *et al.*, 2008 ; Kimura *et al.*, 2010 ; Tortorano *et al.*, 2014 ; Fernandez-Flores *et al.*, 2016 ; Arif *et al.*, 2017). De plus, dans certains prélèvements des chlamydospores terminales ou intercalaires (20 µm) peuvent être observées et potentiellement confondues avec des levures. Il s'agit de spores de résistance à paroi épaisse qui ne peuvent pas se disséminer dans l'environnement à maturité. Elles se développent lorsque le milieu est hostile à la croissance du champignon (Walts, 2001 ; Bioforma, 2002 ; Fernandez-Flores *et al.*, 2016). La forme, la taille et la couleur des conidies sont également des éléments de distinction (Walts, 2001 ; Kimura *et al.*, 2010). Ces observations nécessitent cependant une grande expertise du biologiste (Cortez *et al.*, 2008).

b) Examen sérologique

Aucun des outils mentionnés ci-dessus ne permet la distinction d'une infection ou d'une colonisation des voies respiratoires dans le cadre de la mucoviscidose notamment. Or la prise en charge du patient ne sera pas la même dans un cas ou dans l'autre. Or, d'après Baxter *et al.* (2013), une infection ne peut être affirmée que s'il y a la détection d'anticorps sériques spécifiques. La recherche d'anticorps anti-*Scedosporium* n'étant pas actuellement disponible, des techniques permettent cependant de rechercher les anticorps sériques (immunoprécipitation, électrosynérèse).

Un premier anticorps polyclonal fluorescent permettrait d'identifier *S. boydii*. Cependant, il présente une faible spécificité puisque des épitopes communs sont retrouvés chez *S. boydii*, *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. et *Paecilomyces lilacinus* (Kaufman *et al.*, 1997).

Un antigène peptidopolysaccharidique issu du mycélium du champignon a été employé dans le diagnostic d'infections à *S. boydii* (Pinto *et al.*, 2001). Cependant, des réactions croisées avec *Sporothrix schenckii* (Pinto *et al.*, 2001) et *Aspergillus* spp. (Jabado *et al.*, 1998) ont été observées.

Au début des années 2000, la mise au point d'une technique d'électrosynérèse permet la détection d'anticorps dirigés contre une catalase de *S. apiospermum*. L'étude a démontré que cette méthode était plus sensible que la culture, notamment sur des crachats, mais qu'elle reste tout de même limitée puisque des réactions croisées avec *Aspergillus* spp. ont été notées (Cimon *et al.*, 2000).

En 2009, Christopher Thornton a élaboré deux anticorps monoclonaux (MAbs) qui reconnaissent spécifiquement des épitopes de la paroi de la spore ou du filament de *S. apiospermum* et *S. boydii* (Thornton, 2009). Aucune réaction croisée n'a été observée avec d'autres espèces fongiques fréquemment

retrouvées en clinique (ex. *A. fumigatus*, *C. albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Fusarium. solani*, *Rhizopus oryzae*) ou des espèces proches phylogénétiquement (ex. *S. dehoogii*, *L. prolificans*). Ces MAbs peuvent être utilisés en immunofluorescence ou en test *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* (ELISA).

Récemment, un test ELISA a été développé en utilisant la catalase A1, purifiée de *S. boydii*. Il semblerait que cette technique permette d'affirmer l'infection par *Scedosporium* spp. des sérums de patients et de les discriminer des sérums de patients infectés par *Aspergillus* spp. ou de patients non colonisés par des champignons. Cette technique serait plus spécifique (Mina et al., 2015).

c) Imagerie

L'imagerie médicale (radiographie classique, tomodensitométrie, imagerie par résonance magnétique) peut permettre le suivi de l'évolution et l'atteinte des tissus mous dans les mycétomes. Dans les scédosporioses pulmonaires et cérébrales, des lésions nodulaires de faible densité peuvent être révélées mais le diagnostic est très difficile car cette caractéristique n'est pas spécifique des scédosporioses. L'intérêt des techniques d'imagerie reste donc limité dans ce contexte (Guarro et al., 2006 ; Cortez et al., 2008 ; Tortorano et al., 2014 ; Arif et al., 2017).

d) Diagnostic biochimique

Le N(α)-méthyl coprogène B est un sidérophore spécifiquement produit par les espèces appartenant au genre *Scedosporium* (Bertrand et al., 2010). Les champignons sécrètent ces molécules uniquement en conditions de stress. Elles pourraient constituer une méthode diagnostique rapide, puisque détectables dans les expectorations de patients atteints de mucoviscidose et colonisés par ces moisissures, par chromatographie liquide haute performance, couplée à la spectrométrie de masse (Bertrand et al., 2010 ; Pluháček et al., 2016). Cependant l'identification des espèces en cause n'a pas pu être aboutie.

2.5.3. Identification d'espèces : techniques moléculaires

Ces méthodes permettent une identification rapide des espèces responsables d'une scédosporiose à partir d'un échantillon clinique. Ainsi, la prise en charge du patient est rapide et adéquate. En revanche, elles ne permettent pas de distinguer le caractère infectieux ou colonisateur de la scédosporiose.

a) PCR conventionnelles

L'analyse des séquences nucléotidiques est aujourd'hui considérée comme le gold standard permettant l'identification des espèces fongiques provenant à la fois d'échantillons cliniques ou environnementaux (Lackner et al., 2012b ; Irinyi et al., 2015). Une base de données d'environ 2800 séquences ITS permettant l'identification de 421 espèces fongiques a récemment été implémentée (Irinyi et al., 2015).

Une première technique a été développée sur des crachats de patients atteints de la mucoviscidose par Harun et al. (2011). Elle repose sur l'amplification par PCR des régions ITS des ADN ribosomiaux à

l'aide de sondes spécifiques de certaines espèces (Irinnyi *et al.*, 2015), comme *S. aurantiacum* et *S. boydii* (spécificité de 100%).

Une seconde technique, a également été développée sur des crachats de patients, par amplification d'une portion du gène qui code la β -tubuline (*BT2*) des *Scedosporium* spp. (Lu *et al.*, 2011). L'identification des espèces est réalisée par transfert des amplicons sur membrane puis hybridation avec des sondes spécifiques d'une espèce. Seul *S. dehoogii* n'a pas été identifié par cette méthode. En revanche, elle est plus discriminante que la méthode précédente car elle est capable de différencier deux espèces très proches.

b) Puces à ADN

Cette technologie nécessite l'amplification des régions ITS1 et ITS2 de la sous-unité 5,8S des ADN ribosomiaux qui sont ensuite hybridées à des sondes espèce spécifique (Bouchara *et al.*, 2009). Elle est réalisable sur les crachats des patients et a été validée sur une vingtaine d'espèces fongiques filamenteuses, dont les *Scedosporium* spp., et de levures. C'est une technique plus sensible que la culture.

c) MLST

Le *MultiLocus Sequence Typing* (MLST) a été validé sur des isolats de patients atteints de mucoviscidose (Bernhardt *et al.*, 2013). Jusqu'à ce jour trois profils sont disponibles : *S. apiospermum*, *S. aurantiacum* et *S. boydii*. Les gènes ciblés lors de cette étude correspondaient aux gènes de l'actine (*ACT*), de la calmoduline (*CAL*), de la seconde sous-unité de l'ARN polymérase II (*RPB2*), de la β -tubuline (*BT2*), de la superoxyde dismutase (*SOD2*) et du facteur d'élongation 1 alpha (*EF1a*).

d) RAPD

La *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) est une technique de génotypage qui a permis d'identifier 16 génotypes différents chez des isolats cliniques de *S. apiospermum* issus de patients atteints de mucoviscidose en France (Defontaine *et al.*, 2002). Une seconde étude utilisant la même technique de génotypage a permis de distinguer 17 profils électrophorétiques et surtout d'identifier les isolats cliniques et environnementaux européens de *Scedosporium* spp. au rang d'espèce en discriminant *S. apiospermum* de *S. boydii* (Zouhair *et al.*, 2001).

e) MALDI-TOF/MS

La spectrométrie de masse de type MALDI-TOF (*Matrix-Laser Desorption/Ionization Time Of Flight*) est un outil d'identification indispensable aujourd'hui au laboratoire. En effet, c'est une analyse économique, rapide et exacte si l'on compare au séquençage de l'ADN, permettant l'identification de l'espèce (Coulibaly *et al.*, 2011 ; Sitterlé *et al.*, 2014 ; Bernhard *et al.*, 2016 ; Sleiman *et al.*, 2016). Les spectres de référence des bases de données actuelles permettent de discriminer les principales espèces du genre *Scedosporium* (Coulibaly *et al.*, 2011 ; Sitterlé *et al.*, 2014 ; Bernhard *et al.*, 2016 ; Sleiman *et al.*,

2016). Actuellement, aucune base de données disponible n'est validée par la communauté scientifique experte (Bernhard *et al.*, 2016).

f) PCR ESI-TOF/MS

Une nouvelle technique de PCR, la PCR *Electrospray Ionization-Time Of Flight/Mass Spectrometry* (ESI-TOF/MS) a été élaborée en 2007. Des gènes nucléaires ou mitochondriaux sont amplifiés à l'aide d'amorces et de 16 PCR uniplexes. Les amplicons sont ionisés puis séparés par chromatographie. Des spectres sont obtenus suite à la détection des poids moléculaires et la composition en bases des amplicons (Metzgar *et al.*, 2013 ; Bacconi *et al.*, 2014). Cette technique a été testée avec efficacité sur des LBA (Shin *et al.*, 2013) ou des hémocultures positives à *Candida* spp. uniquement (Metzgar *et al.*, 2013 ; Bacconi *et al.*, 2014). La résonance magnétique T2 associée à cette méthode permet d'obtenir des résultats précis sur des échantillons non purifiés voire non extraits, notamment sur des hémocultures (Mylonakis *et al.*, 2015 ; Pfaller *et al.*, 2016) mais l'élaboration des amorces est assez compliquée (Alanio et Bretagne, 2017).

2.6. Traitements

Le diagnostic des scédosporioses constitue à lui seul un énorme challenge. Il en est de même pour le traitement de ces infections. En effet, les moisissures du genre *Scedosporium* sont résistantes à la majorité des antifongiques actuellement disponibles. Or, il est nécessaire d'instaurer rapidement une thérapie efficace chez les patients, notamment dans le cas des scédosporioses disséminées.

2.6.1. Sensibilité aux antifongiques

Les *Scedosporium* spp. sont connus pour être le plus souvent multi-résistants vis-à-vis des antifongiques généralement utilisés en premières intentions dans le traitement des infections fongiques (Walsh *et al.*, 2004 ; Guarro *et al.*, 2006 ; Cortez *et al.*, 2008 ; Tortorano *et al.*, 2014 ; Cimon *et al.*, 2015 ; Sharma et Chowdhary, 2017 ; Ramirez-Garcia *et al.*, 2018). La résistance des *Scedosporium* spp. aux antifongiques peut aussi bien être naturelle (ex. 5-fluoro-cytosine, triazolés de première génération) qu'acquise (ex. amphotéricine B, échinocandines). Seules quelques molécules présentent encore une efficacité envers ces espèces.

a) Familles d'antifongiques et résistance

Ces moisissures sont résistantes à des antifongiques qui ciblent des composants de la membrane ou de la paroi fongique, à savoir l'ergostérol ou le β -(1, 3)-D-glucane. Concernant l'ergostérol, l'amphotéricine B se fixe à la molécule et induit la lyse de la membrane fongique (Walsh *et al.*, 2002b ; Capilla *et al.*, 2004 ; Marie et White, 2009 ; Sedlacek *et al.*, 2015). Les triazolés de première génération, tels que l'itraconazole et le fluconazole, ou de deuxième génération comme l'isavuconazole, inhibent eux la synthèse de l'ergostérol (Marie et White, 2009). La résistance aux azolés relèverait de mutations dans le cytochrome CYP51A (Debeljak *et al.*, 2003 ; Albarrag *et al.*, 2011 ; Stensvold *et al.*, 2012 ; Fraczek *et al.*, 2013 ; Verweij *et al.*, 2016). Les échinocandines, telles que la capsosungine ou l'anidulafungine, ciblent

la voie de biosynthèse du β -(1, 3)-D-glucane de la paroi fongique (Marie et White, 2009). La résistance aux échinocandines peut s'expliquer par la mutation du gène *fks1* qui code la sous-unité de la β -(1, 3)-D-glucane synthase (Johnson et al., 2011 ; Williams et al., 2016). Les *Scedosporium* spp. sont également résistants à la flucytosine ou 5-fluorocytosine (Marie et White, 2009).

b) Différences de sensibilité inter- et intra-espèces

Il a été démontré que la sensibilité aux antifongiques des champignons *Scedosporium* peut varier d'une espèce à une autre, mais également entre les souches d'une même espèce (Gilgado et al., 2006 ; Nweze et Okafor, 2010 ; Lackner et al., 2012a, 2014a ; Tortorano et al., 2014 ; Sedlacek et al., 2015 ; Pereira de Mello et al., 2016). A rappeler que ce constat reste pratiquement une règle dans le domaine de la mycologie médicale.

Une large étude a été menée sur des isolats de *Scedosporium* spp. provenant de différentes régions du monde (n = 332) incluant des échantillons environnementaux (n= 82) et cliniques (n = 246) (Lackner et al., 2012a, 2014a) puis une seconde étude en Allemagne réalisée sur de nombreux échantillons respiratoires de patients atteints de la mucoviscidose (n > 11 600) (Sedlacek et al., 2015). Ces études ont tout d'abord démontré que *S. apiospermum* et *S. boydii*, deux espèces fréquemment identifiées en pathologie humaine, ainsi que *S. minutisporum* moins représentée dans les scédosporioses, révèlent globalement le même spectre de sensibilité aux antifongiques, même si *S. apiospermum* se montre plus sensible au posaconazole que *S. boydii*. Des résistances croisées envers les azolés et les échinocandines ont été rapportées chez ces deux espèces. Concernant *S. apiospermum*, des profils de sensibilité différents vis-à-vis du posaconazole et de la micafungine ont été observés entre les souches environnementales qui présentaient une concentration minimale inhibitrice (CMI) supérieure à celle des souches cliniques pour le posaconazole par exemple. Étonnamment, les souches résistantes au posaconazole pourraient être les souches les moins retrouvées en pathologie humaine. Le phénomène inverse est observé pour la micafungine. Aucune différence statistique significative n'a permis de mettre en évidence des différences de sensibilité entre les souches cliniques et environnementales de *S. boydii*. En revanche, il est clairement mis en avant que *S. aurantiacum* demeure globalement la souche la plus résistante aux antifongiques par rapport à l'ensemble des espèces testées, notamment envers le posaconazole. Une étude menée uniquement sur des isolats environnementaux issus de sols dans des zones fortement impactées par l'activité humaine au Mexique a démontré que la majorité des souches étaient sensibles au voriconazole et au posaconazole, modérément sensibles à l'amphotéricine B et au fluconazole mais en revanche étaient résistantes aux échinocandines (Elizondo-Zertuche et al., 2017).

Malgré l'identification de fortes tendances concernant la résistance aux antifongiques des espèces du genre *Scedosporium*, il est aujourd'hui difficile de prédire la sensibilité d'une souche. Par exemple, de grandes disparités de sensibilité à l'amphotéricine B ont été décrites entre deux espèces différentes du genre *Scedosporium*, voire entre deux isolats appartenant à la même espèce de *Scedosporium* (Lackner et al., 2012a, 2014b).

c) Schémas thérapeutiques

En Europe, la molécule de première intention dans le traitement des scédosporioses est le voriconazole, un composé triazolé de deuxième génération, puisque la résistance *in vitro* et *in vivo* envers cet antifongique est rare chez les *Scedosporium* spp. (Guarro *et al.*, 2006 ; Cortez *et al.*, 2008 ; Cimon *et al.*, 2015 ; Ramirez-Garcia *et al.*, 2018). L'espèce *S. aurantiacum* décrite comme l'espèce la plus résistante des *Scedosporium* semble cependant rester sensible au voriconazole (Sedlacek *et al.*, 2015) et *S. dehoogii*, une espèce peu décrite en pathologie humaine, présente la plus forte CMI envers cet antifongique (> 16 µg.mL⁻¹) (Lackner *et al.*, 2012a). *S. apiospermum* et *S. boydii* seraient les deux espèces les plus sensibles à ce composé (Lackner *et al.*, 2012a). Il est à rappeler que d'autre part, bien qu'efficace, le voriconazole n'est pas forcément bien tolérée (Walsh *et al.*, 2002a ; Rondeau, 2012).

Dans le cas d'infections localisées, la résection chirurgicale du champignon est également préconisée pour obtenir une guérison totale (Jabado *et al.*, 1998 ; Kanafani *et al.*, 2004 ; Kooijman *et al.*, 2007 ; Yildiz *et al.*, 2014 ; Bui *et al.*, 2016 ; Tóth *et al.*, 2017). Chez les patients immunodéprimés présentant une infection disséminée ou dans les atteintes du SNC, malgré une thérapeutique adaptée, l'issue est fatale dans 65% et 100% des cas, respectivement (Buzina *et al.*, 2006 ; Troke *et al.*, 2008 ; Schwartz *et al.*, 2011 ; Tortorano *et al.*, 2014). Cependant, une étude menée par Martin-Vincete *et al.* (2017b) a démontré qu'une infection disséminée peut être traitée avec efficacité si la souche responsable de l'infection présente une CMI < 2 µg.mL⁻¹.

En seconde intention, le posaconazole, un triazolé de deuxième génération et la micafungine, une échinocandine, sont de possibles alternatives car ils semblent actifs contre les *Scedosporium* spp. *in vitro* (Gilgado *et al.*, 2006 ; Lackner *et al.*, 2012a ; Lelièvre *et al.*, 2013 ; Alvarez et Sanhueza_2016 ; Halliday *et al.*, 2016). Ces deux molécules sont généralement utilisées en association dans le traitement des scédosporioses.

Le voriconazole seul n'étant pas suffisamment efficace dans le traitement des scédosporioses disséminées, des associations d'antifongiques sont proposées, permettant de diminuer les doses d'antifongiques et donc améliorer la tolérance du patient envers ces molécules, mais aussi prévenir l'échappement thérapeutique des souches si elles sont résistantes à l'une des molécules en association. Des effets synergiques ont été observés chez *S. apiospermum* lorsque le voriconazole était associé à l'amphotéricine B, une échinocandine (ex. capsosungine ou micafungine) ou la terbinafine, bien que les résultats peuvent varier entre les espèces du genre *Scedosporium* testées (Walsh *et al.*, 1995 ; Verweij *et al.*, 1997 ; Heyn *et al.*, 2005 ; Cuenca-Estrella *et al.*, 2008 ; Lackner *et al.*, 2011 ; Schwartz *et al.*, 2011 ; Henao-Martínez *et al.*, 2013 ; Rolfe *et al.*, 2013 ; Tóth *et al.*, 2017 ; Solé *et al.*, 2018). Cependant, une étude *in vivo* n'a pas permis de mettre en évidence une association plus efficace (azolés/échinocandines) que le voriconazole ou le posaconazole seuls (Lackner *et al.*, 2014a). L'association de trois molécules antifongiques a été proposée par Martin-Vincente *et al.* (2017a) : amphotéricine B, voriconazole et anidulafungine ou micafungine, bien que cette association n'ait pas démontré son utilité chez toutes les souches testées. Une combinaison plus étonnante a été proposée par Biswas *et al.* (2013), entre la

miltefosine, une molécule prescrite dans le traitement des leishmanioses, et le voriconazole ou le posaconazole (Compain *et al.*, 2015). Une seconde association surprenante combine un antifongique (terbinafine ou amphotéricine B) avec un anti-psychotique (chlorpromazine hydrochloride) (Homa *et al.*, 2015). Enfin, certaines études associent une à deux molécules antifongiques (ex. itraconazole, amphotéricine B, voriconazole, micafungine) à un facteur de stimulation des colonies de granulocytes et de macrophages ou à l'interféron-gamma dans le traitement des scédosporioses disséminées chez des patients immunodéprimés (Abzug *et Walsh*, 2004 ; Goldman *et al.*, 2016). Ces dernières molécules permettent à l'individu immunodéprimé de reconstituer ses défenses immunitaires et notamment les PNN qui permettent la phagocytose et l'oxydation des cellules fongiques.

Pour finir, nous évoquerons l'étude menée par Lu *et al.* (2017) et qui a mis en avant qu'une photo-inactivation de *Scedosporium* spp. diminuait les CMI *in vitro* des souches envers les principaux antifongiques (itraconazole, voriconazole, posaconazole, amphotéricine B).

2.6.2. Perspectives thérapeutiques

Le panel d'antifongiques encore actifs sur les espèces du genre *Scedosporium* étant limité, il est aujourd'hui indispensable de développer de nouvelles molécules, notamment présentant des effets secondaires ou des interactions médicamenteuses moindres (Oshero *et Kontoyiannis*, 2017 ; Perfect, 2017 ; Wiederhold, 2017a, 2017b).

Quelques nouvelles molécules antifongiques semblent prometteuses dans la thérapeutique des scédosporioses. Tout d'abord, la molécule E1210 (ou AX001, Amplyx Pharmaceuticals, San Diego, CA, USA) qui cible la voie de biosynthèse de l'ancre glycosyl phosphatidyl inositol des protéines à ancre GPI induisant alors des anomalies de paroi, d'élongation des hyphes par exemple (Hata *et al.*, 2011 ; Miyazaki *et al.*, 2011). De plus, la CMI des espèces du genre *Scedosporium* vis-à-vis de ce composé se montre au moins dix fois inférieure à celle observée pour le voriconazole, le posaconazole, l'itraconazole, la capsosfungine et l'anidulafungine ou encore l'amphotéricine B (Castanheira *et al.*, 2012). L'évaluation *in vivo* de la molécule dans le traitement de candidoses disséminées ou d'aspergilloses pulmonaires a donné des résultats encourageants (Hata *et al.*, 2011). Ensuite, une nouvelle classe d'antifongiques, les orotomides, est développée et représentée par la molécule F901318 (F2G, Inc., Manchester, UK), un inhibiteur de la dihydroorotate déhydrogénase prévenant la biosynthèse des pyrimidines (Oliver *et al.*, 2016). Trois études réalisées *in vitro* sur des isolats cliniques de *Scedosporium* spp. ont permis de prouver l'efficacité de ce composé sur *S. apiospermum*, *S. aurantiacum*, *S. boydii*, *S. dehoogii* et *S. ellipsoideus*. Cependant les CMI obtenues n'étaient pas reproductibles d'une étude à l'autre : 0,12 à 0,5 mg.mL⁻¹ (Biswas *et al.*, 2013) 0,007 à 0,5 mg.mL⁻¹ (Alastruey-Izquierdo *et al.*, unpublished), et ≤ 0,08 à 0,25 mg.mL⁻¹ (Wiederhold *et al.*, 2017a). Cette molécule fait actuellement l'objet d'études cliniques de Stade I chez des volontaires sains (Wiederhold, 2017).

La seconde stratégie permettant de gagner considérablement du temps dans le cadre des programmes d'innovation thérapeutique est d'étudier les potentiels antifongiques d'anciennes molécules

comme l'auranofin et la N-chlorotaurine (Wiederhold *et al.*, 2017b). L'auranofin comporte une molécule d'or liée à un sucre thiolé qui inhibe les voies de l'inflammation et était utilisée dans les années 1980 dans le traitement des troubles rhumatismaux. Montrant peu d'effets secondaires, l'efficacité de la molécule a été prouvée envers *S. apiospermum* à travers cette étude. Une seconde entité décrite dans les années 80 a récemment ressuscité l'engouement des chimistes. Il s'agit d'un acide aminé dérivé de la taurine, la N-chlorotaurine, qui possède une activité oxydante (Grisham *et al.*, 1984). L'un des avantages de cette molécule est la faible probabilité que des micro-organismes développent des résistances du fait d'un mécanisme d'action non spécifique. Les cellules de *S. apiospermum* et *S. boydii* sont tuées au contact du composé *in vitro* (Lackner *et al.*, 2015), en particulier dans des expérimentations incluant un milieu synthétique mimant le mucus mucoviscidose (Gruber *et al.*, 2017).

2.7. Conclusion

Malgré les formidables avancées des connaissances épidémiologiques sur les champignons appartenant au genre *Scedosporium*, de nombreuses questions essentielles restent en suspens. Par exemple, des réservoirs potentiels ont été identifiés mais cela n'est pas suffisant pour apprécier réellement la distribution des espèces dans l'environnement. De même, les mécanismes d'interaction de la moisissure avec son hôte restent aujourd'hui encore peu élucidés. Les méthodes diagnostiques, bien que développées, nécessitent encore la mise au point de méthodes hautement sensibles, spécifiques et rapides des espèces du genre *Scedosporium* en faveur d'un diagnostic plus précoce. Enfin, comme décrit en amont, les *Scedosporium* spp. sont des champignons filamenteux ayant la faculté de coloniser et/ou d'infecter leur hôte. Ces infections peuvent rester localisées ou bien se disséminer dans l'organisme entraînant souvent la mort du patient puisque ces dernières infections sont associées à un fort taux de mortalité. Or, l'arsenal thérapeutique qui cible les scédosporioses est aujourd'hui limité.

C'est pourquoi, au cours de ces travaux, nous avons focalisé nos efforts sur l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles, les histidines kinases (HKs), dans l'optique de futures stratégies de développement thérapeutique.

3. Les histidine kinases : cibles thérapeutiques potentielles

Les espèces fongiques du genre *Scedosporium* sont de redoutables pathogènes du fait de leur faible sensibilité à la majorité des molécules antifongiques aujourd'hui disponibles. C'est pourquoi il est essentiel de continuer à mener des recherches visant à identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. C'est donc dans ce cadre que mon programme doctoral a été initié. Dans cette première partie, nous proposons un état de l'art sur les HKs, une famille de protéines « senseurs » sur laquelle nous nous sommes focalisés au cours de ma thèse, tant sur le plan phylogénétique que fonctionnel.

3.1. Résumé

La phosphorylation des protéines est l'un des processus les plus répandus dans les organismes vivants et est couramment utilisée pour réguler de nombreuses voies de signalisation cellulaire. Ces phosphorylations sont régulées par des enzymes appartenant à la superfamille des kinases. Les kinases catalysent le transfert d'un phosphate de l'ATP sur divers acides aminés, comme la sérine/thréonine (Ser/Thr kinases), la tyrosine (Tyr kinases) ou encore l'histidine (HKs). À ce jour, les HKs ont été décrites chez les archées, les bactéries, les amibes, les plantes, les champignons, les virus et les bactériophages (Delaroque *et al.*, 2001 ; Osakabe *et al.*, 2013 ; Hargreaves *et al.*, 2014 ; Hérivaux *et al.*, 2016 ; Schaap *et al.*, 2016 ; Galperin *et al.*, 2018). L'activité HK a également été détectée chez les mammifères (Attwood, 2013), mais les génomes animaux ne semblent coder aucune protéine HK dont la structure est semblable à celles décrites chez les bactéries ou encore les champignons. Par conséquent, les approches pharmacologiques visant à cibler les protéines HKs représentent aujourd'hui une stratégie prometteuse pour le développement futur d'antimicrobiens dans le contexte de la santé humaine (Bem *et al.*, 2015 ; Shor *et al.*, 2015).

Nous proposons dans ce premier article un état de l'art très synthétique concernant la structure, la fonction et la distribution de ces cibles thérapeutiques chez les champignons pathogènes. Il s'agit d'une courte revue rédigée en réponse à une invitation de l'éditeur de la revue *PloS Pathogens*.

3.2. Article

PEARLS

Major Sensing Proteins in Pathogenic Fungi: The Hybrid Histidine Kinase Family

Anaïs Hérivaux¹, Yee-Seul So², Amandine Gastebois¹, Jean-Paul Latgé³, Jean-Philippe Bouchara^{1,4}, Yong-Sun Bahn^{2*}, Nicolas Papon^{1*}

1 Université d'Angers, Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène, Angers, France, **2** Department of Biotechnology, College of Life Science and Biotechnology, Yonsei University, Seoul, Republic of Korea, **3** Unité des Aspergillus, Institut Pasteur, Paris, France, **4** Laboratoire de Parasitologie—Mycologie, Centre Hospitalier Universitaire d'Angers, Angers, France

* ysbahn@yonsei.ac.kr (YSB); nicolas.papon@univ-angers.fr (NP)

Milestones in the Discovery of Histidine Kinases

The pioneering discovery of histidine kinases (HKs) from *Escherichia coli* was made in the early 1980s with the identification of the *envZ* gene [1] (Fig 1A). Further biochemical characterization of the corresponding protein revealed a new type of protein kinase activity, namely HK, to add to the well-known serine/threonine and tyrosine kinases. For a decade, HKs were considered to be restricted to bacteria, but in the 1990s, HKs were identified in plants [2], fungi [3], archaea [4], cyanobacteria [5], and amoebae (Fig 1A) [6]. Soon after, evidence suggested that HKs regulate essential processes in pathogenic bacteria and fungi [7]. Although some HKs appear to be present in humans, typical bacterial or fungal HK-like sensor proteins have not been reported yet in mammals [8], promoting these proteins as ideal targets for future therapeutics [9].

It is now accepted that HKs are involved in cell signaling systems referred to as His-to-Asp phosphorelays and several canonical schemes depicting transduction pathways involving HKs in bacteria, amoebae, plants, and fungi have emerged (Fig 1B). To date, HKs act as primary sensors for various environmental stimuli, and, upon activation, initiate phosphate transfer events between various proteins, leading to an adaptive response. Although these mechanistic models are largely described in bacteria and plants, limited evidence is available for amoebae and fungi.

Structure and Classification of Fungal Histidine Kinases

The basic structure of fungal HKs is now well established. They are composed of three main regions (Fig 2A). The first region corresponds to a highly variable N-terminal sequence that determines which stimulus is perceived by the HK. This region is referred to as the “sensor domain.” The central region is the transmitter domain consisting of both histidine kinase A (HisKA) (dimerization/phosphoacceptor) (Fig 2A) and cognate histidine kinase-like ATPase catalytic (HATPase_c) (Fig 2A) subdomains. HisKA domains include an H-box, usually containing a phosphorylatable histidine (see Fig 2A), and an X-box. The HATPase_c subdomain displays four distinct boxes: N-, G1- (sometimes called D-box), F-, and G2-boxes. The third and final region, well conserved in fungal HKs, is the C-terminal receiver domain (RD) (Fig 2A) characterized by the presence of a three amino-acids signature (DDK) including a phosphorylatable aspartate residue (see Fig 2A) [10]. Another important aspect is that fungal HKs are generically defined as hybrid HKs since the transmitter domain is fused to the receiver domain (Fig 1B).



OPEN ACCESS

Citation: Hérivaux A, So Y-S, Gastebois A, Latgé J-P, Bouchara J-P, Bahn Y-S, et al. (2016) Major Sensing Proteins in Pathogenic Fungi: The Hybrid Histidine Kinase Family. *PLoS Pathog* 12(7): e1005683. doi:10.1371/journal.ppat.1005683

Editor: Deborah A. Hogan, Geisel School of Medicine at Dartmouth, UNITED STATES

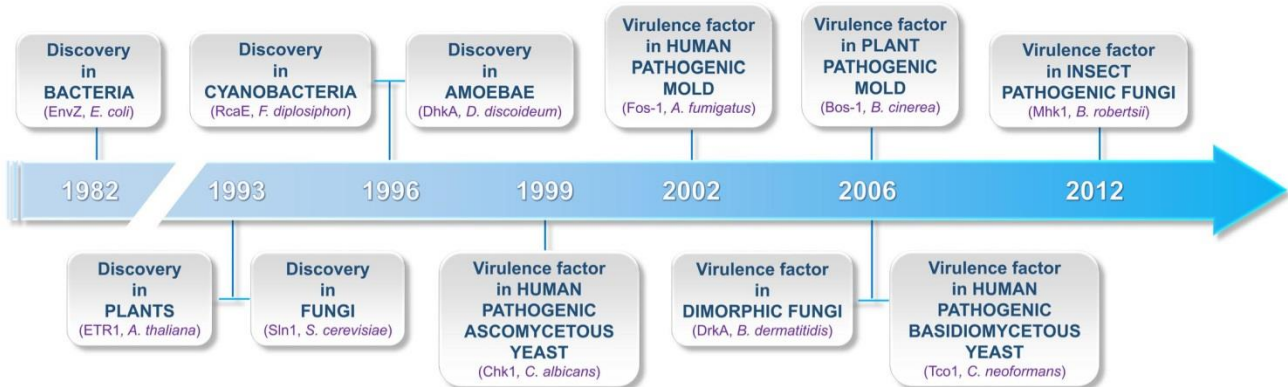
Published: July 28, 2016

Copyright: © 2016 Hérivaux et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by National Research Foundation of Korea grants (2015R1A2A1A15055687) from MEST and the Strategic Initiative for Microbiomes in Agriculture and Food funded by Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (916006-2)(to YSB). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

A



B

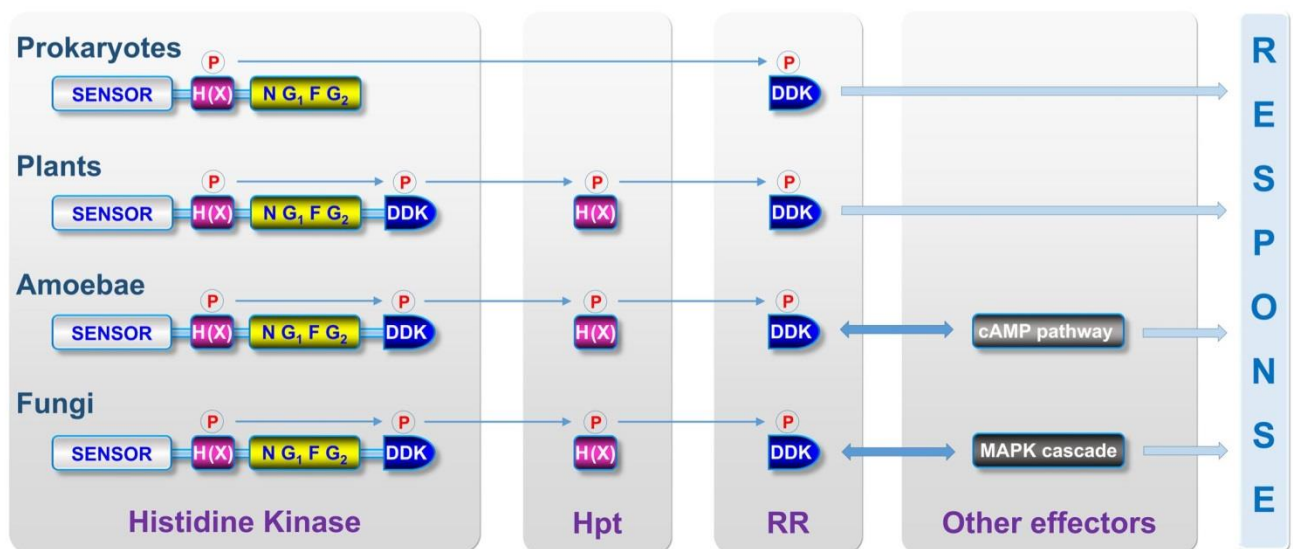


Fig 1. Milestones in the discovery of histidine kinases (HKs) and currently accepted canonical signaling pathways involving HKs in prokaryotes, plants, amoebae, and fungi. (A) Historical timeline depicting the evolution of knowledge concerning HKs. In the order of appearance from left to right: the EnvZ osmosensor in *Escherichia coli* [1], the phytohormone ethylene receptor ETR1 in *Arabidopsis thaliana* [2], the Slr1 osmosensor in *Saccharomyces cerevisiae* [3], the RcaE cyanobacteriochrome [5], the discadenine receptor DhkA in *Dictyostelium discoideum* [6], the quorum sensing-associated Chk1 in *Candida albicans* [26], the virulence factor Fos-1 in *Aspergillus fumigatus* [27], the dimorphism-related Drk1 in *Blastomyces dermatitidis* [28], the Bos-1 osmosensor in *Botrytis cinerea* [29], the *Cryptococcus neoformans* Tco1 and Tco2 (a first functionally characterized dual HK) [30], and the *Metarhizium robertsii* Mhk1 [31]. (B) Canonical schemes depicting signaling pathways involving HKs in prokaryotes, amoebae, plants, and fungi. In prokaryotes, most signaling pathways involving HKs simply consist of two components. The perception of a stimulus by the sensor domain (grey box) induces the autophosphorylation of a conserved histidine (H, pink box) by the catalytic domain (N G₁ F G₂, yellow box) in the HK. The phosphate is then transferred to a conserved aspartate residue (D) located on a cytosolic response regulator (RR) and the activated RR governs the expression of response genes. In plant cells, most (but not all) HKs constitute the initial sensing proteins of a four-step phosphorelay signaling pathway involving phosphorylation events of two downstream elements, i.e., histidine phosphotransfer shuttle proteins (Hpt) and RRs. Note that a first phosphorylatable receiver domain (DDK) is fused to the catalytic domain (N G₁ F G₂) in the HK. As observed for the archetypal two-component system in prokaryotes, the activated RR governs the expression of response genes. In amoebae, similarly to plants, a four-step phosphorelay signaling pathway is observed, but this latter controls a downstream cyclic AMP pathway. Finally, in fungi, knowledge is very fragmented, but initial studies in *Saccharomyces cerevisiae* have demonstrated that HKs also constitute the initial sensing proteins of a four-step phosphorelay signaling pathway that governs a cascade of mitogen-activated protein (MAP) kinases.

doi:10.1371/journal.ppat.1005683.g001

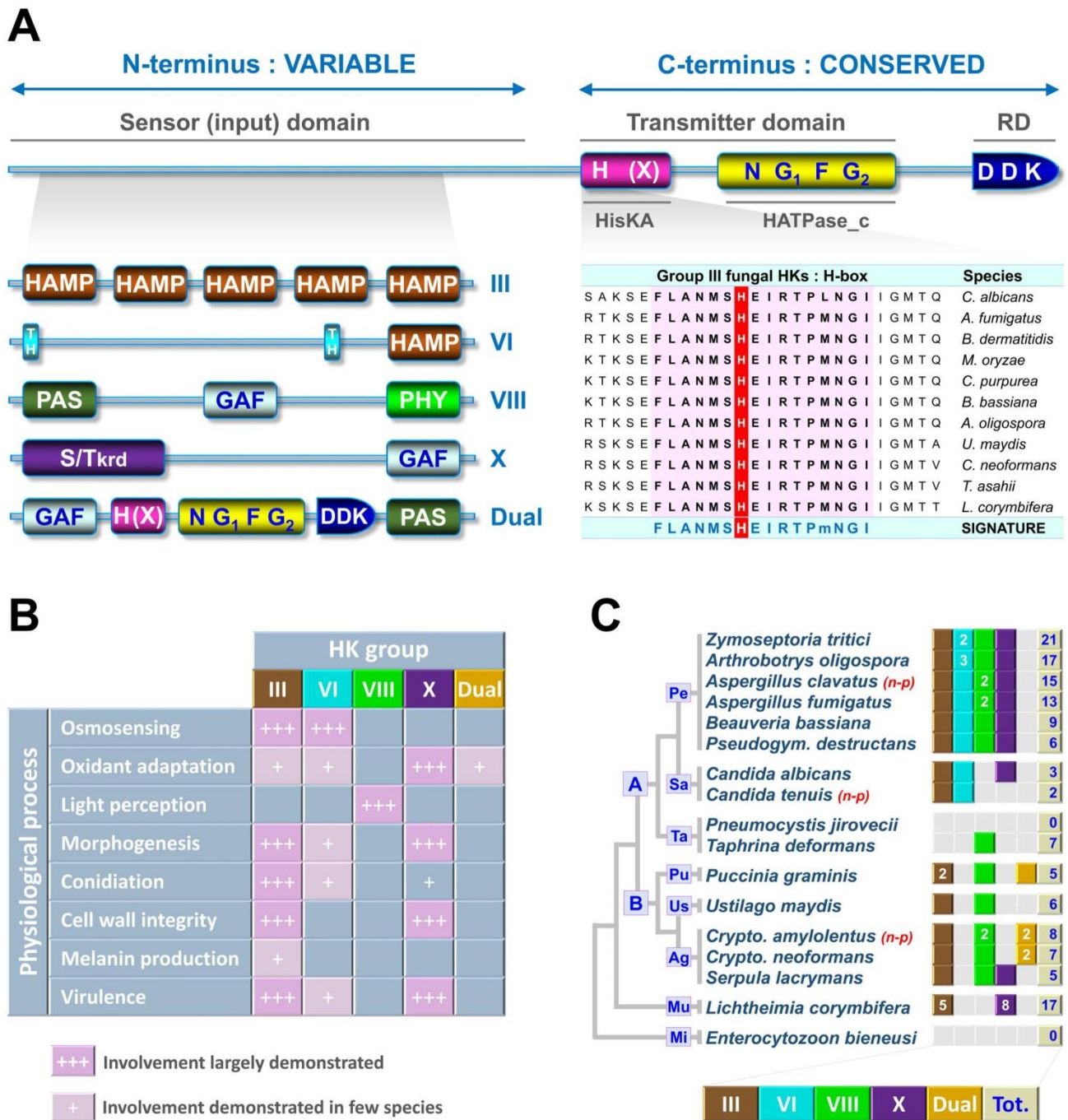


Fig 2. Structure, classification, function, and distribution of fungal HKs at a glance. (A) Basic structure of fungal HKs. They are composed of three main regions: a highly variable N-terminal sequence that determines which stimulus is perceived by the HK ("sensor" domain), a central transmitter domain consisting of both histidine kinase A (HisKA) and cognate histidine kinase-like ATPase catalytic subdomains (HATPase_c), and a C-terminal receiver domain showing a three amino-acids signature (DDK). Fungal HKs are currently categorized in 16 groups according to the sequence analysis of two regions: the H-box signature (alignment of group III HKs from major pathogenic fungi are provided in the right panel) containing the phosphorylatable histidine (red background) and the combination of domains found in the N-terminus. Domains that compose the N-terminal sensor region of major HK groups, whose

functions have been at least partially characterized, are provided on the left panel. Abbreviations: HAMP, Histidine kinases-Adenylate cyclases-Methyl accepting proteins and Phosphatases; TH, Transmembrane Helix; PAS, Period circadian protein-Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein-Single-minded protein; GAF, cGMP-specific phosphodiesterases-Adenylyl cyclases-FhIA; PHY, Phytochrome; S/Tkrd, Serine/Threonine kinase related domain. (B) Some notable functions currently assigned to the prominent groups III, VI, VIII, X, and dual HKs (for more details see [11]). (C) Quantitative and qualitative distribution of HKs in fungal clades. The total number of HKs and the occurrence of major HK groups are provided for a panel of representative well-known pathogenic and non-pathogenic (n-p) fungi. A grey box signifies that the corresponding HK groups are not observed in the species. A colored box signifies that a unique member of the corresponding HK group is found in the species and the number of members is only indicated when many members are observed. Abbreviations: A, Ascomycota; B, Basidiomycota; Pe, Pezizomycotina; Sa, Saccharomycotina; Ta, Taphrinomycotina; Us, Ustilaginomycotina; Pu, Pucciniomycotina; Ag, Agaricomycotina; Mu, Mucoromycotina; Mi, Microsporidia.

doi:10.1371/journal.ppat.1005683.g002

Sequence analysis of the transmitter domain and the sensor domain have aided in categorizing fungal HKs into 16 groups [11]. More precisely, the H-box signature (pink region in Fig 2A) containing the phosphorylatable histidine (red residue in Fig 2A) is often sufficient to classify an HK into its respective group [12]. However, since several fungal HK groups are divergent [12], it is essential to verify that the N-terminus of a newly identified HK contains most of the domains commonly found in HKs already assigned to the corresponding group. Thus, this means that each fungal HK group is defined by a relatively well-conserved H-box signature and a specific combination of domains within the N-terminus. For instance, the extensively studied group III fungal HKs are characterized by both a highly conserved H-box signature (alignment of group III HKs from prominent pathogenic species is provided in the Fig 2A) and tandem repeats of Histidine kinases-Adenylate cyclases-Methyl accepting proteins and Phosphatases (HAMP) domains within the N-terminus. The combination of domains that compose sensor region of functionally well-characterized HK groups (see following section) is provided in Fig 2A.

Functions Currently Assigned to Fungal Histidine Kinases

HKs are key signaling proteins involved in the perception and the transduction of a wide range of environmental stimuli in prokaryotes, amoebae, and plants. HKs are also widespread in the fungal kingdom, but their precise roles in the regulation of physiological processes remain fragmentary. The function of several fungal HKs has been studied over the last 15 years using classical reverse genetic approaches, mainly by creating targeted mutants and comparing them with the wild type strain (for a review see [11]). This approach has given insight into the involvement of some fungal HK groups in the response and adaptation to environmental conditions. The most striking associations reported between fungal HKs and physiological processes are summarized below and in Fig 2B.

Some fungal HKs regulate osmotic adaptation by governing the high-osmolarity glycerol (HOG) mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway (Fig 1B). This includes members of HK groups VI and III (Fig 2A). Deletion of these groups of HKs may cause cell lethality not because of the absence of the osmosensing function, but because of hyperactivation of the HOG pathway causing overaccumulation of intracellular glycerol levels [13,14].

Some other fungal HKs display a key role in response to oxidative stress. This function is particularly attributed to the group X HKs (Fig 2A) but was also reported for a few HKs belonging to other groups. Interestingly, the group X HK members in pathogenic fungi that were initially found to be involved in chemical oxidant adaptation also protected the fungal cells against phagocytic cells of their host [15].

Fungal phytochromes are light-perceiving HK receptors, as is the case in bacteria and cyanobacteria but not in plants, where phytochromes curiously evolved for serine/threonine kinase activity [16]. These proteins commonly belong to group VIII (also called the Fph group) (Fig 2A) and aid red-light sensing in Ascomycota and Basidiomycota while other types of

photoreceptors mediate shorter wavelength light sensing (for a review see [17]). Notably, it has been recently reported that a phytochrome HK in *Aspergillus nidulans*, FphA, modulates sexual differentiation through the HOG MAPK pathway by sensing red-light [18].

Adding to the aforementioned chemical and physical stressors/stimuli that can be perceived by HKs, it is important to remember that a number of HKs were also associated with essential fungal developmental programs. Specifically, some HK deletion strains, notably from group III or X HKs (and to a lesser extent group VI), displayed strong physiological perturbations, such as altered hyphal growth and reduced conidiation in pathogenic fungi and morphogenetic switch inability in dimorphic fungal pathogens. For instance, while a *Candida albicans* group X HK mutant strain is unable to switch from yeast to hyphae, *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum*, or *Penicillium marneffei* group III HK mutant strains are incapable of the hyphae to yeast transition. Furthermore, deletion of group III HK also diminishes filamentous growth and mating efficiency in *Cryptococcus neoformans*. It is important to point out that these morphogenetic perturbations seen in mutants are often associated with an alteration in cell wall composition or integrity resulting in a reduced virulence [19].

Finally, some other interesting roles were reported for a few series of fungal HKs, but they currently appear species-specific including melanin production, adaptation to hypoxia, regulation of secondary metabolism, and biofilm formation (for a review see [11]).

Distribution of Histidine Kinases in the Fungal Kingdom

HKs are widespread in all fungal clades with the exception of Pneumocystidiomycetes (e.g., *Pneumocystis jirovecii*, the causal agent of pneumocystosis, Fig 2C) and microsporidia (e.g., *Enterocytozoon bieneusi*, a causal agent of microsporidiosis, Fig 2C). In light of new genomic data, the initial conviction that Ascomycota harbor the largest number of HKs was recently revised. Surprisingly, some previously unexplored early diverging fungal lineages, such as Mucoromycotina (e.g., the fungal pathogen *Lichtheimia corymbifera*, an agent of human mucormycosis, Fig 2C) and its closely related Entomophthoromycotina (e.g., *Basidiobolus sp.* and *Conidiobolus sp.*, agents of human entomophthoromycosis), includes species with about 15–20 predicted HKs [11]. Nevertheless, it is accepted that Ascomycete yeasts (e.g., *Candida albicans*, Fig 2C) contain fewer HKs than filamentous Ascomycete species (Fig 2C), in which the number of HKs appears particularly variable. Some filamentous Ascomycete families have species that display a large series of HKs, such as Dothideomycetes (e.g., the plant pathogen *Zymoseptoria tritici*, Fig 2C) or Orbiliomycetes (e.g., the nematode trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*, Fig 2C). However, it is important to note that even within a family, the total number of HKs can drastically differ between species. For example, in Sordariomycetes, *Fusarium verticillioides* (a pathogen of maize producing deadly mycotoxins) encodes 16 HKs [12], whereas only 9 HK-encoding genes are present in the genome of *Beauveria bassiana* (a prominent insect pathogen, Fig 2C) [11]. Even more strikingly, in Leotiomycetes, *Botrytis cinerea* (the cause of the gray mold on many plants) encodes 20 HKs [12], whereas *Pseudogymnoascus destructans* (the causal agent of the white-nose syndrome in bats, Fig 2C) contains only 6 predicted HKs.

A recent compilation/classification based on genomic analysis of 50 species indicates that Basidiomycota species contains few (2 to 7) HK members and there is no marked trend between yeast and filamentous species from this clade [20]. For instance, the Agaricomycete yeast *C. neoformans* encodes 7 HKs, whereas 5 genes are predicted to encode HKs in *Serpula lacrymans*, a devastating wood degrading filamentous fungus from the same clade (Fig 2C).

Finally, major qualitative points concerning HK proteins found in Ascomycota, Basidiomycota, and other early diverging fungal lineages also require particular mention. Some HK groups are widely distributed among fungal clades (Fig 2C). This is the case of group III HKs,

which are present in most of species that contain HKs with the exception of Taphrinomycotina (e.g., *Taphrina deformans*, the causal agent of peach leaf curl, Fig 2C), the Schizosaccharomycetaceae (e.g., the model fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*), and the Saccharomycetaceae Whole Genome Duplication (WGD) clade (e.g. *Candida glabrata*). Interestingly, this observation has led some research teams to use group III HK-expressing strains of *Saccharomyces cerevisiae* as cell-based reporters to develop high throughput screening for new antifungals (see [9] for a review). On the other hand, some HK groups seem to have emerged or been maintained in a clade-specific manner. This has been hypothesized for the dual HK group that only occurs in Basidiomycota [21], or group VI osmosensors, which appear to be restricted to Ascomycota. Finally, it remains important to note that the broad series of HKs (up to 15) observed in some clades/species originates mainly from gene duplication events (likely leading to functional redundancy) and, to a lesser extent, from acquisition of new structures (HK groups). This is particularly obvious for the HKs found in Mucoromycotina (e.g., *L. corymbifera*) (Fig 2C) and filamentous Ascomycete plant pathogens [12].

In conclusion, it is striking to observe such a high degree of diversity among HKs in different fungi, both in the number of genes and their structure and functional variations, but, unfortunately, the underlying mechanisms that drive such diversity remain unclear. Closely related pathogenic and non-pathogenic fungal species do not appear to have significantly varying number of HKs (Fig 2C). However, it is highly likely that this gene family may have undergone rapid gene expansion under certain selection pressures allowing fungal species to adapt to their specific niches.

Future Prospects in Fungal Histidine Kinase Research

Many functional and evolutionary aspects concerning HKs in the fungal kingdom are still largely uncharted. However, we can assume that the recent expansion of genomic resources along with improved genetic approaches for studying pathogenic fungi (see [22] for a review) will contribute to broadened knowledge about fungal HKs. It is likely that the availability of new genome sequences will aid in identifying unknown HK structures/groups, which will help complete the current classification of this protein family. In the same way, comparative genomics should also expedite comprehensive phylogenetic analyses, enabling us to decipher the evolutionary path that led to the appearance, transfer, duplication, and loss of HK genes in fungi. As recently observed for few species [23,24], the development of novel efficient gene disruption strategies now promotes systematic multiple gene deletions in molds that bear a large number of HKs. In the near future, these powerful genetic approaches will likely help in deciphering (1) the role of each HK in a species, (2) putative genetic interactions, and (3) the basis of their apparent functional redundancy. In addition, although basic HK-mediated signal transduction routes are well characterized, downstream interacting partners and the global architecture of the signaling pathway involving fungal HKs remain critical missing pieces in this field. For instance, fluorescence microscopy techniques can provide insight into the subcellular localization of fungal HKs [25]. Notably, with the exception of group VI HKs harboring transmembrane regions, most HKs are not predicted to be localized on the cell surface. Therefore, it will be intriguing to study how an environmental signal is translated into intracellular input signal for intracellular HKs and even a possibility that HKs may collaborate with other sensor proteins. Additionally, it will be highly relevant to determine which of the known HK groups directly communicates with the only currently known downstream candidate, the phosphotransfer shuttle protein Ypd1 (see Fig 1B), and to identify unknown downstream interacting partners. It is puzzling how different signals coming from different HKs are converged into Ypd1 and a few (1 to 2) response regulators, implying that some adaptor or scaffold proteins,

hitherto uncharacterized, may play such roles. Overall, we can assume that all the aforementioned strategies and outlooks will accelerate acquisition of new basic knowledge concerning fungal HK properties and general knowledge about signaling pathways involving these proteins. This is of primary importance for the future development of innovative HK-targeted antifungal strategies.

Acknowledgments

We acknowledge the Broad Institute Fungal Genome Initiative and the MycoCosm/JGI Fungal program for making available the complete genome sequence of many fungal species. We thank Pr. Gérald Larcher and Christina Cuomo for providing the compilation of HK sequences from the bat pathogen *Pseudogymnoascus destructans* and *Cryptococcus amyloletus*, respectively. We apologize to those whose work was not referenced due to citation restrictions.

References

- Mizuno T, Wurtzel ET, Inouye M. Osmoregulation of gene expression. II. DNA sequence of the *envZ* gene of the *ompB* operon of *Escherichia coli* and characterization of its gene product. *J Biol Chem*. 1982 Nov 25; 257(22):13692–8. PMID: [6292200](#).
- Chang C, Kwok SF, Bleecker AB, Meyerowitz EM. *Arabidopsis* ethylene-response gene ETR1: similarity of product to two-component regulators. *Science*. 1993 Oct 22; 262(5133):539–44. PMID: [8211181](#).
- Ota IM, Varshavsky A. A yeast protein similar to bacterial two-component regulators. *Science*. 1993 Oct 22; 262(5133):566–9. PMID: [8211183](#).
- Rudolph J, Oesterhelt D. Chemotaxis and phototaxis require a CheA histidine kinase in the archaeon *Halobacterium salinarum*. *EMBO J*. 1995 Feb 15; 14(4):667–73. PMID: [7882970](#); PubMed Central PMCID: PMC398130.
- Kehoe DM, Grossman AR. Similarity of a chromatic adaptation sensor to phytochrome and ethylene receptors. *Science*. 1996 Sep 6; 273(5280):1409–12. PMID: [8703080](#).
- Schuster SC, Noegel AA, Oehme F, Gerisch G, Simon MI. The hybrid histidine kinase DokA is part of the osmotic response system of *Dictyostelium*. *EMBO J*. 1996 Aug 1; 15(15):3880–9. PMID: [8670893](#)
- Mascher T, Helmann JD, Uuden G. Stimulus perception in bacterial signal-transducing histidine kinases. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2006 Dec; 70(4):910–38. Review. PMID: [17158704](#); PubMed Central PMCID: PMC1698512.
- Attwood PV. Histidine kinases from bacteria to humans. *Biochem Soc Trans*. 2013 Aug; 41(4):1023–8. doi: [10.1042/BST20130019](#) Review. PMID: [23863173](#).
- Shor E, Chauhan N. A case for two-component signaling systems as antifungal drug targets. *PLoS Pathog*. 2015 Feb; 11(2):e1004632. doi: [10.1371/journal.ppat.1004632](#) eCollection 2015 Feb. PMID: [25723524](#); PubMed Central PMCID: PMC4344368.
- Grebe TW, Stock JB. The histidine protein kinase superfamily. *Adv Microb Physiol*. 1999; 41:139–227. Review. PMID: [10500846](#).
- Defosse TA, Sharma A, Mondal AK, Dugé de Bernonville T, Latgé J-P, Calderone R, et al. Hybrid histidine kinases in pathogenic fungi. *Mol Microbiol*. 2015 Mar; 95(6):914–24. doi: [10.1111/mmi.12911](#) Epub 2015 Jan 30. Review. PMID: [25560420](#).
- Catlett NL, Yoder OC, Turgeon BG. Whole-genome analysis of two-component signal transduction genes in fungal pathogens. *Eukaryot Cell*. 2003 Dec; 2(6):1151–61. PMID: [14665450](#); PubMed Central PMCID: PMC326637.
- Maeda T, Takekawa M, Saito H. Activation of yeast PBS2 MAPKK by MAPKKs or by binding of an SH3-containing osmosensor. *Science*. 1995 Jul 28; 269(5223):554–8. PMID: [7624781](#).
- Posas F, Wurgler-Murphy SM, Maeda T, Witten EA, Thai TC, Saito H. Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 "two-component" osmosensor. *Cell*. 1996 Sep 20; 86(6):865–75. PMID: [8808622](#).
- Chauhan N, Latgé J-P, Calderone R. Signalling and oxidant adaptation in *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *Nat Rev Microbiol*. 2006 Jun; 4(6):435–44. Review. PMID: [16710324](#).
- Yeh KC, Lagarias JC. Eukaryotic phytochromes: light-regulated serine/threonine protein kinases with histidine kinase ancestry. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Nov 10; 95(23):13976–81. PMID: [9811911](#); PubMed Central PMCID: PMC24997.

17. Bayram O, Braus GH, Fischer R, Rodriguez-Romero J. Spotlight on *Aspergillus nidulans* photosensory systems. *Fungal Genet Biol*. 2010 Nov; 47(11):900–8. doi: [10.1016/j.fgb.2010.05.008](https://doi.org/10.1016/j.fgb.2010.05.008) Epub 2010 May 23. Review. PMID: [20573560](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20573560/).
18. Yu Z, Armant O, Fischer R. Fungi use the SakA (HogA) pathway for phytochrome-dependent light signaling. *Nat Microbiol*. doi: [10.1038/nmicrobiol.2016.19](https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.19)
19. Boyce KJ, Andrianopoulos A. Fungal dimorphism: the switch from hyphae to yeast is a specialized morphogenetic adaptation allowing colonization of a host. *FEMS Microbiol Rev*. 2015 Nov; 39(6):797–811. doi: [10.1093/femsre/fuv035](https://doi.org/10.1093/femsre/fuv035) Epub 2015 Aug PMID: [26253139](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26253139/)
20. Lavín JL, García-Yoldi A, Ramírez L, Pisabarro AG, Oguiza JA. Two-component signal transduction in *Agaricus bisporus*: a comparative genomic analysis with other basidiomycetes through the web-based tool BASID2CS. *Fungal Genet Biol*. 2013 Jun; 55:77–84. doi: [10.1016/j.fgb.2012.09.012](https://doi.org/10.1016/j.fgb.2012.09.012) Epub 2012 Oct 31. PMID: [23123423](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23123423/).6. Review. [26253139](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26253139/).
21. Lavín JL, Sarasola-Puente V, Ramírez L, Pisabarro AG, Oguiza JA. Dual-histidine kinases in basidiomycete fungi. *C R Biol*. 2014 Feb; 337(2):111–6. doi: [10.1016/j.crv.2013.12.007](https://doi.org/10.1016/j.crv.2013.12.007) Epub 2014 Feb 10. PMID: [24581805](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24581805/).
22. Cairns TC, Studholme DJ, Talbot NJ, Haynes K. New and improved techniques for the study of pathogenic fungi. *Trends Microbiol*. 2016 Jan; 24(1):35–50. doi: [10.1016/j.tim.2015.09.008](https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.09.008) Epub 2015 Nov 5. Review. PMID: [26549580](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26549580/).
23. Jacob S, Foster AJ, Yemelin A, Thines E. Histidine kinases mediate differentiation, stress response, and pathogenicity in *Magnaporthe oryzae*. *Microbiologyopen*. 2014 Oct; 3(5):668–87. doi: [10.1002/mbo3.197](https://doi.org/10.1002/mbo3.197) Epub 2014 Aug 8. PMID: [25103193](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25103193/); PubMed Central PMCID: [PMC4234259](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC4234259/).
24. Chapeland-Leclerc F, Dilmaghani A, Ez-Zaki L, Boisnard S, Da Silva B, Gaslonde T, et al. Systematic gene deletion and functional characterization of histidine kinase phosphorelay receptors (HKRs) in the human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genet Biol*. 2015 Nov; 84:1–11. doi: [10.1016/j.fgb.2015.09.005](https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.09.005) Epub 2015 Sep 10. PMID: [26365385](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26365385/).
25. Foureau E, Clastre M, Montoya EJ, Besseau S, Oudin A, Glévarec G, et al. Subcellular localization of the histidine kinase receptors Sln1p, Nik1p and Chk1p in the yeast CTG clade species *Candida guilliermondii*. *Fungal Genet Biol*. 2014 Apr; 65:25–36. doi: [10.1016/j.fgb.2014.01.007](https://doi.org/10.1016/j.fgb.2014.01.007) Epub 2014 Feb 8. PMID: [24518307](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24518307/).
26. Calera JA, Zhao XJ, De Bernardis F, Sheridan M, Calderone R. Avirulence of *Candida albicans* CaHK1 mutants in a murine model of hematogenously disseminated candidiasis. *Infect Immun*. 1999 Aug; 67(8):4280–4. PMID: [10417206](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10417206/); PubMed Central PMCID: [PMC96739](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC96739/).
27. Clemons KV, Miller TK, Selitrennikoff CP, Stevens DA. Fos-1, a putative histidine kinase as a virulence factor for systemic aspergillosis. *Med Mycol*. 2002 Jun; 40(3):259–62. PMID: [12146755](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12146755/).
28. Nemecek JC, Wüthrich M, Klein BS. Global control of dimorphism and virulence in fungi. *Science*. 2006 Apr 28; 312(5773):583–8. PMID: [16645097](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16645097/).
29. Viaud M, Fillinger S, Liu W, Polepalli JS, Le Pêcheur P, Kunduru AR, et al. A class III histidine kinase acts as a novel virulence factor in *Botrytis cinerea*. *Mol Plant Microbe Interact*. 2006 Sep; 19(9):1042–50. PMID: [16941908](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16941908/).
30. Bahn Y-S, Kojima K, Cox GM, Heitman J. A unique fungal two-component system regulates stress responses, drug sensitivity, sexual development, and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Mol Biol Cell*. 2006 Jul; 17(7):3122–35. Epub 2006 May 3. PMID: [16672377](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16672377/); PubMed Central PMCID: [PMC1483045](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC1483045/).
31. Zhou G, Wang J, Qiu L, Feng M-G. A Group III histidine kinase (mhk1) upstream of high-osmolarity glycerol pathway regulates sporulation, multi-stress tolerance and virulence of *Metarhizium robertsii*, a fungal entomopathogen. *Environ Microbiol*. 2012 Mar; 14(3):817–29. doi: [10.1111/j.1462-2920.2011.02643.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02643.x) Epub 2011 Nov 28. PMID: [22118192](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22118192/).

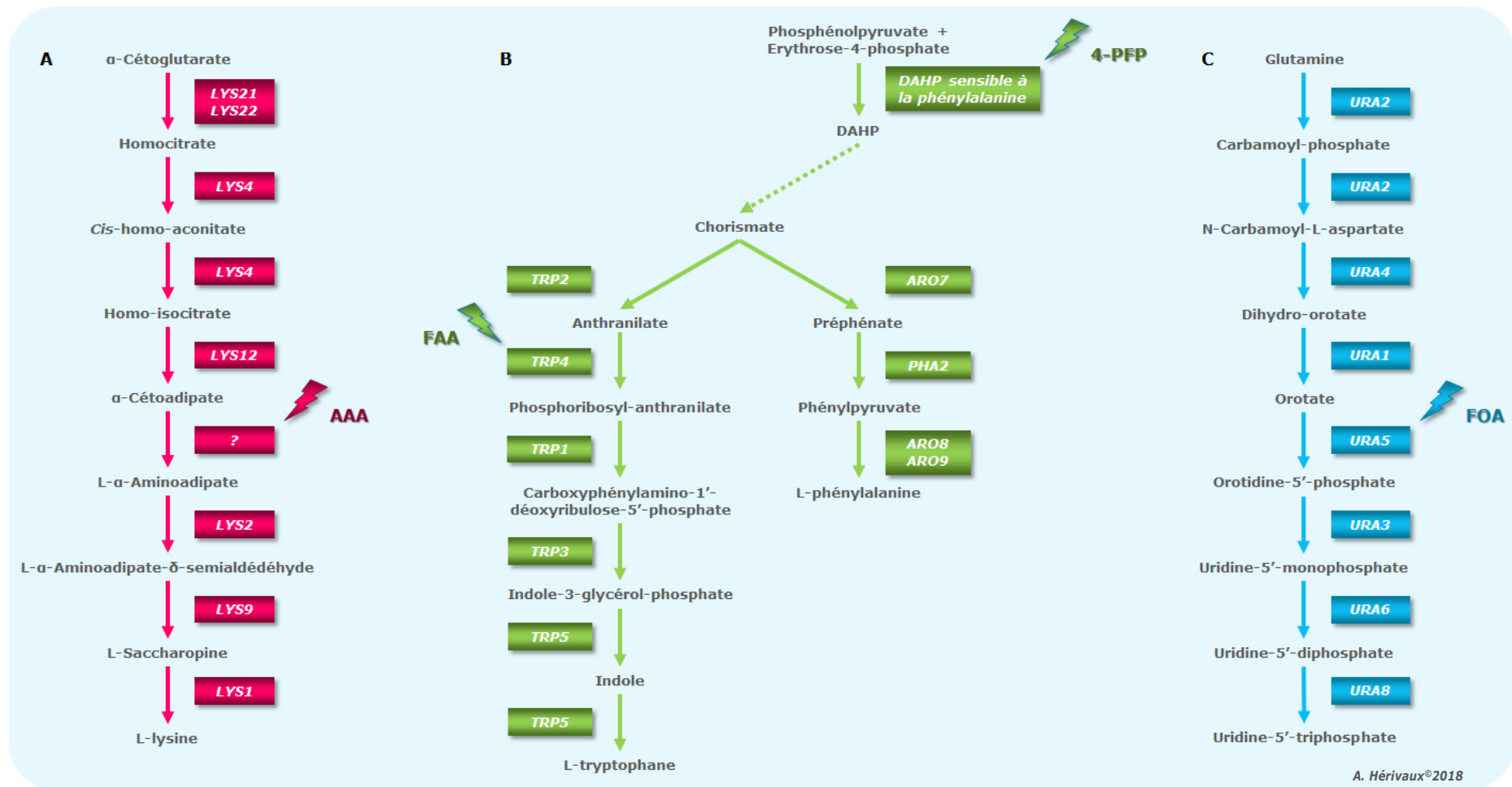


Figure 20. Marqueurs nutritionnels, antimétabolites et voies de biosynthèse respectives, d'après Ljungdahl et Daignan-Fornier (2012) et Jastrzebowska et Gabriel (2014).

A. Voie de biosynthèse de la L-lysine. **B.** Voie de biosynthèse du L-tryptophane et de la L-phénylalanine. **C.** Voie de biosynthèse de l'uracile et de l'uridine.

4. Outils moléculaires

D'une manière générale, la mise au point d'outils moléculaires demeure un prérequis essentiel au développement des approches génétiques visant à étudier la fonction de gènes chez les micro-organismes. En génétique fongique, on distingue quatre groupes majeurs d'outils moléculaires : i) les marqueurs de sélection, ii) les systèmes d'inactivation de gènes, iii) les systèmes d'expression et iv) les gènes rapporteurs.

4.1. Marqueurs de sélection

Les marqueurs de sélection représentent un premier groupe majeur d'outils moléculaires indispensables à la transgénèse des micro-organismes. Lors des expériences de transgénèse, ils permettent en effet de différencier les cellules transformées des cellules non transformées lors de l'étape de sélection. En génétique fongique, on distingue deux types de marqueurs de sélection : i) les marqueurs nutritionnels et ii) les marqueurs de résistance aux drogues. L'utilisation des marqueurs nutritionnels nécessite la génération préalable d'une souche auxotrophe réceptrice. Les étapes d'obtention de souches auxotrophes de champignons restent laborieuses, ce sont donc préférentiellement les marqueurs de résistance aux drogues qui sont utilisés pour la transgénèse des espèces fongiques, en particulier chez les filamenteux.

4.1.1. Marqueurs nutritionnels

Les marqueurs nutritionnels dominants sont des gènes qui permettent la contre-sélection de cellules fongiques transformées. Plus précisément, il s'agit de gènes codant des enzymes impliquées dans des voies de biosynthèse de métabolites primaires essentiels au développement du champignon (**Figure 20**). Cependant, pour utiliser de tels marqueurs dans les expériences de transgénèse fongique, il est nécessaire de générer au préalable une souche réceptrice auxotrophe correspondante. Par exemple, l'utilisation du marqueur dominant *URA3* sera possible chez une souche mutante de génotype *ura3*, donc auxotrophe pour l'uracile. Même si aujourd'hui quelques antimétabolites facilitent la contre-sélection de souches réceptrices auxotrophes, il est à noter que l'obtention de telles souches réceptrices reste une étape laborieuse (Papon *et al.*, 2012 ; Siewers, 2014). Les antimétabolites sont normalement toxiques pour les souches prototrophes. Ainsi, par exemple en présence d'acide 5-fluoro-orotique (5-FOA) des mutants auxotrophes *ura3* et *ura5* peuvent être sélectionnés (Boeke *et al.*, 1984 ; Ruiz-Diez, 2002). Il en est de même pour l'acide 5-fluoro-anthranilique (5-FAA) qui permet de sélectionner des souches auxotrophes pour la voie de biosynthèse du tryptophane (*trp1*, *trp3*, *trp4* ou *trp5*) (Toyn *et al.*, 2000). D'autre part, certaines mutations aboutissant à la génération de souches auxotrophes sont caractérisées par la production d'un pigment ou encore la formation de complexes colorés, ce qui facilite donc leur identification (Siewers, 2014). Par exemple, l'accumulation de précurseurs dans la voie de biosynthèse des purines entraîne une coloration rouge des colonies pour lesquelles l'allèle *ADE1* ou *ADE2* est inactivé (Foureau *et al.*, 2013). Il en est de même lorsque l'allèle *MET2* ou *MET15* (impliqués dans la voie de biosynthèse de la

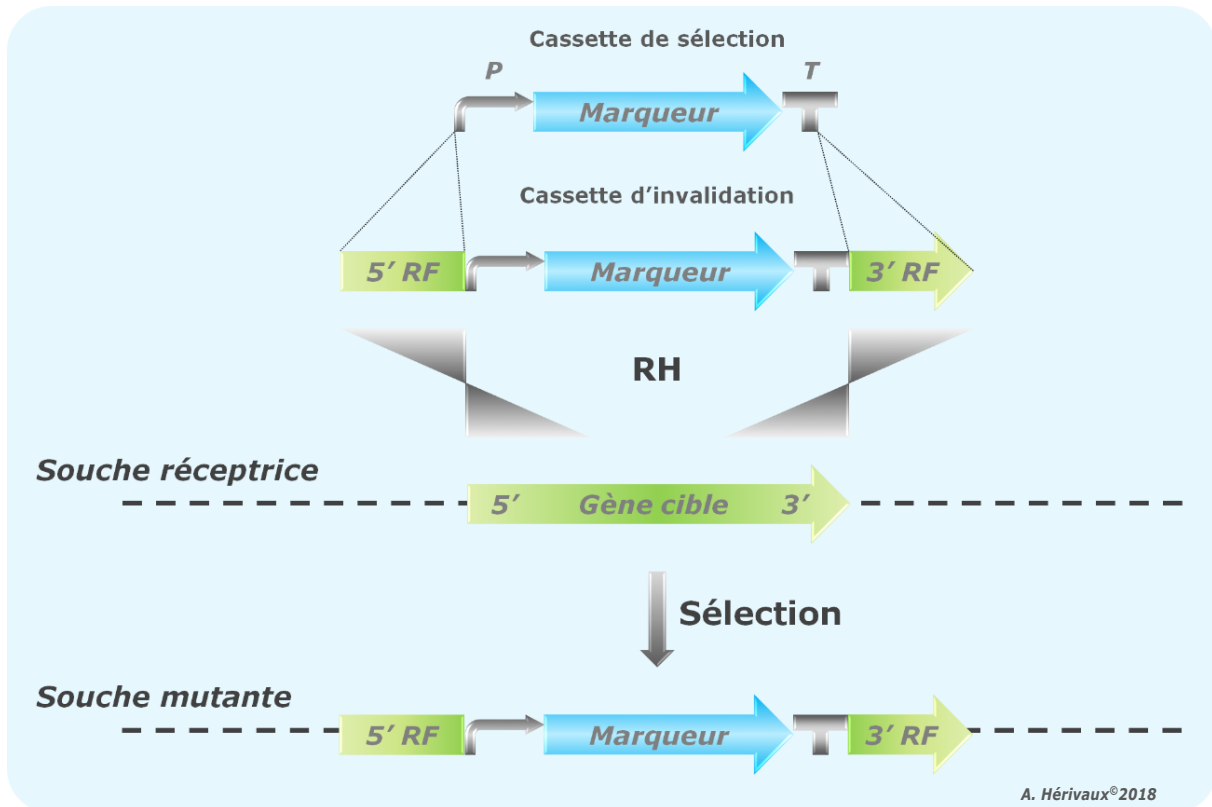


Figure 21. Schématisation de la stratégie d'inactivation de gènes par recombinaison homologe.

La première étape consiste à la construction d'une cassette de sélection qui renferme le marqueur de sélection qui sera régulé par un promoteur constitutif (P) et un terminateur (T). Les régions flanquantes (RF) 5' et 3' du gène cible sont positionnées de part et d'autre de la cassette de sélection pour former la cassette d'inactivation. Cette cassette est ensuite insérée dans le génome d'une souche réceptrice au locus donné par des mécanismes de recombinaison homologe (RH), au cours d'une étape de transgénèse, la souche mutante peut ainsi être sélectionnée.

méthionine) est défectueux, les colonies apparaissent marron sur un milieu synthétique contenant des traces de plomb (Obando Montoya *et al.*, 2014). Dans l'ensemble, les marqueurs nutritionnels ont largement été utilisés chez les levures (Siewers *et al.*, 2014 ; Xu *et al.*, 2014b) mais plus discrètement chez les champignons filamenteux (Fincham, 1989 ; Ruiz-Diez, 2002 ; Schuster et Schmoll, 2010 ; Frandsen, 2011).

4.1.2. Marqueurs de résistance aux drogues

Les marqueurs nutritionnels précédemment décrits sont ainsi d'excellents outils pour la sélection de cellules transformées de par leur innocuité et leur faible coût d'utilisation. Cependant, comme détaillé ci-dessus, ils nécessitent l'obtention préalable de souches auxotrophes. C'est pourquoi les marqueurs de résistance aux drogues représentent également une alternative intéressante dans la mesure où leur utilisation en transgénése fongique permet de s'affranchir du statut nutritionnel de la souche à transformer. Dans ce cadre, de nombreuses drogues de sélection sont disponibles et utilisables chez les espèces levuriformes et filamenteuses. La sélection des souches transformées est ainsi réalisée grâce à l'utilisation d'un gène de résistance dominant, hétérologue ou homologue.

Dans l'optique de développer de nouveaux marqueurs de sélection chez *S. apiospermum*, qui correspond au modèle fongique du laboratoire, nous avons réalisé une large étude bibliographique concernant l'utilisation des marqueurs de résistance aux drogues dans la stratégie de transformation des levures et des champignons filamenteux. Ce travail bibliographique fait actuellement l'objet de la rédaction d'une revue, disponible en annexe (Annexe II), compilant les marqueurs de résistance aux drogues actuellement disponibles et leur utilisation chez les espèces appartenant au règne des Fungi.

4.2. Systèmes d'inactivation de gènes

Dans le cadre de l'étude de la fonction des gènes, les systèmes d'inactivation permettent la création de souches mutantes pour un gène donné, ce qui offre par la suite la possibilité de comparer les phénotypes d'un génotype mutant par rapport au génotype sauvage de l'espèce.

La stratégie la plus simple qui permet l'obtention d'une souche mutante repose sur la construction préalable d'une cassette d'inactivation composée de manière générique d'un marqueur de sélection bordé par des séquences 5' et 3' homologues du gène ciblé. Cette cassette est ensuite transférée dans les cellules fongiques par diverses techniques de transgénése (choc thermique, électroporation, agrotransformation, biolistique, ...). Dans un certain nombre de cellules transformées, la construction moléculaire sera intégrée dans le génome grâce aux mécanismes cellulaires de recombinaison homologue (qui correspond au remplacement d'un gène à un locus ciblé) (Figure 21).

4.2.1. Point critique

Les espèces fongiques filamenteuses, contrairement à la majorité des levures, privilégient des mécanismes de réparation de l'ADN dits « non-homologues » ou « illégitimes ». Ces mécanismes

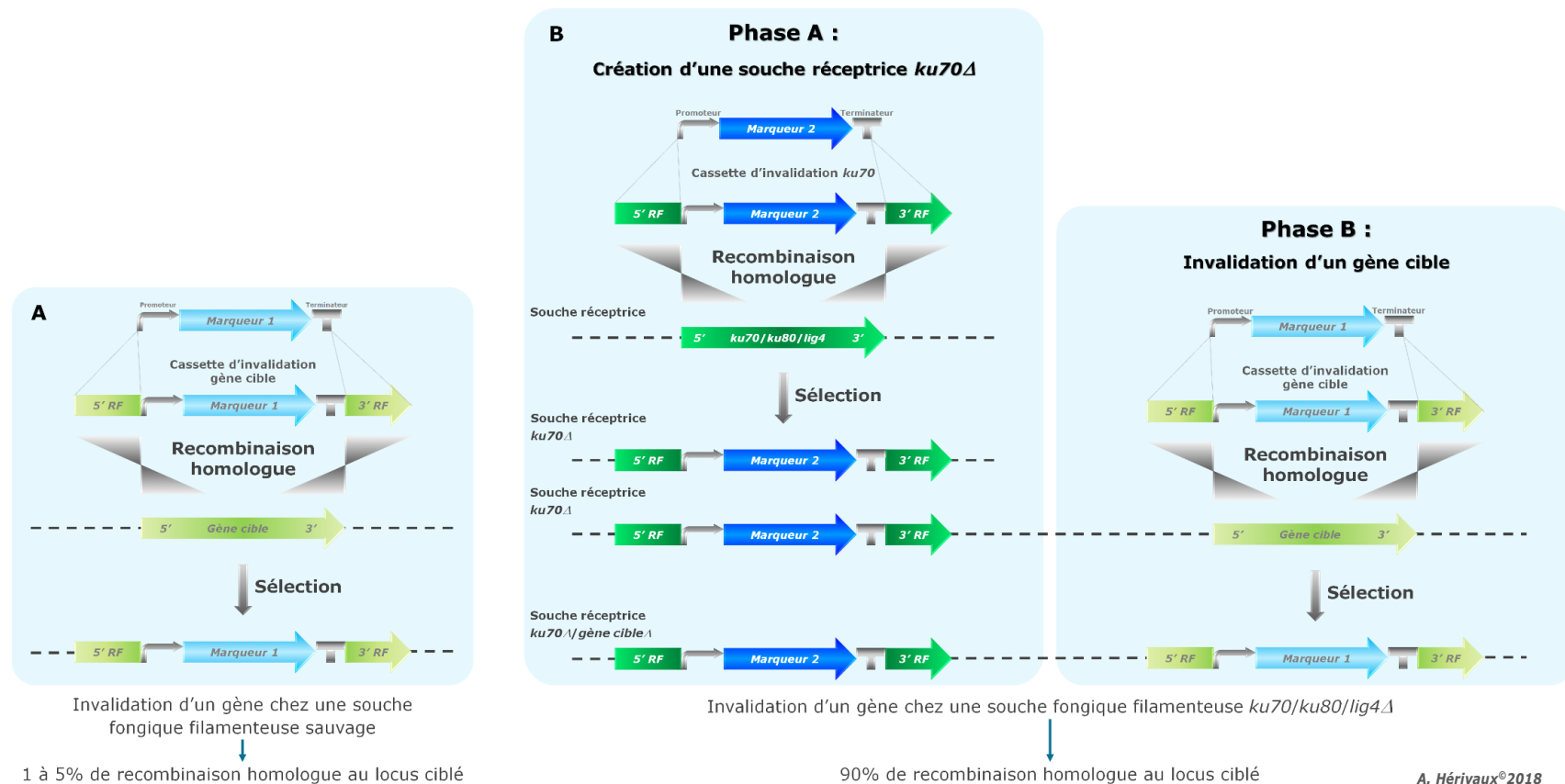


Figure 22. Intérêt de l'ingénierie d'une souche réceptrice *ku70Δ*, *ku80Δ* ou *lig4Δ* chez les champignons filamenteux.

A. Lorsque la transgénèse d'un ADN exogène (par exemple une cassette d'inactivation) est réalisée chez une souche réceptrice sauvage d'un champignon filamenteux, des mécanismes de recombinaison non-homologues s'opèrent et empêchent l'intégration de cet ADN au locus ciblé. Le taux de recombinaison homologue est extrêmement faible. **B.** Les protéines *Ku70*, *Ku80* et *Lig4* sont reconnues comme impliquées dans ces mécanismes de recombinaison non-homologues. Ainsi, lorsque l'inactivation d'un gène cible est envisagée chez un champignon sauvage, il est conseillé de construire au préalable une souche réceptrice dans laquelle le gène *ku70*, *ku80* ou *lig4* a été éliminé. Dans un second temps, la transgénèse de la cassette d'inactivation au locus du gène cible peut être réalisée. Les systèmes de réparation illégitimes de l'ADN n'étant plus fonctionnels, le taux de recombinaison homologue est plus élevé.

entraînent donc l'intégration ectopique des ADN exogènes (correspondant à la cassette d'inactivation dans le cadre de la transgénèse) (Ninomiya *et al.*, 2004). Ainsi, dans une souche sauvage de champignon filamenteux, il est souvent très difficile d'aboutir à la sélection d'un mutant pour un gène cible (la cassette d'inactivation pourtant spécifique du gène ne s'intégrera pas au locus cible dans plus de 95% des cas) (Figure 22).

Aujourd'hui, il est reconnu que la voie de réparation illégitime chez les champignons implique en particulier les protéines du complexe appelé « jonction d'extrémités non homologues » (ou NHEJ en anglais) : Ku70, Ku80 et Lig4. C'est pourquoi, dans le cadre des stratégies d'inactivation de gènes chez les champignons filamenteux, il apparaît essentiel de sélectionner au préalable une souche réceptrice dans laquelle le gène *ku70*, *ku80* ou *lig4* aura été muté. Ainsi, les mécanismes de recombinaison non-homologues ne pouvant plus s'effectuer dans une telle souche, l'intégration de l'ADN exogène dans le génome de cette dernière par recombinaison homologue devrait s'effectuer au locus ciblé (Figure 22).

4.2.2. Recyclage du marqueur de sélection : recombinaisons

La caractérisation fonctionnelle d'un gène nécessite couramment la génération i) d'une souche mutante, dans laquelle le gène sauvage a été éliminé et ii) celle d'une souche complétée qui correspond à la ré-introduction de ce même gène sauvage dans le génome de la souche mutante. Ces deux types de souches peuvent alors être comparés sur le plan phénotypique à la souche parentale. Ainsi, il apparaît qu'au moins deux marqueurs de sélection sont nécessaires à la réalisation de ces deux modifications génétiques. Il en est de même pour l'étude de familles multigéniques. En effet, la création de mutants multiples dans une même souche nécessite donc au moins un marqueur de sélection par gène que l'on souhaite invalider.

Comme évoqué dans la revue proposée en annexe, malgré un large panel de marqueurs de résistance aux drogues disponibles, certaines souches peuvent être naturellement résistantes à un grand nombre de drogues de sélection. Pour contourner ce problème, un certain nombre d'alternatives ont été proposées, en particulier le développement de systèmes d'inactivation géniques recyclables (système blaster, cassette à recombinaison...) (Papon *et al.*, 2012 ; Krappmann *et al.*, 2014 ;). Parmi l'ensemble des stratégies disponibles aujourd'hui, nous nous sommes plus particulièrement intéressés au mécanisme d'action des recombinaisons puisqu'un système recombinaison est expérimenté au laboratoire chez *S. apiospermum*.

a) Mécanisme d'action

La famille des recombinaisons constitue un ensemble d'enzymes subdivisé en deux sous-groupes en fonction des résidus actifs présents dans le site catalytique de la protéine : les tyrosine recombinaisons (Figures 23 et 24). Ces recombinaisons, dont la production est sous le contrôle d'une séquence promotrice constitutive ou inductible, reconnaissent spécifiquement de courtes séquences disposées de part et d'autre d'un ADN cible. Il s'en suit une recombinaison site-spécifique qui peut être à l'origine i) d'une inversion, ii) d'une intégration/excision ou iii) de la translocation d'un fragment d'ADN, en

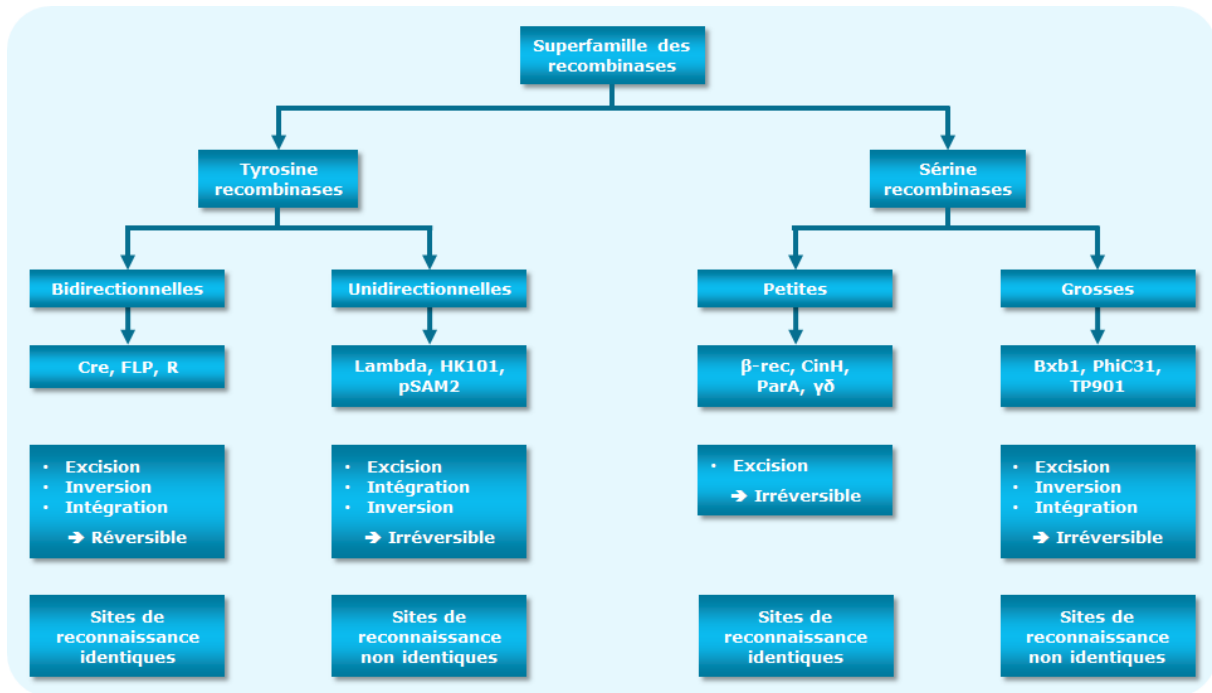


Figure 23. La superfamille des recombinases, d'après Wang *et al.* (2011).

La superfamille des recombinases se subdivise en deux sous-groupes en fonction des acides aminés actifs présents dans le site catalytique de l'enzyme : les tyrosine et les sérine recombinases. Les recombinases du groupe tyrosine sont toutes capables d'exciser, d'inverser ou d'intégrer un fragment d'ADN. Cependant, ces activités sont réversibles pour les enzymes qui nécessitent des sites de reconnaissance identiques pour fonctionner (ex. le système Cre/loxP qui reconnaît deux séquences loxP identiques, le système FLP/FRT qui reconnaît deux séquences FRT identiques) alors que dans le cas où les enzymes n'ont pas de sites de reconnaissance identiques leur activité est irréversible. La classification des sérine recombinases repose sur la taille de ces enzymes. Qu'elles nécessitent ou non des sites de reconnaissance identiques pour fonctionner, l'activité qu'elles engendrent est nécessairement irréversible. Les « grosses » enzymes présentent le même panel d'activités que les tyrosine recombinases. En revanche, les « petites » sérine recombinases, de par leur taille, ne peuvent qu'exciser un fragment d'ADN (ex. le système βrec-six qui reconnaît deux séquences six identiques).

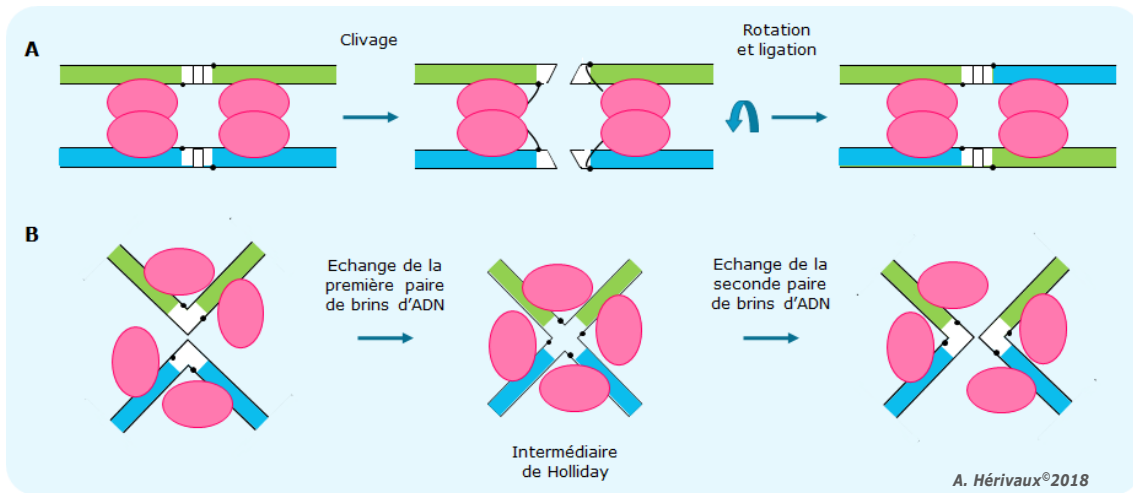


Figure 24. Mécanismes de la recombinaison site-spécifique, d'après Olorunniji et al. (2016).

Les recombinases permettent la recombinaison de deux brins d'ADN. Quelle que soit la nature du site catalytique de la recombinase (tyrosine ou sérine), un dimère d'enzyme reconnaît et se fixe spécifiquement sur les deux sites de recombinaison présents sur chaque brin d'ADN. Ainsi, le tétramère d'enzymes forme « une synapse » au sein de laquelle les brins d'ADN seront clivés. S'en suit un réarrangement des brins d'ADN qui seront ensuite recombinés. Le mécanisme d'action des recombinases n'est pas le même s'il s'agit **A.** d'une tyrosine ou **B.** d'une sérine recombinase.

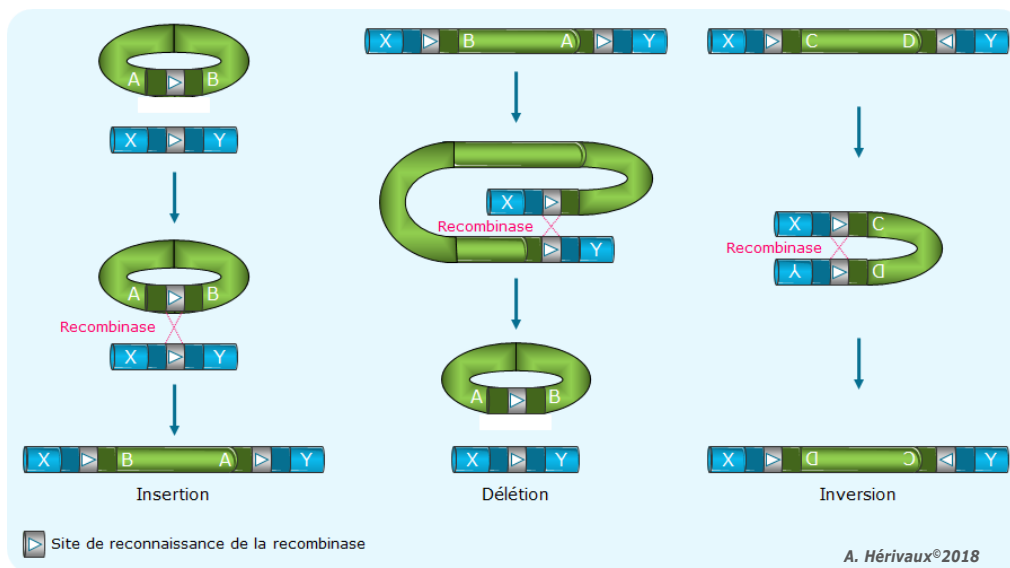


Figure 25. Mécanismes moléculaires mis en jeu dans les systèmes d'inactivation multiple de gènes Cre/loxP, FLP/FRT et β -rec/six, d'après Krappmann et al. (2014), Olorunniji et al. (2016), Addgene.org (2018) et Servier Medical Art.

A. Intégration ou insertion. Lorsque les sites de reconnaissance de la recombinase sont situés sur deux molécules d'ADN différentes et dans la même direction, il s'opère une intégration au niveau de ces sites. **B.** Excision ou délétion. Lorsque les sites de reconnaissances de la recombinase sont situés sur le même brin d'ADN et possèdent la même orientation, la séquence d'ADN entre ces sites est excisée et relarguée. **C.** Inversion. Lorsque les sites de reconnaissance de la recombinase sont situés sur le même brin d'ADN mais dans des directions opposées, la région d'ADN située entre ces deux sites est inversée.

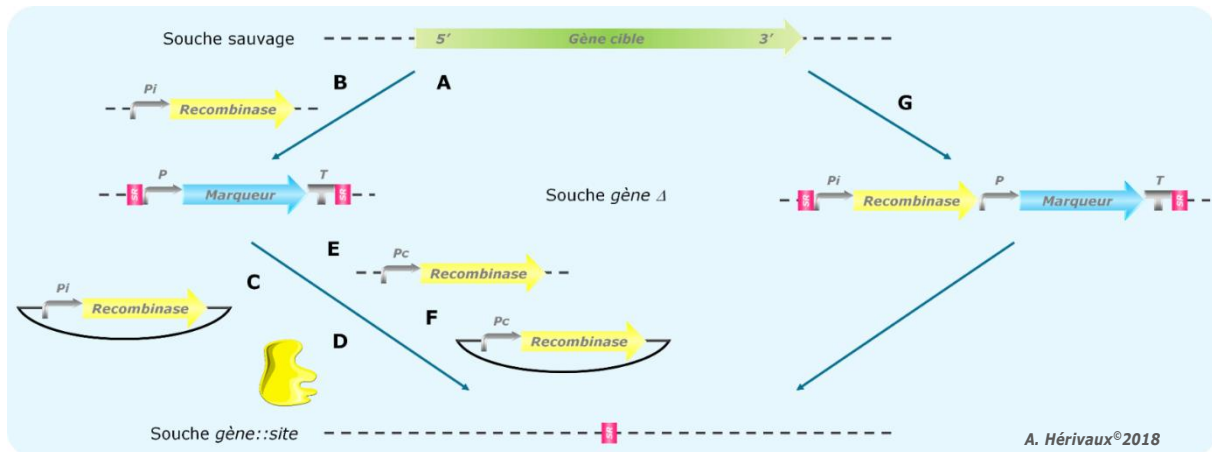


Figure 26. Stratégies de recyclage du marqueur de résistance aux drogues à l'aide des systèmes d'inactivation multiple de gènes Cre/*loxP*, FLP/*FRT* et β -rec/*six*, d'après Krappmann et al. (2014) et Servier Medical Art.

La caractérisation fonctionnelle d'un gène nécessite que ce gène sauvage soit délété du génome de la souche étudiée, puis remplacé par un marqueur de sélection afin que les cellules mutées puissent être sélectionnées. Les systèmes d'inactivation multiple de gènes permettent de recycler spécifiquement ce marqueur de sélection en l'excisant du génome de la souche délétée par recombinaison des séquences de reconnaissance (SR) situées de part et d'autre de ce marqueur de sélection. La première stratégie d'inactivation d'un gène sauvage consiste à introduire une cassette contenant uniquement le marqueur de sélection ainsi que les SRs de la recombinaison de part et d'autre de ce marqueur **A**. Ensuite, plusieurs stratégies sont applicables pour le recyclage du marqueur de sélection. La recombinaison peut être sous le contrôle d'un promoteur inductible (Pi) et être apportée soit par une seconde souche servant de souche réceptrice **B**, ou soit via l'insertion d'un plasmide dans la souche délétée **C**, l'enzyme fonctionnelle peut être amenée dans la souche à l'aide d'un vecteur ADN **D**, enfin la recombinaison peut être exprimée de façon constitutive s'il y a présence d'un promoteur constitutif (Pc) et être amenée par une seconde souche **E** ou un plasmide **F**. Enfin, la stratégie la plus directe consiste à insérer, au locus du gène sauvage que l'on souhaite étudier, une cassette d'inactivation contenant à la fois la recombinaison et le marqueur de sélection, ainsi que les SR de part et d'autre de ces deux gènes **G**. La recombinaison est sous le contrôle d'un Pi. Lorsque ce dernier est induit, la recombinaison est activée et va reconnaître ces SR et induire leur recombinaison. Ainsi le marqueur de sélection et la flippase sont recyclés alors qu'un SR résiduel sera conservé dans le génome de la souche recombinée.

Marqueur : gène de résistance à un marqueur de sélection ; Pc : promoteur constitutif ; Pi : promoteur inductible ; P : promoteur ; Recombinase : gène qui code la protéine recombinaison (Cre, FLP ou β -rec) ; T : terminateur ; SR : séquence de reconnaissance de la recombinaison (*loxP*, *FRT* ou *six*).

fonction de la nature de l'enzyme (**Figures 25 et 26**). La recombinaison est réalisée à l'aide de la création de ponts phosphodiester ([Wang et al., 2011](#) ; [Krappman et al., 2014](#) ; [Olorunniji et al., 2016](#)).

Actuellement, chez les champignons filamenteux trois systèmes majeurs d'inactivation multiple de gènes médiés par des recombinases sont disponibles : i) le système Cre/*loxP*, ii) le système FLP/*FRT*, et iii) le système β -rec/*six* ([Krappman et al., 2014](#) ; [Cairns et al., 2016](#)).

b) Champignons filamenteux et recyclage du marqueur de sélection

Tyrosine recombinase

Le système Cre/*loxP* est le système d'inactivation génique le plus utilisé à ce jour, tous organismes confondus (bactéries, insectes, plantes, helminthes, rongeurs, champignons). Il est issu du bactériophage P1. La recombinase Cre (pour *Causes recombination*) possède un acide aminé tyrosine au cœur de son site catalytique et reconnaît spécifiquement les séquences *loxP* (pour *locus of crossover in Phage P1*) qui correspondent à des fragments de 34 pb. Ce système possède la faculté d'exciser, d'inverser ou d'intégrer réversiblement un ADN cible.

Le système d'inactivation de gènes FLP/*FRT* comprend une tyrosine recombinase, appelée flippase (FLP), qui reconnaît spécifiquement les séquences *FRT* (pour *FLP Recombinase Target*) de 48 pb. Ce système a été identifié sur le plasmide 2 μ de la levure *Saccharomyces cerevisiae*, donc il possède une origine eucaryote contrairement aux deux autres systèmes. Le système Cre/*loxP* est un système stable. Le système FLP/*FRT* est lui aussi stable mais uniquement à 30°C. C'est pourquoi la séquence FLP d'origine a été optimisée. Le système FLP/*FRT* permet lui aussi l'excision, l'inversion ou l'insertion réversible d'un fragment d'ADN.

Sérine recombinases

Le système β -rec/*six*, contrairement aux deux systèmes précédemment décrits, correspond à une sérine recombinase de petite taille qui reconnaît spécifiquement les séquences *six* de 90 pb. Le système a été identifié pour la première fois chez l'espèce procaryote *Streptococcus pyogenes*. Du fait de sa petite taille, cette recombinase est exclusivement à l'origine de l'excision irréversible d'un ADN cible.

Applications chez les espèces fongiques filamenteuses

Le système de recyclage Cre/*loxP* a tout d'abord été développé pour l'espèce *A. fumigatus* au milieu des années 2000 ([Krappman et al., 2005](#)). L'excision de la cassette de sélection a été réalisée en deux étapes (**Figure 27.A**). Tout d'abord, la cassette de résistance à la phléomycine (Phleo), contenant le gène *ble*, bordée par les séquences *loxP* est intégrée par recombinaison homologue dans le génome du champignon à un locus donné. Lors d'une seconde étape de transformation, la recombinase Cre est apportée par un plasmide de sauvetage contenant le gène *ptrA*, qui confère la résistance à la pyrithiamine. L'expression de la recombinase est sous la dépendance du promoteur inductible et du terminateur *niaD* d'*A. nidulans*. Ainsi la recombinase est uniquement exprimée lorsque les cellules transformées sont cultivées sur un milieu contenant du nitrate comme unique source d'azote. Quelques années plus tard,

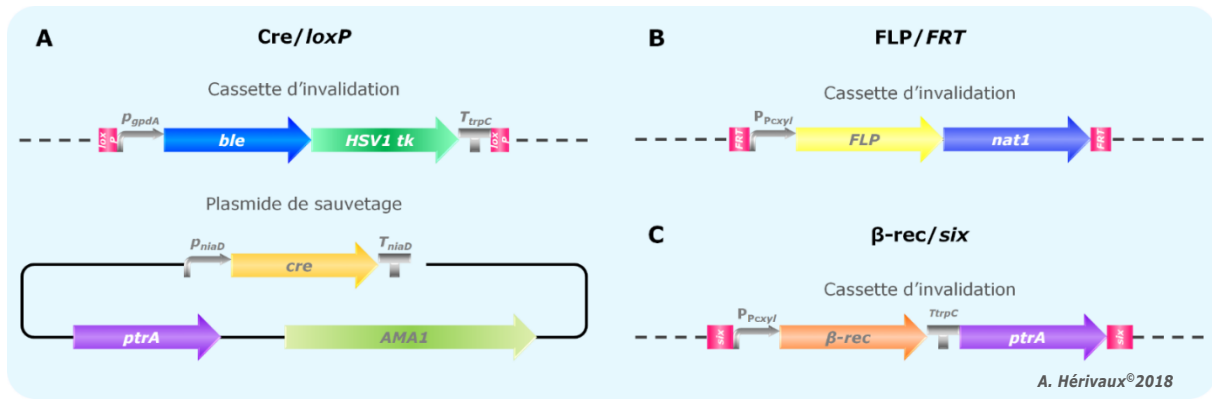


Figure 27. Schématisation des systèmes d'inactivation multiple de gènes Cre/loxP, FLP/FRT et β-rec/six, développés chez les champignons filamenteux, d'après Forment et al. (2006), Kopke et al. (2010) et Hartmann et al. (2010).

A. Le système Cre/loxP est basé sur une cassette d'inactivation qui se compose du gène de résistance à la phléomycine (*ble*) bordé par des sites *loxP*. Une fois cette cassette insérée dans le génome à un locus ciblé, l'excision de la cassette d'inactivation sera possible grâce à l'apport d'un plasmide de sauvetage qui produit la recombinase Cre et qui contient également un gène de résistance à la pyrithiamine (*ptrA*). **B.** Le système FLP/FRT se présente sous la forme d'une unique cassette d'inactivation qui renferme le gène de résistance à la nourseothricine (*nat1*) et le gène de la recombinase (FLP). Ces deux gènes sont bordés par les séquences de reconnaissance FRT. Une fois la cassette insérée dans le génome à un locus cible, la production de la flippase pourra être induite par son promoteur inductible au xylose ($P_{P_{CxyI}}$). Ainsi, la cassette d'inactivation sera excisée lorsque les souches mutantes seront cultivées sur un milieu en présence de xylose comme unique source de carbone. **C.** Le système β-rec/six repose sur le même principe que le système FLP/FRT. La recombinase (β-rec) et le gène de résistance à la pyrithiamine (*ptrA*) sont bordés par les séquences de reconnaissance *six*. L'ensemble de ces éléments constitue la cassette d'inactivation qui une fois insérée dans le génome à un locus cible sera excisée après culture des souches mutantes sur un milieu contenant uniquement du xylose comme source de carbone.

Hartmann *et al.* ont validé la délétion successive de 8 gènes chez cette même espèce fongique grâce à l'excision de la cassette de sélection contenant le marqueur de résistance *hph* ou *ble*, permettant respectivement la sélection par l'hygromycine B (HygB) ou la Phleo (Hartmann *et al.*, 2011). Comme précédemment, un plasmide de sauvetage contenant la recombinase a été transfecté (Krappman *et al.*, 2006 ; Hartmann *et al.*, 2011). Ce même système a été utilisé avec succès chez d'autres espèces filamenteuses telles qu'*A. nidulans*, *Neotyphodium coenophialum*, *Neotyphodium uncinatum* et *Epichloë festucae* (Florea *et al.*, 2009). Jusqu'à présent, l'utilisation de la recombinase Cre nécessitait un plasmide de sauvetage qui était transfecté dans un second temps chez une souche mutante qui avait préalablement intégré un marqueur de sélection à exciser. Zhang *et al.* ont mis en place un protocole d'anastomose valide chez *Cryphonectria parasitica* et *Metarhizium robertsii* (Zhang *et al.*, 2013). Cette technique consistait à mettre en culture sur une même gélose une souche donneuse contenant la protéine Cre exprimée constitutivement et une souche réceptrice qui avait préalablement été mutée et qui contenait le marqueur de sélection à exciser (le marqueur de résistance à l'HygB ou à la généticine).

Penicillium chrysogenum est le premier champignon filamenteux chez lequel le système de recyclage FLP/FRT a été développé avec succès (Kopke *et al.*, 2010). La recombinase FLP, utilisée à l'origine chez *S. cerevisiae*, a été optimisée (PcFLP). La PcFLP étant sous la dépendance du promoteur inducible P_{PcXYL} de cette même espèce, elle n'était exprimée que lorsque les souches mutantes étaient cultivées sur un milieu contenant uniquement du xylose comme source carbonée. La recombinase ensuite reconnaît spécifiquement les séquences FRT placées de part et d'autre de la cassette de sélection. Au cours de ces travaux, le gène de résistance à la nourséothricine *nat1* a été excisé avec succès (Figure 27.B). Peu de temps après, ce système a également été validé avec succès chez *Ustilago maydis* lors de la délétion multiple et consécutive de 11 gènes effecteurs (*eff11*) en utilisant uniquement le gène de résistance à l'HygB, *hph* (Khrunyk *et al.*, 2010). Chez *Acremonium chrysogenum*, la recombinase FRT a également été validée pour le recyclage du marqueur de sélection (Bloemendal *et al.*, 2014). Cependant, une optimisation des codons de la FLP a également été réalisée au préalable.

Hartmann *et al.* ont validé le système β -rec/*six* chez *A. fumigatus* (Hartmann *et al.*, 2010). La cassette de résistance à la pyrithiamine *ptrA* est bordée des séquences de reconnaissance spécifique de cette recombinase, les séquences *six*. La cassette une fois insérée au locus cible dans le génome fongique peut être excisée après culture de la souche mutante sur un milieu contenant du xylose comme unique source de carbone puisque l'expression de la β -recombinase est sous le contrôle du promoteur inducible P_{PcXYL} de *P. chrysogenum* (Figure 27.C). Dans une seconde expérimentation menée avec succès chez *A. fumigatus*, ce même système a permis l'excision du marqueur de résistance *hph* (Amich *et al.*, 2013). Le système β -Rec/*six* a également été validé chez *Neurospora crassa* et a permis la délétion successive des gènes *mus-51* et *cre-1* (Szewczyk *et al.*, 2013). La cassette de sélection était identique à celle décrite par Hartmann *et al.*, à la seule différence que le marqueur de sélection a été remplacé par le gène *bar*, plus adapté à cette espèce fongique, qui permet la sélection des souches résistantes à la phosphinothricine.

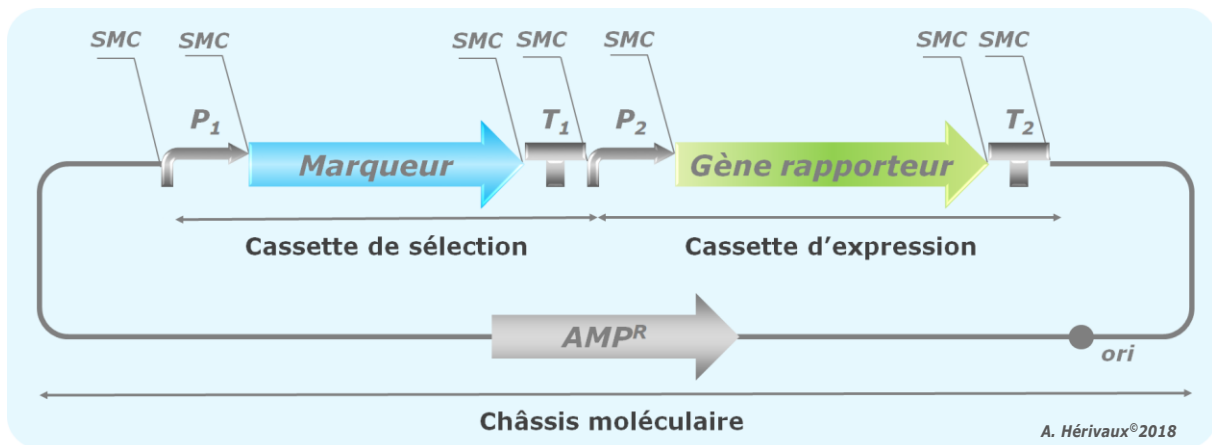


Figure 28. Schématisation d'un système d'expression.

Un système d'expression se compose d'un châssis moléculaire d'origine bactérienne sur lequel des sites multiples de clonage (SMC) seront préalablement définis afin de permettre l'insertion séquentielle des différents modules, d'une cassette de sélection qui comprend un marqueur de sélection régulé par un promoteur (P_1) et un terminateur (T_1) propres, et d'une cassette d'expression qui renferme un gène à exprimer, par exemple un gène rapporteur, dont l'expression sera régulée par une séquence promotrice (P_2) et terminatrice (T_2) propres.

En conclusion, les trois systèmes de recyclage présentés ci-dessus se démocratisent progressivement chez les champignons filamenteux. Il est cependant à noter que le système Cre/*loxP* est un système de petite taille qui nécessite cependant deux étapes de transformation puisqu'il n'est pas inclus dans la cassette d'inactivation du gène ciblé. Au contraire, les systèmes FLP/*FRT* et β -Rec/*six* sont présents dans la cassette d'inactivation du gène ciblé. Par conséquent, une seule étape de transformation du champignon est nécessaire. En revanche, pour ces deux derniers systèmes, la cassette d'inactivation générée sera de grande taille donc potentiellement plus difficile à manipuler *in vitro* et à insérer dans le génome du champignon.

4.3. Systèmes d'expression

Les systèmes d'inactivation de gènes permettent d'appréhender la fonction d'un gène en comparant une souche mutante avec la souche sauvage correspondante. Les systèmes d'expression constituent également des précieux outils pour mener des études génétiques chez les micro-organismes. Ils permettent notamment d'évaluer l'impact de la surexpression d'un gène (endogène ou hétérologue), mais aussi de transférer des gènes rapporteurs.

Classiquement, le squelette plasmidique de ces systèmes se compose : i) d'un châssis moléculaire d'origine bactérienne dans lequel des sites multiples de clonage auront été introduits et qui permettront l'insertion séquentielle des modules, ii) d'une cassette de sélection qui contient un marqueur de résistance aux drogues dont l'expression sera sous le contrôle d'une séquence promotrice et terminatrice propres et iii) d'une cassette d'expression qui renferme un gène à exprimer, dont les gènes rapporteurs qui seront développés dans le point suivant, qui sera également sous la dépendance de séquences régulatrices propres (**Figure 28**).

Les séquences terminatrices ayant généralement un moindre effet sur le taux d'expression des gènes, l'identification de promoteurs régulant la cassette d'expression est une étape cruciale. Selon l'effet escompté, le choix s'orientera vers une séquence promotrice constitutive qui permettra l'expression forte en continu de la cassette d'expression (ex. le gène de l'actine *ACT1*, le facteur d'élongation de la traduction 1α *TEF1*) ou vers une séquence inductible pour induire ou inhiber l'expression de cette cassette (ex. le promoteur du gène *GAL1* qui code une galactokinase est induit par le galactose, le promoteur du gène *MAL2* qui code une maltase est lui induit par le maltose, le promoteur du gène *CK1* qui code une phosphoénolpyruvate carboxykinase est induit par l'acide succinique, le promoteur du gène *XYL* qui est induit par le xylose).

4.4. Gènes rapporteurs

Utilisés dans de nombreux domaines de la biologie, les gènes rapporteurs sont de puissants outils moléculaires qui facilitent l'obtention de données (ex. la régulation de séquences promotrices, la dissémination d'un pathogène dans un organisme hôte, la localisation subcellulaire de protéines). Parmi

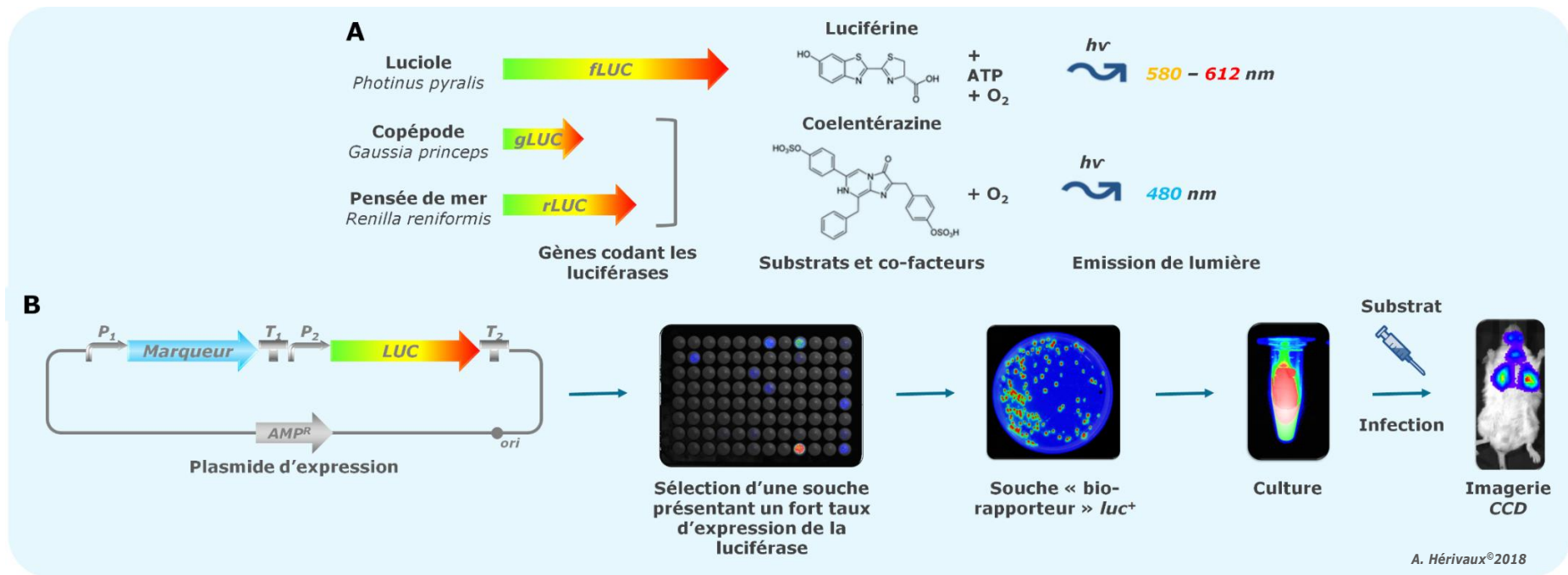


Figure 29. Imagerie de bioluminescence chez les pathogènes fongiques, d'après Papon et al. (2014).

A. Trois gènes codant des protéines luciféras sont développés chez les levures et les champignons filamenteux : i) le gène fLUC de la luciole qui en présence d'ATP convertit le substrat luciférine en oxy-luciférine, mécanisme qui engendre une émission de lumière entre 580 et 612 nm, ii) le gène rLUC de la pensée de mer et iii) le gène gLUC du crustacé copépo *Gaussia*. Ces deux derniers gènes codent des luciféras qui lorsqu'elles oxydent le substrat coelentérazine engendre une émission de lumière à 480 nm. **B.** Dans le but de développer l'imagerie de bioluminescence, un vecteur d'expression contenant un gène luciférase adapté doit être construit. Une fois inséré dans le génome de la souche réceptrice par transgénése, une souche mutante « bio-rapporteur » luc⁺ exprimant fortement la luciférase sera sélectionnée. Après culture, elle sera injectée chez la souris en présence de son substrat. La bioluminescence pourra donc être suivie en temps réel en imagerie CCD.

les gènes rapporteurs les plus utilisés chez les eucaryotes, on retrouve les gènes codant les β -galactosidases, les luciférases (LUC) ou encore les protéines fluorescentes.

4.4.1. β -galactosidases

L'activité β -galactosidase peut être directement observée par une couleur bleue lorsque les cellules transformées par un gène codant cette enzyme (bactéries, levures, ...) se développent sur un milieu contenant le chromogène 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (X-Gal). Ce gène rapporteur permet en particulier de caractériser la régulation de séquences promotrices (Defosse *et al.*, 2014).

4.4.2. Luciférases

Les LUC sont des protéines présentes chez certains insectes, planctons, méduses ou encore bactéries. Elles catalysent la réaction d'oxydation d'un substrat organique. L'oxydation des substrats par les LUC est couplée à une émission de lumière, phénomène naturel connu sous le nom de bioluminescence (Figure 29.A) (Mager et Tu, 1995 ; Kaskova *et al.*, 2016). Exprimés de manière hétérologue, les gènes *LUC* permettent ainsi, *in vitro*, d'évaluer la régulation de promoteurs grâce à un luminomètre. Lorsqu'ils sont transférés et exprimés dans des micro-organismes, les gènes *LUC* permettent de visualiser *in vivo* et en temps réel la prolifération du pathogène dans un organisme hôte par des technologies d'imagerie de bioluminescence (IBL) (Figure 29.B) (Papon *et al.*, 2014 ; Kaskova *et al.*, 2016).

4.4.3. Protéines fluorescentes

Les protéines fluorescentes sont naturellement présentes chez certaines espèces de méduses ou encore de coraux. Il existe actuellement 4 gènes/variants majeurs codant des protéines fluorescentes et qui ont déjà été expérimentés chez les champignons : i) initialement la *Green Fluorescent Protein* (GFP) isolée de la méduse *Aequorea victoria*, puis ii) la *Yellow Fluorescent Protein* (YFP) et iii) la *Cyan Fluorescent Protein* (CFP) obtenues par modification de quelques acides aminés de la GFP, ainsi que iv) la *Red Fluorescent Protein* (RFP) d'un corail (*Discosoma* sp.) (Figure 30.A) (Papon *et al.*, 2012).

Suite à l'excitation de la protéine fluorescente par une source lumineuse de longueur d'onde définie, celle-ci est capable d'émettre en retour un signal de fluorescence spécifique. Dans le domaine de la biologie, les expériences de localisation subcellulaire par fusion des produits des gènes étudiés avec ceux de protéines fluorescentes apportent souvent des données précieuses. En effet, ces approches d'imagerie biophotonique peuvent s'avérer très informatives dans le but de préciser la localisation et/ou les déplacements subcellulaires liés aux fonctions propres de certaines protéines (impliquées dans la signalisation cellulaire ou la morphogénèse par exemple, telles que les HKs) (Figure 30.B).

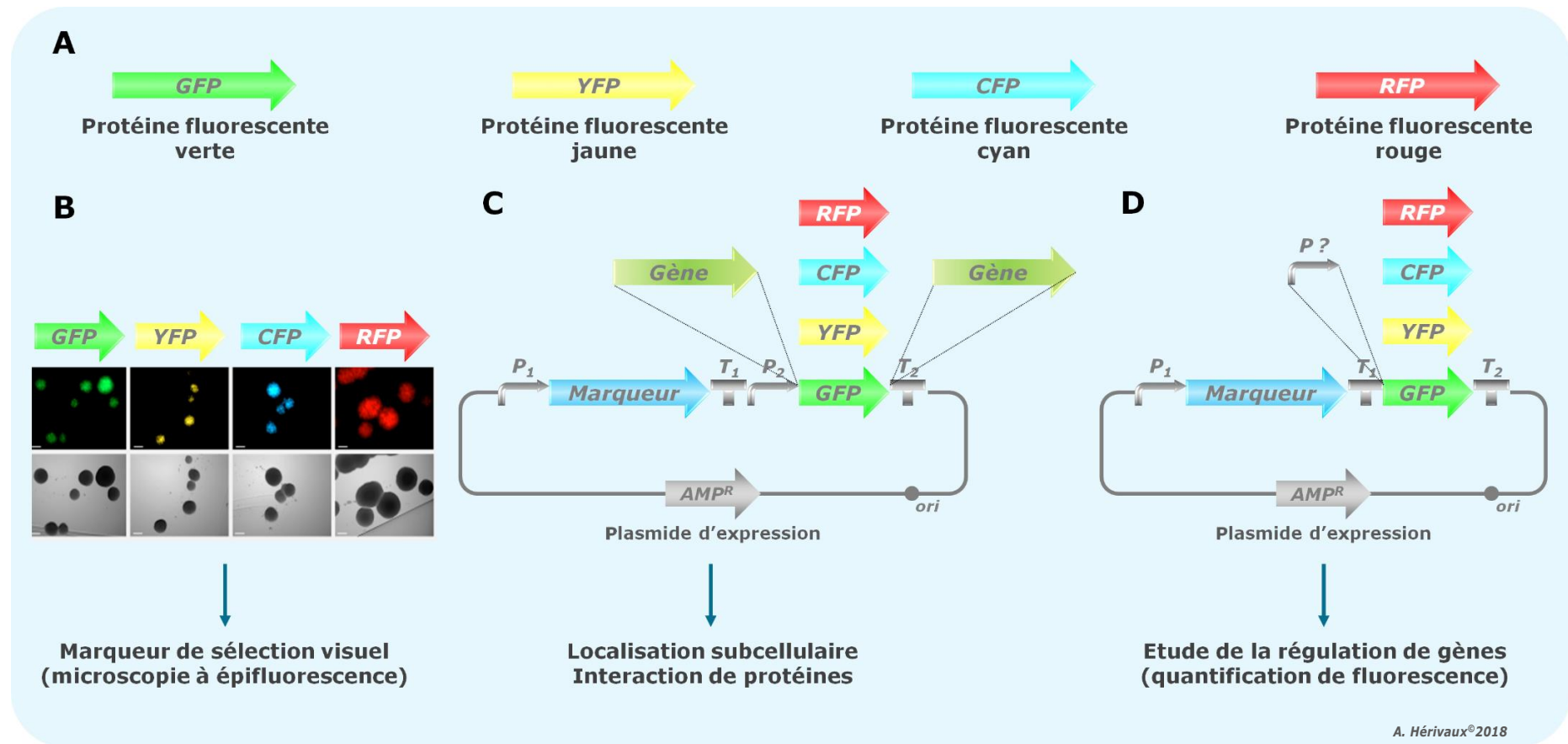


Figure 30. Protéines fluorescentes et applications chez les champignons, d'après Papon *et al.* (2012).

A. Chez les champignons, quatre protéines fluorescentes sont disponibles : i) la *gfp* de couleur verte, ii) la *yfp* de couleur jaune, iii) la *cfp* de couleur bleu et iv) la *rfp* de couleur rouge. Ces protéines peuvent s'appliquer différemment chez les champignons : **B.** elles peuvent servir de marqueur de sélection visuel lors de la transgénèse du champignon, **C.** il est possible d'intégrer un gène en amont ou en aval de la protéine fluorescente afin d'étudier la localisation subcellulaire de la protéine de fusion correspondante et **D.** elles peuvent servir de gènes rapporteurs pour étudier la régulation de l'expression de gènes via l'analyse de promoteurs.

OBJECTIFS

Les HKs représentent une vaste famille de protéines impliquées dans la perception des signaux environnementaux chez les bactéries, les champignons et les plantes. Ces protéines jouent notamment un rôle majeur dans l'adaptation aux stress, mais aussi dans la virulence de nombreux micro-organismes procaryotes et eucaryotes. Si les HKs sont à présent bien connues chez les bactéries et les plantes, tant sur un plan structural que fonctionnel (Mascher *et al.*, 2006 ; Schaller *et al.*, 2011), les données concernant ces protéines chez les autres clades de l'arbre du vivant demeurent plus que fragmentaires.

C'est ainsi que le premier objectif de ce travail a consisté en l'exploration *in silico* de la structure et de la distribution des HKs chez les organismes eucaryotes à travers plusieurs études de bio-informatique : i) chez les champignons dits « inférieurs » (EDF pour *Early Diverging Fungi*), ii) chez les levures Saccharomycotina et enfin iii) chez l'ensemble des Eucaryotes.

Il est également important de rappeler que les HKs, n'étant pas retrouvées chez les mammifères, suscitent depuis quelques années une attention particulière de la communauté scientifique en tant que nouvelles cibles pour le développement d'antibiotiques et antifongiques (Bem *et al.*, 2015 ; Shor et Chauhan, 2015). C'est précisément dans ce cadre que la partie expérimentale de ce projet a été initiée au sein de l'EA3142 GEIHP qui développe depuis plus de 10 ans une expertise sur les infections fongiques respiratoires dans le contexte de la mucoviscidose. Plus précisément, l'équipe porte ses efforts sur une espèce fongique multirésistante : *S. apiospermum*. Cette moisissure est en effet le second champignon filamenteux, après *A. fumigatus*, capable de coloniser chroniquement les poumons des patients atteints de mucoviscidose. Ce pathogène opportuniste est difficile à éliminer et/ou traiter puisqu'il est résistant à la majorité des molécules antifongiques systémiques actuellement disponibles sur le marché. Il est donc aujourd'hui indispensable d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

De ce fait, le second objectif de ce travail s'est focalisé sur la caractérisation fonctionnelle des HKs chez *S. apiospermum*. L'analyse fonctionnelle de ces récepteurs s'est donc déroulée de la façon suivante : i) l'identification des séquences génomiques des gènes *HKs* à l'aide d'outils de bio-informatique, ii) l'invalidation de l'ensemble des gènes identifiés, iii) la complémentation des souches mutantes et iv) la réalisation d'études phénotypiques sur ces différentes souches.

En parallèle, cette thèse nous a amenés à développer de nouveaux outils moléculaires adaptés à *S. apiospermum* en vue de futures études d'imagerie de fluorescence et de bioluminescence.

PARTIE EXPERIMENTALE

Partie I

Les histidines kinases : structure et distribution chez les eucaryotes

1. Introduction générale

Comme souligné dans le premier article de revue de ce manuscrit, les HKs sont dans l'ensemble déjà bien documentées chez les procaryotes, tant sur le plan de la distribution que de la fonction (Mascher *et al.*, 2006 ; Galperin *et al.*, 2018). En revanche, les connaissances sur ces protéines restent globalement très fragmentaires chez les organismes eucaryotes.

C'est pourquoi, en parallèle de la caractérisation fonctionnelle des HKs chez *S. apiospermum*, modèle fongique du laboratoire, nous avons au cours de cette thèse initié différentes études de phylogénomique visant à explorer à la fois la structure et la distribution de ces protéines à travers les différents phylla eucaryotes. Nous proposons ici trois articles qui m'ont permis de m'aguerrir aux notions de bases du domaine de la bio-informatique et qui portent sur la phylogénie des HKs chez i) les champignons inférieurs, ii) chez les levures bourgeonnantes et enfin iii) chez l'ensemble des super-groupes eucaryotes.

2. L'étude de la structure et de la distribution des histidine kinases chez les champignons « inférieurs » (*Early Diverging Fungi*) : première description de protéines fongiques homologues aux récepteurs à hormones végétales

Au début de la thèse en Octobre 2015, l'article de référence portant sur la distribution et la classification des HKs fongiques demeurait celle publiée quelques mois auparavant par Defosse *et al.* (2015). Fin 2015, c'est-à-dire au cours des premiers mois de ma thèse, la rédaction de l'article de synthèse sur les HKs des champignons pathogènes pour le journal *PLoS Pathogens* nous a bien évidemment amenés, sur la base des nombreux nouveaux génomes fongiques rendus disponibles régulièrement, à étudier si des avancées dans ce domaine pouvaient être proposées dans ce manuscrit. Ainsi fin 2015, à l'exception de quelques données très partielles pour les Mucoromycotina (une sous-division des champignons « inférieurs », aujourd'hui dénommés EDF), les données sur les HKs fongiques portaient exclusivement sur les champignons « supérieurs » (les Dikarya qui regroupent les Ascomycètes et les Basidiomycètes). Le projet « 1000 génomes fongiques » du Joint Genome Institute (JGI : <https://jgi.doe.gov/>) déposant chaque semaine de nouveaux génomes fongiques, et en particulier progressivement les premiers génomes séquencés d'EDF, nous avons ainsi initié une étude visant à explorer la structure et la distribution des HKs chez ces champignons « inférieurs ». Ce projet nous a amené à décrire pour la première fois chez les champignons la présence de gènes codant des récepteurs à deux classes d'hormones majeures du règne végétal : l'éthylène et les cytokinines. Cette étude hautement spéculative a été valorisée sous forme d'« *Opinion and Hypothesis* » dans la revue *mBio*. Il est également à noter que ces découvertes fortuites ont été instigatrices du projet ANR-PRCE « Mycormones » récemment initié au sein de notre équipe et mené en partenariat avec l'Université de Toulouse et la société Agronutrition.

2.1. Résumé

Les HKs sont parmi les protéines « senseurs » les plus importantes du règne fongique. Si leur distribution et leurs fonctions biologiques commencent à être élucidées chez les champignons supérieurs (Dikarya), de telles données pour les champignons « inférieurs » (EDF) sont presque inexistantes. Dans cette étude, nous avons tiré profit des ressources génomiques récentes pour déterminer si des relations entre la présence de groupes d’HKs spécifiques chez certains EDF et leurs habitats/modes de vie respectifs pouvaient être établies. Cela nous a conduits à la découverte inattendue d’HKs fongiques qui présentent un fort degré de similarité avec des récepteurs à hormones végétales (éthylène et cytokinines). Il est important de noter que ces homologues de récepteurs à phytohormones ont uniquement été identifiés chez des espèces d’EDF se développant comme symbiontes de racines végétales ou des endophytes, mais aussi chez des espèces qui colonisent les matières végétales en décomposition. Nous avons ainsi émit l’hypothèse que ces récepteurs phytohormonaux, au cours de l’évolution, ont peut-être favorisé l’interaction des EDF avec des plantes et ont donc parallèlement potentialisé la conquête de l’espace terrestre par les champignons et les végétaux.

2.2. Article



The Identification of Phytohormone Receptor Homologs in Early Diverging Fungi Suggests a Role for Plant Sensing in Land Colonization by Fungi

Anaïs Hérivaux,^a Thomas Dugé de Bernonville,^b Christophe Roux,^c Marc Clastre,^b Vincent Courdavault,^b Amandine Gastebois,^a Jean-Philippe Bouchara,^a Timothy Y. James,^d Jean-Paul Latgé,^e Francis Martin,^f Nicolas Papon^a

Université d'Angers, Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène, Angers, France^a; Université François-Rabelais de Tours, EA 2106, Biomolécules et Biotechnologies Végétales, Tours, France^b; Laboratoire de Recherche en Sciences Végétales, Université de Toulouse, UPS, Castanet-Tolosan, France^c; Department of Ecology and Evolutionary Biology, University of Michigan, Ann Arbor, Michigan, USA^d; Institut Pasteur de Paris, Unité des Aspergillus, Paris, France^e; Institut National de la Recherche Agronomique, Université de Lorraine, UMR 1136 Interactions Arbres/Microorganismes, Laboratoire d'Excellence ARBRE, Nancy, France^f

ABSTRACT Histidine kinases (HKs) are among the most prominent sensing proteins studied in the kingdom Fungi. Their distribution and biological functions in early diverging fungi (EDF), however, remain elusive. We have taken advantage of recent genomic resources to elucidate whether relationships between the occurrence of specific HKs in some EDF and their respective habitat/lifestyle could be established. This led to the unexpected discovery of fungal HKs that share a high degree of similarity with receptors for plant hormones (ethylene and cytokinin). Importantly, these phytohormone receptor homologs are found not only in EDF that behave as plant root symbionts or endophytes but also in EDF species that colonize decaying plant material. We hypothesize that these particular sensing proteins promoted the interaction of EDF with plants, leading to the conquest of land by these ancestral fungi.

Histidine kinases (HKs) are prominent sensing proteins present in bacteria, amoebae, plants, and fungi. When activated, for instance following the perception of an external stimulus, HKs initiate more or less complex phosphorylation cascades, ranging from two-component systems (prevailing in bacteria) to multistep phosphorelays (in plants and fungi) that lead to an adapted response (1).

In bacteria, it is now well documented that HKs regulate a large panel of fundamental processes, including nutrient acquisition, various metabolic activities, adaptation to changes in the environment, developmental pathways, virulence, antibiotic resistance, and many others (2). In plants, HKs act as osmosensors by regulating responses to drought, salt stress, and stomatal closure, but more importantly they have been implicated in the perception of two major phytohormones, cytokinins and ethylene (3). HKs are also widespread in the kingdom Fungi, and to date in Dikarya (i.e., *Ascomycota* and *Basidiomycota*) they have been reported to be involved in stress adaptation, red light perception, morphogenesis, and virulence (4). With the exception of a few recent insights into the distribution of these sensing proteins in *Mucoromycotina* (5), no extensive analysis of HKs has been conducted to date across the so-called early diverging fungal (EDF) lineages, which comprise a large portion of the phylogenetic diversity of the kingdom Fungi though just a small proportion of described species (6–8).

Published 31 January 2017

Citation Hérivaux A, Dugé de Bernonville T, Roux C, Clastre M, Courdavault V, Gastebois A, Bouchara J-P, James TY, Latgé J-P, Martin F, Papon N. 2017. The identification of phytohormone receptor homologs in early diverging fungi suggests a role for plant sensing in land colonization by fungi. *mBio* 8:e01739-16. <https://doi.org/10.1128/mBio.01739-16>.

Editor John W. Taylor, University of California

Copyright © 2017 Hérivaux et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Address correspondence to Nicolas Papon, nicolas.papon@univ-angers.fr.

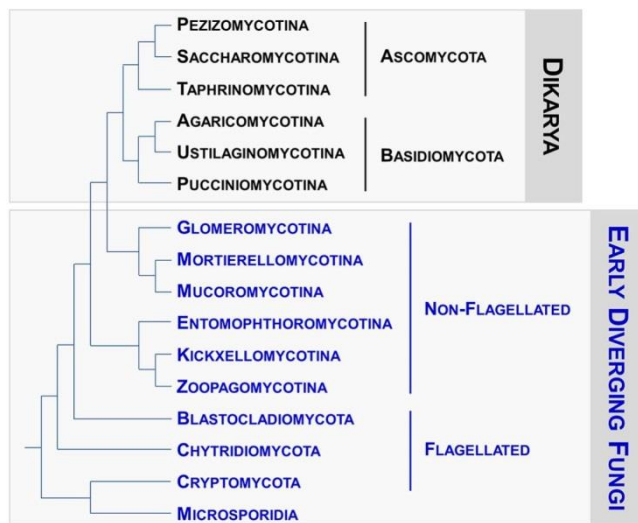


FIG 1 Phylogeny of the kingdom Fungi. The 10 early diverging fungal lineages are indicated in blue. The topologies resemble the current understanding of the relationships of the fungal groups, according to reference 9.

EDF are currently categorized into 10 lineages (depicted in Fig. 1) (9). From an ecological point of view, the habitats of EDF are broadly diversified, ranging from marine or freshwater environments to soils, with more or less tight associations with plants. Many other EDF lifestyles require strong interactions with hosts, as illustrated by *Glomeromycotina*, which live exclusively as obligate symbionts of vascular plants, bryophytes, and cyanobacteria, whereas several EDF have been identified as insect or vertebrate pathogens (6–8). In this way, to survive in a wide range of ecological niches or to fine-tune interactions with their respective hosts, EDF have likely developed a variety of cell signaling strategies that allow them to perceive and to cope appropriately with a broad range of external cues. Since HKs remain among the most important sensing proteins in Dikarya (1), we were primarily interested for this study in exploring the structure and distribution of HKs in EDF and in elucidating whether relationships could be established between the occurrence of particular HKs in some species/groups and their respective habitats and lifestyles.

EXPLORING THE STRUCTURAL DIVERSITY AND DISTRIBUTION OF HKs AMONG THE EDF LINEAGES

The basic structure of fungal HKs is now well established (Fig. 2, top left panel). In contrast to most bacterial HKs, the histidine kinase A (HisKA) and histidine kinase ATPase catalytic (HATPase_c) domains are fused to the C-terminal receiver domain (REC); thus, importantly, fungal HKs are generically defined as hybrid HKs (HHKs). It is worth noting that the variable N-terminal region, referred to as the sensing domain, displays a combination of motifs that drives the perception properties of the HHK (Fig. 2, top left panel) (10). Based on the sequence analysis of both histidine kinase A and sensing domains from more than 200 predicted proteins, fungal HHKs are currently categorized into 16 groups (4).

To gain insight into the structure and distribution of these proteins in the EDF lineages, we were primarily interested in compiling predicted sequences that bear the HHK canonical domains described in top left panel of Fig. 2 (10). For this purpose, we browsed the genome of a representative species from each EDF lineage (Fig. 1); the characteristics of these species are summarized in Table 1. Due to the lack of genomic resources for *Zoopagomycotina*, this lineage was not incorporated into the present analysis, nor were the *Microsporidia*, which do not contain HHK-encoding genes in their genome.

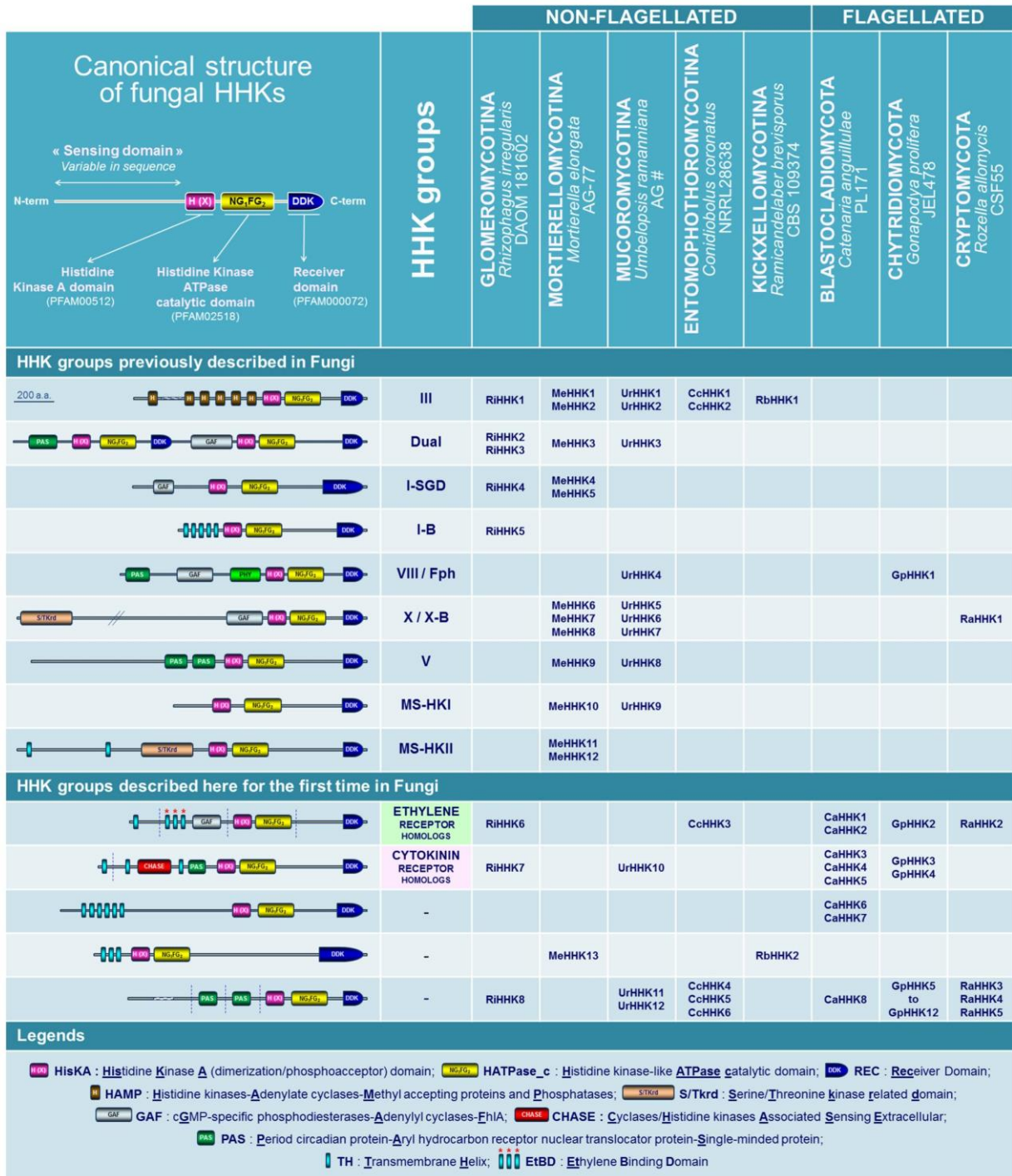


FIG 2 Compilation of HHKs in some early diverging fungi. Gene loci encoding HHKs in EDF genomes were identified following multiple tBLASTn and BLASTp searches against selected genomes of the Joint Genome Institute (JGI) MycoCosm database (6) (<http://genome.jgi.doe.gov/programs/fungi/index.jsf>). Conserved Domain Database (CDD) sequences for HisKA (PFAM00512), HATPase_c (PFAM02518), and REC (PFAM00072) were used in BLAST searches of each EDF genome. All hits producing *E* values below 10⁻⁴ were further analyzed. Functional domains were identified with CDD, and predictions of transmembrane-spanning regions were carried out using TMHMM v2.0. All sequences are compiled in Text S1 in the supplemental material.

TABLE 1 Early diverging fungi whose genomes were examined in this study

Species ^a	Strain	Fungal lineage	Lifestyle or habitat ^b
Preliminary exploration of HHK structures			
<i>Rhizophagus irregularis</i>	DAOM 181602	<i>Glomeromycotina</i> (nonflagellated)	Obligate endosymbiont of plant roots
<i>Mortierella elongata</i>	AG-77	<i>Mortierellomycotina</i> (nonflagellated)	Saprotrophic, widely distributed in soils
<i>Umbelopsis ramanniana</i>	AG #	<i>Mucoromycotina</i> (nonflagellated)	Saprotrophic, facultative endophyte in woody roots
<i>Conidiobolus coronatus</i>	NRRL28638	<i>Entomophthoromycotina</i> (nonflagellated)	Saprotrophic, rarely parasite of insects and mammals
<i>Ramicandelaber brevisporus</i>	CBS 109374	<i>Kickxellomycotina</i> (nonflagellated)	Saprotrophic, widely distributed in soils
<i>Catenaria anguillulae</i>	PL171	<i>Blastocladiomycota</i> (flagellated)	Saprotrophic, decaying plant materials, facultative parasite of plant pathogenic nematodes
<i>Gonapodya prolifera</i>	JEL478	<i>Chytridiomycota</i> (flagellated)	Saprotrophic, decaying plant material
<i>Rozella allomycis</i>	CSF55	<i>Cryptomycota</i> (flagellated)	Obligate parasite of <i>Allomyces macrogynus</i>
Secondary exploration ^b			
<i>Gigaspora rosea</i>	DAOM194757	<i>Glomeromycotina</i> (nonflagellated)	Obligate endosymbiont of plant roots
<i>Basidiobolus meristosporus</i>	CBS 931.73	<i>Entomophthoromycotina</i> (nonflagellated)	Saprotrophic, decaying plant material
<i>Zoophthora radicans</i>	ARSEF 4784	<i>Entomophthoromycotina</i> (nonflagellated)	Parasite of insects
<i>Allomyces macrogynus</i>	ATCC 38327	<i>Blastocladiomycota</i> (flagellated)	Saprotrophic, decaying plant material
<i>Spizellomyces punctatus</i>	DAOM BR117	<i>Chytridiomycota</i> (flagellated)	Saprotrophic, decaying plant material
<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	JAM81	<i>Chytridiomycota</i> (flagellated)	Parasite of amphibians
<i>Rhizoclosmatium globosum</i>	JEL800	<i>Chytridiomycota</i> (flagellated)	Saprotrophic
<i>Piromyces</i> sp.	E2	<i>Neocallimastigomycetes</i> (flagellated)	Mutualist in gut in variety of herbivores

^aAll genomes were compared with information from the Joint Genome Institute MycoCosm database (6) (<http://genome.jgi.doe.gov/programs/fungi/index.jsf>). See Fig. 2 for further information on the genomes browsed for the preliminary exploration of HHK structures; for information regarding the genomes browsed in the secondary exploration, see Fig. 3, 4, and 6.

^bSeveral genome sequences used in this study are included in this table: *Rhizophagus irregularis*, *Rozella allomycis*, *Batrachochytrium dendrobatidis*, *Gigaspora rosea*, and *Spizellomyces punctatus* (31–35).

A compilation of HHK structures deduced from EDF genomes is provided in Fig. 2. Above all, this compilation gives evidence that 9 out of the 16 fungal HHK groups previously identified in Dikarya are also present in EDF. This includes, notably, the osmosensing group III HHKs, the dual HHK group, which was initially thought to be restricted to *Basidiomycota*, and the red light sensing phytochromes (the VIII/Fph group) (4, 11). Interestingly, some unprecedented HHKs are also scattered among the different EDF lineages (Fig. 2), and it was particularly surprising that most of their sensing domains harbor hydrophobic transmembrane helices, distinguishing them from the majority of Dikarya-related HHKs (4).

FIRST DESCRIPTION OF PLANT HORMONE RECEPTOR HOMOLOGS IN EDF

The striking finding of this analysis is actually the discovery of fungal HHKs with a high degree of similarity with two groups of plant hormone receptors, i.e., ethylene and cytokinin receptors (Fig. 2). Both phytohormones are known to play crucial roles in plant development, and recent works have highlighted a cytokinin/ethylene interaction at diverse levels of biosynthetic and metabolic pathways (3). From a general point of view, ethylene and cytokinins are also well-documented as key signaling molecules in plant biotic interactions (with viruses, protists, bacteria, worms, insects, and fungi). Importantly, recent advances have revealed that in several plant-fungus systems, both plant- and microorganism-borne phytohormones have concerted effects that promote interactions (12–17).

SOME EDF GENOMES ENCODE ETHYLENE RECEPTOR HOMOLOGS

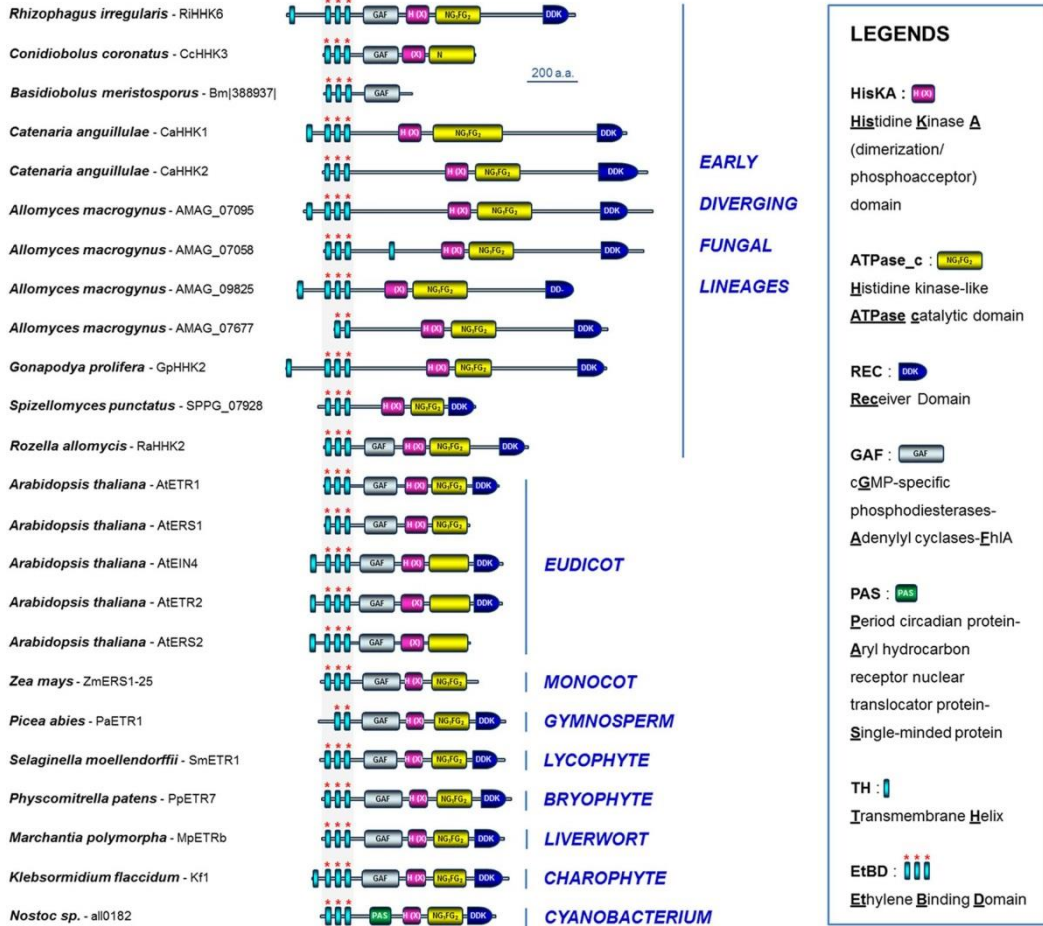
We first identified new fungal HHKs that share strong identities with plant ethylene receptors (Fig. 2 and 3A). The main feature that differentiates plant ethylene receptors from other bacterial or fungal HKs is the presence within the N-terminal sensing region of an ethylene binding domain consisting of a combination of three transmembrane

helices that bear conserved amino acids essential for hormone perception (Fig. 3B) (18). We identified this particular N-terminal feature initially in the *Rhizophagus* (*Glomeromycotina*) RiHHK6 predicted protein (Fig. 2). *Glomeromycotina* form arbuscular mycorrhizae with plants (Table 1), and the importance of ethylene in the establishment of this type of symbiosis has been previously demonstrated (12, 13). Further BLAST analysis of more than 500 fungal genomes (using the *Rhizophagus* RiHHK6 ethylene binding domain as the query) led us to identify homologous sequences in several other EDF which are known to colonize plant materials (leaf litter, twigs, decaying fruits, soil) (Table 1), including *Conidiobolus* (CcHHK3), *Catenaria* (CaHHK1 and CaHHK2), *Gonapodya* (GpHHK2), *Basidiobolus* (Bm|388937]), and *Spizellomyces* (SPPG_07928) (Fig. 2 and 3A). We also noticed the presence of ethylene receptor homologs in *Allomyces* (AMAG_07677, AMAG_07095, AMAG_07058, and AMAG_09825) and *Rozella* (RaHHK2) (Fig. 2 and 3A). Since it is well-known that *Rozella* behaves as an obligate parasite of *Allomyces* (19), it could be hypothesized that ethylene orchestrates interactions between these two aquatic species. Alternatively, the presence of ethylene receptor homologs in these two flagellated fungi could be inherent to their location in the deepest branches of the tree and the inheritance of ethylene receptor homologs in the common ancestor of all fungi (9). All these new EDF proteins are depicted in Fig. 3A, along with several previously characterized ethylene receptors from plants, green algae, and cyanobacteria (20). As revealed by alignment of the ethylene binding domains from these proteins (Fig. 3B), all homologs to ethylene receptors identified in the genomes of the set of EDF display the three predicted transmembrane helices containing all of the crucial residues involved in ethylene perception (18). Plant ethylene receptors are currently categorized in two subfamilies: subfamily 1 includes members displaying an ethylene binding domain together with a GAF domain (cyclic GMP-specific phosphodiesterases/adenylyl cyclases/FhlA domain) in the sensing region, whereas subfamily 2 includes ethylene receptors containing a supplemental N-terminal transmembrane helix, compared to subfamily 1 members (21). As shown in Fig. 3A, both subfamilies are represented among EDF. In addition, it is now recognized that some members of the *Arabidopsis* ethylene receptor series lack several HHK functional domains, such as the C-terminal receiver domain (REC; AtERS1 and AtERS2) up to the histidine kinase ATPase catalytic (HATPase_c) domain (AtEIN4, AtERS2, and AtETR2) (21). Interestingly, such truncated features are also observed in some *Entomophthoromycotina* (*Conidiobolus* CcHHK3 and *Basidiobolus* Bm|388937]) (Fig. 3A).

SOME EDF GENOMES ENCODE CYTOKININ RECEPTOR HOMOLOGS

When exploring the structural diversity of HHKs in EDF, we were also surprised to observe unprecedented fungal HHKs that bear within their N terminus a CHASE domain (cyclases/histidine kinase-associated sensing extracellular domain) surrounded by two predicted transmembrane helices (Fig. 2). This remains indeed the characteristic feature of plant cytokinin receptors (22, 23). These CHASE domain-containing HHKs among the kingdom Fungi were initially identified in this study among the *Glomeromycotina* (*Rhizophagus* RiHHK7 and *Gigaspora* GrHHK7) (Fig. 2 and 4A). As for ethylene, the major importance of the host plant cytokinins in the development of arbuscular mycorrhizal symbiosis by *Glomeromycotina* is now well documented (15, 16). Further investigations (BLAST analysis using the *Rhizophagus* RiHHK7 CHASE sequence as the query) allowed us to identify homologous sequences in other EDF which, interestingly, are known to colonize decaying plant material (Table 1), including the genera *Catenaria* (CaHHK3, CaHHK4, and CaHHK5), *Gonapodya* (GpHHK3, GpHHK4), *Basidiobolus* (Bm|296463]), *Allomyces* (AMAG_01137, AMAG_18430), and *Spizellomyces* (SPPG_01597) (Fig. 4A). In *Mucoromycotina*, cytokinin receptor homologs are also found in the genus *Umbelopsis* (UrHHK10) (Fig. 4A) but not in the other 30 *Mucoromycotina* species for which the genome sequences are available. *Umbelopsis* species display a unique lifestyle compared to other *Mucoromycotina* (predominantly including saprotrophic or pathogenic species), as *Umbelopsis* spp. have been reported as endophytes in root xylem tissues (Table 1) (24). Figure 4A depicts this set of new fungal HHKs, along with the structure

A



B

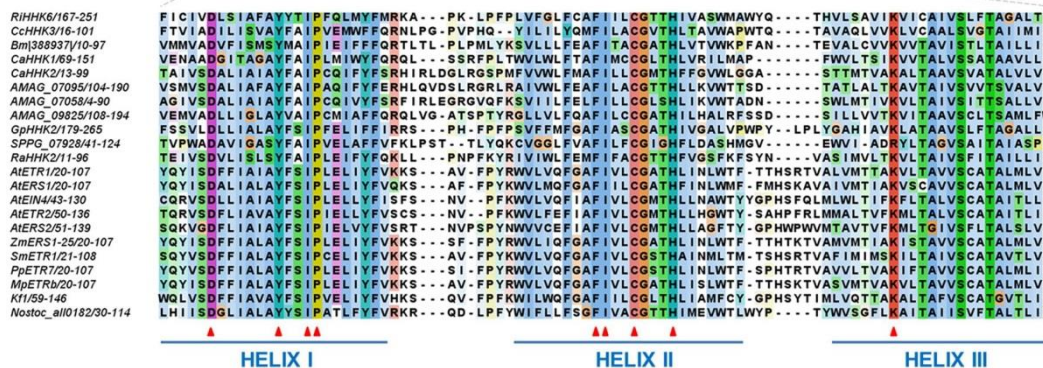
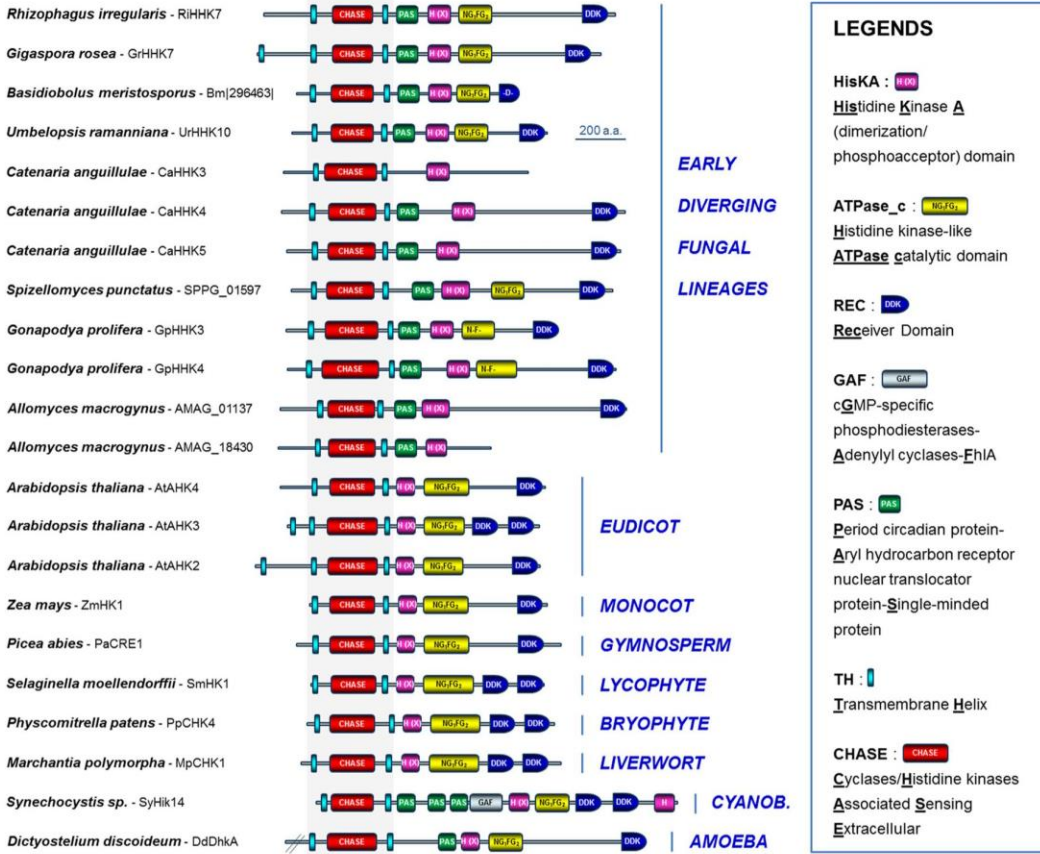


FIG 3 Structures of homologs to ethylene receptors identified in early diverging fungi. (A) Diversity of structures found in various early diverging fungi. The structures of several previously characterized ethylene receptors from plant, green algae, and cyanobacteria are also provided (20). (B) Alignment of ethylene binding domains from homologs to ethylene receptors identified in early diverging fungi, along with others from plant, algae, and cyanobacteria. The ethylene binding domains consist of three transmembrane helices. Essential residues that have been reported to be involved in ethylene perception (18) are indicated with red arrows. AMAG_07677 and PaETR1 sequences were not included in this analysis (incomplete ethylene binding domain). The amino acid sequence alignment was formatted with the JALVIEW program.

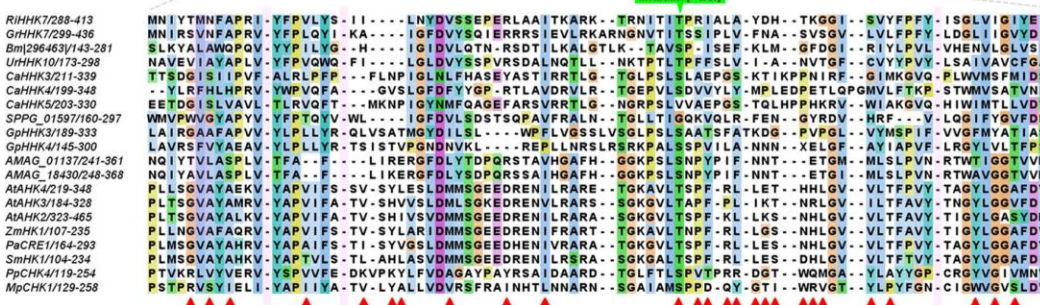
Opinion/Hypothesis



A



B



of several plant cytokinin receptors and CHASE domain-containing HKs. As previously described for plant cytokinin receptors (22, 23), alignment of all these predicted protein sequences revealed that the CHASE domain remains highly degenerated (Fig. 4B). This suggests that EDF may sense numerous cytokinin derivatives, as observed in plants that

typically contain a mixture of different biologically active cytokinin metabolites (25). Interestingly, the most important amino acid for hormone binding in the *Arabidopsis* AHK4 cytokinin receptor, i.e., threonine 301 (green arrow in Fig. 4B), is conserved or similar (serine) in almost all the CHASE domain-containing HHKs deduced from EDF genomes. Indeed, this residue was at the origin of the discovery of plant cytokinin receptors, since when mutated in AHK4, this led to the *wooden leg (wol)* mutant phenotype in *Arabidopsis* (an altered root morphology characteristic of the absence of cytokinin perception in plants) (26).

DECIPHERING THE PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS OF EDF, PLANT, AND CYANOBACTERIAL ETHYLENE AND CYTOKININ RECEPTORS

A cyanobacterial origin of plant ethylene receptors was previously suggested (27). Although it was recently proposed that cytokinin perception by plant HHKs through the CHASE domain might have emerged shortly before the conquest of land (23), the exact origin of these phytohormone receptors remains unclear. To gain insight into the phylogenetic relationships of EDF, plant, and cyanobacterial ethylene and cytokinin receptors, we generated a robust phylogenetic tree after multiple alignments of all the predicted sequences compiled in this analysis (Fig. 5). This revealed that cyanobacterial, plant, and EDF ethylene receptors tend to cluster, supporting a common origin (Fig. 5). Emergence of EDF cytokinin receptor homologs, as currently believed for plants (23), might have resulted from separate transfer and specialization of an ancestral, hitherto-unknown CHASE domain-containing prokaryotic HK, since plant and EDF cytokinin receptor homologs do not occur in the same cluster (Fig. 5).

PHYTOHORMONE RECEPTOR HOMOLOGS MAY HAVE PLAYED AN ESSENTIAL ROLE IN FUNGAL LAND COLONIZATION AND FUNGUS-PLANT INTERACTION PROCESSES

We have described here for the first time fungal HHKs that share a high degree of similarity with plant ethylene and cytokinin receptors. Importantly, these homologs to phytohormone receptors were found in large numbers in several flagellated genera (e.g., *Gonapodya*, *Catenaria*, *Allomyces*, and *Spizellomyces*), which are reported to colonize decaying plant material, where cytokinins and ethylene are omnipresent (25), and in a small number of some nonflagellated EDF they are known to behave as plant root symbionts or endophytes (e.g., *Rhizophagus* and *Umbelopsis*) (Fig. 3 and 4).

Strong arguments suggest that interacting with fungi was one of the major processes that promoted land colonization by plants (28, 29). In addition, as previously mentioned, ethylene and cytokinins are prominent phytohormones that orchestrate interactions in several plant-fungus symbiotic systems (12, 13, 15, 16). On the basis of our observations, some hypotheses may be therefore put forward to explain the presence and distribution of these ethylene and cytokinin receptor homologs in the EDF lineages (Fig. 6A). Ancestral aquatic fungi may have harbored a pool of archetypal ethylene receptors and CHASE domain-containing HK genes that may have been transferred horizontally from cyanobacteria or green algae (23, 27). These gene families have undergone rapid expansion in some flagellated EDF lineages, including, for instance, *Chytridiomycota* (e.g., *Gonapodya* and *Spizellomyces*) and *Blastocladiomycota* (e.g., *Allomyces* and *Catenaria*) (Fig. 6A and D). The presence of these phytohormone receptor homologs may have initially participated to potentiate EDF-EDF (e.g., ethylene receptors in *Allomyces* and its parasite, *Rozella*), EDF-cyanobacteria, and EDF-green algae communication (most cyanobacteria and green algae harbor such phytohormone homologs) (23, 27). Later, these same signaling pathways could have been coopted for EDF-plant interactions and coevolution (28). The presence of a unique member of both ethylene and cytokinin receptors in *Glomeromycotina* (e.g., *Rhizophagus*) (Fig. 6A), which currently represent the sole group of EDF that cannot be cultured without their plant partner, may reflect the optimization process that occurred in some EDF lineages to sense the host plant for symbiosis establishment. Once plants successfully colonized land, notably *Glomeromycotina* and the related *Mucoromycotina* (29), and developed

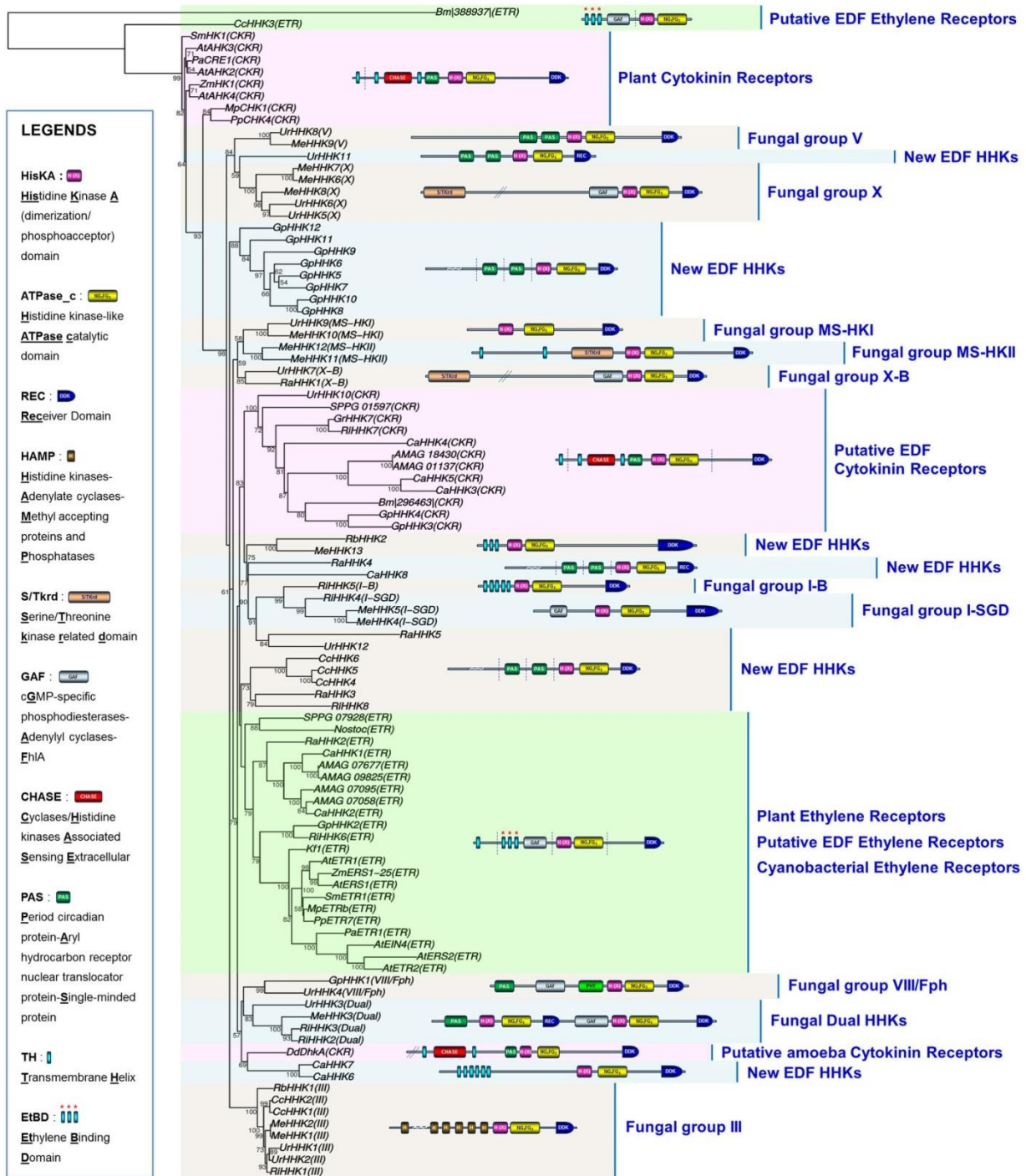


FIG 5 Phylogeny estimation of HHK predicted protein sequences. Methods used to carry out this phylogenetic analysis are provided in Text S1 in the supplemental material. Early diverging fungi predicted HHK sequences were categorized following sequence analysis of both HisKA signatures and N-terminal sensing domains according to previous classifications (4, 10). Abbreviations: Ri, *Rhizophagus irregularis* (Glomeromycotina); Me, *Mortierella elongata* (Mortierellomycotina); Ur, *Umbelopsis ramanniana* (Mucoromycotina); Cc, *Conidiobolus coronatus* (Entomophthoromycotina); Rb, *Ramicandelaber brevisporus* (Kickxellomycotina); Ca, *Catenaria anguillulae* (Blastocladiomycota); Gp, *Gonapodya prolifera* (Chytridiomycota); Ra, *Rozella allomyces* (Cryptomycota); AMAG, *Allomyces macrogynus* (Blastocladiomycota); Dd, *Dictyostelium discoideum* (Amoeboae); SPPG, *Spizellomyces punctatus* (Chytridiomycota); Bm, *Basidiobolus meristoporus* (Entomophthoromycotina); Gr, *Gigaspora rosea* (Glomeromycotina); At, *Arabidopsis thaliana* (dicots); Zm, *Zea mays* (monocots); Pa, *Picea abies* (gymnosperms); Sm, *Selaginella moellendorffii* (lycophytes); Pp, *Physcomitrella patens* (bryophytes); Mp, *Marchantia polymorpha* (liverworts); Kf, *Klebsormidium flaccidum* (charophytes).

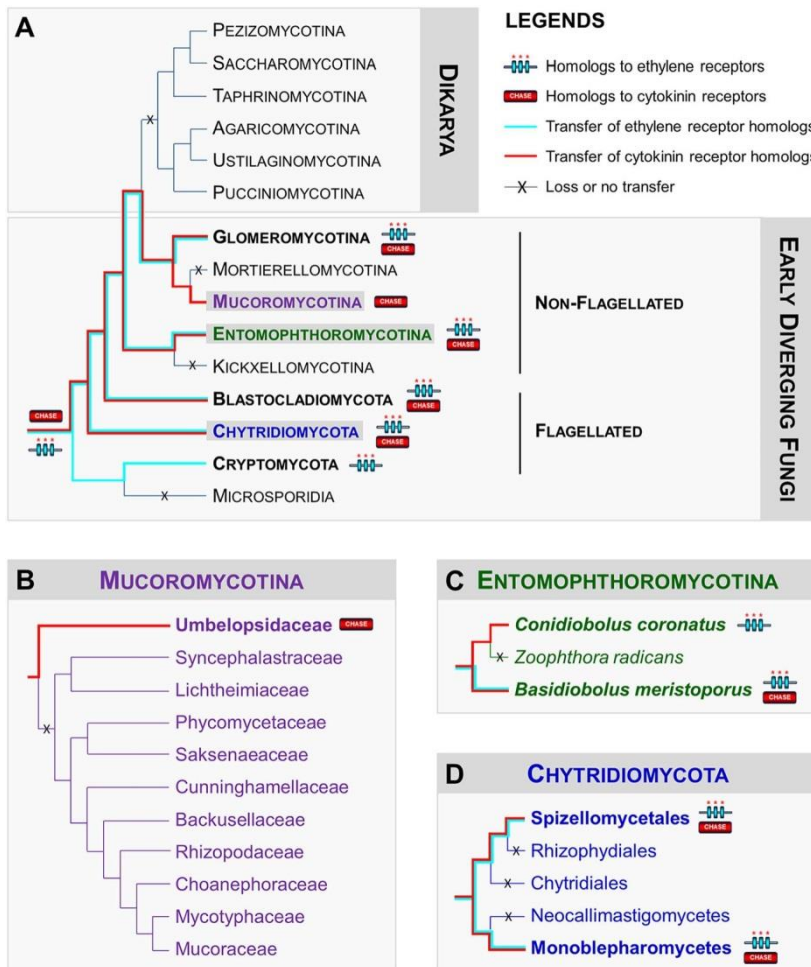


FIG 6 Distribution of homologs to ethylene and cytokinin receptors in the early diverging fungal lineages. (A) Phylogeny of fungi. Homologs to phytohormone receptors were found in lineages which included flagellated early diverging fungal species (from *Chytridiomycota*, *Blastocladiomycota*, and *Cryptomycota*) and some nonflagellated species, which have been reported to colonize decaying plant material or to behave as symbionts or endophytes of plant roots (from *Mucoromycotina*, *Glomeromycotina*, and *Entomophthoromycotina*) (B) The particular case of *Mucoromycotina*. Homologs to cytokinin receptors are exclusively present in basal species from the *Umbelopsidaceae* clade (facultative endophytes of plant roots). (C) The case of *Entomophthoromycotina*. Homologs to ethylene and cytokinin receptors are detected in the basal lineages (e.g., *Basidiobolus* and *Conidiobolus*) that are capable of diverse ecologies, including colonizing decaying plant materials and parasitizing insects. As the lifestyle progresses to a strict reliance on insect parasitism (e.g., *Zoophthora*), the presence of the homologs is lost. (D) The case of *Chytridiomycota*. Both homologs to ethylene and cytokinin receptors are detected in species that colonize decaying plant materials (e.g., *Gonapodya* from *Monoblepharomycetes* and *Spizellomyces* from *Spizellomycetales*), but not in others (e.g., the amphibian pathogenic fungus *Batrachochytrium*, *Rhizophydiales*, the saprobe *Rhizoclostium globosum*, *Chytridiales*, or the mutualistic fungi of herbivore guts, *Piromyces* and *Neocallimastigomycetes*). The topologies resemble the current understanding of the relationships of the fungal groups according to information reported in reference (7–9 and 30).

more hospitable terrestrial habitats, such as soil, wood, and litter, ethylene and cytokinin receptor homologs were progressively lost in the genomes of fungi (absent in the Dikarya and most of the nonflagellated EDF lineages) that have shifted to other environmental niches. The striking truncated structures of ethylene receptor homologs found in *Conidiobolus* and *Basidiobolus* (*Entomophthoromycotina*) (Fig. 3A and 6C) and the intriguing presence of a unique cytokinin receptor homolog in *Umbelopsis* (*Mucoromycotina*) (Fig. 6B) and *Basidiobolus* (Fig. 6C) clearly illustrate this phenomenon of

gene erosion, since these genera are considered basal within their respective lineages (9, 30). Moreover, we propose that EDF species that originally colonized plants and decaying vegetation lost their receptors at the same time they gained the ability to become pathogens of animals living in the same terrestrial ecological niche (e.g., *Catenaria* and *Conidiobolus*) (Fig. 6). Additional examples of plant host-to-animal host switches in the EDF will be necessary to confirm whether loss of these phytohormone receptor homologs is really linked to changes to non-plant-associated lifestyles.

CONCLUDING REMARKS

The discovery of unprecedented homologs to plant hormone receptors in EDF suggests the participation of these sensing proteins in fungus-plant interaction processes, which may have helped these early diversifying fungal lineages to colonize land. Work is under way to functionally characterize these receptors and to decipher their physiological roles in EDF via complementary biochemical, genetic, and modeling approaches.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material for this article may be found at <https://doi.org/10.1128/mBio.01739-16>.

Text S1, DOCX file, 0.1 MB.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the U.S. Department of Energy Joint Genome Institute and the following principal investigators from the 1000 Fungal Genomes Project (J. Spatafora, J. Stajich, A. Gryganskyi, S. Baker, and R. Vilgalys) for the permission to use EDF genomes before publication. We also acknowledge the Broad Institute Fungal Genome Initiative for making the genome sequences of *A. macrogynus* and *S. punctuatus* available.

Research in the laboratory of F.M. is funded by the Laboratory of Excellence Advanced Research on the Biology of Tree and Forest Ecosystems (ARBRE grant ANR 11 LABX 0002 01) and the U.S. DOE through the Oak Ridge National Laboratory Scientific Focus Area for Genomics Foundational Sciences (Plant Microbe Interfaces Project).

We are grateful to V. Puech-Pagès, P. M. Delaux, and G. Bécard (Université de Toulouse, UMR 5546, France) for their critical reading of the manuscript. We apologize to those whose work was not referenced due to citation restrictions.

REFERENCES

- Hérivaux A, So YS, Gastebois A, Latgé JP, Bouchara JP, Bahn YS, Papon N. 2016. Major sensing proteins in pathogenic fungi: the hybrid histidine kinase family. *PLoS Pathog* 12:e1005683. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005683>.
- Bem AE, Velikova N, Pellicer MT, Baarlen Pv, Marina A, Wells JM. 2015. Bacterial histidine kinases as novel antibacterial drug targets. *ACS Chem Biol* 10:213–224. <https://doi.org/10.1021/cb5007135>.
- Zdarska M, Dobisová T, Gelová Z, Pernisová M, Dabravolski S, Hejátko J. 2015. Illuminating light, cytokinin, and ethylene signalling crosstalk in plant development. *J Exp Bot* 66:4913–4931. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv261>.
- Defosse TA, Sharma A, Mondal AK, Dugé de Bernonville T, Latgé JP, Calderone R, Giglioli-Guivarc'h N, Courdavault V, Clastre M, Papon N. 2015. Hybrid histidine kinases in pathogenic fungi. *Mol Microbiol* 95: 914–924. <https://doi.org/10.1111/mmi.12911>.
- Corrochano LM, Kuo A, Marcet-Houben M, Polaino S, Salamov A, Villalobos-Escobedo JM, Grimwood J, Álvarez MI, Avalos J, Bauer D, Benito EP, Benoit I, Burger G, Camino LP, Cánovas D, Cerdá-Olmedo E, Cheng JF, Domínguez A, Eliáš M, Eslava AP, Glaser F, Gutiérrez G, Heitman J, Henrissat B, Iturriaga EA, Lang BF, Lavín JL, Lee SC, Li W, Lindquist E, López-García S, Luque EM, Marcos AT, Martin J, McCluskey K, Medina HR, Miralles-Durán A, Miyazaki A, Muñoz-Torres E, Oguiza JA, Ohm RA, Olmedo M, Orejas M, Ortiz-Castellanos L, Pisabarro AG, Rodríguez-Romero J, Ruiz-Herrera J, Ruiz-Vázquez R, Sanz C, Schackwitz W, et al. 2016. Expansion of signal transduction pathways in fungi by extensive genome duplication. *Curr Biol* 26:1577–1584. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.04.038>.
- Grigoriev IV, Nikitin R, Haridas S, Kuo A, Ohm R, Otilar R, Riley R, Salamov A, Zhao X, Korzeniewski F, Smirnova T, Nordberg H, Dubchak I, Shabalov I. 2014. MycoCosm portal: gearing up for 1000 fungal genomes. *Nucleic Acids Res* 42:D699–D704. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1183>.
- Chang Y, Wang S, Sekimoto S, Aerts AL, Choi C, Clum A, LaButti KM, Lindquist EA, Yee Ngan C, Ohm RA, Salamov AA, Grigoriev IV, Spatafora JW, Berbee ML. 2015. Phylogenomic analyses indicate that early fungi evolved digesting cell walls of algal ancestors of land plants. *Genome Biol Evol* 7:1590–1601. <https://doi.org/10.1093/gbe/evv090>.
- James TY, Kauff F, Schoch CL, Matheny PB, Hofstetter V, Cox CJ, Celio G, Gueidan C, Fraker E, Miadlikowska J, Lumbsch HT, Rauhut A, Reeb V, Arnold AE, Amtoft A, Stajich JE, Hosaka K, Sung GH, Johnson D, O'Rourke B, Crockett M, Binder M, Curtis JM, Slot JC, Wang Z, Wilson AW, Schüssler A, Longcore JE, O'Donnell K, Mozley-Standridge S, Porter D, Letcher PM, Powell MJ, Taylor JW, White MM, Griffith GW, Davies DR, Humber RA, Morton JB, Sugiyama J, Rossman AY, Rogers JD, Pfister DH, Hewitt D, Hansen K, Hambleton S, Shoemaker RA, Kohlmeyer J, Volkmann-Kohlmeyer B, Spotts RA, et al. 2006. Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature* 443:818–822. <https://doi.org/10.1038/nature05110>.
- Spatafora JW, Chang Y, Benny GL, Lazarus K, Smith ME, Berbee ML, Bonito G, Corradi N, Grigoriev I, Gryganskyi A, James TY, O'Donnell K, Roberson RW, Taylor TN, Uehling J, Vilgalys R, White MM, Stajich JE. 2016. A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi

- based on genome-scale data. *Mycologia* 108:1028–1046. <https://doi.org/10.3852/16-042>.
10. Catlett NL, Yoder OC, Turgeon BG. 2003. Whole-genome analysis of two-component signal transduction genes in fungal pathogens. *Eukaryot Cell* 2:1151–1161. <https://doi.org/10.1128/EC.2.6.1151-1161.2003>.
 11. Lavín JL, Sarasola-Puente V, Ramírez L, Pisabarro AG, Oguiza JA. 2014. Dual-histidine kinases in basidiomycete fungi. *C R Biol* 337:111–116. <https://doi.org/10.1016/j.crvi.2013.12.007>.
 12. Foo E, McAdam EL, Weller JL, Reid JB. 2016. Interactions between ethylene, gibberellins, and brassinosteroids in the development of rhizobial and mycorrhizal symbioses of pea. *J Exp Bot* 67:2413–2424. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw047>.
 13. de los Santos RT, Vierheilig H, Ocampo JA, Garrido JM. 2011. Altered pattern of arbuscular mycorrhizal formation in tomato ethylene mutants. *Plant Signal Behav* 6:755–758. <https://doi.org/10.4161/psb.6.5.15415>.
 14. Chanclud E, Kisiala A, Emery NR, Chalvon V, Ducasse A, Romiti-Michel C, Gravot A, Kroj T, Morel JB. 2016. Cytokinin production by the rice blast fungus is a pivotal requirement for full virulence. *PLoS Pathog* 12:e1005457. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005457>.
 15. Cosme M, Ramireddy E, Franken P, Schmülling T, Wurst S. 2016. Shoot- and root-borne cytokinin influences arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza* 26:709–720. <https://doi.org/10.1007/s00572-016-0706-3>.
 16. Laffont C, Rey T, André O, Novero M, Kazmierczak T, Debelle F, Bonfante P, Jacquet C, Frugier F. 2015. The CRE1 cytokinin pathway is differentially recruited depending on *Medicago truncatula* root environments and negatively regulates resistance to a pathogen. *PLoS One* 10:e0116819. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116819>.
 17. Hinsch J, Galuszka P, Tudzynski P. 2016. Functional characterization of the first filamentous fungal tRNA-isopentenyltransferase and its role in the virulence of *Claviceps purpurea*. *New Phytol* 211:980–992. <https://doi.org/10.1111/nph.13960>.
 18. Wang W, Esch JJ, Shiu SH, Agula H, Binder BM, Chang C, Patterson SE, Bleecker AB. 2006. Identification of important regions for ethylene binding and signaling in the transmembrane domain of the ETR1 ethylene receptor of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18:3429–3442. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.044537>.
 19. Gleason FH, Lilje O, Marano AV, Sime-Ngando T, Sullivan BK, Kirchmair M, Neuhauser S. 2014. Ecological functions of zoospore hyperparasites. *Front Microbiol* 5:244. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00244>.
 20. Yasumura Y, Pierik R, Fricker MD, Voesenek LA, Harberd NP. 2012. Studies of *Physcomitrella patens* reveal that ethylene-mediated submergence responses arose relatively early in land-plant evolution. *Plant J* 72:947–959. <https://doi.org/10.1111/tpj.12005>.
 21. Gallie DR. 2015. Appearance and elaboration of the ethylene receptor family during land plant evolution. *Plant Mol Biol* 87:521–539. <https://doi.org/10.1007/s11103-015-0296-z>.
 22. Heyl A, Wulfetange K, Pils B, Nielsen N, Romanov GA, Schmülling T. 2007. Evolutionary proteomics identifies amino acids essential for ligand-binding of the cytokinin receptor CHASE domain. *BMC Evol Biol* 7:62. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-62>.
 23. Gruhn N, Halawa M, Snel B, Seidl MF, Heyl A. 2014. A subfamily of putative cytokinin receptors is revealed by an analysis of the evolution of the two-component signaling system of plants. *Plant Physiol* 165:227–237. <https://doi.org/10.1104/pp.113.228080>.
 24. Hoff JA, Klopfenstein NB, McDonald GI, Tonn JR, Kim M-S, Zambino PJ, Hessburg PF, Rogers JD, Peever TL, Carris LM. 2004. Fungal endophytes in woody roots of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and ponderosa pine (*Pinus ponderosa*). *Forest Pathol* 34:255–271. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.2004.00367.x>.
 25. Spíchal L. 2012. Cytokinins—recent news and views of evolutionarily old molecules. *Functional Plant Biol* 39:267–284. <https://doi.org/10.1071/FP11276>.
 26. Mähönen AP, Bonke M, Kauppinen L, Riikonen M, Benfey PN, Helariutta Y. 2000. A novel two-component hybrid molecule regulates vascular morphogenesis of the *Arabidopsis* root. *Genes Dev* 14:2938–2943. <https://doi.org/10.1101/gad.189200>.
 27. Lacey RF, Binder BM. 2016. Ethylene regulates the physiology of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 via an ethylene receptor. *Plant Physiol* 171:2798–2809. <https://doi.org/10.1104/pp.16.06062>.
 28. Brundrett MC. 2002. Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytol* 154:275–304. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2002.00397.x>.
 29. Field KJ, Pressel S, Duckett JG, Rimington WR, Bidartondo MI. 2015. Symbiotic options for the conquest of land. *Trends Ecol Evol* 30:477–486. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2015.05.007>.
 30. Hoffmann K, Pawłowska J, Walther G, Wrzosek M, de Hoog GS, Benny GL, Kirk PM, Voigt K. 2013. The family structure of the Mucorales: a synoptic revision based on comprehensive multigene-genealogies. *Persoonia* 30:57–76. <https://doi.org/10.3767/003158513X666259>.
 31. Tisserant E, Malbreil M, Kuo A, Kohler A, Symeonidi A, Balestrini R, Charron P, Duensing N, Frei dit Frey N, Gianinazzi-Pearson V, Gilbert LB, Handa Y, Herr JR, Hijri M, Koul R, Kawaguchi M, Krajinski F, Lammers PJ, Masclaux FG, Murat C, Morin E, Ndikumana S, Pagni M, Petitpierre D, Requena N, Rosikiewicz P, Riley R, Saito K, San Clemente H, Shapiro H, van Tuinen D, Bécard G, Bonfante P, Paszkowski U, Shachar-Hill YY, Tuskan GA, Young JP, Sanders IR, Henrissat B, Rensing SA, Grigoriev IV, Corradi N, Roux C, Martin F. 2013. Genome of an arbuscular mycorrhizal fungus provides insight into the oldest plant symbiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:20117–20122. <https://doi.org/10.1073/pnas.1313452110>.
 32. James TY, Pelin A, Bonen L, Ahrendt S, Sain D, Corradi N, Stajich JE. 2013. Shared signatures of parasitism and phylogenomics unite Cryptomycota and Microsporidia. *Curr Biol* 23:1548–1553. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.06.057>.
 33. Rosenblum EB, James TY, Zamudio KR, Poorten TJ, Ilut D, Rodriguez D, Eastman JM, Richards-Hrdlicka K, Joneson S, Jenkinson TS, Longcore JE, Parra Olea G, Toledo LF, Arellano ML, Medina EM, Restrepo S, Flechas SV, Berger L, Briggs CJ, Stajich JE. 2013. Complex history of the amphibian-killing chytrid fungus revealed with genome resequencing data. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:9385–9390. <https://doi.org/10.1073/pnas.1300130110>.
 34. Tang N, San Clemente H, Roy S, Bécard G, Zhao B, Roux C. 2016. A survey of the gene repertoire of *Gigaspora rosea* unravels conserved features among Glomeromycota for obligate biotrophy. *Front Microbiol* 7:233. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00233>.
 35. Russ C, Lang BF, Chen Z, Gujja S, Shea T, Zeng Q, Young S, Cuomo CA, Nusbaum C. 2016. Genome sequence of *Spizellomyces punctatus*. *Genome Announc* 4:e00849-16. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00849-16>.

3. L'étude de la structure et de la distribution des histidine kinases chez les Saccharomycotina montre une perte progressive de ces protéines au cours de l'évolution des levures bourgeonnantes

Le premier article de bio-informatique portant sur la structure et la distribution des HKs chez les champignons « inférieurs » a été réalisé en collaboration étroite avec mon directeur de thèse (N. Papon). Cette étude m'ayant permis de m'aguerrir i) à la structure des différents groupes d'HKs fongiques et ii) aux différentes approches et outils de bio-informatique, j'ai souhaité mener une seconde analyse bio-informatique de ce type de récepteurs, de manière plus autonome, et donc portant sur un nombre plus restreint d'espèces de surcroît comportant un faible nombre d'HKs puisque la classification de cette famille de protéines demeurait relativement complexe. A l'époque de cette réflexion est parue un article de revue axé sur l'exploitation de la diversité génétique des levures bourgeonnantes (Saccharomycotina) à des fins biotechnologiques (Hittinger *et al.*, 2015). Dans cet article figurait une magnifique phylogénie de plus de 80 espèces levuriformes dont la séquence des génomes était disponible (Figure 31). Les données sur les HKs de levures étant rares et se limitant à quelques espèces (3 HKs chez *C. albicans*, 1 HK chez *C. glabrata*, et 1 HK chez *S. cerevisiae*) (Salas-Delgado *et al.*, 2017), je me suis donc lancée de manière autonome dans l'étude de la phylogénie des HKs chez les Saccharomycotina. Ce travail a été récemment valorisé dans le journal *Current Genetics*.

3.1. Résumé

Les systèmes à deux composants (*two-component systems*, TCS) sont des voies de signalisation cellulaires utilisées par les organismes procaryotes et eucaryotes pour faire face à un large éventail de signaux environnementaux. Chez les champignons, les voies de signalisation TCS qui permettent la perception des stimuli impliquent le transfert d'un groupement phosphoryl entre trois familles de protéines comprenant les histidine kinases hybrides (HHKs), les protéines histidine phosphotransfer (Hpt) et les régulateurs de réponse (RR). Les mécanismes sous-jacents qui conduisent à la remarquable diversité parmi les HHKs et d'autres protéines des TCS dans différents clades fongiques restent peu élucidés. Plus précisément, les tendances évolutives qui ont conduit à l'apparition, au transfert, à la duplication et à la perte des gènes TCS chez les champignons n'ont jamais été abordées jusqu'à présent. Dans cet article, nous avons été plus particulièrement intéressés par l'étude de la distribution des modules TCS chez les levures bourgeonnantes (Saccharomycotina) en analysant le génome de 82 espèces. Étonnamment, certaines espèces des lignées basales, en particulier *Lipomyces starkeyi*, codent plusieurs groupes d'HHKs généralement retrouvés chez les filamenteux et apparaissent comme des gènes « reliques » qui ont probablement été retenus par un ancêtre commun de Saccharomycotina. Dans l'ensemble, cette analyse a révélé une diminution progressive du pool initial de gènes codant pour des HHKs au cours de l'évolution de la levure Saccharomycotina.

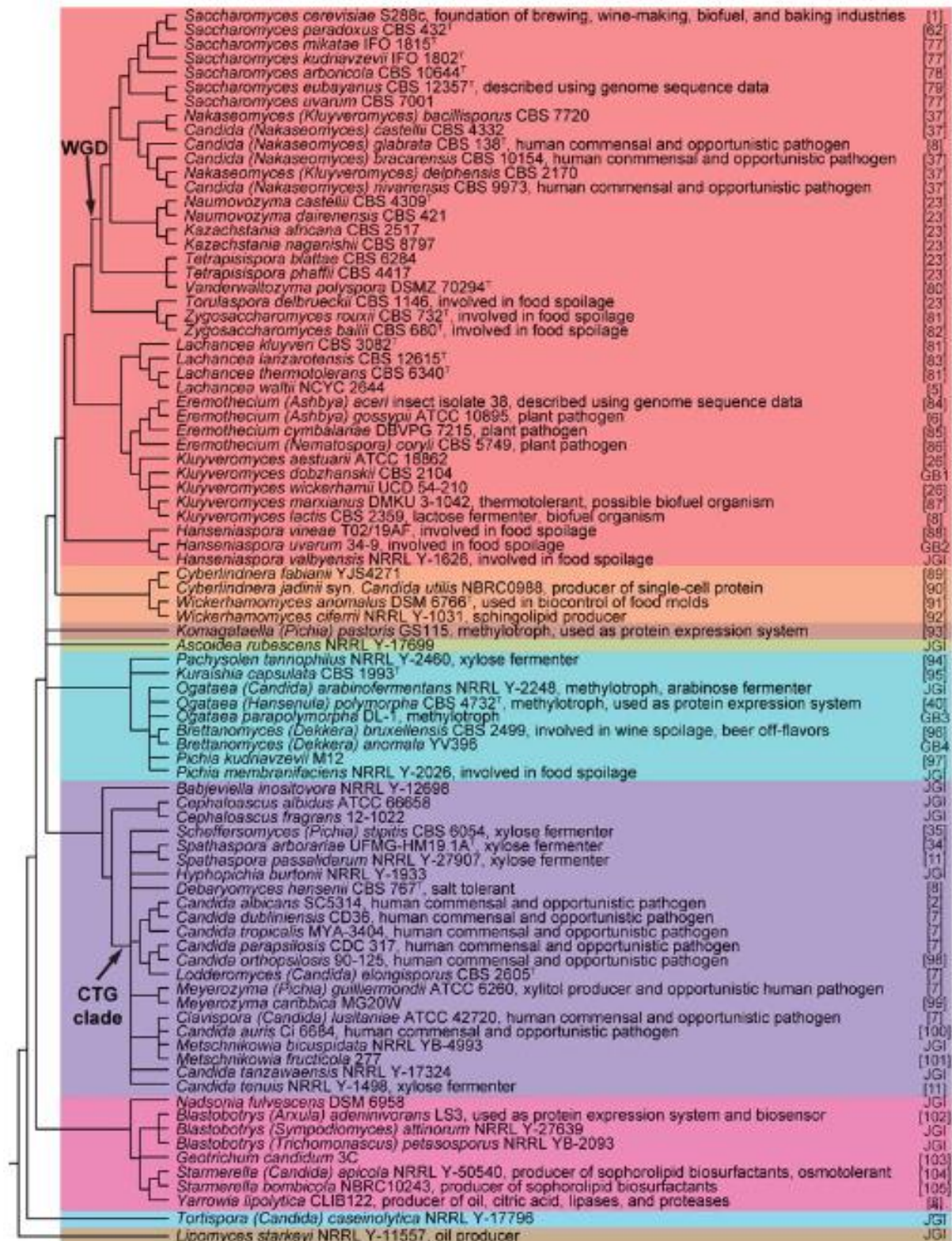


Figure 31. Phylogénie de 80 espèces levuriformes, d'Hittinger et al. (2015).

3.2. Article

Current Genetics

<https://doi.org/10.1007/s00294-017-0797-1>

ORIGINAL ARTICLE



Progressive loss of hybrid histidine kinase genes during the evolution of budding yeasts (Saccharomycotina)

Anaïs Hérviaux¹ · José L. Lavín² · Thomas Dugé de Bernonville³ · Patrick Vandeputte^{1,4} · Jean-Philippe Bouchara^{1,4} · Amandine Gastebois¹ · José A. Oguiza⁵ · Nicolas Papon¹Received: 19 October 2017 / Revised: 29 November 2017 / Accepted: 11 December 2017
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2017

Abstract

Two-component systems (TCSs) are widely distributed cell signaling pathways used by both prokaryotic and eukaryotic organisms to cope with a wide range of environmental cues. In fungi, TCS signaling routes, that mediate perception of stimuli, correspond to a multi-step phosphorelay between three protein families including hybrid histidine kinases (HHK), histidine phosphotransfer proteins (HPt) and response regulators (RR). The best known of these fungal transduction pathways remains the Sln1(HHK)–Ypd1(HPt)–Ssk1(RR) system that governs the high-osmolarity glycerol (HOG) mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway for osmo-adaptation in *Saccharomyces cerevisiae*. Although recent advances have provided a preliminary overview of the distribution of TCS proteins in the kingdom Fungi, underlying mechanisms that drive the remarkable diversity among HHKs and other TCS proteins in different fungal lineages remain unclear. More precisely, evolutionary paths that led to the appearance, transfer, duplication, and loss of the corresponding TCS genes in fungi have never been hitherto addressed. In the present study, we were particularly interested in studying the distribution of TCS modules across the so-called “budding yeasts clade” (Saccharomycotina) by interrogating the genome of 82 species. With the exception of the emergence of an additional RR (named Srr1) in the fungal CTG clade, TCS proteins Ypd1 (HPt), Ssk1 (RR), Skn7 (RR), and Rim15 (RR) are well conserved within the Saccharomycotina. Surprisingly, some species from the basal lineages, especially *Lipomyces starkeyi*, harbor several filamentous-type HHKs that appear as relict genes that have been likely retained from a common ancestor of Saccharomycotina. Overall, this analysis revealed a progressive diminution of the initial pool of HHK-encoding genes during Saccharomycotina yeast evolution.

Keywords Two-component systems · Cell signaling · Histidine kinases · Histidine-containing phosphotransfer proteins · Response regulators

Communicated by M. Kupiec.

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00294-017-0797-1>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Nicolas Papon
nicolas.papon@univ-angers.fr

¹ Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène, GEIHP, EA3142, UNIV Angers, UNIV Brest, Université Bretagne-Loire, Angers, France

² Genome Analysis Platform, CIC bioGUNE, Derio, Spain

³ Biomolécules et Biotechnologies Végétales, EA2106, Université François Rabelais de Tours, Tours, France

Introduction

Two-component systems (TCSs) are widely distributed cell signaling pathways used by both prokaryotic and eukaryotic organisms to cope with a wide range of environmental cues. The lack of typical TCSs proteins in mammals has progressively promoted these signal transduction pathways

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

⁵ Genetics and Microbiology Research Group, Department of Agrarian Production, Public University of Navarre, Pamplona, Spain

Published online: 16 December 2017

as interesting targets for future development of antimicrobials (Bem et al. 2015; Shor and Chauhan 2015).

In prokaryotes, TCSs are usually restricted to the communication occurring between two functional modules by phosphorylation events, i.e., histidine kinases (HKs) and response regulators (RRs). In this case, the perception of a stimulus induces the autophosphorylation of the HK which thus acts as a primary sensor. The phosphate is then transferred to a RR which acts as a transcription factor to directly regulate a series of genes required for an adapted response (Bem et al. 2015). In eukaryotes, TCSs are composed of additional modules, such as histidine-containing phosphotransfer (HPt), and the signaling routes that mediate the perception of stimuli correspond to a multi-step phosphorelay between three families of proteins: HK → HPt → RR. In most of the eukaryotic TCSs, the RR governs downstream elements such as mitogen-activated protein kinases (MAPK) cascades or cyclic adenosine monophosphate (cAMP) signaling systems (Hérivaux et al. 2016).

Whereas current knowledge about TCSs in fungi remains little more than fragmentary, some advances have been done recently concerning the structure and distribution of TCS modules, notably in Dikarya (higher fungi, i.e., Ascomycota and Basidiomycota). While the number of HK-encoding genes differs sharply from one fungal clade to another, fungal genomes seem to encode only few RR overall (2–6 candidates) and a unique HPt (Catlett et al. 2003; Li et al. 2010). Fungal HKs are categorized into 16 groups (Defosse et al. 2015) but a recent exploration of genome resources in early diverging fungal lineages suggested that additional archetypal fungal HK groups have also to be considered (Hérivaux et al. 2017). Whereas the function of TCSs in fungi remains largely elusive, these signaling systems have been studied by functional genomics over the last 15 years in some fungal species, mainly filamentous Ascomycota, and, to date, they were reported to be involved in stress adaptation, red-light perception, morphogenesis, and virulence (Defosse et al. 2015).

Although recent advances have provided a preliminary overview of the distribution of these cell signaling proteins in Dikarya (Catlett et al. 2003; Lavin et al. 2010; Defosse et al. 2015; Salas-Delgado et al. 2017), underlying mechanisms that drive the remarkable diversity among HKs and other TCS modules in different fungal lineages, both in the number of corresponding TCS genes, their structure and functional variations, remain unclear. More precisely, evolutionary paths that led to the appearance, transfer, duplication, and loss of the corresponding genes have never been hitherto addressed in the kingdom Fungi. In the present study, we were particularly interested in addressing these issues across the so-called “budding yeasts clade” (Saccharomycotina, syn. Hemiascomycota) which includes interesting species that are actively studied not only for their

impact on human health (*Candida* sp.) but also for their high potential in various areas of biotechnologies (Papon et al. 2014; Hittinger et al. 2015). We have taken advantage of recent genomic resource availability (Hittinger et al. 2015; Dujon and Louis 2017) to explore the structural diversity and the distribution of TCS functional modules in 82 yeast species. This represents an important step to progressively gain insight into the evolution of cell signaling pathways in fungi (Benanti 2016; Derouiche et al. 2016).

Materials and methods

Gene identification

HK genes were identified following BLAST searches in NCBI and JGI genome sequence databases. All the references concerning the genomes browsed in this study are compiled in supplemental Table S1. Consensus Protein Families Database (Finn et al. 2014) sequences for the Histidine Kinase A domain (HisKA, PFAM00512) and Histidine Kinase ATPase catalytic domain (HATPase_c, PFAM02518) were used in BLASTP searches of each fungal genome. Once annotated, putative HK amino acid sequences were compared (TBLASTN) against each fungal genome as a mean to identify HKs not found by the previous approach. Finally, HK were categorized in their respective groups according to previous classifications, i.e., by (1) comparing the conserved H-box signature and the specific combination of domains within the N terminus (Catlett et al. 2003; Lavin et al. 2010; Defosse et al. 2015). RR genes were identified in a similar manner using Receiver domain (REC, PFAM00072) as query for BLAST searches. HPt genes were identified using *Saccharomyces cerevisiae* YPD1 for BLAST searches.

Phylogenetic analysis

Multiple sequence alignments of protein sequences were performed using MUSCLE (Edgar 2004) configured for highest accuracy (MUSCLE with default settings). After alignment, ambiguous regions (i.e., containing gaps and/or poorly aligned) were removed with Gblocks v0.91b (Castresana 2000) using the following parameters: the default settings and a minimum length of a block after gap cleaning of 10 for HHKs and HPt proteins, and the options for a less stringent selection and a minimum length of a block after gap cleaning of 5 for RRs. Phylogenetic analysis were carried out using the Phylogeny.fr platform (Dereeper et al. 2008) and comprised the following steps. Phylogenetic trees were reconstructed using the maximum likelihood method implemented in the PhyML program v3.0 (Anisimova and Gascuel 2006; Guindon and Gascuel 2003). The

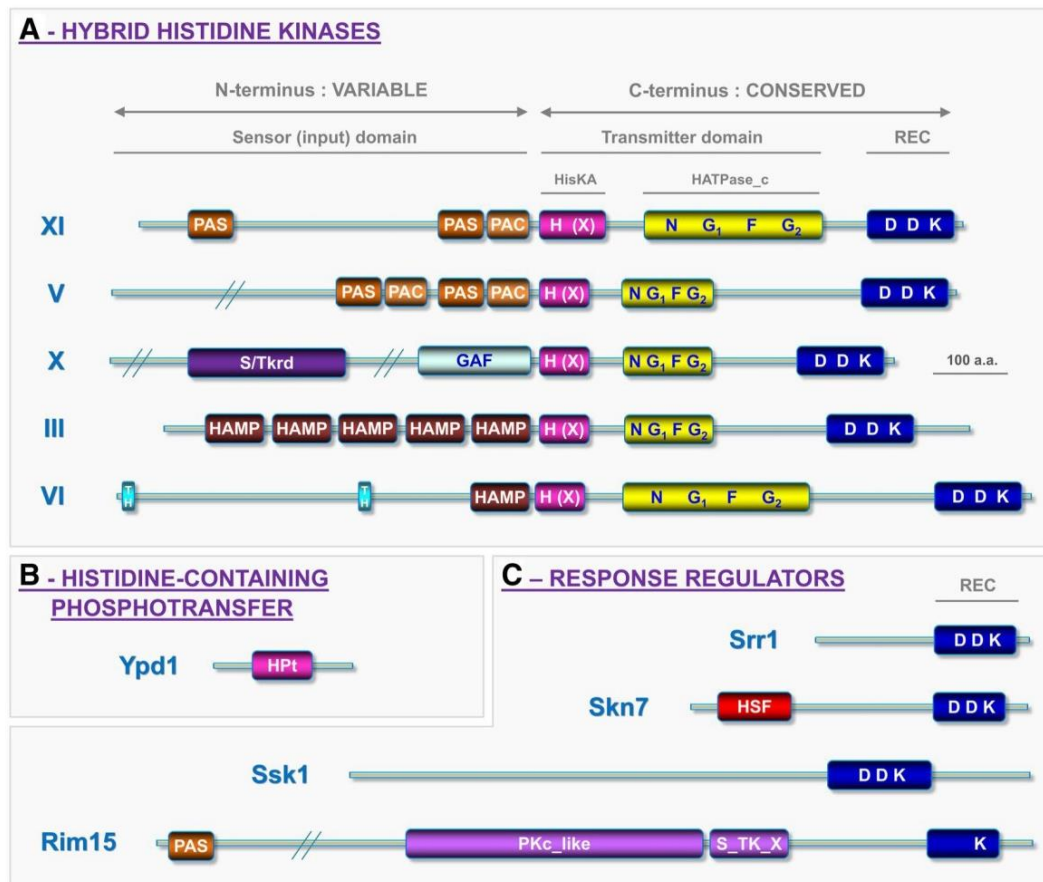


Fig. 1 Structure of predicted two-component system modules identified in this analysis. **a** Hybrid histidine kinases (HHKs). HHKs are composed of three main regions. The first corresponds to a highly variable N-terminal sequence that determines which stimulus is perceived by the HHK. This region is referred to as the “sensor domain”. The central region is the transmitter domain consisting of both Histidine Kinase A (HisKA) and cognate Histidine kinase ATPase catalytic (HATPase_c) subdomains. HisKA domains include an H-box, usually containing a phosphorylatable histidine, and an X-box. The HATPase_c subdomain displays four distinct boxes: N-, G₁-, F-, and G₂-boxes. The third and C-terminal region is the receiver domain (REC) characterized by the presence of a three-amino-acid signature (DDK) including a phosphorylatable aspartate residue. HHKs are categorized in their respective groups according to previous classifications (Catlett et al. 2003; Lavin et al. 2010; Defosse et al. 2015). Each fungal HHK group is defined by a relatively well-conserved

H-box signature and a specific combination of domains within the N terminus. *PAS/PAC* per-period circadian protein; *Arnt-Ah* receptor nuclear translocator protein; *Sim* single-minded protein; *S/Tkrd* serine/threonine kinase-related domain; *GAF* cGMP-phosphodiesterase, adenylyl cyclase, *FhlA*; *HAMP* histidine kinase, adenylyl cyclase, methyl-accepting protein, phosphatase; *TH* transmembrane helices. **b** Histidine-containing phosphotransfer (HPT). HPT are well-conserved small proteins (roughly 150 amino acids) (Fassler and West 2013). **c** Response regulators (RRs). According to previous analysis (Catlett et al. 2003; Lavin et al. 2010), four different RR proteins were identified in the genomes of Saccharomycotina including *Srr1*, *Skn7*, *Ssk1*, and *Rim15*. The C-terminal region in RR corresponds to a REC domain characterized by the presence of a three-amino-acid signature (DDK). *HSF* heat-shock factor domain, *PKc_like* protein kinases catalytic domain, *ST_K_X* extension to Ser/Thr-type protein kinases

LG substitution model was selected assuming an estimated proportion of invariant sites and 4 gamma-distributed rate categories to account for rate heterogeneity across sites. The gamma shape parameter was estimated directly from the data. Reliability for internal branch was assessed using the bootstrapping method (100 bootstrap replicates). Graphical representation and edition of the phylogenetic trees were performed with TreeDyn v198.3 (Chevenet et al. 2006).

Results and discussion

Structure and distribution of HKs in Saccharomycotina

To acquire an overall vision of the structure and distribution of HKs in Saccharomycotina, we browsed the genome of 82 yeast species for which the sequence is available

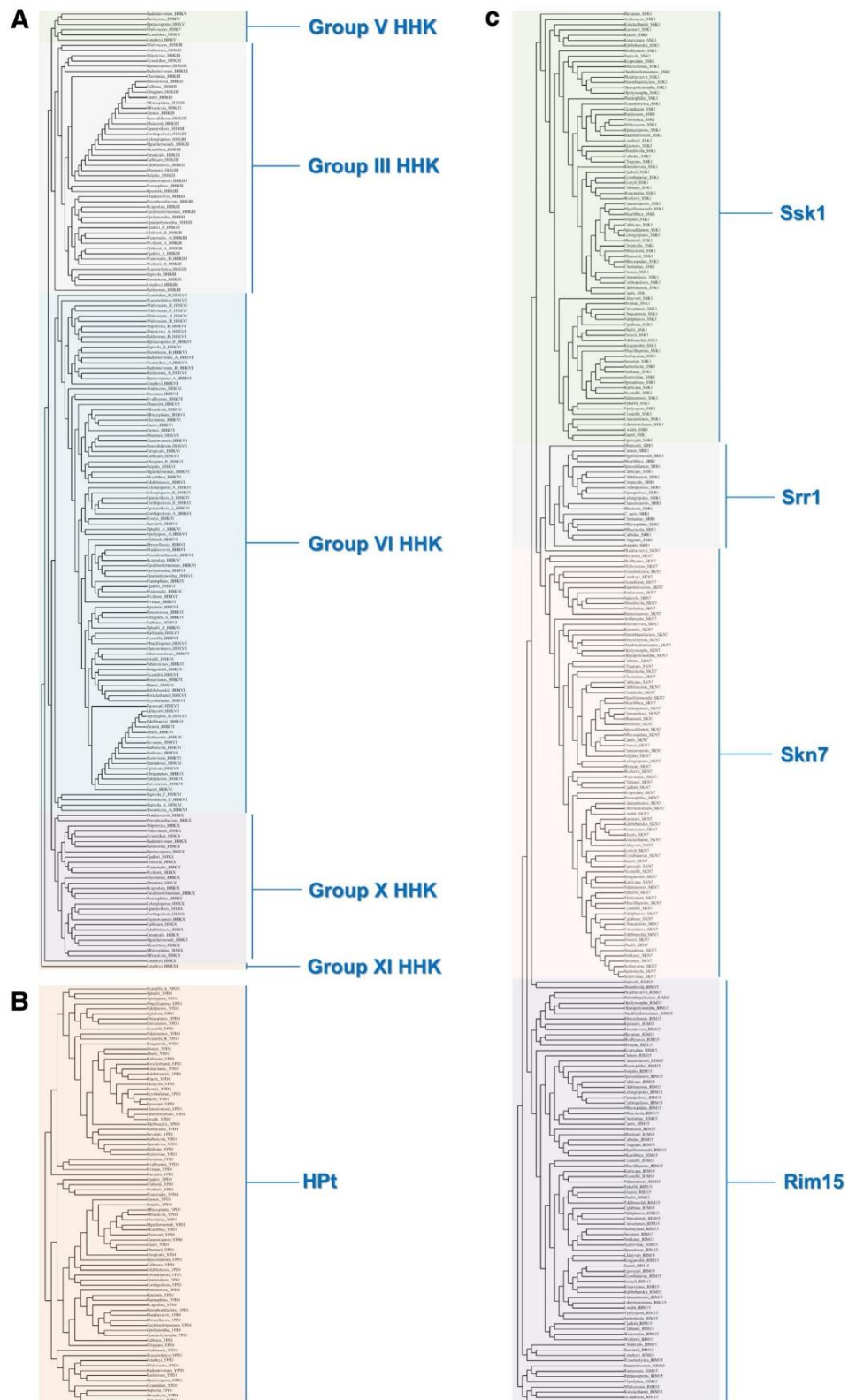


Fig. 2 Phylogeny estimation of TCS-predicted protein sequences. Methods used to carry out this phylogenetic analysis are provided in “Materials and methods”. **a** Hybrid histidine kinases. **b** Histidine-containing phosphotransfer proteins. **c** Response regulators. Predicted HHK sequences were categorized following sequence analysis of both HisKA signatures and N-terminal-sensing domains according to the previous classifications (Catlett et al. 2003; Lavin et al. 2010; Defosse et al. 2015)

(supplemental Table S1) (Hittinger et al. 2015; Riley et al. 2016; Dujon and Louis 2017). This allowed the compilation of 184 predicted proteins (accession numbers are provided in supplemental Table S2) displaying the canonical structure of fungal HKs: (1) a variable N-terminal region, referred to as the “sensing domain”, which displays a combination of motifs responsible for the perception properties of the HK; (2) an Histidine Kinase A domain (HisKA); (3) an Histidine Kinase ATPase catalytic domain (HATPase_c); and (4) a C-terminal Receiver domain (REC) (Fig. 1). Importantly, because HisKA/HATPase_c domains are fused to the REC domain, fungal HKs are generically defined as hybrid HKs (HHKs, used hereafter) (Catlett et al. 2003). A phylogenetic analysis depicted in Fig. 2a, together with direct comparison of HisKA H-box signatures (including the phosphorylatable histidine, Fig. 3) and protein domain arrangement (Fig. 1) (Catlett et al. 2003), has enabled to categorize these yeast HHKs into 5 out of the 11 groups currently described in Ascomycota (Catlett et al. 2003) (Fig. 1). The global distribution of these HHK groups within Saccharomycotina is provided in Fig. 4.

All selected species harbor one to four representative members of group VI fungal HHKs (Fig. 4), which are usually referred to as Sln1 proteins in yeasts (Ota and Varshavsky 1993). The canonical N terminus of these transmembrane proteins (Lu et al. 2003) includes two hydrophobic helices that border an extracellular loop predicted to mainly fold into large helices and small sheets, as found in plant AHK1-related HHKs (Papon et al. 2006) (Fig. 1). The integrity of this periplasmic extracellular loop region of Sln1 proteins was reported to be essential for its sensor function in *S. cerevisiae* (Reiser et al. 2003). In addition, most of the group VI HHKs in Saccharomycotina harbor a predicted HAMP domain (abbreviation of histidine kinase, adenylyl cyclase, methyl-accepting protein, phosphatase; Aravind and Ponting 1999) close to the central HisKA domain which is predicted to form a dimeric four-helical coiled coil and is crucial for the propagation of input signals to downstream domains (Ferris et al. 2011; Gushchin et al. 2017). The HHK group VI was initially characterized in *S. cerevisiae* and was shown to act as a primary transmembrane osmosensor by governing the high-osmolarity glycerol (HOG) mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway through Ypd1 (HPt) and Ssk1 (RR) (Ota and Varshavsky 1993; Maeda et al. 1994). This group of HHKs was also

demonstrated to regulate osmotic adaptation, yeast to hyphae morphogenetic switch, and virulence in *Candida albicans* (Yamada-Okabe et al. 1999). Interestingly, we noted that among the four representative members of group VI HHKs identified in *Nadsonia fulvescens* (copies A, B, C, and D of *Nfulvescens_HHKVI*) (Fig. 3), two (copies A and B) lack the phosphorylatable histidine residue within the HisKA H-box indicating that these proteins are not functional. In this basal species, it is thus highly likely that osmosensing is mediated through the perception and autophosphorylation of the two other copies (copies C and D displaying the conserved histidine).

Group III fungal HHKs, usually referred to as Nik1 proteins in yeasts (Nagahashi et al. 1998), were also identified in Saccharomycotina but appeared to be absent in Saccharomycetaceae (encompassing post-WGD, ZT and KLE clades) and Saccharomycodaceae (*Hanseniaspora* sp.) (Fig. 4). The N-terminal region of these nucleocytoplasmic proteins (Meena et al. 2010; Foureau et al. 2014) includes five HAMP domain repeats (Catlett et al. 2003) (Fig. 1) essential for the HisKA activity (Meena et al. 2010; Furukuwa et al. 2012; Randhawa and Mondal 2013). Group III fungal HHKs were shown to regulate growth under hyperosmotic conditions in a large series of fungal species. For this reason, they are currently considered as secondary osmosensors branched to the HOG pathway through Ypd1 and Ssk1 (along with the group VI HHKs). These sensing proteins were also involved in oxidant condition adaptation, antifungal susceptibility, cell wall integrity, morphogenesis, and virulence (Li et al. 2010; Defosse et al. 2015). It is noteworthy that two members of group III fungal HHKs are observed in some Wickerhamomycetaceae (*Cyberlindnera* sp. and *Wickerhamomyces* sp.) and this trait seems to be unique to this family (Fig. 4). The phylogenetic analysis provided in Fig. 2a clearly indicates that these two copies have emerged from a recent duplication event that has likely occurred in a common ancestor in Wickerhamomycetaceae.

Group X fungal HHKs, which are referred to as Chk1 proteins in yeast (Calera and Calderone 1999), were detected in Wickerhamomycetaceae, methylotrophs, the CTG clade and basal lineages but not within all representative species (Fig. 4). Group X fungal HHKs are large nucleocytoplasmic proteins (Foureau et al. 2014) (more than 2000 amino acids) with a canonical N terminus that includes a domain related to serine/threonine kinase-related domain and a GAF domain (abbreviation of cGMP-phosphodiesterase, adenylyl cyclase, FhIA; Aravind and Ponting 1997; Catlett et al. 2003) (Fig. 1). The group X fungal HHKs were extensively studied, particularly Chk1 in *C. albicans*, for which a crucial role in virulence, morphogenesis, quorum sensing, oxidative stress adaptation, cell wall composition, biofilm formation, and antifungal susceptibility has been established (Li et al. 2010). However, recent advances clearly demonstrated that

Fig. 3 Alignment of the H-box sequence of HHK-predicted sequences. Subalignments of the H-box region from the sequence alignment used for Fig. 2 are shown. For each HHK group, the reference sequence of *Fusarium verticillioides* is provided (Catlett et al. 2003). Asterisks indicate positions of conserved phosphorylatable histidine residues. The amino acid sequence alignment was formatted with the JALVIEW program

Group VI HHK

*

Sequence alignment for Group VI HHK. The reference sequence is *F. verticillioides* (FLANVSHSELKPLNGV). Conserved phosphorylatable histidine residues are indicated by asterisks above the sequence. The alignment includes numerous species from the Ascomycota phylum.

REFERENCE (F. verticillioides) F L A N V S H E L K P L N G V

Group XI HHK

*

Sequence alignment for Group XI HHK. The reference sequence is *F. verticillioides* (FLDMSHEMRNPLSAI). Conserved phosphorylatable histidine residues are indicated by asterisks above the sequence.

REFERENCE (F. verticillioides) F L D M S H E M R N P L S A I

Group X HHK

*

Sequence alignment for Group X HHK. The reference sequence is *F. verticillioides* (FLANMSHERTPFNLS). Conserved phosphorylatable histidine residues are indicated by asterisks above the sequence.

REFERENCE (F. verticillioides) F L A N M S H E R T P F N L S

Group III HHK

*

Sequence alignment for Group III HHK. The reference sequence is *F. verticillioides* (FLGIFSHELRTPFMGI). Conserved phosphorylatable histidine residues are indicated by asterisks above the sequence.

REFERENCE (F. verticillioides) F L G I F S H E L R T P F M G I

Group V HHK

*

Sequence alignment for Group V HHK. The reference sequence is *F. verticillioides* (FLSNMSHERTPLEIGI). Conserved phosphorylatable histidine residues are indicated by asterisks above the sequence.

REFERENCE (F. verticillioides) F L S N M S H E R T P L E I G I

the functions of group X fungal HHKs are not conserved within Saccharomycotina species, even closely related (Chapeland-Leclerc et al. 2007; Navarro-Arias et al. 2017). The sporadic distribution of group X fungal HHKs tends to suggest that an archetypal group X fungal HHK gene was likely present in a common ancestor of Saccharomycotina and that gene loss events have certainly occurred during the evolution of budding yeasts.

Surprisingly, we identified in some yeast species several members of fungal HHK groups that were not previously observed in Saccharomycotina. This includes first the group V fungal HHKs which was found in some basal species encompassing *N. fulvescens*, *Blastobotrys* sp., *Geotrichum candidum*, and *Lipomyces starkeyi* (Figs. 1, 4). These large HHKs (roughly 2000 amino acids) display an N-terminal region that includes a couple of PAS/PAC domains (abbreviation of Per—period circadian protein; Arnt—Ah receptor nuclear translocator protein; Sim—single-minded protein, Möglich et al. 2009) (Catlett et al. 2003). Group V fungal HHKs have been only described in filamentous Ascomycota and some early diverging fungal lineages (Mortierellomycotina and Mucoromycotina) (Corrochano et al. 2016; Hérivaux et al. 2017) and their function remains largely unclear. The unique available data concern the group V fungal HHK mutant in *Magnaporthe oryzae* which displayed reduced vegetative growth, lack of conidiation, cell wall instability, stress hyper-susceptibility, and abolished virulence (Jacob et al. 2014). The distribution of group V fungal HHKs in Saccharomycotina suggests that a corresponding gene was present in ancestors of basal species and that gene loss events occurred during the evolution of yeasts as suggested for group X HHKs.

Finally, we identified a unique member of group XI fungal HHKs in *L. starkeyi* (Fig. 4). This is surprising because the presence of group XI fungal HHKs was previously believed to be restricted to filamentous Ascomycota, particularly plant pathogenic molds (Catlett et al. 2003). To date, group XI HHKs have only been studied in *M. oryzae* which exhibits three members of this group (MoHik4, MoHik8 and MoHik9). Only MoHik4 and MoHik8 were found essential for virulence, vegetative growth, conidiation, and stress tolerance (Jacob et al. 2014).

Structure and distribution of HPts and RRs in Saccharomycotina

To gain insight into the structure and distribution of downstream TCS modules in Saccharomycotina, we browsed the genome of the same set of 82 yeast species to identify predicted proteins with HPT or REC domains. A phylogenetic analysis depicted in Fig. 2b, c enabled to categorize these yeast TCS elements into five groups previously described in the kingdom Fungi (Defosse et al. 2015) (Fig. 1). The global

distribution of these predicted proteins within Saccharomycotina is provided in Fig. 4.

All genomes encode a single predicted protein harboring an HPT domain (Fassler and West 2013), except *Naumovozyma castellii* that displays an additional paralog (accession numbers are combined in supplemental Table S3) (Fig. 4). All these predicted HPT proteins display the conserved histidine residue indispensable to their functionality (supplemental Figure S1). In yeasts, the corresponding signaling module is referred to as Ypd1 (Posas et al. 1996). This protein is known to mediate the phosphotransfer from the group VI fungal HHKs to Ssk1 or Skn7 RRs (Posas et al. 1996; Li et al. 1998). The initial contention that HPT proteins are essential in fungi has to be revised since recent works demonstrated the viability of the corresponding mutants (Mavrianos et al. 2014; Day et al. 2017). Ypd1 was also recently shown to be the target of the phosphatase activity of group III fungal HHKs (Lawry et al. 2017).

BLAST searches for soluble proteins harboring a REC domain (i.e., RRs) allowed the identification of 265 predicted proteins (accession numbers are combined in supplemental Table S3) and the phylogenetic analysis provided in Fig. 2 enabled to categorize them into four groups: Ssk1, Skn7, Rim15 and Srr1 (Figs. 1, 4).

All studied species display not only a single Ssk1 member which is described to be predominantly involved in osmoregulation in yeasts (Hohmann et al. 2007) but also a Skn7 homolog which is above all known to govern the response towards oxidant conditions (Pais et al. 2016) (Fig. 4). It is noteworthy that some basal species (*B. adenivorans*, *B. petasosporus*, *G. candidum*, and *Yarrowia lipolytica*) display a Skn7 protein lacking the phosphorylatable aspartate (supplemental Figure S1) known to be targeted by the HPT protein in *S. cerevisiae* (He et al. 2009). With the exception of that of *Ascoidea rubescens*, all the browsed genomes displayed a single copy of the gene encoding the Rim15 protein, a master regulator of the response towards nutrient starvation (Zhang and Cao 2017) (Fig. 4). Finally, as previously suggested, this study confirms that an additional RR protein, referred to as Srr1 (Mavrianos et al. 2013), is unique to the fungal CTG clade (and the closely related species from the *Cephaloscybus* genus) (Fig. 4). Whereas Ssk1 and Rim15 are considered as nucleocytoplasmic proteins and Skn7 as a nuclear protein (Lu et al. 2003; Wanke et al. 2005), the Srr1 protein, which participates in stress adaptation, morphogenesis, and virulence in *C. albicans*, was demonstrated to be localized in the mitochondria (Mavrianos et al. 2013). Srr1 proteins were previously shown to cluster more closely with RRs found in marine bacteria than with other yeast TCS modules, raising the question of a prokaryotic origin of Srr1 (Mavrianos et al. 2013). These findings thus suggested the possibility that chloroplasts and mitochondria were responsible for the acquisition of TCSs by eukaryotes.



Fig. 4 Distribution of two-component system modules within 82 Saccharomycotina species. HHKs, HPts and RRs were categorized into their respective groups according to previous classifications (Catlett et al. 2003; Lavin et al. 2010; Defosse et al. 2015). When superior to one, the number of genes encoding members of a same HHK group is indicated by asterisks. The topologies resemble the current understanding of the relationships of the Saccharomycotina clades according to Hittinger et al. (2015) and Dujon and Louis (2017). WGD, whole-genome duplication; ZT, *Zygosaccharomyces/Torulasp* ora clade; KLE, *Kluyveromyces/Lachanceal/Ermothecium* clade; Sa, Saccharomycodaceae; Wi, Wickerhamomycetaceae

Conclusion

To date, only three out of the eleven fungal HHK groups currently known in Ascomycota have been described in Saccharomycotina including groups VI, III, and X in a fistful of species (Li et al. 2010; Defosse et al. 2015; Rodríguez-González et al. 2017). In the present study, we identified new putative proteins related to several fungal HHK groups that were not previously observed within the budding yeast clade. These include group V and XI HHKs which were initially considered to be restricted to filamentous Ascomycota (Pezizomycotina, Fig. 5) (Catlett et al. 2003; Defosse et al. 2015).

Analysis of the distribution of TCS modules in the Saccharomycotina thus allows to draw some fairly reliable conclusions concerning the evolution of these signaling pathways in yeasts: (1) with the exception of the emergence of

an additional RR (named Srr1) in the fungal CTG clade, TCS modules Ypd1, Ssk1, Skn7, Rim15 are well conserved within the Saccharomycotina; (2) some basal species, especially *L. starkeyi*, harbor several filamentous-type HHKs that appear as relict genes that have been retained from a common ancestor of Saccharomycotina; (3) a progressive loss of the initial pool of HHK-encoding genes during Saccharomycotina yeast evolution is observed.

Overall, our results are in accordance with the current theory stating that Saccharomycotina yeasts have evolved from their fungal ancestors primarily following loss of gene function events associated with an increasing specialization (Dujon and Louis 2017). In addition, our observations clearly illustrate the recently described phenomenon of “specifically retained ancestral genes” (SRAG) that has occurred in some basal yeasts (Morel et al. 2015), likely contributing to the phenotypic specificity of these particular species (e.g., *G. candidum* and *L. starkeyi*). Although some data are available regarding the function of group III, VI and X fungal HHKs in prominent yeast models (*S. cerevisiae* and *Candida* sp.) (Li et al. 2010; Gregori et al. 2007; Chapeland-Leclerc et al. 2007; Navarro-Arias et al. 2017), nothing is known about the newly identified group V and XI HHKs in basal Saccharomycotina and functional genomic approaches should be developed to decipher the role of these proteins.

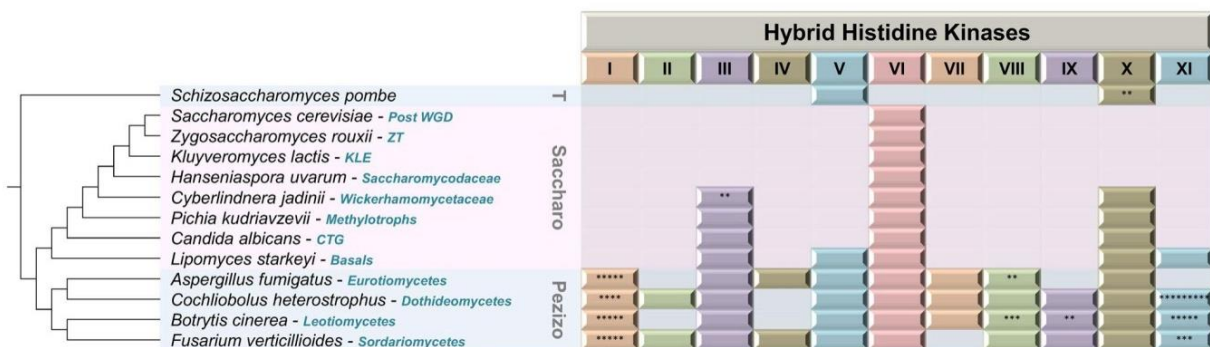


Fig. 5 Distribution of HHKs within representative Saccharomycotina yeasts and other Ascomycota model species. HHKs were categorized into their respective groups according to previous classifications (Catlett et al. 2003; Defosse et al. 2015). When superior to one, the number of gene-encoding members of a same HHK group is indicated by asterisks. The topologies resemble the current understanding

of the relationships of the Ascomycota clades according to Hittinger et al. (2015) and Butler (2010). WGD, whole-genome duplication; ZT, *Zygosaccharomyces/Torulasp* ora clade; KLE, *Kluyveromyces/Lachanceal/Ermothecium* clade; T, Taphrinomycotina; Sa, Saccharomycotina; Pezizo, Pezizomycotina

Acknowledgements We acknowledge Pr. J-P Latgé and Pr. B. Dujon (Institut Pasteur, Paris, France) for fruitful discussions and critical reading of this manuscript. We would like to thank the Department of Energy Joint Genome Institute for making available a large series of yeast genomes and also J. Spatafora, J. Magnuson and D. Cullen as PIs of the MycoCosm program for allowing the use of sequences of *Cephaloscyus albidus*, *Cephaloscyus fragrans*, *Blastobotrys (Sympodiomyces) attinorum*, and *Blastobotrys (Trichomonascus) petasosporus*. J.L.L. thanks MINECO for the Severo Ochoa Excellence Accreditation (SEV-2016-0644). J.A.O. is supported by research project AGL2011-55971-R of the Spanish National Research Plan and by additional institutional support from the Public University of Navarre.

Author contributions AH, TDD and PV compiled all sequences. JLL and JAO performed phylogenetic analyses. AG and NP conceived and managed the project. NP and JPB wrote the manuscript.

References

- Anisimova M, Gascuel O (2006) Approximate likelihood-ratio test for branches: a fast, accurate, and powerful alternative. *Syst Biol* 55:539–552
- Aravind L, Ponting CP (1997) The GAF domain: an evolutionary link between diverse phototransducing proteins. *Trends Biochem Sci* 2:458–459
- Aravind L, Ponting CP (1999) The cytoplasmic helical linker domain of receptor histidine kinase and methyl-accepting proteins is common to many prokaryotic signalling proteins. *FEMS Microbiol Lett* 176:111–116
- Bem AE et al (2015) Bacterial histidine kinases as novel antibacterial drug targets. *ACS Chem Biol* 10:213–224
- Benanti JA (2016) Create, activate, destroy, repeat: Cdk1 controls proliferation by limiting transcription factor activity. *Curr Genet* 62(2):271–276
- Butler G (2010) Fungal sex and pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* 23(1):140–159
- Calera JA, Calderone R (1999) Histidine kinase, two-component signal transduction proteins of *Candida albicans* and the pathogenesis of candidosis. *Mycoses* 42(Suppl 2):49–53
- Castresana J (2000) Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Mol Biol Evol* 17:540–552
- Catlett NL, Yoder OC, Turgeon BG (2003) Whole-genome analysis of two-component signal transduction genes in fungal pathogens. *Eukaryot Cell* 2:1151–1161
- Chapelard-Leclerc F et al (2007) Differential involvement of histidine kinase receptors in pseudohyphal development, stress adaptation, and drug sensitivity of the opportunistic yeast *Candida lusitanae*. *Eukaryot Cell* 6:1782–1794
- Chevenet F, Brun C, Bañuls AL, Jacq B, Christen R (2006) TreeDyn: towards dynamic graphics and annotations for analyses of trees. *BMC Bioinform* 7:439
- Corrochano LM et al (2016) Expansion of signal transduction pathways in fungi by extensive genome duplication. *Current Biol* 26:1577–1584
- Day AM et al (2017) Blocking two-component signalling enhances *Candida albicans* virulence and reveals adaptive mechanisms that counteract sustained SAPK activation. *PLoS Pathog* 13:e1006131
- Defosse TA et al (2015) Hybrid histidine kinases in pathogenic fungi. *Mol Microbiol* 95:914–924
- Dereeper A et al (2008) Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Res* 36:W465–W469
- Derouiche A, Shi L, Kalantari A, Mijakovic I (2016) Evolution and tinkering: what do a protein kinase, a transcriptional regulator and chromosome segregation/cell division proteins have in common? *Curr Genet* 62(1):67–70
- Dujon BA, Louis EJ. (2017) Genome diversity and evolution in the budding yeasts (Saccharomycotina). *Genetics*. 206:717–750
- Edgar RC (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 32:1792–1797
- Fassler JS, West AH (2013) Histidine phosphotransfer proteins in fungal two-component signal transduction pathways. *Eukaryot Cell* 12:1052–1060
- Ferris HU et al (2011) The mechanisms of HAMP-mediated signaling in transmembrane receptors. *Structure* 19:378–385
- Finn RD et al (2014) Pfam: the protein families database. *Nucleic Acids Res* 42(Database issue):D222–D230
- Foureau E et al (2014) Subcellular localization of the histidine kinase receptors Sln1p, Nik1p and Chk1p in the yeast CTG clade species *Candida guilliermondii*. *Fungal Genet Biol* 65:25–36
- Furukawa K, Randhawa K, Kaur H, Mondal AK, Hohmann S (2012) Fungal fludioxonil sensitivity is diminished by a constitutively active form of the group III histidine kinase. *FEBS Lett* 586:2417–2422
- Gregori C et al (2007) The high-osmolarity glycerol response pathway in the human fungal pathogen *Candida glabrata* strain ATCC 2001 lacks a signaling branch that operates in baker's yeast. *Eukaryot Cell* 6:1635–1645
- Guindon S, Gascuel O (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* 52:696–704
- Gushchin I et al (2017) Mechanism of transmembrane signaling by sensor histidine kinases. *Science* 356(6342):eaah6345
- He XJ, Mulford KE, Fassler JS (2009) Oxidative stress function of the *Saccharomyces cerevisiae* Skn7 receiver domain. *Eukaryot Cell* 8(5):768–778
- Hérivaux A et al (2016) Major sensing proteins in pathogenic fungi: the hybrid histidine kinase family. *PLoS Pathog* 12:e1005683
- Hérivaux A et al (2017) The identification of phytohormone receptor homologs in early diverging fungi suggests a role for plant sensing in land colonization by fungi. *MBio*. 8(1):e01739–e01716
- Hittinger CT et al (2015) Genomics and the making of yeast biodiversity. *Curr Opin Genet Dev* 35:100–109
- Hohmann S, Krantz M, Nordlander B (2007) Yeast osmoregulation. *Methods Enzymol* 428:29–45
- Jacob S, Foster AJ, Yemelin A, Thines E. 2014. Histidine kinases mediate differentiation, stress response, and pathogenicity in *Magnaporthe oryzae*. *Microbiologyopen* 3:668–687
- Lavín JL, Ramírez L, Ussery DW, Pisabarro AG, Oguiza JA (2010) Genomic analysis of two-component signal transduction proteins in Basidiomycetes. *J Mol Microbiol Biotechnol* 18:63–73
- Lawry SM et al (2017) Fludioxonil induces Drk1, a fungal group III Hybrid Histidine Kinase, to dephosphorylate its downstream target, Ypd1. *Antimicrob Agents Chemother* 61(2):e01414–e01416
- Li S et al (1998) The yeast histidine protein kinase, Sln1p, mediates phosphotransfer to two response regulators, Ssk1p and Skn7p. *EMBO J* 17:6952–6962
- Li D, Agrellos OA, Calderone R (2010) Histidine kinases keep fungi safe and vigorous. *Curr Opin Microbiol* 13:424–430
- Lu JM, Deschenes RJ, Fassler JS (2003) *Saccharomyces cerevisiae* histidine phosphotransferase Ypd1p shuttles between the nucleus and cytoplasm for SLN1-dependent phosphorylation of Ssk1p and Skn7p. *Eukaryot Cell* 2:1304–1314
- Maeda T, Wurgler-Murphy SM, Saito H (1994) A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature* 369(6477):242–245
- Mavrianos J et al (2013) Mitochondrial two-component signaling systems in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* 12:913–922

- Mavrianos J, Desai C, Chauhan N (2014) Two-component histidine phosphotransfer protein Ypd1 is not essential for viability in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* 13:452–460
- Meena N, Kaur H, Mondal AK (2010) Interactions among HAMP repeats act as an osmosensing molecular switch in a group III hybrid histidine kinase. *J Biol Chem* 285:12121–12132
- Möglich A, Ayers RA, Moffat K (2009) Structure and signaling mechanism of Per-ARNT-Sim domains. *Structure* 17:1282–1294
- Morel G et al (2015) Differential gene retention as an evolutionary mechanism to generate biodiversity and adaptation in yeasts. *Sci Rep* 5:11571
- Nagahashi S et al (1998) Isolation of CaSLN1 and CaNIK1, the genes for osmosensing histidine kinase homologues, from the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Microbiology* 144:425–432
- Navarro-Arias MJ et al (2017) Group X hybrid histidine kinase Chk1 is dispensable for stress adaptation, host-pathogen interactions and virulence in the opportunistic yeast *Candida guilliermondii*. *Res Microbiol*
- Ota IM, Varshavsky A (1993) A yeast protein similar to bacterial two-component regulators. *Science* 262(5133):566–569
- Pais P, Costa C, Cavalheiro M, Romão D, Teixeira MC (2016) Transcriptional control of drug resistance, virulence and immune system evasion in pathogenic fungi: a cross-species comparison. *Front Cell Infect Microbiol* 6:131
- Papon N et al (2006) Molecular cloning and expression of a cDNA encoding a hybrid histidine kinase receptor in tropical periwinkle *Catharanthus roseus*. *Plant Biol (Stuttg)* 8:731–736
- Papon N, Courdavault V, Clastre M (2014) Biotechnological potential of the fungal CTG clade species in the synthetic biology era. *Trends Biotechnol* 32:167–168
- Posas F et al (1996) Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 “two-component” osmosensor. *Cell* 86:865–875
- Randhawa A, Mondal AK (2013) The sixth HAMP domain negatively regulates the activity of the group III HHK containing seven HAMP domains. *Biochem Biophys Res Commun* 438:140–144
- Reiser V, Raitt DC, Saito H (2003) Yeast osmosensor Sln1 and plant cytokinin receptor Cre1 respond to changes in turgor pressure. *J Cell Biol* 161:1035–1040
- Riley R et al (2016) Comparative genomics of biotechnologically important yeasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 113:9882–9887
- Rodríguez-González M et al (2017) Role of the Sln1-phosphorelay pathway in the response to hyperosmotic stress in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Mol Microbiol* 104:822–836
- Salas-Delgado G, Ongay-Larios L, Kawasaki-Watanabe L, López-Villaseñor I, Coria R (2017) The yeasts phosphorelay systems: a comparative view. *World J Microbiol Biotechnol* 33:111
- Shor E, Chauhan N (2015) A case for two-component signaling systems as antifungal drug targets. *PLoS Pathog* 11(2):e1004632
- Wanke V, Pedruzzi I, Camerini E, Dubouloz F, De Virgilio C (2005) Regulation of G0 entry by the Pho80–Pho85 cyclin-CDK complex. *EMBO J* 24:4271–4278
- Yamada-Okabe T et al (1999) Roles of three histidine kinase genes in hyphal development and virulence of the pathogenic fungus *Candida albicans*. *J Bacteriol* 181:7243–7247
- Zhang N, Cao L (2017) Starvation signals in yeast are integrated to coordinate metabolic reprogramming and stress response to ensure longevity. *Curr Genet*. <https://doi.org/10.1007/s00294-017-0697-4>

4. Structure et distribution des histidines kinases chez les eucaryotes

Forts de l'expérience des trois précédents articles, nous nous sommes enfin engagés dans une dernière étude bio-informatique bien plus conséquente : la première description et analyse globale des protéines HKs au sein du domaine des eucaryotes. De manière rationnelle, la lourdeur de la tâche nous a amené à recruter une étudiante de Master 2 recherche « Infectiologie et Bio-informatique » de l'Université libanaise, Samar Kabbara. Cette étude a ainsi été initiée à travers l'encadrement de ce stage. Cependant, l'étude complète a nécessité plus de 18 mois d'analyses bio-informatiques, fédérant plus d'une demi-douzaine de collaborateurs. Ce travail est actuellement en révision mineure dans la revue *Genome Biology and Evolution*.

4.1. Résumé

La structure et la distribution des protéines HKs sont aujourd'hui bien documentées chez les procaryotes, mais ces informations sont encore plus que fragmentaires pour ce qui concerne les eucaryotes. Dans cette étude, nous avons tiré profit des ressources génomiques récentes pour explorer la diversité structurelle et la distribution phylogénétique des HKs à travers l'ensemble des super-groupes eucaryotes. Des recherches sur les génomes de 67 espèces eucaryotes réparties uniformément dans l'arbre du vivant ont permis de prédire la séquence de 748 HKs. Des analyses phylogénétiques de ces protéines ont été effectuées de manière indépendante pour chacun des principaux super-groupes eucaryotes. Si cette étude a permis à la plupart des séquences compilées d'être catégorisées en groupes d'HKs précédemment décrits, elle a également pu révéler de nouvelles données intéressantes : i) la caractérisation de certains groupes HKs eucaryotes non décrits précédemment avec des fonctions prédictives supposées liées à des traits physiologiques des espèces dans lesquelles ils sont retrouvés, ii) la découverte de groupes d'HKs que l'on pensait auparavant limités à un seul clade dans des super-groupes supplémentaires et iii) des indications que certaines voies évolutives ont conduit à l'apparition, au transfert, à la duplication et à la perte de gènes HKs dans certains phylla. Cette étude fournit un aperçu sans précédent de la structure et de la distribution des HKs chez les eucaryotes et représente une première étape vers la compréhension des mécanismes qui sous-tendent l'évolution des voies de signalisation cellulaire chez les organismes eucaryotes.

4.2. Article

DIVERSITY AND EVOLUTION OF SENSOR HISTIDINE KINASES IN EUKARYOTES

Samar Kabbara^{1,†}, Anaïs Hérivaux^{1,†}, Thomas Dugé de Bernonville², Vincent Courdavault², Marc Clastre², Amandine Gastebois¹, Marwan Osman³, Monzer Hamze³, J. Mark Cock⁴, Pauline Schaap⁵, Nicolas Papon^{1*}

¹Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène, GEIHP, EA3142, UNIV Angers, SFR 4208 ICAT, Angers, France

²Biomolécules et Biotechnologies Végétales, BBV, EA2106, Université François Rabelais de Tours, Tours, France

³Laboratoire Microbiologie Santé et Environnement, Faculté de Santé Publique, Université Libanaise, Tripoli, Lebanon

⁴Algal Genetics Group, UMR 8227, Integrative Biology of Marine Models, Station Biologique de Roscoff, Sorbonne Université, UPMC Université Paris 06, CNRS, Roscoff, France.

⁵Cell and Development Biology, School of Life Sciences, University of Dundee, Dow Street, Dundee, United Kingdom

† These authors contributed equally to this work

Running title: **Eukaryotic histidine kinases**

Abstract: **249 words**

Core text: **9317 words**

Number of figures: **8**

Number of tables: **1**

Supplemental files: **Table S1; Figures S1-S5**

*Author for correspondence:

Nicolas Papon

Tel: +33 244688363

Email: nicolas.papon@univ-angers.fr

ABSTRACT

Histidine kinases (HKs) are primary sensor proteins that act in cell signaling pathways generically referred to as “two component systems” (TCSs). TCSs are among the most widely distributed transduction systems used by both prokaryotic and eukaryotic organisms to detect and respond to a broad range of environmental cues. The structure and distribution of HK proteins are now well documented in prokaryotes but information is still fragmentary for eukaryotes. Here, we have taken advantage of recent genomic resources to explore the structural diversity and the phylogenetic distribution of HKs in the prominent eukaryotic supergroups. Searches of the genomes of 67 eukaryotic species spread evenly throughout the phylogenetic tree of life identified 748 predicted HK proteins. Independent phylogenetic analyses of predicted HK proteins were carried out for each of the major eukaryotic supergroups. This allowed most of the compiled sequences to be categorised into previously described HK groups. Beyond the phylogenetic analysis of eukaryotic HKs, this study revealed some interesting findings: (i) characterisation of some previously undescribed eukaryotic HK groups with predicted functions putatively related to physiological traits; (ii) discovery of HK groups that were previously believed to be restricted to a single kingdom in additional supergroups and (iii) indications that some evolutionary paths have led to the appearance, transfer, duplication, and loss of HK genes in some phylogenetic lineages. This study provides an unprecedented overview of the structure and distribution of HKs in the Eukaryota and represents a first step towards deciphering the evolution of TCS signaling in living organisms.

KEY WORDS

Histidine kinases, cell signaling, two component systems, eukaryotes, phylogenetic analysis

INTRODUCTION

Protein phosphorylation is one of the most widespread processes in living organisms, and is commonly used to regulate numerous cell signaling pathways. Protein phosphorylation is mediated by enzymes belonging to the kinase superfamily. Kinases catalyze the transfer of a phosphate from ATP to various amino acids including serine/threonine (Ser/Thr kinases), tyrosine (Tyr kinases) and histidine (His kinases). To date, histidine kinases (HKs) have been described in archaea, bacteria, amoebae, plants, fungi, viruses, and bacteriophages (Delaroque *et al.* 2001; Mascher *et al.* 2006; Osakabe *et al.* 2013; Hargreaves *et al.* 2014; Hérivaux *et al.* 2016; Schaap *et al.* 2016; Galperin *et al.* 2018). HK activity has also been detected in mammals (Attwood 2013) but mammalian genomes do not encode any typical bacterial or eukaryotic HK-like proteins. Consequently, approaches aiming at pharmacologically targeting HK proteins represent a promising strategy for the future development of antimicrobials in the context of human disease (Bem *et al.* 2015; Shor *et al.* 2015).

The canonical structure of HKs is composed of various domains (Figure 1). The first region corresponds to a highly variable N-terminal sequence that determines which stimulus is perceived by the HK. This region is referred to as the “sensing domain”. The central region is the transmitter domain consisting of both histidine kinase A (dimerization/phosphoacceptor) (HisKA) and cognate histidine kinase-like ATPase catalytic (HATPase_c) subdomains. The HisKA domain includes a H-box, usually containing a phosphorylatable histidine, and an X-box. The HATPase_c subdomain includes four distinct boxes: the N-, G1-, F-, and G2-boxes (Grebe and Stock 1999). In contrast to prokaryotic HKs, most eukaryotic HKs harbor an additional C-terminal receiver domain (REC) characterized by the presence of a three amino-acid signature (DDK) that includes a phosphorylatable aspartate residue. Thus, eukaryotic HKs are generally called hybrid HKs (Appleby *et al.* 1996).

HKs are primary sensor proteins involved in cell signaling pathways generically referred to as “two component systems” (TCSs) (Figure 1). TCSs are among the most widely distributed transduction systems used by both prokaryotic and eukaryotic organisms to detect and respond to a wide range of environmental cues. In prokaryotes, TCSs usually involve communication between two functional modules, *i.e.* HKs and response regulators (RRs), via phosphorylation events (Figure 1). The perception of a stimulus induces autophosphorylation of the HK, and the phosphate is then transferred to a RR which acts as a transcription factor to directly regulate a series of target genes required for an adapted response (Appleby *et al.* 1996). In eukaryotes, TCSs are composed of additional modules, such as the histidine-containing phosphotransfer (Hpt) domain and the signaling routes that mediate the perception of stimuli involve a multi-step phosphorelay between three families of proteins: HK → Hpt → RR (Figure 1). In most eukaryotic TCSs, the RR either acts directly as a transcription factor or regulates downstream elements such as mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascades or cyclic adenosine monophosphate (cAMP) signaling systems (Hérivaux *et al.* 2016). In plants, some HKs are known to directly regulate other types of signaling proteins such as Raf-like kinases (Clark *et al.* 1998). Finally, few other variations in the architecture of TCSs have been described in some models (Jung *et al.* 2012).

It is now well documented that prokaryotic HKs govern a wide range of crucial processes including nutrient acquisition, various metabolic pathways (nitrogen, glucose, cell wall biosynthesis), adaptation to changes in the environment (osmolarity, light, chemotaxis, temperature, oxygen), developmental pathways (sporulation, biofilm formation, competence), virulence, antibiotic resistance, and many others (e.g. flagellar assembly, secretion systems) (Mascher *et al.* 2006). In amoebae, HKs regulate a large panel of fundamental processes during multicellular development such as motility, morphogenesis, osmoregulation, as well as spore differentiation, encapsulation and dormancy (Du *et al.* 2015). In plants, HKs participate in the regulation of female gametophyte development and vegetative growth, as osmosensors by regulating drought, salt-stress and stomatal closure responses and are involved in light and phytohormones (cytokinin and ethylene) perception and signal transduction (Osakabe *et al.* 2013). Finally, HKs are also widespread in fungi and to date, have been reported to be involved in stress adaptation (high osmolarity and oxidant conditions), red-light perception, morphogenesis, and virulence (Hérivaux *et al.* 2016).

While the structure and distribution of these sensing proteins are now well documented in prokaryotes (Kim and Forst 2001; Mascher *et al.* 2006; Galperin *et al.* 2018), information is still fragmentary for eukaryotes. Plant and fungal HKs are currently categorized into 7 and 16 groups, respectively (Schaller *et al.* 2008; Defosse *et al.* 2015). Some studies exploring the structure of HKs in Dictyosteliaceae, Physaraceae, and Protosteliaceae initiated the establishment of a classification of these sensing proteins in amoebae (Eichinger *et al.* 2005; Heidel *et al.* 2011; Schaap *et al.* 2016; Hillmann *et al.* 2018). Thus, although recent advances have provided a preliminary insight into the distribution of HKs in fungi, plants and amoebae, the underlying mechanisms that drive the marked diversity among eukaryotic HKs, the number of genes, the structure, and the functional variations remain largely obscure. More precisely, the evolutionary paths that led to the appearance, transfer, duplication, and loss of HK genes have not been addressed broadly across the eukaryotes. In the present work, we have taken advantage of recent genomic resources to explore the structural diversity and the phylogenetic distribution of HKs in the six prominent eukaryotic clades: Archaeplastida (and sister clades Cryptophyta and Haptophyta), Opisthokonta, Amoebozoa, Apusozoa, Excavata, and SAR (Stramenopiles, Alveolates, and Rhizaria) (Grant and Katz 2014). This study represents an essential step towards deciphering the evolution of TCS cell signaling pathways in eukaryotes.

MATERIALS AND METHODS

HK sequence search, analysis and annotation

BLAST (Altschul *et al.* 1990) searches were performed against the NCBI and JGI genome sequence databases. The protein domains HisKA (PFAM00512) and HATPase_c (PFAM02518) were used as queries against both databases without threshold constraints. In order to eliminate redundant protein sequences, a multiple alignment was performed using the Clustal Omega algorithm (Sievers *et al.* 2011). After

annotation, domain organisation was predicted for each unique protein using the SMART (Schultz *et al.* 1998) and the Conserved Domain Database (Marchler-Bauer *et al.* 2017) algorithms. The TMHMM (Krogh *et al.* 2001) algorithm was used to predict transmembrane helices in the predicted proteins. Importantly, following a domain arrangement study for each deduced protein, we only kept putative HK sequences that have at least two out of the three following domains: HisKA (PFAM00512), HATPase_c (PFAM02518), and REC (PFAM00072). HK protein sequences were annotated using the first letter of the genus followed by the first 4 letters of the species, HK, and the number of the sequence (*e.g.* KniteHK1 for *Klebsormidium nitens* Histidine Kinase 1) except for *Arabidopsis thaliana*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Oryza sativa*, and *Dictyostelium discoideum* HKs for which the previously published nomenclature was conserved.

Phylogenetic analysis

Alignments were built with Cobalt 2.0.2 (Papadopoulos and Agarwala 2007), applying an additional constraint on conserved domains that were compared to the CDD domain bank v0.75. The alphabet chosen was of the regular type and a maximum distance between two sequences of 0.7 was chosen (fraction of the number of words in common to all the words). The resulting alignments were curated using Gblocks 0.91b (Talavera and Castresana 2007) to remove non-conserved positions that could prevent correct reconstruction of the phylogeny. Several Gblocks parameter values were tested to retain between 11% and 13% of the positions in each initial alignment. For each alignment, the minimum length of a block was set to four positions and all positions corresponding to a gap in one block were retained. The parameters related to (i) the number of sequences required to consider a position as being conserved, (ii) the number of sequences required to consider a position as being flanking, and (iii) the maximum number of contiguous non-conserved positions that were optimized to define each block (Opisthokonta: 102, 102, 100; Archaeplastida and sister clades: 116, 116, 100; Excavata: 16, 26, 30; Amoebozoa: 64, 64, 175; SAR: 74, 79, 115; Apusozoa: 6, 6, 50; respectively). A phylogeny was constructed using the curated alignments with the package 'Phangorn' (Schliep 2011) in R (R development core team, 2013). A Neighbor-Joining tree was used as a primer tree and distances between sequences were fitted using the maximum likelihood approach and the Lê & Gascuel (2008) substitution matrix after several substitution models had been tested using the 'modelTest' function with both invariant sites and the gamma distribution. We retained the LG model which was always the most appropriate as determined by its Bayesian Information Criterion (BIC). Branch position was optimized with a nearest neighbor interchange (NNI) algorithm. Branch robustness was evaluated using parametric resampling (bootstrap of 100) carried out in multicore computing machines of the CCSC (CNRS, Orléans, France).

RESULTS

Exploring the structure and distribution of HKs in Eukaryota

In order to acquire a representative sampling to study the structure and distribution of HKs in the Eukaryota, we browsed the genomes of 67 species (**Table 1**) spread throughout the eukaryotic tree of life (Grant and Katz 2014). Most eukaryotic HKs are hybrid, containing a C-terminal REC domain downstream of HisKA and HATPase_c domains, but there are some examples of eukaryotic HKs that lack the REC domain. This is the case for example of some diverged groups of HKs, such as plant phytochromes, ERS2-type ethylene receptors, and chloroplast TCS sensors that progressively acquired serine threonine kinase activity and non-response regulator functional partner in evolution (Cashmore 1998 ; Puthiyaveetil and Allen 2009 ; Schaller *et al.* 2011 ; Gallie 2015). We therefore searched all 67 genomes with the Pfam domains HisKA (PFAM00512) and HATPase_c (PFAM02518) and following a domain arrangement study for each deduced protein, we only kept putative HK sequences that have at least two out of the three following domains: HisKA (PFAM00512), HATPase_c (PFAM02518), and REC (PFAM00072). This strategy has helped (i) to remove a number of non-HK sequences that only contain a single HATPase_c domain such as for instance pyruvate dehydrogenases, heat shock proteins 90, and DNA mismatch repair proteins MutL (ii) but also has provided the opportunity to capture divergent proteins related to the HK family. This allowed the compilation of 748 predicted proteins (**Table 1 and supplemental Table S1**). The HK family is known to be highly divergent, even within a single kingdom (Mascher *et al.* 2006; He *et al.* 2016; Hérivaux *et al.* 2017). Thus, independent phylogenetic analyses of HK predicted proteins were carried out for each of the six major eukaryotic supergroups: Archaeplastida, Opisthokonta, Amoebozoa, Apusozoa, Excavata and SAR (Grant and Katz 2014).

Improving the categorization of HK proteins in Archaeplastida, Opisthokonta, and Amoebozoa

Archaeplastida and sister clades (Cryptophyta and Haptophyta)

Several recent studies have provided important advances in our understanding of the structure and distribution of land plant HKs (Schaller *et al.* 2008; Yasumura *et al.* 2012; Gruhn *et al.* 2014; Liu *et al.* 2014). However, there is a need to extend this analysis to the whole green lineage (Archaeplastida), which encompasses glaucophytes (Glaucocystophyta), red algae (Rhodophyta), green algae (Chlorophyta), and land plants (Streptophyta), together with the sister clades Cryptophyta and Haptophyta in some phylogenies (Grant and Katz 2014). Genome searches revealed that HKs are broadly represented throughout all these clades since we identified sequences in the Glaucocystophyta (*Cyanophora paradoxa*, 1 HK) (Price *et al.* 2012) and the Rhodophyta (*Cyanidioschyzon merolae*, 1 HK) (Matsuzaki *et al.* 2004). We also identified 3 and 7 HK sequences from the genomes of the aquatic green algae *Micromonas pusilla* (Prasinophytes) (Worden *et al.* 2009) and *Volvox carteri* (Chlorophyceae) (Prochnik *et al.* 2010), respectively, 67 HKs in the genome of *Klebsormidium nitens* (Charophyta, terrestrial green alga) (Hori *et*

al. 2014), 54 HKs in the genome of *Physcomitrella patens* (Bryophytes) (Rensing *et al.* 2008), 20 HKs in the genome of *Marchantia polymorpha* (Liverworts) (Bowman *et al.* 2017), and 16 HKs in the genome of *Selaginella moellendorffii* (Lycophytes) (Banks *et al.* 2011). The Acrogymnospermae clade was represented by the loblolly pine genome (*Pinus taeda*) (Neale *et al.* 2014) in which we annotated 10 HKs. Concerning Magnoliophyta (flowering plants), we identified 9 HKs in *Amborella trichopoda* (Amborella Genome Project 2013), a model early-diverging species from the Magnoliophyta, to which we added the 16 previously described HKs from *Arabidopsis thaliana* (a Eudicot model species) (Hwang *et al.* 2002) and the 13 HKs from *Oryza sativa* (a Monocot model species) (Pareek *et al.* 2006). Finally, we identified 10 and 3 HKs in the genomes of representative species from the sister clades Cryptophyta (*Guillardia theta*) (Curtis *et al.* 2012) and Haptophyta (*Emiliania huxleyi*) (Read *et al.* 2013), respectively (Table 1).

To gain insight into the phylogenetic relationships between HKs from glaucophytes (Glaucocystophyta), red algae (Rhodophyta), green algae (Chlorophyta), land plants (Streptophyta), and the sister clades Cryptophyta and Haptophyta, we generated a robust phylogenetic tree after multiple alignment of 230 predicted sequences (Table 1 and supplemental Table S1). This analysis revealed that most of the deduced HK sequences tended to cluster in the previously described major plant HK groups (Figure 2) (Schaller *et al.* 2008; Ishida *et al.* 2010). These included the AHK1 group, known to act as osmosensors in Eudicots (Urao *et al.* 1999; Cheddor *et al.* 2006), the CKI1 group (Kakimoto 1996), which constitutes key regulators of central cell specification in the *Arabidopsis* female gametophyte (Pischke *et al.* 2002), the CKI2 group (Kakimoto 1996), which was reported to be involved in stress-induced stomatal closure (Mira-Rodado *et al.* 2012), the phytochrome group (Schaller *et al.* 2008), which consists in photoswitchable red/far-red photoreceptors regulating competition with neighboring plants for photosynthetically active red light (Rockwell and Lagarias 2017), the ethylene receptor group (ETR), which has been divided in two subfamilies (Gallie 2015) that display the three predicted transmembrane helices containing the crucial residues involved in ethylene perception (Wang *et al.* 2006), the cytokinin receptor group (CKR), which consists of proteins displaying a Cyclases/Histidine kinases Associated Sensing Extracellular (CHASE) domain in their N-terminal region (Anantharaman and Aravind 2001; Mougel and Zhulin 2001) known to be essential for the binding of the hormones (Gruhn *et al.* 2014), and the more recently described Membrane-Associated Sensor 1 (MASE1) domain-containing HKs of unknown function (Ishida *et al.* 2010). Most of these HK groups, including AHK1, CKR, and ETR, were found exclusively in the Streptophyta (*K. nitens*, *P. patens*, *M. polymorpha*, *S. moellendorffii*, *P. taeda*, *A. trichopoda*, *A. thaliana*, and *O. sativa*) (Figure 2). It is noteworthy that most of the CHASE domain-containing HKs predicted from the *K. nitens* and *P. patens* genomes tended to cluster in the subfamily 2 of plant CKRs (Gruhn *et al.* 2014) whereas *K. nitens* KniteHK9 and KniteHK48 did not appear to cluster with the two previously described subfamilies, thus defining a new subfamily of putative CKRs in Archaeplastida (Figure 2). The MASE1 domain-containing HK group appeared to be restricted to early diverging land plants (*P. patens*, *M. polymorpha*, and *S. moellendorffii*). Finally, this phylogenetic analysis reveals that the CKI1 and CKI2 groups are restricted to land plants and that, interestingly, the CKI1 group has likely emerged from a structural specialization of AHK1-like ancestors (Figure 2).

In addition to these observations, several interesting advances were provided by the phylogenetic analysis. First, the genome of the red alga *C. merolae* encodes a unique HK (CmeroHK1) that corresponds to the Chloroplast Sensor Kinase (CSK) group (**Figure 2**) (Puthiyaveetil *et al.* 2008). A nuclear-encoded CSK has been first described in *A. thaliana*. The CSK gene is believed to have originated from the cyanobacterial histidine kinase 2 (Hik2). CSK homologs are present in all major lineages of photosynthetic eukaryotes but because they lack typical HisKA Pfam domain, these were not included in the present study. A unique aspect of CSK evolution is that it occurs as a canonical histidine kinase along with its RR partner in non-green algae but in green algae and plants it is a modified histidine kinase having lost the conserved histidine residue and its cognate RR partner. As in the case for higher plant ethylene receptors, plant CSK has been rewired in evolution to work with a non-response regulator functional partner to link chloroplast gene expression with photosynthetic electron transport (Puthiyaveetil and Allen 2009 ; Puthiyaveetil *et al.* 2010 ; Puthiyaveetil *et al.* 2013). Glaucocystophyta CparaHK1 shares high similarity with several cyanophytochromes (not shown) and tended to cluster in the tree with Streptophyta phytochromes (**Figure 2**). This is in accordance with previous analyses demonstrating that despite the lack of detectable sequence similarity, Archaeplastida phytochromes originated from cyanophytochromes (Kooß and Lamparter 2017). CparaHK1 was previously shown to act as a phytochrome, detecting light broadly throughout the visible spectrum (blue, green, orange, red, and far-red) in contrast to land plant phytochromes that only use the ratio of red to far-red light to detect shading by neighboring plants and to control photomorphogenesis (Rockwell *et al.* 2014). Few HKs were found in green algae (*e.g.* *M. pusilla*, 3 HKs), including notably a single phytochrome (MpusiHK1) (Duanmu *et al.* 2014), which appears to be distantly related to land plant phytochromes (**Figure 2**). The two other *M. pusilla* HKs (MpusiHK2 and MpusiHK3) are predicted to have multiple transmembrane regions within their N-terminus and therefore correspond to a previously undescribed HK group that displays similarity to sequences from the Cryptophyta (*G. theta*, GthetHK3, GthetHK5, GthetHK8, and GthetHK10) (**Figure 2**).

Some HKs from the Archaeplastida sister clades Cryptophyta (*G. theta*) and Haptophyta (*E. huxleyi*) were also of interest (**Figure 2**). These included not only *G. theta* GthetHK6, which clustered with the Archaeplastida phytochrome group, and GthetHK2, GthetHK7, and GthetHK9 that harbor a combination of PAS/PAC domains (**P**er-period circadian protein; **A**rnT-Ah receptor nuclear translocator protein; **S**ingle minded protein) (Möglich *et al.* 2009) within their N-termini (referred here as Multi-PAS HKs). We also detected GthetHK1 and EhuxLHK3 as member of the Hik33/ycf26 group of HKs. These are known to participate in the chloroplast TCS (Suzuki *et al.* 2001 ; Puthiyaveetil and Allen 2009).

One important finding was that both *K. nitens*, a model species representing the early transition step from aquatic algae to land plants, and, to a lesser extent, basal Embryophyta species (*P. patens*, *M. polymorpha* and *S. moellendorffii*) possessed a broad range of HKs, some of which had features that have not been described for land plant HKs. For example, KniteHK26 and KniteHK43 share the same domain topology and cluster with the bacteriorhodopsins VcartHK1, VcartHK3, VcartHK4, VcartHK5, and VcartHK6 from the green alga *V. carteri* (Kianianmomeni and Hallmann 2014) (**Figure 2 and supplemental Figure S1**). Homologues of these proteins, which are located in the eyespot of *Chlamydomonas* (another green

alga), play a crucial role in the adaptation of behavioral responses in the presence of UV-A light (Kateriya *et al.* 2004; Troein *et al.* 2011; Luck *et al.* 2012). Five other HKs, KniteHK15, KniteHK19, KniteHK23, KniteHK28, and KniteHK34, possess an N-terminal sensing region that shares domain topology and significant similarity with the **L**ight, **O**xygen, or **V**oltage (LOV) domain found in blue-light photoreceptors from cyanobacteria and chlorophyta (Figure 2 and supplemental Figure S2) (Crosson *et al.* 2003; Glantz *et al.* 2016). This similarity suggests that green algae retained this type of light sensing HK protein during the first steps of terrestrialization but that it was later lost in land plants and replaced by cryptochromes and phototropins, allowing them to perceive and to adapt to UV-A and blue light (Sullivan and Deng 2003). Another interesting finding was that KniteHK29, KniteHK44, SmoelHK12, SmoelHK15, and PpateHK38 possess an N-terminal sensing region that shares domain topology and significant similarity with bacterial NarX nitrate/nitrite sensors (Mascher *et al.* 2006) (Figure 2 and supplemental Figure S3). It is thus possible that such transduction systems were acquired via horizontal gene transfer during the evolution of green algae and allowed adaptation to the particular form of nitrogen source offered by soils during the terrestrialization process. It is also interesting to note that KniteHK1 and KniteHK2 correspond to dual HKs, which have hitherto only been reported in fungi and the Amoebozoa (Figure 2) (Defosse *et al.* 2015; Schaap *et al.* 2016). Finally, it was also surprising to observe, for the first time in the green lineage, members belonging to the prominent fungal group X HK (KniteHK20, KniteHK56, and KniteHK59) (Figure 2). A previous study suggested that these HKs were also acquired by fungi during the land colonization process allowing their adaptation to the particular oxidant conditions imposed by terrestrial habitats (Hérivaux *et al.* 2017).

Opisthokonta

Opisthokonta represent a supergroup of morphologically highly diversified species including animals (Metazoa), choanoflagellates, Mesomycetozoa, and fungi. Although some previous studies have suggested the presence of HKs in some animals (Zhang *et al.* 2013; Hughes *et al.* 2011; Putnam *et al.* 2007; Zhou *et al.* 2013; You *et al.* 2013; Simakov *et al.* 2013; Neave *et al.* 2017; Gulia-Nuss *et al.* 2016), our analysis demonstrated that all metazoan HK candidates (about 150 sequences) found in the NCBI database corresponded either to an inappropriate annotation or to contamination by bacterial sequences (not shown). Thus, our analysis confirms that animals do not possess any typical eukaryotic HKs.

However, HKs appear to occur broadly in the remaining Opisthokonta clades since one predicted protein was identified in a representative species of choanoflagellate (*Monosiga brevicollis*) (King *et al.* 2008) and 11 HKs were found in the mesomycetozoa model species *Capsaspora owczarzakii* (Suga *et al.* 2013). We also included HK sequences from 23 broadly distributed species from the kingdom Fungi in this phylogenetic analysis (Grigoriev *et al.* 2014). These included the Basidiomycota species *Puccinia graminis* (Pucciniomycotina) (Duplessis *et al.* 2011), *Ustilago maydis* (Ustilaginomycotina) (Kamper *et al.* 2006), and *Cryptococcus neoformans* (Agaricomycotina) (Loftus *et al.* 2005); the Ascomycota species *Tuber melanosporum* (Pezizomycetes) (Martin *et al.* 2010), *Arthrotrichia oligospora* (Orbiliomycetes) (Yang *et al.* 2011), *Aspergillus fumigatus* (Eurotiomycetes) (Nierman *et al.* 2005), *Usnea florida* (Lecanoromycetes),

Botrytis cinerea (Leotiomyces) (Staats and van Kan 2012), *Fusarium verticillioides* (Sordariomyces) (Cuomo et al. 2007), *Xylona heveae* (Xylonomycetes) (Gazis et al. 2016), *Candida albicans* (Saccharomycotina) (Jones et al. 2004), and *Taphrina deformans* (Taphrinomycotina) (Cisse et al. 2013); and the early diverging fungi *Rhizophagus irregularis* (Glomeromycotina) (Tisserant et al. 2013), *Mortierella elongata* (Mortierellomycotina) (Uehling et al. 2017), *Umbelopsis ramanniana* (Mucoromycotina) (Hérivaux et al. 2017), *Syncephalis plumigaleata* (Zoopagomycotina), *Conidiobolus coronatus* (Entomophthoromycotina) (Chang et al. 2015), *Ramicandelaber brevisporus* (Kickxellomycotina) (Hérivaux et al. 2017), *Catenaria anguillulae* (Blastocladiomycota) (Mondo et al. 2017), *Gonapodya prolifera* (Chytridiomycota) (Chang et al. 2015), *Piromyces finnis* (Neocallimastigomycota) (Haitjema et al. 2017), *Enterocytozoon bieneusi* (Microsporidia) (Akiyoshi et al. 2009), *Rozella allomyces* (Cryptomycota) (James et al. 2013). A total of 203 predicted fungal HK proteins was thus included in our analysis (Table 1 and supplemental Table S1).

The opisthokont phylogenetic analysis allowed the 11 prominent fungal HK groups (I to XI) originally categorized by Catlett et al. (2003) to be recovered from the Ascomycota along with the five additional groups described by Defosse et al. (2015) (Figure 3). Although the function of most of these latter groups remains unknown, some fungal HK groups have been shown to be involved in the regulation of various physiological processes (Defosse et al. 2015; Hérivaux et al. 2016).

Group I HKs are known to be highly divergent within the group (Catlett et al. 2003). These proteins are present in various fungal clades including the Ascomycota and Basidiomycota but also in early diverging fungi and appear to have been expanded in the phytopathogenic Ascomycota. A group I HK mutant in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* (Ascomycota) displayed a slight decline in conidiation and an attenuated virulence (Jacob et al. 2014) but there was no apparent altered phenotype for an equivalent mutant in *C. neoformans* (Basidiomycota) (Bahn et al. 2006). Group II fungal HKs are present in the Sordariomycetes, the Orbiliomycetes and the Leotiomyces (Catlett et al. 2003). The function of these proteins is unknown. Most available data concerning the roles of fungal HKs were gained from functional characterization of proteins belonging to group III. Fungal group III HKs proteins contain a variable number of HAMP (Histidine kinases-Adenylate cyclases-Methyl accepting proteins and Phosphatases) domain repeats (Aravind and Ponting 1999) within the sensing domain and have been primarily reported to be implicated in virulence in human, plant, and insect pathogenic fungi but also in osmosensing, morphogenesis, conidiation, and cell wall integrity (Defosse et al. 2015; Hérivaux et al. 2016). Fungal group III HKs were only found in terrestrial species (Figure 3) suggesting that these sensing proteins were acquired for/during the land colonization process. Group IV fungal HKs were exclusively present in the Eurotiomycetes and the Sordariomycetes (Figure 3), where they have been shown to be involved in the virulence of *Aspergillus fumigatus* (Clemons et al. 2002). Group V fungal HKs are large proteins with PAS/PAC repeats within the sensing domain. Group V fungal HKs were found in several clades of the Ascomycota and Basidiomycota but also in early diverging fungi (Figure 3) and have been shown to be implicated in vegetative growth, conidiation, stress adaptation, and virulence in *M. oryzae* (Jacob et al. 2014). Group VI HKs appeared to be restricted to the Ascomycota (Figure 3) and are known to mainly

act as transmembrane osmosensors by governing the high-osmolarity glycerol (HOG) mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway (Defosse *et al.* 2015; Hérivaux *et al.* 2016). The canonical N-terminus of these transmembrane proteins includes two hydrophobic helices flanking an osmosensing extracellular loop, as found in Archaeplastida AHK1-related HKs (Figure 2). Group VII fungal HKs were present in the Ascomycota and Basidiomycota clades (Figure 3) but the function of these proteins is unknown. Phytochromes (group VIII or Fph) are light-perceiving receptors, broadly represented in nearly all fungal clades (Figure 3). These proteins mediate red light sensing in fungi while other types of photoreceptors are involved in sensing light of shorter wavelengths (Bayram *et al.* 2010). Group IX fungal HKs were found in several clades of the Ascomycota and Basidiomycota but not in early diverging fungi. Their function is unknown. Group X fungal HKs are large proteins with a canonical N-terminus that includes a **S**erine/**T**hreonine **K**inase-**r**elated (S/TKr) domain and a GAF domain. Like fungal group III HKs, group X HKs have been extensively studied and have been shown to govern virulence, morphogenesis, and peroxide adaptation (Defosse *et al.* 2015; Hérivaux *et al.* 2016). Group X HKs are broadly represented across the fungi. The phylogenetic tree indicates that this group is polyphyletic, defining fungal groups X-A, X-B, and X-C (Figure 3). Finally, group XI fungal HKs are known to be highly divergent within the group (Catlett *et al.* 2003) and appeared to be broadly spread in the Ascomycota and Basidiomycota but not in early diverging fungi (Figure 3). *M. oryzae* group XI fungal HKs have been shown to be implicated in vegetative growth, conidiation, stress adaptation, and virulence (Jacob *et al.* 2014).

Importantly, the phylogenetic tree shed light on additional clusters that allowed us to refine the categorization of fungal HKs by defining new fungal HK groups (Figure 3), a process that was recently initiated in Defosse *et al.* (2015) and Hérivaux *et al.* (2016). These new groups include XII-A in Basidiomycota (PgramHK1, CneoTCO2, and CneoTCO4) and XII-B in early diverging fungi (RirreHK2, RirreHK3, MelonHK3, and UramaHK3), which correspond to the polyphyletic groups of dual-HKs (Lavín *et al.* 2014). The dual-HK CneoTCO2 in *C. neoformans* has been shown to be involved in heavy metal and antifungal susceptibility as well as in oxidant condition adaptation (Bahn *et al.* 2006). Group XIII (formerly known as IB or CneoTCO5) HKs were found in *C. neoformans*, *T. deformans* and *R. irregularis* whereas group XIV, which appeared to be restricted to the Basidiomycota, includes predicted proteins in *U. maydis* and *C. neoformans* (UmaydHK4, UmaydHK5, and CneoTCO7) (Figure 3). Group XV HKs (MelonHK10 and UramaHK9), also referred to as MS-HKI, as well as group XVI HKs (MelonHK11 and MelonHK12), formerly called MS-HKII, were exclusively found in the Mucoromycotina (Figure 3) according to previous studies (Defosse *et al.* 2015; Hérivaux *et al.* 2016). Predicted HK proteins from the Lecanoromycetes (UflorHK3), the Orbiliomycetes (AoligHK11), and the Pucciniomycotina (PgramHK4) now define the new group XVII of fungal HKs. It is noteworthy that the recently described ethylene receptor homologs in early diverging fungi (Hérivaux *et al.* 2017) tended to cluster into two different groups (groups XVIII-A and XVIII-B) (Figure 3) suggesting a polyphyletic origin for these fungal phytohormone sensing proteins. CHASE domain-containing HKs (here categorized as group XIX) appeared particularly abundant in early diverging fungi (Figure 3) and tended to cluster together suggesting a monophyletic origin for these cytokinin receptor homologs. The remaining predicted sequences that do not cluster with the above mentioned HK

groups, and which were either found in a single species, were positioned in branches supported by low bootstrap values or did not have a common N-terminal domain arrangement, have not been incorporated into this refined classification of fungal HKs.

Most of the *C. owczarzaki* (Mesomycetozoa) HKs possessed a sensing region with multiple predicted transmembrane helices that could indicate that *C. owczarzaki* contains few intracellular HKs and mostly membrane bound HKs. One of these HKs, CowczHK2, clustered with ethylene receptors (group XVIII-A) from early diverging fungi (**Figure 3**) (Hérivaux *et al.* 2017). As revealed by an alignment with ethylene receptors from plants, green algae, and cyanobacteria, CowczHK2 displays the three predicted transmembrane helices and contained all of the conserved, essential residues involved in ethylene perception (**supplemental Figure S4**) (Wang *et al.* 2006). Another remarkable finding was the occurrence of a dual-HK in *C. owczarzaki* (CowHK5) because this group of HKs was long believed to be restricted to the Basidiomycota within the opisthokonts (Lavín *et al.* 2014). None of the remaining *C. owczarzaki* HKs displayed significant phylogenetic relationships with other fungal HK groups. They thus represent potential founder members of novel Opisthokonta HK groups.

Amoebozoa

More than 2,000 species of amoeboid protists have been described. These unicellular organisms, which often possess pseudopods, are known to behave either as free-living cells in water and soils or as parasites of humans and other organisms. We incorporated the predicted HK sequences from four species broadly distributed across the phylogenetic tree of the Amoebozoa (Shadwick *et al.* 2009) into the present phylogenetic analysis. These included the 51 recently described *Physarum polycephalum* HKs (Schaap *et al.* 2016) and the 14 HKs of *Dictyostelium discoideum* (Eichinger *et al.* 2005; Sucgang *et al.* 2011), and we annotated 48 and 13 predicted sequences from *Acanthamoeba castellanii* (Clarke *et al.* 2013) and *Polysphondylium pallidum* (Heidel *et al.* 2011), respectively. No HK sequences were found in the genome of the obligate human parasite *Entamoeba histolytica* (Loftus *et al.* 2005) (**Table 1**).

Although a recent study reported a phylogeny of HKs for *P. polycephalum* (Schaap *et al.* 2016), little is known about the conservation of these sensing proteins within the various clades of the Amoebozoa. We therefore constructed a phylogenetic tree based on an alignment of the 126 predicted HK sequences from the four above-mentioned species (**Table 1 and supplemental Table S1**). To date, very little data are available about the function of HKs in Amoebozoa, and what exists is derived from studies on *D. discoideum* (Du *et al.* 2015). A homologue of *D. discoideum* DhkA shares a CHASE domain-containing sensing domain with plant cytokinin receptors (**supplemental Figure S5**). However, in *D. discoideum* this domain detects a peptide, SDF-2, which functions both in the regulation of prestalk gene expression and in the control of the terminal differentiation of prespore cells (Wang *et al.* 1996; Wang *et al.* 1999). DhkA was also identified in *P. pallidum* (PpallHK9), but was not found in two other taxon-group-representative species (**Figure 4**). Homologues of *D. discoideum* DhkB, which regulates spore germination and maintenance of spore dormancy (Zinda and Singleton 1998), and DhkC, which is required for the initiation of fruiting body formation (Singleton *et al.* 1998) and also affects chemotaxis (Kuwayama and

Kubohara 2016), were also found in *P. pallidum* (Figure 4). Finally, homologues of *D. discoideum* DhkF and DhkG, for which no functions are known, were identified in *P. pallidum*, but were absent from the genomes of *P. polycephalum* and *A. castellanii* (Figure 4). This indicated that some of the *D. discoideum* HKs are likely restricted to the Dictyostelia, with possible roles in their multicellular development to fruiting bodies, which does not occur in the other Amoebozoa with sequenced genomes (Schaap 2011).

Compared to the explored supergroups, the domain topology of amoebozoan HKs was highly diversified and many domains found in plant and fungal HKs, such as PAS, GAF, S/TKrd, were also found in the sensing regions of these proteins (Figure 4). Some proteins contained domains that have not been described previously in eukaryotic HKs. These included the TyrK (**Tyrosine Kinase**) domain found in DhkG and PpallHK13 and the MeTrc (**Methyltransferase, chemotaxis proteins**) domain found in PpolyHK19. PpolyHK19 is homologous to the prokaryotic CheB/CheR HK, which plays a central role in bacterial chemotaxis (Bischoff and Ordal 1992). Interestingly, some *P. polycephalum* HK proteins contain an Hpt domain fused to the C-terminal REC domain (i.e. PpolyHK5, PpolyHK18). To date, this particular feature has been observed previously only in facultative aerobic bacteria (notably the oxygen sensing HK ArcB, Malpica *et al.* 2006) and to our knowledge, this hybrid HK structure is unique to Amoebozoa within the Eukaryota.

We also detected the presence of some amoebozoan HK groups displaying topologies found in other eukaryotic supergroups. Two *P. polycephalum* HK sequences (PpolyHK37 and PpolyHK38) that contain an N-terminal GAF domain correspond to light sensing phytochromes (Schaap *et al.* 2016) (Figure 4). Most of the amoebozoan Dual HKs cluster with the DhkD branch. Dual HKs were believed to be restricted to Basidiomycota, where the function of these large HKs remains obscure. In the future, it will be important to understand how these sensing proteins orchestrate their phosphorelay events during signalling and how their particular topologies dovetailed the currently accepted canonical TCS (Figure 1). The predicted amoebozoan HKs with domain topologies similar to those of fungal group X exhibited marked polyphyly whilst the HKs related to fungal group III tended to cluster together in the tree (DhkJ group). We also found that PpolyHK39 displays an N-terminal sensing region that shares domain topology and significant similarity with *K. nitens* (terrestrial green algae) KniteHK29 and KniteHK44, and bacterial NarX nitrate/nitrite sensors (Figure 4 and supplemental Figure S3) (Mascher *et al.* 2006). Finally, as revealed by alignment with ethylene receptors from plants, green algae, cyanobacteria, and early diverging fungi, three *A. castellanii* HKs (AcastHK27, AcastHK28, and AcastHK35) contained three predicted transmembrane helices containing all of the conserved residues required for ethylene perception within their N-termini (Figure 4 and supplemental Figure S4) (Wang *et al.* 2006). Thus, this represents the first description of phytohormone receptor homologs in Amoebozoa.

Exploring the structure and the phylogeny of HK proteins in Apusozoa, Excavata, and SAR

Apusozoa

Apusozoa are unicellular flagellated organisms occurring in soils and aquatic habitats where they feed essentially on bacteria. To date, the genome of only one species has been sequenced, namely *Thecamonas trahens* (Russ *et al.* unpublished). We identified 11 predicted proteins that display the canonical HK feature in the *T. trahens* genome (Table 1 and supplemental Table S1). The structures of *T. trahens* HKs are relatively diverse (Figure 5). Half of these HKs are likely to be located at the membrane since multiple transmembrane regions were found within their N-termini. Several domains usually associated with HK sensing, such as PAS or GAF, were observed in some *T. trahens* HKs. Two particular structures stood out from the identified series of predicted proteins. These included the topology VSP-CYCc-GAF-HisKA-HATPase_c-RE-REC of TtrahHK8 (Figure 5). Whereas the CYCc domain (Adenylyl/guanylyl **c**yclase **c**atalytic) has been found in a small number of eukaryotic HKs (from the Archeplastida and Amoebozoa), VSP (Giardia **v**ariant-specific **s**urface **p**rotein) domains mediating antigenic variation at the surface of *G. intestinalis* (Gargantini *et al.* 2016), have not been described previously in HKs. Another interesting finding in *T. trahens* was the occurrence of a bacteriorhodopsin HK, *i.e.* TtrahHK4 (previously observed in the green algae) (Figure 5 and supplemental Figure S1). Thus bacteriorhodopsin HKs appear to be used for UVA sensing in several distantly related lineages but sharing similar environments: some halophilic prokaryotes (Haloarchaea, in which bacteriorhodopsins were originally found) and marine unicellular eukaryotes (green algae and *T. trahens*).

Excavata

Excavata correspond to unicellular, heterotrophic, and commonly flagellated species. Most are free living organisms in the environment, whereas others are commensals, symbionts or parasites of animals. Seven and 24 HK sequences were predicted in the genomes of *Trichomonas vaginalis* (Metamonada) (Carlton *et al.* 2007) and *Naegleria gruberi* (Discoba) (Fritz-Laylin *et al.* 2010), respectively, but no HKs were found in the genomes of the other representative Excavata species (*Spironucleus salmonicida*, *Giardia intestinalis*, *Leishmania infantum*, and *Trypanosoma brucei*) (Xu *et al.* 2014; Morrison *et al.* 2007; Peacock *et al.* 2007; Jackson *et al.* 2010) (Table 1 and supplemental Table S1).

To gain insight into the phylogenetic relationships between *T. vaginalis* and *N. gruberi* HKs, the domain organization of each protein was investigated and a phylogenetic tree was built using a multiple alignment of all the predicted sequences from both species. Based on this analysis and, in particular, sequence similarities between HisKA domains and N-terminal sensing regions, four groups of Excavata HK are proposed (Figure 6).

All seven *T. vaginalis* HKs are hybrid and tended to cluster together in the phylogenetic tree (Excavata group I, Figure 6) independently of the 24 HKs from *N. gruberi*. Most of the *T. vaginalis* HKs possessed a sensing region with no similarity to known domains but the presence of one or two predicted transmembrane helices in some of these proteins could indicate that *T. vaginalis* contains both intracellular and membrane bound HKs (Figure 6). Although the structure of the predicted *N. gruberi* HK proteins seems relatively well conserved at a first glance, the sequences were distributed into 3 major clades (Excavata group II, III and IV, Figure 6). Most of these HKs harbor multiple predicted hydrophobic helices

indicating that the majority of *N. gruberi* HKs are transmembrane proteins. Two *N. gruberi* HKs possessed domains that are often associated with the eukaryotic HK sensing region: PAS in NgrubHK23 and GAF in NgrubHK11. In contrast, five of the 24 HKs from *N. gruberi* did not contain any detectable N-terminal sensing region, as previously observed in some fungal HKs (Defosse et al. 2015). None of the *N. gruberi* and *T. vaginalis* predicted HK sequences were found to share any homology with other previously described prokaryotic or eukaryotic HK groups.

SAR

The SAR (**S**tramenopiles, **A**lveolates, and **R**hizaria) is a highly diversified supergroup encompassing various unicellular and multicellular algal and planktonic species but also ciliates and oomycetes.

HKs appear to be broadly represented in Stramenopiles since 1 to 34 predicted proteins were identified in pelagophytes (*Aureococcus anophagefferens*, 2 HKs) (Gobler et al. 2011), diatoms (*Fistulifera solaris*, 34 HKs) (Tanaka et al. 2015), brown algae (*Ectocarpus sp.*, 13 HKs) (Cock et al. 2010; Cormier et al. 2017), and oomycetes (*Albugo laibachii*, 2 HKs) (Kemen et al. 2011). However, the distribution of HKs in Alveolata is highly heterogeneous since no HK sequence was detected in the apicomplexan genomes (e.g. *Plasmodium falciparum*, *Babesia bovis*, *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium hominis*) (Gardner et al. 2002; Xu et al. 2004; Brayton et al. 2007; Lorenzi et al. 2016) nor in the Dinophyceae (*Symbiodinium microadriaticum*) (Aranda et al. 2016), whereas a few members were identified in the Chromerida (*Vitrella brassicaformis*, 7 HKs) (Woo et al. 2015) and the Perkinsae (*Perkinsus marinus*, 3 HKs) (Joseph et al. 2010). Interestingly, we also observed a marked increase in the number of HK predicted sequences in the Alveolata lineage Ciliophora (70 HKs in *Tetrahymena thermophila*) (Eisen et al. 2006). For Rhizaria, HKs were found in the Cercozoa (*Plasmodiophora brassicae*, 16 HKs) (Schwelm et al. 2015) but were absent from a Foraminifera genome (*Reticulomyxa filosa*) (Glöckner et al. 2014) (Table 1 and supplemental Table S1). Although it is well documented that the SAR includes a large number of genetically distant species with strongly divergent genomes, which could possibly complicate phylogenomic approaches (Grant and Katz 2014), we attempted to provide insight into the evolutionary relationship of HKs in this supergroup by carrying out a robust phylogenetic analysis (Figure 7).

Surprisingly, *T. thermophila* HKs tended to cluster in a single clade, consistent with the current hypothesis that paramecia have evolved rapidly and independently and therefore differ markedly from other Alveolata clades (Eisen et al. 2006; Aury et al. 2006). All except one of the *T. thermophila* HKs are hybrid HKs and most of these harbor multiple predicted hydrophobic helices within the N-terminal sensing region that presumably allow these proteins to be anchored to the cell membrane. Most of these proteins do not have any known domains in the N-terminal region; exceptions include 12 HKs that have a PAS domain (supplemental Table S1) (Figure 7). Despite the large number of *T. thermophila* HKs, there is a limited structural diversity suggesting that *T. thermophila* HK genes, as previously reported for many other kinase families in paramecia, are the result of a rapid gene family expansion process (Bemm et al. 2009).

Concerning the phylogeny of HKs from the other selected SAR species, we identified a set of 3 HKs from the Alveolata group Perkinsae (*P. marinus*) that tend to cluster together (Figure 7). Among these, PmariHK1 has a CYCc domain in its C-terminus. Five out of the 7 Chromerida *V. brassicaformis* HKs possess multiple hydrophobic helices (Figure 7). The genome of this species encodes another hybrid HK structure, VbrasHK1, with a domain topology (HisKA-HATPase_C-REC-REC-CYCc) that has never been observed previously in the Eukaryota. Thus, as observed in this study for green algae, some Alveolata TCS are coupled with adenylyl/guanylyl cyclase activity.

In the Rhizaria, most of the HKs found in the representative species *P. brassicae* (Cercozoa) were predicted to be cytoplasmic proteins. Some possess PAS/PAC domains and these tended to cluster within two clades in the tree. Interestingly, two Cercozoa HKs are predicted to be transmembrane proteins with two hydrophobic helices that border an osmosensing extracellular loop, as found in Archaeplastida AHK1-related HKs (Figure 2 and Figure 7).

In the stramenopiles, the oomycete *A. laibachii* possesses two HKs that differ drastically from those of other SAR clades since their N-termini contain multiple PAS domain repeats and because they display an Hpt domain fused to a C-terminal REC domain (Figure 7). We identified similar Multi-PAS HKs in the Archaeplastida sister clades Cryptophyta (*G. theta*) and Haptophyta (*E. huxleyi*) (Figure 2 and Figure 7). *A. anophagefferens* (pelagophyte), *F. solaris* (diatom) and *Ectocarpus* sp. (brown alga) share some common HK structures including proteins with PAS or GAF domains within their N-terminal sensing domains (Figure 7). The *Ectocarpus* predicted proteins EsiliHK3, EsiliHK7, EsiliHK8, and EsiliHK9 correspond to previously described light sensing phytochromes (Rockwell and Lagarias 2017). Further analyses revealed some interesting findings concerning the HK genes detected in the genome of the brown alga *Ectocarpus* sp.: (i) six of these genes (EsiliHK3, EsiliHK4, EsiliHK5, EsiliHK10, EsiliHK11 and EsiliHK13, Figure 7) are located either within a large, integrated, transcriptionally silent viral genome (Delaroque et al. 2008; Cock et al. 2010) similar to *Ectocarpus siliculosus virus 1* (ESV-1) (Delaroque et al. 2001) located on chromosome 6 or within another inserted viral fragment on scaffold 490, and should therefore be considered as viral rather than algal genes, (ii) of the remaining genes, all except EsiliHK6 share one or more features with viral HK genes including high sequence similarity (EsiliHK1, EsiliHK6, EsiliHK7, EsiliHK8 and EsiliHK12; 25 to 86% identity), phylogenetic proximity (EsiliHK12 clusters with EsiliHK10 and EsiliHK13, and EsiliHK7, EsiliHK8 and EsiliHK9 cluster with EsiliHK3 in Figure 7), and/or only a small number (zero or one) of introns (EsiliHK2, EsiliHK7, EsiliHK8, EsiliHK9 and EsiliHK12), suggesting possible evolutionary relationships between the viral and algal genes, (iii) the N-terminal sensing regions of two of the inserted viral genes, EsiliHK10 and EsiliHK12, encode proteins with typical MASE1 domains (Figure 7) that were herein described in early diverging Archaeplastida; (iv) the *Ectocarpus* sp. genome possesses non-hybrid HK genes (e.g. EsiliHK6) (Figure 7) that appear to have a cyanobacterial origin. The most interesting finding of the SAR analysis was the identification of HKs displaying a CHASE domain within their N-terminus in the brown alga *Ectocarpus* sp. (EsiliHK2) and the diatom *F. solaris* (FsolaHK22 to FsolaHK26) (Figure 7 and supplemental Figure S5). The CHASE domain is a characteristic feature of plant cytokinin receptors. Surprisingly, alignment of four *F. solaris* HKs (FsolaHK12 to FsolaHK15) with ethylene receptors

from plants, green algae, cyanobacteria, Amoebozoa, and early diverging fungi allowed the identification, within their N-termini, of three predicted transmembrane helices with all of the conserved residues necessary for ethylene perception (**Figure 7 and supplemental Figure S4**) (Wang *et al.* 2006). Thus, this represents the first description of cytokinin and ethylene receptor homologs in SAR.

DISCUSSION

Significant advances in knowledge concerning the structure, classification and distribution of HKs have been made within the past decade in plants, fungi and to a lesser extent in amoebae, but these analyses have not been more broadly addressed in Eukaryota. The present study reports for the first time a preliminary but global phylogenetic analysis of this prominent family of sensing proteins in all the eukaryotic supergroups including Archaeplastida, Opisthokonta, Amoebozoa, Apusozoa, Excavata, and SAR (**Figure 8**). This analysis allowed most of the compiled sequences to be categorised into a previously described HK group but we also propose to refine the HK classification for some supergroups, notably the Archaeplastida and Opisthokonta. Unfortunately, the large genetic distances between the representative species in each supergroup and the limited quantity of genomic resources for some clades have precluded the categorization of some highly divergent HKs (notably from the Amoebozoa). Beyond this phylogenetic analysis and classification of eukaryotic HKs, our study has revealed several interesting findings: (i) a description of some previously overlooked eukaryotic HK groups with predicted putative physiological functions; (ii) the observation that some HK groups, previously believed to be restricted to one kingdom (plants or fungi), occur in additional supergroups and (iii) the suggestion of evolutionary paths that have led to the appearance, transfer, duplication, and loss of HK genes in some phylogenetic lineages.

HKs in Archaeplastida: unprecedented structures and evolution

It is now generally admitted that a common ancestor of the Archaeplastida acquired many genes from cyanobacteria through the primary endosymbiotic event that produced their plastids approximately 1.5 billion years ago (Brodie *et al.* 2017). Therefore, it has been suggested that the initial pool of HK genes were acquired from cyanobacteria (Lacey and Binder 2016). In Archaeplastida, we observed first that unicellular aquatic species possess few HK genes (1-7 HKs in Glaucocystophyta, Rhodophyta, and Chlorophyta). The number of HKs is significantly greater in the Charophyta lineage (67 HKs in the model terrestrial algae) but these genes are less abundant in land plants (54 HKs in the model moss, and 9-16 in the remaining studied species) (**Figure 8**). Thus, it could be hypothesized that Archaeplastida algae progressively extended and diversified their HK battery prior to the conquest of terrestrial habitats, notably acquiring the ability to sense new nutrient sources offered by terrestrial niches (nitrate/nitrite sensor homologues in *K. nitens*, *P. patens*, and *S. moellendorffii*) and by developing capacity to respond to various constraints related to terrestrial habitats such as oxidant stresses (homologues of fungal group X oxidant sensors in *K. nitens*), osmotic stresses (proteins related to the osmosensor AthalHK1 in *K. nitens*) or direct

sunlight exposure (homologues of bacteriorhodopsins and LOV blue-light photoreceptors in *K. nitens*) (**Figure 8**). CKI2, which is involved in stress-induced stomatal closure (Mira-Rodado *et al.* 2012), was detected from species that have colonized terrestrial habitats. Domain-based phylogenetic analysis suggested that CKI1, which directs specification of the endosperm precursor central cell resulting in seeds containing an embryo and an endosperm, appeared within the seed-forming flowering plants (Angiosperms) (Yuan *et al.* 2016).

An important feature of the diversification of the structure of green algal HKs was the apparition of ethylene and cytokinin receptors from the terrestrial alga *K. nitens* (**Figure 8**). Both ethylene and cytokinin are largely documented as prominent phytohormones essential for land plant developmental programs (Zdarska *et al.* 2015). The apparition of ethylene and cytokinin sensing HKs in large numbers in the terrestrial algae (*K. nitens*) is likely to have played an essential role in progressively shaping the first multicellular Archaeplastida for growth and nutrition in various land ecotopes.

Strengthening the classification of HKs in Opisthokonta

For the Opisthokonta, we first confirmed the absence of typical prokaryotic or eukaryotic HKs in animals. This is of course an essential prerequisite for approaches aimed at developing antimicrobials that target HKs in the context of human disease, for example (Bem *et al.* 2015; Shor *et al.* 2015).

Fungal HKs were initially categorized into 11 groups (Catlett *et al.* 2003) and then subsequently into 16 groups (Defosse *et al.* 2015). Our analysis of a large panel of Dikarya (Ascomycota and Basidiomycota) and early diverging fungi, indicated that classification of fungal HKs needs to be extended because previously undescribed topologies were identified and, consequently, some new groups have been proposed.

Exploration of the structure of HKs in the mesomycetozoon model species *C. owczarzaki* revealed the unexpected presence of a HK that shared a high degree of similarity with plant ethylene receptors (**Figure 8**). However, we failed to detect any plant cytokinin receptor homologs in this species. Importantly, phytohormone receptor homologs (ethylene and cytokinin receptors) were recently found in early diverging fungi that are plant root symbionts or endophytes, but also in species that colonize decaying plant material. It was thus speculated that these particular sensing proteins have promoted the interaction of early diverging fungi with plants leading to the conquest of land by these ancestral fungi (Hérivaux *et al.* 2017). The presence of such phytohormone receptor homologs in the Mesomycetozoa suggests that the acquisition of these sensing proteins occurred in a common ancestor of fungi and Mesomycetozoa. In cyanobacteria, ethylene receptors are bifunctional sensing proteins that mediate responses to both light and ethylene (Lacey and Binder 2016). It would be thus interesting to investigate the precise origin of ethylene receptors and their roles in the Mesomycetozoa and early diverging fungi.

A marked structural diversity in amoebozoan HKs

In contrast to plant and fungal HKs, knowledge about the function and physiological roles of HKs in amoebae remains fragmentary. The domain topologies of amoebozoan HKs were found to be highly diversified compared to other eukaryotic supergroups, indicating that they are likely to have a broad range of biochemical outputs and functions. Phylogenetic distribution provided some clues about the evolutionary paths driving the amoebozoan HKs diversity. For example, HKs with N-terminal CHASE domains (DhkA) were found exclusively in Dictyostelia, *i.e.* amoebae that form true multicellular fruiting bodies (sorocarps) to produce spores. We also found some domain topologies in the Amoebozoa that had been observed previously only in fungi, such as group III HKs, which are reported to act as osmosensors, group X HKs, known to mediate oxidant stress adaptation (Defosse *et al.* 2015) and light-sensing phytochromes (Figure 8). A similar situation was observed for some domain topologies that had been observed previously only in bacteria and plants, such as nitrate/nitrite sensors (Figure 8). Most importantly, we described, for the first time, the occurrence of ethylene receptor homologs in the Amoebozoa, especially in the free-living amoeba *A. castellanii* (Figure 8). However, the physiological role of homologs of fungal group III, group X, phytochromes, and ethylene receptors remains to be established.

Globally, the number of HKs differed sharply between amoebozoan species (Figure 8). The size of an organism HKs complement appeared to be inversely related to its level of developmental complexity (*D. discoideum* and *P. pallidum* versus *P. polycephalum*) or to its dependency on a host species (the free living *A. castellanii* versus the obligate parasite *E. histolytica*). However, these trends will need to be validated using larger scale phylogenomic analyses when more amoebozoan genomes are available.

First description of HKs in Apusozoa

In this study, we also took the opportunity to advance the description of HKs in Eukaryota by investigating the structure and distribution of these proteins in unexplored eukaryotic supergroups. We describe here for the first time predicted HK structures for the Apusozoa. The phylogenetic position of this clade is still controversial but recent molecular evidence suggests that it is a paraphyletic phylum related to the Opisthokonta (Cavalier-Smith *et al.* 2015). We identified 11 predicted proteins in the *T. trahens* genome that display canonical HK features and these proteins were structurally diversified. Some interesting topologies were observed, notably HKs with a VSP (Giardia variant-specific surface protein) domain in their N-terminal sensing region and bacteriorhodopsins. However, we have not been able to characterise this protein family further due to a lack of additional genomic resources and functional genomic data for the Apusozoa, and the lack of similarity of Apusozoa HKs with other bacterial and eukaryotic HK sequences.

HKs are restricted to some clades within the Excavata supergroup

Searches of genomic resources for Excavata identified seven and 24 predicted HK sequences in the genomes of *T. vaginalis* (Metamonada) and *N. gruberi* (Discoba), respectively, but no HKs were found in the genomes of other prominent genera from the Excavata (*Giardia* sp., *Leishmania* sp., and

Trypanosoma sp.). This distribution seems surprising but it is important to highlight the fact that, the genetic distance between *T. vaginalis* and *G. intestinalis* is large, as that between *N. gruberi* and other species within the Discoba (Grant and Katz 2014). However, it was interesting to note the previously unreported occurrence of HKs in two prominent species *T. vaginalis* (human parasite) and *N. gruberi* (closely related to the human parasite *N. fowleri*). Three main observations can be highlighted concerning the predicted Excavata HKs: (i) Metamonada and Discoba HKs appear to be highly diverged, reflecting the large genetic distance between these two major clades of the Excavata; (ii) although a small number of the Excavata HKs are likely to act as intracellular sensing proteins, most are predicted to be anchored in the cell membrane; and (iii) very few of the Excavata HKs have known domains in their N-termini that have been implicated in sensing in other prokaryotic and eukaryotic HKs. Thus, the HK family appears to have evolved structurally in a specific manner in the Excavata supergroup.

First description of cytokinin and ethylene receptor homologs in SAR

Finally, we report here the first description of HK structures in the SAR supergroup. The distribution of these predicted proteins was highly heterogeneous within the SAR clades and we failed to identify any homologues in the genomes of Apicomplexa. Hence, therapeutic developments based on the inhibition of HK activity will unfortunately not be useful in combatting malaria, toxoplasmosis or other coccidian diseases. The high level of genetic divergence between the genomes of the representative SAR species selected for this analysis complicated the phylogenomic approaches and it was not possible to draw any general conclusions about the evolutionary relationships of HKs in this supergroup. However, interesting findings were made. Notably the presence in the genomes of photosynthetic diatoms and brown algae of genes encoding HKs that bear within their N-termini a CHASE domain, the characteristic feature of plant cytokinin receptors (Figure 8). In addition, we described here for the first time the occurrence of ethylene receptor homologs in photosynthetic diatoms (Figure 8). It is currently admitted that the diatom/brown algal lineage underwent an ancient secondary endosymbiosis events involving engulfment of a red alga by a stramenopile protist cell (Brodie et al. 2017). It is thus possible that phytohormone-like receptors were acquired by some Stramenopiles lineages via this secondary endosymbiosis. This in line with the current theory for the acquisition of HKs in eukaryotic lineages which would be based on both the early mitochondrial endosymbiosis and the later endosymbiosis involving cyanobacterium-like ancestors that gave rise to plastids (Schaller et al. 2011). We also observed indications that brown algal HK gene complements may have been enriched by exchanges with large DNA viruses, mediated by insertions of the genomes of these viruses into algal genomes. Inserted viral DNA containing HK genes was detected in *Ectocarpus* sp., for example. Moreover, not only did most of the *bone fida* algal HK genes share a high level of similarity with viral genes or cluster with them in phylogenetic trees but they also tended to be intron-poor, which is unusual for brown algal genes but is a typical feature of viral genomes. Taken together, these observations suggest that both endosymbiotic and other horizontal gene transfer mechanisms may have played an important role during the evolutionary history of stramenopile HKs.

CONCLUDING REMARKS

This study provides a preliminary overview of the structure and distribution of HKs in Eukaryota (**Figure 8**). Whereas HKs had been previously identified in plants, fungi and Amoebozoa, we present here the first description of this family of HK proteins in unexplored clades such as Apusozoa, Excavata, and SAR. We observed conservation of some HK groups that are putatively involved in crucial physiological processes including light perception, hormone sensing, development, and stress adaptation within eukaryotic supergroups (**Figure 8**). We show that data concerning the function of HK groups can be combined with robust phylogenetic analysis to decipher the evolutionary history and currently known functions of HKs, notably by correlating the presence of specific domain topologies with physiological traits. This approach was applied for the Archaeplastida and, to a lesser extent, for the Opisthokonta (mainly fungi). Critically, phylogenetic analysis suggested that cytokinin and/or ethylene signaling systems are not only found in plants but may also occur in various other eukaryotic (brown algae, diatoms, amoebae, fungi, and Mesomycetozoa) (this study and [Hérivaux et al. 2017](#)) and prokaryotic (cyanobacteria and eubacteria) clades ([Lacey and Binder 2016](#), [Wang et al. 2017](#); [Kabbara et al. 2018](#)) where they probably regulate cellular processes in a functional context with chemotaxis, developmental processes, and inter-kingdom communication.

In conclusion, this analysis extends our knowledge of the dissemination and the evolution of TCS signaling pathways in eukaryotes. However, it remains essential in the near future to accelerate the acquisition of data concerning the functions of eukaryotic HKs, notably for pathogenic fungi, Metamonada (*T. vaginalis*), Discoba (*N. gruberi*), and oomycetes. This could shed light on their potential as new targets for antimicrobial development, as suggested over the past few years for bacteria ([Bem et al. 2015](#)).

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank the U.S. Department of Energy Joint Genome Institute and the PIs of the 1000 Fungal Genomes Project (J. Spatafora, A. Gryganskyi, T. James, M.E. Smith, and J. Magnuson) for permission to use the *Usnea florida*, *Syncephalis plumigaleata*, *Umbelopsis ramanniana*, and *Ramicandelaber brevisporus* genome data before publication. We also acknowledge the Broad Institute Genome Sequencing Platform for making the *Thecamonas trahens* genome publicly available. We thank S. Gribaldo (Institut Pasteur, Paris) for constructive conversations about this manuscript. Samar Kabbara was supported by a fellowship from association AZM. Anaïs Hérivaux was supported by a fellowship from the University of Angers. Nicolas Papon was funded by the Agence Nationale de la Recherche (program ANR-PRCE Mycormones).

REFERENCES

- ✓ Akiyoshi DE, *et al.* Genomic survey of the non-cultivable opportunistic human pathogen, *Enterocytozoon bieneusi*. PLoS Pathog. **2009** Jan;5(1):e1000261.
- ✓ Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. J Mol Biol. **1990** Oct 5;215(3):403-10.
- ✓ Amborella Genome Project. The *Amborella* genome and the evolution of flowering plants. Science. **2013** Dec 20;342(6165):1241089.
- ✓ Anantharaman V, Aravind L. The CHASE domain: a predicted ligand-binding module in plant cytokinin receptors and other eukaryotic and bacterial receptors. Trends Biochem Sci. **2001** Oct;26(10):579-82.
- ✓ Appleby JL, Parkinson JS, Bourret RB. Signal transduction via the multi-step phosphorelay: not necessarily a road less traveled. Cell. **1996** Sep 20;86(6):845-8.
- ✓ Aranda M, *et al.* Genomes of coral dinoflagellate symbionts highlight evolutionary adaptations conducive to a symbiotic lifestyle. Sci Rep. **2016** Dec 22;6:39734.
- ✓ Aravind L, Ponting CP. The cytoplasmic helical linker domain of receptor histidine kinase and methyl-accepting proteins is common to many prokaryotic signalling proteins. FEMS Microbiol Lett. **1999** Jul 1;176(1):111-6.
- ✓ Aravind L, Ponting CP. The GAF domain: an evolutionary link between diverse phototransducing proteins. Trends Biochem Sci. **1997** Dec;22(12):458-9.
- ✓ Attwood PV. Histidine kinases from bacteria to humans. Biochem Soc Trans. **2013** Aug;41(4):1023-8.
- ✓ Aury JM, *et al.* Global trends of whole-genome duplications revealed by the ciliate *Paramecium tetraurelia*. Nature. **2006** Nov 9;444(7116):171-8
- ✓ Bahn YS, Kojima K, Cox GM, Heitman J. A unique fungal two-component system regulates stress responses, drug sensitivity, sexual development, and virulence of *Cryptococcus neoformans*. Mol Biol Cell. **2006** Jul;17(7):3122-35.
- ✓ Banks JA, *et al.* The *Selaginella* genome identifies genetic changes associated with the evolution of vascular plants. Science. **2011** May 20;332(6032):960-3.
- ✓ Bayram O, Braus GH, Fischer R, Rodriguez-Romero J. Spotlight on *Aspergillus nidulans* photosensory systems. Fungal Genet Biol. **2010** Nov;47(11):900-8.
- ✓ Bem AE, *et al.* Bacterial histidine kinases as novel antibacterial drug targets. ACS Chem Biol. **2015** Jan 16;10(1):213-24.
- ✓ Bemm F, Schwarz R, Förster F, Schultz J. A kinome of 2600 in the ciliate *Paramecium tetraurelia*. FEBS Lett. **2009** Nov 19;583(22):3589-92.
- ✓ Bischoff DS, Ordal GW. *Bacillus subtilis* chemotaxis: a deviation from the *Escherichia coli* paradigm. Mol Microbiol. **1992** Jan;6(1):23-8.
- ✓ Bowler C, *et al.* The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. Nature. **2008** Nov 13;456(7219):239-44.
- ✓ Bowman JL, *et al.* Insights into land plant evolution garnered from the *Marchantia polymorpha* genome. Cell. **2017** Oct 5;171(2):287-304.e15.
- ✓ Brayton KA, *et al.* Genome sequence of *Babesia bovis* and comparative analysis of apicomplexan hemoprotozoa. PLoS Pathog. **2007** Oct 19;3(10):1401-13.
- ✓ Brodie J, *et al.* Biotic interactions as drivers of algal origin and evolution. New Phytol. **2017** Nov;216(3):670-681.
- ✓ Carlton JM, *et al.* Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*. Science. **2007** Jan 12;315(5809):207-12.
- ✓ Cashmore AR. Higher-plant phytochrome: "I used to date histidine, but now I prefer serine". Proc Natl Acad Sci U S A. **1998** Nov 10;95(23):13358-60.
- ✓ Catlett NL, Yoder OC, Turgeon BG. Whole-genome analysis of two-component signal transduction genes in fungal pathogens. Eukaryot Cell. **2003** Dec;2(6):1151-61.
- ✓ Cavalier-Smith T, *et al.* Multigene phylogeny resolves deep branching of Amoebozoa. Mol Phylogenet Evol. **2015** Feb;83:293-304.
- ✓ Chang Y, *et al.* Phylogenomic analyses indicate that early fungi evolved digesting cell walls of algal ancestors of land plants. Genome Biol Evol. **2015** May 14;7(6):1590-601.
- ✓ Chefdor F, *et al.* Osmotic stress sensing in *Populus*: components identification of a phosphorelay system. FEBS Lett. **2006** Jan 9;580(1):77-81.

- ✓ Cisse OH, *et al.* Genome sequencing of the plant pathogen *Taphrina deformans*, the causal agent of peach leaf curl. *Mbio*. **2013** Apr 30;4(3):e00055-13.
- ✓ Clark KL, Larsen PB, Wang X, Chang C. Association of the *Arabidopsis* CTR1 Raf-like kinase with the ETR1 and ERS ethylene receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1998** Apr 28;95(9):5401-6.
- ✓ Clarke M, *et al.* Genome of *Acanthamoeba castellanii* highlights extensive lateral gene transfer and early evolution of tyrosine kinase signaling. *Genome Biol*. **2013** Feb 1;14(2):R11.
- ✓ Clemons KV, Miller TK, Selitrennikoff CP, Stevens DA. Fos-1, a putative histidine kinase as a virulence factor for systemic aspergillosis. *Med Mycol*. **2002** Jun;40(3):259-62.
- ✓ Cock JM, *et al.* The *Ectocarpus* genome and the independent evolution of multicellularity in brown algae. *Nature*. **2010** Jun 3;465(7298):617-21.
- ✓ Cormier A, *et al.* Re-annotation, improved large-scale assembly and establishment of a catalogue of noncoding loci for the genome of the model brown alga *Ectocarpus*. *New Phytol*. **2017** Apr;214(1):219-232.
- ✓ Crosson S, Rajagopal S, Moffat K. The LOV domain family: photoresponsive signaling modules coupled to diverse output domains. *Biochemistry*. **2003** Jan 14;42(1):2-10.
- ✓ Cuomo CA, *et al.* The *Fusarium graminearum* genome reveals a link between localized polymorphism and pathogen specialization. *Science*. **2007** Sep 7;317(5843):1400-2.
- ✓ Curtis BA, *et al.* Algal genomes reveal evolutionary mosaicism and the fate of nucleomorphs. *Nature*. **2012** Dec 6;492(7427):59-65.
- ✓ Defosse TA, *et al.* Hybrid histidine kinases in pathogenic fungi. *Mol Microbiol*. **2015** Mar;95(6):914-24.
- ✓ Delaroque N, Boland W. The genome of the brown alga *Ectocarpus siliculosus* contains a series of viral DNA pieces, suggesting an ancient association with large dsDNA viruses. *BMC Evol Biol*. **2008** Apr 12;8:110.
- ✓ Delaroque N, *et al.* The complete DNA sequence of the *Ectocarpus siliculosus* Virus EsV-1 genome. *Virology*. **2001** Aug 15;287(1):112-32.
- ✓ Du Q, Kawabe Y, Schilde C, Chen Z-H, Schaap P. The evolution of aggregative multicellularity and cell-cell communication in the Dictyostelia. *J Mol Biol*. **2015** Nov 20;427(23):3722-33.
- ✓ Duanmu D, *et al.* Marine algae and land plants share conserved phytochrome signaling systems. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2014** Nov 4;111(44):15827-32.
- ✓ Duplessis S, *et al.* Obligate biotrophy features unraveled by the genomic analysis of rust fungi. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2011** May 31;108(22):9166-71.
- ✓ Eichinger L, *et al.* The genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Nature*. **2005** May 5;435(7038):43-57.
- ✓ Eisen JA, *et al.* Macronuclear genome sequence of the ciliate *Tetrahymena thermophila*, a model eukaryote. *PloS Biol*. **2006** Sep;4(9):e286.
- ✓ Fritz-Laylin LK, *et al.* The genome of *Naegleria gruberi* illuminates early eukaryotic versatility. *Cell*. **2010** Mar 5;140(5):631-42.
- ✓ Gallie DR. Appearance and elaboration of the ethylene receptor family during land plant evolution. *Plant Mol Biol*. **2015** Mar;87(4-5):521-39.
- ✓ Galperin MY, Makarova KS, Wolf YI, Koonin EV. Phyletic distribution and lineage-specific domain architectures of archaeal two-component signal transduction systems. *J Bacteriol*. **2018** Mar 12;200(7).
- ✓ Gardner MJ, *et al.* Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature*. **2002** Oct 3;419(6906):498-511.
- ✓ Gargantini PR, *et al.* Antigenic variation in the intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Curr Opin Microbiol*. 2016 Aug;32:52-8.
- ✓ Gazis R, *et al.* The genome of *Xylona heveae* provides a window into fungal endophytism. *Fungal Biol*. **2016** Jan;120(1):26-42.
- ✓ Glantz ST, Carpenter EJ, Melkonian M, Gardner KH, Boyden ES, Wong GK, Chow BY. Functional and topological diversity of LOV domain photoreceptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2016** Mar 15;113(11):E1442-51.
- ✓ Glöckner G, *et al.* The genome of the foraminiferan *Reticulomyxa filosa*. *Curr Biol CB*. **2014** Jan 6;24(1):11-8.
- ✓ Gobler CJ, *et al.* Niche of harmful alga *Aureococcus anophagefferens* revealed through ecogenomics. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2011** Mar 15;108(11):4352-7.
- ✓ Grant JR, Katz LA. Building a phylogenomic pipeline for the eukaryotic tree of life - addressing deep phylogenies with genome-scale data. *PloS Curr*. **2014** Apr 2;6.
- ✓ Grebe TW, Stock JB. The histidine protein kinase superfamily. *Adv Microb Physiol*. **1999**;41:139-227.

- ✓ Grigoriev IV, *et al.* MycoCosm portal: gearing up for 1000 fungal genomes. *Nucleic Acids Res.* **2014** Jan;42(Database issue):D699-704.
- ✓ Gruhn N, Halawa M, Snel B, Seidl MF, Heyl A. A subfamily of putative cytokinin receptors is revealed by an analysis of the evolution of the two-component signaling system of plants. *Plant Physiol.* **2014** May;165(1):227–37.
- ✓ Gulia-Nuss M, *et al.* Genomic insights into the *Ixodes scapularis* tick vector of Lyme disease. *Nat Commun.* **2016** Feb 9;7:10507.
- ✓ Haitjema CH, *et al.* A parts list for fungal cellulosomes revealed by comparative genomics. *Nat Microbiol.* **2017** May 30;2:17087.
- ✓ Hargreaves KR, Kropinski AM, Clokie MR. What does the talking?: quorum sensing signalling genes discovered in a bacteriophage genome. *PLoS One.* **2014** Jan 24;9(1):e85131.
- ✓ He Y, *et al.* Genome-wide identification and expression analysis of two-component system genes in tomato. *Int J Mol Sci.* **2016** Jul 26;17(8).
- ✓ Heidel AJ, *et al.* Phylogeny-wide analysis of social amoeba genomes highlights ancient origins for complex intercellular communication. *Genome Res.* **2011** Nov;21(11):1882–91.
- ✓ Hérivaux A, *et al.* The identification of phytohormone receptor homologs in early diverging fungi suggests a role for plant sensing in land colonization by fungi. *mBio.* **2017** Jan 31;8(1).
- ✓ Hérivaux A, *et al.* Major sensing proteins in pathogenic fungi: the hybrid histidine kinase family. *PLoS Pathog.* **2016** Jul;12(7):e1005683.
- ✓ Hillmann F, *et al.* Multiple roots of fruiting body formation in Amoebozoa. *Genome Biol Evol.* **2018** Feb 1;10(2):591-606.
- ✓ Hori K, *et al.* *Klebsormidium flaccidum* genome reveals primary factors for plant terrestrial adaptation. *Nat Commun.* **2014** May 28;5:3978.
- ✓ Hughes AL, Friedman R. A survey of schistosome protein domain types: insights into unique biological properties. *Mol Biochem Parasitol.* **2011** Jun;177(2):100–5.
- ✓ Hwang I, Chen H-C, Sheen J. Two-component signal transduction pathways in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **2002** Jun;129(2):500–15.
- ✓ Ishida K, Yamashino T, Nakanishi H, Mizuno T. Classification of the genes involved in the two-component system of the moss *Physcomitrella patens*. *Biosci Biotechnol Biochem.* **2010**;74(12):2542–5.
- ✓ Jackson AP, *et al.* The genome sequence of *Trypanosoma brucei gambiense*, causative agent of chronic human african trypanosomiasis. *PLoS Negl Trop Dis.* **2010** Apr 13;4(4):e658.
- ✓ Jacob S, Foster AJ, Yemelin A, Thines E. Histidine kinases mediate differentiation, stress response, and pathogenicity in *Magnaporthe oryzae*. *Microbiologyopen.* **2014** Oct;3(5):668-87.
- ✓ James TY, *et al.* Shared signatures of parasitism and phylogenomics unite *Cryptomycota* and *Microsporidia*. *Curr Biol.* **2013** Aug 19;23(16):1548-53.
- ✓ Jones T, *et al.* The diploid genome sequence of *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2004** May 11;101(19):7329-34.
- ✓ Joseph SJ, *et al.* The Alveolate *Perkinsus marinus*: biological insights from EST gene discovery. *BMC Genomics.* **2010** Apr 7;11:228.
- ✓ Jung K, Fried L, Behr S, Heermann R. Histidine kinases and response regulators in networks. *Curr Opin Microbiol.* **2012** Apr;15(2):118–24.
- ✓ Kabbara S, Schmölling T, Papon N. CHASEing cytokinin receptors in plants, bacteria, fungi, and beyond. *Trends Plant Sci.* **2018** Mar;23(3):179-181.
- ✓ Kakimoto T. CKI1, a histidine kinase homolog implicated in cytokinin signal transduction. *Science.* **1996** Nov 8;274(5289):982–5.
- ✓ Kamper J, *et al.* Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature.* **2006** Nov 2;444(7115):97-101.
- ✓ Kateriya S, Nagel G, Bamberg E, Hegemann P. "Vision" in single-celled algae. *News Physiol Sci Int J Physiol Prod Jointly Int Union Physiol Sci Am Physiol Soc.* **2004** Jun;19:133–7.
- ✓ Kemen E, *et al.* Gene gain and loss during evolution of obligate parasitism in the white rust pathogen of *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Biol.* **2011** Jul;9(7):e1001094.
- ✓ Kianianmomeni A, Hallmann A. Algal photoreceptors: in vivo functions and potential applications. *Planta.* **2014** Jan;239(1):1-26.
- ✓ Kim D, Forst S. Genomic analysis of the histidine kinase family in bacteria and archaea. *Microbiol Read Engl.* **2001** May;147(Pt 5):1197–212.

- ✓ King N, *et al.* The genome of the choanoflagellate *Monosiga brevicollis* and the origin of metazoans. *Nature*. **2008** Feb 14;451(**7180**):783–8.
- ✓ Kooß S, Lamparter T. Cyanobacterial origin of plant phytochromes. *Protoplasma*. **2017** Jan;254(**1**):603–7.
- ✓ Krogh A, Larsson B, von Heijne G, Sonnhammer EL. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol*. **2001** Jan 19;305(**3**):567–80.
- ✓ Kuwayama H, Kubohara Y. Differentiation-inducing factor 2 modulates chemotaxis via the histidine kinase DhkC-dependent pathway in *Dictyostelium discoideum*. *FEBS Lett*. **2016** Mar;590(**6**):760–8.
- ✓ Lacey RF, Binder BM. Ethylene regulates the physiology of the *Cyanobacterium Synechocystis* sp. PCC 6803 via an ethylene receptor. *Plant Physiol*. **2016**;171(**4**):2798–809.
- ✓ Lavín JL, Ramírez L, Ussery DW, Pisabarro AG, Oguiza JA. Genomic analysis of two-component signal transduction proteins in basidiomycetes. *J Mol Microbiol Biotechnol*. **2010**;18(**2**):63–73.
- ✓ Lavín JL, Sarasola-Puente V, Ramírez L, Pisabarro AG, Oguiza JA. Dual-histidine kinases in basidiomycete fungi. *C R Biol*. **2014** Feb;337(**2**):111–6.
- ✓ Le SQ, Gascuel O. LG: An improved, general amino-acid replacement matrix. *Molecular Biology and Evolution*. **2008** 25(**7**):1307–20.
- ✓ Li D, Agrellos OA, Calderone R. Histidine kinases keep fungi safe and vigorous. *Curr Opin Microbiol*. **2010** Aug;13(**4**):424–30.
- ✓ Liu Z, *et al.* Genome-wide identification, phylogeny, duplication, and expression analyses of two-component system genes in Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *Pekinensis*). *DNA Res Int J Rapid Publ Rep Genes Genomes*. **2014** Aug;21(**4**):379–96.
- ✓ Loftus B, *et al.* The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. *Nature*. **2005** Feb 24;433(**7028**):865–8.
- ✓ Loftus BJ, *et al.* The genome of the basidiomycetous yeast and human pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Science*. **2005** Feb 25;307(**5713**):1321–4.
- ✓ Lorenzi H, *et al.* Local admixture of amplified and diversified secreted pathogenesis determinants shapes mosaic *Toxoplasma gondii* genomes. *Nat Commun*. **2016** Jan 7;**7**:10147.
- ✓ Luck M, *et al.* A photochromic histidine kinase rhodopsin (HKR1) that is bimodally switched by ultraviolet and blue light. *J Biol Chem*. **2012** Nov 16;287(**47**):40083–90.
- ✓ Malpica R, Sandoval GRP, Rodríguez C, Franco B, Georgellis D. Signaling by the arc two-component system provides a link between the redox state of the quinone pool and gene expression. *Antioxid Redox Signal*. **2006** Jun;8(**5–6**):781–95.
- ✓ Marchler-Bauer A, *et al.* CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures. *Nucleic Acids Res*. **2017** Jan 4;45(**D1**):D200–D203.
- ✓ Martin F, *et al.* Perigord black truffle genome uncovers evolutionary origins and mechanisms of symbiosis. *Nature*. **2010** Apr 15;464(**7291**):1033–8.
- ✓ Mascher T, Helmann JD, Uden G. Stimulus perception in bacterial signal-transducing histidine kinases. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR*. **2006** Dec;70(**4**):910–38.
- ✓ Matsuzaki M, *et al.* Genome sequence of the ultrasmall unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae* 10D. *Nature*. **2004** Apr 8;428(**6983**):653–7.
- ✓ Mira-Rodado V, *et al.* Identification of two-component system elements downstream of AHK5 in the stomatal closure response of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signal Behav*. **2012** Nov;7(**11**):1467–76.
- ✓ Möglich A, Ayers RA, Moffat K. Structure and signaling mechanism of Per-ARNT-Sim domains. *Struct Lond Engl* 1993. **2009** Oct 14;17(**10**):1282–94.
- ✓ Mondo SJ, *et al.* Widespread adenine N6-methylation of active genes in fungi. *Nat Genet*. **2017** Jun;49(**6**):964–968.
- ✓ Morrison HG, *et al.* Genomic minimalism in the early diverging intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Science*. **2007** Sep 28;317(**5846**):1921–6.
- ✓ Mougel C, Zhulin IB. CHASE: an extracellular sensing domain common to transmembrane receptors from prokaryotes, lower eukaryotes and plants. *Trends Biochem Sci*. **2001** Oct;26(**10**):582–4.
- ✓ Neale DB, *et al.* Decoding the massive genome of loblolly pine using haploid DNA and novel assembly strategies. *Genome Biol*. **2014** Mar 4;15(**3**):R59.
- ✓ Neave MJ, Michell CT, Apprill A, Voolstra CR. Endozoicomonas genomes reveal functional adaptation and plasticity in bacterial strains symbiotically associated with diverse marine hosts. *Sci Rep*. **2017** Jan 17;**7**:40579.
- ✓ Nierman WC, *et al.* Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *Nature*. **2005** Dec 22;438(**7071**):1151–6.

- ✓ Osakabe Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, Tran LS. Sensing the environment: key roles of membrane-localized kinases in plant perception and response to abiotic stress. *J Exp Bot.* **2013** Jan;64(2):445-58.
- ✓ Papadopoulos JS, Agarwala R. COBALT: constraint-based alignment tool for multiple protein sequences. *Bioinforma Oxf Engl.* **2007** May 1;23(9):1073-9.
- ✓ Pareek A, *et al.* Whole-genome analysis of *Oryza sativa* reveals similar architecture of two-component signaling machinery with Arabidopsis. *Plant Physiol.* **2006** Oct;142(2):380-97.
- ✓ Peacock CS, *et al.* Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nat Genet.* **2007** Jul;39(7):839-47.
- ✓ Pekárová B, *et al.* Structural aspects of multistep phosphorelay-mediated signaling in Plants. *Mol Plant.* **2016** Jan 4;9(1):71-85.
- ✓ Pischke MS, *et al.* An *Arabidopsis* histidine kinase is essential for megagametogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2002** Nov 26;99(24):15800-5.
- ✓ Price DC, *et al.* *Cyanophora paradoxa* genome elucidates origin of photosynthesis in algae and plants. *Science.* **2012** Feb 17;335(6070):843-7.
- ✓ Prochnik SE, *et al.* Genomic analysis of organismal complexity in the multicellular green alga *Volvox carteri*. *Science.* **2010** Jul 9;329(5988):223-6.
- ✓ Puthiyaveetil S, Allen JF. Chloroplast two-component systems: evolution of the link between photosynthesis and gene expression. *Proc Biol Sci.* **2009** Jun 22;276(1665):2133-45.
- ✓ Puthiyaveetil S, *et al.* The ancestral symbiont sensor kinase CSK links photosynthesis with gene expression in chloroplasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2008** Jul 22;105(29):10061-6.
- ✓ Puthiyaveetil S, Ibrahim IM, Allen JF. Evolutionary rewiring: a modified prokaryotic gene-regulatory pathway in chloroplasts. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* **2013** Jun 10;368(1622):20120260.
- ✓ Puthiyaveetil S, Ibrahim IM, Jelčić B, Tomasić A, Fulgosi H, Allen JF. Transcriptional control of photosynthesis genes: the evolutionarily conserved regulatory mechanism in plastid genome function. *Genome Biol Evol.* **2010**;2:888-96.
- ✓ Putnam NH, *et al.* Sea anemone genome reveals ancestral eumetazoan gene repertoire and genomic organization. *Science.* **2007** Jul 6;317(5834):86-94.
- ✓ R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. **2013** URL <http://www.R-project.org/>.
- ✓ Read BA, *et al.* Pan genome of the phytoplankton *Emiliania* underpins its global distribution. *Nature.* **2013** Jul 11;499(7457):209-13.
- ✓ Rensing SA, *et al.* The *Physcomitrella* genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants. *Science.* **2008** Jan 4;319(5859):64-9.
- ✓ Rockwell NC, *et al.* Eukaryotic algal phytochromes span the visible spectrum. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2014** Mar 11;111(10):3871-6. Doi: 10.1073/pnas.1401871111.
- ✓ Rockwell NC, Lagarias JC. Phytochrome diversification in cyanobacteria and eukaryotic algae. *Curr Opin Plant Biol.* **2017** Jun;37:87-93.
- ✓ Schaap P, *et al.* The *Physarum polycephalum* Genome Reveals Extensive Use of Prokaryotic Two-Component and Metazoan-Type Tyrosine Kinase Signaling. *Genome Biol Evol.* **2016** Jan; 8(1): 109-125.
- ✓ Schaap P. Evolutionary crossroads in developmental biology: *Dictyostelium discoideum*. *Dev Camb Engl.* **2011** Feb;138(3):387-96.
- ✓ Schaller GE, Kieber JJ, Shiu S-H. Two-component signaling elements and histidyl-aspartyl phosphorelays. *Arab Book.* **2008**;6:e0112.
- ✓ Schaller GE, Shiu SH, Armitage JP. Two-component systems and their co-option for eukaryotic signal transduction. *Curr Biol.* **2011** May 10;21(9):R320-30.
- ✓ Schliep KP. Phangorn: phylogenetic analysis in R. *Bioinforma Oxf Engl.* **2011** Feb 15;27(4):592-3.
- ✓ Schultz J, Milpetz F, Bork P, Ponting CP. SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1998** May 26;95(11):5857-64.
- ✓ Schwelm A, *et al.* The *Plasmodiophora brassicae* genome reveals insights in its life cycle and ancestry of chitin synthases. *Sci Rep.* **2015** Jun 18;5:11153.
- ✓ Shadwick LL, Spiegel FW, Shadwick JDL, Brown MW, Silberman JD. Eumycetozoa = Amoebozoa?: SSUrDNA phylogeny of protosteloid slime molds and its significance for the amoebozoan supergroup. *PLoS One.* **2009** Aug 25;4(8):e6754.
- ✓ Shor E, Chauhan N. A case for two-component signaling systems as antifungal drug targets. *PLoS Pathog.* **2015** Feb;11(2):e1004632.
- ✓ Sievers F, *et al.* Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol.* **2011** Oct 11;7:539.

- ✓ Simakov O, *et al.* Insights into bilaterian evolution from three spiralian genomes. *Nature*. **2013** Jan 24;493(7433):526–31.
- ✓ Singh R, *et al.* Oil palm genome sequence reveals divergence of interfertile species in Old and New worlds. *Nature*. **2013** Aug 15;500(7462):335–9.
- ✓ Singleton CK, Zinda MJ, Mykytko B, Yang P. The histidine kinase dhkC regulates the choice between migrating slugs and terminal differentiation in *Dictyostelium discoideum*. *Dev Biol*. **1998** Nov 15;203(2):345–57.
- ✓ Staats M, van Kan JA. Genome update of *Botrytis cinerea* strains B05.10 and T4. *Eukaryot Cell*. **2012** Nov;11(11):1413–4.
- ✓ Sugang R, *et al.* Comparative genomics of the social amoebae *Dictyostelium discoideum* and *Dictyostelium purpureum*. *Genome Biol*. **2011**;12(2):R20.
- ✓ Suga H, *et al.* The *Capsaspora* genome reveals a complex unicellular prehistory of animals. *Nat Commun*. **2013**;4:2325.
- ✓ Sullivan JA, Deng XW. From seed to seed: the role of photoreceptors in *Arabidopsis* development. *Dev Biol*. **2003** Aug 15;260(2):289–97.
- ✓ Suzuki I, Kanesaki Y, Mikami K, Kanehisa M, Murata N. Cold-regulated genes under control of the cold sensor Hik33 in *Synechocystis*. *Mol Microbiol*. **2001** Apr;40(1):235–44.
- ✓ Talavera G, Castresana J. Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. *Syst Biol*. **2007** Aug;56(4):564–77.
- ✓ Tanaka T, *et al.* Oil accumulation by the oleaginous diatom *Fistulifera solaris* as revealed by the genome and transcriptome. *Plant Cell*. **2015** Jan;27(1):162–76.
- ✓ Tisserant E, *et al.* Genome of an arbuscular mycorrhizal fungus provides insight into the oldest plant symbiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2013** Dec 10;110(50):20117–22.
- ✓ Troein C, *et al.* Multiple light inputs to a simple clock circuit allow complex biological rhythms. *Plant J Cell Mol Biol*. **2011** Apr;66(2):375–85.
- ✓ Tuskan GA, *et al.* The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science*. **2006** Sep 15;313(5793):1596–604.
- ✓ Uehling J, *et al.* Comparative genomics of *Mortierella elongata* and its bacterial endosymbiont *Mycoavidus cysteinexigens*. *Environ Microbiol*. **2017** Aug;19(8):2964–2983.
- ✓ Urao T, *et al.* A transmembrane hybrid-type histidine kinase in *Arabidopsis* functions as an osmosensor. *Plant Cell*. **1999** Sep;11(9):1743–54.
- ✓ Wang FF, Cheng ST, Wu Y, Ren BZ, Qian W. A bacterial receptor PcrK senses the plant hormone cytokinin to promote adaptation to oxidative stress. *Cell Rep*. **2017** Dec 5;21(10):2940–2951.
- ✓ Wang N, Shaulsky G, Escalante R, Loomis WF. A two-component histidine kinase gene that functions in *Dictyostelium* development. *EMBO J*. **1996** Aug 1;15(15):3890–8.
- ✓ Wang N, Söderbom F, Anjard C, Shaulsky G, Loomis WF. SDF-2 induction of terminal differentiation in *Dictyostelium discoideum* is mediated by the membrane-spanning sensor kinase DhkA. *Mol Cell Biol*. **1999** Jul;19(7):4750–6.
- ✓ Wang W, *et al.* Identification of important regions for ethylene binding and signaling in the transmembrane domain of the ETR1 ethylene receptor of *Arabidopsis*. *Plant Cell*. **2006** Dec;18(12):3429–42.
- ✓ Woo YH, *et al.* Chromerid genomes reveal the evolutionary path from photosynthetic algae to obligate intracellular parasites. *eLife*. **2015** Jul 15;4:e06974.
- ✓ Worden AZ, *et al.* Green evolution and dynamic adaptations revealed by genomes of the marine picoeukaryotes *Micromonas*. *Science*. **2009** Apr 10;324(5924):268–72.
- ✓ Xu F, *et al.* The genome of *Spironucleus salmonicida* highlights a fish pathogen adapted to fluctuating environments. *PLoS Genet*. **2014** Feb;10(2):e1004053.
- ✓ Xu P, *et al.* The genome of *Cryptosporidium hominis*. *Nature*. **2004** Oct 28;431(7012):1107–12.
- ✓ Yang J, *et al.* Genomic and proteomic analyses of the fungus *Arthrobotrys oligospora* provide insights into nematode-trap formation. *PLoS Pathog*. **2011** Sep;7(9):e1002179.
- ✓ Yasumura Y, Pierik R, Fricker MD, Voesebeck LACJ, Harberd NP. Studies of *Physcomitrella patens* reveal that ethylene-mediated submergence responses arose relatively early in land-plant evolution. *Plant J Cell Mol Biol*. **2012** Dec;72(6):947–59.
- ✓ You M, *et al.* A heterozygous moth genome provides insights into herbivory and detoxification. *Nat Genet*. **2013** Feb;45(2):220–5.
- ✓ Yuan L, *et al.* The CKI1 Histidine kinase specifies the female gametic precursor of the endosperm. *Dev Cell*. **2016** Apr 4;37(1):34–46.

- ✓ Zdarska M, *et al.* Illuminating light, cytokinin, and ethylene signalling crosstalk in plant development. *J Exp Bot.* **2015** Aug;66(**16**):4913–31.
- ✓ Zhang F, Jiang Z, Xu A, Zeng Y, Li C. Recent geological events and intrinsic behavior influence the population genetic structure of the chiru and tibetan gazelle on the tibetan plateau. *PloS One.* **2013**;8(**4**):e60712.
- ✓ Zhou X, *et al.* Baiji genomes reveal low genetic variability and new insights into secondary aquatic adaptations. *Nat Commun.* **2013**;4:2708.
- ✓ Zinda MJ, Singleton CK. The hybrid histidine kinase dhkB regulates spore germination in *Dictyostelium discoideum*. *Dev Biol.* **1998** Apr 15;196(**2**):171–83.

FIGURES AND TABLES

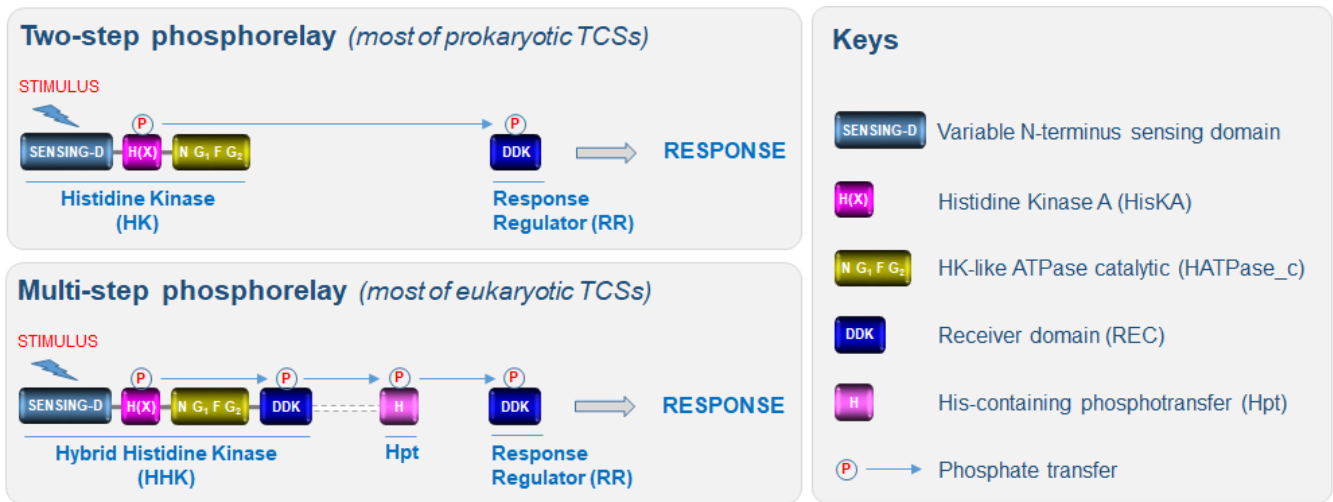


Figure 1. Domain organization and TCSs signaling.

The canonical structure of histidine kinases (HKs) is composed of: (i) a highly variable N-terminal sequence that determines which stimulus is perceived by the HK ("sensing-D"); (ii) and both histidine kinase A (H(X)) (including a phosphorylatable histidine residue in the H-box and an X-box) and histidine kinase-like ATPase catalytic (including four distinct boxes: the N-, G₁-, F-, and G₂-boxes) subdomains. In prokaryotes, two-component systems (TCSs) usually consist of a two-step phosphorelay between a HK and a response regulator (RR). Perception of a stimulus induces autophosphorylation of the HK which thus acts as a primary sensor, and the phosphate is then transferred to a RR which acts as a transcription factor to directly regulate a series of genes required for an adapted response. Most eukaryotic HKs harbor an additional C-terminal receiver domain (REC) characterized by the presence of a three amino-acid signature (DDK). Thus, eukaryotic HKs are generally called hybrid HKs (HHKs). In eukaryotes, TCSs are composed of additional modules, such as the histidine containing phosphotransfer (Hpt) domain and the signaling routes that mediate the perception of stimuli correspond to a multi-step phosphorelay between three families of proteins (HHK, Hpt, and RR). In most eukaryotic TCSs, the RR either acts directly as a transcription factor or governs downstream elements (MAPK cascades, the cAMP pathway, or Raf-like kinases). Note that in a few HKs, the Hpt domain is fused to the REC domain.

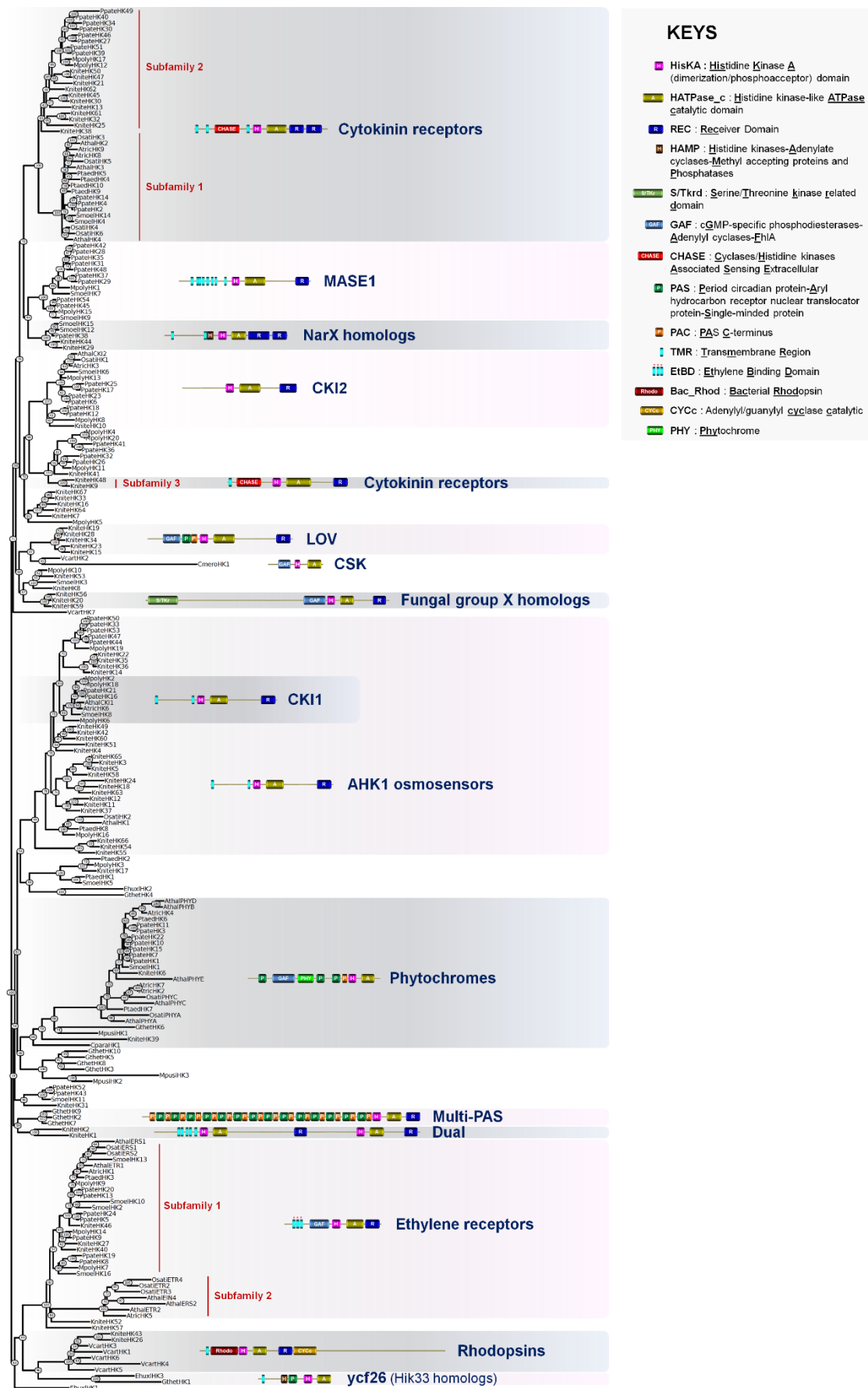
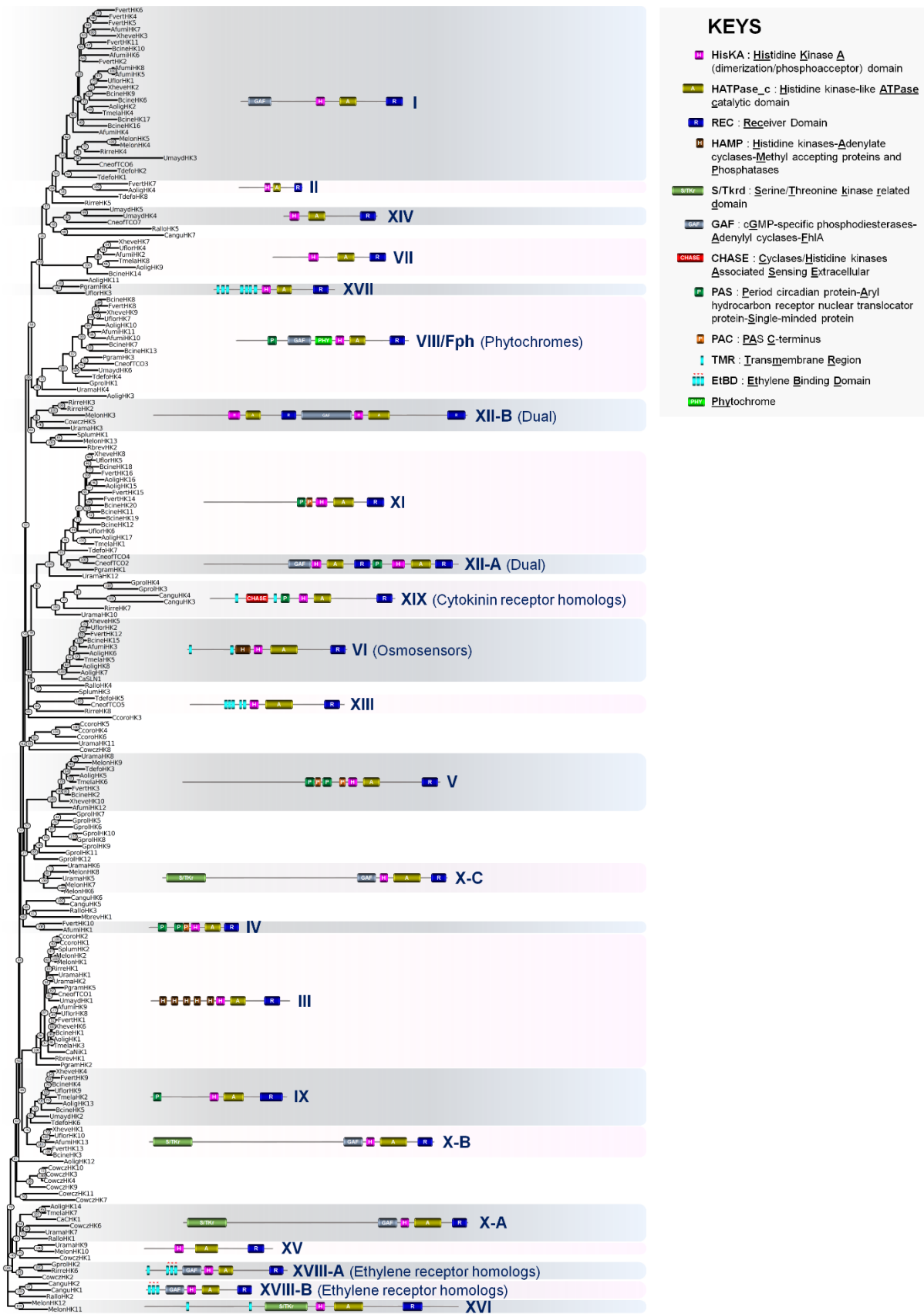


Figure 2. Phylogeny estimation of HK predicted protein sequences in Archaeplastida.

A representative structure is provided for each of defined HK group. Abbreviations: Athal, *Arabidopsis thaliana*; Atric, *Amborella trichopoda*; Cmero, *Cyanidioschyzon merolae*; Cpara, *Cyanophora paradoxa*; Ehuxl, *Emiliana huxleyi*; Gthet, *Guillardia theta*; Knite, *Klebsormidium nitens*; Mpusi, *Micromonas pusilla*; Osati, *Oryza sativa*; Ppate, *Physcomitrella patens*; Ptaed, *Pinus taeda*; Smoel, *Selaginella moellendorffii*; Vcart, *Volvox carteri*.



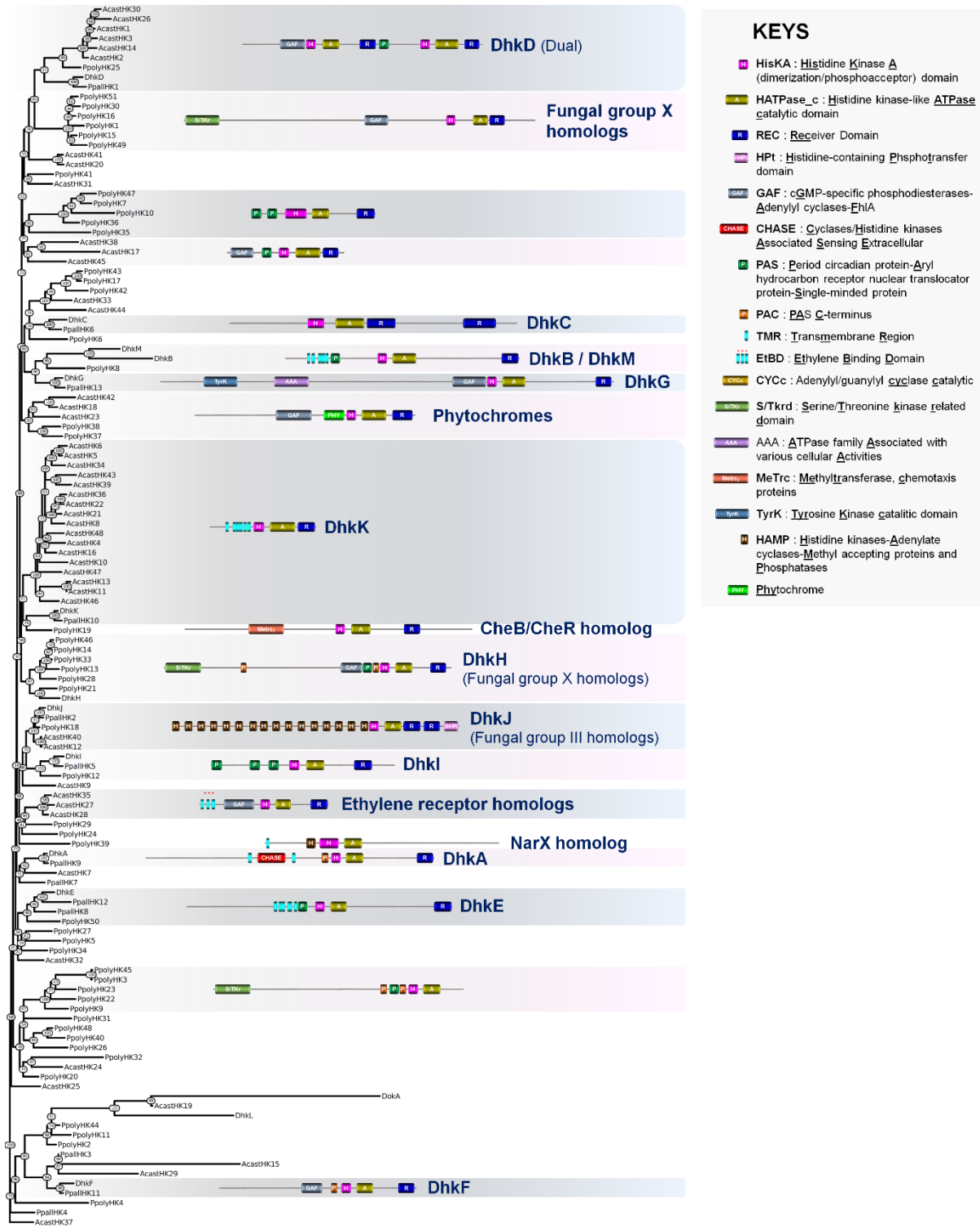


Figure 4. Phylogeny estimation of HK predicted protein sequences in Amoebozoa.

A representative structure is provided for each of defined HK group. Abbreviations: Acast, *Acanthamoeba castellanii*; Ddisc, *Dictyostelium discoideum*; Ppall, *Polysphondylium pallidum*; Ppoly, *Physarum polycephalum*.

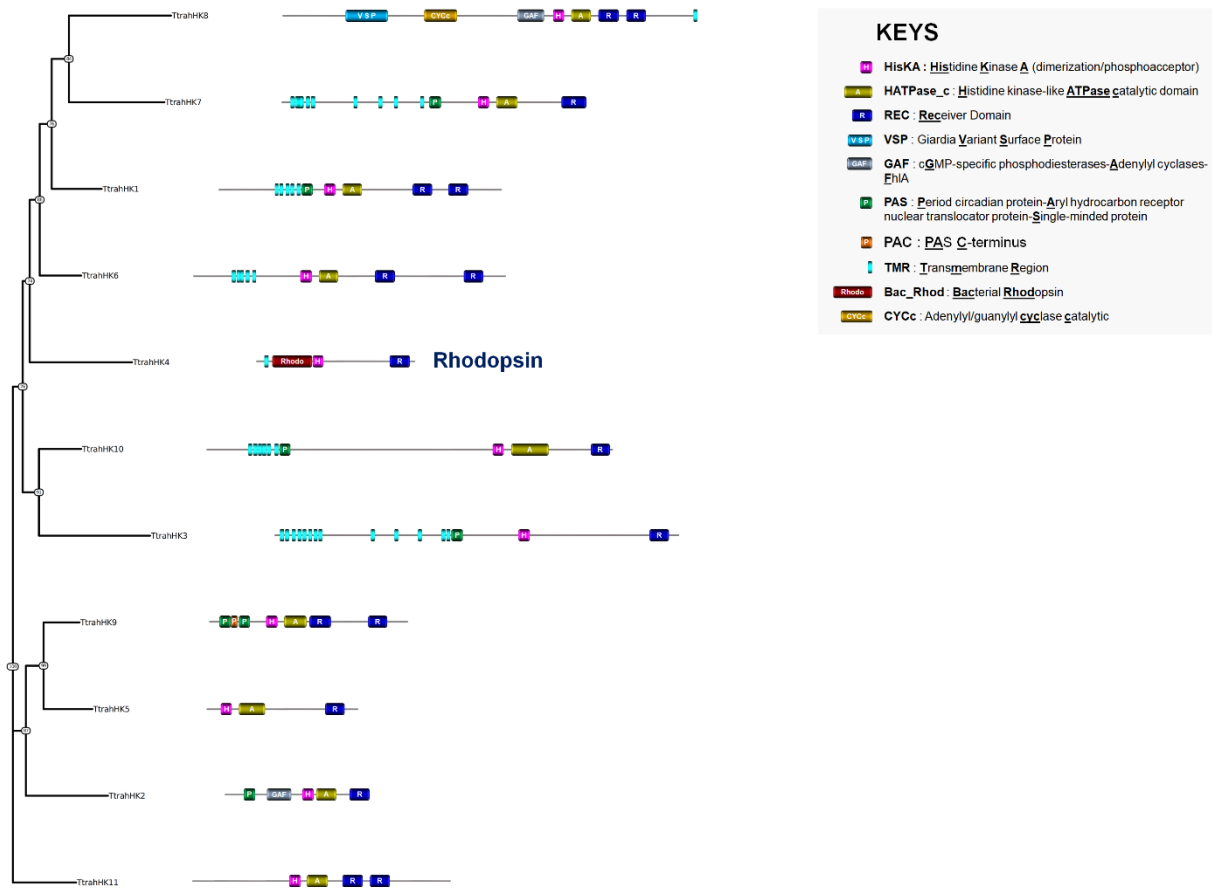


Figure 5. Phylogeny estimation of HK predicted protein sequences in Apusozoa.
The structure of each HK is provided. Abbreviations: Ttrah, *Thecamonas trahens*.

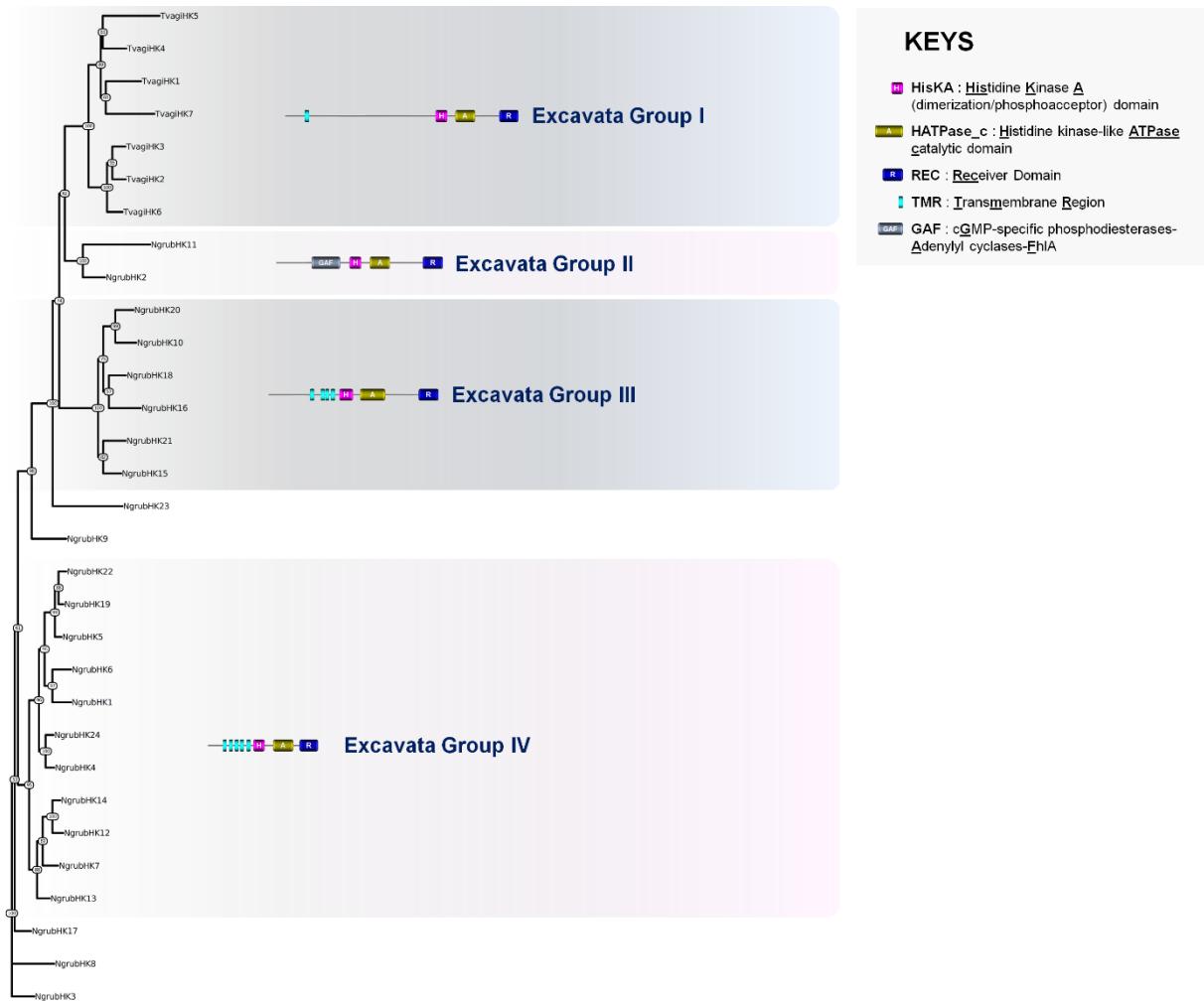


Figure 6. Phylogeny estimation of HK predicted protein sequences in Excavata.

A representative structure is provided for each of defined HK group. Abbreviations: Ngrub, *Naegleria gruberi*; Tvagi, *Trichomonas vaginalis*.

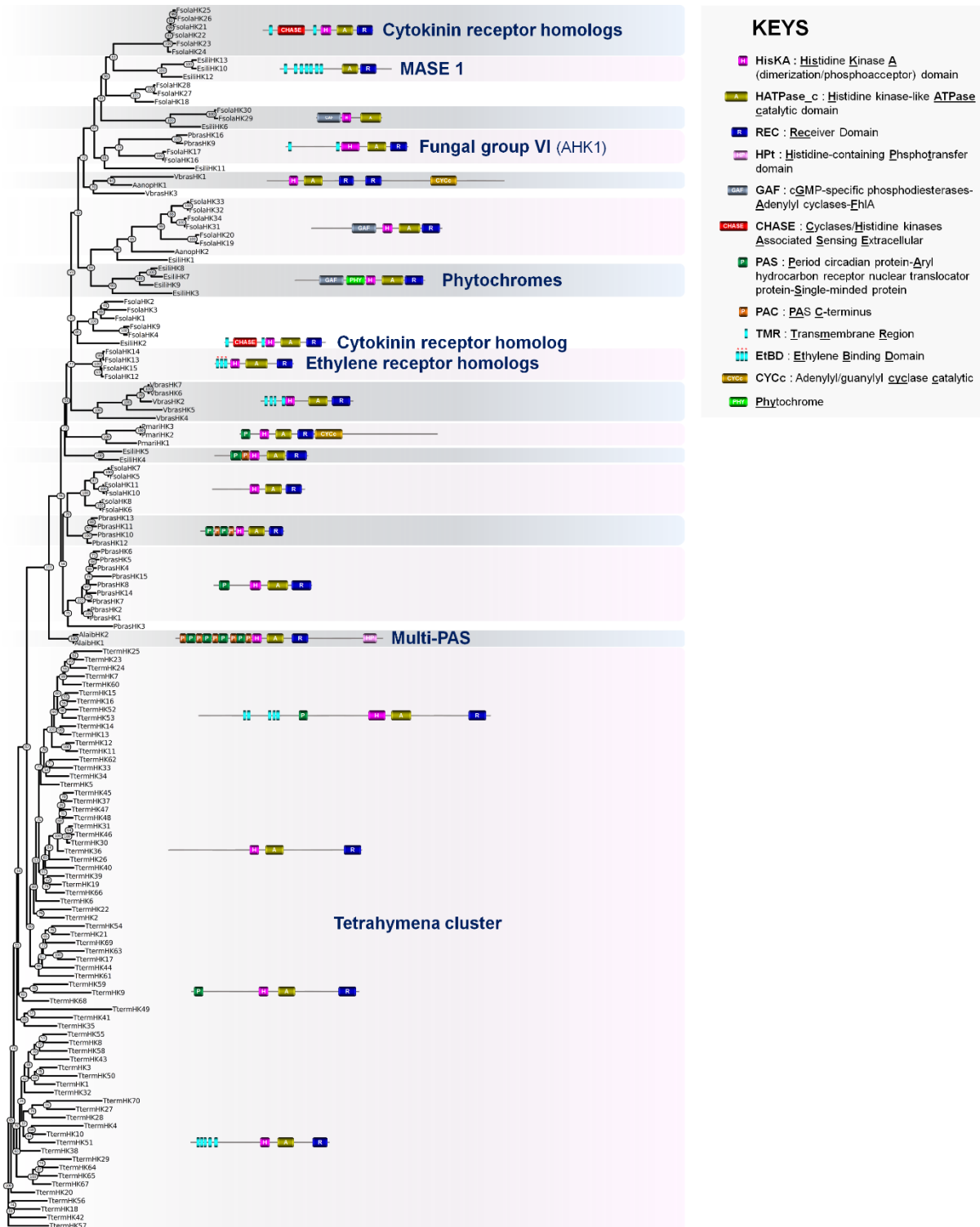


Figure 7. Phylogeny estimation of HK predicted protein sequences in SAR.

A representative structure is provided for each of defined HK group. Abbreviations: Aanop, *Aureococcus anophagefferens*; Alaib, *Albugo laibachii*; Esili, *Ectocarpus siliculosus*; Fsol, *Fistulifera solaris*; Pbras, *Plasmodiophora brassicae*; Pmar, *Perkinsus marinus*; Tterm, *Tetrahymena termophila*; Vbras, *Vitrella brassicaformis*.

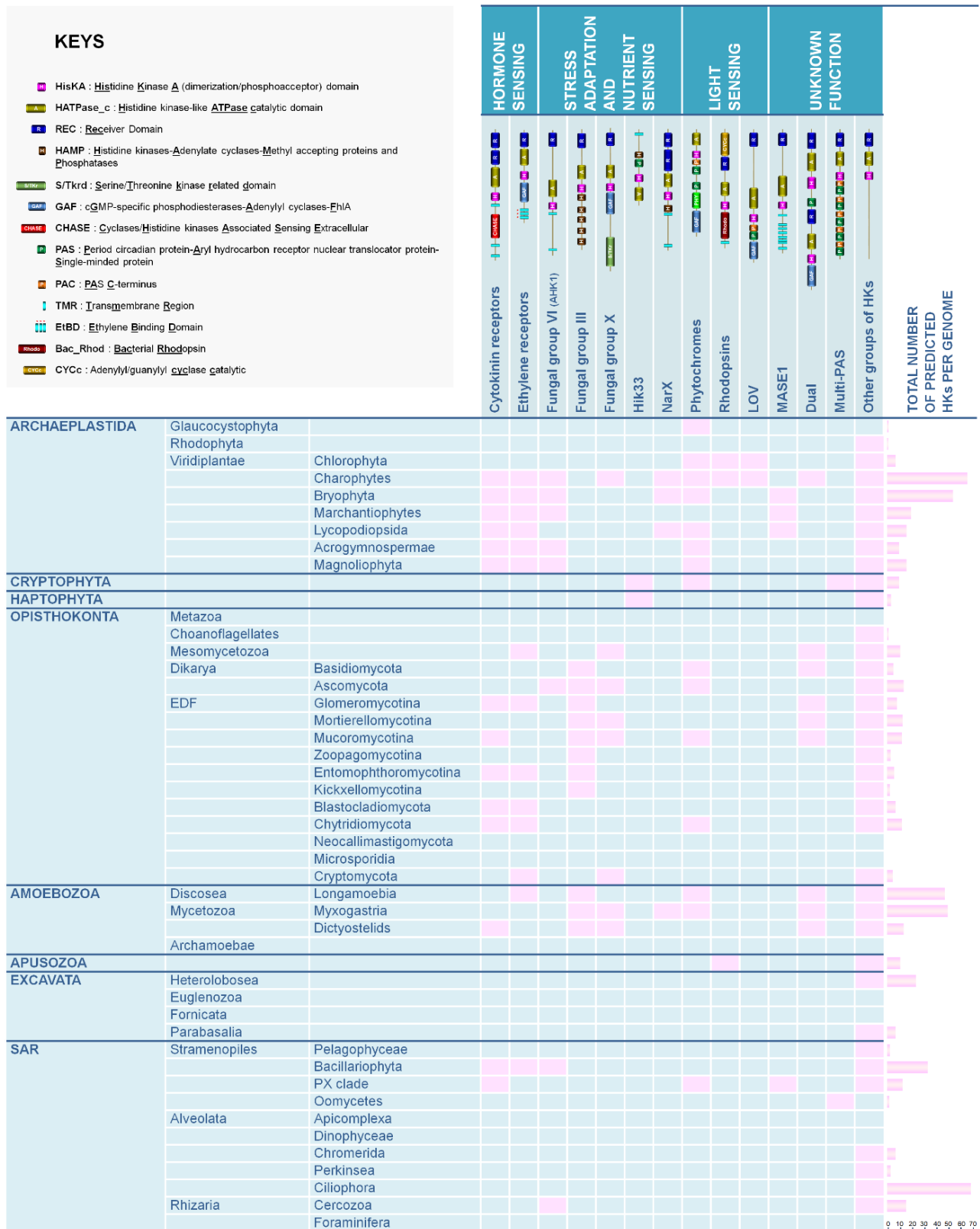


Figure 8. Occurrence of prominent HK groups in eukaryotic clades.

For each eukaryotic clade, the presence of main HK groups is indicated with a pink box. The total number of predicted HK sequences is indicated in the right column.

Table 1. List of eukaryotic species in which the presence of predicted HK sequences was investigated for this study.

Clades	Simplified classification		Species name	Strain name	HK num				
Archaeplastida	Glaucocestophyta		<i>Cyanophora paradoxa</i>	CCMP329	1				
		Rhodophyta		<i>Cyanidioschizon merolae</i>	10D	1			
	Viridiplantae	Chlorophyta	Prasinophytes	<i>Micromonas pusilla</i>	CCMP1545	3			
			Chlorophyceae	<i>Volvox carteri</i>	Eve	7			
		Streptophyta	Charophytes	<i>Klebsormidium nitens</i>	NIES-2285	67			
			Bryophyta	<i>Physcomitrella patens</i>	-	54			
			Marchantiophytes	<i>Marchantia polymorpha</i>	-	20			
			Lycopodiopsida	<i>Selaginella moellendorffii</i>	-	16			
			Acrogymnospermae	<i>Pinus taeda</i>	-	10			
			Magnoliophyta	<i>Amborella trichopoda</i>	-	9			
			Magnoliophyta	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	16			
			Magnoliophyta	<i>Oryza sativa</i>	P0709F06	13			
				<i>Guillardia theta</i>	CCMP2712	10			
	<i>Emiliana huxleyi</i>	CCMP1516	3						
Cryptophyta									
Haptophyta									
Opisthokonta	Metazoa	Eumetazoa	Cnidaria	<i>Nematostella vectensis</i>	CH2xCH6	0			
			Arthropoda	<i>Drosophila melanogaster</i>	-	0			
			Platyhelminthes	<i>Schistosoma mansoni</i>	Puerto Rico	0			
			Chordata	<i>Homo sapiens</i>	-	0			
	Choanoflagellates			<i>Monosiga brevicollis</i>	MX1	1			
		Mesomycetozoa		<i>Capsaspora owczarzaki</i>	ATCC30864	11			
	Dikarya	Basidiomycota	Pucciniomycotina	<i>Puccinia graminis</i>	CDL75-36-700-3	5			
			Ustilaginomycotina	<i>Ustilago maydis</i>	521	6			
			Agaricomycotina	<i>Cryptococcus neoformans</i>	JC21	7			
			Pezizomycetes	<i>Tuber melanosporum</i>	Mel28	8			
			Orbiliomycetes	<i>Arthrobotrys oligospora</i>	ATCC24927	17			
			Eurotiomycetes	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Af293	13			
			Lecanoromycetes	<i>Usnea florida</i>	ATCC18376	10			
			Leotiomycetes	<i>Botrytis cinerea</i>	T4	20			
			Sordariomycetes	<i>Fusarium verticillioides</i>	ATCC38932	16			
			Xylonomycetes	<i>Xylona heveae</i>	TC161	10			
			Saccharomycotina	<i>Candida albicans</i>	SC5314	3			
			Taphrinomycotina	<i>Taphrina deformans</i>	PYCC5710	8			
			EDF	Mucoromycota	Glomeromycotina	<i>Rhizophagus irregularis</i>	DAOM181602	8	
					Mortierellomycotina	<i>Mortierella elongata</i>	AG-77	13	
		Mucoromycotina			<i>Umbelopsis ramanniana</i>	AG	12		
		Zoopagomycota			<i>Syncephalis plumigaleata</i>	NRRL S24	3		
		Entomophthoromycotina			<i>Conidiobolus coronatus</i>	NRRL28638	6		
		Kickxellomycotina			<i>Ramicandelaber brevisporus</i>	CBS 109374	2		
					<i>Catenaria anguillulae</i>	PL171	7		
		Blastocladiomycota		<i>Gonapodya prolifera</i>	JEL478	12			
		Chytridiomycota		<i>Piromyces finnis</i>	E2	0			
		Neocallimastigomycota		<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	H348	0			
		Microsporidia		<i>Rozella allomyces</i>	CSF55	5			
		Cryptomycota							
		Amoebozoa		Discosea	Longamoebia	Centramoebida	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	Neff	48
				Mycetozoa	Myxogastria	Myxogastromycetidae	<i>Physarum polycephalum</i>	LU352	51
			Dictyostelids		Dictyosteliales	<i>Dictyostelium discoideum</i>	AX4	14	
			Archamoebae		Acytosteliales	<i>Polysphondylium pallidum</i>	PN500	13	
					<i>Entamoeba histolytica</i>	HM-1:IMSS	0		
	Apusozoa			<i>Thecamonas trahens</i>	ATCC50062	11			
	Excavata	Heterolobosea			<i>Naegleria gruberi</i>	NEG-M	24		
		Euglenozoa			<i>Leishmania infantum</i>	JPCM5	0		
					<i>Trypanosoma brucei</i>	DAL972	0		
					<i>Spironucleus salmonicida</i>	ATCC 50377	0		
		Fornicata	Diplomonadida		<i>Giardia intestinalis</i>	ATCC 50803	0		
		Parabasalia			<i>Trichomonas vaginalis</i>	G3	7		
SAR		Stramenopiles	Pelagophyceae	Pelagomonadales	<i>Aureococcus anophagefferens</i>	CCMP1984	2		
	Bacillariophyta		Bacillariophyceae	<i>Fistulifera solaris</i>	DA0580	34			
	PX clade		Phaeophyceae	<i>Ectocarpus siliculosus</i>	Ec32	13			
	Oomycetes		Albuginaceae	<i>Albugo laibachii</i>	Nc14	2			
	Alveolata	Apicomplexa	Haemosporida	<i>Plasmodium falciparum</i>	3D7	0			
			Piroplasmida	<i>Babesia bovis</i>	T2Bo	0			
			Coccidia	<i>Toxoplasma gondii</i>	ARI	0			
			Coccidia	<i>Cryptosporidium hominis</i>	TU502	0			
		Dinophyceae	<i>Symbiodinium microadriaticum</i>	CCMP2467	0				
		Chromerida	<i>Vitrella brassicaformis</i>	CCMP3155	7				
		Perkinsea	<i>Perkinsus marinus</i>	CB5D4	3				
		Ciliophora	<i>Tetrahymena thermophila</i>	SB210	70				
	Rhizaria	Cercozoa	<i>Plasmodiophora brassicae</i>	e3	16				
		Foraminifera	<i>Reticulomyxa filosa</i>	-	0				

SAR, Stramenopiles, Alveolates, and Rhizaria; EDF, early diverging fungi

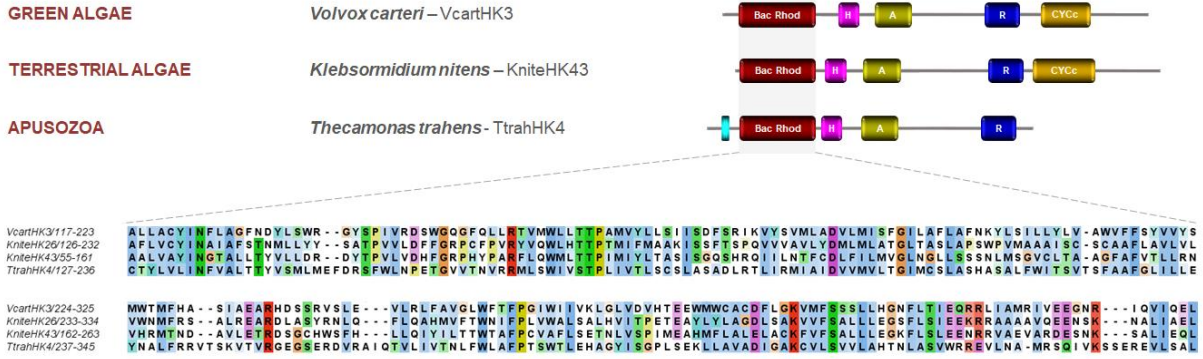


Figure S1. Structure of homologs to bacteriorhodopsins identified in this study in terrestrial algae and Apusozoa. The upper panel shows domain arrangement of a representative predicted protein from *Volvox carteri*, *Klebsormidium nitens*, and *Thecamonas trahens*. The lower panel shows alignment of sensing domains from VcarthHK3, KnteHK26, KnteHK43, and TtrahHK4. The amino acid sequence alignment was formatted with the JALVIEW program.

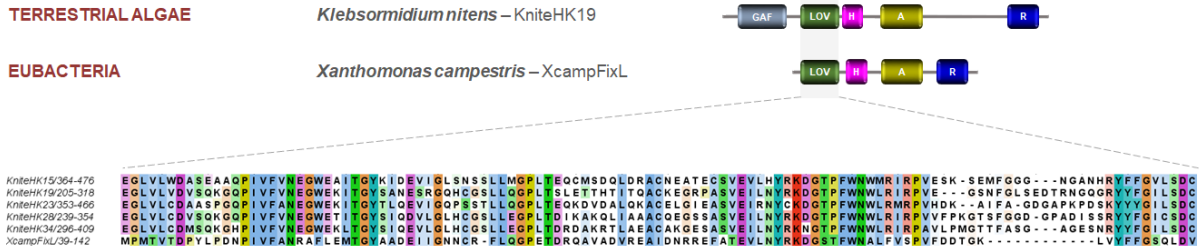


Figure S2. Structure of homologs to bacterial LOV sensors identified in this study in terrestrial algae. The upper panel shows domain arrangement of a representative predicted protein from *Klebsormidium nitens* and *Xanthomonas campestris*. The lower panel shows alignment of sensing domains of KnteHK15, KnteHK19, KnteHK23, KnteHK28, KnteHK34 along with the prominent FixL receptor from *Xanthomonas campestris*. The amino acid sequence alignment was formatted with the JALVIEW program.

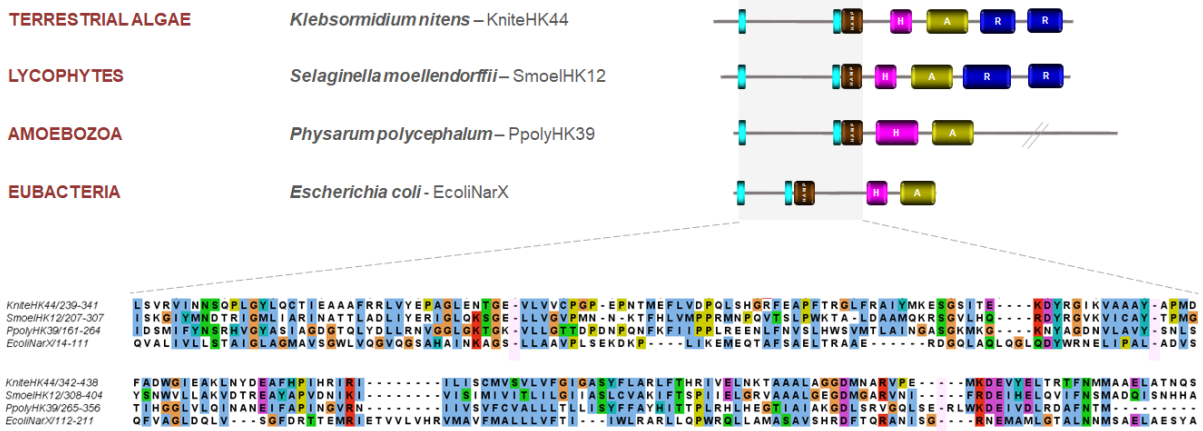
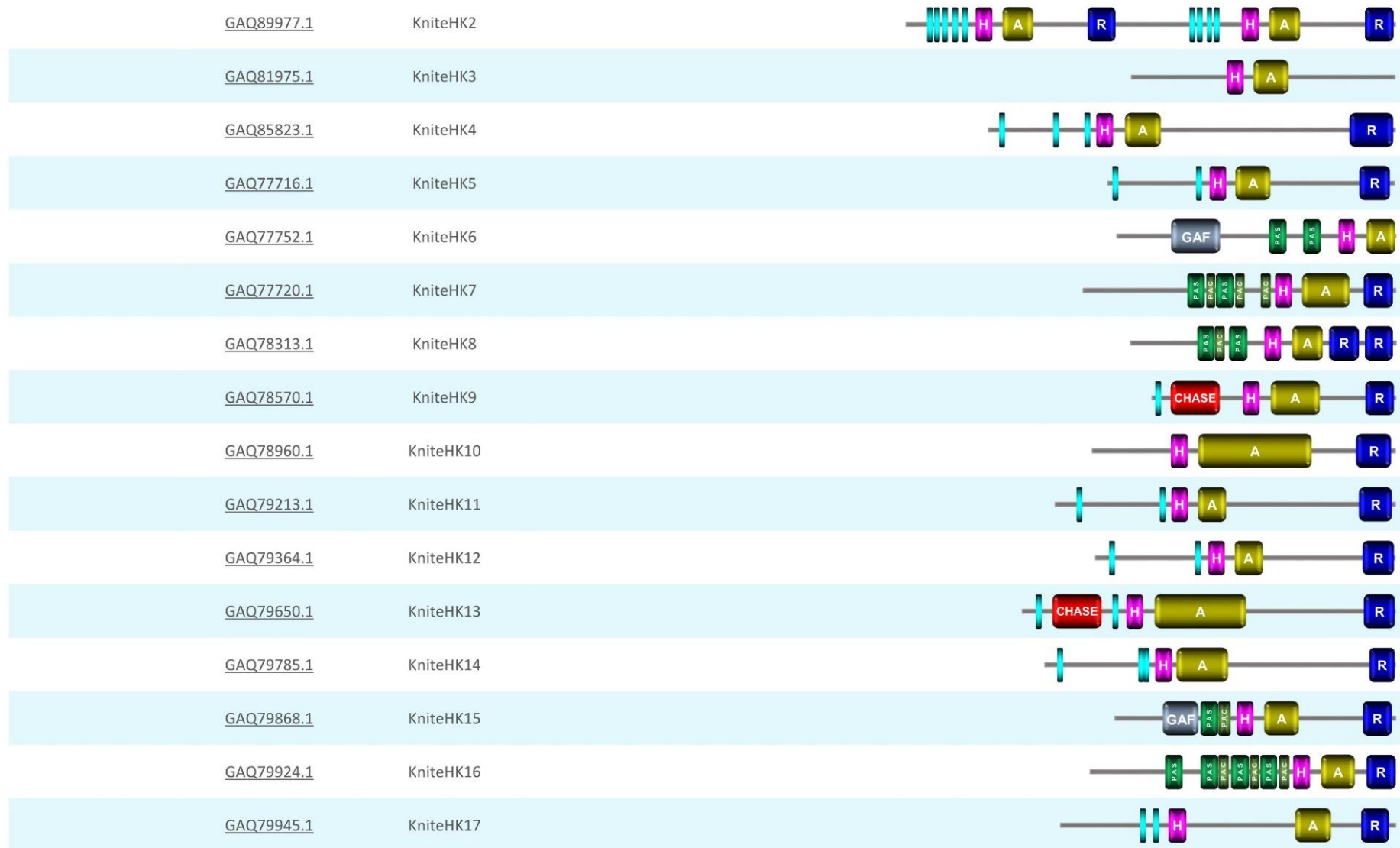
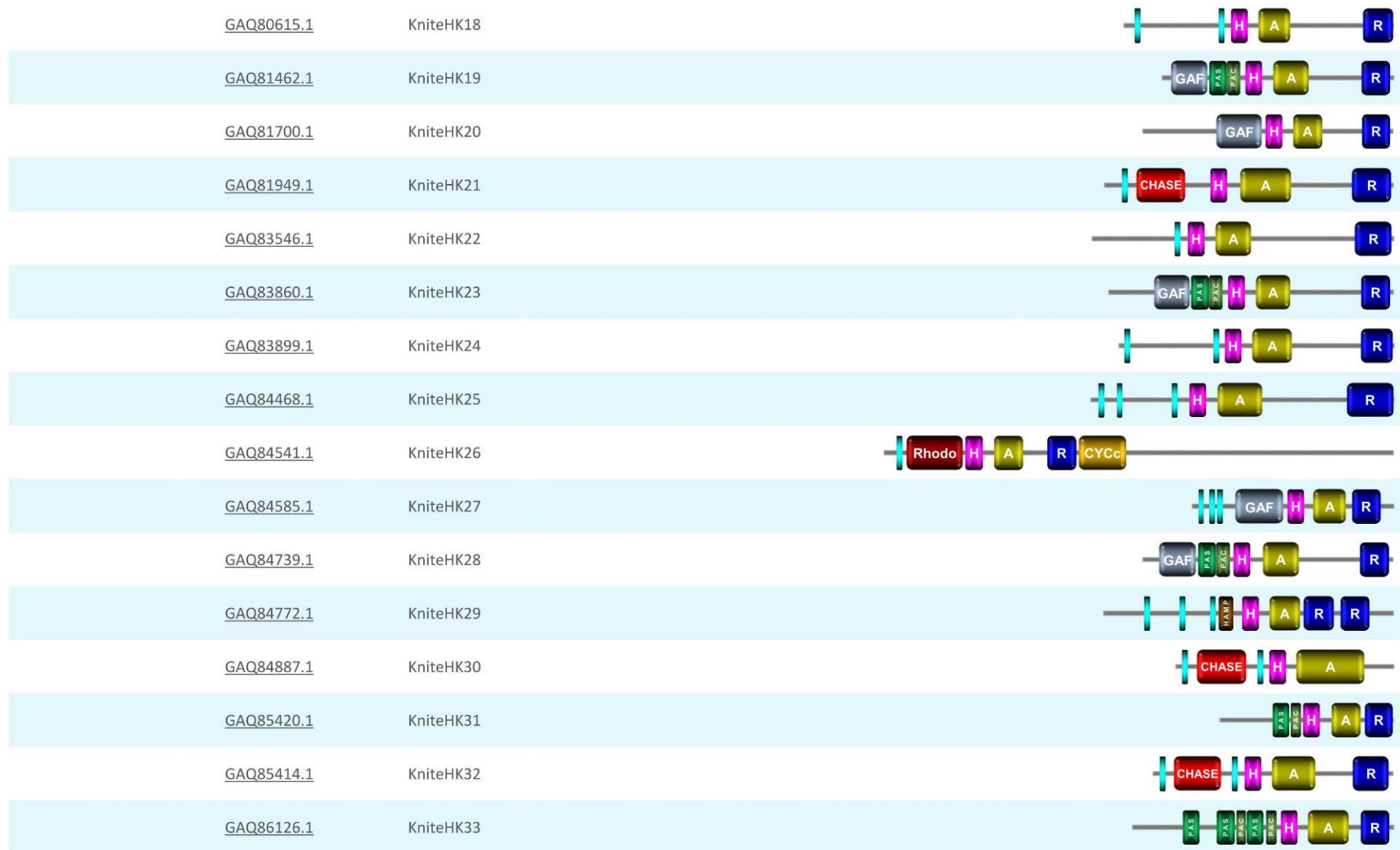
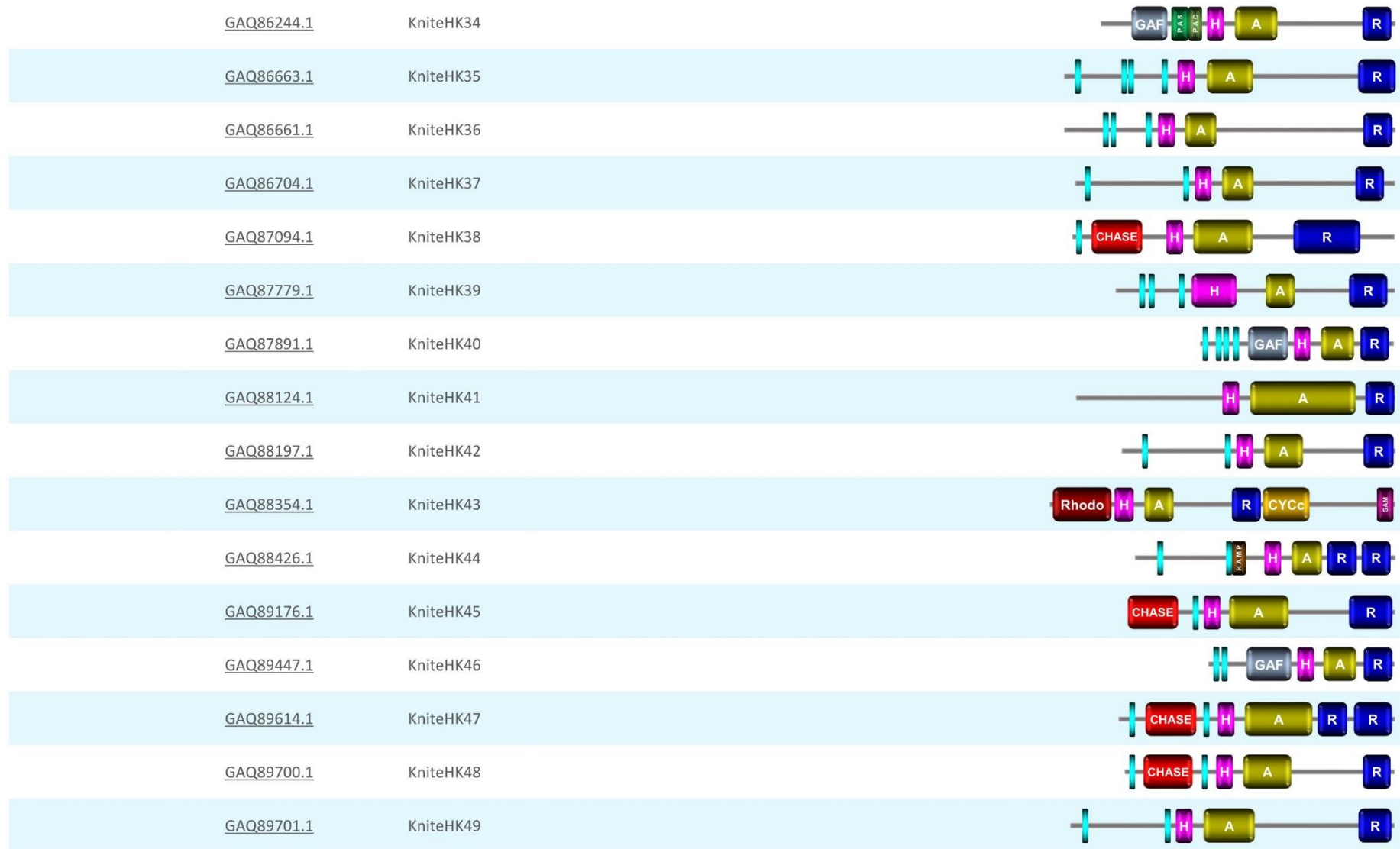


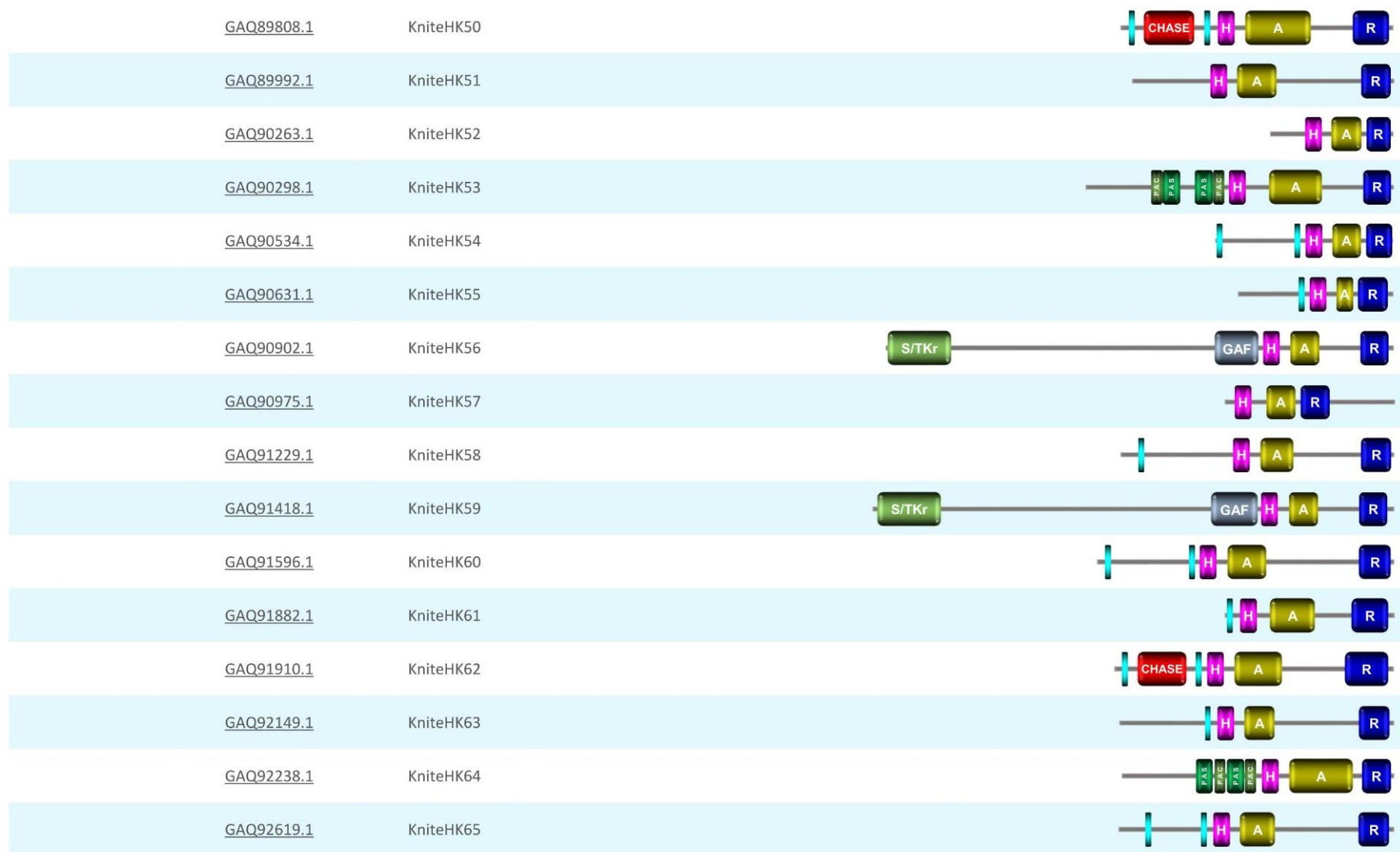
Figure S3. Structure of homologs to bacterial NarX nitrate/nitrite sensors identified in plants and Amoebozoa. The upper panel shows domain arrangement of a representative predicted protein from *Klebsormidium nitens*, *Selaginella moellendorffii*, and *Physarum polycephalum*. The lower panel shows alignment of sensing domains of KnteHK44, SmoelHK12, PpolyHK39 along with the prominent NarX receptor from *Escherichia coli*. The amino acid sequence alignment was formatted with the JALVIEW program. Interruptions of the alignment are indicated by pink rectangles.

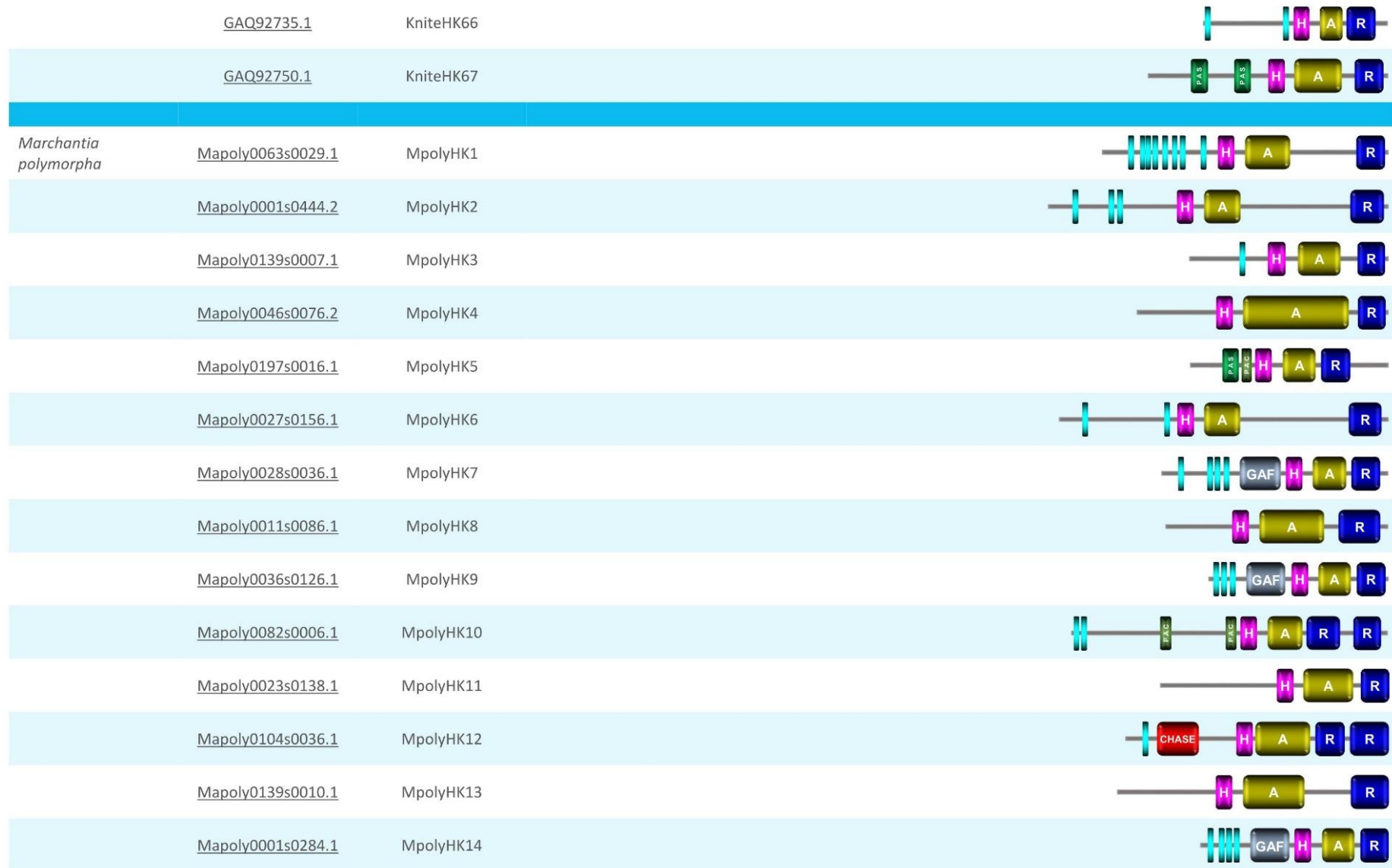
Species	Acc. Num	Annotated here as	Domain arrangement (SMART)
ARCHAEPLASTIDA AND SISTER CLADES			
<i>Cyanophora paradoxa</i>	AHB18377.1	CparaHK1	
<i>Cyanidioschyzon merolae</i>	XP_005537729.1	CmeroHK1	
<i>Micromonas pusilla</i>	AIO03593.1	MpusiHK1	
	XP_003060254.1	MpusiHK2	
	XP_003060076.1	MpusiHK3	
<i>Volvox carteri f. nagariensis</i>	XP_002957065.1	VcartHK1	
	XP_002954901.1	VcartHK2	
	XP_002954798.1	VcartHK3	
	XP_002953949.1	VcartHK4	
	XP_002953210.1	VcartHK5	
	XP_002952599.1	VcartHK6	
	XP_002949250.1	VcartHK7	
<i>Klebsormidium nitens</i>	GAQ88588.1	KniteHK1	

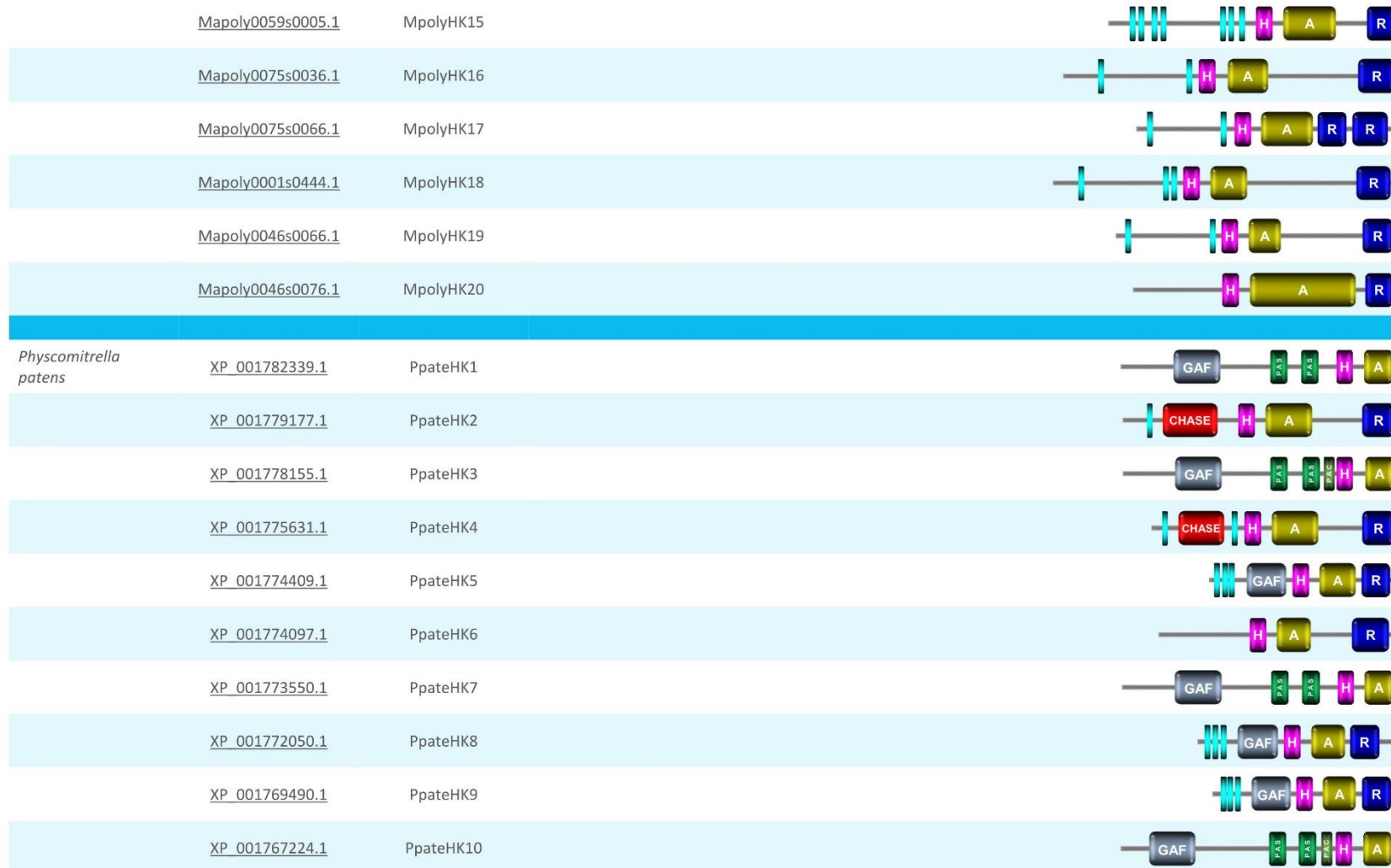


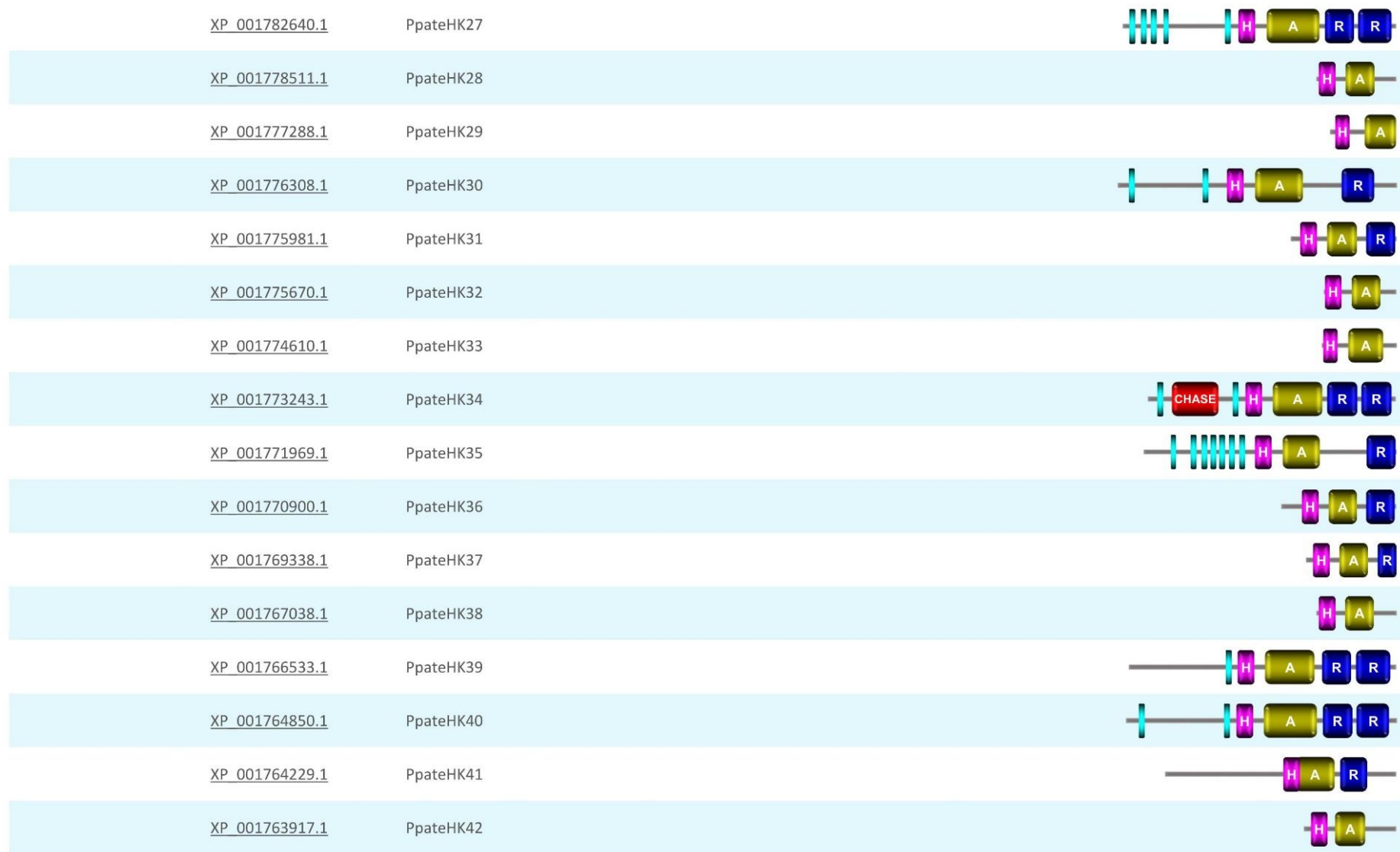


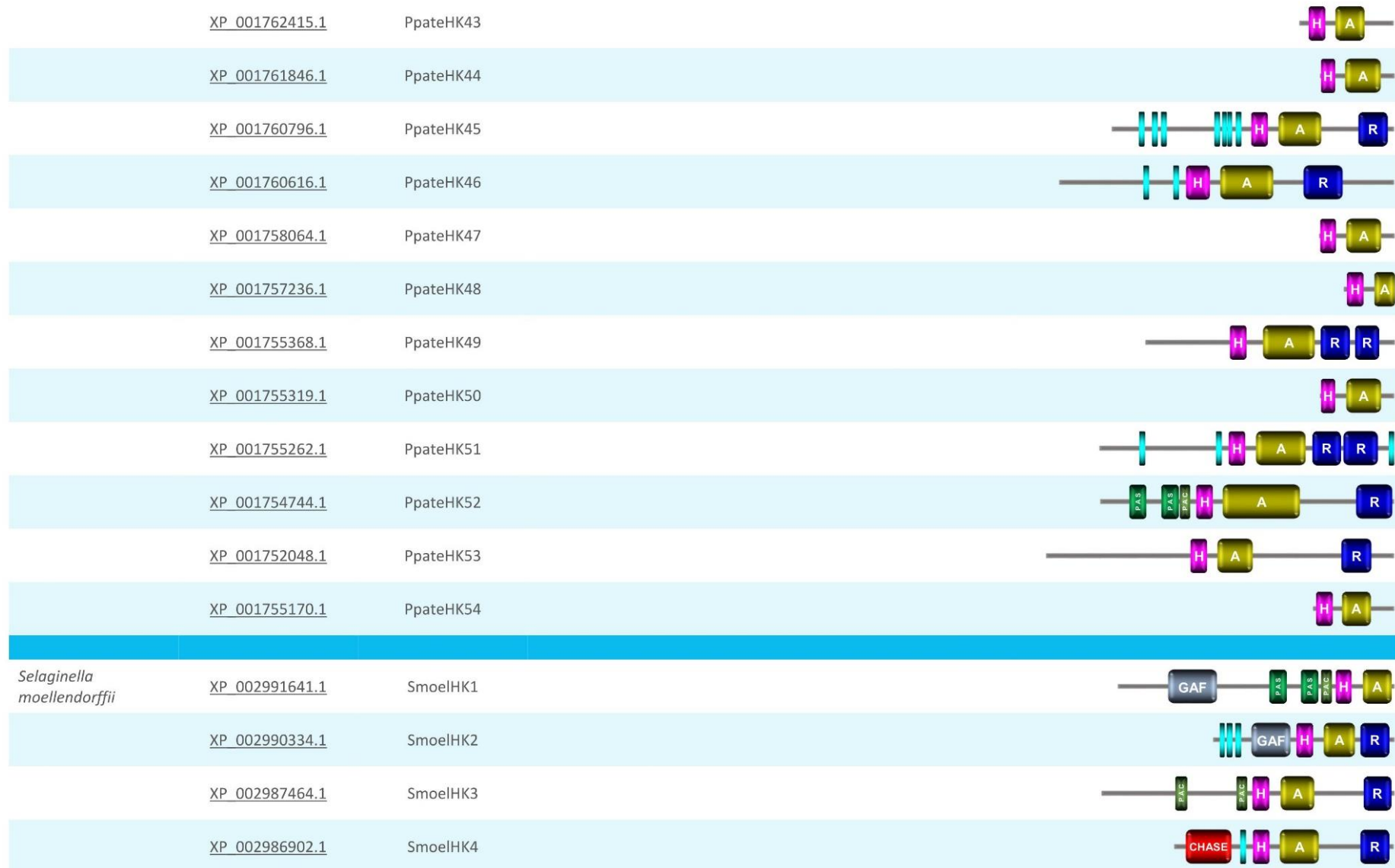


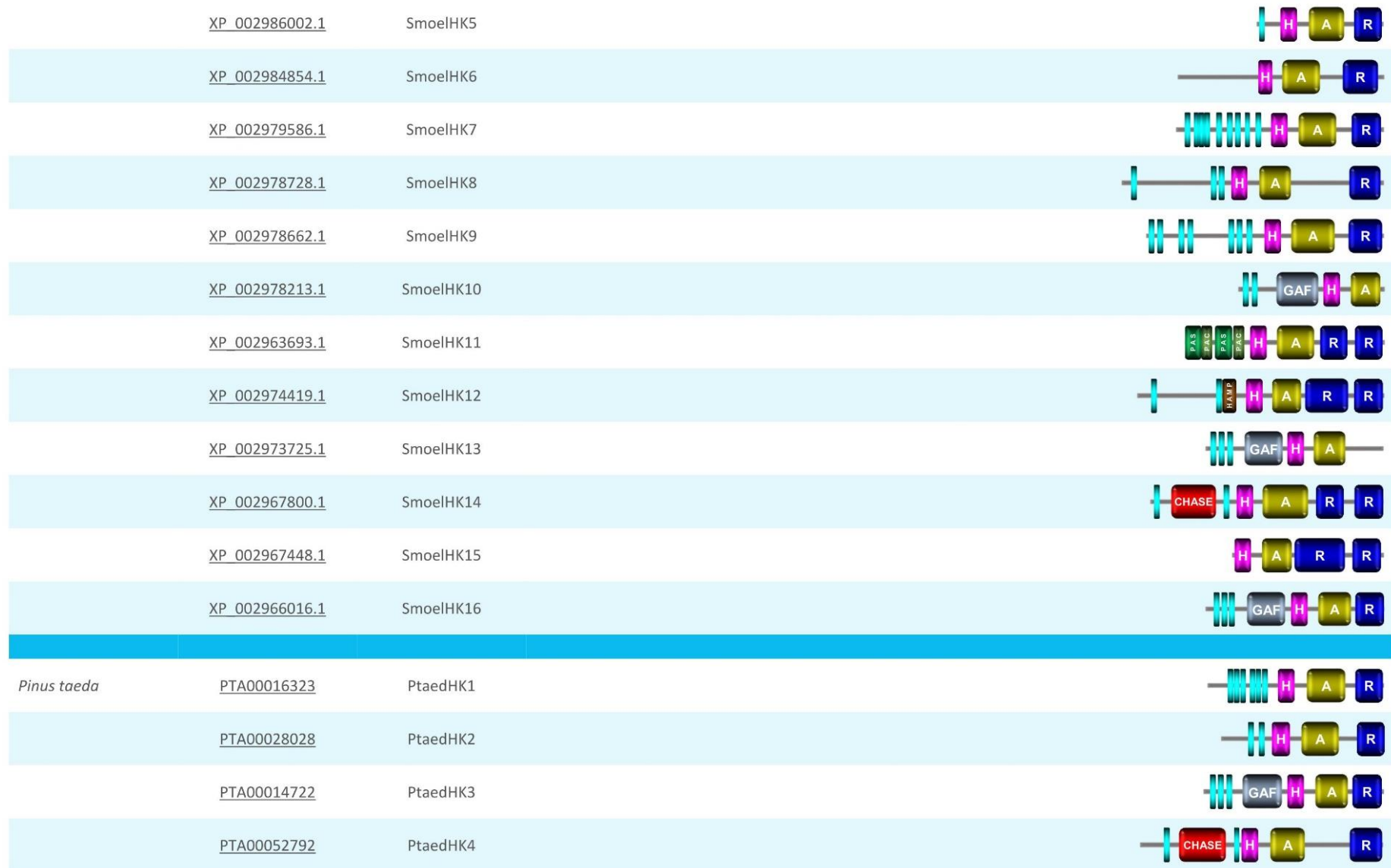


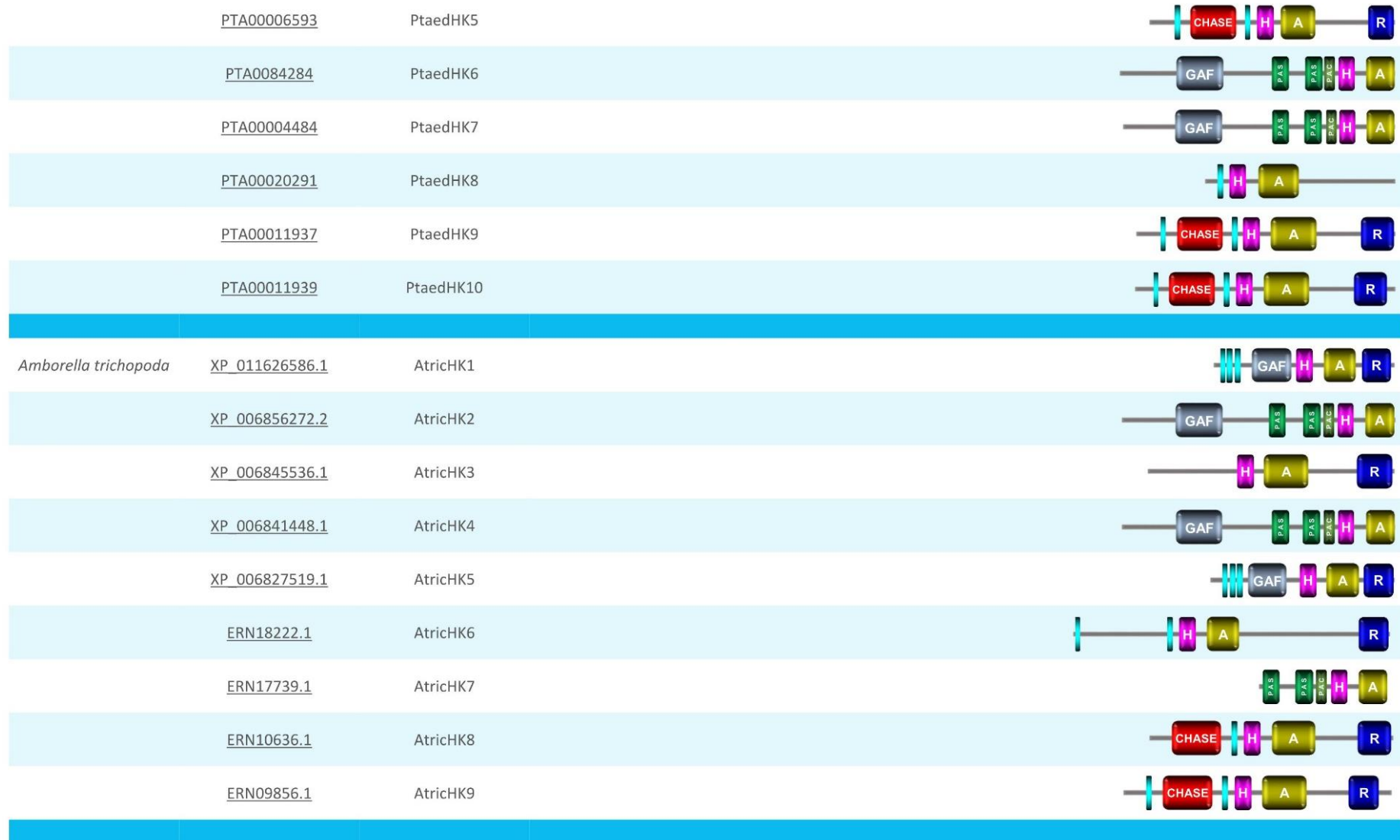


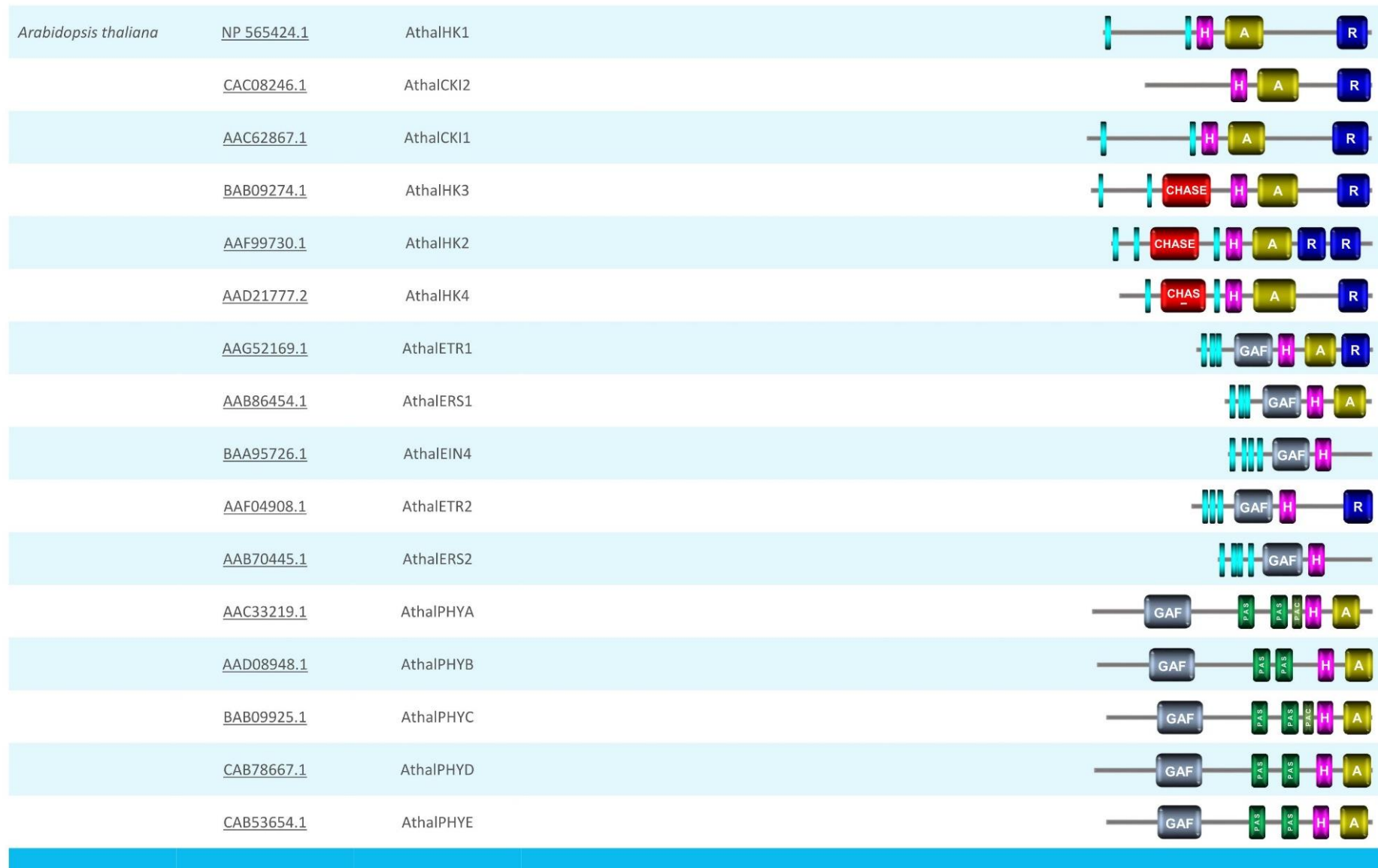


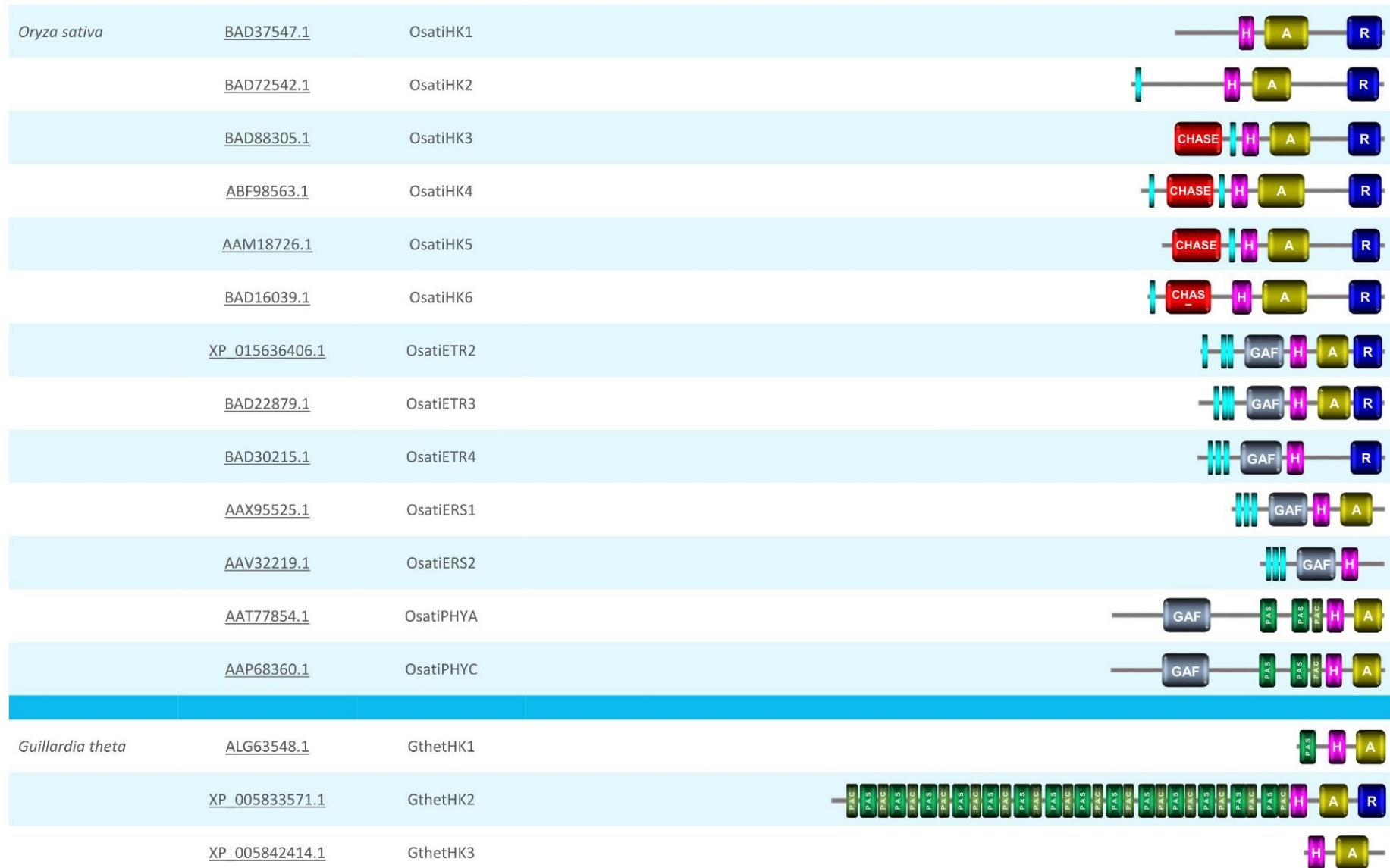


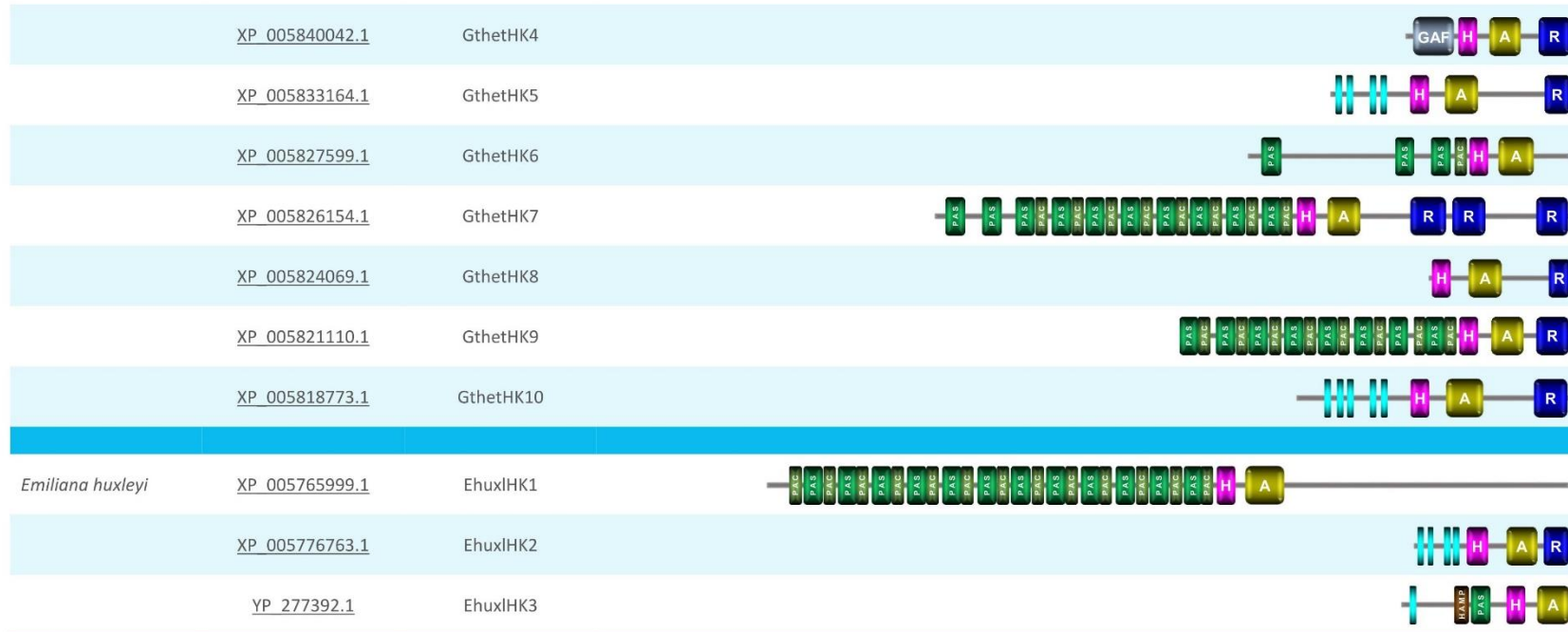








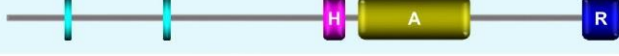









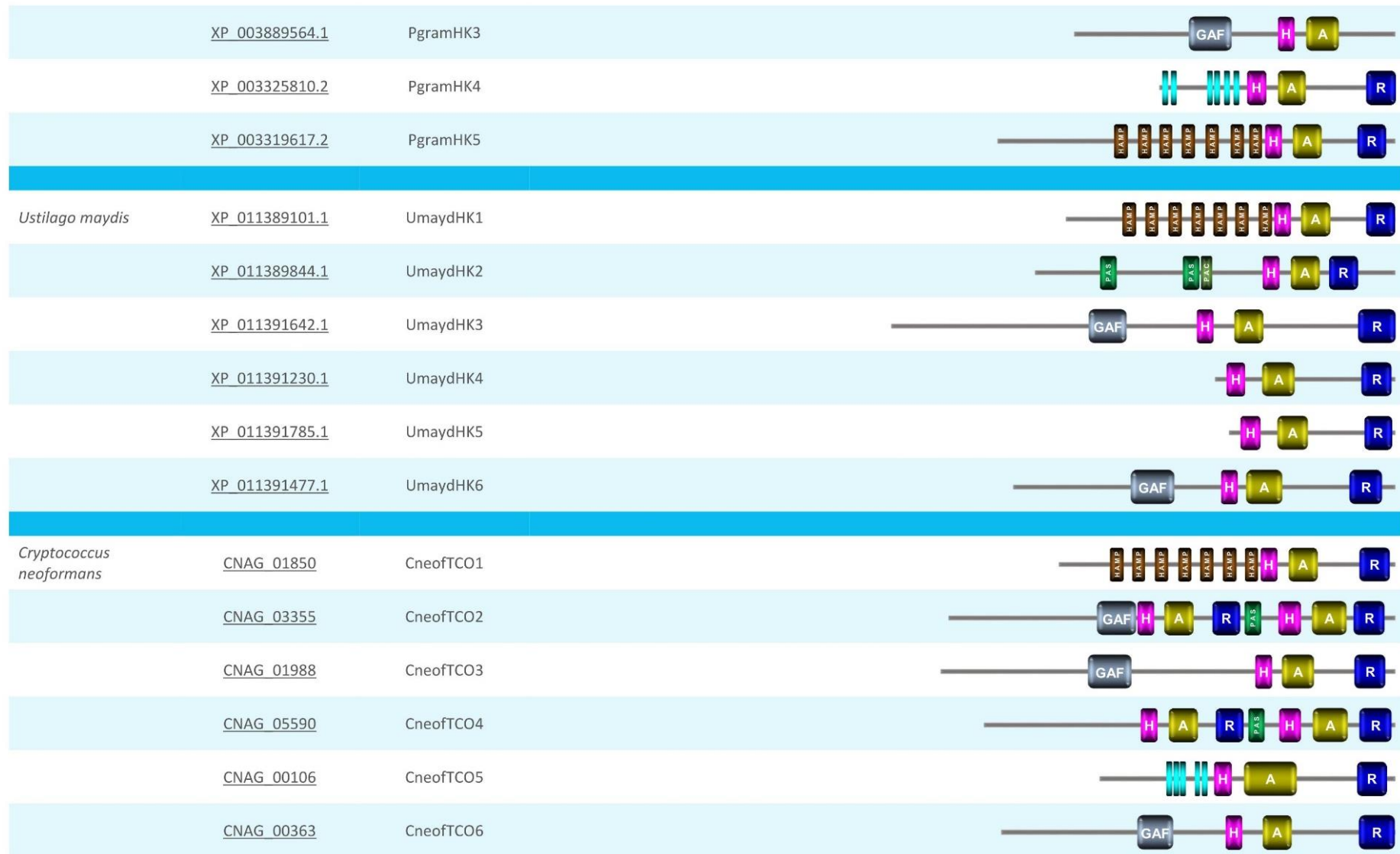


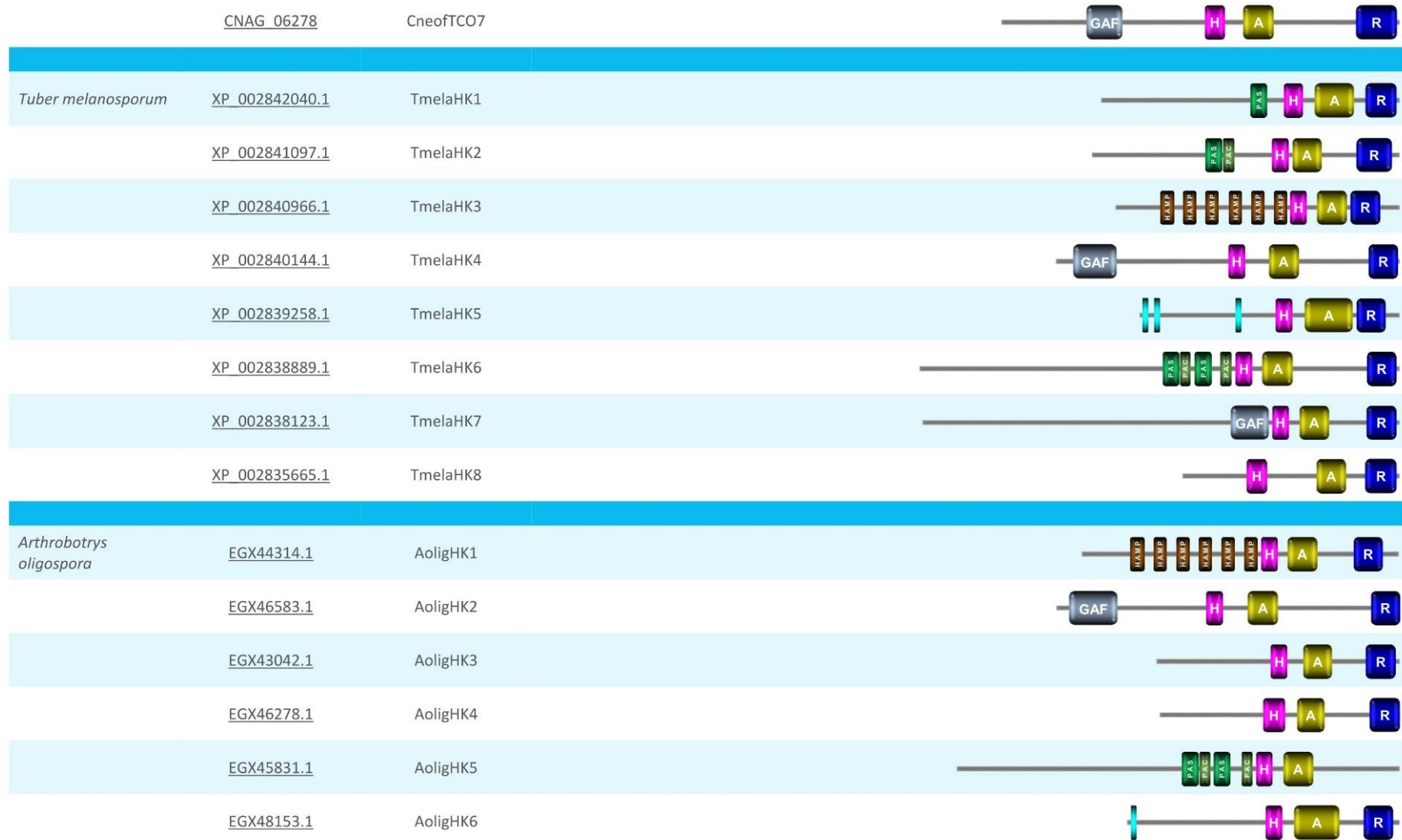


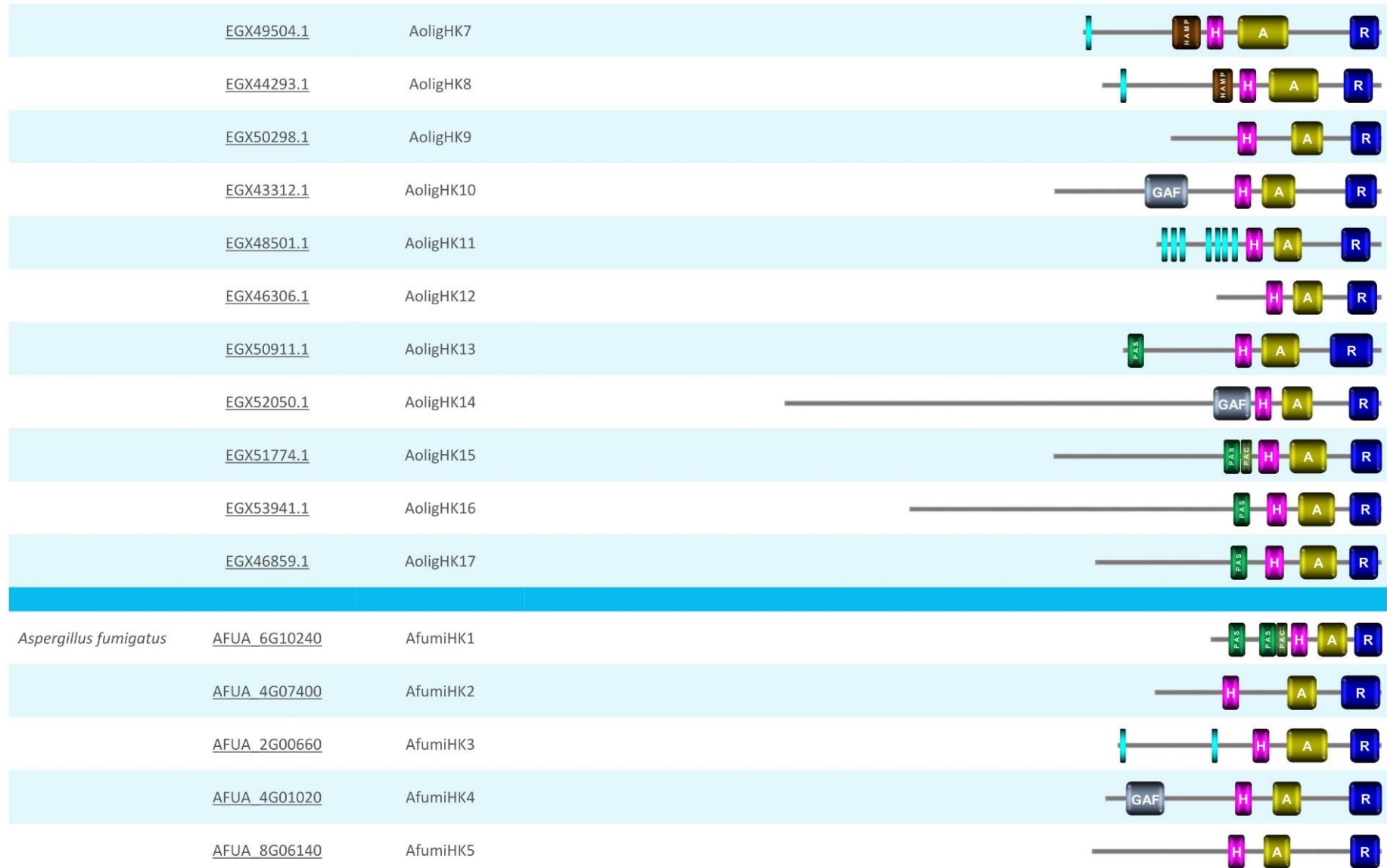


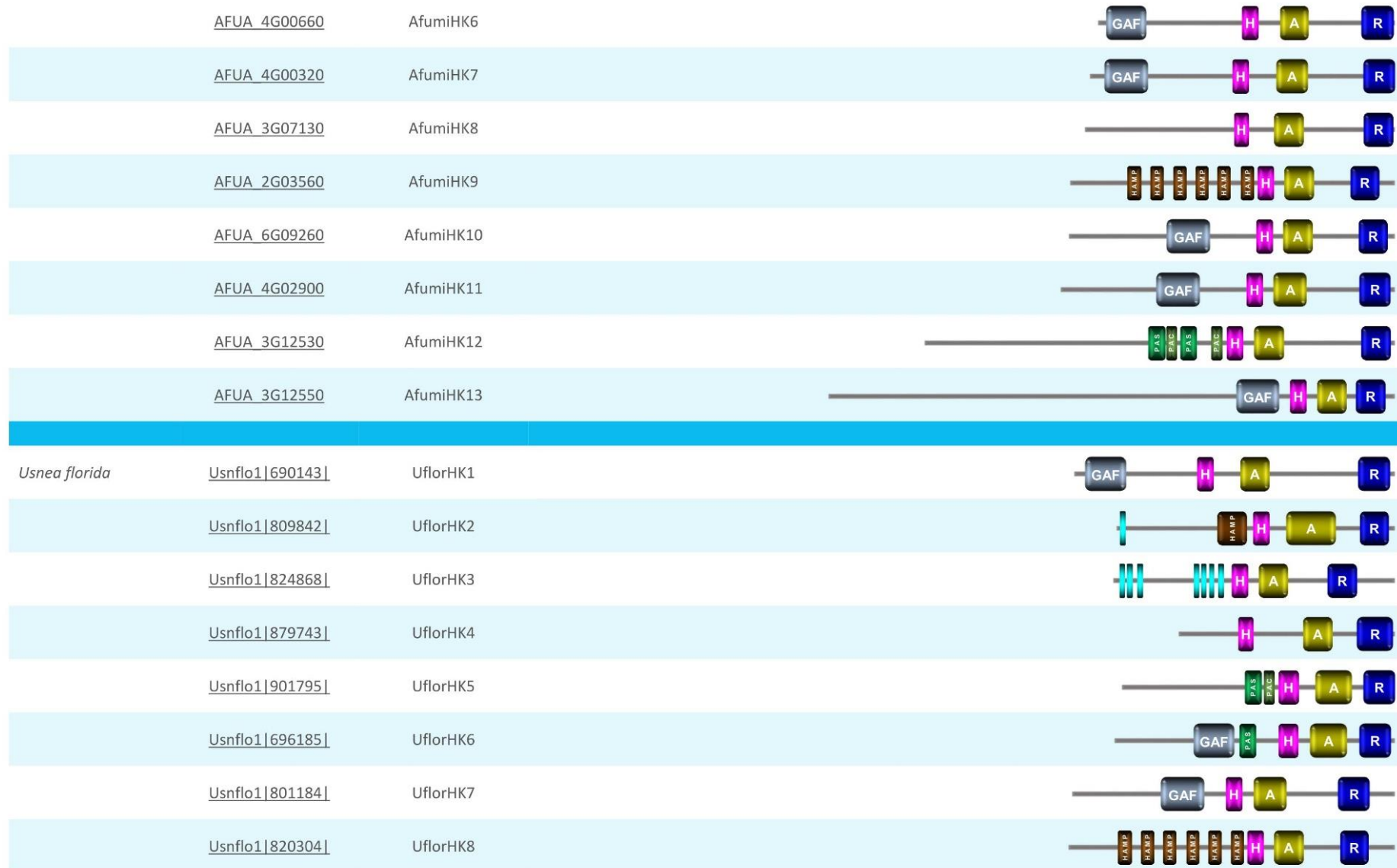


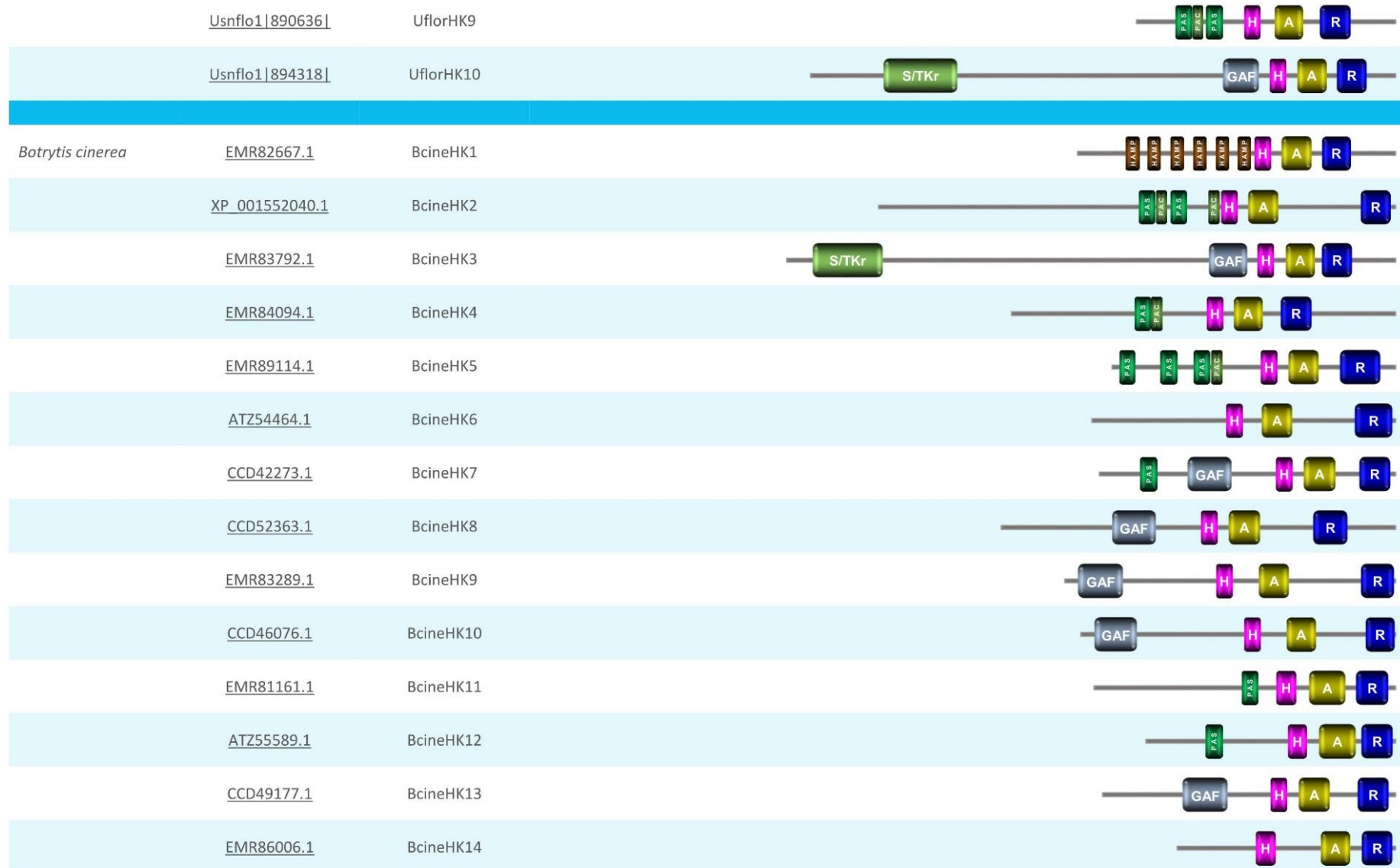
Species	Acc. Num	Annotated here as	Domain arrangement (SMART)
OPISTHOKONTA			
<i>Monosiga brevicollis</i>	XP_001747449.1	MbrevHK1	
<i>Capsaspora owczarzaki</i>	KJE95236.1	CowczHK1	
	XP_011270167.1	CowczHK2	
	XP_011270166.1	CowczHK3	
	XP_004349431.1	CowczHK4	
	XP_004347661.1	CowczHK5	
	KJE88784.1	CowczHK6	
	XP_004345397.2	CowczHK7	
	KJE90544.1	CowczHK8	
	KJE89950.1	CowczHK9	
	XP_011270161.1	CowczHK10	
	XP_004345556.1	CowczHK11	
<i>Puccinia graminis</i>	XP_003334153.2	PgramHK1	
	XP_003889300.1	PgramHK2	

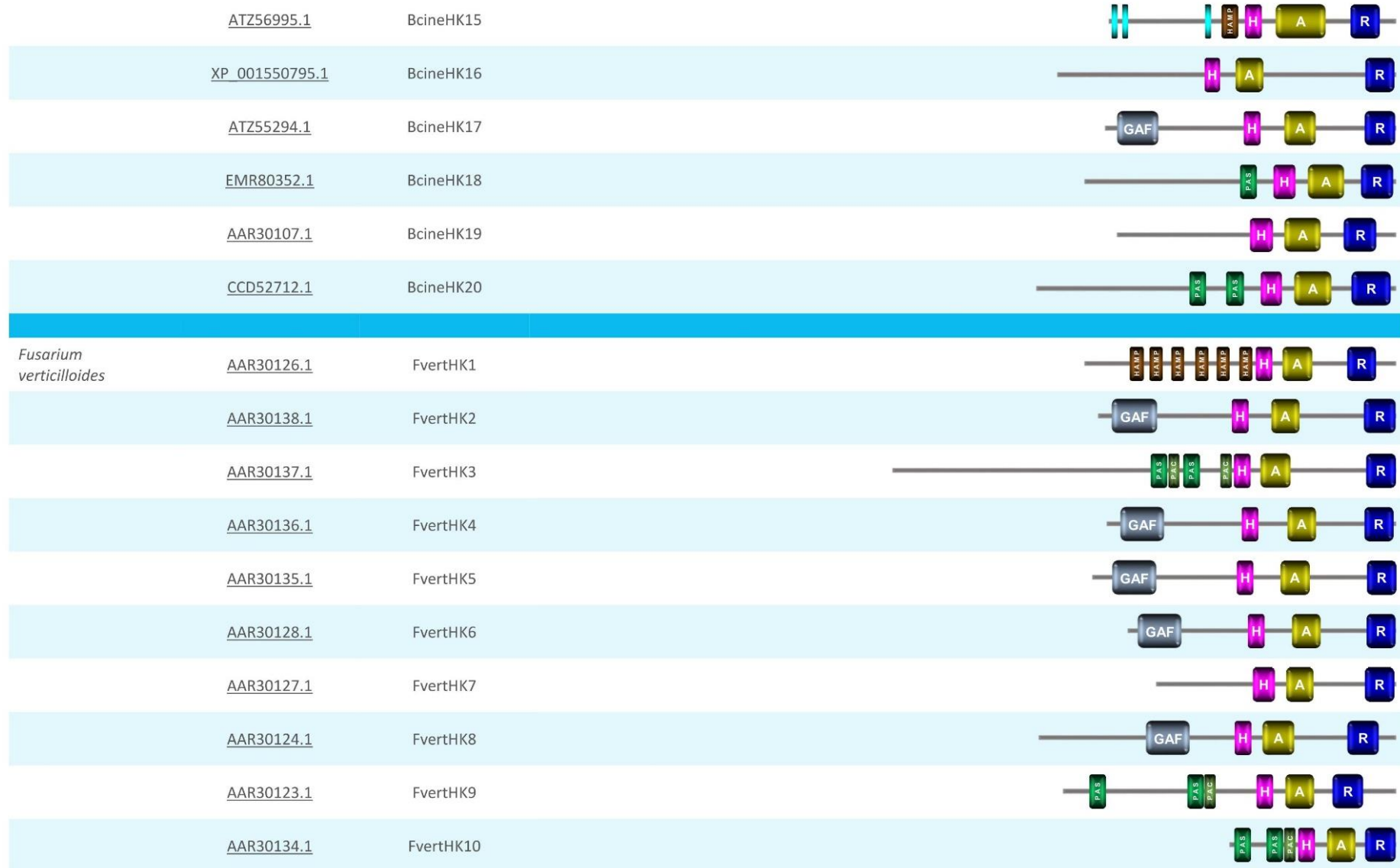


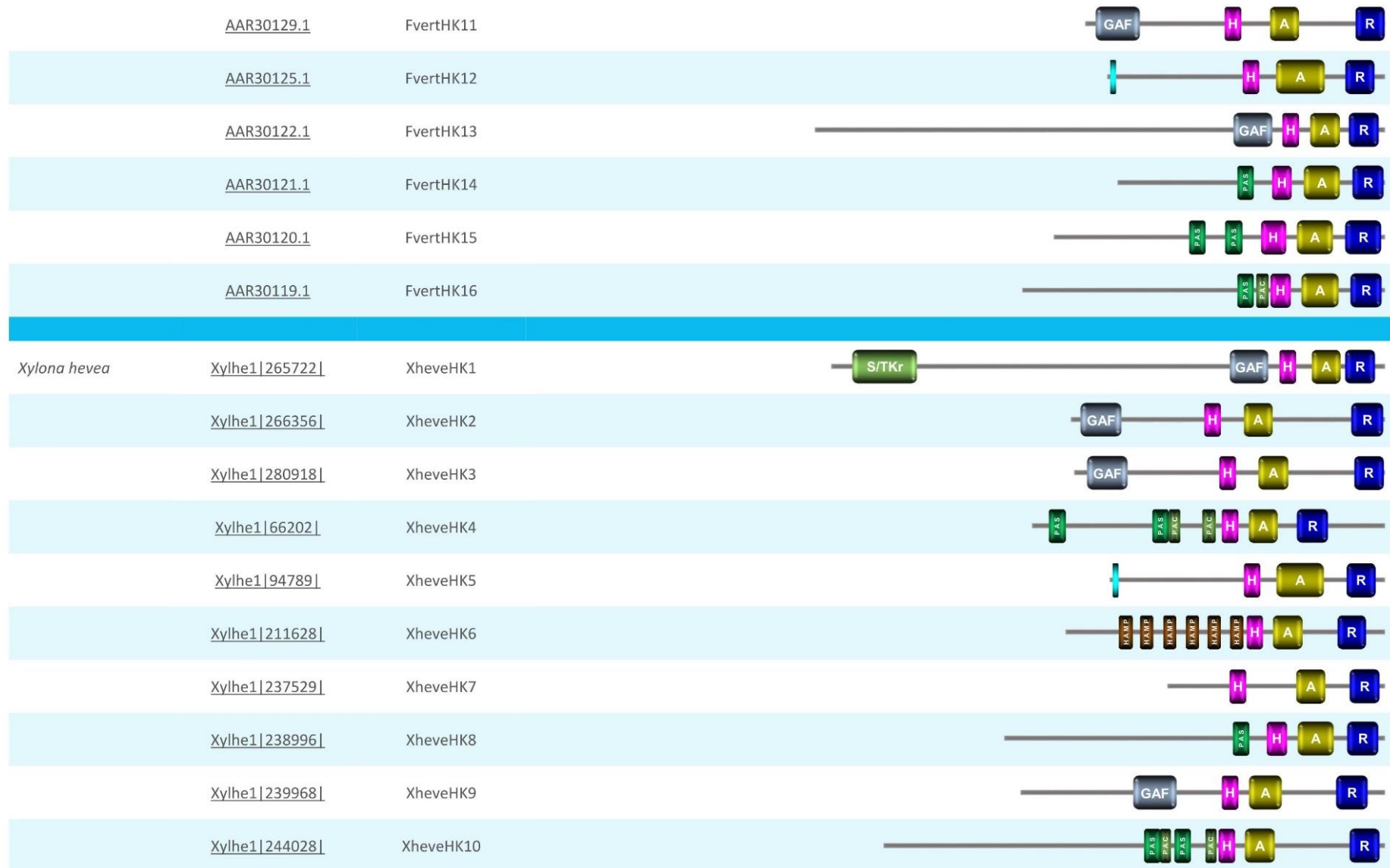


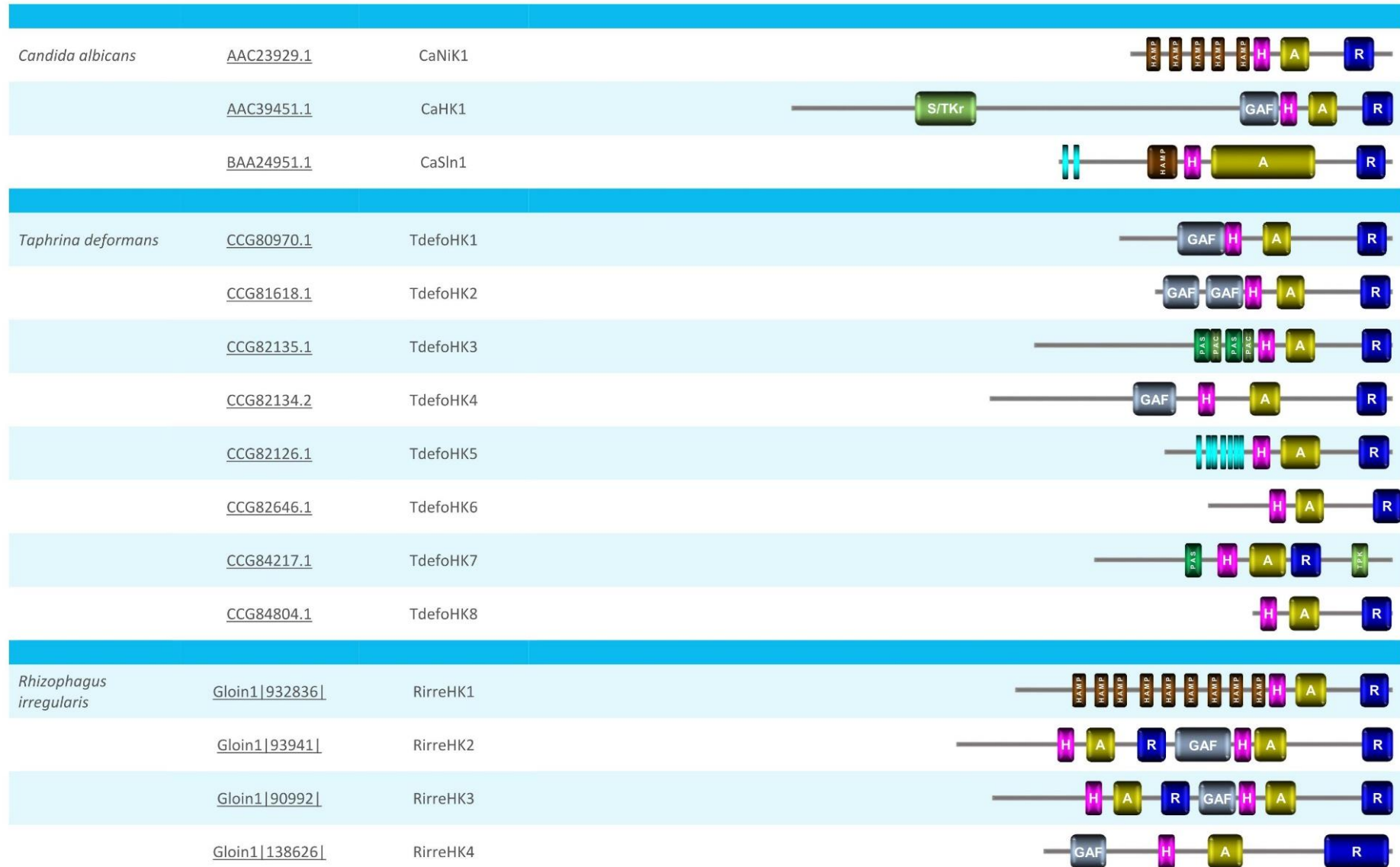


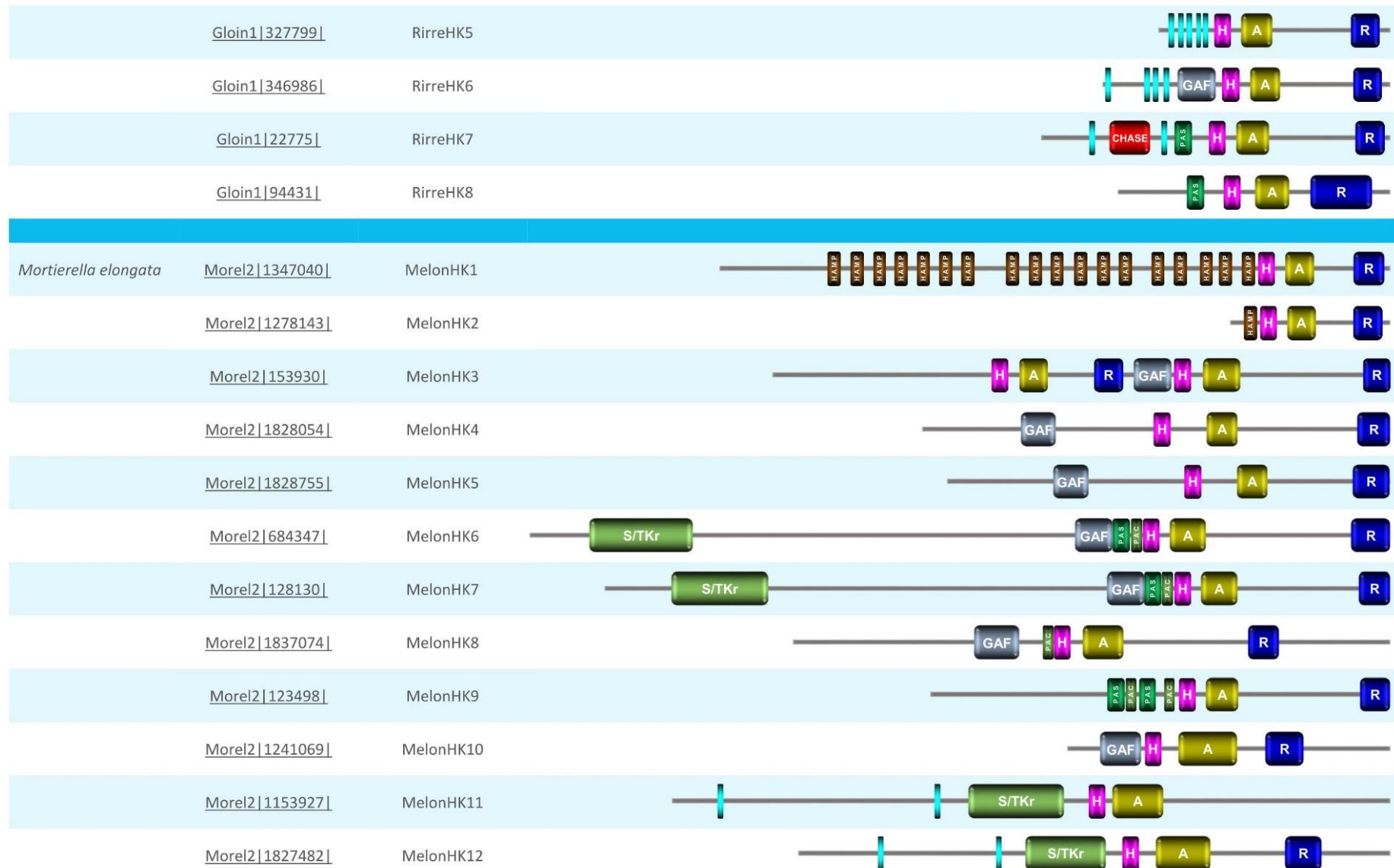


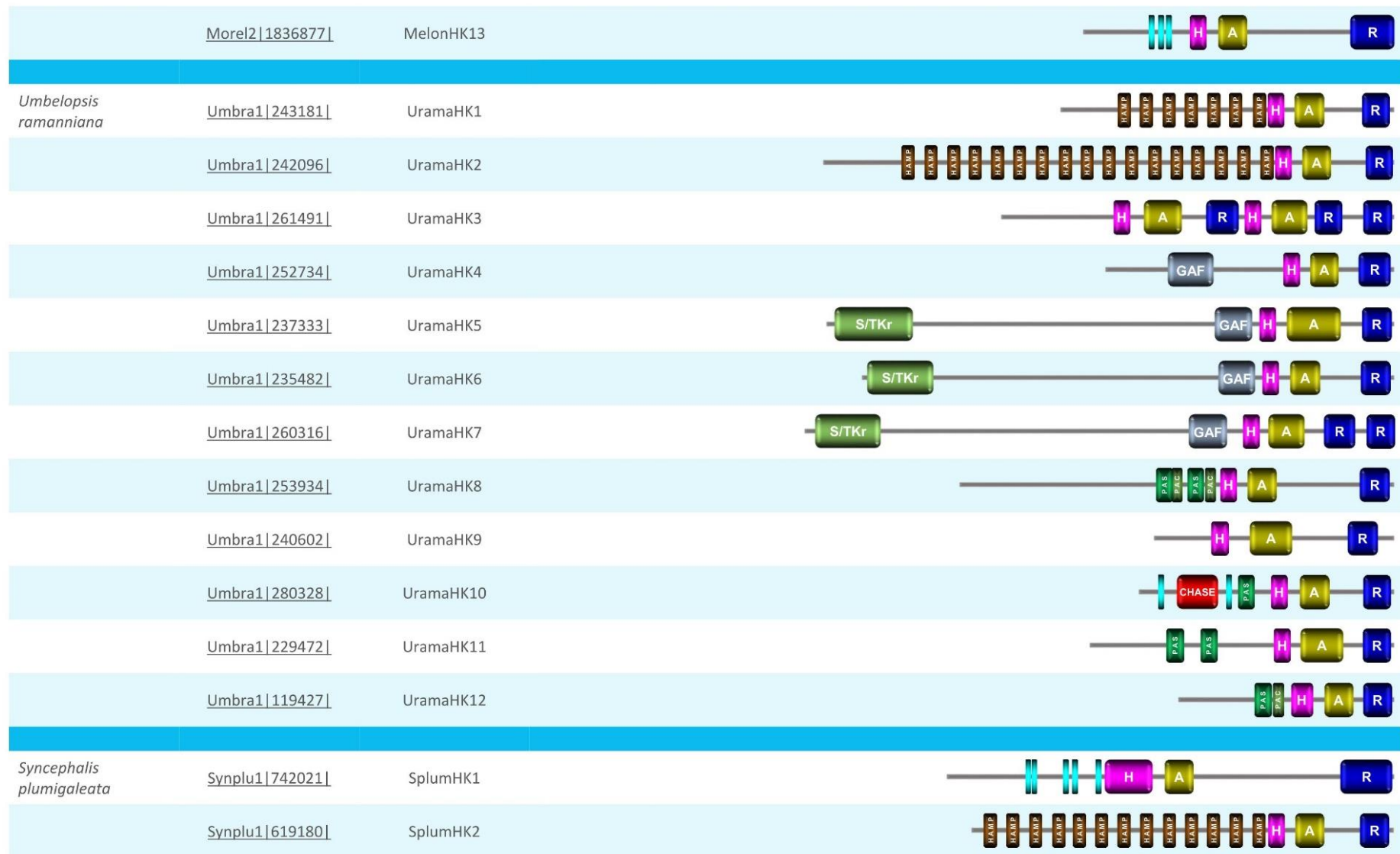


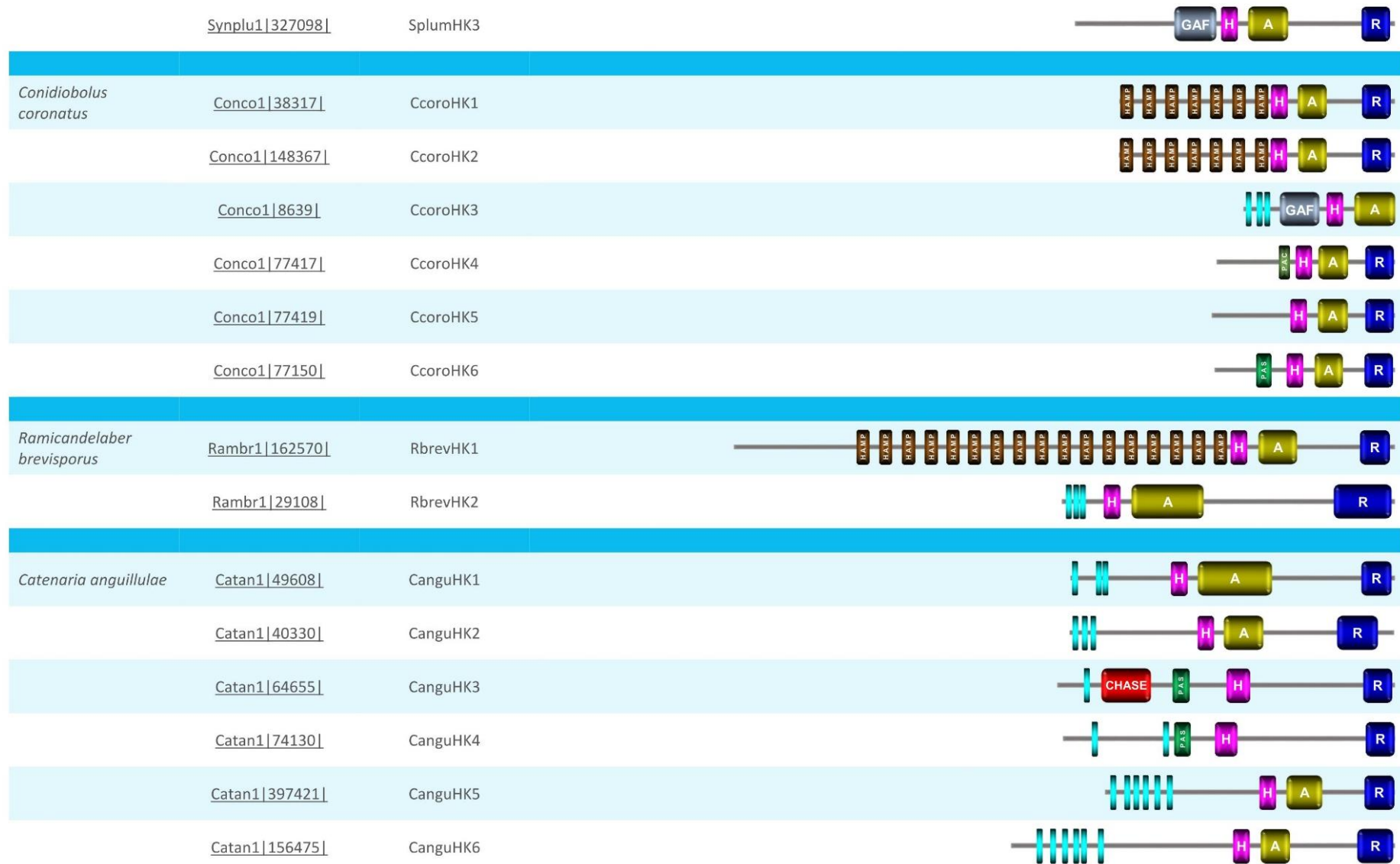


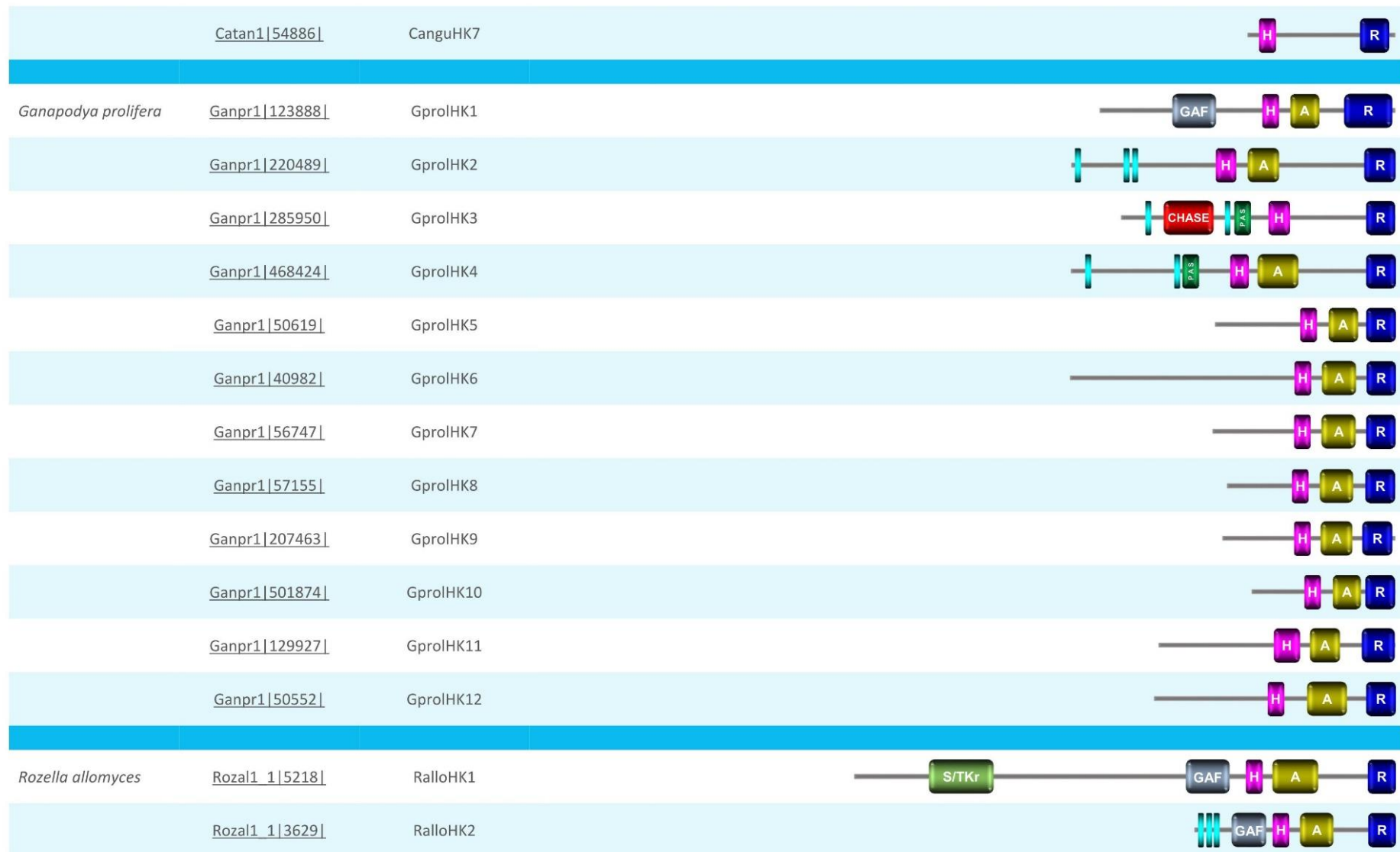








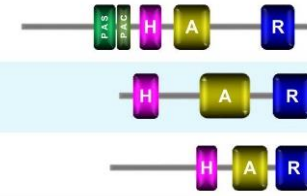




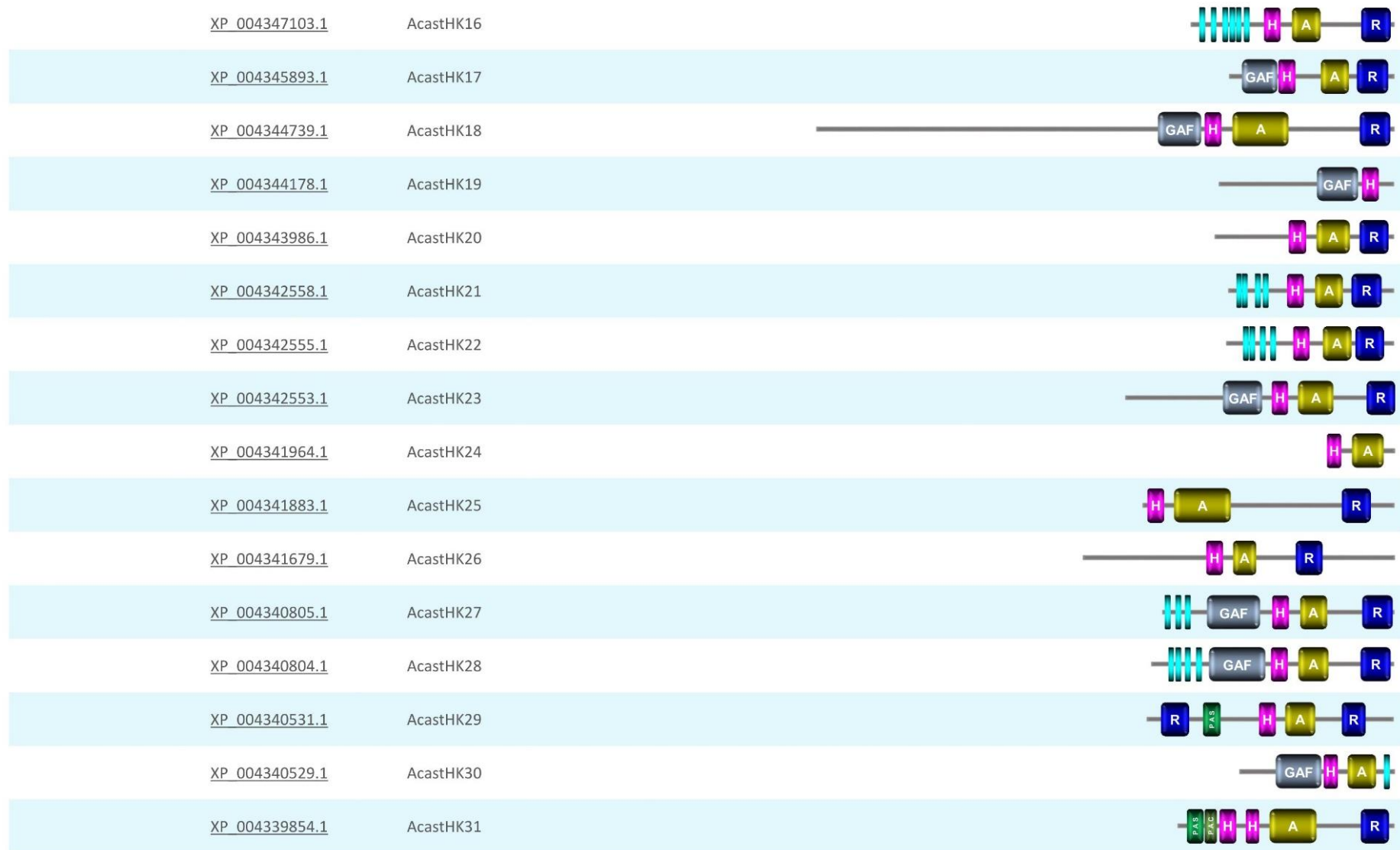
[Rozal1_1|4039|](#) RalloHK3

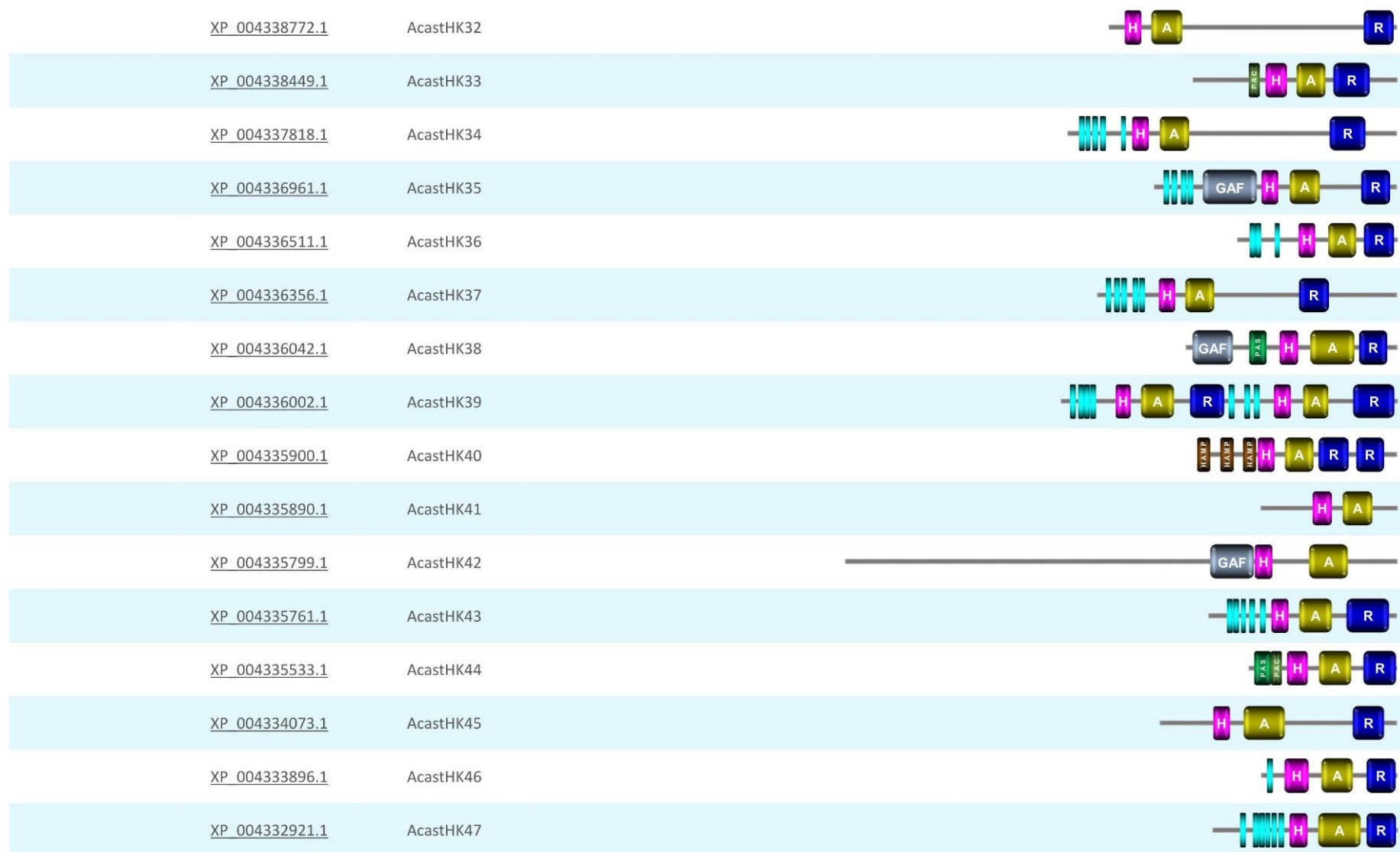
[Rozal1_1|3104|](#) RalloHK4

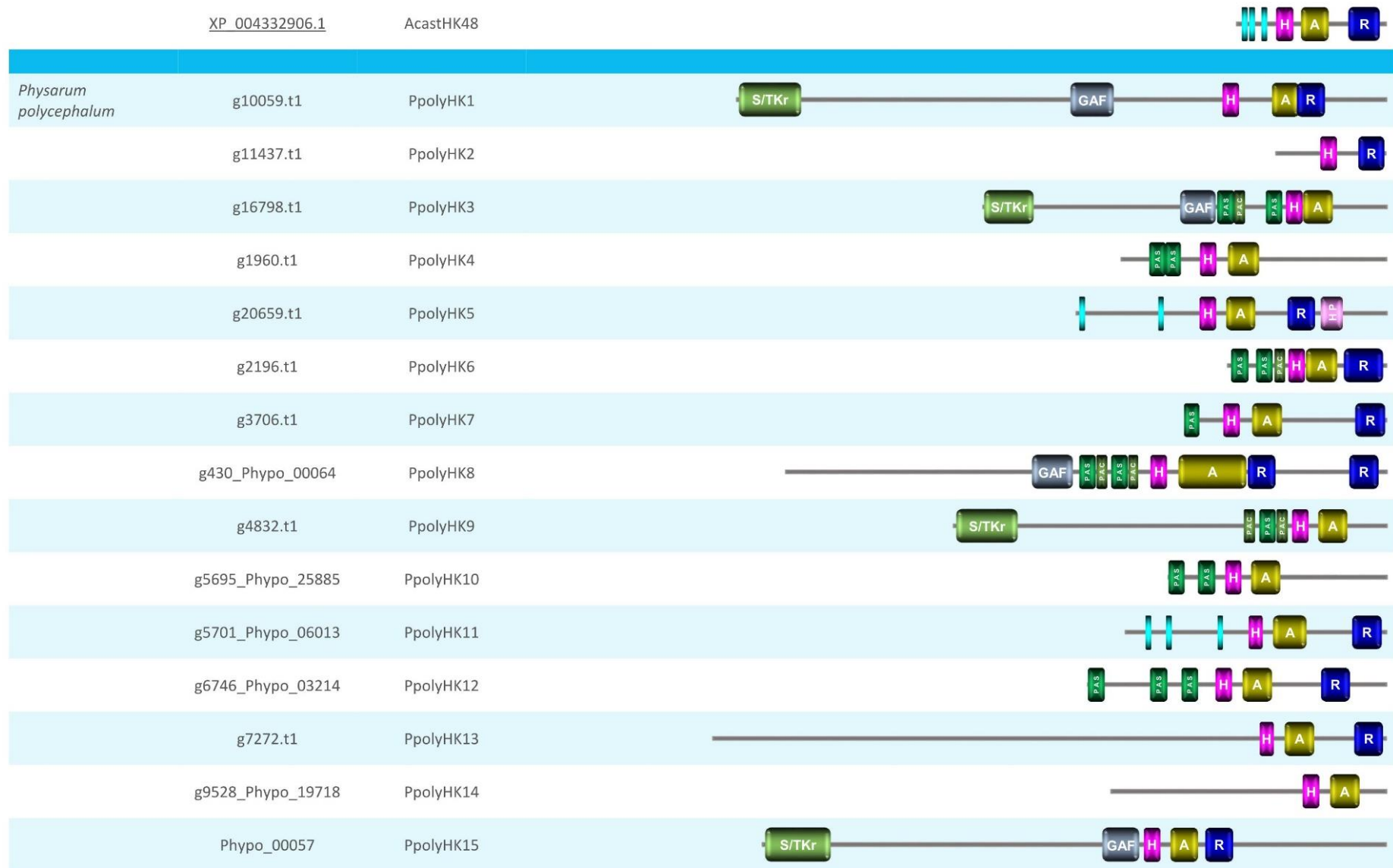
[Rozal1_1|946|](#) RalloHK5

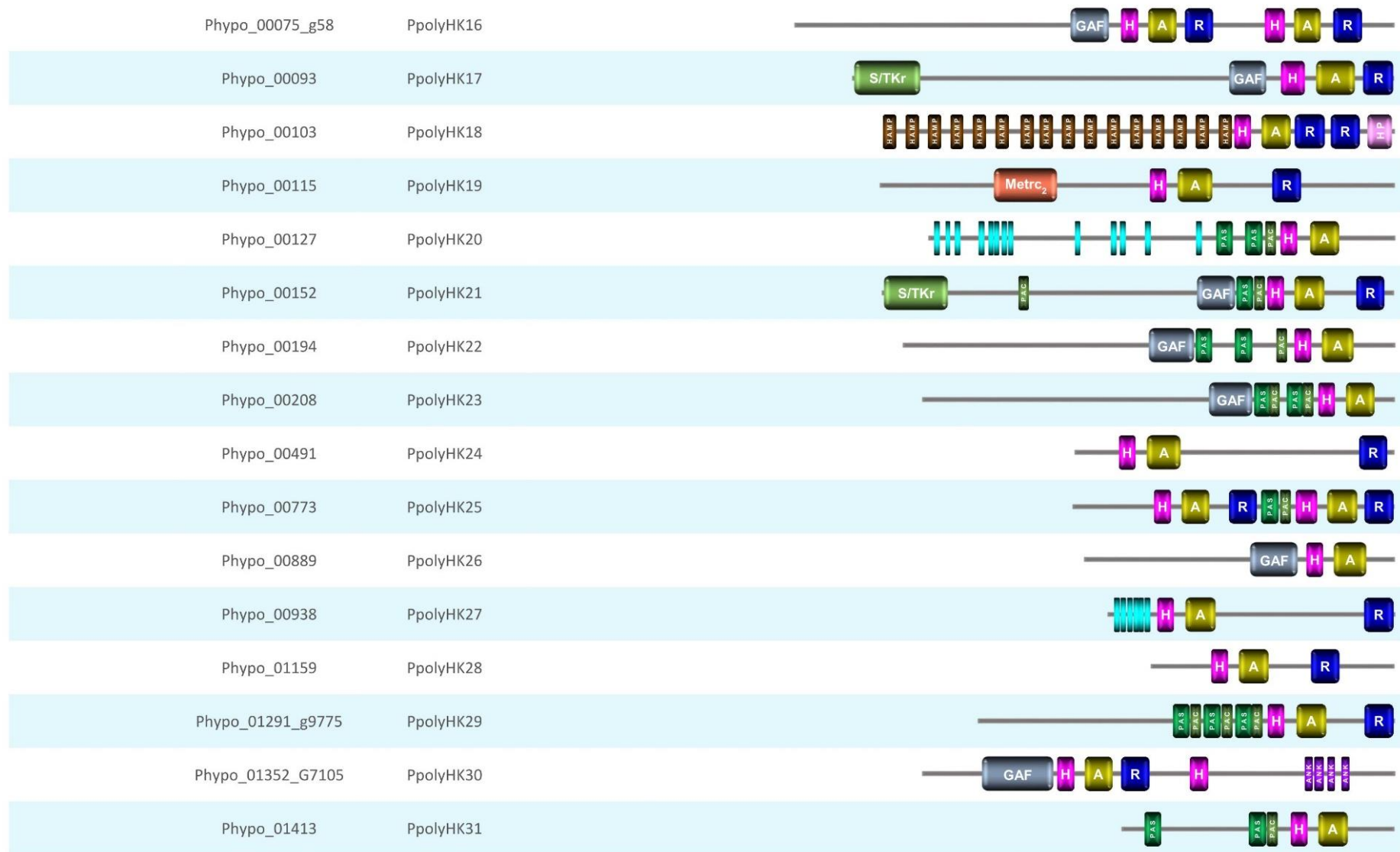


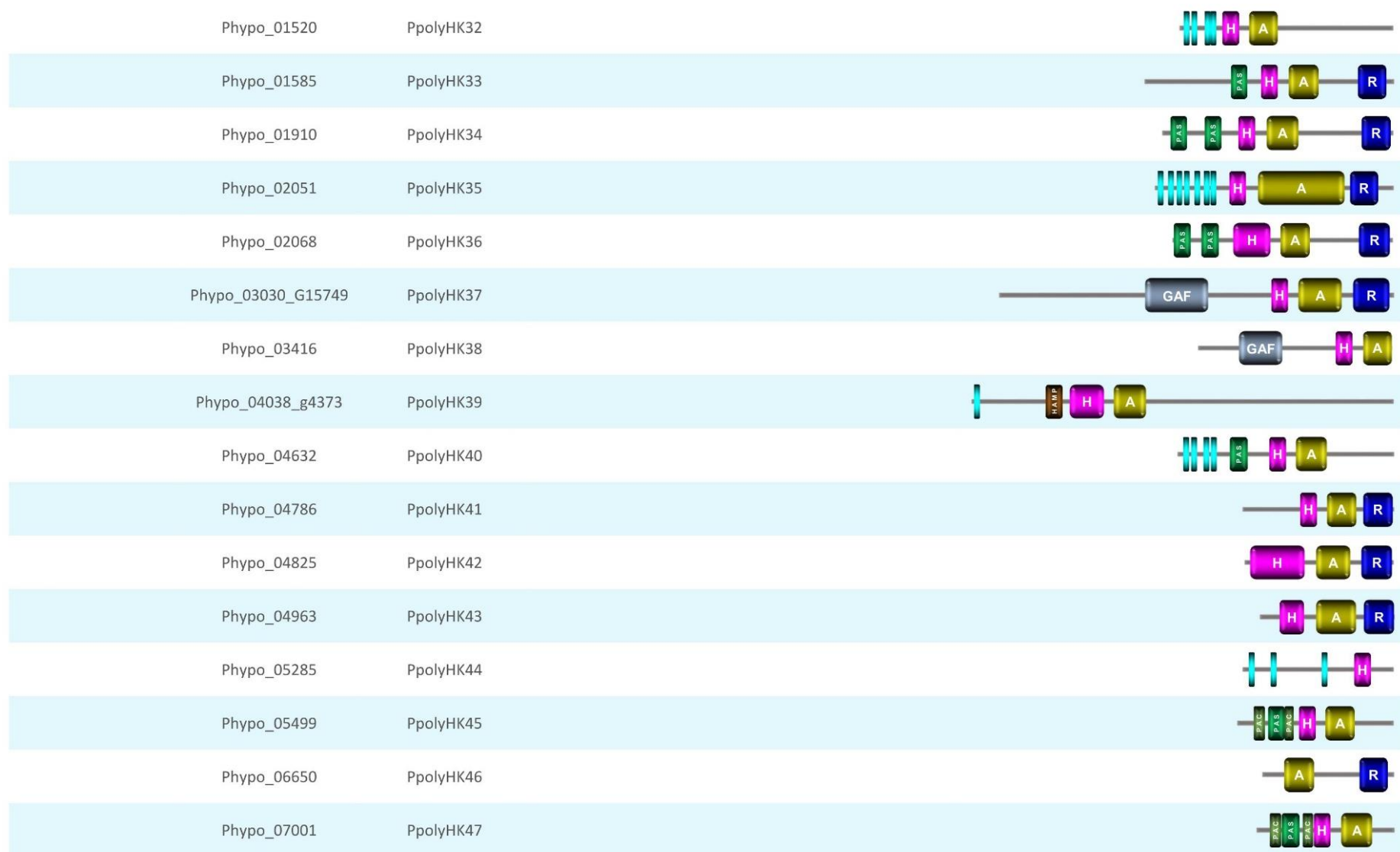
Species	Acc. Num	Annotated here as	Domain arrangement (SMART)
AMOEBOZOA			
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	XP_004349724.1	AcastHK1	
	XP_004347212.1	AcastHK2	
	XP_004335793.1	AcastHK3	
	XP_004368122.1	AcastHK4	
	XP_004367844.1	AcastHK5	
	XP_004367842.1	AcastHK6	
	XP_004357435.1	AcastHK7	
	XP_004356506.1	AcastHK8	
	XP_004356466.1	AcastHK9	
	XP_004353621.1	AcastHK10	
	XP_004353268.1	AcastHK11	
	XP_004367708.1	AcastHK12	
	XP_004367646.1	AcastHK13	
	XP_004347209.1	AcastHK14	
	XP_004347208.1	AcastHK15	

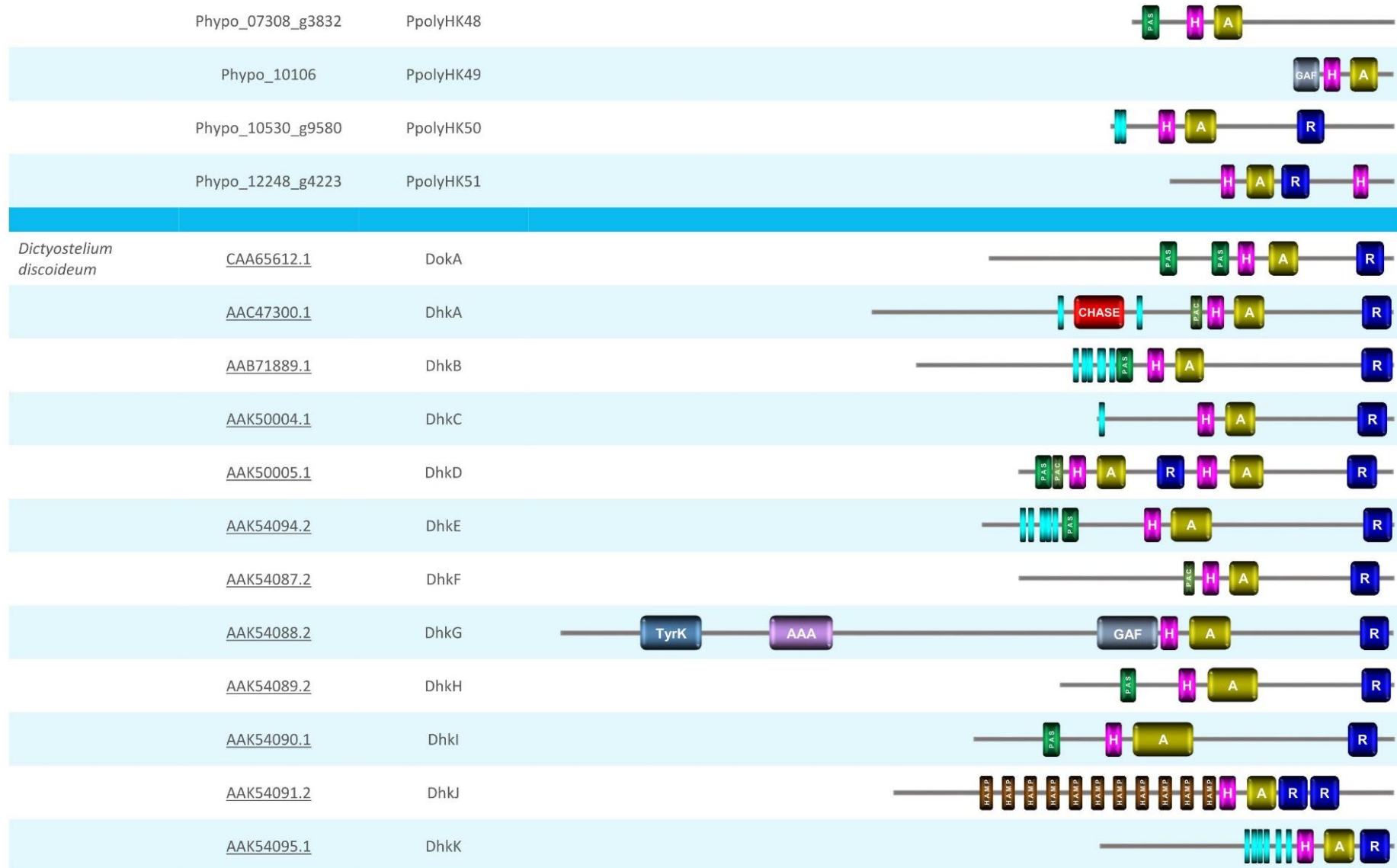


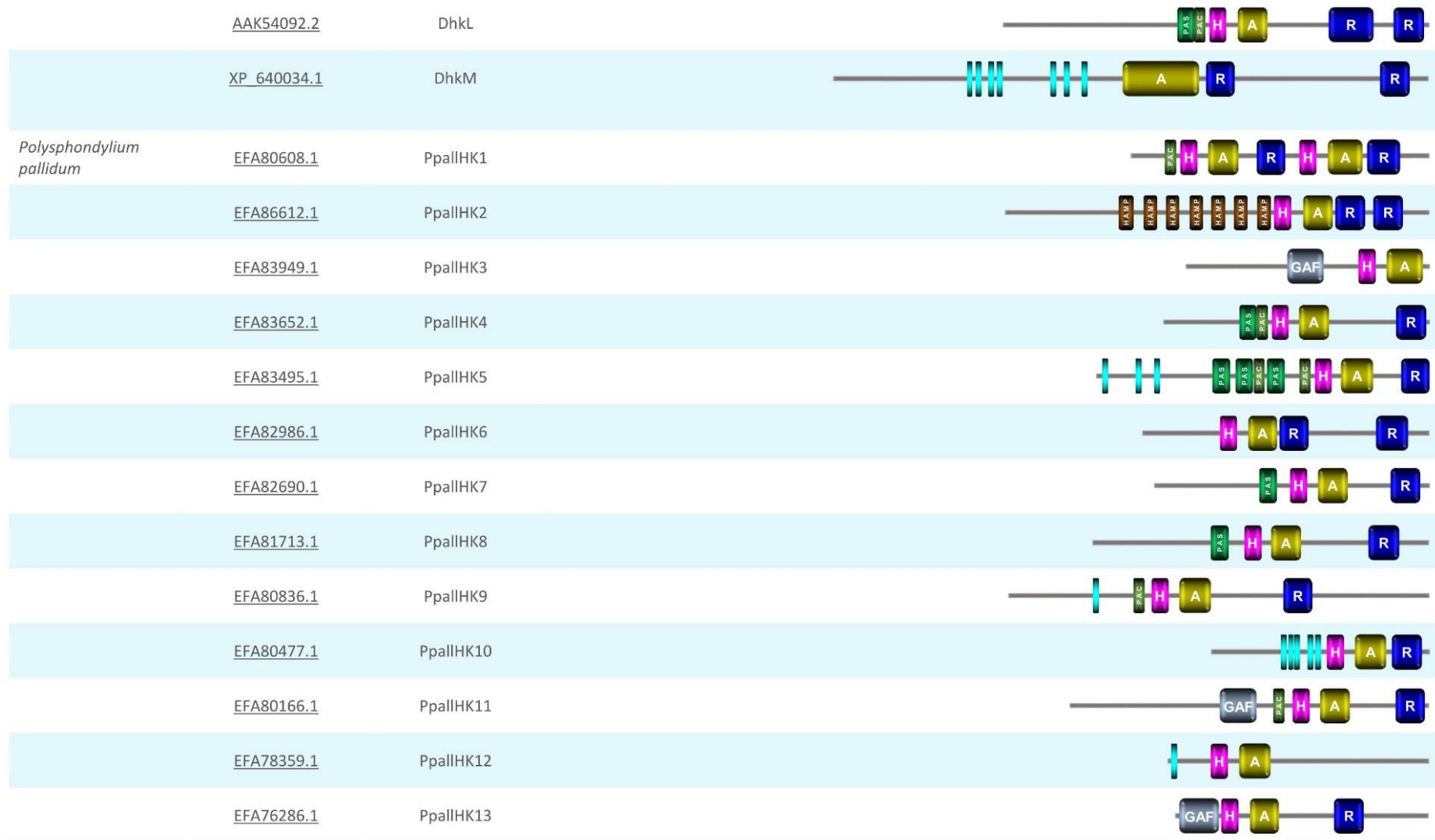






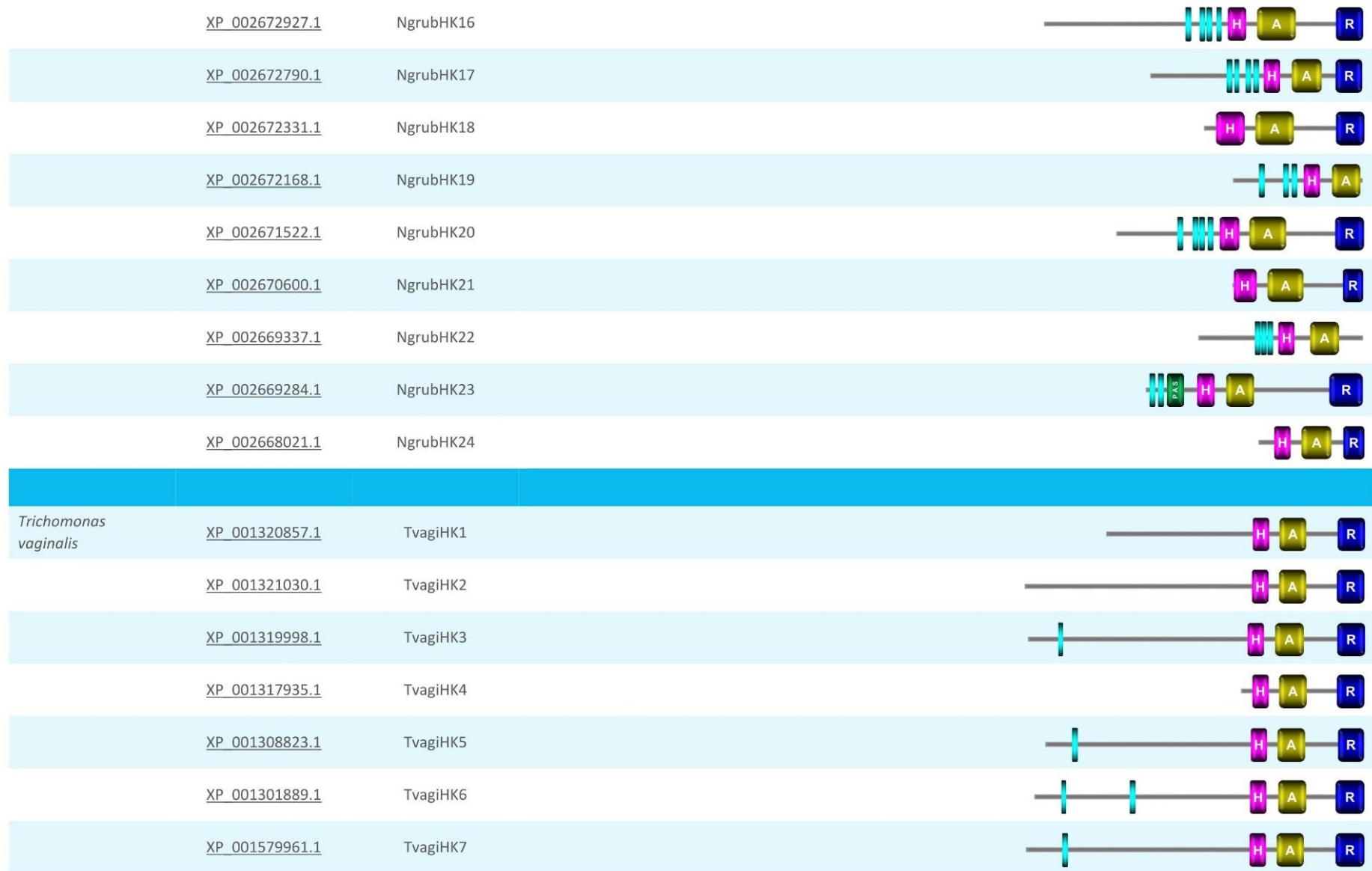






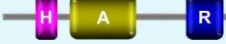

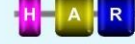

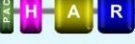



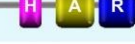



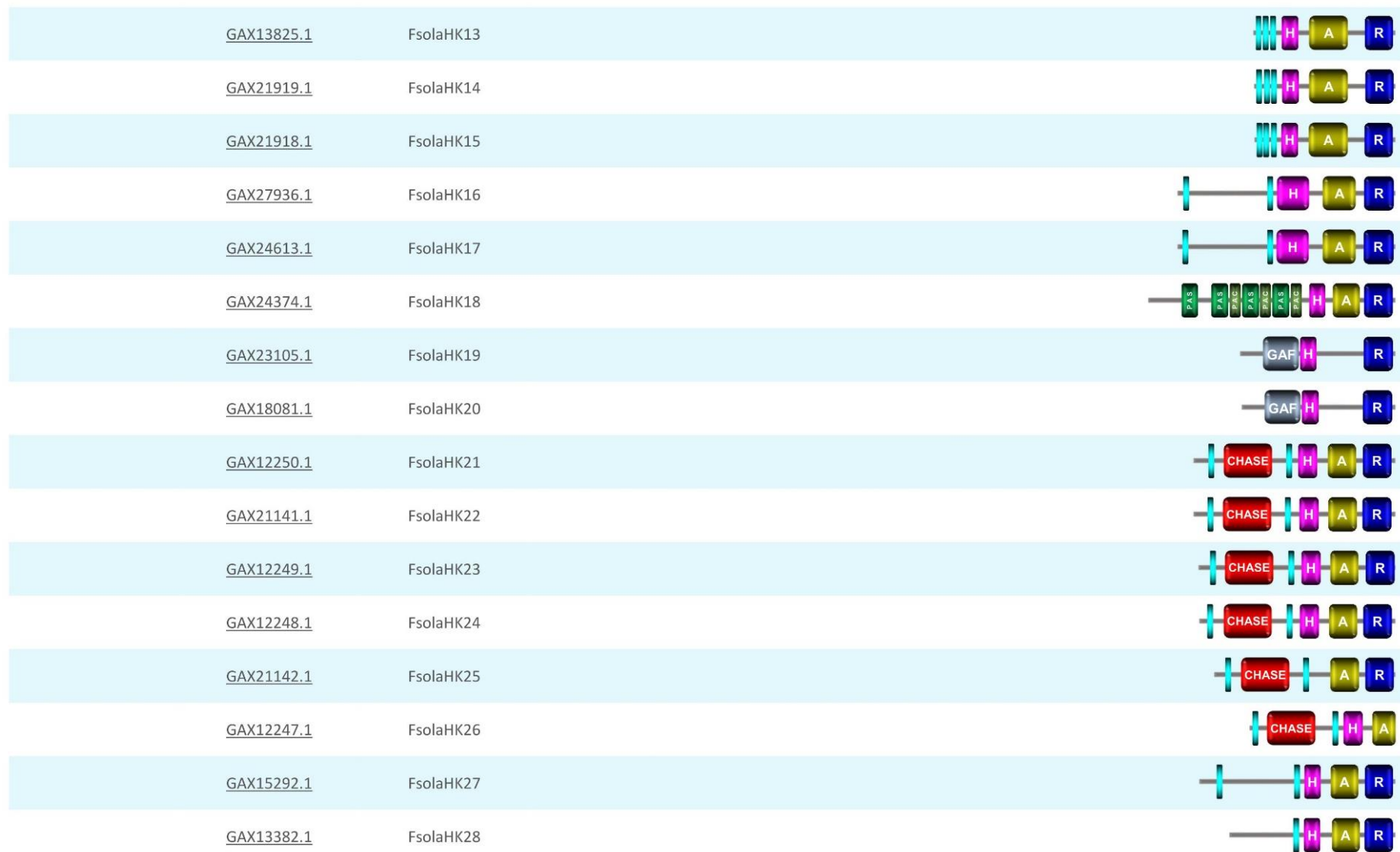


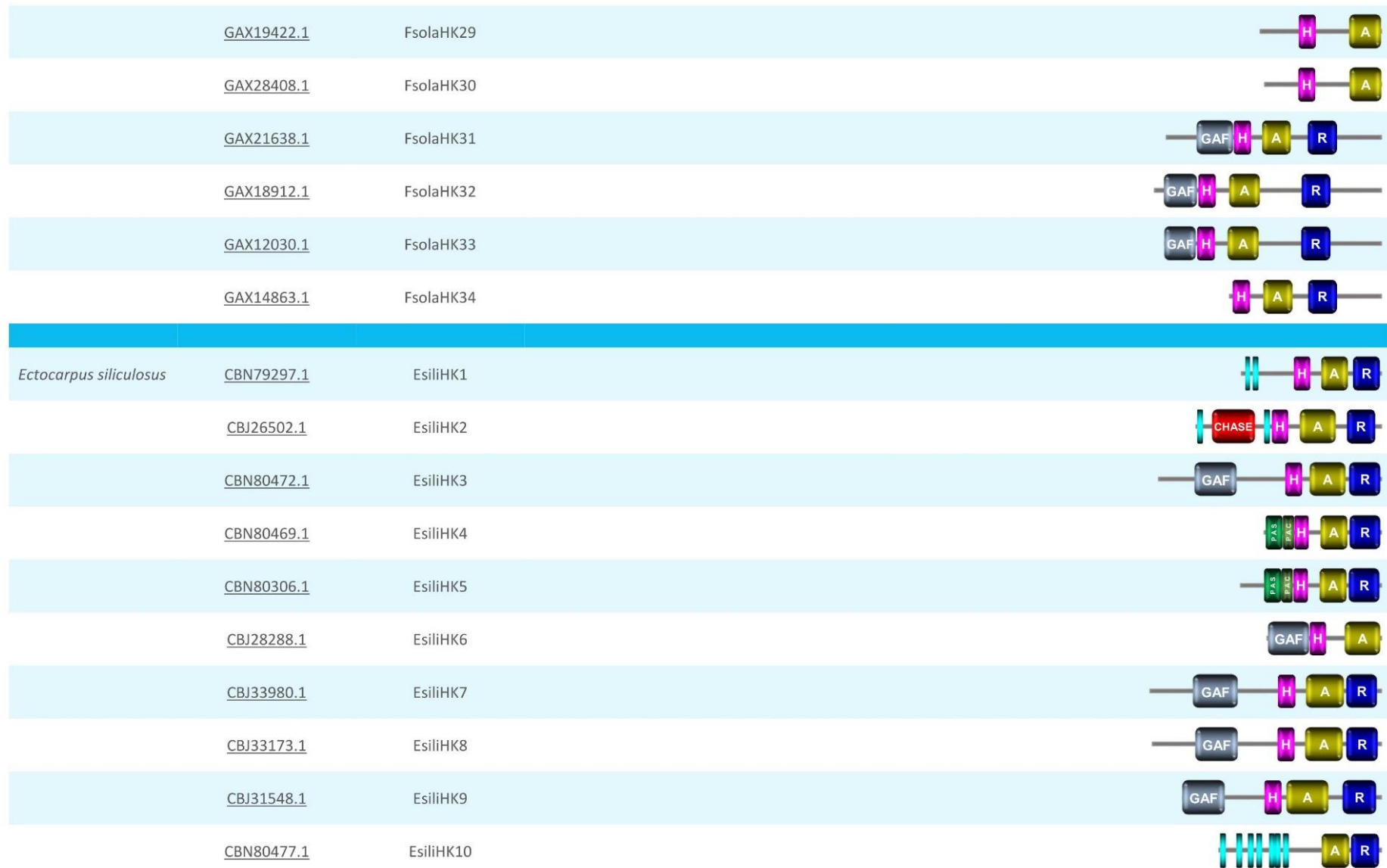
Species	Acc. Num	Annotated here as	Domain arrangement (SMART)
APUSOZOA			
<i>Techamonas trahens</i>	XP_013761889.1	TtrahHK1	
	XP_013761739.1	TtrahHK2	
	XP_013760384.1	TtrahHK3	
	XP_013760265.1	TtrahHK4	
	XP_013756727.1	TtrahHK5	
	XP_013756519.1	TtrahHK6	
	XP_013754366.1	TtrahHK7	
	XP_013753928.1	TtrahHK8	
	XP_013753672.1	TtrahHK9	
	XP_013753581.1	TtrahHK10	
	XP_013753134.1	TtrahHK11	

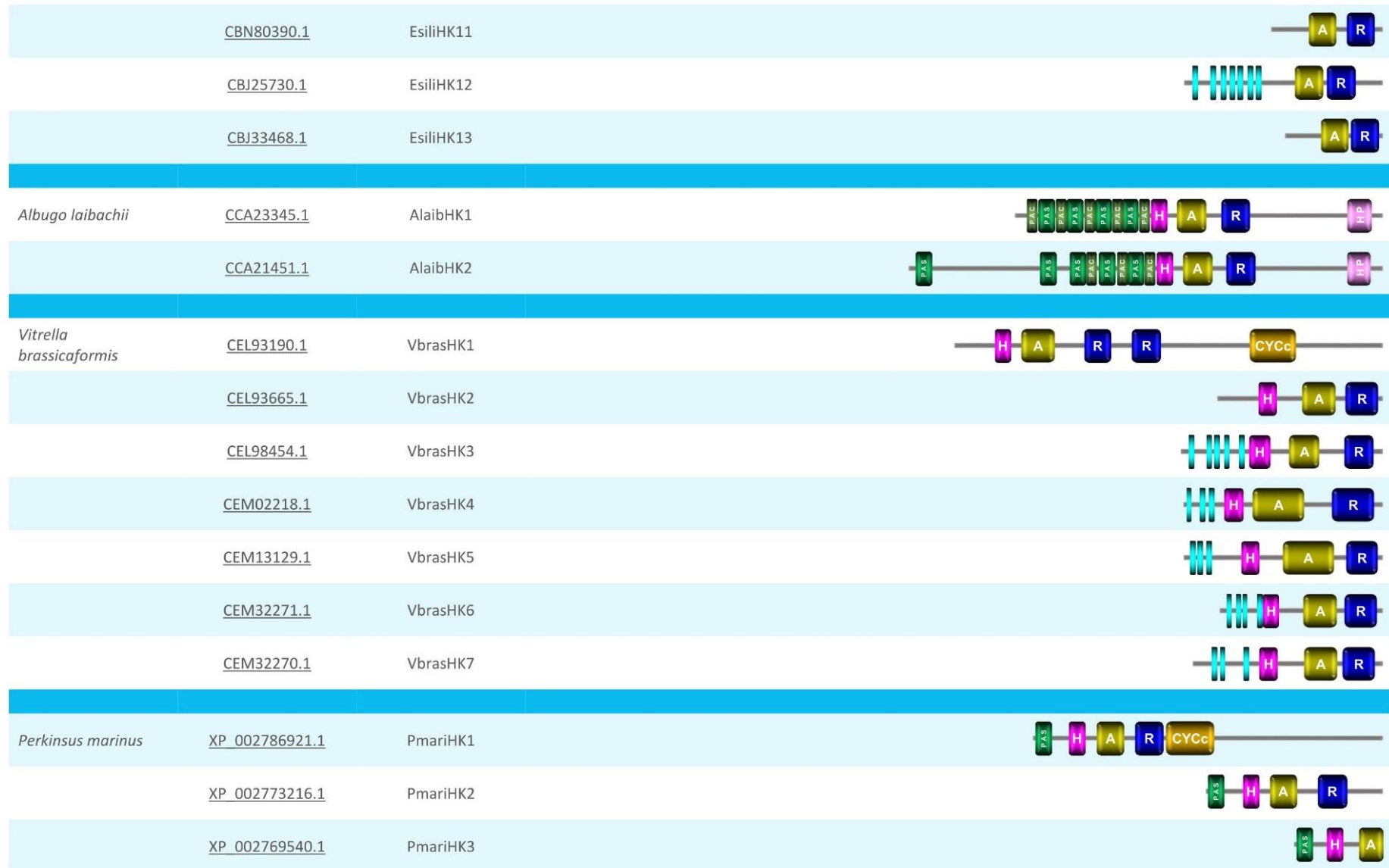
Species	Acc. Num	Annotated here as	Domain arrangement (SMART)
EXCAVATA			
<i>Naegleria gruberi</i>	XP_002682149.1	NgrubHK1	
	XP_002681933.1	NgrubHK2	
	XP_002681915.1	NgrubHK3	
	XP_002681143.1	NgrubHK4	
	XP_002680543.1	NgrubHK5	
	XP_002679490.1	NgrubHK6	
	XP_002679117.1	NgrubHK7	
	XP_002677990.1	NgrubHK8	
	XP_002677574.1	NgrubHK9	
	XP_002675328.1	NgrubHK10	
	XP_002675154.1	NgrubHK11	
	XP_002674170.1	NgrubHK12	
	XP_002673780.1	NgrubHK13	
	XP_002673759.1	NgrubHK14	
	XP_002673478.1	NgrubHK15	

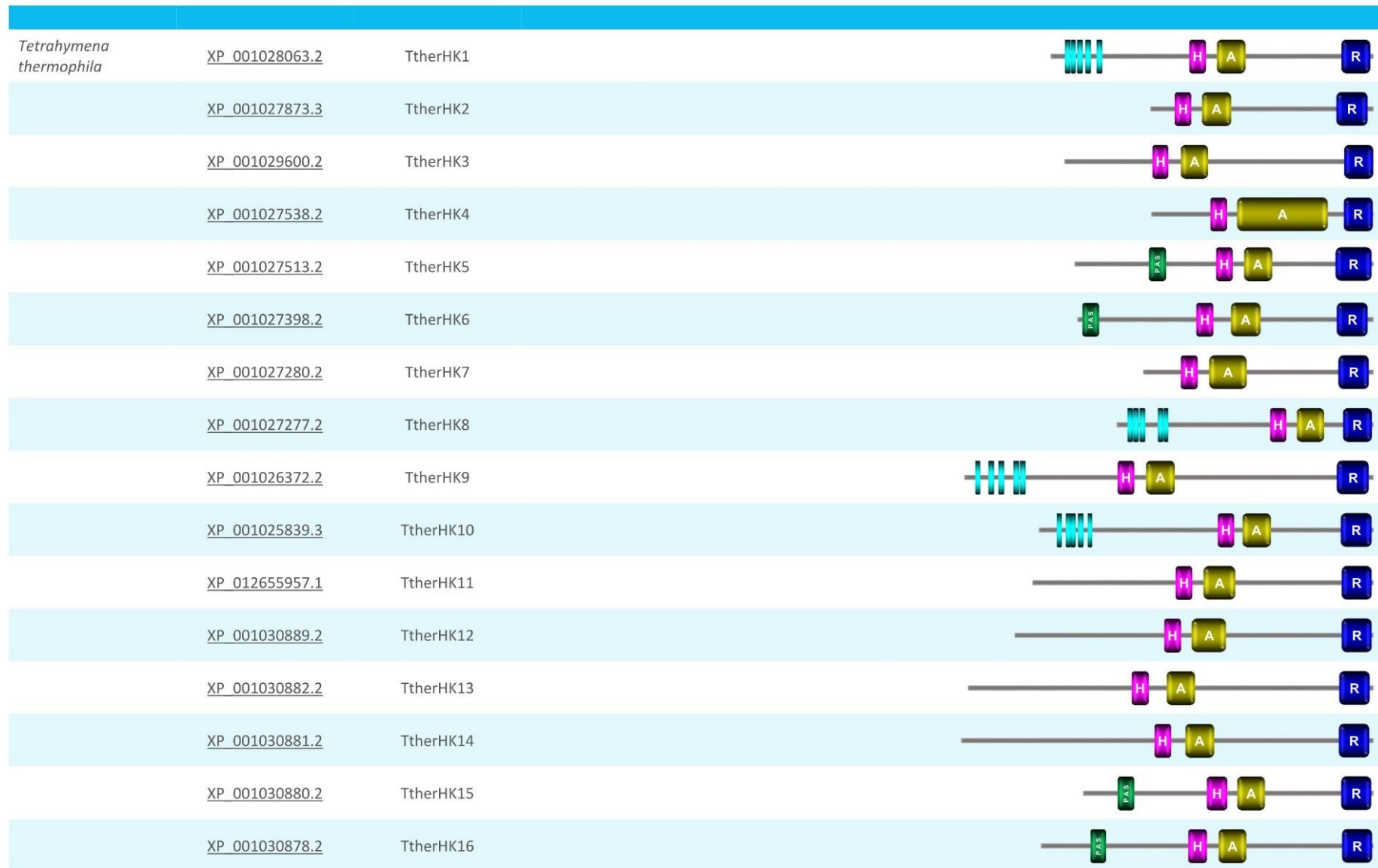


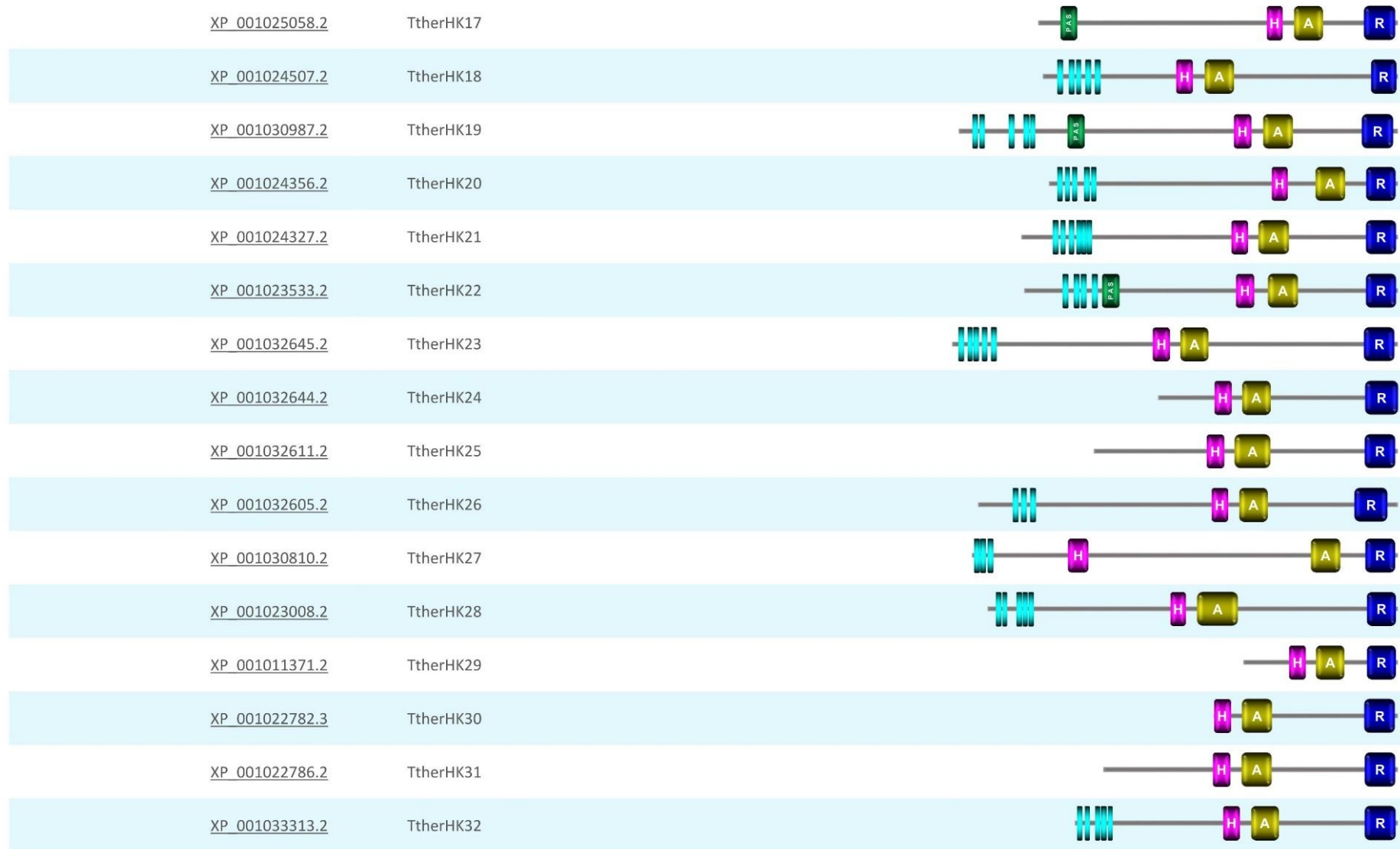
Species	Acc. Num	Annotated here as	Domain arrangement (SMART)
SAR			
<i>Aureococcus anophagefferens</i>	XP_009042407.1	AanopHK1	
	XP_009036196.1	AanopHK2	
Fistulifera solaris			
	GAX27780.1	FsolaHK1	
	GAX24471.1	FsolaHK2	
	GAX23902.1	FsolaHK3	
	GAX21436.1	FsolaHK4	
	GAX18934.1	FsolaHK5	
	GAX21932.1	FsolaHK6	
	GAX12051.1	FsolaHK7	
	GAX10549.1	FsolaHK8	
	GAX17168.1	FsolaHK9	
	GAX19519.1	FsolaHK10	
	GAX09632.1	FsolaHK11	
	GAX13824.1	FsolaHK12	

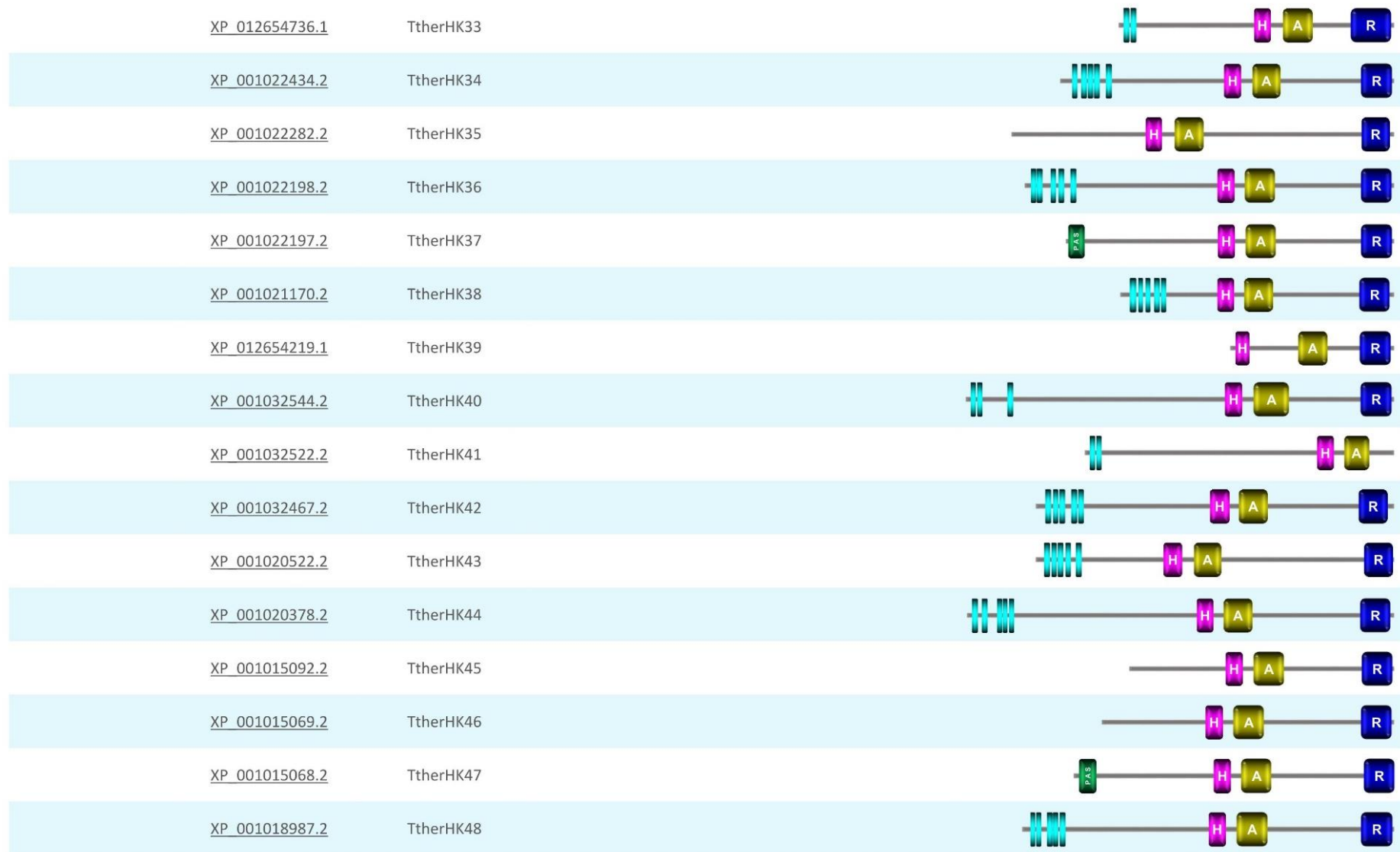


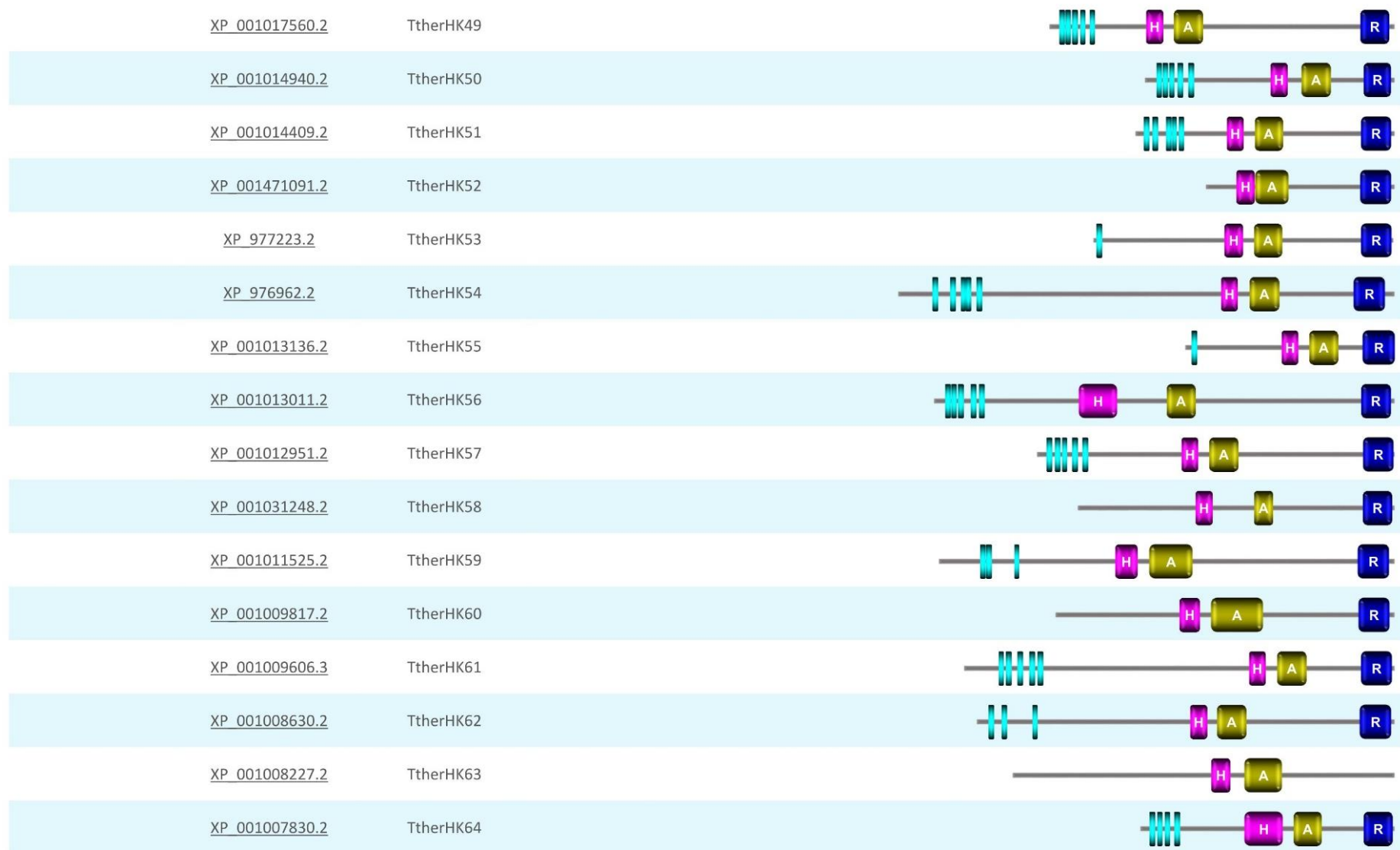


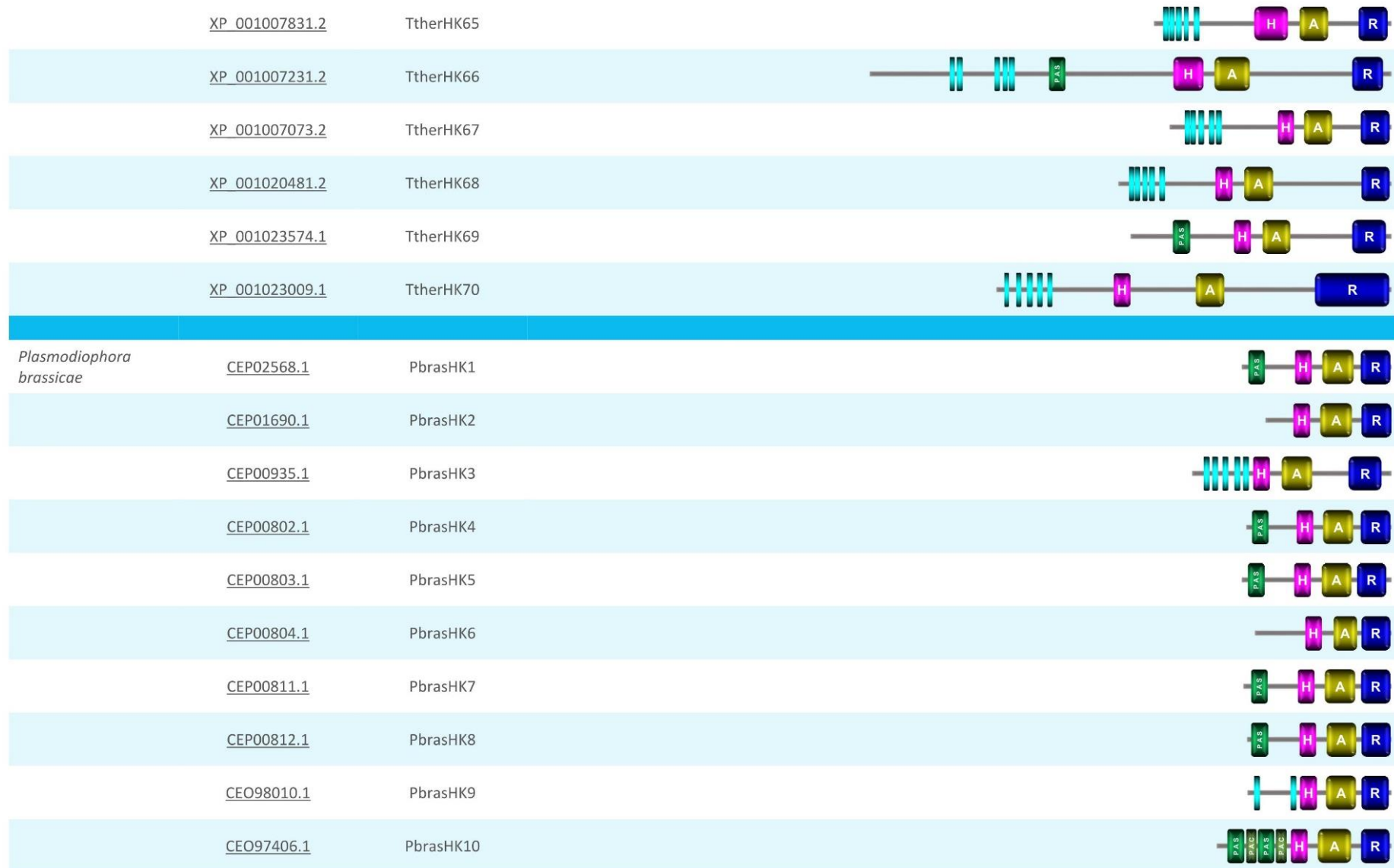














Partie II

Les histidines kinases : caractérisation fonctionnelle chez *Scedosporium apiospermum*

1. Introduction générale

Comme largement mentionné dans les parties précédentes, les HKs sont des protéines « senseurs » capables de capter les signaux externes et qui permettent ainsi à la plupart des micro-organismes de s'adapter à l'environnement dans lequel ils se développent. Notre hypothèse est que ces protéines pourraient jouer un rôle majeur dans l'adaptation de l'espèce fongique *S. apiospermum* à l'environnement pulmonaire très particulier des patients atteints de mucoviscidose. En effet, un mucus épais et visqueux ainsi qu'une clairance muco-ciliaire inefficace caractérisent cette pathologie. De plus, une hypoxie et un pH acide du mucus bronchique sont également reportés dans ce contexte.

Les HKs sont décrites chez une grande variété d'organismes vivants, à l'exception des cellules mammifères. Les animaux possèdent bien des structures HKs dans leurs génomes mais ces dernières sont très différentes de celles décrites chez les bactéries ou les champignons. Les HKs possèdent toutes le même mécanisme d'action qui a pour objectif final de délivrer une réponse cellulaire adaptée. Plus précisément, les HKs captent un stimulus via leur extrémité N-terminale. Puis un résidu histidine conservé présent dans la H-box de la partie C-terminale de l'HK sera phosphorylé. S'en suit une cascade de phosphorylation qui engendrera l'activation ou l'inhibition d'autres effecteurs situés plus en aval de ces voies de signalisation (Hérivaux *et al.*, 2016).

Malgré un mécanisme d'action similaire, c'est-à-dire l'activité HK en tant que telle de ces senseurs, leur implication dans les processus physiologiques du champignon est le plus souvent variable en fonction de la classe de l'histidine kinase hybride (HHK) considérée. Les données concernant le rôle des HHKs fongiques restent à ce jour limitées chez les champignons pathogènes, c'est pourquoi après avoir identifié la présence de gènes codant des HHKs dans le génome de *S. apiospermum*, nous proposons dans cette partie de caractériser la fonction des différentes classes d'HHKs chez notre modèle fongique.

2. Matériels et méthodes

2.1. Outils de bio-informatique : identification des gènes codant des histidine kinases chez les espèces du genre *Scedosporium*

2.1.1. Banque de données

La recherche des séquences protéiques et nucléotidiques des HHKs a été effectuée chez différentes espèces appartenant au genre *Scedosporium* et dont le génome a été publié : *S. apiospermum* IHEM 14462 (Vandeputte *et al.*, 2014, [NW_015971811.1](#)), *S. apiospermum* HDO1 (Morales *et al.*, 2017, [MVOQ01000001.1](#)), *S. aurantiacum* WM 09.24 (Pérez-Bercoff *et al.*, 2015, [JUDQ01000001.1](#)), *S. boydii* IHEM 23826 (Duvaux *et al.*, 2017, [NJFT01000001.1](#)) et *S. dehoogii* 120008799-01/4 (Shiller *et al.*, 2017_Unpublished, [PGIRO1000001.1](#)).

Les génomes de ces différentes souches sont disponibles dans la base de données du NCBI (National Center for Biotechnology : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

2.1.2. Recherche des séquences protéiques et nucléotidiques

La recherche de séquences homologues nucléotidiques et/ou protéiques des HHKs au sein des génomes séquencés a été réalisée à l'aide des outils BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool* : <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) proposés par le NCBI.

Le génome de *S. apiospermum* IHEM 14462 a été interrogé contre le génome d'*A. fumigatus* Af293 (Nierman *et al.*, 2005, [XP_749489.1](#)) et celui de *Magnaporthe oryzae* 70-15 (Dean *et al.*, 2005, [XP_003714630.1](#)). Les génomes de toutes les autres espèces appartenant au genre *Scedosporium* ont été interrogés contre le génome de la souche IHEM 14462.

2.1.3. Prédiction des séquences protéiques

Lorsque seules les séquences nucléotidiques étaient disponibles, elles ont été traduites en séquences protéiques hypothétiques à l'aide des outils ExpASY – Translate Tool (<https://web.expasy.org/cgi-bin/translate/dna2aa.cgi>) et Augustus – Gene Prediction (<http://bioinf.uni-greifswald.de/augustus/>).

2.1.4. Prédiction des domaines protéiques

Une fois les séquences protéiques des différentes HHKs identifiées, la prédiction des domaines a été réalisée à l'aide des bases de données CDD (*Conserved Domain Database* : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/>), Pfam (*Protein families database* : <https://pfam.xfam.org/>) et du logiciel SMART (*Simple Modular Architecture Research Tool* : <http://smart.embl-heidelberg.de/>). Les domaines transmembranaires ont été identifiés à l'aide du logiciel TMHMM Server v. 2.0 (*Transmembrane Helix Prediction* : <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>).

2.1.5. Alignement des séquences

Les alignements multiples des séquences génomiques ont été réalisés grâce au logiciel Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

2.2. Matériel biologique

2.2.1. Matériel fongique

La souche sauvage utilisée comme source d'ADN génomique est la souche IHEM 14462 de *S. apiospermum*. Elle a été isolée au CHU de Tours en 1998 à partir d'un crachat d'un patient atteint de mucoviscidose. Actuellement, il s'agit de la souche de référence au laboratoire étant la première dont le génome a été séquencé, quatre ans auparavant (Vandeputte *et al.*, 2014).

La souche parentale utilisée lors de la construction des mutants *HHKΔ* est identique à la souche IHEM 14462, mentionnée précédemment, à la différence que celle-ci a été optimisée pour la recombinaison homologue en délétant au préalable le gène *ku70* (voir la partie résultats ci-après).

L'entretien des souches a été réalisé par repiquages successifs sur milieu PDA supplémenté en chloramphénicol 0,5% pour *S. apiospermum*, de façon à limiter une potentielle croissance bactérienne (**Annexe I**). Pour la souche *ku70Δ*, en plus du chloramphénicol 0,5%, l'agent de sélection phléomycine (Phleo) 20 µg.mL⁻¹ (Invivogen, Toulouse, France) a été ajouté dans le milieu afin de maintenir la pression de sélection puisque les mutants *ku70Δ* ont été générés à l'aide du marqueur de résistance à la Phleo, *Shble* de *Streptococcus hindustanus*. Le champignon a été ensuite incubé à 37°C pendant 7 à 9 jours.

La majorité des constructions réalisées lors de ces travaux intégrant le gène de résistance à l'hygromycine B (HygB) d'*Escherichia coli* (*hph*), les repiquages successifs des transformants ont été réalisés sur YPDA ou PDA (**Annexe I**) supplémentés en chloramphénicol 0,5% et en HygB 50 µg.mL⁻¹ (Invivogen, Toulouse, France). Lorsque le gène de résistance *Shble* a été intégré aux constructions, les transformants ont été repiqués sur des milieux identiques en présence de 20 µg.mL⁻¹ de Phleo à la place de l'HygB. Le temps d'incubation à 37°C a été variable en fonction des transformants (de 1 à 4 semaines ou plus).

Les suspensions de spores des différentes souches ont été conservées en glycérol 20% à -80°C.

2.2.2. Matériel bactérien

Pour les clonages des différentes cassettes moléculaires, la souche bactérienne utilisée a été *Escherichia coli* DH5α. Les bactéries sont conservées à -80°C en diméthyl sulfoxyde 7% (DMSO, Alfa Aesar, Karlsruhe, Allemagne).

L'ensemble des plasmides utilisés dans cette étude contenant le gène *AMP^R*, les bactéries transformées ont étéensemencées sur le milieu solide Luria Bertani (LB) supplémenté en ampicilline 100 µg.mL⁻¹ (EMD Millipore Corp., Guyancourt, France) (**Annexe I**). Les clones bactériens d'intérêt peuvent

être conservés en glycérol 20% à -80°C à partir d'une pré-culture en milieu liquide LB contenant 100 µg.mL⁻¹ d'ampicilline (16 h, 250 rpm, 37°C) (**Annexe I**).

2.3. Extraction et purification des acides nucléiques

2.3.1. Extraction de l'ADN génomique

L'ADN de *S. apiospermum* a été extrait à partir de cultures liquides en milieu YPD (2 à 4 j, 120 rpm, 37°C) (**Annexe I**). Le mycélium obtenu est filtré sur Miracloth (porosité 22 µm) puis broyé à l'azote liquide. Le broyat est repris par 5 mL d'un tampon de lyse (**Annexe I**).

L'extraction de l'ADN fongique est réalisée classiquement à l'aide du phénol-chloroforme. Cinq mL d'un mélange de phénol:chloroforme:isopropanol (25:24:1) sont ajoutés au broyat lysé. L'ensemble est vortexé puis centrifugé (30 min, 4600 rpm, 4°C). Cinq mL de chloroforme:isopropanol (24:1) sont additionnés au surnageant. Le mélange est vortexé puis centrifugé de nouveau (30 min, 4600 rpm, 4°C).

L'ADN extrait est précipité (30 min, -20°C) en ajoutant 2 volumes d'éthanol absolu (Fisher Scientific, New Hampshire, USA) au surnageant. Après centrifugation (1 h, 4600 rpm, 4°C), le culot d'ADN est lavé avec 500 µL d'éthanol 70%. Une fois le culot séché, ce dernier est repris dans 500 µL de Tris-EDTA 1X (TE 1X) (**Annexe I**) auxquels 1 µL de RNase A (Thermo Fischer Scientific, Illkirch, France) à 100 mg.mL⁻¹ est ajouté. Après incubation 1 h à 37°C, 1 volume d'isopropanol (Fisher Scientific, Illkirch, France, USA) est ajouté pour précipiter de nouveau l'ADN. Après évaporation totale de la partie alcoolique, le précipité d'ADN obtenu est repris dans du tampon TE 1X puis conservé à 4°C.

2.3.2. Extraction de l'ADN plasmidique

a) Minipréparation de l'ADN plasmidique

L'extraction d'ADN plasmidique a été réalisée par lyse alcaline de clones recombinants d'*Escherichia coli*. Les colonies transformées sont tout d'abord mises en culture dans 3 mL de milieu liquide LB contenant 100 µg.mL⁻¹ d'ampicilline (16 h, 250 rpm, 37°C). Le culot bactérien est récupéré par centrifugation (5 min, 4600 rpm, 4°C) puis repris dans 200 µL d'une solution de resuspension (**Annexe I**). Deux cents µL d'un tampon de lyse sont mis au contact des cellules bactériennes (1 min) (**Annexe I**). Le lysat est ensuite neutralisé (**Annexe I**). Après élimination des débris bactériens par centrifugation (15 min, 4600 rpm, 4°C), l'ADN plasmidique est précipité en ajoutant 2 volumes d'éthanol absolu (Fisher Scientific, Illkirch, France) puis incubé 15 min à -20°C. Le culot d'ADN récupéré après centrifugation (15 min, 15000 rpm, 4°C) est lavé à l'éthanol 70%. Une fois séché, le culot est repris dans 50 µL de TE 1X, puis stocké à -20°C.

b) Maxipréparation de l'ADN plasmidique

Le protocole de transgénèse de *S. apiospermum* nécessitant plusieurs µg d'ADN transformant, les cassettes validées par digestions enzymatiques ont été amplifiées puis purifiées selon une méthode de maxipréparation. Une pré-culture de 100 mL en milieu LB additionné d'ampicilline 100 µg.mL⁻¹ (16 h, 250

rpm, 37°C) du clone bactérien transformant est réalisée. La pré-culture a été traitée à l'aide du coffret NucleoBond® Xtra Midi (Macherey-Nagel, Düren, Allemagne), selon les recommandations du fabricant.

2.4. Purification des acides nucléiques à partir d'un gel

Les fragments d'ADN séparés par électrophorèse sur gel d'agarose classique ont été purifiés à l'aide du coffret Nucleospin® Gel et PCR Clean-Up (Macherey-Nagel, Düren, Allemagne) selon les recommandations du fabricant.

2.5. Analyse des acides nucléiques

2.5.1. Electrophorèse de l'ADN

La qualité et la taille des fragments d'ADN, en mélange avec du tampon de charge Gel Loading Dye Purple 6X (New England BioLabs, Evry, France) sont appréciées après migration sur gel d'agarose 0,8% à 1% en tampon Tris-Acétate EDTA 0,5X (TAE 0,5X, Tris-acétate, 20mM ; acide acétique, 0,6 g.L⁻¹ ; EDTA, 0,5mM) en utilisant le Midori Green 1% (Advance DNA stain, Nippon Genetics Europe, Dueren, Allemagne) comme agent intercalant de l'ADN. Après migration en tampon TAE 0,5X (35 min, 110 V), l'ADN est révélé sous rayonnement UV ($\lambda = 254$ nm) à l'aide d'une table fluorescente Combi-Light (Vilber Lourmat, Marne-La-Vallée, France). La taille des ADNs extraits est évaluée grâce au marqueur de taille Quick-Load Purple 2-Log (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, New England BioLabs, Evry, France).

2.5.2. Quantification de l'ADN

L'ADN a été quantifié au fluorimètre Qubit® 2.0 (Invitrogen, Illkirch, France) en diluant (volume final de 200 μL) 2 μL d'échantillon dans la solution de travail préparée selon les recommandations du fournisseur (Qubit™ dsDNA BR Buffer, Invitrogen, Illkirch, France), qui réagissent avec un composé fluorescent (Fluo Qubit™ dsDNA BR Reagent 200X, Invitrogen, Illkirch, France) qui forme un complexe avec les acides nucléiques. La calibration préalable du fluorimètre à l'aide du kit Quant-iT™ dsDNA Broad-range Assay (Invitrogen, Illkirch, France) permet d'apprécier la quantité de complexe formé.

2.5.3. Digestion par des endonucléases de restriction

L'ADN plasmidique a été digéré dans un volume final de 20 ou 50 μL , en présence d'une unité d'endonucléases (New England BioLabs, Evry, France) pour 1 μg d'ADN, dans une concentration 1X du tampon adéquat fourni par le fabricant. L'ADN plasmidique est digéré pendant 4 h alors que l'ADN génomique est digéré sur la nuit. Les digestions sont incubées à la température optimale indiquée par le fournisseur, en fonction des endonucléases utilisées.

2.5.4. Précipitation de l'ADN

L'ADN plasmidique a été précipité dans un mélange Na-Acétate 3M pH5,2 (1/10^{ème} du volume) et éthanol absolu (2 volumes). L'ensemble est centrifugé (15 min, 15000 rpm, 4°C) après 15 min d'incubation

à -20°C. Le culot est lavé à l'éthanol 70% après élimination du surnageant, puis séché et resuspendu en tampon TE 1X avant d'être conservé à 4°C.

2.6. PCR conventionnelle

L'amplification de l'ADN a été réalisée par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) à l'aide du kit GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase (Promega, Charbonnières, France). Selon les recommandations du fournisseur, pour un volume final de 50 µL, le mélange réactionnel se compose de 1X de tampon 5X Colorless GoTaq® Flexi, 2,5mM de MgCl₂ 25mM, 0,2mM de dNTP 10mM (Biotechrabbit, Berlin, Allemagne), 1µM d'oligonucléotides 10mM (Integrated DNA Technologies, Leuven, Belgique) sens et antisens délimitant la séquence à amplifier, 1,25 unités de GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase 5 u/µL et moins de 0,5 µg d'ADN.

La réaction de PCR, réalisée à l'aide du thermocycleur Personnel GeneQ TC 24 Bioer (Dominique Dutsher, Brumath, France), débute par une étape initiale de dénaturation (2 min, 95°C). Puis une série de 30 cycles permet l'amplification de l'ADN : une phase de dénaturation (30 sec, 95°C), une phase d'hybridation (30 sec à la température optimale des oligonucléotides utilisés), et enfin une phase d'élongation (1 min/kb, 72°C). La réaction se termine par une étape finale d'élongation (5 min, 72°C).

2.7. Constructions moléculaires

2.7.1. Clonage dans le pGEM®-T Easy

La stratégie de type TA-cloning est utilisée pour l'insertion d'un ADN dans le vecteur pGEM®-T Easy (Promega, Charbonnières, France). Lors de l'amplification de l'ADN, la Taq DNA polymérase ajoute une base azotée adénosine supplémentaire à l'extrémité 5' des fragments amplifiés grâce à son activité déoxynucléotidyl terminale transférase. Le vecteur pGEM®-T Easy linéaire possède une thymine supplémentaire à son extrémité 3'. Il s'opère donc une hybridation thymine/adénine entre le vecteur et l'ADN.

A l'aide du kit pGEM®-T Easy Vector System II (Promega, Charbonnières, France) et selon les recommandations du fournisseur, la réaction de ligature a été réalisée dans un volume réactionnel final de 10 µL qui se compose de 5 µL de 2X Rapid Ligation Buffer T4 DNA Ligase, de 1 µL (soit 50 ng) de pGEM®-T Easy Vector et de 1 µL de T4 DNA Ligase (3 Weiss units/µL). La quantité de produit de PCR ajoutée au mélange réactionnel est généralement optimisée de manière à respecter un ratio insert/vecteur de 3:1. Le mélange est incubé 1 h à température ambiante ou la nuit à 4°C.

2.7.2. Clonage dans les autres vecteurs

Les fragments obtenus par PCR ont été insérés dans un plasmide (pPV189, pAN7-1 (Punt *et al.*, 1987), pAN8-1 (Mattern *et al.*, 1988), pBlueScript II KS+ (pKS, Addgene, Teddington, Grande-Bretagne)) suite à une étape de ligature. Le mélange réactionnel s'effectue dans un volume final de 20 µL et se compose de 2 µL de tampon T4 DNA Ligase Buffer 10X (New England Biolabs, Evry, France) et de 1 µL de T4 DNA Ligase (New England Biolabs, Evry, France). Selon les recommandations du fournisseur, les

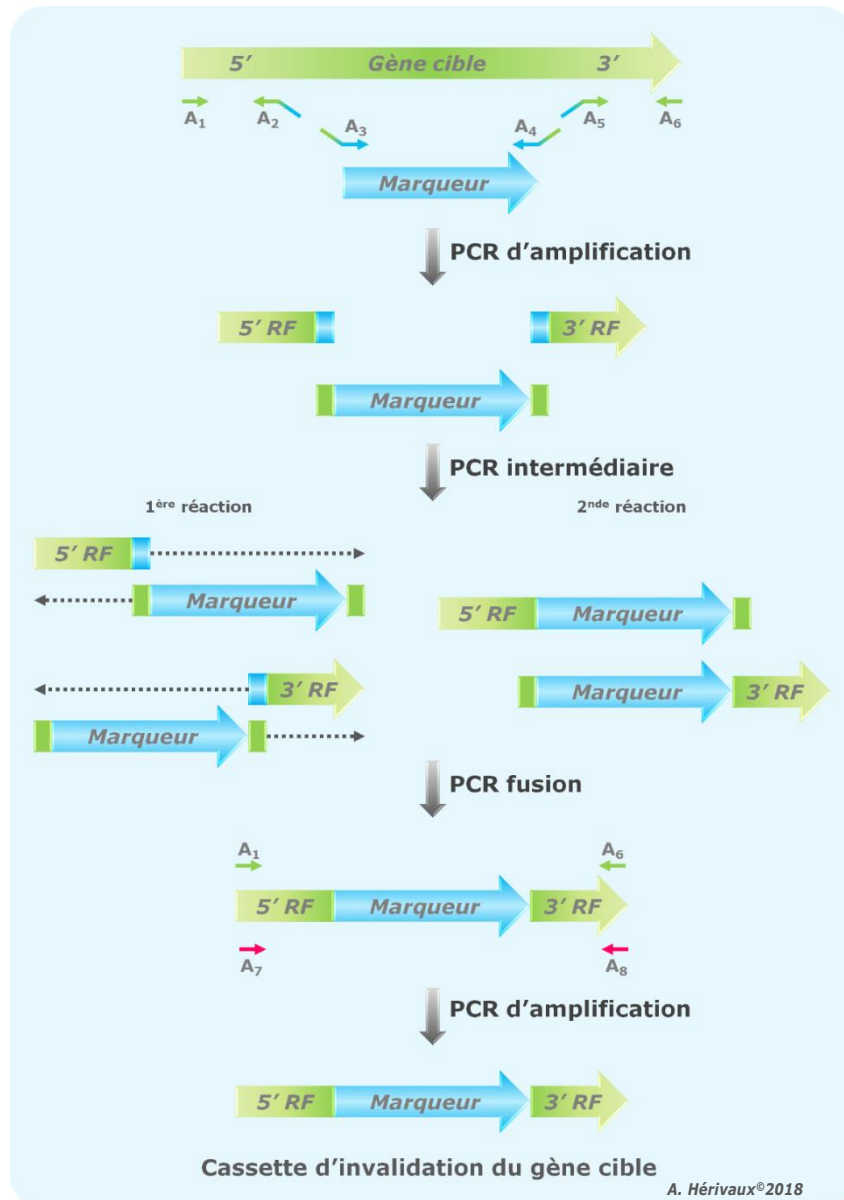


Figure 32. Principe de la construction d'une cassette d'inactivation par PCR fusion, d'après Yu et al. (2004).

La PCR fusion permet la production d'une cassette d'inactivation suite à trois étapes successives de PCR. La première étape correspond à une PCR d'amplification classique des régions 5'RF et 3'RF d'un gène cible et d'un marqueur. Les amorces A₂ et A₅ ajoutent une « queue libre » d'une trentaine de nucléotides correspondant à la séquence du marqueur. Les amorces A₃ et A₄ ajoutent une « queue libre » d'une trentaine de nucléotides correspondant aux séquences 5'RF et 3'RF, respectivement. La seconde étape de PCR qualifiée « d'intermédiaire » correspond à l'amplification des fragments chimériques obtenus à l'étape précédente. Cette étape ne nécessite pas d'amorces. Ce sont les extensions chimériques qui remplacent les amorces. La troisième étape de PCR correspondant à la fusion de l'ensemble des fragments obtenus à l'étape précédente est réalisée en présence du couple d'amorces A₁/A₆ utilisés initialement. Cette étape peut également être réalisée en présence du couple d'amorces A₇/A₈ qui correspond aux amorces « nested ». Le couple d'amorces « nested » se situent après un résidu thymine dans la séquence génomique du gène cible dans le but de limiter l'addition de résidus adénines à l'extrémité 3' par la polymérase. La cassette d'inactivation du gène cible est ainsi obtenue.

quantités de vecteur et d'insert ajoutées sont calculées à l'aide du logiciel NEBioCalculator (New England Biolabs, Evry, France), afin de respecter le ratio molaire insert/vecteur 3:1, tout en tenant compte de la taille des deux fragments qui sont mis en contact. Le mélange est incubé sur la nuit à 16°C.

2.7.3. PCR fusion

La PCR fusion s'est déroulée selon 3 étapes d'amplification, comme schématisé sur la **Figure 32** (Yu *et al.*, 2004).

a) Amplification individuelle des fragments d'ADN

La première étape consiste à amplifier les différents fragments d'ADN individuellement. L'amplification est réalisée par PCR à l'aide du kit Q5[®] High-Fidelity DNA Polymerase (New England BioLabs, Evry, France). Selon les recommandations du fournisseur, pour un volume final de 50 µL, le mélange réactionnel se compose de 10 µL de tampon 5X Q5[®] Reaction Buffer, 0,5 µL de dNTP 10mM (Biotechrabbit, Berlin, Allemagne), 2,5 µL d'oligonucléotides 10µM (Integrated DNA Technologies, Leuven, Belgique) sens et antisens délimitant la séquence à amplifier, 0,5 µL de Q5[®] High-Fidelity DNA Polymerase, plus ou moins 10 µL de 5X Q5[®] High GC Enhancer et une quantité variable d'ADN (1 ng à 1 µg s'il s'agit d'ADN génomique, 1 pg à 1 ng s'il s'agit d'ADN plasmidique).

La réaction de PCR, réalisée à l'aide du thermocycleur Personnel GeneQ TC 24 Bioer (Dominique Dutsher, Brumath, France), débute par une étape initiale de dénaturation (30 sec, 98°C). Puis une série de 35 cycles permet l'amplification de l'ADN : une phase de dénaturation (5 à 10 sec, 98°C), une phase d'hybridation (30 sec à la température optimale des oligonucléotides utilisés), et enfin une phase d'élongation (20 à 30 sec/kb, 72°C). La réaction se termine par une étape finale d'élongation (2 min, 72°C).

b) Fusion des différents fragments

La seconde étape consiste à réaliser une autre amplification en présence des fragments obtenus lors de la première étape. Par homologie des séquences, les différents fragments seront assemblés. Le protocole utilisé pour cette amplification a été adapté par Yu *et al.* (2004). L'enzyme utilisée reste celle du kit Q5[®] High-Fidelity DNA Polymerase (New England BioLabs, Evry, France). D'après Yu *et al.*, pour un volume final de 25 µL, le mélange réactionnel se compose de 2,5 µL de tampon 10X Q5[®] Reaction Buffer, 2 µL de dNTP 2,5mM chacun (Biotechrabbit, Berlin, Allemagne), les PCR qui correspondent aux fragments extérieurs 5' et 3' et la PCR centrale sont ajoutées de façon à respecter le ratio 1:3:1 et 0,25 µL de Q5[®] High-Fidelity DNA Polymerase. Aucune amorce n'est ajoutée afin que l'hybridation des fragments chimériques soit favorisée.

La réaction de PCR, réalisée à l'aide du thermocycleur Personnel GeneQ TC 24 Bioer (Dominique Dutsher, Brumath, France), débute par une étape initiale de dénaturation (2 min, 94°C). Puis une série de 10 à 15 cycles permet la fusion des fragments : une phase de dénaturation (30 sec, 94°C), une phase

d'hybridation (10 min, 58°C), et enfin une phase d'élongation (5 min, 72°C). La réaction se termine par une étape finale d'élongation (10 min, 72°C).

c) Amplification du produit de fusion (Nested-PCR)

La dernière étape permet d'amplifier les produits de la fusion (Yu *et al.*, 2004). L'enzyme utilisée est toujours celle du kit Q5[®] High-Fidelity DNA Polymerase (New England BioLabs, Evry, France). La composition du mélange réactionnel ainsi que les conditions de PCR suivent les recommandations du fournisseur, telles que décrites lors de la première amplification (cf **Partie II, 2.7.3.a. Amplification individuelle des fragments d'ADN**).

2.8. Transformations génétiques de micro-organismes

2.8.1. Transformation bactérienne

Des aliquots de bactéries thermo-compétentes ont tout d'abord été préparés en vue de la transformation par choc thermique. La souche bactérienne *E. coli* DH5a est repiquée sur gélose LB (16 h, 37°C). Une colonie est inoculée dans 25 mL de SOC (SOB ; glucose, 2%) puis incubée (250 rpm, 37°C) jusqu'à atteindre une DO₆₀₀ de 0,8 (**Annexe I**). Quatorze mL de cette culture en SOC sont prélevés et incubés sous agitation lente (120 rpm, 18°C) avec 500 mL de Super Optimal Broth (SOB) jusqu'à obtenir une DO₆₀₀ de 0,5 à 0,6 (**Annexe I**). Le culot bactérien est récupéré par centrifugation (15 min, 5500 rpm, 4°C) puis repris dans 160 mL de PIPES pH6,7 (PIPES, 10mM ; CaCl₂, 15mM ; KCl, 250mM ; MnCl₂, 55mM) (**Annexe I**). La suspension est incubée 10 min dans la glace puis centrifugée (10 min, 4400 rpm, 4°C). Le culot bactérien est lavé par 40 mL de tampon PIPES pH6,7 et incubé 10 min dans la glace. Du DMSO pur (7% final) est ajouté à la suspension permettant la conservation des bactéries compétentes, échantillonnées par 600 µL et conservées à -80°C.

Pour réaliser la transformation, les produits de ligature sont mis en contact avec 150 µL de bactéries compétentes. Après 30 min dans la glace, un choc thermique est réalisé en plaçant les bactéries 5 min à 37°C. Un mL de LB est ajouté puis les bactéries sont incubées 1 h à 37°C. Le culot bactérien est récupéré après centrifugation (5 min, 4000 rpm). L'excès de surnageant est éliminé et le culot bactérien est resuspendu dans 100 µL de LB puis ensemencé sur gélose LB supplémentée de 100 µg.mL⁻¹ d'ampicilline.

Lorsque les clonages ont été réalisés dans les vecteurs pGEM[®]-T Easy (Promega, Charbonnières, France) ou pKS (Addgene, Teddington, Grande-Bretagne), les bactéries recombinantes ont été sélectionnées sur milieu LB solide/ampicilline (100 mg.mL⁻¹) contenant 1mM final d'isopropyl-thiogalactopyranoside (IPTG) et 50 µg.mL⁻¹ de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-galactopyranoside (X-Gal) selon le classique test « blanc / bleu ».

2.8.2. Transformation génétique de *S. apiospermum*

Des cultures en milieu solide PDA ou YPDA supplémenté en chloramphénicol 0,5% pour la souche IHEM 14462 et contenant également 20 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ de Phleo pour la *ku70Δ* sont incubées 9 j à 37°C. Les spores sont récupérées par filtration sur Miraclloth (porosité 22 μm) et lavées successivement en tampon TE 1X (5 min, 4600 rpm). Après dénombrement à la cellule de Malassez, 4 fioles d'Erlenmeyer contenant 200 mL d'YPD liquide sont inoculées par 6.10^7 spores de la souche à transformer et incubées au moins 24 h (120 rpm, 37°C). Dans l'optique de la transgénése, au minimum 5 μg d'ADN plasmidique transformant sont en parallèle linéarisés par digestion toute la nuit.

Les tubes germinatifs obtenus sont filtrés sur Miraclloth (porosité 22 μm) puis incubés (3h30, 120 rpm, 37°C) en présence de 80 mL d'OM/glucanex (**Annexe I**), préparé extemporanément, de façon à lyser les polysaccharides de la paroi fongique, et ainsi récupérer les protoplastes sur lesquels s'effectuera la transformation fongique (Turgeon *et al.*, 2010 ; Liu et Friesen, 2012). La solution de protoplastes est répartie dans 4 tubes Falcons dans lesquels 20 mL de solution ST (**Annexe I**), maintenue dans la glace, sont ajoutés délicatement. Après centrifugation (20 min, 2000 rpm, 4°C), les protoplastes situés à l'interface de l'OM/glucanex et du ST sont prélevés, filtrés sur membrane en nylon (porosité 100 μm) puis lavés trois fois successivement en STC (**Annexe I**) maintenu dans la glace (20 min, 2000 rpm, 4°C). Un dénombrement en cellule de Malassez est réalisé et la solution de protoplastes est ajustée à 1.10^8 protoplastes. mL^{-1} .

L'ADN transformant digéré est mis en contact avec 100 μL de la solution finale de protoplastes et placé 5 min sur la glace. Les étapes suivantes favorisent l'intégration de l'ADN transformant à l'intérieur des protoplastes par fragilisation de la paroi de ces derniers. Deux fois 200 μL de PTC (**Annexe I**), préparés extemporanément, sont ajoutés dans les tubes contenant l'ADN et les protoplastes, puis placés 5 min sur la glace. Un choc thermique est appliqué en ajoutant 800 μL de PTC à température ambiante pendant 5 min. Le choc thermique et le PTC composé de glycérol et d'ions calcium favorisent l'adhésion de l'ADN aux protoplastes et la fragilisation de la paroi des cellules fongiques, respectivement. Enfin, 675 μL de STC, pendant 5 min à température ambiante, sont ajoutés.

Les protoplastes sont ensuite incorporés (500 μL) à 20 mL de Molten agar en surfusion (**Annexe I**). Les boîtes de Pétri sont incubées à 37°C pendant au moins 16 h pour que les protoplastes puissent se régénérer. Dix mL de Molten agar contenant 50 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ d'HygB sont ajoutés en surcouche permettant ainsi la sélection des protoplastes transformés avec le marqueur *hph*. Les milieux de culture sont incubés environ 4 j à 37°C.

En parallèle, un témoin de viabilité et un témoin négatif sont réalisés. Aucun de ces témoins ne contient d'ADN transformant. Le témoin de viabilité permet de s'assurer que les protoplastes que nous avons traités étaient viables. C'est pourquoi l'HygB n'est pas ajouté dans la surcouche. Concernant le témoin négatif, l'HygB est ajoutée à la surcouche puisque le but ici est de s'assurer que les protoplastes préparés étaient bien naturellement sensibles à cette molécule et donc ne puissent pas se développer en présence de cet agent de sélection.

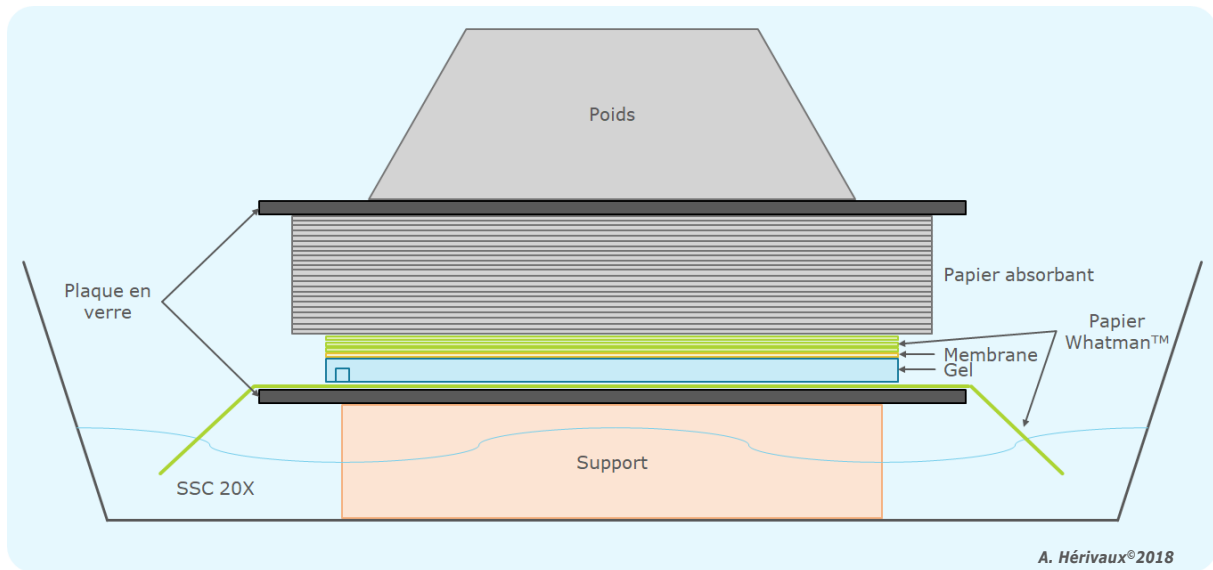


Figure 33. Schématisation du montage permettant le transfert neutre de l'ADN lors du Southern blot.

Le montage « sandwich » permettant le transfert neutre de l'ADN pendant la nuit est le suivant : une feuille de papier Whatman™ qui trempe dans du tampon SSC 20X, le gel d'agarose, la membrane en nylon, trois feuilles de papier Whatman™, du papier absorbant. L'ensemble est placé entre deux plaques en verre. Afin de presser le montage et de permettre au SSC 20X de monter par capillarité, un poids est déposé au-dessus du montage.

2.9. Caractérisation moléculaire des transformants par Southern blot

Suite à la transformation fongique, les clones transformants sont tout d'abord repiqués sur gélose PDA ou YPDA additionnée d'HygB ($50 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$), afin de maintenir la pression de sélection, et incubés à 37°C (temps d'incubation variable en fonction des transformants). Avant d'extraire l'ADN du champignon, un isolement monospore est réalisé, puisqu'en effet les protoplastes peuvent contenir plusieurs noyaux qui n'ont pas tous nécessairement intégrés la cassette. On tente donc d'obtenir au moins une spore bien isolée sur milieu gélosé contenant la drogue de sélection pour s'assurer que la cassette de transformation est présente. Alors l'ADN de la monospore est extrait (**cf Partie II, 2.3. Extraction et purification des acides nucléiques**).

Les ADN extraits des souches sont digérés sur la nuit (au minimum $5 \mu\text{g}$ dans un volume final de $50 \mu\text{L}$). En parallèle, la sonde d'hybridation est préparée puis diluée au $1/1000^{\text{ème}}$ en tampon TE 1X.

Les ADN digérés sont précipités, resuspendus dans $16 \mu\text{L}$ de tampon TE 1X et mélangés à du tampon de charge Gel Loading Dye Purple 6X (New England BioLabs, Evry, France) pour migration sur gel d'agarose 1% en tampon TAE 0,5X en utilisant le bromure d'éthidium (solution à $10 \text{mg}.\text{mL}^{-1}$; Bio-Rad, Marnes-La-Coquette, France) comme agent intercalant de l'ADN. Après migration en TAE 0,5X (300min , 80V), le profil de migration des ADN est révélé sous rayonnement UV ($\lambda = 302 \text{nm}$) à l'aide d'une table fluorescente Combi-Light (Vilber Lourmat, Marne-La-Vallée, France). On procède ensuite au transfert neutre des ADN en recouvrant le gel d'une solution de transfert 1 (**Annexe I**) (25min , température ambiante, sous agitation douce). Après deux rinçages successifs à l'eau distillée, le gel est recouvert d'une solution de transfert 2 (**Annexe I**) (30min , température ambiante, sous agitation douce). Puis le gel est recouvert d'une solution de transfert 3 (**Annexe I**) (25min , température ambiante, sous agitation douce) suite à deux rinçages successifs en eau distillée. Enfin, le gel est rincé à l'identique en eau distillée avant de déposer à sa surface une membrane de nylon Amersham HybondTM-N⁺ (GE Healthcare Life Sciences, Velizy-Villacoublay, France). Le transfert de l'ADN du gel vers la membrane s'effectue sur la nuit par capillarité à l'aide de papier WhatmanTM (GE Healthcare Life Sciences, Velizy-Villacoublay, France) en tampon SSC 20X (**Annexe I**) (**Figure 33**).

Après 16h de transfert, la membrane sur laquelle l'ADN a été transféré est traitée 3min sous UVs pour permettre la fixation irréversible des ADNs sur cette membrane. La membrane est rincée deux fois avec une solution extemporanée de SSC 2X (**Annexe I**) puis stockée à 4°C jusqu'à l'étape d'hybridation. En parallèle, la sonde d'hybridation (500ng dans un volume final de $18 \mu\text{L}$) est marquée à la phosphatase alcaline à l'aide du kit AmershamTM AlkPhos Direct Labelling Module and Detection System (GE Healthcare Life Sciences, Velizy-Villacoublay, France) selon les recommandations du fabricant. En parallèle, la membrane et la solution d'hybridation (**Annexe I**) préchauffée à 55°C sont mises en contact et pré-incubées dans le four à hybridation (au moins 15min , 60rpm , 55°C). La sonde marquée est ajoutée dans le tube d'hybridation. L'ensemble est incubé au moins 16h (60rpm , 55°C).

Tableau III. Essais de sensibilité de *S. apiospermum* IHEM 14462 à différents marqueurs de sélection.

Marqueurs de sélection					
Antimétabolites					
Molécule	Solubilité	Forme	Solution stock	Milieu	Concentrations testées
AAA	-	Poudre	-	YCB	2 mg.mL ⁻¹
5-FAA (+ tryptophane)	Ethanol absolu (NaOH 0,2M)	Poudre	100 mg.mL ⁻¹ (50 mg.mL ⁻¹)	YNBD	250 et 500 µg.mL ⁻¹ (+ 0,5 et 1 mg.mL ⁻¹)
5-FOA (+ uracile + uridine)	-	Poudre	-	YNBD	250 et 500 µg.mL ⁻¹ (+ 250 et 500 µg.mL ⁻¹)
4-PFP (+ tyrosine)	-	Poudre	-	YNBD	1 et 3 mg.mL ⁻¹ (+ 0,4 et 1 mg.mL ⁻¹)
Marqueurs de résistance					
Molécule	Solubilité	Forme	Solution stock	Milieu	Concentrations testées
Acide mycophénolique	Ethanol absolu	Solution	10 mg.mL ⁻¹	PDA	50; 100; 150; 200 µg.mL ⁻¹
Blasticidine S	Eau distillée	Solution	10 mg.mL ⁻¹	PDA	50 et 200 µg.mL ⁻¹
Carboxine	Ethanol absolu	Poudre	10 mg.mL ⁻¹	PDA	30; 50; 100 et 125 µg.mL ⁻¹
Généticine	Eau distillée	Poudre	100 mg.mL ⁻¹	PDA	25 et 50 µg.mL ⁻¹
Glufosinate	Eau distillée	Poudre	100 mg.mL ⁻¹	PDA	100 et 500 µg.mL ⁻¹
Hygromycine B	Eau distillée	Poudre	100 mg.mL ⁻¹	PDA	25 et 50 µg.mL ⁻¹
Nourséothricine	Eau distillée	Poudre	200 mg.mL ⁻¹	PDA	25; 50; 75 et 100 µg.mL ⁻¹
Phléomycine	Eau distillée	Poudre	20 mg.mL ⁻¹	PDA	50; 100 et 150 µg.mL ⁻¹
Puromycine	Eau distillée	Poudre	10 mg.mL ⁻¹	PDA	50 et 200 µg.mL ⁻¹
Sulfonylurée	DMF	Poudre	100 mg.mL ⁻¹	YNBD	5; 50; 100 et 125 µg.mL ⁻¹

AAA : Alpha-Amino-Adipate ; DMF : Di-Méthyl Formamide ; DMSO : Di-Méthyl Sulfoxyde ; 5-FAA : Acide 5-Fluoro-Anthranilique ; 5-FOA : Acide 5-Fluoro-Orotique ; PDA : Potato Dextrose Agar ; 4-PFP : 4-Para-Fluoro-Phénylalanine ; YCB : Yeast Carbon Base ; YNBD : Yeast Nitrogen Base Dextrose ; YPDA : Yeast Peptone Dextrose Agar.

Deux lavages successifs de la membrane sont effectués en tampon de lavage primaire 1X (**Annexe I**) (10 min, sous agitation douce, 55°C) puis deux lavages en tampon de lavage secondaire 1X (**Annexe I**) (5 min, sous agitation douce, température ambiante). L'agent de détection CDP-Star® detection reagent Amersham™ (GE Healthcare Life Sciences, Velizy-Villacoublay, France) est déposé à la surface de la membrane (5 mL) et incubé 2 à 5 min à température ambiante. La détection des ADNs à la surface de la membrane est finalement réalisée en chemiluminescence à l'aide de l'ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare Life Sciences, Velizy-Villacoublay, France).

2.10. Recyclage du marqueur de sélection

Une fois les souches mutées caractérisées par Southern blot, l'objectif suivant consistait à compléter cette souche en réintroduisant un allèle sauvage dans son génome. Théoriquement, un second marqueur de sélection est donc nécessaire pour cette nouvelle étape de transgénèse. *S. apiospermum* étant connu pour sa faible sensibilité à de nombreuses drogues, il est préférable d'envisager d'utiliser un système d'excision du marqueur de sélection. Ce système permet alors de réutiliser le marqueur de sélection qui a servi à l'obtention de la souche mutée. Chez *S. apiospermum* IHEM 14462, nous avons développé le système recombinase qui contient la flippase FLP/FRT (**Cf Analyse bibliographique, 4. Outils moléculaires**).

L'expression de la flippase étant sous le contrôle du promoteur inductible au xylose P_{pcXYL} de *P. chrysogenum*, l'induction de la recombinase est réalisée en milieu minimum YNB liquide auquel 1% de xylose est additionné et constitue l'unique source de carbone du milieu. Le milieu d'induction est tamponné à pH7 (tampon phosphate).

Après filtration sur Miracloth (porosité 22 µm), les spores sont dénombrées en tampon TE 1X puis ajustées à 2.10⁶ spores.mL⁻¹. Cent µL de cette suspension sont déposés dans 20 mL de milieu d'induction. La solution de spores est incubée sous agitation (120 rpm, 37°C) pendant 1 à 4 j. Cent µL du milieu de culture sont alors ensemencés sur une gélose YPDA, de façon à obtenir des spores isolées, puis la gélose est incubée à 37°C pendant 1 semaine.

Le matériel fongique est ensuite repiqué sur gélose YPDA contenant ou non 50 µg.mL⁻¹ d'HygB. Si le gène de résistance *hph* qui est utilisé comme marqueur de sélection a été excisé, le champignon ne poussera pas en présence de la drogue.

2.11. Tests de sensibilité aux drogues

2.11.1. Test en gouttes – Sensibilité des spores

Les drogues de sélection, en solutions ou en poudres, sont ajoutées extemporanément à 20 mL de gélose en surfusion (**Annexe I**) (**Tableau III**). Vingt mL de ce mélange sont ensuite coulés dans une boîte de Pétri stérile.

La sensibilité des spores a été évaluée par des tests en gouttes. Après filtration des spores sur Miracloth 22 µm et deux lavages successifs en TE 1X, un dénombrement à la cellule de Malassez est réalisé. La solution de départ est ajustée à $2,5 \cdot 10^7$ spores.mL⁻¹ en TE 1X. Puis 6 dilutions en cascade de raison 10 sont réalisées dans une microplaque 96 puits stérile. Quatre µL de chaque dilution sont déposés à la surface de la gélose, de façon à ce que les 4 µL de la dilution la plus faible ne contiennent qu'une seule spore. Les géloses ensemencées sont incubées 3 j à 30°C puis 4 j à 25°C de façon à ce que le champignon puisse se développer mais que la croissance des différents inoculums déposés ne se superpose pas.

2.11.2. Test en gouttes – Sensibilité des protoplastes

Les drogues de sélection, en solutions ou en poudres, sont ajoutées extemporanément à la gélose Soft Agar en surfusion, usuellement utilisée pour la transformation du champignon. La génération de protoplastes et la quantité insérée dans la gélose en surfusion sont identiques à celles opérées lors de la transformation du champignon (**Cf Partie II, 2.8.2. Transformation génétique de *S. apiospermum***).

2.11.3. Génération de mutants spontanés auxotrophes

Dans le but de générer des mutants spontanés auxotrophes au tryptophane d'une part et à l'uracile ou l'uridine d'autre part, $1 \cdot 10^7$ spores.mL⁻¹ de la souche IHEM 14462 de *S. apiospermum* ont été étalées au râteau sur des géloses YNB contenant 2% de glucose et différentes concentrations en 5-FAA (500 µg.mL⁻¹) + tryptophane d'une part ou 5-FOA (250, 500 et 750 µg.mL⁻¹) + uracile + uridine d'autre part. Les métabolites essentiels au développement du champignon ont été ajoutés à des concentrations 10 fois inférieures à celle en antimétabolites. Les géloses ont été incubées à 30°C en chambre humide pendant au moins 3 semaines.

2.12. Etudes phénotypiques

Les différentes études phénotypiques ont été menées en parallèle sur la souche sauvage IHEM 14462, la souche sauvage *ku70Δ* et sur les souches mutantes obtenues chez les deux souches réceptrices selon la technique de test en gouttes (**cf Partie II, 2.11.1 Test en gouttes – Sensibilité des spores**), à l'exception des études macroscopiques et microscopiques.

2.12.1. Etudes macroscopiques

Dix µL de spores concentrées à $1 \cdot 10^4$ spores.mL⁻¹ sont déposés à la surface du milieu PDA ou YPDA puis incubés à 25, 37 ou 40°C. Les éléments mycologiques classiquement observés sont le diamètre de la colonie et l'aspect macroscopique recto/verso de la colonie.

Tableau IV. Tests phénotypiques de sensibilité aux stressés menés sur *S. apiospermum* IHEM 14462 et la souche mutante *HHKIIIΔ*.

Agents de stressés				
Inhibiteurs de la paroi				
Molécule	Solubilité	Solution stock	Milieu	Concentrations testées
Caféine	Eau distillée	10 mg.mL ⁻¹	YPDA	3 et 5mM
Calcofluor White	Eau distillée	20 mg.mL ⁻¹	YPDA	0,175; 0,25; 0,5 et 1 mg.mL ⁻¹
Rouge Congo	Eau distillée	20 mg.mL ⁻¹	YPDA	0,175; 0,25; 0,5 et 1 mg.mL ⁻¹
Agents du stress osmotique				
Molécule	Solubilité	Solution stock	Milieu	Concentrations testées
Chlorure de sodium	Eau distillée	5 M	YPDA	0,25; 0,5 et 1M
Iprodione	DMSO	10 mg.mL ⁻¹	YPDA	150 µg.mL ⁻¹
Sorbitol	Eau distillée	2 M	YPDA	0,5 et 1M
-	-	-	Soft Agar	-
Agents du stress oxydatif				
Molécule	Solubilité	Solution stock	Milieu	Concentrations testées
Ménadione	DMSO	10 mM	YPDA	10; 20; 40; 80 et 120µM
Antifongiques				
Molécule	Solubilité	Solution stock	Milieu	Concentrations testées
Amphotéricine B	Ethanol absolu	2 mg.mL ⁻¹	YPDA	16 µg.mL ⁻¹
Capsosfungine	Eau distillée	1 mg.mL ⁻¹	YPDA	2 µg.mL ⁻¹
Fluconazole	Ethanol absolu	2 mg.mL ⁻¹	YPDA	50 µg.mL ⁻¹
Voriconazole	Ethanol absolu	10 mg.mL ⁻¹	YPDA	0,25 µg.mL ⁻¹
Alcalinité – Hypoxie				
Molécule	Solubilité	Solution stock	Milieu	Concentrations testées
Acide lactique	-	-	PDA +/- 5% CO ₂ YPDA +/- 5% CO ₂	10 mg.mL ⁻¹

DMSO : Di-Méthyl Sulfoxyde, PDA : Potato Dextrose Agar ; YPDA : Yeast Peptone Dextrose Agar.

2.12.2. Etudes microscopiques

a) Culture en milieu liquide

A 40 mL d'YPD liquide sont ajoutés 100 μL de spores concentrées à 1.10^6 spores.mL⁻¹. La culture est placée sous agitation (120 rpm, 37°C). Les filaments mycéliens sont observés au microscope optique sur une lame recouverte de bleu lactique ou après marquage au calcofluor white.

b) Culture en milieu solide sur lame

Six mL de PDA ou YPDA sont déposés à la surface d'une lame de microscope décontaminée au préalable à l'éthanol absolu. Dix μL d'une suspension de spores à 1.10^6 spores.mL⁻¹ sont ensuite déposés à la surface de la couche gélosée puis incubés à 37°C. La morphologie et le taux de germination des spores sont enfin observés au microscope optique.

2.12.3. Etudes de la sensibilité aux stress

Les différents agents pouvant induire un stress (agents osmotiques, oxydants, ou encore différents xénobiotiques, ...) sont additionnés extemporanément à 20 mL de gélose YPDA en surfusion. Les concentrations utilisées sont précisées pour chacune des expériences dans le **Tableau IV**.

3. Identification de gènes codant des histidine kinases chez *S. apiospermum* IHEM 14462 et comparaison avec les autres espèces du genre *Scedosporium*

Grâce au séquençage des génomes et au développement des études « -omics », la mycologie moléculaire a connu un nouvel essor au cours de ces dernières années. Les stratégies d'inactivation permettant de caractériser fonctionnellement les gènes se sont progressivement démocratisées. Ces techniques au départ restreintes à quelques espèces modèles fongiques dont le génome était séquencé peuvent aujourd'hui s'appliquer à un vaste panel d'espèces fongiques dont les séquences génomiques sont disponibles dans des bases de données (ex. NCBI, JGI).








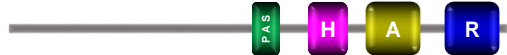
Le second objectif de cette thèse était ainsi de caractériser fonctionnellement les gènes codant des HHKs chez l'espèce *S. apiospermum* rencontrée au cours de la mucoviscidose. La première étape a consisté à identifier les séquences nucléotidiques et protéiques déduites des HHKs dans la souche de référence IHEM 14462.

3.1. Introduction

À mon arrivée au laboratoire en 2015, le génome de *S. apiospermum* IHEM 14462 venait d'être séquencé et publié (Vandeputte *et al.*, 2014, [NW_015971811.1](#)). Grâce à ces données, il nous a été possible d'identifier les gènes codant des HHKs chez la souche de référence du laboratoire. Plus récemment, trois autres génomes de *Scedosporium* spp. ont été séquencés : *S. aurantiacum* (Pérez-Bercoff *et al.*, 2015, [JUDQ01000001.1](#)), *S. boydii* (Duvaux *et al.*, 2017, [NJFT01000001.1](#)) et *S. dehoogii* (Shiller *et al.*, 2017_Unpublished, [PGIR01000001.1](#)). Enfin, l'année dernière une équipe colombienne a déposé la séquence génomique d'une seconde souche de *S. apiospermum*, la souche HDO1 (Morales *et al.*, 2017, [MVOQ01000001.1](#)).

Plus précisément, la souche fongique *S. apiospermum* IHEM 14462 a été isolée en 1998 au CHU de Tours lors de l'examen d'un crachat de patient atteint de mucoviscidose (Vandeputte *et al.*, 2014). Il s'agit donc d'un isolat clinique. En revanche, la souche HDO1 de *S. apiospermum* correspond à un isolat environnemental colombien (Morales *et al.*, 2017). Celle-ci a été isolée inopinément, puisque le test avait été développé à l'origine pour l'étude de souches bactériennes, sur une gélose contenant du pétrole brut comme unique source de carbone. *S. aurantiacum* WM 09.24 est une souche environnementale qui a été collectée en zone urbaine aux abords d'un embarcadère, le Circular Quay, à Sydney en Australie (Pérez-Bercoff *et al.*, 2015). La souche 120008799-01/4 de *S. dehoogii* correspond aussi à une souche environnementale puisqu'elle a été isolée à partir de prélèvements de boues de prétraitement dans la région d'Angers (Shiller *et al.*, 2017_Unpublished). Enfin, la souche *S. boydii* IHEM 23826 est une souche clinique puisqu'elle a été isolée au CHU d'Angers en 2009 dans l'expectoration d'un patient atteint de mucoviscidose (Duvaux *et al.*, 2017). Le panel de souches appartenant au genre *Scedosporium* incluses

Tableau V. Identification des gènes codant les protéines HHKs chez *Scedosporium apiospermum* IHEM 14462.

<i>Scedosporium apiospermum</i> IHEM 14462				
Annotation	N° accession ou N° contig	Taille de la protéine	Signature de la H-box	Structure (SMART)
Sapio14462HHKIII	XP_016644173.1	1288	FLANMS H EIRTPMNGI	
Sapio11462HHKIV	JOWA01000066.1	735	FLANMS H EIRTPMHGI	
Sapio14462HHKV	XP_016642860.1	1913	FLSNMS H EIRTPPLIGI	
Sapio14462HHKVI	XP_016638451.1	1192	FIANIS H ELKTPLNGI	
Sapio14462HHKVIII	XP_016638641.1	1372	LLANSA H QVRTPLNAI	
Sapio14462HHKX	XP_016642865.1	2522	FLANVS H ELRTPPLNGV	
Sapio14462HHKXI_1	XP_016645823.1	1417	FIDITS H EMRNPLSAI	
Sapio14462HHKXI_2	JOWA01000098.1	1316	FMDMTS H EMRNPLGAI	

La classification des HHKs est basée sur la reconnaissance de la signature « H-box » tel que décrit par Catlett et al. (2003).

H : résidu histidine conservé.

Tableau VI. Identification des gènes codant les protéines HHKs chez *Scedosporium apiospermum* HDO1.

<i>Scedosporium apiospermum</i> HDO1				
Annotation	N° accession ou N° contig	Taille de la protéine	Signature de la H-box	Structure (SMART)
SapioHDO1HHKIII	MVOQ01000001.1	1297	FLANMS H EIRTPMNGI	
SapioHDO1HHKIV	MVOQ01000015.1	735	FLANMS H EIRTPMHGI	
SapioHDO1HHKV	MVOQ01000011.1	2067	FLSNMS H EIRTPPLIGI	
SapioHDO1HHKVI	MVOQ01000002.1	1192	FIANIS H ELKTPLNGI	
SapioHDO1HHKVIII	MVOQ01000002.1	1373	LLANSA H QVRTPLNAI	
SapioHDO1HHKX	MVOQ01000011.1	2524	FLANVS H ELRTPLNGV	
SapioHDO1HHKXI_1	MVOQ01000024.1	1581	FIDITS H EMRNPLSAI	
SapioHDO1HHKXI_2	MVOQ01000011.1	1316	FMDMTS H EMRNPLGAI	

La classification des HHKs est basée sur la reconnaissance de la signature « H-box » tel que décrit par Catlett et al. (2003).

H : résidu histidine conservé.

Tableau VII. Identification des gènes codant les protéines HHKs chez *Scedosporium aurantiacum* WM 09.24.

<i>Scedosporium aurantiacum</i> WM 09.24				
Annotation	N° accession ou N° contig	Taille de la protéine	Signature de la H-box	Structure (SMART)
SauraHHKIII	JUDQ01000285.1	1288	FLANMSHEIRTPMNGI	
SauraHHKIV	JUDQ01000164.1	738	FLANMSHEIRTPMHGI	
SauraHHKV	JUDQ01000192.1	2046	FLSNMSHEIRTPPLIGI	
SauraHHKVI	JUDQ01000329.1	1188	FIANISHELKTPLNIGI	
SauraHHKVIII	JUDQ01000020.1	1370	LLANSAHQVRTPLNAI	
SauraHHKX	JUDQ01000170.1	2525	FLANVSHLRTPLNGV	
SauraHHKXI_1	JUDQ01000287.1	1500	FIDITSEMRNPLSAI	
SauraHHKXI_2	JUDQ01000063.1	1305	FMDMTSEMRNPLGAI	

La classification des HHKs est basée sur la reconnaissance de la signature « H-box » tel que décrit par Catlett et al. (2003).

H : résidu histidine conservé.

Tableau VIII. Identification des gènes codant les protéines HHKs chez *Scedosporium boydii* IHEM 23826.

<i>Scedosporium boydii</i> IHEM 23826				
Annotation	N° accession ou N° contig	Taille de la protéine	Signature de la H-box	Structure (SMART)
SboydHHKIII	NJFT01000015.1	1364	FLANMS H EIRTPMNGI	
SboydHHKIV	NJFT01000274.1	735	FLANMS H EIRTPMHGI	
SboydHHKV	NJFT01000028.1	2069	FLSNMS H EIRTPPLIGI	
SboydHHKVI	NJFT01000072.1	1188	FIANIS H ELKTPPLNGI	
SboydHHKVIII	NJFT01000160.1	1399	LLANSA H QVRTPLNAI	
SboydHHKX	NJFT01000370.1	2526	FLANVS H ELRTPLNGV	
SboydHHKXI_1	NJFT01000035.1	1513	FIDITS H EMRNPLSAI	
SboydHHKXI_2	NJFT01000021.1	1319	FMDMTS H EMRNPLGAI	

La classification des HHKs est basée sur la reconnaissance de la signature « H-box » tel que décrit par Catlett et al. (2003).

H : résidu histidine conservé.

Tableau IX. Identification des gènes codant les protéines HHKs chez *Scedosporium dehoogii* 120008799-01/4.

<i>Scedosporium dehoogii</i> 120008799-01/4				
Annotation	N° accession ou N° contig	Taille de la protéine	Signature de la H-box	Structure (SMART)
SdehoHHKIII	PGIR01000112.1	2767	FLANMS H EIRTPMNGI	
SdehoHHKIV	PGIR01000027.1	735	FLANMS H EIRTPMHGI	
SdehoHHKV	PGIR01000113.1	2088	FLSNMS H EIRTPPLIGI	
SdehoHHKVI	PGIR01000076.1	1189	FIANIS H ELKTPPLNGI	
SdehoHHKVIII	PGIR01000057.1	1192	LLANSA H QVRTPLNAI	
SdehoHHKX	PGIR01000190.1	2529	FLANVS H ELRTPLNGV	
SdehoHHKXI_1	PGIR01000011.1	1416	FIDITS H EMRNPLSAI	
SdehoHHKXI_2	PGIR01000248.1	1316	FMDMTS H EMRNPLGAI	

La classification des HHKs est basée sur la reconnaissance de la signature « H-box » tel que décrit par Catlett et al. (2003).

H : résidu histidine conservé.

dans l'étude englobe à la fois des souches cliniques et environnementales, de surcroît d'origines géographiques différentes.

Ainsi, après avoir identifié les gènes codant des HHKs dans la souche IHEM 14462, il nous a semblé intéressant de rechercher ces gènes chez les autres espèces du genre *Scedosporium* dont le génome était disponible.

3.2. Résultats

3.2.1. *S. apiospermum* IHEM 14462

Après comparaison en blastp (pour *search protein databases using a protein query*) avec suppression des redondances (nr pour *non-redundant protein sequences*) des séquences génomiques des HHKs d'*A. fumigatus* Af293 et de *M. oryzae* 70-15, 6 protéines HHKs ont été identifiées dans le génome de *S. apiospermum* IHEM 14462.

La prédiction des domaines protéiques en N-terminale et l'identification de la signature de la H-box qui renferme le résidu histidine conservé en C-terminale de nos 6 HHKs ont permis d'attribuer 6 classes différentes (Catlett *et al.*, 2003 ; Defosse *et al.*, 2015). Ainsi, le génome de *S. apiospermum* IHEM 14462 comporte 6 HHKs appartenant à 6 classes différentes dont les classes III (HHKIII), V (HHKV), VI (HHKVI), VIII (HHKVIII), X (HHKX) et XI (HHKXI) (**Tableau V**).

3.2.2. Autres espèces du genre *Scedosporium*

Une analyse bio-informatique similaire a été menée chez les autres espèces citées ci-dessus en comparant leurs génomes à celui de *S. apiospermum* IHEM 14462. De la même manière, nous avons identifié chez chacune d'elle les 6 HHKs précédemment prédites chez *S. apiospermum* IHEM 14462 (**Tableaux VI, VII, VIII, IX**).

L'analyse des génomes de ces 4 espèces supplémentaires a été réalisée sur l'ensemble de la séquence nucléotidique en tblastn (pour *search translated nucleotide databases using a protein query*) sur le génome entier (wgs pour *whole-genome shotgun contigs*) puisqu'aucune protéine n'était prédite en blastp. Étonnamment, deux séquences HHKs supplémentaires ont pu être prédites pour les souches *S. aurantiacum* WM 09.24, *S. boydii* IHEM 23826 et *S. dehoogii* 120008799-01/4. Après analyse de ces deux séquences HHKs supplémentaires chez chaque isolat, nous avons identifié une HHK appartenant à la classe IV (HHKIV) et la seconde séquence qui correspond à une seconde protéine de la classe XI (HHKXI_2) (**Tableaux VII, VIII, IX**).

En outre, *S. apiospermum* étant une espèce très proche génétiquement de *S. boydii*, il nous semblait curieux que les deux souches de *S. apiospermum* ne possèdent pas ces deux séquences supplémentaires (Ramirez-Garcia *et al.*, 2018). C'est la raison pour laquelle nous avons comparé le génome de chacune des souches de *S. apiospermum* à la séquence protéique de l'HHKIV et l'HHKXI_2 de *S. boydii*.

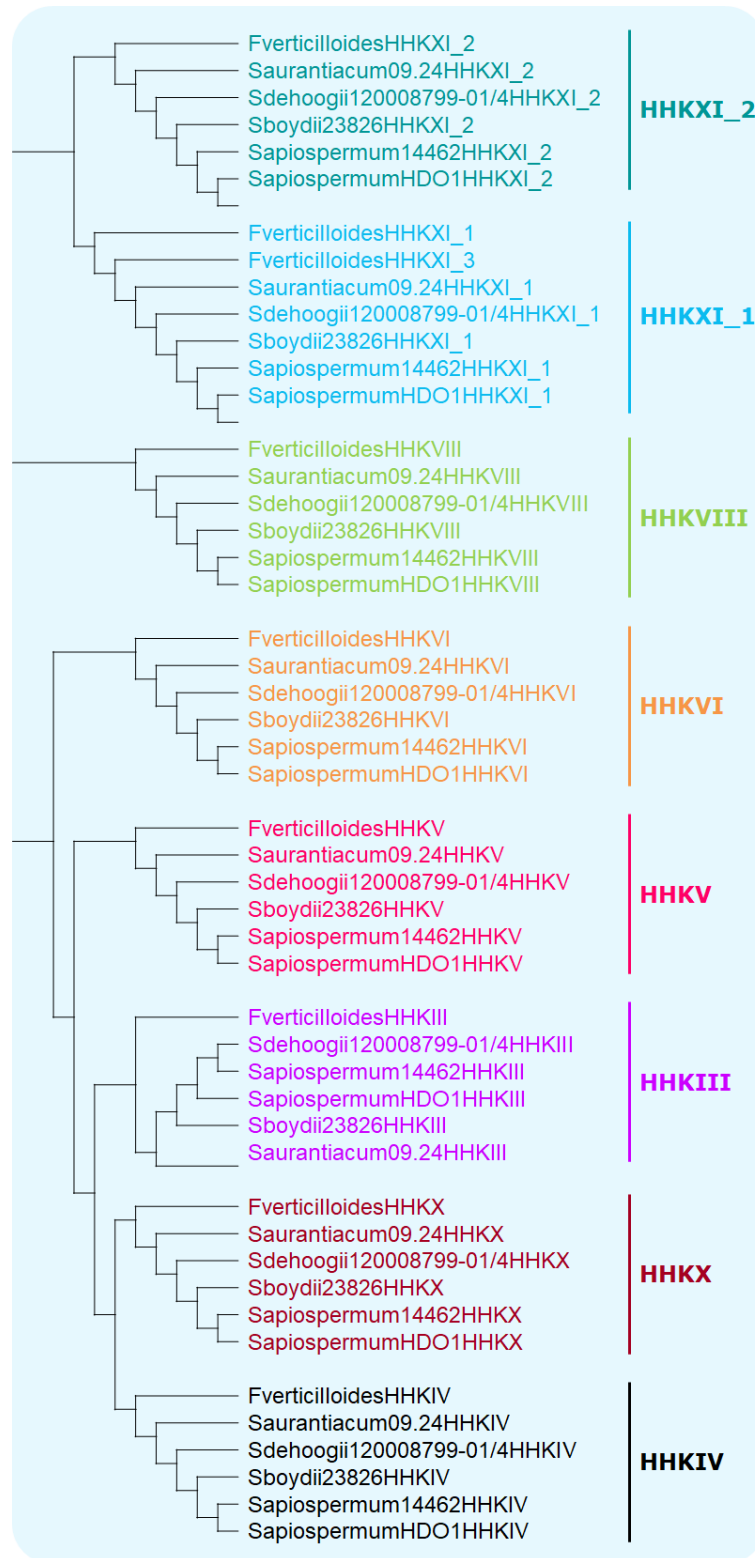


Figure 34. Phylogénie estimée des séquences histidine kinases hybrides prédites des espèces du genre *Scedosporium*.

L'arbre phylogénétique a été réalisé grâce au logiciel Clustal Omega, suite à l'alignement des séquences protéiques prédites pour les HKs des souches IHEM 14462 et HDO1 de *S. apiospermum*, WM 09.24 de *S. aurantiacum*, IHEM 23826 de *S. boydii* et 120008799-01/4 de *S. dehoogii* avec les séquences protéiques HKs de référence issues de *Fusarium verticilloides* et identifiées par Catlett et al. (2003).

Cette fois les deux séquences supplémentaires correspondant à une HHKIV et une seconde HHKXI ont également été prédites chez ces deux isolats (**Tableaux V et VI**).

L'arbre généré suite à l'alignement des différentes séquences identifiées chez chacun des isolats de *Scedosporium* étudiés permet de mettre en évidence 8 clusters, ce qui confirme les résultats précédemment décrits (**Figure 34**).

3.3. Discussion

L'analyse *in silico* que nous avons menée a permis de mettre en évidence la présence de 8 gènes prédits pour coder des protéines HHKs (HHKIII, HHKIV, HHKV, HHKVI, HHKVIII, HHKX, HHKXI_1 et HHKXI_2) chez l'ensemble des espèces appartenant au genre *Scedosporium* dont les séquences génomiques sont disponibles.

Comme indiqué dans les résultats ci-dessus, seules 6 protéines HHKs avaient été initialement prédites dans le génome de *S. apiospermum* IHEM 14462. Cependant, suite à plusieurs analyses génomiques menées au laboratoire, nous avons constaté que l'annotation du génome du champignon était à l'origine d'un biais. En effet, lorsqu'un cadre ouvert de lecture ne présentait pas d'intron, il était systématiquement annoté (improprement) comme « pseudogène » et aucune protéine n'était prédite à partir de ce dernier. Ceci explique la raison pour laquelle dans un premier temps les protéines HHKIV et HHKXI_2 n'ont pas été trouvées suite à une interrogation de la banque en blastp.

De plus, cette analyse préliminaire de génomique comparative n'a été que très récemment réalisée puisque les génomes des 4 autres souches couvrant 3 autres espèces de *Scedosporium* inclus dans cette étude ne sont disponibles que depuis peu dans les bases de données. Par conséquent, bien que deux séquences HHKs supplémentaires (HHKIV et HHKXI_2) aient été identifiées chez *S. apiospermum* IHEM 14462, les travaux de caractérisation fonctionnelle de ces deux nouvelles protéines n'ont été initiés que très récemment et par conséquent ne seront pas détaillés dans ce manuscrit.

En 2003, 11 classes d'HHKs ont été initialement décrites chez les champignons (Catlett *et al.*, 2003). Une dizaine d'années plus tard, 5 classes supplémentaires ont été identifiées (Defosse *et al.*, 2015 ; Hérivaux *et al.*, 2016). Récemment, nous avons pu mettre en évidence 3 nouveaux groupes (Kabbara *et al.*, 2018_Unpublished). Lorsque des données fonctionnelles sont disponibles, chaque groupe d'HHKs semble plus ou moins impliqué dans des processus physiologiques spécifiques (Defosse *et al.*, 2015 ; Hérivaux *et al.*, 2016). Parmi les classes identifiées chez *S. apiospermum* IHEM 14462, le rôle des récepteurs HHKs appartenant aux groupes III, VI, VIII et X semble bien défini en se basant sur les données bibliographiques issues d'études menées chez d'autres modèles fongiques. Certaines HHKs sont décrites dans des processus physiologiques communs. Par exemple, les HHKIII et X joueraient un rôle dans la virulence et la morphogénèse des champignons (Defosse *et al.*, 2015 ; Hérivaux *et al.*, 2016). L'HHKIII et l'HHKVI régulent la voie HOG (pour *High Osmolarity Glycerol*) et sont donc décrits comme des osmosenseurs (Defosse *et al.*, 2015 ; Hérivaux *et al.*, 2016). L'HHKX permettrait elle l'adaptation du champignon au stress oxydatif (Defosse *et al.*, 2015 ; Hérivaux *et al.*, 2016). Les HHKVIII, ou

phytochromes, sont d'étonnantes protéines qui captent la lumière à de courtes longueurs d'ondes (Bayram *et al.*, 2010). En revanche, peu de données sont actuellement disponibles pour les HHKIV, V et XI. La classe HHKIV est décrite chez les Sordariomycètes (Kabbara *et al.*, 2018_Unpublished) et semble impliquée dans la virulence chez *A. fumigatus* (Clemons *et al.*, 2002). Les protéines du groupe V ont été étudiées uniquement chez *M. oryzae* (Jacob *et al.*, 2014). Elles partageraient certains processus physiologiques avec les HHKIII (ex. virulence, adaptation aux stressés) mais seraient aussi impliquées dans la croissance végétative du champignon. Pour finir, la classe XI regroupe des protéines structurellement divergentes (Catlett *et al.*, 2003). Une étude menée chez *M. oryzae* a démontré l'implication de ces récepteurs dans la croissance végétative du champignon, son adaptation aux stressés ou encore sa virulence (Jacob *et al.*, 2014).

Dans ce contexte, la suite du projet a consisté en la caractérisation fonctionnelle des différents gènes codant des protéines HHKs identifiés chez *S. apiospermum* IHEM 14462. Dans cette optique, l'invalidation de gènes et l'étude phénotypique du génotype mutant demeurent une démarche de choix chez les champignons. L'invalidation de gènes nécessitant la disponibilité de marqueurs de sélection dans le cadre de l'étape de transgénèse, nous proposons dans la partie suivante d'identifier de nouveaux marqueurs de sélection utilisables chez *S. apiospermum*.

4. Marqueurs de sélection

Lors de mon arrivée au laboratoire, seuls deux marqueurs de sélection étaient utilisables pour la transgénèse de *S. apiospermum* : i) le gène *hph* d'*E. coli* conférant la résistance à l'HygB et ii) le gène *Shble* de *S. hindustanus* conférant la résistance à la Phleo. De plus, en présence de Phleo, la croissance résiduelle du champignon (« bruit de fond »), qui est plus importante qu'en présence d'HygB, rend délicate la sélection des clones transformants après transgénèse de *S. apiospermum* par le gène *Shble*.

Ainsi, l'objectif suivant de ce travail de thèse a été de tester la sensibilité de la souche de référence IHEM 14462 envers un large panel de drogues de sélection afin d'identifier de nouvelles molécules utilisables chez *S. apiospermum* dans nos stratégies de transgénèse, que ce soit pour l'invalidation d'un ou plusieurs gènes ou l'introduction d'une cassette d'expression dans le génome de notre souche. Ce travail préliminaire s'est grandement appuyé sur la littérature afin de déterminer les concentrations initiales à tester ou encore les milieux appropriés à chaque drogue.

4.1. Introduction

Les marqueurs de sélection sont des gènes utilisés pour différencier les cellules transformées de celles qui ne le sont pas suite à la transgénèse d'un organisme. En génétique fongique, deux catégories de marqueurs de sélection sont décrites : i) les marqueurs nutritionnels et ii) les marqueurs de résistance aux drogues.

La sensibilité des spores de *S. apiospermum* IHEM 14462 aux différentes drogues de sélection a été évaluée. Le but de ces manipulations était d'estimer la concentration en drogue de sélection qui inhiberait 100% de la croissance de nos spores. Dans un second temps, les drogues de résistance donnant des résultats intéressants lors du premier crible ont été testées sur des protoplastes régénérés, puisque la transformation de *S. apiospermum* est communément effectuée au laboratoire sur ce type de cellules. Dans le cas précis des antimétabolites, ils pourraient être potentiellement utilisés pour sélectionner des souches réceptrices auxotrophes.

4.2. Résultats

Au total, 14 molécules ont été testées sur les spores de la souche IHEM 14462 de *S. apiospermum* dont 4 antimétabolites (l'Alpha-Amino-Adipate (AAA), l'Acide 5-Fluoro-Anthranilique (5-FAA), l'Acide 5-Fluoro-Orotique (5-FOA) et la 4-Para-Fluoro-Phénylalanine (4-PFP)) et 10 drogues de sélection (l'acide mycophénolique, la blasticidine S, la carboxine, la généticine, le glufosinate, l'HygB, la nouséothricine, la Phleo, la puromycine et la sulfonilurée).

Les différents résultats présentés dans ce manuscrit ont été obtenus après 7 jours de culture.

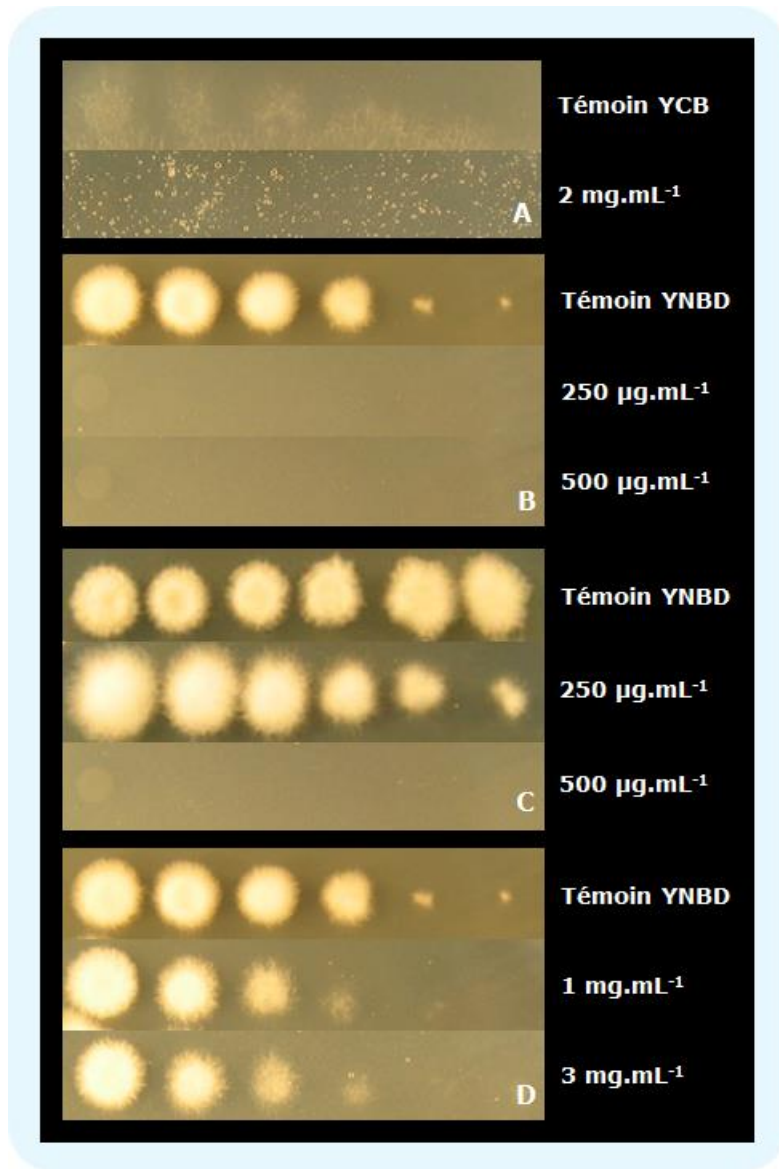


Figure 35. Sensibilité des spores de la souche *Scedosporium apiospermum* IHEM 14462 aux différents marqueurs nutritionnels testés, après 7 jours de culture.

A. Acide alpha-amino-adipate. **B.** Acide 5-fluoro-anthranilique. **C.** Acide 5-fluoro-orotique. **D.** 4-para-fluoro-phénylalanine.

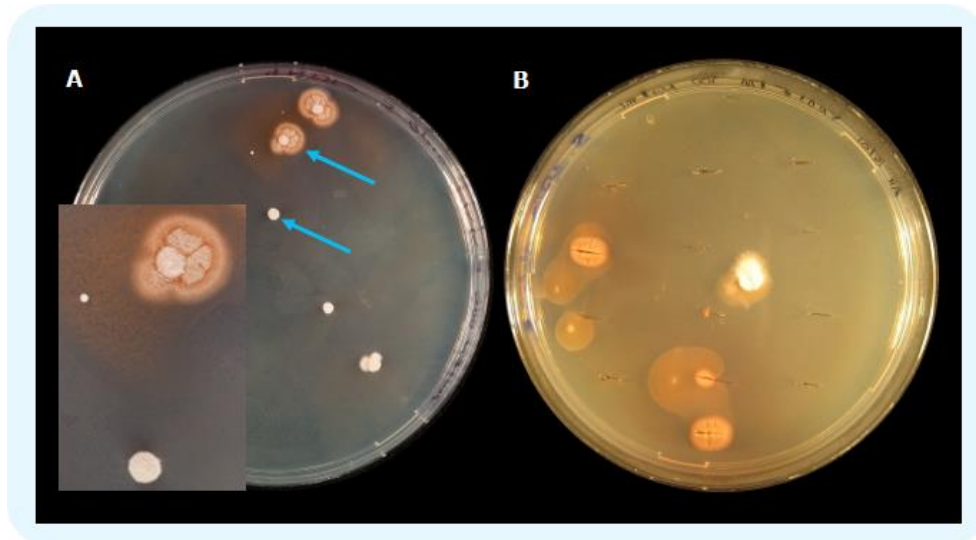


Figure 36. Génération de mutants spontanés auxotrophes au tryptophane chez *S. apiospermum* IHEM 14462.

A. Des mutants spontanés ont été obtenus après 3 semaines d'incubation à 30°C sur milieu YNB en présence de 5-FAA et de tryptophane à hauteur de 500 et 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ respectivement. Parmi les colonies qui se sont développées sur la gélose de gauche, deux phénotypes différents ont été observés comme indiqué par les flèches. Le premier phénotype présente des petites colonies blanches duveteuses. Le second phénotype se traduit par des colonies plus étalées, légèrement duveteuses, boursouflées, qui poussent dans la gélose, produisent un pigment orangeâtre et qui forment un halo autour de la colonie. Le centre de celle-ci est légèrement plus clair. **B.** Ces deux phénotypes sont retrouvés après repiquage, sur la gélose de droite. Le champignon croît à l'intérieur de la gélose.

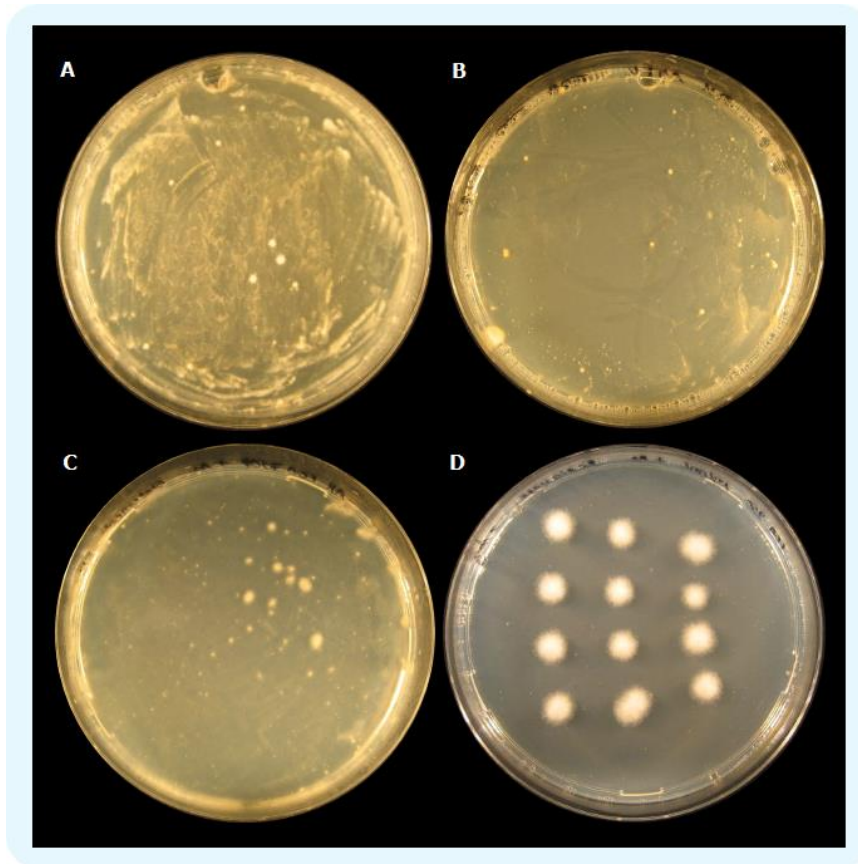


Figure 37. Génération de mutants spontanés auxotrophes à l'uracile et/ou l'uridine chez *S. apiospermum* IHEM 14462.

Des mutants spontanés ont été obtenus après 3 semaines d'incubation à 30°C sur milieu YNB en présence de 5-FOA et des compléments uracile et uridine à hauteur de **A.** 250 et 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, **B.** 500 et 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ et **C.** 750 et 75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivement. Tous présentent le même et unique phénotype : de très petites colonies blanches aériennes et duveteuses. **D.** Après repiquage sur le même milieu gélosé, le même phénotype est retrouvé.

4.2.1. Antimétabolites

Souhaitant évaluer la sensibilité de notre souche sauvage prototrophe, pour chaque antimétabolite testé nous avons ajouté l'acide aminé ou la base azotée correspondant. Ceci permettrait de compléter le cas échéant l'auxotrophie générée par la mutation sélectionnée par la toxicité de l'antimétabolite : i) du tryptophane pour le 5-FAA, ii) de l'uracile et de l'uridine pour le 5-FOA, et iii) de la tyrosine pour le 4-PFP.

a) Tests de sensibilité

Pour commencer, *S. apiospermum* IHEM 14462 est capable de se développer sur les milieux classiques de culture fongique comme le YNB et le PDA. En revanche, sa croissance est très lente sur le milieu YCB (pour *Yeast Carbon Base*) (**Figure 35**). Nous avons ainsi dès le début des tests abandonné les expérimentations sur la molécule de AAA puisqu'elle doit être testée dans ce dernier milieu pauvre. La 4-PFP ne semble pas être un bon candidat. En effet, la concentration en cet antimétabolite nécessaire pour observer une inhibition totale du développement des spores s'est révélée trop élevée ($> 3 \text{ mg.mL}^{-1}$). Le 5-FAA montre en revanche un certain potentiel puisque *S. apiospermum* s'avère sensible à des concentrations inférieures à $250 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$. Il en va de même pour le 5-FOA, malgré la concentration élevée nécessaire à l'inhibition totale des spores du champignon ($> 500 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$), mais ce qui correspond à une concentration voisine de celle déjà utilisée pour d'autres modèles fongiques (Boeke *et al.*, 1984 ; Millerioux *et al.*, 2011).

b) Essais d'obtention de mutants spontanés résistants aux antimétabolites

Les tests précédemment décrits ont permis de révéler une sensibilité de la souche sauvage IHEM 14462 vis-à-vis du 5-FAA et du 5-FOA. Nous avons donc tenté de contre-sélectionner des mutants spontanés auxotrophes pour le tryptophane sur milieu contenant le 5-FAA et des mutants auxotrophes spontanés pour l'uracile/uridine sur milieu contenant du 5-FOA (Boeke *et al.*, 1984 ; Toyn *et al.*, 2000).

Après 3 semaines d'incubation, des colonies se sont développées sur la gélose contenant $500 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ de 5-FAA et $50 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ de tryptophane. Deux phénotypes différents ont été observés (**Figure 36**). Le repiquage des différents mutants s'est avéré difficile puisque le champignon poussait dans la gélose et non en surface. Suite à ces premiers résultats encourageants, le même protocole a été réalisé en testant le 5-FOA à diverses concentrations (250 , 500 et $750 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$) en présence d'uracile et d'uridine (25 , 50 et $75 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$). A l'identique, des mutants spontanés sont apparus aux différentes concentrations en 5-FOA (**Figure 37**). Malheureusement, aucun mutant spontané ne s'est avéré auxotrophe envers le tryptophane, l'uracile ou l'uridine. En effet, après repiquage sur milieu gélosé contenant uniquement du 5-FAA ou du 5-FOA, une croissance de chacun des clones précédemment isolés a pu être observée.

4.2.2. Marqueurs de résistance aux drogues

a) Sensibilité aux drogues des spores

Notre souche s'est tout d'abord révélée naturellement très peu sensible vis-à-vis de certaines molécules, comme la blasticidine S ($200 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$), le glufosinate ($500 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$) et la puromycine (200

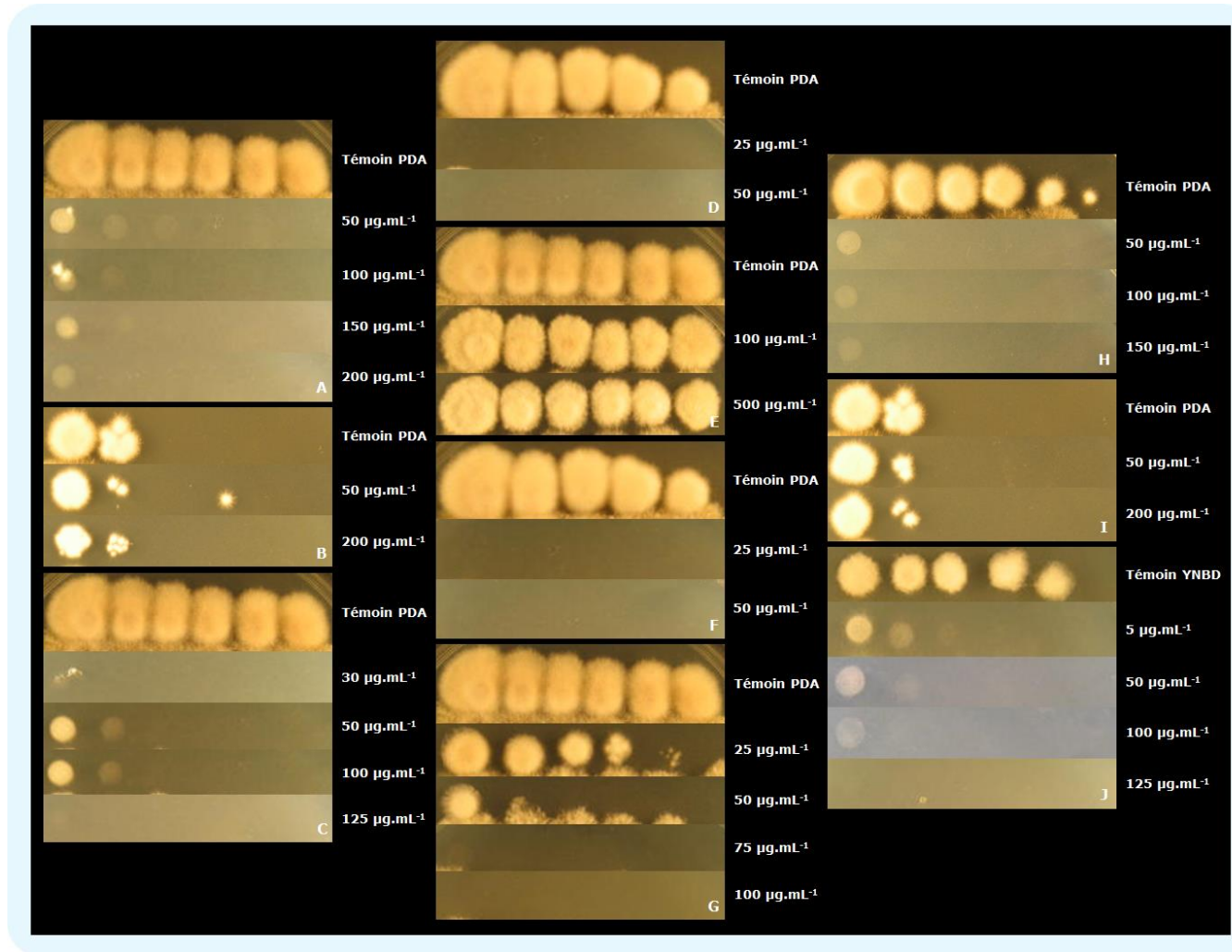


Figure 38. Sensibilité des spores de la souche *Scedosporium apiospermum* IHEM 14462 aux différentes drogues testées, après 7 jours de culture.

A. Acide mycophénolique. **B.** Blastidine S. **C.** Carboxine. **D.** Généticine. **E.** Glufosinate. **F.** Hygromycine B. **G.** Nourséothricine. **H.** Phléomycine. **I.** Puromycine. **J.** Sulfonylurée.

$\mu\text{g.mL}^{-1}$). Une résistance plus modérée a été cependant observée pour l'acide mycophénolique, la carboxine, la Phleo et la sulfonylurée puisque la croissance de la souche est totalement inhibée à $< 200 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $< 125 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $> 150 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et $< 125 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivement. Enfin, certaines molécules semblent pouvoir constituer de potentielles drogues de sélection pour notre champignon car elles se sont montrées capables de pouvoir inhiber totalement la croissance du champignon à de faibles concentrations : la généticine ($25 \mu\text{g.mL}^{-1}$), l'HygB ($25 \mu\text{g.mL}^{-1}$) et la nouséothricine ($75 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (**Figure 38**).

b) Sensibilité des protoplastes

En se basant sur les résultats de sensibilité acquis sur les spores, nous avons testé les molécules les plus prometteuses sur des protoplastes régénérés obtenus à partir de la même souche fongique IHM 14462. L'HygB et la Phleo n'ont pas été testées ici car déjà utilisées au laboratoire dans le cadre de la transgénèse de *S. apiospermum* à des concentrations de 50 et 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivement.

Le protocole de transgénèse de *S. apiospermum* nous amène à ensemercer les protoplastes dans le milieu Soft agar en surfusion. Après solidification, il est nécessaire de laisser les protoplastes se régénérer durant une période où notamment le gène de résistance pourra s'exprimer. Ainsi, après environ 16 h d'incubation, une seconde couche de Soft agar contenant la drogue de sélection est déposée à la surface de la première. La sélection des protoplastes transformés peut alors s'effectuer au cours des jours suivants (**cf Partie II, 4. Matériels et méthodes**).

Pour chaque essai, la drogue a donc systématiquement été ajoutée dans la surcouche. En parallèle, il nous a également semblé pertinent de tester la condition où la drogue et les protoplastes non régénérés sont mélangés simultanément dans la première couche de milieu. D'après la **Figure 39**, seule la généticine semble donner des résultats intéressants dans les deux conditions. En effet, aucun protoplaste ne s'est développé en présence de $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de drogue. Les protoplastes sauvages sont donc sensibles à de faibles concentrations en généticine. En revanche, le phénomène inverse a été observé pour toutes les autres drogues (acide mycophénolique, carboxine, sulfonylurée et nouséothricine, résultats non montrés). En effet, les concentrations en drogue se révèlent insuffisantes pour inhiber la croissance des protoplastes alors qu'à de telles concentrations, nous avons précédemment observé que la croissance des spores du champignon était inhibée.

En ce qui concerne l'acide mycophénolique et la généticine, nous disposons d'un plasmide contenant le gène *IMH3B* et le gène *neo* conférant respectivement la résistance à l'acide mycophénolique et à la généticine. Des essais de transgénèse ont donc été effectués. Pour l'acide mycophénolique, comme observé dans la **Figure 39**, un « bruit de fond » a été obtenu sur la boîte de sélection témoin. Sur la boîte de sélection, sur laquelle les protoplastes ayant subi la transformation par le gène *IMH3B* ont été ensemercés, une croissance comparable a également été observée et aucun clone mycélien ne s'est développé plus rapidement que le reste du « bruit de fond ». Concernant la généticine, des résultats similaires ont été observés, malgré des concentrations élevées en drogue allant jusqu'à $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (résultats non montrés). Suite à l'ensemble de ces résultats négatifs, et malgré tous ces efforts consentis,

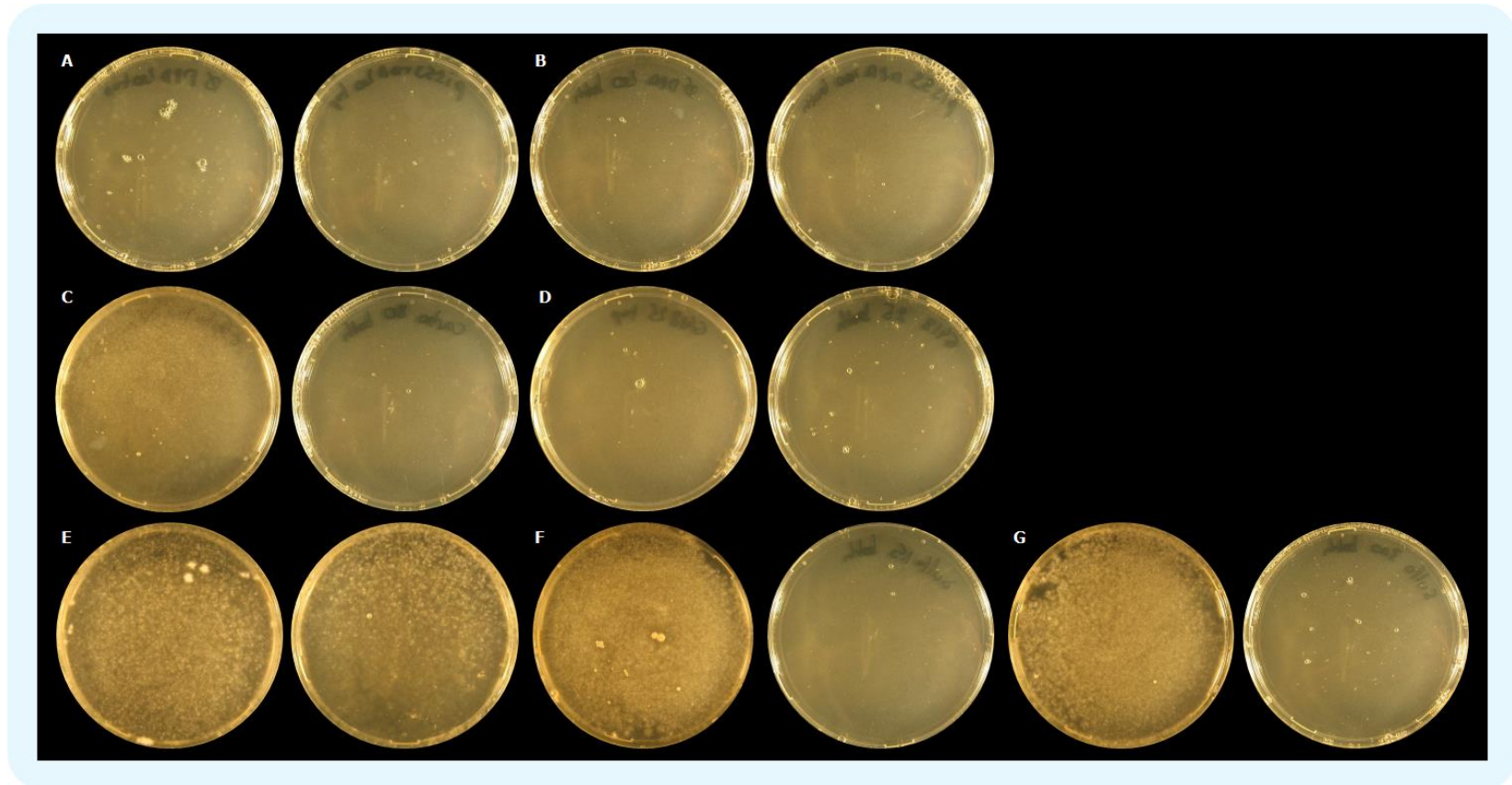


Figure 39. Sensibilité des protoplastes de la souche *Scedosporium apiospermum* IHEM 14462 aux différentes drogues testées, après 7 jours de culture.

A. Acide mycophénolique 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ uniquement dans la surcouche, sans plasmide à gauche et avec plasmide contenant le gène de résistance *IMH3B* à droite. **B.** Acide mycophénolique 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ dans les deux couches gélosées, sans plasmide contenant le gène de résistance à gauche et avec le plasmide à droite. **C.** Carboxine 80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ uniquement dans la surcouche à gauche et dans les deux couches gélosées à droite. **D.** Généticine 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ uniquement dans la surcouche à gauche et dans les deux couches gélosées à droite. **E.** Sulfonylurée 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ uniquement dans la surcouche à gauche et dans les deux couches gélosées à droite. **F.** Sulfonylurée 150 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ uniquement dans la surcouche à gauche et dans les deux couches gélosées à droite. **G.** Sulfonylurée 300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ uniquement dans la surcouche à gauche et dans les deux couches gélosées à droite.

nous n'avons pas souhaité approfondir cette partie de développement expérimental et nous nous sommes donc concentrés sur l'étape suivante, à savoir, l'obtention de mutants pour les gènes *HHKs* chez *S. apiospermum*.

4.3. Discussion

4.3.1. Observations générales

Une importante étude bibliographique sur l'utilisation des drogues de sélection dans le cadre de la transgénèse des champignons avait été menée en amont de ces expérimentations. Cette étude a d'ailleurs mené à la rédaction d'un article de revue dont la version préliminaire est proposée en annexe (**Annexe II**). Les études précédentes préconisaient ainsi l'utilisation de chaque molécule dans un milieu défini. Parmi ces milieux, on retrouvait en particulier des milieux riches (PDA), pauvres (YNB), voire très pauvres (YCB). La croissance fongique observée sur les différents milieux sans même ajouter de drogues s'est avérée, comme attendu, proportionnelle à la « richesse » du milieu utilisé. Ainsi, le milieu YCB ne semble aucunement adapté au développement de *S. apiospermum* donc il a été très rapidement abandonné pour tester les potentiels du AAA. D'autre part, des problèmes de solubilité des antimétabolites dans la gélose ont été observés (à l'exception du 5-FAA) pouvant être à l'origine d'un biais sur les résultats obtenus.

4.3.2. Antimétabolites

Les antimétabolites, comme indiqué précédemment, permettent la contre-sélection de souches auxotrophes réceptrices. Ainsi, le AAA, le 5-FAA, le 5-FOA et le 4-PFP contre-sélectionnent des souches auxotrophes vis-à-vis de la L-lysine, du L-tryptophane, de l'uridine et de la phénylalanine, respectivement.

Les antimétabolites 5-FAA et 5-FOA ont surtout été utilisés pour la contre-sélection de levures auxotrophes, très peu chez les filamenteux (Ruiz-Diez, 2002 ; Weld *et al.*, 2006 ; Foureau *et al.*, 2012 ; Papon *et al.*, 2012 ; Siewers, 2014). La souche IHEM 14462 de *S. apiospermum* est très sensible au 5-FAA (100% d'inhibition < 250 µg.mL⁻¹) et de manière moindre au 5-FOA (100% d'inhibition > 500 µg.mL⁻¹). Cependant, par cette approche aucun mutant spontané auxotrophe au tryptophane ou à l'uracile/uridine n'a pu être contre-sélectionné. Il est donc fortement probable que chez *S. apiospermum*, comme précédemment observé chez d'autres modèles fongiques, la résistance observée vis-à-vis de ces antimétabolites (sans même pour autant être liée à une auxotrophie) puisse être mise en place suite à des mutations n'intervenant pas dans les voies de biosynthèse ciblées (pompes d'efflux, blocage de l'entrée dans la cellule, ou activation de voies métaboliques compensatoires par exemple) (Goosen *et al.*, 1987).

4.3.3. Marqueurs de résistance aux drogues

Dans l'idéal, une drogue de sélection utilisée dans le cadre de la transgénèse de micro-organismes doit pouvoir être utilisée à faible concentration (coût) et en toute innocuité. Compte tenu de ces critères, la blasticidine S et la puromycine ont rapidement été écartées compte tenu de leur prix encore très élevés. La sensibilité de la souche IHEM 14462 n'a pas été testée envers l'auréobasidine A et la bléomycine,

également en raison de leur prix excessif. Le bénomyl n'a pas été testé puisqu'il était déjà bien décrit que les espèces du genre *Scedosporium* sont naturellement résistantes vis-à-vis de ce composé. Le bénomyl est en effet un des agents sélectifs entrant dans la composition des milieux SceSel+ et Scedo Select III (Rainer *et al.*, 2008 ; Pham *et al.*, 2015).

Les protoplastes étant dépourvus de paroi, donc théoriquement plus fragiles que les spores, il est raisonnable de penser qu'ils présentent une sensibilité plus marquée aux drogues et par conséquent, les concentrations nécessaires à l'inhibition de la croissance des protoplastes régénérés seraient inférieures à celles inhibant la croissance des spores. De manière intrigante, c'est le constat inverse qui a été dressé. Il est important de rappeler que, en vue de la transgénèse, les protoplastes sont préparés à partir des premières cellules mycéliennes issues du tube émergeant de la spore en cours de germination. Ainsi, il semblerait que les spores de *S. apiospermum* soient globalement plus sensibles aux drogues que des entités issues du mycélium (protoplastes ou filaments).

4.3.4. Conclusion

Comme indiqué précédemment, la sensibilité aux drogues demeure un caractère très variable chez les micro-organismes. Dans notre approche, il était donc indispensable de tester au préalable la sensibilité de *S. apiospermum* vis-à-vis de différentes molécules avant toute utilisation en transgénèse. Bien qu'ayant développé une approche rationnelle d'évaluation de la sensibilité de *S. apiospermum* vis-à-vis de nombreuses molécules (antimétabolites et drogues de sélection), ces efforts n'ont pas été récompensés dans la mesure où cette espèce s'est montrée peu sensible à la plupart des composés testés. *S. apiospermum* était déjà bien connu pour sa multirésistance primaire à de nombreuses molécules antifongiques utilisées en thérapeutique, compliquant le traitement des scédosporioses. Nos résultats vont donc en ce sens puisque notre souche s'est avérée résistante à un large panel d'antimétabolites et de drogues de sélection qui pourtant ont déjà été utilisés avec succès chez de nombreux autres champignons filamenteux. Ainsi, nous n'avons pas pu développer de marqueurs de résistance venant s'ajouter aux deux gènes déjà utilisés dans l'équipe pour la transgénèse (*hph* et *Shble*). Dans la partie suivante, nous proposerons comme alternative de développer un système d'inactivation permettant de recycler le gène de résistance.

Tableau X. Vecteurs plasmidiques utilisés dans les stratégies de clonage des cassettes de délétion des gènes *HHKs*.

Vecteur plasmidique	Origine	Principaux éléments constituant le vecteur
pAN7-1	-	✓ Cassette de résistance à l'hygromycine B
pAN8-1	-	✓ Cassette de résistance à la phléomycine
pct74	-	✓ Cassette de résistance à l'hygromycine B optimisée
pPV189	-	✓ Cassette de résistance à l'hygromycine B ✓ Système recombinaise FLP/ <i>FRT</i>
pAHHKIII.1	pPV189	✓ Cassette de délétion AHHKIII.1
pAHHKIII.7	pAN7-1	✓ Cassette de délétion AHHKIII.7
pAHHKIII.8	pAN8-1	✓ Cassette de délétion AHHKIII.8
-	PCR fusion	✓ Cassette de délétion AHHKIII.F
pAHHKIII.R1	pKS	✓ Termineur de l' <i>HHKIII</i>
pAHHKIII.R2	pKS	✓ Gène <i>HHKIII</i> ✓ Termineur de l' <i>HHKIII</i>
pAHHKIII.R3	pKS	✓ Termineur de l' <i>HHKIII</i> ✓ Cassette de résistance à l'hygromycine B ✓ Gène <i>HHKIII</i>
pAHHKV.1	pPV189	✓ Cassette de délétion AHHKV.1
pAHHKV.7	pAN7-1	✓ Cassette de délétion AHHKV.7
pAHHKVI.1	pPV189	✓ Cassette de délétion AHHKVI.1
pAHHKVIII.1	pPV189	✓ Cassette de délétion AHHKVIII.1
pAHHKX.1	pPV189	✓ Cassette de délétion AHHKX.1
pAHHKX.7	pAN7-1	✓ Cassette de délétion AHHKX.7
pAHHKX.8	pAN8-1	✓ Cassette de délétion AHHKX.8
-	PCR fusion	✓ Cassette de délétion AHHKX.F
pAHHKXI_1.1	pPV189	✓ Cassette de délétion AHHKXI_1.1
pAHHKXI_1.7	pAN7-1	✓ Cassette de délétion AHHKXI_1.7

Tableau XI. Souches générées au cours des essais de transgénèse.

Annotation	Clones validés	Cassette de délétion	Induction de la flippase	Souche
AHSaHHKIII.1	111A	AHHKIII.1	X	IHEM 14462
AHSaHHKIII.2	2B, 8A, 10C X228, Y19	AHHKIII.1	X ✓	<i>ku70Δ</i>
AHSaHHKIII.F	–	AHHKIII.F	NP	<i>ku70Δ</i>
AHSaHHKIII.R	En cours	AHHKIII.R	NP	AHSaHHKIII.1.111A
AHSaHHKV.1	En cours	AHHKV.1	X	<i>ku70Δ</i>
AHSaHHKVI.1	En cours	AHHKVI.1	X	<i>ku70Δ</i>
AHSaHHKX.1	–	AHHKX.1	X	<i>ku70Δ</i>
AHSaHHKX.F	–	AHHKX.F	NP	<i>ku70Δ</i>
AHSaHHKXI_1.1	En cours	AHHKXI_1.1	X	<i>ku70Δ</i>

✓ : flippase induite ; X : flippase non induite ; NP : flippase non présente dans la construction ; – : aucun clone validé.

5. Etude fonctionnelle des gènes histidine kinases chez *S. apiospermum*

Bien que nous n'ayons pas eu l'opportunité d'identifier de nouveaux marqueurs de sélection pour la transgénèse de *S. apiospermum*, l'étape suivante a consisté en la caractérisation fonctionnelle des différents gènes *HHKs* de cette espèce en utilisant les outils moléculaires déjà disponibles au laboratoire. Pour rappel, les gènes *HHKIV* et *HHKXI_2* n'ayant été que très récemment identifiés, les travaux initiés pour ces deux gènes ne seront pas détaillés dans ce manuscrit.

Communément, la caractérisation fonctionnelle d'un gène chez un champignon repose sur la démarche suivante : i) l'invalidation du gène par recombinaison homologue au locus ciblé dans la souche sauvage, ii) la complémentation des souches mutantes et iii) la comparaison des phénotypes entre la souche sauvage, la souche mutante et la souche complémentée.

L'objectif étant d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques, nos recherches se sont tout d'abord concentrées sur l'invalidation du gène *HHKIII* puis du gène *HHKX* puisque ce sont les deux classes d'*HHKs* qui sont principalement décrites dans la littérature chez les champignons filamenteux et pour lesquelles l'implication dans la virulence a été mise en avant chez d'autres modèles fongiques (Defosse et al., 2015 ; Hérivaux et al., 2016).

Les vecteurs plasmidiques utilisés et les souches générées au cours de ces expérimentations sont répertoriés dans les **Tableaux X** et **XI**.

5.1. Construction des cassettes de délétion pour les gènes *HHKIII* et *HHKX*

L'invalidation d'un gène dans le génome d'un organisme nécessite au préalable l'élaboration d'une cassette de délétion. Généralement, cette cassette se compose d'un marqueur de sélection qui permet de sélectionner sur un milieu approprié les clones mutants ayant intégré la construction. De plus, ce marqueur de sélection est bordé par les régions flanquantes (RF) 5' et 3' homologues aux régions 5' et 3' du gène ciblé. Les séquences RF favorisent l'insertion de la cassette de délétion au locus du gène ciblé par les mécanismes cellulaires de recombinaison homologue (Weld et al., 2006).

En principe, lorsqu'une souche mutante est obtenue, l'étape suivante consiste à y réintroduire un allèle sauvage pour obtenir une souche dite « complémentée ». Cette seconde étape de transgénèse nécessite donc un nouveau marqueur de sélection. Dans le cas où la souche étudiée présente une faible sensibilité aux drogues de sélection ou que peu de marqueurs de sélection sont disponibles, il est essentiel de disposer d'un système de recyclage. Dans cette optique, les systèmes incluant un gène recombinase sont particulièrement utilisés chez les champignons filamenteux (Krappmann, 2014).

Les difficultés de construction des cassettes de délétion pour les gènes *HHKIII* et *HHKX* nous ont amenés à tenter diverses stratégies de clonage, décrites ci-dessous.

Tableau XII. Amorces utilisées pour le développement des cassettes de délétion et de complémentation du gène *HHKIII*.

Amorce sens	Séquence 5' → 3'	Tm (°C)	Amorce anti-sens	Séquence 5' → 3'	Tm (°C)	Taille des amplicons (pb)	Annotation
Construction de la cassette de délétion HHK III							
Clonage dans le pPV189 → pAHHKIII.1							
5'FP-HKIII- <i>Cla</i> I	CCATCGATGTACAGTTGATGAAGCGTGAAGAAA	61	5'RP-HKIII- <i>Hind</i> III	CCCAGCTTAAGGTCGAAGGTTTGAATGGAGATA	62	1135	5'RF_HHKX_1
3'FP-HKIII- <i>Not</i> I	ATAAGAATGCGGCCGCATTCAAGCACAGATGGATGAGTAC	67	3'RP-HKIII- <i>Bst</i> XI	ATGCATCCACCGCGTGGTCATTTGCCAATCTTCGCTCTTTAG	69	1145	3'RF_HHKX_1
HKIII-vérifFP	ATGCTTGGACCTCGGAATCA	56	HKIII-vérifRP	GGGAGCCTCGGTCTCTTAA	56	1950	-
Clonage dans le pAN7-1 → pAHHKIII.7							
HKIII-pan <i>Bgl</i> II	GAGATCTGTACAGTTGATGAAGCGTGAAGAAA	60	HKIII-pan <i>Bst</i> EII	GCGCAAAGGTCACCAAGGTCGAAGGTTTGAATGGAGATA	67	1135	5'RF_HHKIII_7
HKIII-pan7 <i>Nae</i> I	GCGCAAAGCGGCCCATTC AAGCACAGATGGATGAGTAC	69	HKIII-pan7 <i>Xba</i> I	GCTTAGATCATTGCCAATCTTCGCTCTTTAG	60	1145	3'RF_HHKIII_7
Clonage dans le pAN8-1 → pAHHKIII.8							
HKIII-pan <i>Bgl</i> II	GAGATCTGTACAGTTGATGAAGCGTGAAGAAA	60	HKIII-pan <i>Bst</i> EII	GCGCAAAGGTCACCAAGGTCGAAGGTTTGAATGGAGATA	67	1135	5'RF_HHKIII_8
HKIII-pan8 <i>Xba</i> I	GCTTAGACATTCAAGCACAGATGGATGAGTAC	61	HKIII-pan8 <i>Nde</i> I	GGAATCCATATGTCATTTGCCAATCTTCGCTCTTTAG	62	1145	3'RF_HHKIII_8
PCR fusion → AHHKIII.F							
5'FP-HKIII- <i>Cla</i> I	CCATCGATGTACAGTTGATGAAGCGTGAAGAAA	61	HPH-HKIII-fusB	TCGTGAATCTTTACCAGATCGGAAGCAAT AAGGTCGAAGGTTTGAATGGAGATA	67	1135	5'RF_HHKIII_F
HPH-HKIII-fusC	TATCTCCATTCAAACCTTCGACCTTATTGCTCCGATCTGGTAAAAGATTCACGA	67	HPH-HKIII-fusD	GTAATCATCCATCTGTGCTTGAATGATCAGAGCAGATTGACTGAGAGTGCACCA	68	2635	HPH_HHKIII_F
HPH-HKIII-fusE	TGGTGCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATCATTCAAGCACAGATGGATGAGTAC	68	3'RP-HKIII- <i>Bst</i> XI	ATGCATCCACCGCGTGGTCATTTGCCAATCTTCGCTCTTTAG	69	1145	3'RF_HHKIII_F
Construction de la cassette de complémentation HHKIII							
Clonage dans le pBluescript II KS + → pAHHKIII.R							
HKIII-rev1- <i>Not</i> I	CTGAGAGCGGCCGCTACAGTTGATGAAGCGTGAAG	69	HKIII-rev2- <i>Xba</i> I	CTGAGATCTAGACCTCAGCGGTGAAGACCATA	62	6115	HHKIII_R
HKIII-rev3- <i>Xba</i> I	CTGAGATCTAGATGATATTGAAGGAGCATTTTTGGG	60	HKIII-rev4- <i>Bam</i> HI	CTGAGAGGATCCGTTAACTGGTCCCGTCCGGC	68	1410	HPH_R
HKIII-rev5- <i>Bam</i> HI	CTGAGAGGATCCCTGGCAACGTCATATCACTC	65	HKIII-rev6- <i>Hind</i> III	CTGAGAAAGCTTGATACATACATATTCTTGTG	56	1000	HHKIIIterm_R
HPHsm-F-pAN7	GCGCAAATCTAGAATTGCTCCGATCTGGTAAAAGATTCACGA	65	HPHsm-R-pAN7	GCGCAAAGGATCCCGCGTGGCATCTACTATTCTTTGCC	71	1600	HPH_Rbis

ATCG : adaptateur ; ATCG : site de restriction enzymatique ; ATCG : séquence chevauchante ; ATCG : séquence de l'ADN à amplifier.

Tableau XIII. Amorces utilisées pour le développement des cassettes de délétion du gène *HHKX*.

Amorce sens	Séquence 5' → 3'	Tm (°C)	Amorce anti-sens	Séquence 5' → 3'	Tm (°C)	Taille des amplicons (pb)	Annotation
Construction de la cassette de délétion HHKX							
Clonage dans le pPV189 → pAHHKX.1							
5'FP-HKX- <i>Cla</i> I	CCATCGATGTAGCCTCCACTATGCGTAATTGT	62,5	5'RP-HKX- <i>Hind</i> III	CCCAGCTTCCAGCTAAGAAGGACGTTGAAATA	63	1095	5'RF_HHKX_1
3'FP-HKX- <i>Not</i> I	ATAAGAATGCGGCCGCAAGCTCGTCAAGAATAGAAGTACG	67	3'RP-HKX- <i>Bst</i> XI	ATGCATCCACCGCGGTGGAAAGAATGTTGCTTGTTCGTTTTTC	69	1125	3'RF_HHKX_1
3'FP-HKX- <i>Not</i> Ibis	ATAAGAATGCGGCCGCTCAAACAACGACTCGTGAGAAAT	68	3'RP-HKX- <i>Bst</i> XIbis	ATGCATCCACCGCGGTGGCTTTAATATGGCACTCGGTCCACAG	71	748	3'RF_HHKX_1bis
HKX-vérifFP	AAGGTCTCATCATCGCCAT	56	HKX-vérifRP	CATCGAAAAGGGTCAGAGCG	56	1890	-
Clonage dans le pAN7-1 → pAHHKX.7							
HKX-pan <i>Bgl</i> II	GAAGATCTGTAGCCTCCACTATGCGTAATTGT	61	HKX-pan <i>Bst</i> EII	GCGCAAAGGTCACCTCCAGCTAAGAAGGACGTTGAAATA	67	1095	5'RF_HHKX_7
HKX-pan7 <i>Nae</i> I	GCGCAAAGCGGCCCTCAAACAACGACTCGTGAGAAAT	70	HKX-pan7 <i>Xba</i> I	GCTCTAGAGCTTTAATATGGCACTCGGTCCACAG	62	1125	3'RF_HHKX_7
Clonage dans le pAN8-1 → pAHHK.8							
HKX-pan <i>Bgl</i> II	GAAGATCTGTAGCCTCCACTATGCGTAATTGT	61	HKX-pan <i>Bst</i> EII	GCGCAAAGGTCACCTCCAGCTAAGAAGGACGTTGAAATA	67	1095	5'RF_HHKX_8
HKX-pan8 <i>Xba</i> I	GCTCTAGACTCAAACAACGACTCGTGAGAAAT	62	HKX-pan8 <i>Nde</i> I	GGAATTCATATGGCTTTAATATGGCACTCGGTCCACAG	64	1125	3'RF_HHKX_8
PCR fusion → AHHKX.F							
5'FP-HKX- <i>Cla</i> I	CCATCGATGTAGCCTCCACTATGCGTAATTGT	62,5	HPH-HKX-fusB	TCGTGAATCTTTACCAGATCGGAAGCAATCCAGCTAAGAAGGACGTTGAAATA	67	1205	5'RF_HHKX_F
HPH-HKX-fusC	TATTTCAAGTCCTTCTTAGCTGAATTGCTCCGATCTGGTAAAGATTACGA	67	HPH-HKX-fusD	ATTTCTCGACGAGTCGTTGTTTGGATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCA	69	2635	HPH_HHKX_F
HPH-HKX-fusE	TGGTGCACTCTCAGTACAATCTGCTGATCTCAAACAACGACTCGTGAGAAAT	69	3'RP-HKX- <i>Bst</i> XIbis	ATGCATCCACCGCGGTGGCTTTAATATGGCACTCGGTCCACAG	71	1145	3'RF_HHKX_F

ATCG : adaptateur ; ATCG : site de restriction enzymatique ; ATCG : séquence chevauchante ; ATCG : séquence de l'ADN à amplifier.

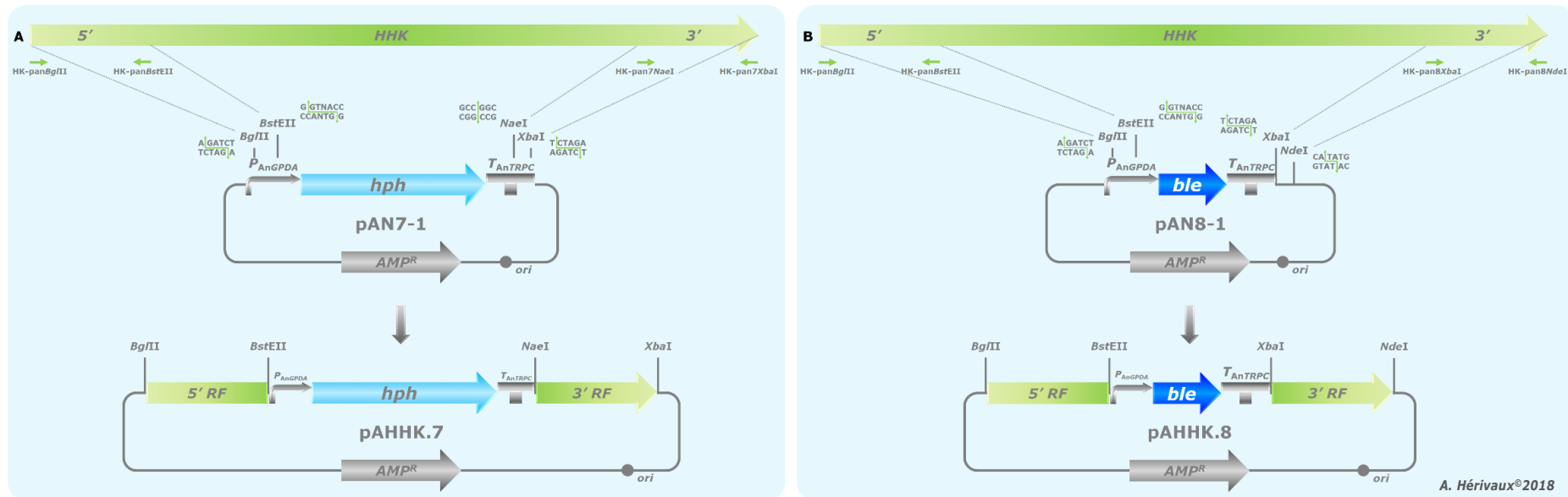


Figure 40. Construction des cassettes de délétion AHHKIII.7 et AHHKX.7 dans le vecteur plasmidique pAN7-1, AHHKIII.8 et AHHKX.8 dans le vecteur plasmidique pAN8-1.

A. Les fragments 5'RF_HHK_7 ont été amplifiés à l'aide du couple d'amorces HKK-panBglII/HKK-panBstEII puis insérés au niveau des sites de restriction BglII et BstEII du pAN7-1. Les fragments 3'RF_HHK_7 ont été amplifiés par les amorces HKK-pan7NaeI et HKK-pan7XbaI puis insérés dans le pAN7-1 au niveau des sites de restriction NaeI et XbaI. Les plasmides pAHHKIII.7 (~ 8700 pb) et pAHHK.7 (~ 8650 pb) ainsi générés contiennent les cassettes de délétion AHHKIII.7 (~ 5850 pb) et AHHKX.7 (~ 5800 pb), respectivement. **B.** Les fragments 5'RF_HHK_8 ont été amplifiés à l'aide du couple d'amorces HKK-panBglII/HKK-panBstEII puis insérés au niveau des sites de restriction BglII et BstEII du pAN8-1. Les fragments 3'RF_HHK_8 ont été amplifiés par les amorces HKK-pan8XbaI et HKK-pan8NdeI puis insérés dans le pAN8-1 au niveau des sites de restriction XbaI et NdeI. Les plasmides pAHHKIII.8 (~ 7900 pb) et pAHHK.8 (~ 7850 pb) ainsi générés contiennent les cassettes de délétion AHHKIII.8 (~ 5350 pb) et AHHKX.8 (~ 5300 pb), respectivement.

5.1.1. Clonage dans le pAN7-1 et le pAN8-1

S. apiospermum est un champignon qui est peu sensible à la plupart des molécules antifongiques ainsi qu'à de nombreuses drogues de sélection, comme démontré dans l'étude préliminaire que nous avons menée au début de cette thèse. A l'époque de l'initiation de ma thèse, seules l'HygB et la Phleo pouvaient être utilisées comme drogues de sélection chez notre champignon. Il est également important de souligner que l'HygB est préférée à la Phleo puisqu'elle entraîne moins de « bruit de fond » lors des étapes de sélection de la transgénèse. Nous avons ainsi, dans un premier temps, opté pour le clonage des extrémités 5'RF et 3'RF dans les deux vecteurs les plus classiquement utilisés en génétique fongique : les plasmides pAN7-1 (Punt *et al.*, 1987) et pAN8-1 (Mattern *et al.*, 1988), contenant les marqueurs *hph* (conférant la résistance à l'HygB) et *Shble* (conférant la résistance à la Phleo), respectivement (Figure 40).

Les RF 5' et 3' de chaque gène ont été amplifiées par PCR conventionnelle. L'ensemble des amorces utilisées et la taille des amplicons attendue sont répertoriés dans les Tableau XII et XIII (Figure 41).

Les fragments amplifiés 5'RF_HHKIII_7 et 5'RF_HHKX_7 ont été digérés par le couple d'enzymes *Bgl*II et *Bst*EII puis clonés au niveau des sites *Bgl*II et *Bst*EII du pAN7-1. Dans un second temps, les extrémités 3'RF_HHKIII_7 et 3'RF_HHKX_7 ont été digérées par les endonucléases *Nae*I et *Xba*I puis insérées au niveau des sites *Nae*I et *Xba*I du pAN7-1. Les plasmides pAHHKIII.7 et pAHHKX.7 contiennent donc la cassette de délétion AHHKIII.7 ou AHHKX.7 incluant le gène de résistance à l'HygB (*hph*).

Parallèlement, les clonages des RF 5' et 3' ont été tentés dans le plasmide pAN8-1. A cet effet, les extrémités 3'RF_HHKIII_8 et 3'RF_HHKX_8 ont été digérées par le couple d'enzymes *Xba*I et *Nde*I puis clonées au niveau des mêmes sites dans le pAN8-1. Dans un second temps, les amplicons 5'RF_HHKIII_8 et 5'RF_HHKX_8 ont été digérés par les endonucléases *Bgl*II et *Bst*EII puis insérés au niveau de ces mêmes sites dans le pAN8-1. Les plasmides pAHHKIII.8 et pAHHKX.8 contiennent donc la cassette de délétion AHHKIII.8 ou AHHKX.8 incluant le gène de résistance à la Phleo (*Shble*).

Difficultés rencontrées. Bien que l'ensemble des régions 5'RF et 3'RF aient été amplifiées sans difficulté, nous ne sommes pas parvenus à construire les différentes cassettes de délétion des gènes *HHKIII* et *HHKX* dans les vecteurs plasmidiques pAN7-1 et pAN8-1. Aucune explication rationnelle n'a pu justifier ce phénomène.

5.1.2. PCR fusion

La seconde stratégie que nous avons expérimentée afin de construire nos cassettes de délétion des gènes *HHKIII* et *HHKX* a été la PCR fusion (Figure 42).

L'ensemble des fragments de PCR fusion a été amplifié à l'aide de la Q5® High-Fidelity DNA Polymerase. L'extrémité 5'RF_HHK_F du gène ciblé a été amplifiée à l'aide des amorces 5'FP-*Cla*I et *fusB*. Il en est de même pour le fragment 3'RF_HHK_F mais avec les amorces 3'RP-*Bst*XI et *fusE*. Le gène de sélection *hph* correspond à l'amplification de la cassette de sélection à l'HygB du pAN7-1 à l'aide des amorces *fusC* et *fusD* (Figure 43.A) (Tableau XII et XIII).

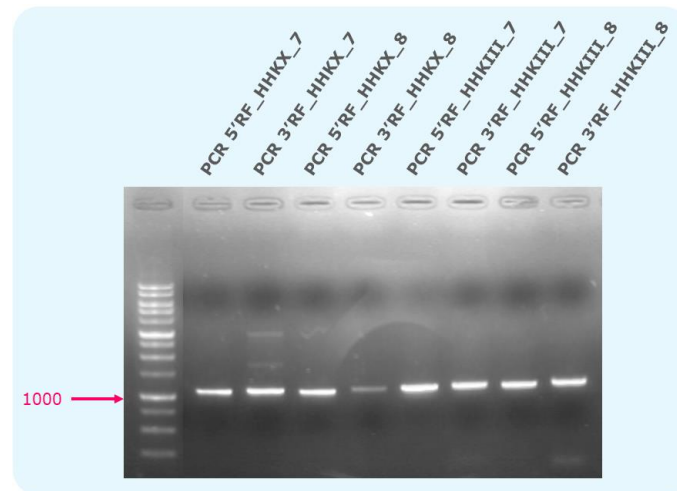


Figure 41. Amplification des fragments 5'RF et 3'RF des gènes *HHKIII* et *HHKX* nécessaires à la construction des cassettes de délétion AHHKIII.7, AHHKIII.8, AHHKX.7 et AHHKX.8 par clonage dans les plasmides pAN7-1 et le pAN8-1.

L'ensemble des fragments, mesurant environ 1000 pb, a été amplifié par PCR conventionnelle à l'aide de la GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase.

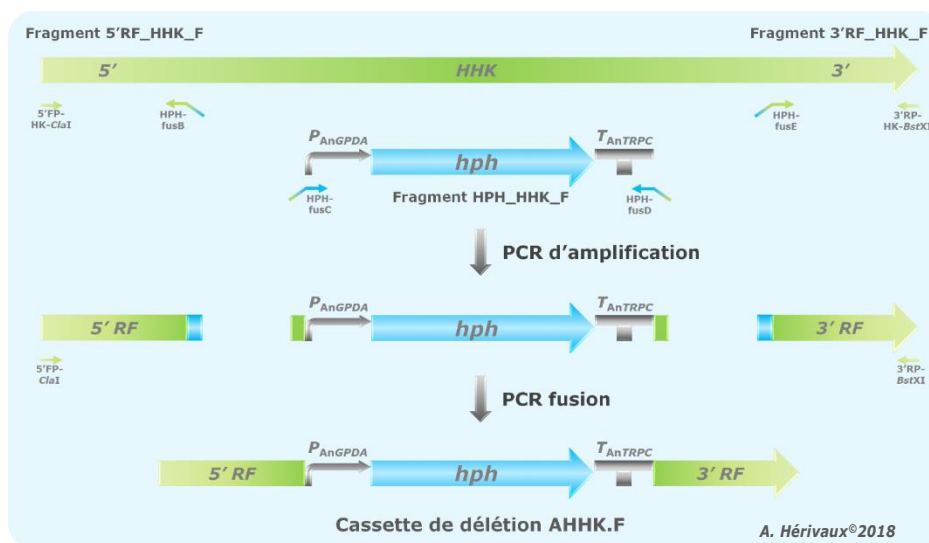


Figure 42. Construction des cassettes de délétion AHHKIII.F et AHHKX.F par PCR fusion.

Les trois fragments composant les cassettes de délétion AHHKIII.F et AHHKX.F ont tout d'abord été amplifiés indépendamment. Le fragment 5'RF_HHK_F a été amplifié à l'aide des amorces 5'FP-HK-ClaI et HPH-HK-fusB à partir du gène cible. Le fragment 3'RF_HHK_F a été amplifié à partir du gène cible à l'aide du couple d'amorces HPH-HK-fusE/3'RP-HK-BstXI. Le dernier fragment qui correspond à l'amplification de la cassette de résistance à l'hygromycine B du pAN7-1 (~ 2650 pb) a été amplifié à l'aide des amorces HPH-HK-fusC et HPH-HK-fusD. Suite à cette première étape d'amplification, les trois fragments qui présentaient des régions chevauchantes à leurs extrémités ont été obtenus. La seconde étape a consisté à réaliser une nouvelle amplification en présence de nos 3 fragments chimériques afin de générer les cassettes de délétion. Cette nouvelle étape a été réalisée avec les amorces 5'FP-HK-ClaI et 3'RP-HK-BstXI. Les cassettes de délétion ainsi générées mesurent environ 4900 pb pour l'AHHKIII.F et 5000 pb pour l'AHHKX.F.

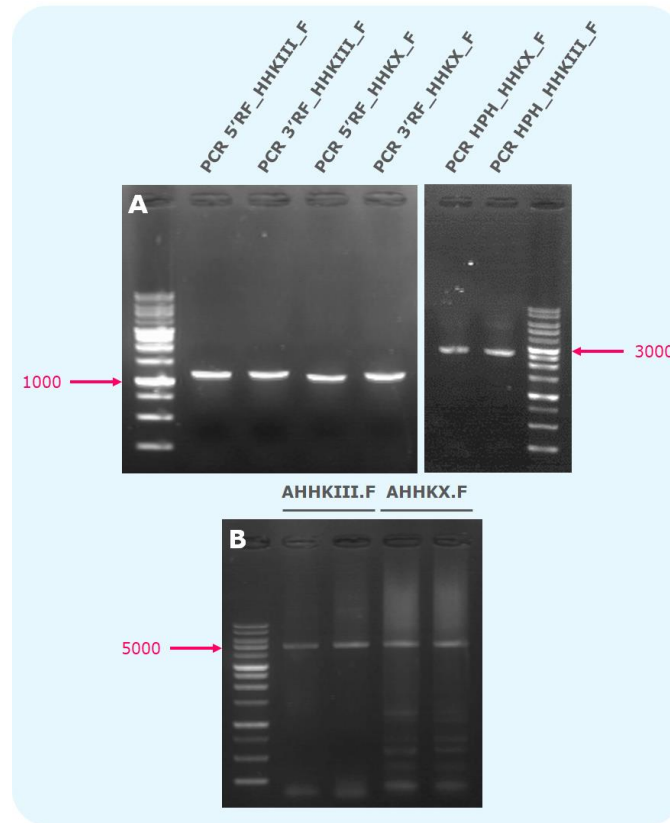


Figure 43. Amplification des fragments de PCR nécessaires à la construction des cassettes de délétions AHHKIII.F et AHHKX.F et génération des cassettes de délétion par PCR fusion.

A. Les fragments 5'5R_HHK_F et 3'RF_HHK_F sont attendus à la taille d'environ 1000 pb. Les fragments HPH_HHK_F sont attendus à environ 2650 pb. Les fragments ont été amplifiés à l'aide de la Q5® High-Fidelity DNA Polymerase. **B.** Les cassettes AHHKIII.F et AHHKX.F ont été obtenues par PCR fusion (~ 5000 pb).

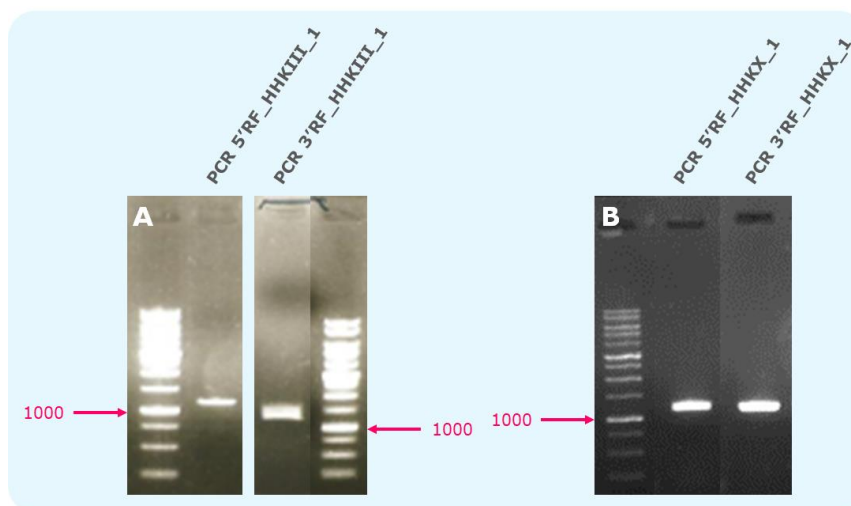


Figure 44. Amplification des fragments 5'RF et 3'RF des gènes *HHKIII* et *HHKX* nécessaires à la construction des cassettes de délétion AHHKIII.1 et AHHKX.1 par clonage dans le pPV189.

L'ensemble des fragments, mesurant environ 1100 pb, a été amplifié par PCR conventionnelle à l'aide de la GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase.

Les trois fragments nécessaires à la construction de chacune des cassettes de délétion ont été mis en contact puis l'amplification a été réalisée selon le principe de la PCR fusion, sans effectuer d'étape intermédiaire. Les deux cassettes de délétion AHHKIII.F et AHHKX.F ont été rapidement obtenues par cette approche (**Figure 43.B**). La seule limite de cette méthode est la faible quantité d'ADN générée lors de l'étape finale de la PCR fusion.

Remarques. La possibilité d'utiliser les constructions décrites ci-dessus pour la transgénèse de *S. apiospermum* a été remise en question. En effet, dans l'entrefait la nouvelle souche *ku70Δ* a été générée et validée dans l'équipe et le gène de résistance *Shble* est à présent intégré (et « condamné ») au locus du gène *ku70* (voir la description de la souche *ku70Δ* ci-après). L'utilisation des cassettes AHHKIII.7, AHHKX.7, AHHKIII.F et AHHKX.F incluant le gène de résistance à l'*HygB* sans la présence d'un système de recyclage ne serait donc à terme plus judicieuse dans l'équipe dans l'optique de générer des souches mutées puis complétées à partir de la souche *ku70Δ* avec le seul et unique marqueur *hph*. Nous nous sommes donc orientés à ce stade vers la construction de cassettes d'invalidation incluant un système de recyclage du marqueur de sélection *hph*.

5.1.3. Clonage dans le pPV189

Dans l'optique de n'utiliser que l'*HygB* comme drogue de sélection pour créer des souches mutantes dans la souche *ku70Δ*, il apparaissait nécessaire d'avoir recours à un système de recyclage afin de pouvoir compléter la souche mutante avec le même marqueur *hph* lors d'une seconde étape de transgénèse. C'est pourquoi nous nous sommes alors orientés vers des constructions moléculaires sur la base du plasmide pPV189.

Le vecteur pPV189 est un plasmide qui a été généré au laboratoire par le Dr. Vandeputte P. Il renferme la cassette de résistance à l'*HygB*, issue du pAN7-1 (Punt *et al.*, 1987). Le vecteur contient également un système de recyclage du marqueur de sélection basé sur la flippase (système FLP/*FRT*). L'expression du gène codant cette FLP est sous la dépendance de la séquence promotrice P_{PCXYL} (inductible par le xylose). Les séquences de reconnaissance de la recombinase (les fragments *FRT*) sont disposés de part et d'autre de la cassette de sélection. Comme évoqué précédemment dans l'introduction, le système FLP/*FRT* est un outil moléculaire qui reste de grande taille : 9,51 kb (cf **Analyse bibliographique, 4. Outils moléculaires**).

Les RF 5' et 3' de chaque gène ont été amplifiées par PCR conventionnelle (**Figure 44**). Les amorces nécessaires aux amplifications et la taille attendue des amplicons sont répertoriées dans les **Tableau XII** et **XIII**. Les extrémités des amplicons 3'RF_HHKIII_1 et 3'RF_HHKX_1 ont été digérées par le couple d'enzymes *NotI* et *BstXI* puis clonées au niveau des mêmes sites dans le pPV189. Dans un second temps, les extrémités de la PCR 5'RF_HHKIII_1 et 5'RF_HHKX_1 ont été digérées par les endonucléases *ClaI* et *HindIII* puis insérées au niveau de ces sites dans le pPV189. Les plasmides pAHHKIII.1 et pAHHKX.1 ainsi obtenus contiennent donc la cassette de délétion du gène *HHKIII* ou *HHKX* incluant le gène de

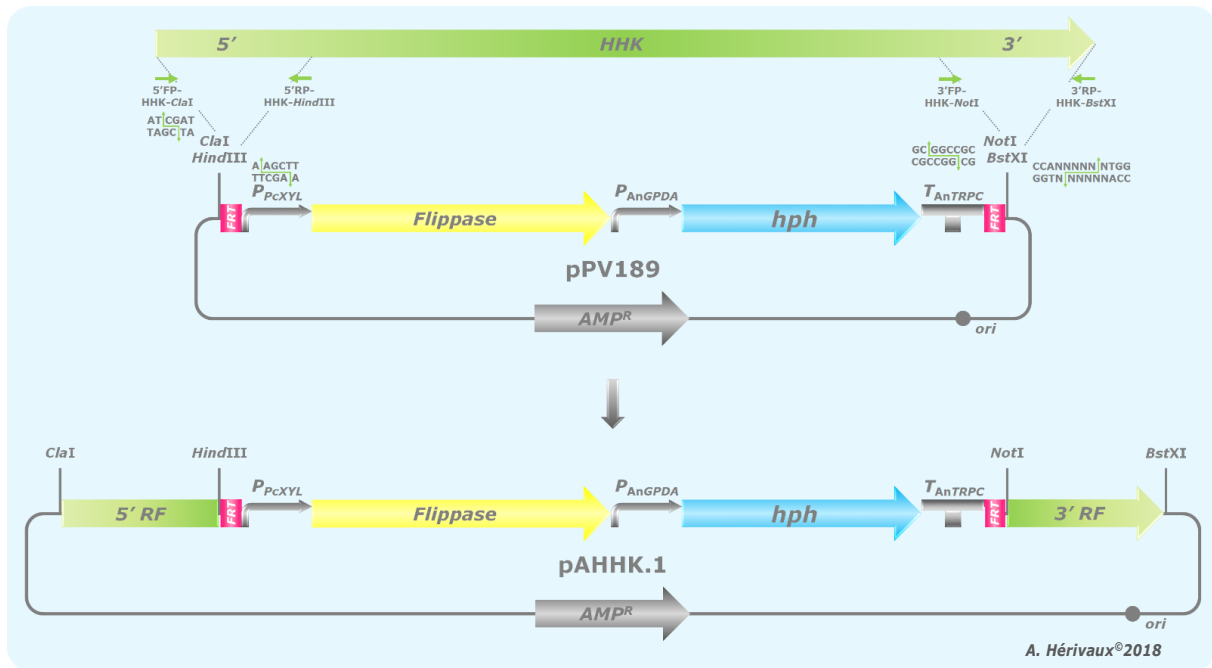


Figure 45. Construction des cassettes de délétion AHHKIII.1 et AHHKX.1 dans le vecteur plasmidique pPV189.

Les fragments 5'RF_HHK_1 ont été amplifiés à l'aide du couple d'amorces 5'FP-HHK-ClaI/5'RP-HHK-HindIII puis insérés au niveau des sites de restriction ClaI et HindIII du pPV189. Les fragments 3'RF_HHK_1 ont été amplifiés par les amorces 3'FP-HHK-NotI et 3'RP-HHK-BstXI puis insérés dans le pPV189 au niveau des sites de restriction NotI et BstXI. Les plasmides pAHHKIII.1 (~ 11800 pb) et pAHHKX.1 (~ 11750 pb) ainsi générés contiennent les cassettes de délétion AHHKIII.1 (~ 8900 pb) et AHHKX.1 (~ 8850 pb), respectivement.

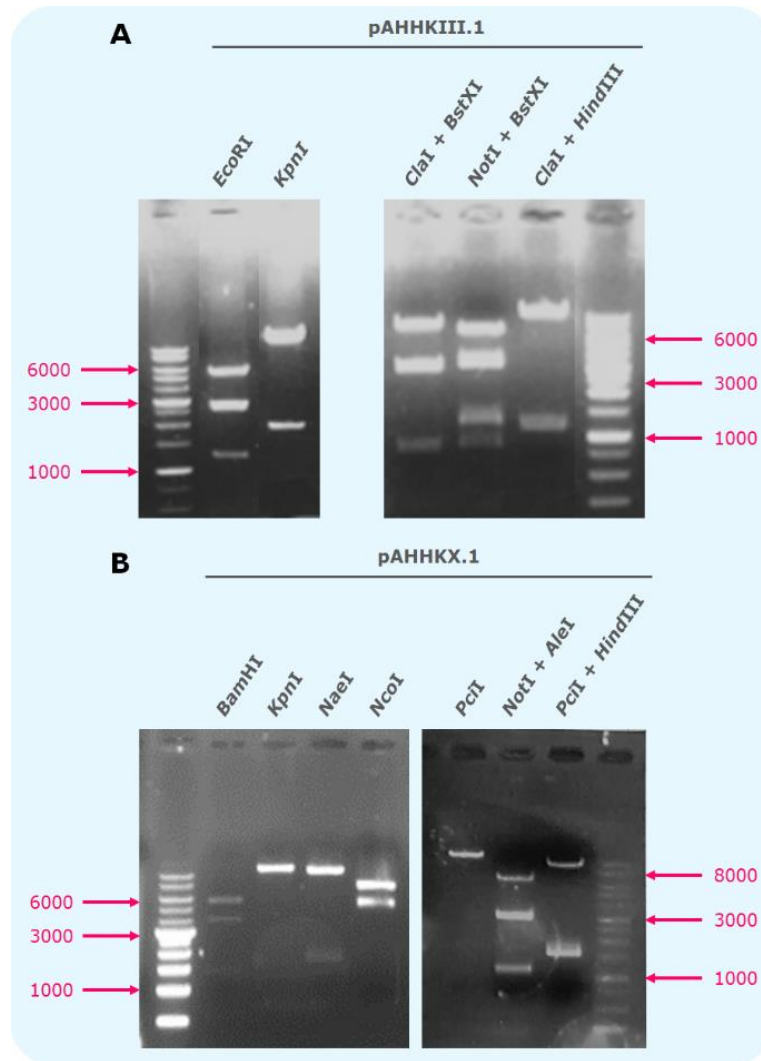


Figure 46. Vérification des constructions plasmidiques pAHHKIII.1 et pAHHKX.1.

A. Le plasmide pAHHKIII.1 a été validé après digestion par différentes enzymes de restriction. Les profils de digestion attendus en fonction des enzymes sont les suivants : EcoRI : ~ 5700, 2550, 2400 et 1100 pb, KpnI : ~ 10000 et 800 pb, ClaI/BstXI : ~ 7950, 2900, 800 et 150 pb, NotI/BstXI : ~ 6800, 3050, 1150 et 800 pb, ClaI/HindIII : ~ 10650 et 1150 pb. **B.** Le plasmide pAHHKX.1 a été validé après digestion par différentes enzymes de restriction. Les profils de digestion attendus en fonction des enzymes sont les suivants : BamHI : ~ 7100 et 4650 pb, KpnI : ~ 9950 et 1750 pb, NaeI : ~ 9600 et 2150 pb, NcoI : ~ 6350, 3950 et 1450 pb, PciI : ~ 11750 pb, NotI/AleI : ~ 7350, 3150, 1150 et 150 pb, PciI/HindIII : ~ 10200 et 1550 pb.

résistance à l'HygB (*hph*) et le système de recyclage du marqueur de sélection FLP/FRT (Figures 45 et 46).

Difficultés rencontrées. La cassette AHHKIII.1 a rapidement été générée. En revanche, nous avons connu quelques difficultés pour la construction de la cassette AHHKX.1. Tout d'abord, l'amplification de l'extrémité 3'RF de l'HHKX n'a pas pu être réalisée avec les premières amorces synthétisées, à savoir 3'FP-HKX-NotI et 3'RP-HKX-BstXI. Cet écueil a été écarté grâce aux secondes amorces 3'FP-HKX-NotIbis et 3'RP-HKX-BstXIbis. Ensuite, nous avons rencontré des difficultés à cloner l'extrémité 5'RF_HHKX_1. Face à cette impasse, l'hypothèse dressée concernait la compétence de nos cellules *Escherichia coli* DH5a. Dans le doute, nous avons généré de nouvelles bactéries compétentes ce qui au final a permis d'obtenir la seconde construction.

5.1.4. Conclusion générale

Au final, différentes cassettes de délétion ont été générées pour chacun des gènes *HHKIII* et *HHKX*. La première série de cassettes (AHHKIII.F et AHHKX.F) a été obtenue grâce au principe de la PCR fusion. Cependant, celles-ci ne contiennent pas de système de recyclage du marqueur de sélection. Suite à la disponibilité de la souche *ku70Δ*, une seconde série de constructions (AHHKIII.1 et AHHKX.1) contenant à la fois une cassette de sélection à l'HygB et un système de recyclage du marqueur a alors été générée. Grâce à l'obtention de ces différentes cassettes de délétion, nous avons alors pu envisager d'invalider les gènes *HHKIII* et *HHKX* chez *S. apiospermum*.

5.2. Caractérisation fonctionnelle du gène *HHKIII*

5.2.1. Délétion du gène *HHKIII*

Chez de nombreux champignons filamenteux, la méthode de choix pour réaliser la transgénèse d'un ADN exogène repose sur la transformation de protoplastes, de petites entités fragiles puisque dépourvues de paroi, en appliquant un choc thermique en présence de PEG et d'ions chlorures de calcium (cf Partie II, 2. Matériels et méthodes) (Turgeon *et al.*, 2010 ; Liu et Friesen, 2012).

a) Construction de la souche *S. apiospermum ku70Δ*

Les premiers essais de transgénèse menés au laboratoire sur *S. apiospermum* ont été initiés par le Dr. Vandeputte P. L'objectif de la transgénèse était de déléter le gène *CYR1* qui code une adénylate cyclase qui pourrait être à l'origine de la résistance des levures et des moisissures aux antifongiques azolés. Comme observé chez la plupart des autres modèles filamenteux, ces premières expérimentations ont confirmé la difficulté à obtenir des mutants ciblés dans la souche sauvage IHEM 14462. C'est pourquoi le Dr. Vandeputte P. s'est attelé à la construction d'une souche *ku70Δ* chez *S. apiospermum*.

Le développement d'une souche *ku70Δ* requiert la construction d'une cassette de délétion contenant bien entendu un premier marqueur de sélection. A l'époque où la construction d'une telle souche a été initiée, *S. apiospermum* était connu pour n'être sensible qu'à l'HygB et à la Phleo. De plus, aucun

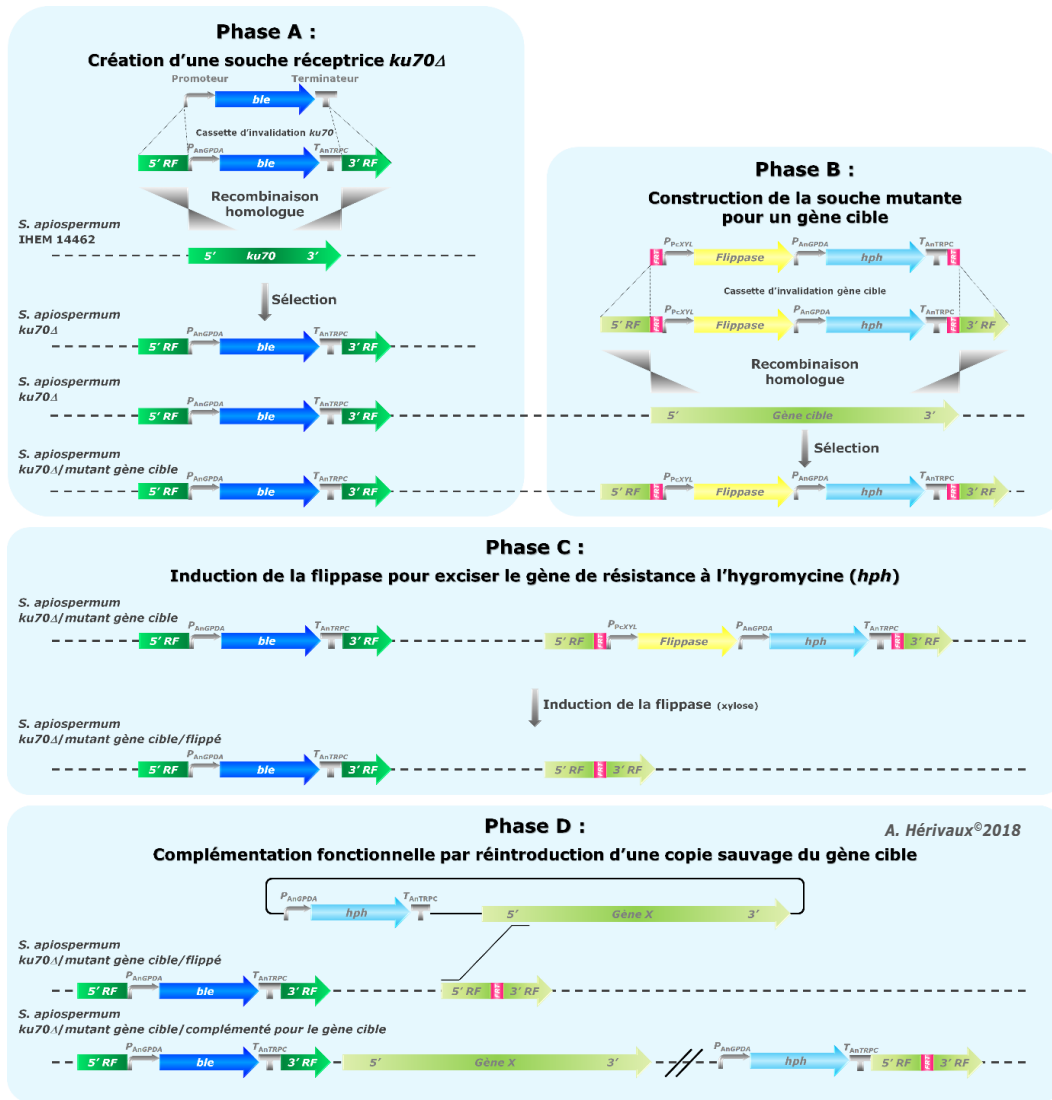


Figure 47. Stratégie globale d'inactivation de gènes adoptée au laboratoire pour *S. apiospermum*.

La stratégie globale d'inactivation de gènes développée au laboratoire se déroule selon 4 étapes. **A.** Une souche réceptrice *ku70Δ* de *S. apiospermum* est générée de façon à inhiber les mécanismes de recombinaison non-homologues, décrits chez les champignons filamenteux. **B.** Le gène cible est invalidé après l'intégration, par recombinaison homologue (RH), d'une cassette d'inactivation dans le génome de la souche réceptrice au locus ciblé. Cette cassette contient le gène de résistance à l'hygromycine B (*hph*) dont l'expression constitutive dépend du P_{AngpdA} et du $T_{AnttrpC}$ d'*Aspergillus nidulans*. Elle contient également le gène de la flippase dont l'expression est régulée par le promoteur inducible au xylose (P_{PcxyI}). Les séquences de recombinaison spécifiques de la recombinase (FRT) sont ajoutées de part et d'autre de la cassette de sélection. Les régions flanquantes (RF) 5' et 3' du gène cible bordent de chaque côté la cassette de délétion. **C.** La recombinase est induite sur un milieu contenant uniquement du xylose comme source de carbone. La cassette de sélection est excisée, laissant place à un fragment FRT résiduel. **D.** Le gène cible est ré-introduit dans le génome de la souche mutante de façon à générer une souche complétement. La sélection de la souche complétementée est réalisée en utilisant de nouveau le marqueur *hph* puisque ce dernier a été éliminé du génome de la souche mutante au cours de l'étape précédente.

système de recyclage de gènes n'étant encore validé à cette époque au laboratoire, le gène qui servirait à construire la souche *ku70Δ* serait condamné à ce locus et ne pourrait donc pas être utilisé par la suite pour d'éventuelles autres délétions de gènes. Le gène de résistance à la Phleo (*Shble*) a été choisi pour déléter le gène *ku70Δ*. La cassette de sélection insérée au locus du gène *ku70* est issue du pAN8-1 (Mattern *et al.*, 1988) et se compose du gène de résistance *Shble* encadré par le promoteur P_{AnGPD}A et le terminateur T_{AnTRPC} d'*A. nidulans*. La stratégie globale d'inactivation de gènes appliquée à cette souche de *S. apiospermum* au laboratoire est présentée à travers la **Figure 47**.

A l'exception de la transgénèse du pAHHKIII.1 dans la souche IHEM 14462, l'ensemble des essais de transgénèse a été réalisé dans cette nouvelle souche *ku70Δ*. Ces différentes expérimentations sont détaillées ci-après.

b) Transformation de la souche sauvage *S. apiospermum* IHEM 14462

Suite à l'intégration d'une cassette de sélection, et donc d'un gène de résistance à une drogue dans le génome d'un champignon, les transformants qui ont intégré cette cassette sont normalement résistants à la drogue correspondante. Au total, une dizaine d'expériences indépendantes de transformation de la souche sauvage IHEM 14462 ont été réalisées en présence du pAHHKIII.1 linéarisé par l'endonucléase *Cla*I. Seulement 4 de ces expérimentations ont permis d'obtenir des transformants (appelés AHSaHHKIII.1) résistants à l'HygB sur les boîtes de sélection au nombre de 10, 22, 4 et 118. Les transformants issus des 3 premiers essais se sont révélés sensibles à l'HygB après un second repiquage sur le milieu de sélection. En revanche, les 118 autres transformants AHSaHHKIII.1 se sont révélés résistants même après plusieurs repiquages sur un milieu contenant la drogue HygB.

Difficultés rencontrées. Sur 10 transformations, une seule semble avoir permis d'obtenir de réels transformants AHSaHHKIII.1. Certains essais de transformation n'ont même pas pu être menés jusqu'à leur terme puisque la faible quantité de protoplastes obtenue après digestion des filaments mycéliens s'est souvent révélée un facteur limitant. La méthode de transformation employée semble donc peu reproductible. Le second facteur limitant peut être la quantité d'ADN mis en contact avec les protoplastes au cours de la transformation. En effet, généralement 5 µg d'ADN sont utilisés par essai. Il se peut que la quantité de matériel nucléaire ne soit pas suffisante, d'autant plus que la taille du pAHHKIII.1 est élevée (11,8 kb) ce qui peut s'avérer délétère pour l'intégration de ce vecteur.

c) Transformation de la souche *S. apiospermum ku70Δ*

La première stratégie de transformation de la souche *ku70Δ* présentée ici a consisté en l'intégration de la cassette de sélection contenue dans le pAHHKIII.1 (contenant un système de recyclage), après linéarisation par l'enzyme *Cla*I. Une dizaine d'essais de transformation ont été menés. Une seule expérience a permis de générer 46 transformants, identifiés AHSaHHKIII.2. Seuls 4 de ces transformants (AHSaHHKIII.2.2, 8, 10 et 32), ceux qui présentaient une croissance rapide sur milieu gélosé en présence de 50 µg.mL⁻¹ d'HygB, ont été sélectionnés pour poursuivre les analyses. Nous avons en parallèle souhaité expérimenter nos cassettes générées par PCR fusion. Ainsi, dans un second temps, une transformation

réalisée en présence de la cassette de délétion AHHKIII.F (ne contenant pas de système de recyclage) a permis d'obtenir 2 transformants, annotés AHSaHHKIII.F, qui se développaient également rapidement sur le milieu de sélection.

Difficultés rencontrées. Nous avons de nouveau observé des difficultés à transformer notre souche *S. apiospermum*. Les facteurs potentiellement limitant à évoquer sont les mêmes que ceux mentionnés précédemment lors de la transformation de la souche sauvage IHEM 14462 avec le pAHHKIII.1. D'autre part, il semblerait que ces nouveaux résultats confirment que la taille de la cassette de sélection impacte la capacité avec laquelle elle sera intégrée dans le génome du champignon. En effet, la cassette AHHKIII.F mesure environ 4,9 kb contre 11,8 kb pour le pAHHKIII.1 (sachant que la cassette AHHKIII.1 mesure seulement 7,7 kb mais la construction ne nous permet pas de l'extraire du plasmide par digestion enzymatique). Une seule transformation en présence de la cassette AHHKIII.F a permis de générer 2 transformants contre une dizaine de tentatives pour le pAHHKIII.1. De ce fait, la taille de la cassette de sélection devra être optimisée au maximum en vue des prochaines constructions.

d) Conclusion générale

Un grand nombre de transformants AHSaHHKIII.1 a été obtenu après transgénése de la souche sauvage IHEM 14462. Cependant, le risque de recombinaison non homologue de la cassette de délétion dans le génome de la souche sauvage nécessite impérativement la caractérisation moléculaire des transformants pour s'assurer qu'il s'agisse réellement de mutants ciblés au locus *HHKIII*. En ce qui concerne la transgénése des cassettes dans le génome de la *ku70Δ*, le taux de recombinaison homologue au locus ciblé est normalement de 95 à 99% (Da Silva Ferreira *et al.*, 2006 ; Goins *et al.*, 2006 ; Choquer *et al.*, 2007 ; Villalba *et al.*, 2008 ; Xu *et al.*, 2014a). Il est tout de même indispensable de caractériser au niveau moléculaire les clones résistants issus de la transformation de la souche *ku70Δ*.

5.2.2. Caractérisation moléculaire des transformants AHSaHHKIII

La caractérisation moléculaire d'un transformant obtenu suite à une étape de transgénése est indispensable, d'autant plus chez les champignons filamenteux puisque les mécanismes de recombinaison « illégitimes » favorisent l'intégration ectopique de la cassette de délétion. L'amplification de l'ADN par PCR peut permettre de mettre en évidence l'intégration de la cassette dans le génome du champignon. Cependant, seule la technique du Southern blot, suite à l'hybridation d'une sonde sur l'ADN, permet d'affirmer que la cassette a bien été intégrée au locus ciblé.

a) Caractérisation moléculaire des transformants AHSaHHKIII par PCR

Avant de pouvoir réaliser les PCR de vérification et les Southern blot, l'ADN génomique des différents transformants doit être extrait. Sur les 118 transformants AHSaHHKIII.1, l'ADN a été extrait pour 101 de ces souches. En ce qui concerne les 17 clones transformés restants, soit leur capacité de développement sur un milieu contenant de l'HygB était trop faible, donc ne permettait pas de pouvoir

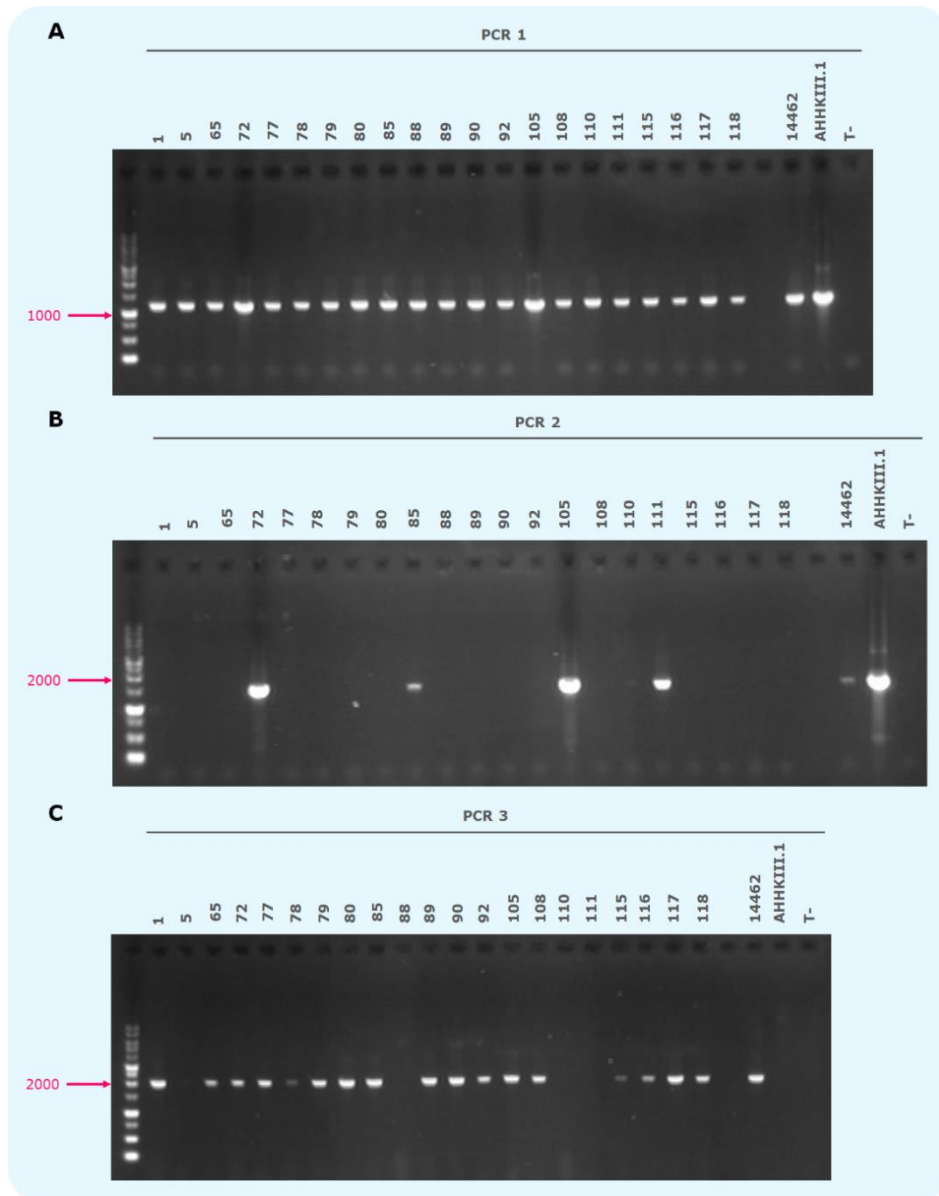


Figure 48. Caractérisation moléculaire des transformants AHSaHHKIII.1 par PCR.

A. Validation de l'extraction de l'ADN des transformants AHSaHHKIII.1 (amorces 3'FP-HKIII-NotI et 3'RP-HKIII-BstXI : ~ 1150 pb). **B.** Validation de l'insertion du gène de résistance à l'hygromycine B (amorces HPH-F et 3'RP-HKIII-BstXI : ~ 1950 pb). **C.** Validation de l'absence du gène sauvage HHKIII (amorces HKIII-vérifFP et HKIII-vérifRP : ~ 1950 pb).

extraire l'ADN par manque de matériel fongique, soit la croissance du transformant était totalement inhibée par 50 µg.mL⁻¹ d'HygB dans le milieu gélosé.

Trois amplifications différentes ont été effectuées afin de vérifier i) que l'ADN du champignon a bien été extrait en amplifiant la région 3'RF en aval du gène *HHKIII* (amorces 3'FP-HKIII-NotI et 3'RP-HKIII-BstXI), ii) que la cassette de sélection a bien été insérée dans le génome du champignon en amplifiant la séquence du terminateur T_{AnTRPC} jusqu'à l'extrémité 3'RF de la cassette (amorces HPH-FGGTTGACGCAATTCGATG et 3'RP-HKIII-BstXI) et iii) que le gène sauvage était bien absent du génome du champignon (amorces HKIII-vérifFP et HKIII-vérifRP). Pour chacune de ces PCR, la taille de l'amplicon attendue est de 1145 pb, 1950 pb et 1945 pb, respectivement (**Figure 48**).

La majorité des souches transformées AHSaHHKIII.1 (62%, 62/101) n'a pas intégré la cassette de délétion AHHKIII.1 puisque la PCR correspondante était négative. La PCR permettant de mettre en évidence le gène sauvage s'est révélée positive chez 96% de ces isolats (59/62) c'est-à-dire que pour 3 isolats ni la cassette ni le gène sauvage n'ont pu être mis en évidence.

Sur l'ensemble des transformants AHSaHHKIII.1 testés, l'insertion de la cassette n'a été validée que chez 39 isolats. Parmi ces 39 isolats, seuls 14 semblent ne plus posséder le gène *HHKIII*, soit 36% (14/39). En effet, pour les autres isolats la cassette de délétion a été intégrée mais elle ne semble pas s'être recombinée au locus du gène *HHKIII* puisque la PCR permettant de mettre en évidence le gène sauvage était positive.

En conclusion, 14% des transformants (14/101) testés semblent avoir intégré la cassette de délétion du gène *HHKIII* au locus ciblé et 25% semblent avoir intégré la cassette de façon ectopique (25/101). Ces résultats confirment la difficulté à insérer un ADN exogène dans le génome d'un organisme puisque la cassette de délétion est détectée pour moins de la moitié des transformants AHSaHHKIII.1 testés. De plus, ils confirment la difficulté à intégrer une cassette de délétion à un locus ciblé dans le génome d'un champignon filamenteux.

Les résultats obtenus à travers les PCR de vérification permettent d'éliminer un grand nombre de transformants pour lesquels la PCR de détection du gène sauvage est positive. Cependant, ces résultats restent indicatifs et sont à interpréter avec précaution. En effet, il est arrivé qu'une PCR négative se révèle finalement positive suite à un second essai (1 isolat s'est révélé positif à l'intégration de la cassette de délétion et 7 isolats se sont révélés positifs à la présence du gène sauvage lors d'un second essai de PCR). C'est pourquoi il est essentiel de confirmer les résultats préliminaires obtenus à l'aide des PCR par la technique du Southern blot.

L'extraction d'ADN a enfin été réalisée pour 4 transformants AHSaHHKIII.2 (n°2, 8, 10 et 32) sélectionnés suite à la transgénèse de la cassette AHHKIII.1 dans la souche *ku70Δ*. Les transformations ayant été réalisées dans la souche *ku70Δ*, nous avons directement testé les transformants AHSaHHKIII.2 par Southern blot. De plus, les PCR précédemment réalisées sur les transformants AHSaHHKIII.1 ne

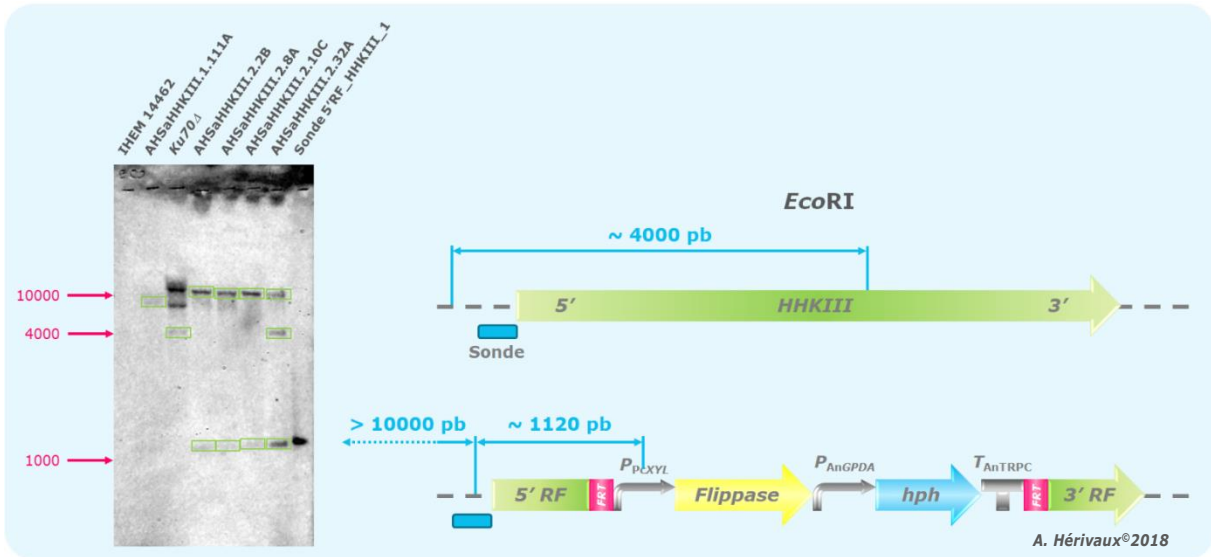


Figure 49. Caractérisation moléculaire des transformants AHSaHHKIII.1.111A et AHSaHHKIII.2.2B, 8A, 10C et 32A par Southern blot.

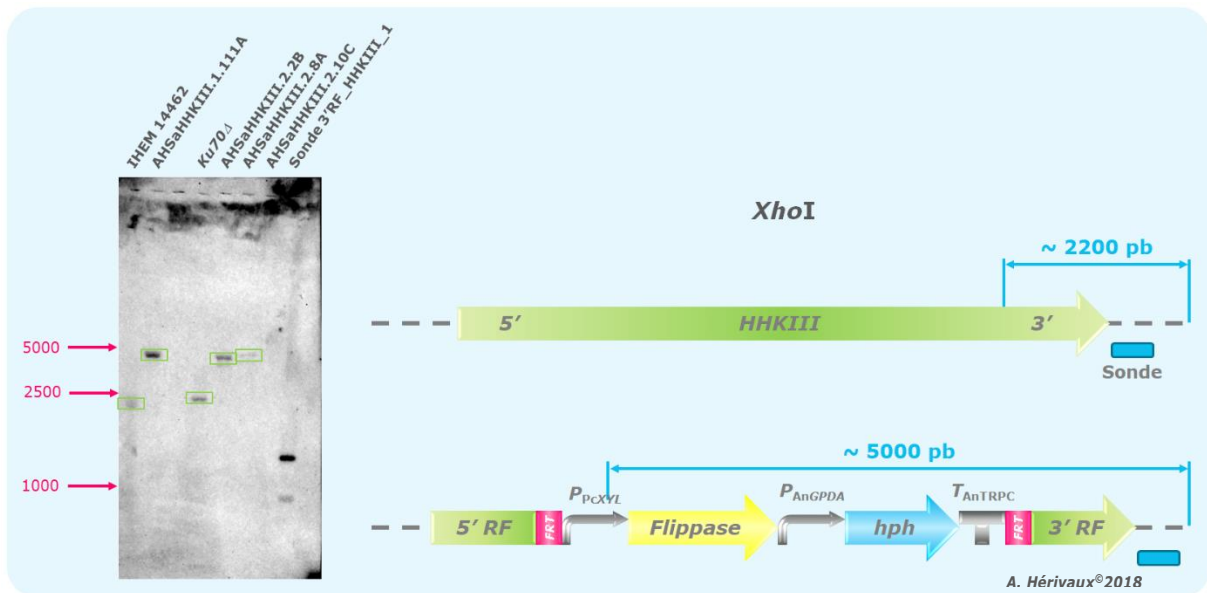


Figure 50. Caractérisation moléculaire des transformants AHSaHHKIII.1.111A et AHSaHHKIII.2.2B, 8A, 10C par Southern blot.

présentant pas une fiabilité de 100%, cette étape préliminaire ne sera pas reconduite lors des prochaines études.

b) Caractérisation moléculaire des transformants AHSaHHKIII par Southern blot

La technique du Southern blot repose sur l'hybridation d'une sonde marquée qui va se fixer spécifiquement sur la région de l'ADN génomique correspondante. Elle permet de mettre en évidence un polymorphisme de restriction, qui aura été identifié au préalable, entre le génome de la souche sauvage et celui de la souche mutante. Le but de la caractérisation moléculaire par Southern blot des transformants est donc d'obtenir des fragments de tailles différentes qui permettront de valider, ou non, l'intégration de la cassette de délétion au locus ciblé. Il est essentiel de rappeler ici qu'avant de procéder à l'extraction de l'ADN des clones transformants, un isolement monospore a été réalisé (3 monospores par clone annotées A, B et C). Ainsi, les Southern blot ont été réalisés sur les monospores AHSaHHKIII.1.111A et AHSaHHKIII.2.2B, 8A, 10C et 32A.

La caractérisation moléculaire des clones transformants AHSaHHKIII.1 et AHSaHHKIII.2 a été réalisée en parallèle. Comme illustré sur la **Figure 49**, l'utilisation de l'enzyme *EcoRI* permet normalement d'obtenir un polymorphisme de restriction puisqu'une bande est attendue à 4 kb pour les deux souches sauvages alors que deux bandes (> 10 kb et 1,1 kb) sont attendues pour les souches mutées. Les résultats observés ont permis de valider les clones AHSaHHKIII.2.2B, 8A et 10C comme souches mutantes. En revanche, la souche AHSaHHKIII.2.32C présente à la fois la bande sauvage et celles pour la souche mutée, ce qui signifie que dans cette souche, la cassette de délétion a bien été intégrée mais à un locus différent de celui du gène *HHKIII*.

Le choix de l'enzyme de restriction n'est pas optimal puisqu'une bande de plus de 10 kb est attendue pour les clones mutants AHSaHHKIII. Cependant, à cette taille il ne nous est pas vraiment possible de distinguer s'il s'agit réellement du fragment attendu ou si cette bande correspond à de l'ADN non digéré. De plus, la sonde ne s'est pas fixée à l'ADN de la souche sauvage IHEM 14462 et du transformant AHSaHHKIII.1.111A. C'est pourquoi une seconde expérience a été effectuée à l'aide d'une nouvelle endonucléase, *XhoI* (**Figure 50**). Grâce à cette nouvelle digestion, les mutants AHSaHHKIII.2.2B et 8A ont été de nouveau validés dans la souche *ku70Δ* ainsi que le clone AHSaHHKIII.1.111A dans la souche sauvage IHEM 14462. En revanche la sonde ADN ne s'est pas hybridée avec le clone AHSaHHKIII.2.10C, sans justification particulière à évoquer. Ainsi, l'étude du clone AHSaHHKIII.2.10C n'a pas été poursuivie.

Pour conclure, des souches mutées pour le gène *HHKIII* ont bien été obtenues à la fois dans la souche sauvage et la souche *ku70Δ*. A travers ces premiers résultats, il est nettement démontré que l'intégration d'un ADN exogène au locus ciblé est facilitée par l'utilisation d'une souche dans laquelle le complexe protéique Ku70/Ku80/Lig4 n'est plus fonctionnel. De plus, l'ensemble de ces souches possédant le système de recyclage, l'étape suivante consistera donc à exciser le marqueur de sélection des loci mutés

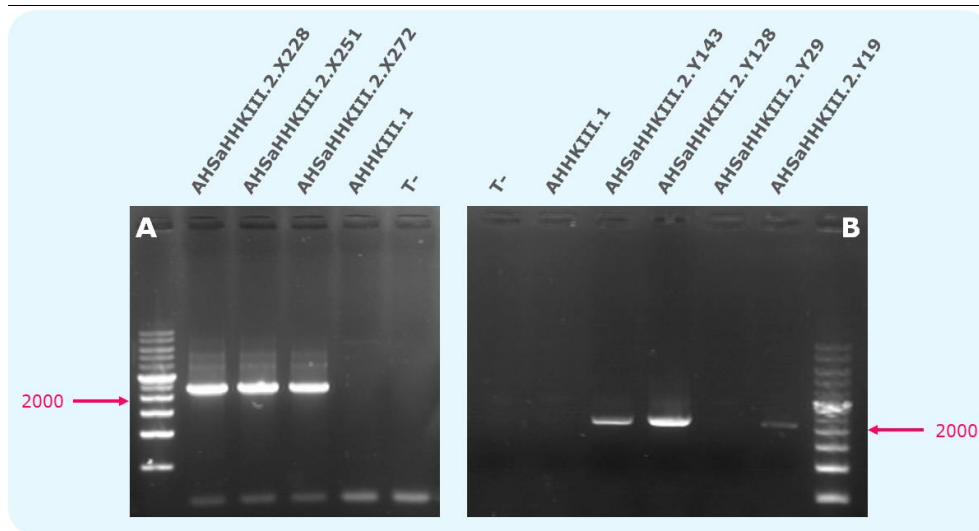


Figure 51. PCR de vérification de l'excision du marqueur de sélection à l'hygromycine B chez les mutants AHSaHHKIII.2.

Validation de l'excision du marqueur de résistance à l'hygromycine B (amorces 5'FP-HKIII-ClaI et 3'RP-HKIII-BstXI : ~ 2400 pb) chez **A.** les transformants AHSaHHKIII.2.X et **B.** les transformants AHSaHHKIII.2.Y.

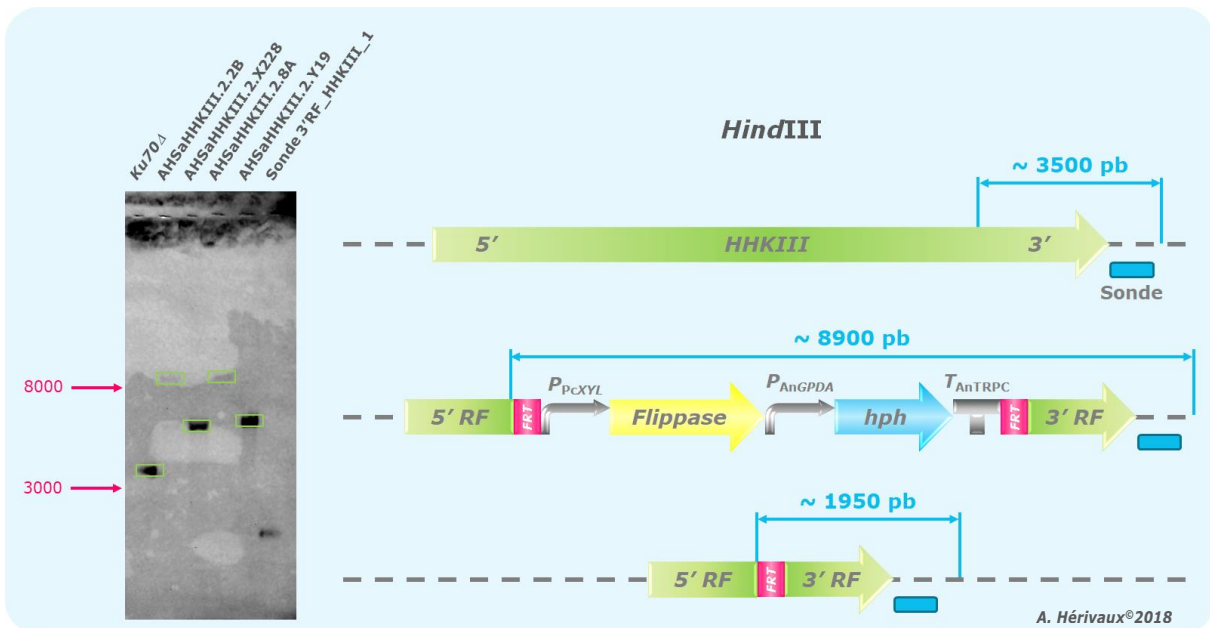


Figure 52. Caractérisation moléculaire des transformants AHSaHHKIII.2.X228 et Y19 par Southern blot.

afin de pouvoir réutiliser le gène de résistance à l'HygB dans le cadre de la construction de la cassette de complémentation.

5.2.3. Complémentation des mutants AHSaHHKIII

Les tests de sensibilité menés sur les spores et les protoplastes de *S. apiospermum* IHEM 14462, dans le but d'identifier de nouveaux marqueurs de sélection, n'ont pas été concluants. Le gène de résistance à la Phleo (*Shble*) ayant servi à la délétion du gène *ku70*, seul le gène de résistance à l'HygB (*hph*) a pu être utilisé dans les stratégies de délétion des gènes *HHKs*. Cependant, comme mentionné dans l'introduction, la réalisation de plusieurs transgénèses dans une même souche nécessite plusieurs marqueurs de sélection (cf [Analyse bibliographique](#), [4. Outils moléculaires](#)). Pour contourner ce problème, nous avons développé et utilisé le système recombinaise FLP/*FRT* qui nous permettra d'exciser le gène de résistance *hph*, et donc d'envisager sa réutilisation comme marqueur de sélection chez nos mutants dans le but d'obtenir la souche complémentée par réintégration d'un allèle sauvage. Les différentes stratégies de complémentation des clones mutants sont envisagées et présentées ci-dessous.

a) Excision du marqueur de sélection

Suite à l'induction de l'expression de la FLP par culture des souches mutantes en milieu liquide contenant du xylose, certaines spores isolées des souches mutantes AHSaHHKIII.2 ne poussaient pas sur milieu gélosé YPDA contenant 50 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ d'HygB. Ces premiers résultats étaient donc encourageants et en faveur de l'excision du gène de résistance *hph*. Afin de conforter ces résultats préliminaires, des PCR conventionnelles ont été réalisées sur l'ADN génomique des spores fongiques afin d'amplifier la cassette de délétion à l'aide du couple d'amorces 5'FP-HKIII-*Clal*/3'RP-HKIII-*Bst*XI. Dans cette approche, si le marqueur de sélection n'a pas été excisé l'amplicon avoisinera les 8,9 kb tandis que si l'excision du marqueur s'est effectuée, l'amplicon généré ne mesurera plus qu'environ 2,4 kb. La [Figure 51](#) montre que le gène de résistance *hph* a bien été excisé puisqu'une bande de 2,4 kb a été amplifiée pour les clones. Ainsi, le clone AHSaHHKIII.2.X228 correspond au clone AHSaHHKIII.2.2B pour lequel le marqueur de sélection *hph* a été excisé et le clone AHSaHHKIII.2.Y19 de la même façon correspond au clone AHSaHHKIII.2.8A n'ayant plus la cassette de sélection à l'HygB.

Pour conforter la première approche de validation, les souches AHSaHHKIII.2 dans lesquelles le marqueur de résistance vis-à-vis de l'HygB a potentiellement été excisé ont été validées par Southern blot. Deux enzymes, *Hind*III et *Kpn*I, ont été utilisées pour digérer les ADN génomiques des souches AHSaHHKIII.2.2B et 8A et des souches AHSaHHKIII.2.X228 et Y19. Les polymorphismes de restriction attendus sont illustrés sur la [Figure 52](#). Après hybridation de la sonde 3'RF-HHKIII, trois profils différents sont bien observés entre la souche parentale, la souche mutante et la souche mutante présentant l'excision du marqueur *hph*, bien que les profils de restriction ne soient pas identiques à ceux attendus.

Contrairement aux essais d'induction qui ont fonctionné dès la première tentative pour les souches AHSaHHKIII.2, la manipulation s'est révélée plus complexe chez AHSaHHKIII.1.111A. En effet, en nous basant sur les résultats précédemment obtenus nous pensions générer des clones dans lesquels le

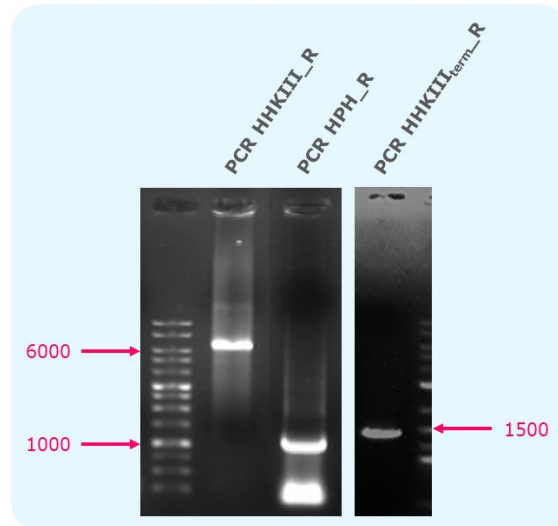


Figure 53. Amplification des fragments de PCR nécessaires à la construction de la cassette de complémentation du gène *HHKIII* par clonage dans la pBluescript II KS +.

Amplifications réalisées avec la Q5® High-Fidelity DNA Polymerase. Les fragments *HHKIII_R*, *HPH_R* et *HHKIIIterm_R* sont attendus aux tailles respectives de ~ 6100, 1400 et 1000 pb.

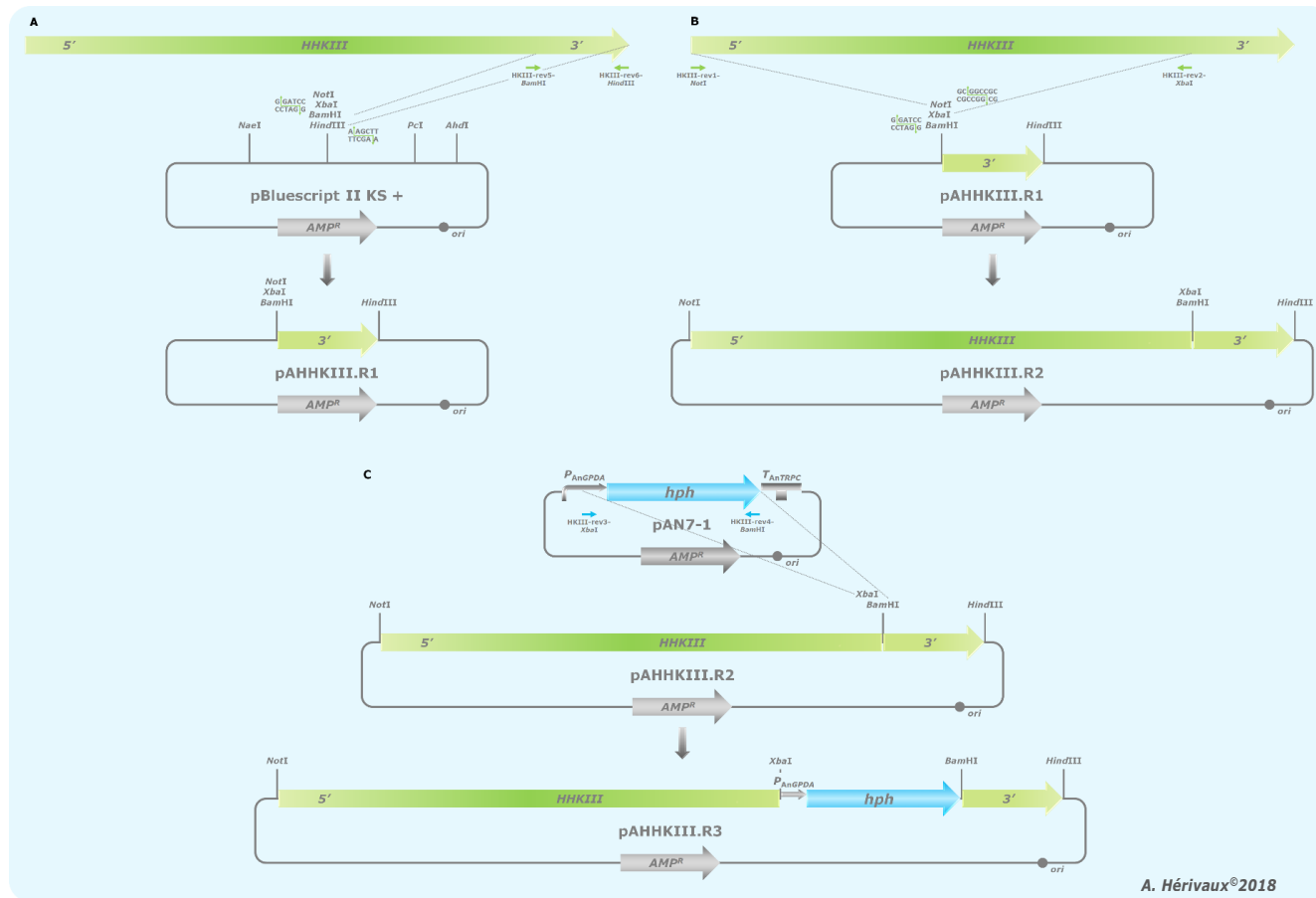


Figure 54. Construction de la cassette de complémentation AHHKIII.R dans le vecteur plasmidique pBluescript II KS +.

A. Le fragment $HHKIII_{term_R}$ a été amplifié à l'aide du couple d'amorces $HHKIII\text{-}rev5\text{-}BamHI/HHKIII\text{-}rev6\text{-}HindIII$ puis inséré au niveau des sites de restriction $BamHI$ et $HindIII$ du pKS. Les fragments pBluescript II KS + aboutissant au plasmide pAHHKIII.R1. **B.** Le fragment $HHKIII_Rbis$ a été amplifié à l'aide du couple d'amorces $HPHsm\text{-}R\text{-}pAN7/HPHsm\text{-}R\text{-}pAN7$ puis inséré au niveau des sites de restriction $NotI$ et $XbaI$ du pAHHKIII.R1 aboutissant au pAHHKIII.R2. **C.** La construction finale pAHHKIII.R3 (~ 11450 pb dont ~ 8550 pb correspondant à la cassette de complémentation AHHKIII.R) résulte de l'insertion de la cassette de résistance à l'hygromycine B optimisée du pAN7-1 (amorces $HKIII\text{-}rev3\text{-}XbaI$ et $HKIII\text{-}rev4\text{-}BamHI$, ~ 1600 pb) au niveau des sites $XbaI$ et $BamHI$ du pAHHKIII.R2.

marqueur de résistance vis-à-vis de l'HygB a potentiellement été excisé en 24 h. Seulement, ces spores ne se sont développées qu'après 72 h d'incubation dans le milieu d'induction. Ces clones, au nombre de 6, devront être validés par PCR et Southern blot.

Le système FLP semble donc fonctionnel chez *S. apiospermum* car une excision du marqueur de sélection a pu être observée dans toutes les souches AHSaHHKIII.2 validées précédemment par Southern blot. Le protocole d'induction de l'excision du marqueur de sélection devra cependant être optimisé puisque nous avons révélé un faible taux d'excision au cours de ces expérimentations préliminaires.

b) Construction de la cassette de complémentation

Le gène de résistance *hph* ayant été excisé, la stratégie de complémentation repose sur la construction d'une cassette contenant l'allèle sauvage du gène *HHKIII* et la cassette de sélection à l'HygB. Cette construction sera réalisée dans le vecteur pBluescript II KS + (pKS) qui présente l'avantage de posséder un site multiple de clonage (SMC) qui facilitera les manipulations moléculaires.

Les trois fragments qui constituent la cassette de complémentation du gène *HHKIII* ont été amplifiés par PCR conventionnelle en utilisant la Q5[®] High-Fidelity DNA Polymerase. En effet, il est conseillé d'utiliser cette polymérase processive pour l'amplification de grands fragments. De plus, s'agissant également d'une polymérase fidèle, la génération de mutations qui pourraient être délétères pour la stratégie de complémentation sera limitée. Le premier fragment correspondant à l'amplification du gène *HHKIII* sans son terminateur (*HHKIII_R*) mesure 6,1 kb. Le troisième fragment qui correspond lui au terminateur du gène *HHKIII* (*HHKIII_{term}_R*) ne mesure pourtant que 1 kb mais n'a pu être amplifié qu'avec cette polymérase. Le fragment central correspond à une version optimisée de la cassette de résistance à l'HygB (*HPH_R*) puisqu'elle ne mesure plus que 1,4 kb (**Figure 53**) (Lorang *et al.*, 2001). En effet, cette séquence a été amplifiée à partir du pCT74, gracieusement fourni par le Pr. Guillemette T. (IRHS, Université d'Angers), et se caractérise par l'absence de terminateur et d'une réduction de la taille de la séquence promotrice. Les amorces utilisées et la taille des amplicons attendue sont répertoriées dans le **Tableau III**.

Les fragments *HHKIII_R*, *HPH_R* et *HHKIII_{term}_R* ont été digérés par les couples d'endonucléases respectifs suivants, *NotI/XbaI*, *XbaI/BamHI* et *BamHI/HindIII*. Le fragment *HHKIII_{term}_R* a tout d'abord été inséré au niveau des sites *BamHI/HindIII* du pKS générant le pAHHKIII.R1. Ensuite, le fragment *HHKIII_R* a été introduit dans le pAHHKIII.R1 au niveau des sites enzymatiques *NotI* et *XbaI*, amenant au vecteur pAHHKIII.R2. Ces deux premiers fragments ont été insérés aisément dans le pKS (**Figure 54**).

En revanche, devant l'incapacité à cloner le fragment *HPH_R* dans le plasmide pAHHKIII.R2, ce fragment a été préalablement inséré dans le vecteur pGEM[®]-T Easy selon la stratégie du TA-cloning (**cf Partie II, 2. Matériels et méthodes**). Lorsque le couple enzymatique *XbaI/BamHI* a été employé, le fragment *HPH_R* n'a pas pu être excisé du plasmide pGEM[®]-T Easy. Cependant, le profil de migration indiquait une seule et unique bande correspondant à la taille du pGEM[®]-T Easy contenant le fragment

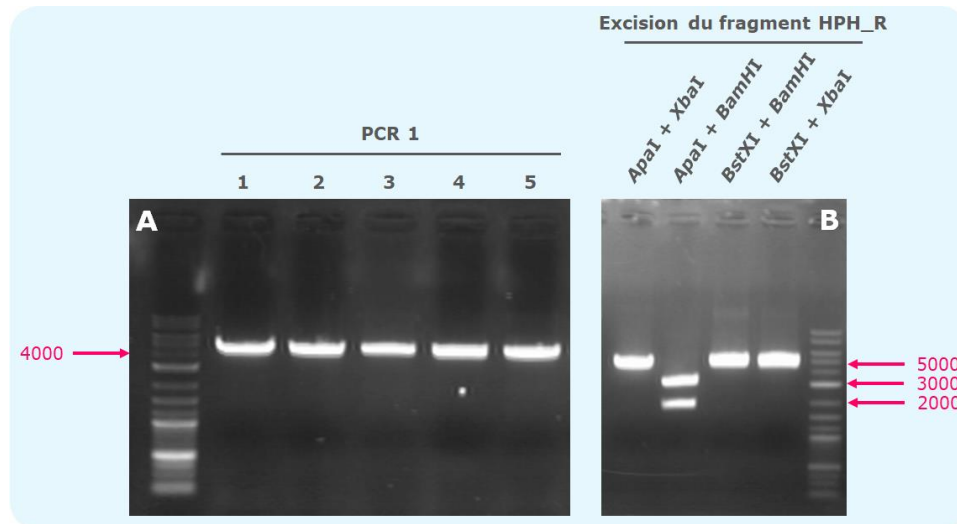


Figure 55. Excision du fragment HPH_R du pGEM[®]-T Easy.

A. Digestion du vecteur pGEM[®]-T Easy (~ 3000 pb) par les enzymes *XbaI* et *BamHI* pour exciser le fragment HPH_R (~ 1400 pb). Les minipréparations n° 1 à 5 sont digérées puisqu'une seule bande est visible après migration. Cette bande est > 4000 pb donc il semble bien que le plasmide ait intégré le fragment HPH_R mais que celui-ci n'a pas été excisé. **B.** Digestions de vérification de l'excision du fragment HPH_R du pGEM[®]-T Easy réalisées sur la minipréparation n°1. Deux bandes sont observées aux tailles attendues pour la digestion *ApaI/BamHI*, indiquant que le site *BamHI* est fonctionnel. En revanche, une seule bande est observée à environ 4500 pb pour les digestions en présence de l'enzyme *XbaI*, indiquant que ce site de restriction n'est pas fonctionnel puisque le fragment HPH_R n'a pas été excisé du plasmide.

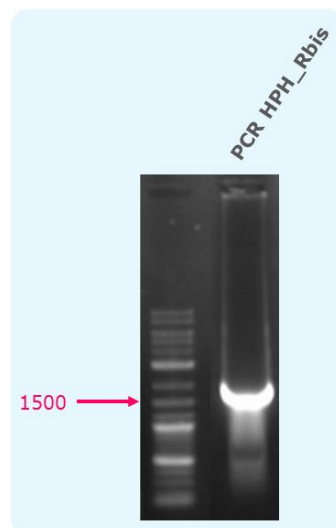


Figure 56. Amplification des fragments de PCR HPH_Rbis nécessaire à la construction de la cassette de complémentation du gène *HHKIII* par clonage dans la pBluescript II KS +.

Amplification réalisée avec la GoTaq[®] G2 Flexi DNA Polymerase. Le fragment HPH_Rbis est attendu à la taille de ~ 1600 pb.

Tableau XIV. Sensibilité des sites de restriction enzymatiques, utilisés au cours des différentes stratégies de clonage dans cette étude, aux méthylases bactériennes.

Enzyme	Site de restriction	Dam méthylase	Dcm méthylase
<i>Apa</i> I	GGGCC/C	-	X
<i>Avr</i> II	C/CTAGG	-	-
<i>Bam</i> HI	G/GATCC	-	-
<i>Bgl</i> II	A/GATCT	-	-
<i>Bst</i> EII	G/GTNACC	-	-
<i>Bst</i> XI	CCANNNNN/NTGG	-	X
<i>Cla</i> I	AT/CGAT	X	-
<i>Hind</i> III	A/AGCTT	-	-
<i>Kpn</i> I	GGTAC/C	-	-
<i>Nae</i> I	GCC/GGC	-	-
<i>Nde</i> I	CA/TATG	-	-
<i>Not</i> I	GC/GGCCGC	-	-
<i>Sbf</i> I	CCTGCA/GG	X	-
<i>Xba</i> I	T/CTAGA	-	-
<i>Xho</i> I	C/TCGAG	-	-

X : site de restriction enzymatique qui peut être méthylé par une méthylase bactérienne ; - : site de restriction enzymatique ne pouvant pas être méthylé par une méthylase bactérienne.

HPH_R (**Figure 55.A**). L'hypothèse dressée serait que l'un des sites enzymatiques du fragment de PCR ne soit pas fonctionnel, ce qui expliquerait l'incapacité à le cloner dans le pAHHKIII.R2. C'est pourquoi différentes digestions ont été réalisées et le résultat indique que le site enzymatique *Xba*I ne semble pas fonctionnel (**Figure 55.B**). Il est admis que certains sites de restriction peuvent être la cible de méthylases bactériennes (**Tableau XIV**). En effet, la cellule procaryote, telle que la cellule compétente *Escherichia coli* DH5 α , synthétise des méthyl-transférases qui transfèrent un groupement méthyl de la S-adénosylméthionine vers un résidu cytosine ou adénine. Ainsi, l'ADN bactérien est protégé de l'action d'endonucléases, par exemple, en induisant la méthylation de certains sites de restriction selon deux principaux mécanismes : i) la Dam-méthylation (régulée par le gène *dam*) qui induit la méthylation du carbone en position 6 de l'adénine dans la séquence 5' GATC 3' et ii) la Dcm-méthylation (régulée par le gène *dcm*) qui entraîne la méthylation du carbone en position 5 du deuxième résidu cytosine dans les séquences 5' CCAGG 3' et 5' CCTGG 3' (Marinus et Morris, 1972 ; Buryanov *et al.*, 1978 ; Geier et Modrich, 1979). Cependant, après analyse *in silico*, le site *Xba*I de notre construction ne semble pas sujet à la méthylation.

Malgré de nombreux essais de ligature du fragment HPH_R dans le pAHHKIII.R2, nous ne sommes pas parvenus à l'obtention du pAHHKIII.R3 correspondant à la cassette de complémentation finale du gène *HHKIII*. Comme indiqué ci-dessus, la séquence de la cassette de résistance à l'HygB du pCT74 n'ayant pas été séquencée, nous nous sommes orientés vers l'amplification de la cassette de sélection à l'HygB du pAN7-1, dont la séquence est parfaitement connue. La taille de cette cassette de sélection a été optimisée c'est-à-dire que comme dans le cas de la cassette de résistance à l'HygB du pCT74 nous avons réduit la séquence promotrice et éliminé le terminateur pour générer une cassette de 1,6 kb. Le fragment HPH_Rbis a été amplifié (HPHsm-F-pAN7/HPHsm-R-pAN7) par PCR conventionnelle à l'aide de la GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase en utilisant le pAN7-1 comme matrice (**Figure 56**). La prochaine étape consistera à insérer ce fragment après digestion par les enzymes *Xba*I et *Bam*HI dans le pAHHKIII.R2 au niveau de ces mêmes sites de restriction.

La cassette de complémentation du gène *HHKIII* n'a pas pu être finalisée. En effet, nous ne parvenons pas à cloner le fragment HPH_Rbis qui correspond à la cassette de sélection à l'HygB optimisée du pAN7-1. Cependant, les deux fragments correspondant au gène *HHKIII* ont été insérés dans le pKS. Ainsi, il est possible d'envisager la co-transformation des souches mutantes pour obtenir des souches complémentées avec le pAHHKIII.R2 en présence du pAN7-1 ou du pAN8-1.

c) Co-transformation de la cassette AHHKIII.R2 et du pAN8-1 dans la souche sauvage IHEM 14462

Devant l'incapacité à insérer le marqueur de sélection *hph* dans la cassette de complémentation, il apparaissait donc impossible de réaliser la transgénèse avec ce plasmide. En revanche, bien que jusqu'à présent la cassette de résistance à l'HygB n'ait pas été excisée du clone AHSaHHKIII.1.111A, il était possible d'envisager la co-transformation du pAHHKIII.R2 en présence du pAN8-1 qui renferme lui le marqueur de sélection *Shble*.

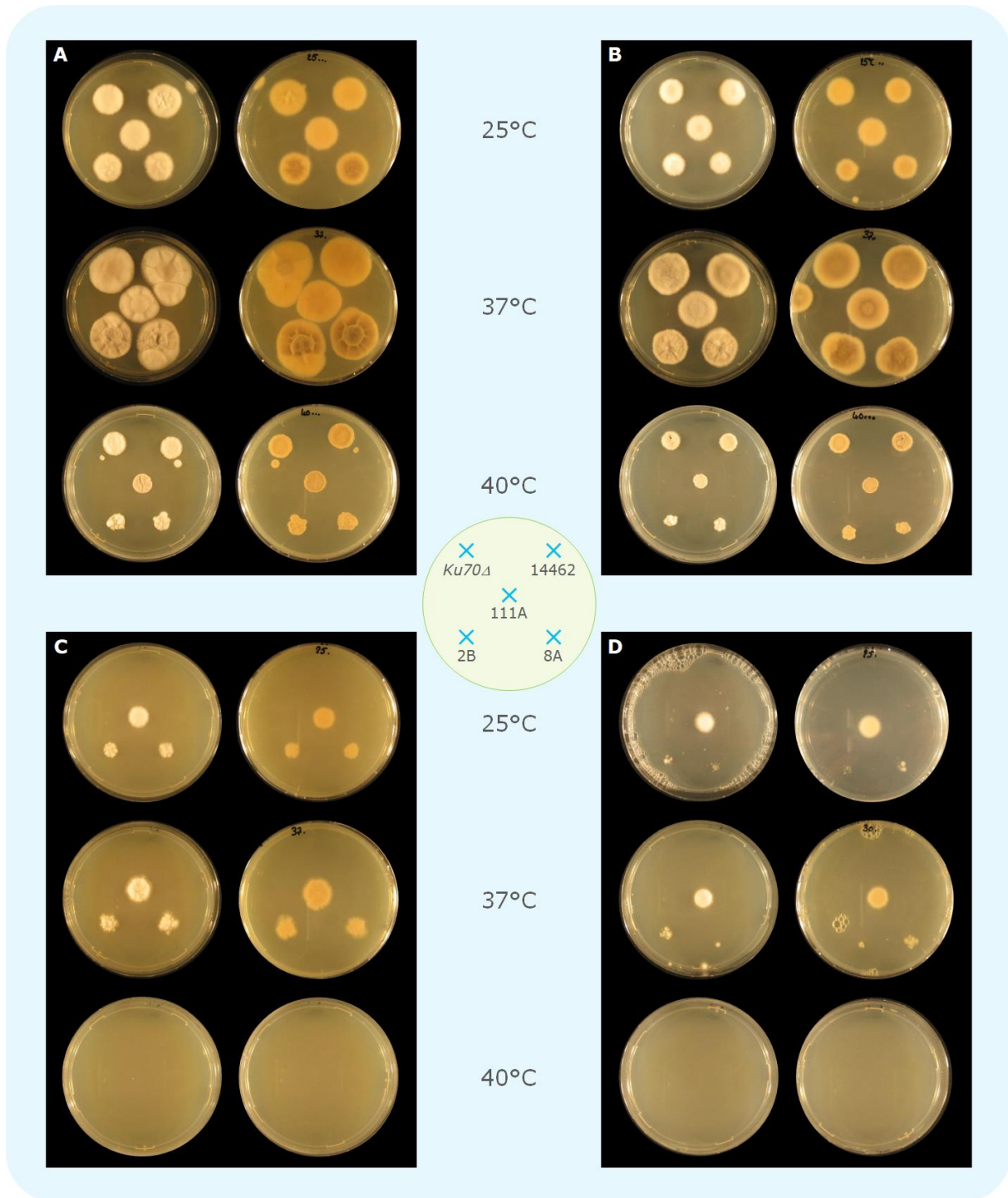


Figure 57. Etudes phénotypiques des mutants AHSaHHKIII : aspect macroscopique.

A. Croissance sur milieu YPDA, 7 jours. **B.** Croissance sur milieu PDA, 7 jours. **C.** Croissance sur milieu YPDA additionné d'hygromycine B ($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$), 7 jours. **D.** Croissance sur milieu PDA additionné d'hygromycine B ($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$), 7 jours.

PDA : Potato Dextrose Agar ; YPDA : Yeast Peptone Dextrose Agar.

Un essai préliminaire de transformation a permis la croissance d'une dizaine de clones présentant la capacité à se développer sur un milieu solide contenant à la fois 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ d'HygB et 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de Phleo. Ces premiers résultats sont encourageants car ils signifieraient que la cassette de résistance à l'HygB serait toujours présente tandis que la cassette de résistance à la Phleo aurait été intégrée lors de la transformation. Ces données nécessitent d'être validées par PCR puis par Southern blot. Pour le moment, aucun argument phénotypique ne nous permet d'affirmer que la cassette de complémentation a bien été intégrée dans le génome du clone AHSaHHKIII.1.111A.

Actuellement, la seule et unique stratégie de complémentation consiste à co-transformer le pAHHKIII.R2 avec le pAN8-1 dans le clone AHSaHHKIII.1.111A. D'autres stratégies peuvent s'offrir à nous si d'une part nous parvenons à construire totalement la cassette de complémentation du gène *HHKIII* et si d'autre part l'excision du marqueur de la souche mutante AHSaHHKIII.1.111A est obtenue. Si l'ensemble de ces éléments aboutissent nous pourrions donc envisager i) de co-transformer la souche AHSaHHKIII.1.111A excisée de son marqueur *hph* avec le pAN7-1 et le pAHHKIII.R2, ii) de transformer la souche AHSaHHKIII.1.111A excisée de son marqueur *hph* avec le pAHHKIII.R3, iii) de transformer les clones AHSaHHKIII.2 excisés de leur marqueur *hph* avec le pAHHKIII.R3 ou iv) de co-transformer ces souches avec le pAHHKIII.R2 et le pAN7-1.

5.2.4. Etudes phénotypiques préliminaires des mutants AHSaHHKIII

Bien que les souches complémentées n'aient pas encore été générées, nous avons mené des études phénotypiques préliminaires entre les souches parentales IHEM 14462, *ku70Δ* et leurs souches mutées respectives AHSaHHKIII.1.111A et AHSaHHKIII.2.2B, 8A.

a) Etude macroscopique

Les souches parentales aussi bien que les souches mutantes sont capables de se développer à 25°C, 37°C et 40°C sur les milieux YPDA et PDA. La température optimale de croissance pour l'ensemble des souches est de 37°C. La croissance semble légèrement ralentie à 25°C alors qu'elle l'est nettement à 40°C (**Figure 57**).

Des différences macroscopiques sont observées entre les souches mutantes et les souches sauvages. En effet, les mutants présentent plus d'aspérités à leur surface. Ils ont un aspect de cratère. Les colonies sont moins duveteuses et lisses. D'autre part, on observe que la présence d'HygB dans le milieu génère un phénotype morphologique chez nos souches mutantes (**Figure 57**).

Enfin, les études de suivi de croissance réalisées en parallèle n'ont pas montré de différence significative entre les souches sauvages et les souches mutantes (résultats non montrés).

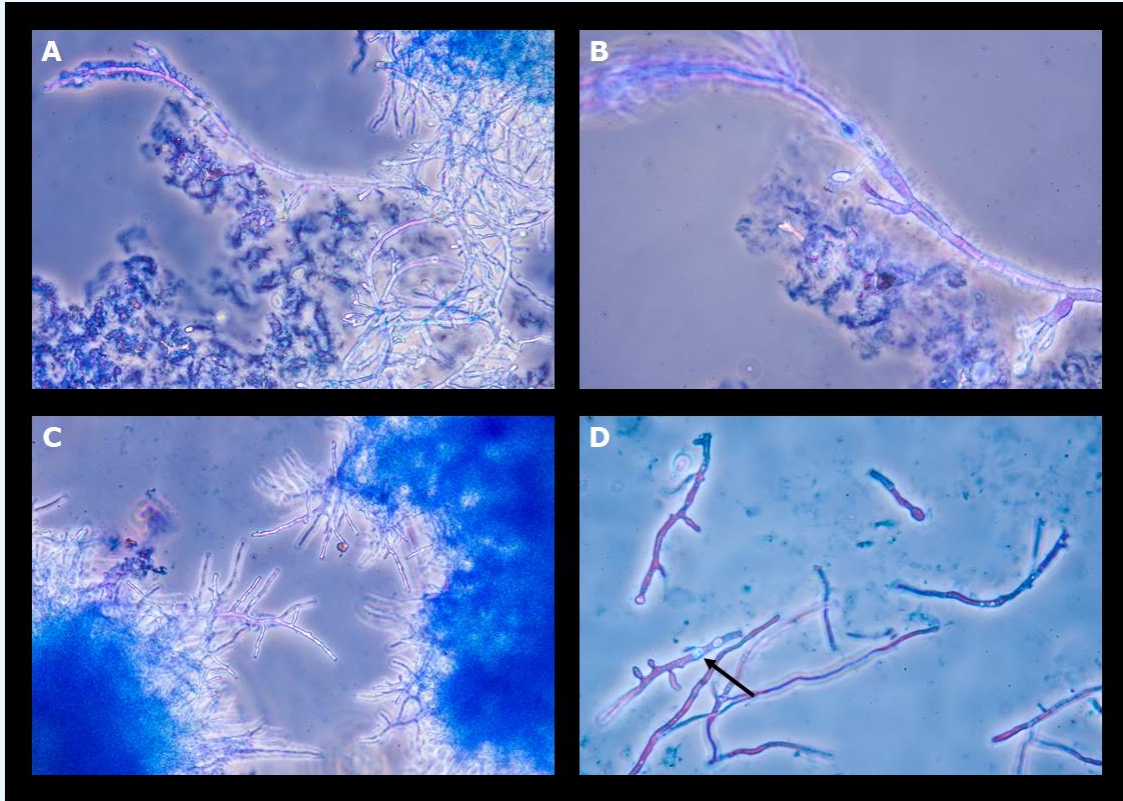


Figure 58. Etudes phénotypiques des mutants AHSaHHKIII : aspect microscopique.

Observations microscopiques réalisées au microscope à contraste de phase après coloration au bleu lactique. **A.** Souche sauvage IHEM 14462, objectif x20. **B.** Souche sauvage IHEM 14462, objectif x40. **C.** Souche mutante AHSaHHKIII.1.111A, objectif x20. **D.** Souche mutante AHSaHHKIII.1.111A, objectif x40. La flèche indique la présence de chlamydospores.

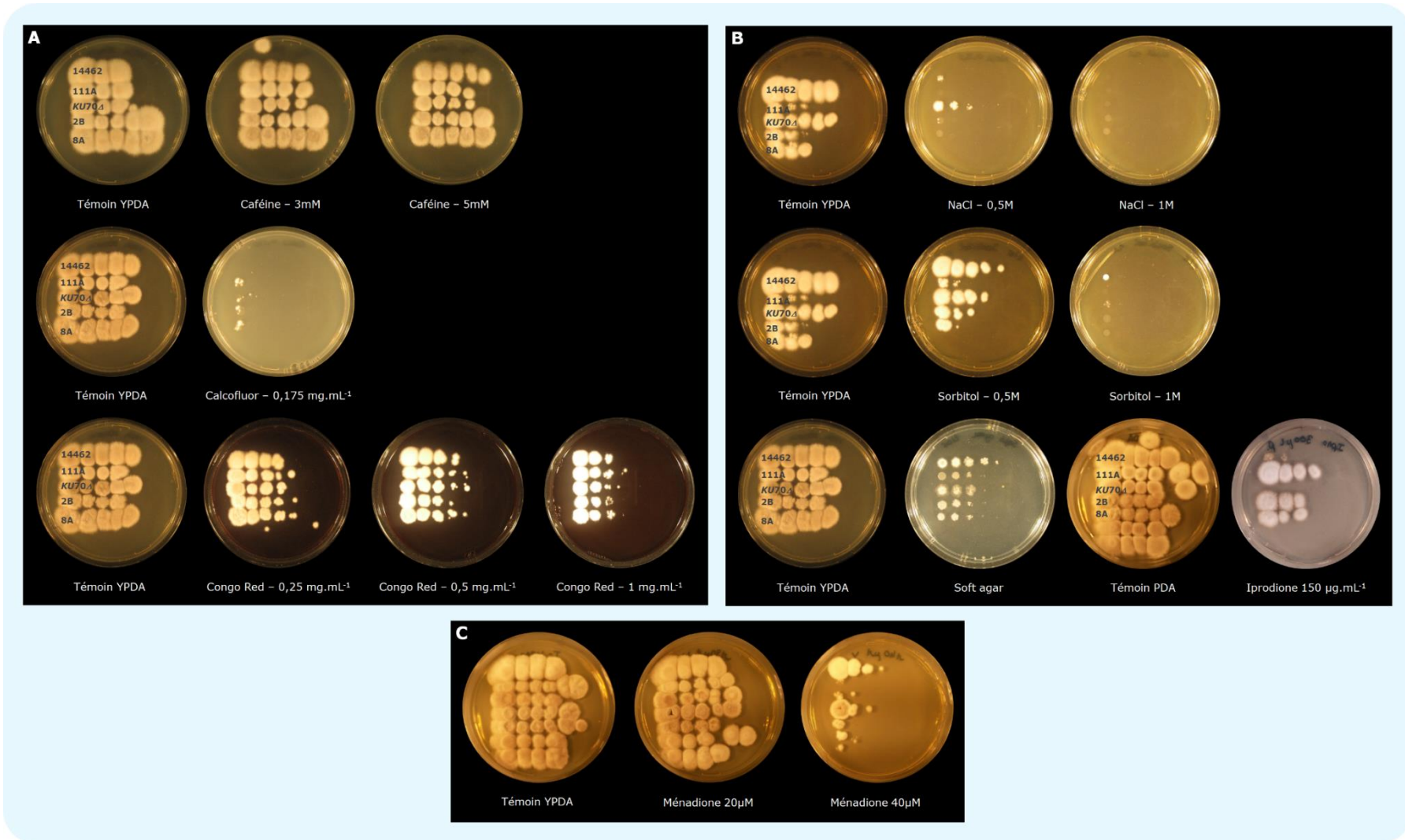


Figure 59. Etude phénotypique des mutants AHSaHHKIII : sensibilité aux stresses.

Résultats présentés après 7 jours de culture. **A.** Inhibiteurs de la paroi. **B.** Agents du stress osmotique. **C.** Agent du stress oxydatif.

b) Etude microscopique

Les différentes souches, après culture en milieu solide ou liquide, ont été observées au microscope. Aucune différence microscopique des filaments n'a été observée pour une même souche entre la culture sur milieu gélosé ou la culture en milieu liquide (résultats non présentés).

Cependant, des différences ont pu être mises en évidence concernant les souches mutantes lorsqu'elles ont été cultivées en présence d'HygB ou en absence de drogue (résultats non montrés). Usuellement, les clones mutants sont repiqués sur milieu gélosé avec $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ d'HygB afin de maintenir la pression de sélection. Il s'avère que lorsque les mutants sont cultivés sur le milieu de sélection, les filaments observés sont plus tortueux et courts. Il est également possible d'observer des chlamydospores, formes très rarement observée chez la souche sauvage de *S. apiospermum* (Figure 58). En l'absence d'HygB, les filaments mycéliens des souches mutantes sont semblables à ceux des souches sauvages.

c) Sensibilité aux stressés

Trois inhibiteurs de paroi ont été testés sur les spores des souches sauvages et des souches mutantes : la caféine, le calcofluor white et le congo red. Les souches ont présenté un comportement identique en présence de chacun des inhibiteurs (Figure 59.A).

La présence d'agents du stress osmotique tels que le chlorure de calcium, le sorbitol ou le milieu soft agar qui est un milieu hyperosmolaire utilisé lors de la transformation fongique a entraîné l'inhibition de la croissance des souches mutantes, indifféremment qu'elles aient été obtenues chez la souche IHEM 14462 ou la souche *ku70Δ*. Ces essais seraient à réitérer avec la souche complémentée puisque les boîtes contrôle indiquent un défaut de croissance des souches mutantes par rapport aux souches sauvages (Figure 59.B).

D'autre part, il semblerait que l'iprodione, un composé qui cible les HHKIII, inhibe clairement la croissance des deux souches sauvages par rapport à celle des souches mutées. De plus, la croissance de la souche *ku70Δ* semble plus affectée que celle de l'IHEM 14462 (Figure 59.B). Il est à noter que la sensibilité de la souche *S. apiospermum* IHEM 14462 à l'iprodione avait été testée en amont et celle-ci s'était révélée sensible à $150 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

L'agent du stress oxydatif qui a été testé est la ménadione. Le comportement des souches sauvages et mutantes n'a pas différencié en présence de ce composé (Figure 59.C).

La sensibilité des souches sauvages et mutantes vis-à-vis de divers antifongiques cliniques a été évaluée. Les antifongiques testés sont 4 molécules usuellement utilisées dans le traitement des infections fongiques à *S. apiospermum* : l'amphotéricine B, la capsofungine, le fluconazole et le voriconazole. Les résultats mettent en avant la différence de sensibilité des deux souches sauvages IHEM 14462 et *ku70Δ*. En effet, la souche IHEM 14462 semble légèrement plus sensible à l'amphotéricine B, au fluconazole et au voriconazole. Cependant, aucune différence de sensibilité aux antifongiques n'a été observée entre la souche sauvage et les souches mutantes correspondantes (résultats non présentés).

L'environnement pulmonaire des patients atteints de mucoviscidose est caractérisé par une hypoxie et un pH acide. C'est pourquoi il nous a semblé intéressant de tester la croissance de nos souches mutantes lors d'expérimentations *in vitro* en présence de 5% de dioxyde de carbone et plus ou moins d'acide lactique. La culture de nos différentes souches en présence de 5% de dioxyde de carbone n'a pas engendré de différences de croissance. La présence d'acide lactique dans le milieu additionné à un air contenant 5% de dioxyde de carbone n'a également pas généré de différences. Cependant, lorsque seul l'acide lactique a été ajouté au milieu, il semble que la croissance des souches IHEM 14462 et AHSaHHKIII.1.111A était légèrement inhibée par rapport aux souches issues de la *ku70Δ*. Les boîtes de culture dans lesquelles l'acide lactique a été ajouté ayant été contaminées, les résultats ne sont pas présentés.

Au niveau phénotypique, peu de différences ont été observées entre les souches sauvages réceptrices et les souches mutées pour le gène *HHKIII*. Toutefois, l'*HHKIII* semble jouer un rôle dans l'adaptation au stress osmotique.

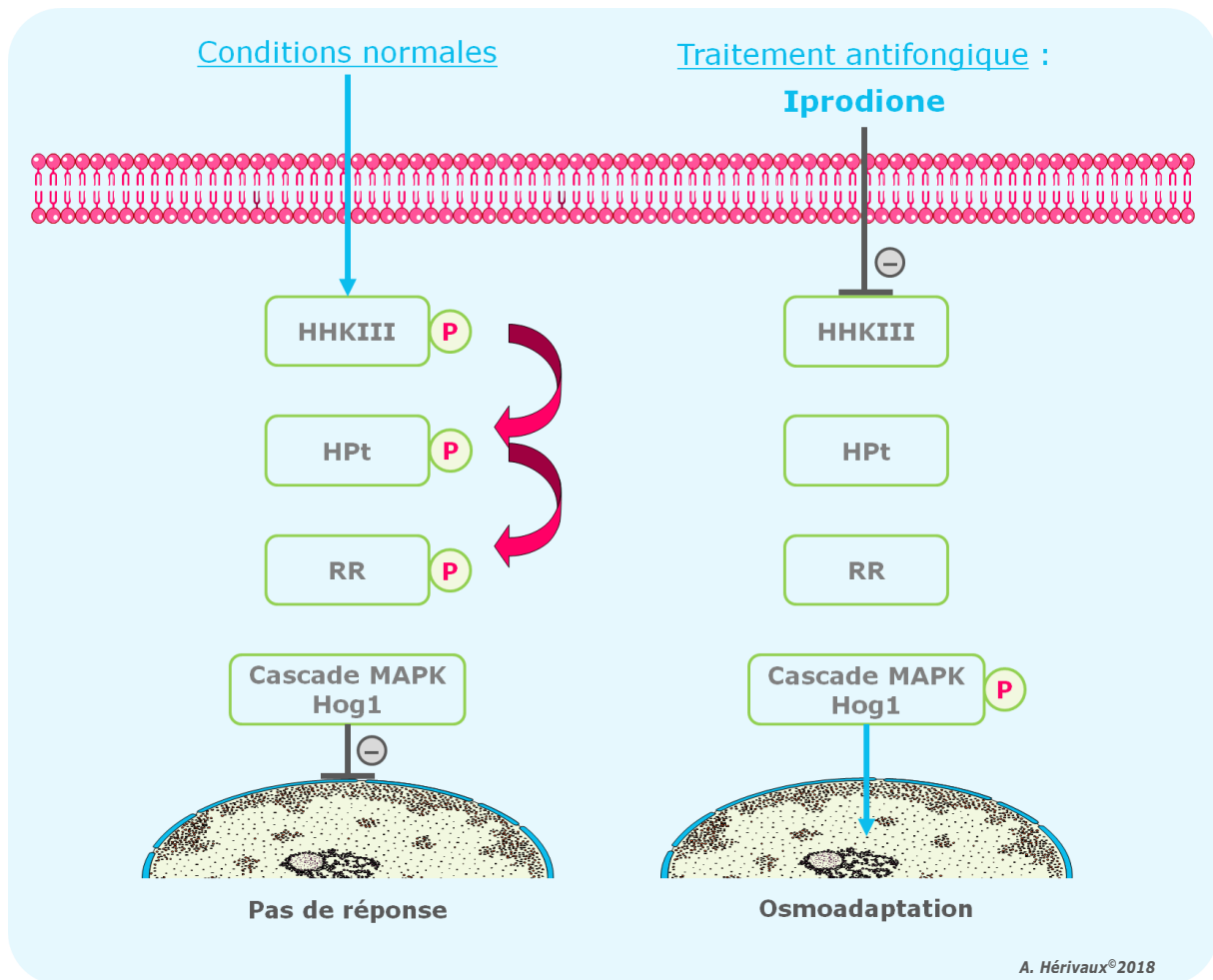
5.2.5. Discussion

Le développement d'outils génétiques en vue d'études fonctionnelles chez *S. apiospermum*, telles que l'élaboration de la souche *ku70Δ* et la validation du système de recyclage du marqueur de sélection FLP/FRT, nous ont permis de progresser dans notre capacité à générer les premières souches mutantes pour les gènes *HKs* chez cette espèce. La diversité génétique des souches mutantes nous permet à présent d'envisager à court terme différentes approches visant à obtenir une souche complétement. A cet effet, des clones transformants sont actuellement en cours de validation.

Dans l'attente de la complémentation du gène *HHKIII*, des études phénotypiques préliminaires ont été conduites en comparant la souche mutée et la souche sauvage. Les premiers résultats nous ont permis de mettre en évidence une différence de comportement entre souche sauvage et souche mutée lorsqu'un stress osmotique est appliqué.

Grâce à ces études phénotypiques préliminaires, les résultats obtenus chez *S. apiospermum* peuvent être comparés avec ceux obtenus précédemment chez d'autres champignons filamenteux. L'*HHKIII* est connue pour son rôle dans l'adaptation au stress osmotique chez de nombreuses espèces fongiques. Son implication dans d'autres processus physiologiques, telles que la morphogénèse, la germination ou encore la virulence du champignon, est également rapportée. De plus, elle semblerait également jouer un rôle, plus mineur, dans l'adaptation au stress oxydatif ou encore la production de mélanine (Defosse *et al.*, 2015 ; Hérivaux *et al.*, 2016).

Le phénotype qui est systématiquement observé lorsque le gène *HHKIII* est délété est une importante perturbation de la morphogénèse du champignon filamenteux (Defosse *et al.*, 2015), comme démontré chez *A. fumigatus* (McCormick *et al.*, 2012 ; Hagiwara *et al.*, 2013) et *Penicillium marneffeii* (Boyce *et al.*, 2011) qui sont des champignons pathogènes de l'Homme. Ce phénotype est également observé chez des espèces fongiques filamenteuses phytopathogènes comme *Alternaria longipes* (Luo *et*



A. Hérivaux®2018

Figure 60. Iprodione, protéine HHKIII et régulation de la voie HOG (pour *High Osmolarity Glycerol*) (Servier Medical Art).

Dans les conditions physiologiques normales, l'HHKIII est phosphorylée ce qui génère une cascade de phosphorylation entre les effecteurs du système à deux composants. La voie des MAPKs (pour Mitogen Activated Protein Kinases) est alors inhibée. Lorsque la molécule iprodione est présente dans l'environnement, elle cible l'HHKIII. L'inhibition de l'HHK régule positivement la voie des MAPKs. Ainsi, la voie HOG est activée entraînant une accumulation de glycérol et donc l'augmentation de la pression osmotique intracellulaire qui jusqu'à un certain niveau peut être délétère pour la cellule fongique.

al., 2012), *Botrytis cinerea* (Viaud *et al.*, 2006), *Fusarium oxysporum* (Rispaïl et Di Pietro, 2010) ou entomopathogènes comme *M. robertsii* (Zhou *et al.*, 2012). Cependant, de telles perturbations morphologiques n'ont pas été observées chez les mutants HHKIII dans notre modèle.

De plus, seul un agent oxydant a été testé sur nos souches, la ménadione, et aucune différence n'a pu être mise en évidence. Il pourrait être intéressant d'élargir cette étude à d'autres agents inducteurs de stress oxydatif comme le peroxyde d'hydrogène par exemple. En effet, plusieurs études ont démontré l'implication de l'HHKIII dans l'adaptation au stress oxydatif (ex. *F. oxysporum* (Rispaïl et Di Pietro, 2010), *M. robertsii* (Zhou *et al.*, 2012), *P. marnefeii* (Boyce *et al.*, 2011), *Sclerotinia sclerotiorum* (Duan *et al.*, 2013).

En outre, un phénotype nous est clairement apparu, et qui est également décrit chez la majorité des champignons filamenteux étudiés, il s'agit de la résistance de la souche mutante vis-à-vis de l'iprodione. L'iprodione est un composé qui appartient à la famille des dicarboximides et qui cible les HHKs de classe III. Pour rappel, les HHKIII sont impliquées dans la réponse au stress osmotique et de ce fait dans le contrôle de la voie HOG. D'une manière générale, il est observé que lorsque la voie HOG est activée, il s'en suit une hyperproduction de glycérol et par conséquent une augmentation de la pression osmotique dans la cellule fongique, ce qui peut jusqu'à un certain point entraîner la mort cellulaire. Il est aujourd'hui admis que l'iprodione inhibe l'HHKIII et que cette inhibition régule positivement la voie des MAPKs (pour *Mitogen-Activated Protein Kinases*) (Figure 60) (Zhang *et al.*, 2002 ; Kojima *et al.*, 2004 ; Motoyama *et al.*, 2005 ; Yoshimi *et al.*, 2005 ; Noguchi *et al.*, 2007). Ainsi, des études ont été menées sur de nombreux modèles fongiques et ont permis de démontrer que la délétion du gène *HHKIII* était à l'origine de la résistance à l'iprodione.

Le panel de phénotypes observés, liés à la délétion du gène *HHKIII*, se révèle moins large que ce qui était attendu, en se basant sur les études précédentes menées chez d'autres espèces fongiques filamenteuses. Cependant, l'analyse phénotypique présentée ici n'est que préliminaire et l'obtention de la souche complémentée nous conduira inévitablement à élargir l'étude en développant par exemple des évaluations de virulence chez le rat.

5.3. Caractérisation fonctionnelle du gène *HHKX*

Le second gène *HHK* qui semble jouer un rôle important dans la virulence et l'adaptation aux stress chez les champignons pathogènes code la protéine *HHKX* (Defosse *et al.*, 2015 ; Hérivaux *et al.*, 2016). C'est ainsi qu'en parallèle de l'étude de l'HHKIII, nous avons également souhaité étudier l'HHKX de *S. apiospermum*.

5.3.1. Délétion du gène *HHKX* dans la souche *S. apiospermum ku70Δ*

Les cassettes de délétion AHHKX.1 et AHHKX.F ayant toutes les deux été construites, des essais de transformation sur *S. apiospermum ku70Δ* ont été réalisés avec ces deux constructions. Pour rappel, la cassette AHHKX.1, contrairement à la cassette AHHKX.F, contient le système de recyclage FLP/FRT.

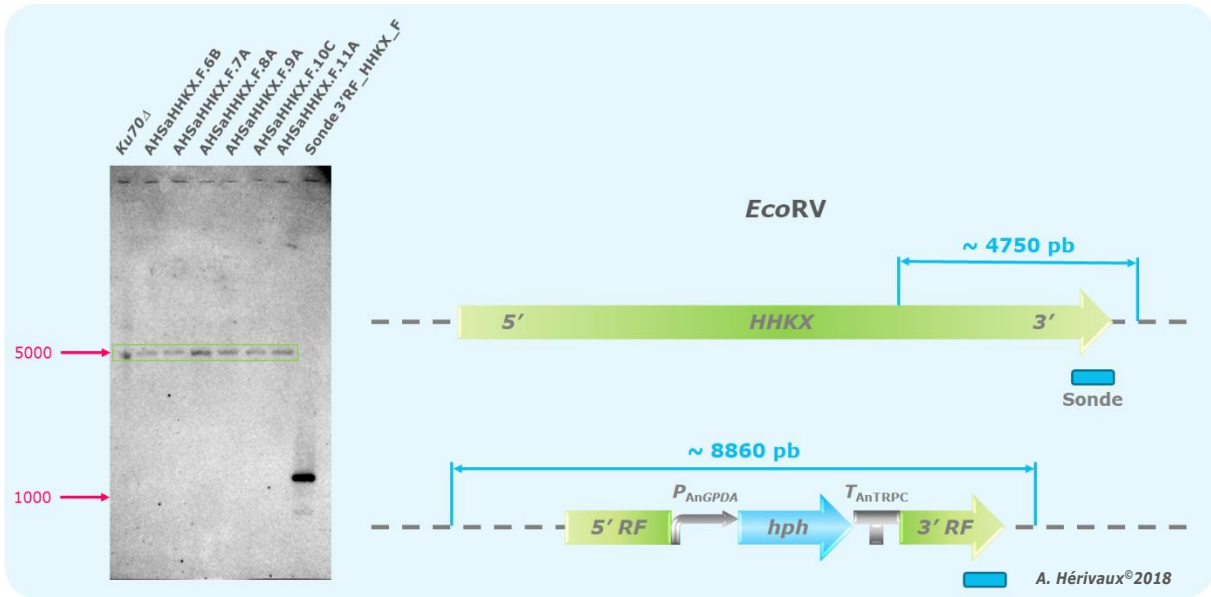


Figure 61. Caractérisation moléculaire des transformants AHSaHHKX.F par Southern blot.

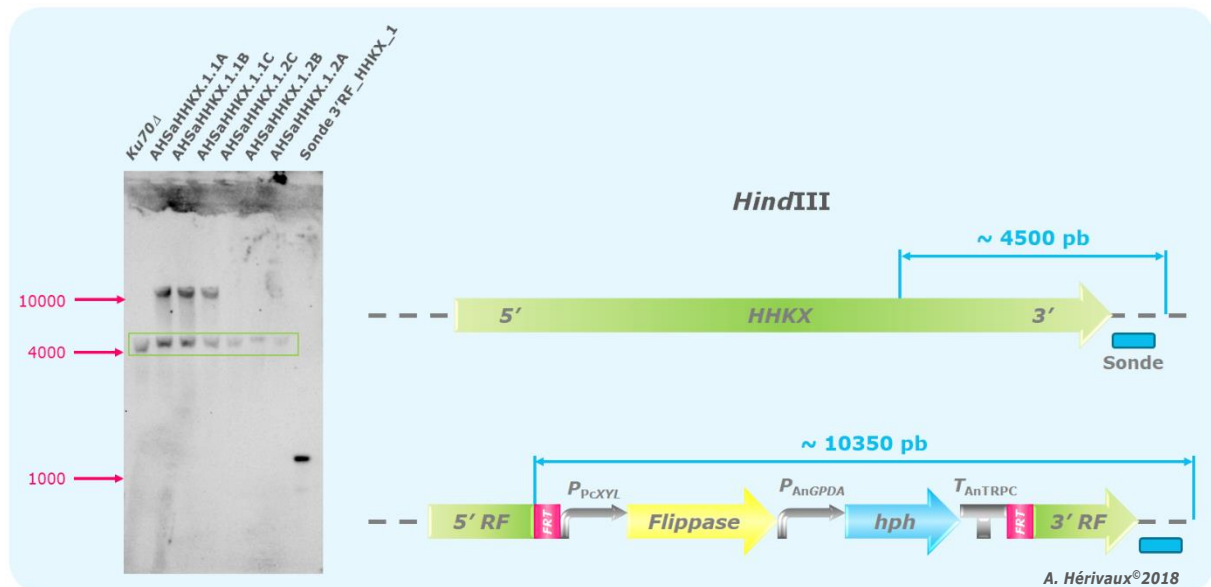


Figure 62. Caractérisation moléculaire des transformants AHSaHHKX.1 par Southern blot.

a) Transformation

Dans le cas de l'*HHKX*, la première cassette de délétion dont nous avons disposé était l'*AHHKX.F* obtenue par PCR fusion. Les premiers essais de transgénèse du champignon pour l'*HHKX* ont donc été réalisés avec cette cassette. Trois essais de transformation ont permis d'obtenir au total 11 transformants, annotés *AHSaHHKX.F* de 1 à 11.

Dans un second temps, la souche réceptrice *S. apiospermum ku70Δ* a été transformée à l'aide de la cassette de délétion *AHHKX.1* générée dans le pPV189. Contrairement à la cassette précédente, de nombreux essais ont été menés avant de réussir à obtenir 2 transformants annotés *AHSaHHKX.1*. Ces clones ont été obtenus suite à l'augmentation de la quantité initiale de 5 µg d'ADN mis au contact des protoplastes lors de la transgénèse. De plus, il est essentiel de rappeler ici que la cassette *AHHKX.1* est une cassette de grande taille de 8,25 kb incluse dans le pPV189 ce qui génère un plasmide de 11,15 kb contrairement à la cassette *AHHKX.F* qui comprend elle 5,8 kb. La taille de la cassette de délétion, comme suggéré pour l'*HHKIII*, semble donc réellement impacter le taux de transformation.

Les deux cassettes de délétion du gène *HHKX* nous ont permis de générer des clones transformants. Ces différents clones doivent à présent être analysés au niveau moléculaire avant d'entreprendre des tests phénotypiques.

b) Caractérisation moléculaire des transformants par Southern blot

L'ensemble des transformants obtenus suite à la transgénèse des deux cassettes *AHHKX* dans le génome de notre champignon ont été analysés directement par Southern blot.

Tous les transformants *AHSaHHKX.F* présentent un polymorphisme de restriction identique à celui de la souche sauvage puisqu'une seule bande correspondant à la taille de l'allèle sauvage est observé (**Figure 61**). Les clones *AHSaHHKX.1* possèdent systématiquement l'allèle sauvage. Seuls les transformants *AHSaHHKX.1.1* semblent posséder l'allèle mutant ce qui signifierait que la cassette de délétion s'est intégrée dans le génome du champignon mais probablement à un locus différent de celui du gène *HHKX* (**Figure 62**). Aucune souche mutante n'a donc été générée pour le gène *HHKX*.

Les clones qui ne présentent que l'allèle sauvage sont plus difficilement interprétables. Ils pourraient correspondre à des mutants spontanés résistants à l'*HygB*. C'est pourquoi des PCR ont été réalisées sur l'ADN génomique de ces transformants afin de statuer sur l'absence ou la présence du gène *hph* dans leur génome (amorces HPH-F et 3'RP-HKX-*Bst*XIbis). Aucun fragment n'a été amplifié (résultats non présentés). Il semblerait donc que le gène *hph* n'ait pas été intégré dans ces clones résistants à l'*HygB*. Cette observation peut fournir une première explication. La seconde hypothèse nous amenant à expliquer cette incapacité à déléter le gène *HHKX* consiste à envisager qu'il s'agisse d'un gène essentiel donc indispensable à la survie du champignon.

Tableau XV. Amorces utilisées pour le développement des cassettes de délétion des gènes *HHKV*, *VI*, *VIII* et *XI_1*.

Amorce sens	Séquence 5' → 3'	Tm (°C)	Amorce anti-sens	Séquence 5' → 3'	Tm (°C)	Taille des amplicons (pb)	Amplicons
Construction de la cassette de délétion HHKV							
Clonage dans le pPV189 → pAHHKV.1							
HKV-5'F- <i>Cl</i> I	CCATCGATCTCCCTGTCTGTCTGATAGAGAG	62	HKV-5'R- <i>Hind</i> III	CCCAGCTTTACGCTATTGGTCGGCATGTTAAGA	64	1005	5'RF_HHKV_1
HKV-3'F- <i>Not</i> I	ATAAGAATGCGGCCGATACTCCGAAGGGAGGAGAATCCAT	69	HKV-3'R- <i>Bst</i> XI	ATGCATCCACCGCGGTGGGAAAAAGCGAAGATCAGAAAAACC	69,5	1000	3'RF_HHKV_1
Clonage dans le pAN7-1 → pAHHKV.7							
5'FP-HKV- <i>Bgl</i> II	GAGAGATCTCCGTATAAGACCGAGAAATGCACTG	61	5'RP-HKV- <i>Bst</i> EII	CGGTCACCCACCGGCATATTACATCGAGAAGTC	65	1075	5'RF_HHKV_7
3'FP-HKV- <i>Nae</i> I	GCGCAAAGCGGCCATACTCCCAAGGGAGGAGAATCCAT	70	3'RP-HKV- <i>Hind</i> III	CCCAGCTTGAAAAAGCGAAGATCAGAAAAACC	63	1000	3'RF_HHKV_7
Construction de la cassette délétion HHKVI							
Clonage dans le pPV189 → pAHHKVI.1							
HKVI-5'F- <i>Cl</i> I	CCATCGATCGGATCAAATCTAGCTGTGGTACTA	62	HKVI-5'R- <i>Hind</i> III	CCCAGCTTACTTTTTGAGGTGCAGCAACAAGA	64	820	5'RF_HHKVI_1
HKVI-5'F- <i>Cl</i> Ibis	CCATCGATGGATCAAATCTAGCTGTGGTACTA	60					5'RF_HHKVI_1bis
HKVI-3'F- <i>Not</i> I	ATAAGAATGCGGCCGCTTGTCGAGGACACGACTACGGACAG	70	HKVI-3'R- <i>Bst</i> XI	ATGCATCCACCGCGGTGGCCTGGCCATAATGCACCTAGATCT	71	940	3'RF_HHKVI_1
Construction de la cassette délétion HHKVIII							
Clonage dans le pPV189 → pAHHKVIII.1							
HKVIII-5'F- <i>Bst</i> XI	ATGCATCCACCGCGGTGGGGATAATGGGATAGGGTGATCAA	71	HKVIII-5'R- <i>Not</i> I	ATAAGAATGCGGCCGCTTGGCGAAGCTAGGTGACTTGGAGG	70	1115	5'RF_HHKVIII_1
HKVIII-3'F- <i>Hind</i> III	CCCAGCTTGTGGATATCAGGAGGATATTCGAA	61	HKVIII-3'R- <i>Cl</i> I	CCATCGATACAATACTCCTCTCTACTTCAGC	60,5	1080	3'RF_HHKVIII_1
HKVIII-3'F- <i>Hind</i> IIIbis	GCGCAAAGCTTATAGTTCTCCTCTGATGTTATGC	63	HKVIII-3'R- <i>Cl</i> Ibis	GCGCAAATCGATGATCGTCATGAACCTCAAGAAATC	63	1080	3'RF_HHKVIII_1bis
Construction de la cassette délétion HHKXI.1							
Clonage dans le pPV189 → pAHHKXI_1.1							
HKXI.1-5'F- <i>Bst</i> XI	ATGCATCCACCGCGGTGTACAGAAACAGTGATTGATCATCC	69	HKXI.1-5'R- <i>Not</i> I	ATAAGAATGCGGCCGCTTTATGTAAGGAGGAGCGCCTATA	66	1140	3'RF_HHKXI_1
HKXI.1-3'F- <i>Hind</i> III	CCCAGCTTCAGTGACTACCGAAAAACACAATGTA	63	HKXI.1-3'R- <i>Cl</i> I	CCATCGATCTTCTAAGGCTACCGTCTGCTG	63	830	3'RF_HHKXI_1
			HKXI.1-3'R- <i>Cl</i> Ibis	CCATCGATTCTAAGGCTACCGTCTGCTG	62		3'RF_HHKXI_1bis
Clonage dans le pAN7-1 → pAHHKXI_1.7							
5'FP-HKXI.1- <i>Bgl</i> II	GAGAGATCTCCGTCTTGGCTGGAACTTA	63,5	5'RP-HKXI.1- <i>Bst</i> EII	CGGTCACCGTCTAGACCCCTCAGCGCATGTACG	68	1130	5'RF_HHKXI_7
3'FP-HKXI.1- <i>Xba</i> I	GCTCTAGAACCCATCCACTCCGCAAGAAT	64	3'RP-HKXI.1- <i>Sbf</i> I	GCGCAAACCTGCAGGGCCCTATGAGACAGACGTTTTGCT	71	1095	3'RF_HHKXI_7

ATCG : adaptateur ; **ATCG** : site de restriction enzymatique ; ATCG : séquence de l'ADN à amplifier.

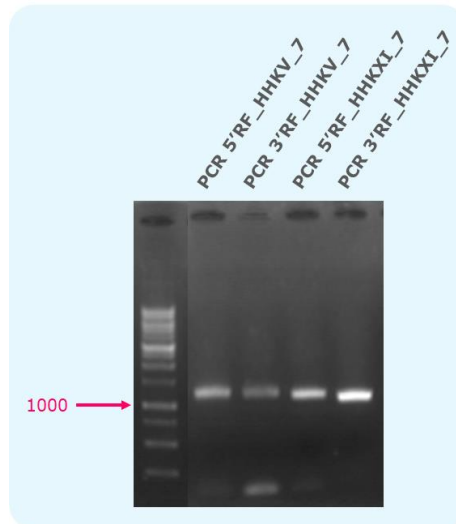


Figure 63. Amplification des fragments 5'RF et 3'RF des gènes *HHKV*, *HHKVI*, *HHKVIII* et *HHKXI_1* nécessaires à la construction des cassettes de délétion *AHHKV.7*, *AHHKVI.7*, *AHHKVIII.7* et *AHHKXI_1.7* par clonage dans le plasmide pAN7-1.

L'ensemble des fragments, mesurant de 1000 à 1150 pb, ont été amplifié par PCR conventionnelle à l'aide de la GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase.

5.4. Caractérisation fonctionnelle des autres gènes *HHKs*

L'objectif principal de cette étude étant l'invalidation de l'ensemble des gènes codant une *HHK* chez *S. apiospermum*, nous nous sommes également intéressés à mi-parcours de la thèse aux quatre autres classes identifiées chez cette espèce : l'*HHKV*, *VI*, *VIII* et *XI_1*.

5.4.1. Construction des cassettes de délétion

Au départ, notre objectif consistait à étudier en priorité les *HHKIII* et *HHKX* puisque ces deux classes de protéines étaient déjà décrites comme impliquées dans la virulence des champignons pathogènes. Cependant, devant la difficulté à obtenir les cassettes de délétion pour ces deux protéines, nous avons initié en parallèle la construction des cassettes de délétion *HHKV* et *HHKXI* car peu d'informations bibliographiques sont disponibles actuellement sur ces deux classes d'*HHKs* chez les espèces fongiques. Il serait donc intéressant de pouvoir les caractériser chez notre modèle *S. apiospermum*. De même pour l'*HHKVI* et l'*HHKVIII*, bien que la littérature décrive plus largement ces deux classes d'*HHKs*, il serait intéressant de les caractériser chez *S. apiospermum*.

Forts des expériences menées pour la construction des cassettes de délétion des gènes *HHKIII* et *HHKX*, la construction des cassettes de délétion ciblant les autres gènes *HHKs* s'est articulée autour de deux stratégies distinctes.

Chronologiquement, au moment de l'élaboration des quatre nouvelles cassettes de délétions *AHHKV.1*, *AHHKVI.1*, *AHHKVIII.1* et *AHHKXI_1*, la souche *ku70Δ* était validée c'est-à-dire que le marqueur de sélection *Phleo* ne pouvait plus être utilisé pour la délétion des gènes *HHKs*. Le système *FLP/FRT* n'était cependant pas mis au point. De plus, la transgénèse du gène *HHKIII* dans la souche sauvage *IHEM 14462* s'était révélée difficile puisque la majorité des transformants obtenus n'avait pas intégré la cassette au locus cible. En conclusion, pour l'*HHKV* et l'*HHKXI_1* uniquement, la stratégie initiale consistait à générer une cassette de délétion à l'aide du *pAN7-1* qui contient le gène de résistance *hph* (sans système de recyclage) et de l'introduire dans la souche *ku70Δ* pour favoriser la recombinaison homologe au locus cible. Dans l'éventualité où le système *FLP* ne permettrait pas d'exciser le gène *hph*, nous avons envisagé d'expérimenter à travers ces nouvelles constructions moléculaires un second système de recyclage de gènes, le β -*Rec/six*.

a) Clonage dans le *pAN7-1*

Les RF 5' et 3' de chaque gène ont été amplifiées par PCR conventionnelle. L'ensemble des amorces utilisées sont répertoriées dans les **Tableau XV (Figure 63)**.

Les extrémités de l'amplicon *5'RF_HHKV_7* ont été digérées par le couple d'enzymes *BglII* et *BstEII* puis clonées au niveau des mêmes sites de restriction dans le *pAN7-1*. Ensuite, les extrémités de la partie *3'RF_HHKV_7* ont été digérées par les enzymes *NaeI* et *HindIII* puis insérées au niveau des sites *NaeI* et *HindIII* du *pAN7-1*. Le plasmide *pAHHKV.7* ainsi obtenu contient donc la cassette de délétion *AHHKV.7* incluant le gène de résistance à l'*HygB* (*hph*). Les extrémités du fragment *3'RF_HHKXI_7* ont été digérées

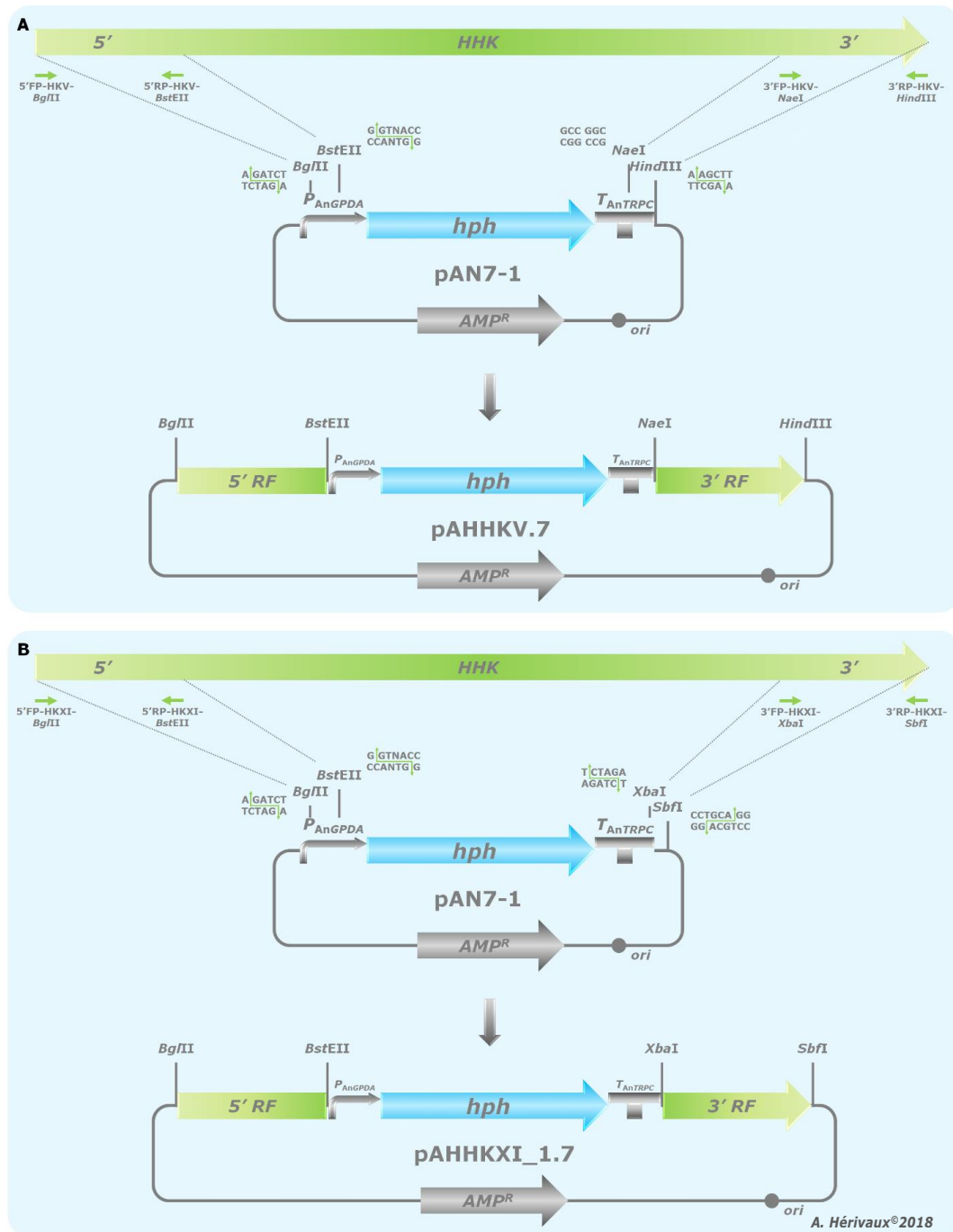


Figure 64. Construction des cassettes de délétion AHHKV.1 et AHHKXI_1.1 dans le vecteur plasmidique pAN7-1.

A. Le fragment 5'RF_HHKV_7 a été amplifié à l'aide du couple d'amorces 5'FP-HHKV-BglII/5'RP-HHKV-BstEII puis inséré au niveau des sites de restriction BglII et BstEII du pAN7-1. Le fragment 3'RF_HHKV_7 a été amplifié par les amorces 3'FP-HHKV-NaeI et 3'RP-HHKV-HindIII puis inséré dans le pAN7-1 au niveau des sites de restriction NaeI et HindIII. Le plasmide pAHHKV.7 (~ 8450 pb) ainsi généré contient la cassette de délétion AHHKV.7 (~ 5650 pb). **B.** Le fragment 5'RF_HHKXI_7 a été amplifié à l'aide du couple d'amorces 5'FP-HHKXI-BglII/5'RP-HHKXI-BstEII puis inséré au niveau des sites de restriction BglII et BstEII du pAN7-1. Le fragment 3'RF_HHKXI_7 a été amplifié par les amorces 3'FP-HHKXI-XbaI et 3'RP-HHKXI-SbfI puis inséré dans le pAN7-1 au niveau des sites de restriction XbaI et SbfI. Le plasmide pAHHKXI_1.7 (~ 8700 pb) ainsi généré contient la cassette de délétion AHHKXI_1.7 (~ 5900 pb).

par le couple d'enzymes *Xba*I et *Sbf*I puis clonées au niveau des mêmes sites de restriction dans le pAN7-1. Ensuite, les extrémités de la partie 5'RF_HHKXI_7 ont été digérées par les enzymes *Bgl*II et *Bst*EII puis insérées au niveau des sites *Bgl*II et *Bst*EII du pAN7-1. Le plasmide pAHHKXI_1.7 ainsi obtenu contient donc la cassette de délétion AHHKXI_1.7 incluant le gène de résistance à l'HygB (*hph*) (Figure 64).

Remarques. Cette stratégie de construction a rapidement été abandonnée puisque nous ne sommes pas parvenus à insérer les différents fragments permettant de générer les cassettes de délétion AHHKV.7 et AHHKXI_1.7 dans le vecteur plasmidique pAN7-1. Aucune explication plausible n'a pu être avancée. Entre-temps, la recombinaison FLP/FRT ayant été validée chez nos mutants AHSaHHKIII.2, nous sommes donc rapidement orientés vers la construction des cassettes de délétion dans le pPV189.

b) Clonage dans le pPV189

Une fois le système FLP-recombinaison validé chez plusieurs mutants générés dans le laboratoire, dont le mutant *HHKIIIΔ*, la seconde stratégie pour la construction de nos cassettes de délétion a été basée sur l'utilisation du pPV189. Pour rappel, ce plasmide renferme le système FLP-recombinaison qui est sous le contrôle de son promoteur inductible au xylose, le P_{PcXYL} , et entouré de part et d'autre par deux séquences FRT. Le marqueur de sélection est le gène *hph* qui provient à l'origine du pAN7-1 (Punt et al., 1987).

La taille des gènes *HHKs* de *S. apiospermum* IHEM 14462 étant relativement grande et devant la difficulté à obtenir la cassette de complémentation pour l'*HHKIII*, nous avons optimisé au maximum l'élaboration de nos amorces en nous plaçant seulement 30 pb en amont de la séquence codante des gènes et 100 pb en aval. Les RF 5' et 3' de chaque gène ont été amplifiées par PCR conventionnelle (Figure 65). L'ensemble des amorces utilisées et la taille des amplicons sont répertoriés dans le Tableau XV.

Les extrémités du fragment PCR 3'RF_HHKV_1 ont été digérées par le couple d'enzymes *Not*I et *Bst*XI puis clonées au niveau des sites *Not*I et *Bst*XI du pPV189. Dans un second temps, les extrémités de l'amplicon 5'RF_HHKV_1 ont été digérées par les endonucléases *Cla*I et *Hind*III puis insérées au niveau des sites *Cla*I et *Hind*III du pPV189. Le plasmide pAHHKV.1 ainsi obtenu contient donc la cassette de délétion AHHKV.1 incluant le gène de résistance à l'HygB (*hph*) et le système de recyclage FLP/FRT (Figures 66 et 67).

Par la même approche, les extrémités du fragment 5'RF_HHKVI_1 ont été digérées par le couple d'enzymes *Cla*I et *Hind*III puis clonées au niveau des mêmes sites de restriction dans le pPV189. Ensuite, les extrémités de la partie 3'RF_HHKVI_1 ont été digérées par les enzymes *Not*I et *Bst*XI puis insérées au niveau des sites *Bst*XI et *Not*I du pPV189. Le plasmide pAHHKVI.1 ainsi obtenu contient donc la cassette de délétion AHHKVI.1 incluant le gène de résistance à l'HygB (*hph*) et le système de recyclage FLP/FRT (Figures 66 et 67).

Concernant la construction des cassettes d'inactivation ciblant les gènes *HHKVIII* et *HHKXI_1*, les extrémités des fragments de PCR 3'RF_HHKVIII_1 et 3'RF_HHKXI_1 ont été digérées par le couple d'enzymes *Cla*I et *Hind*III puis clonées au niveau des mêmes sites de restriction dans le pPV189. Ensuite, les extrémités des PCR 5'RF_HHKVIII_1 et 5'RF_HHKXI_1 ont été digérées par les enzymes *Not*I et *Bst*XI

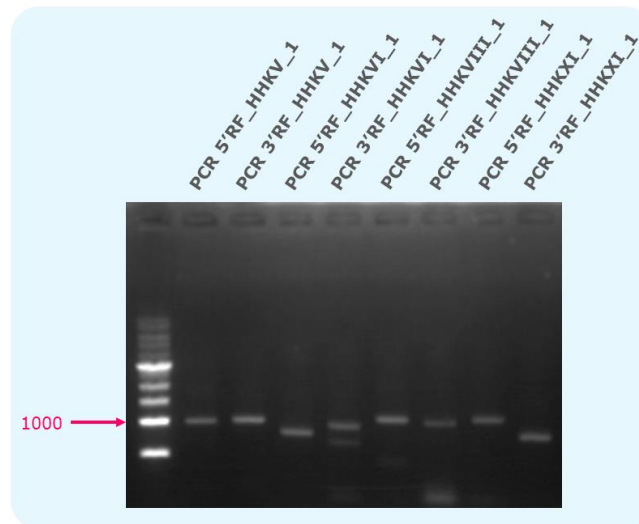


Figure 65. Amplification des fragments 5'RF et 3'RF des gènes *HHKV*, *HHKVI*, *HHKVIII* et *HHKXI_1* nécessaires à la construction des cassettes de délétion *AHHKV.1*, *AHHKVI.1*, *AHHKVIII.1* et *AHHKXI_1.1* par clonage dans le pPV189.

L'ensemble des fragments, mesurant de 800 à 1100 pb, ont été amplifié par PCR conventionnelle à l'aide de la GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase.

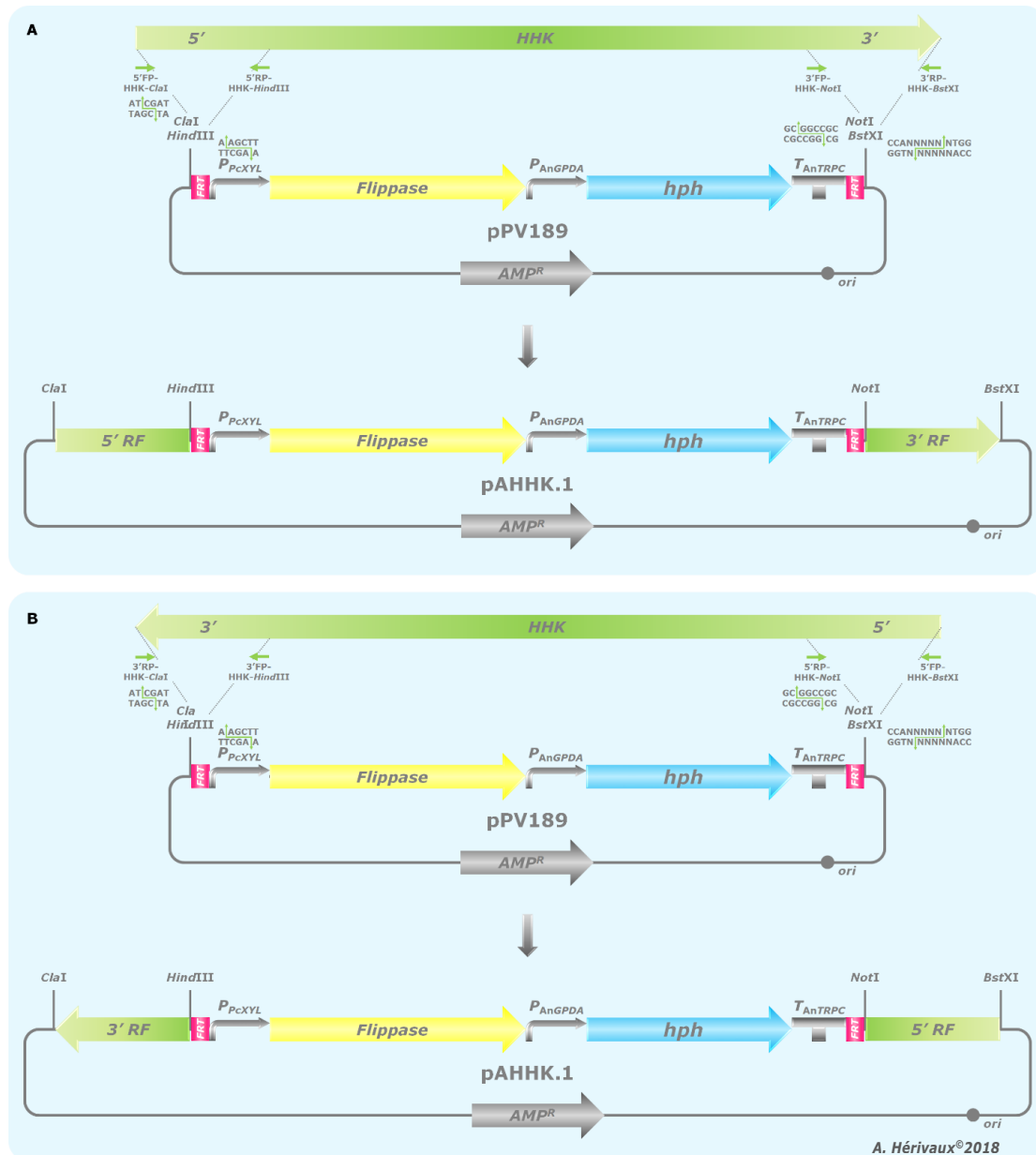


Figure 66. Construction des cassettes de délétion AHHKV.1, AHHKVI.1, AHHKVIII.1 et AHHKX.1 dans le vecteur plasmidique pPV189.

A. Les fragments 5'RF_HHKV_1 et 5'RF_HHKVI_1 ont été amplifiés à l'aide du couple d'amorces 5'FP-HK-ClaI/5'RP-HK-HindIII puis insérés au niveau des sites de restriction ClaI et HindIII du pPV189. Les fragments 3'RF_HHKV_1 et 3'RF_HHKVI_1 ont été amplifiés par les amorces 3'FP-HK-NotI et 3'RP-HK-BstXI puis insérés dans le pPV189 au niveau des sites de restriction NotI et BstXI. Les plasmides pAHHKV.1 (~ 11500 pb) et pAHHKVI.1 (~ 11300 pb) ainsi générés contiennent les cassettes de délétion AHHKV.1 (~ 8600 pb) et AHHKVI.1 (~ 8400 pb), respectivement. **B.** Les fragments 5'RF_HHKVIII_1 et 5'RF_HHKXI_1 ont été amplifiés à l'aide du couple d'amorces 5'FP-HK-BstXI/5'RP-HK-NotI puis insérés au niveau des sites de restriction BstXI et NotI du pPV189. Le fragment 3'RF_HHKVIII_1 et 3'RF_HHKVIII_1 ont été amplifiés par les amorces 3'FP-HK-HindIII et 3'RP-HK-ClaI puis insérés dans le pPV189 au niveau des sites de restriction HindIII et ClaI. Le plasmide pAHHKVIII.1 (~ 11700 pb) et pAHHKXI.1 (~ 11500 pb) ainsi générés contiennent les cassettes de délétion AHHKVIII.1 (~ 8800 pb) et AHHKXI.1 (~ 8600 pb), respectivement.

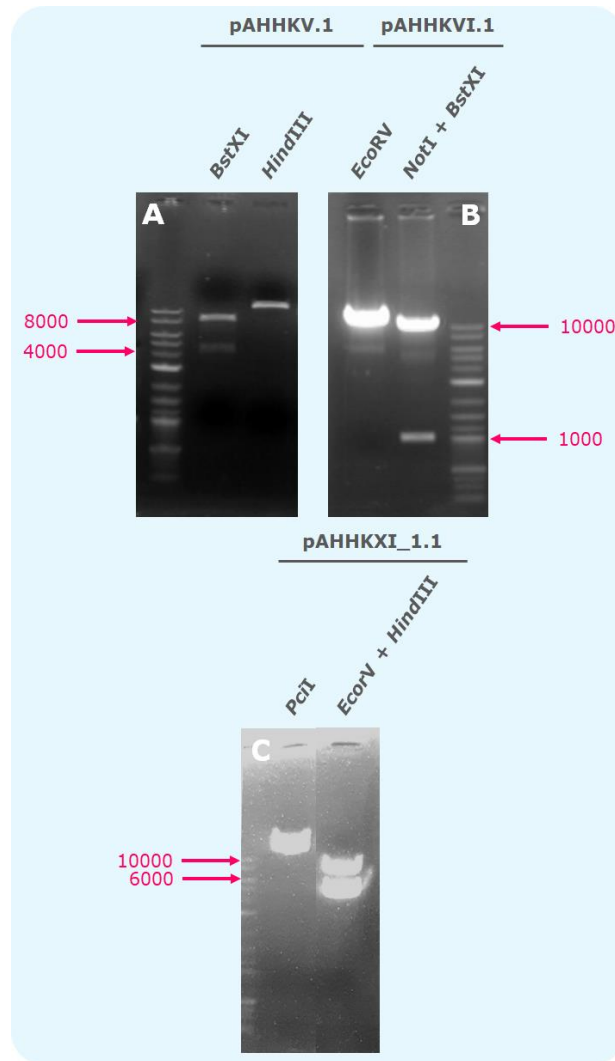


Figure 67. Vérification des constructions plasmidiques pAHHKV.1, pAHHKVI.1, pAHHKVIII.1 et pAHHKXI_.1.

A. Le plasmide pAHHKV.1 a été validé après digestion par différentes enzymes de restriction. Les profils de digestion attendus en fonction des enzymes sont les suivants : BstXI : ~ 7800, 3750 pb, HindIII : ~ 11500 pb. **B.** Le plasmide pAHHKVI.1 a été validé après digestion par différentes enzymes de restriction. Les profils de digestion attendus en fonction des enzymes sont les suivants : EcoRV : ~ 11300 pb, NotI/BstXI : ~ 10300 et 950 pb. **C.** Le plasmide pAHHKXI_1.1 a été validé après digestion par différentes enzymes de restriction. Les profils de digestion attendus en fonction des enzymes sont les suivants : PciI : ~ 11500 pb, EcoRV/HindIII : ~ 7400 et 4100 pb.

puis insérées au niveau des sites *Bst*XI et *Not*I du pPV189. Les plasmides pAHHKVIII.1 et pAHHKXI_1.1 ainsi obtenus contiennent donc la cassette de délétion AHHKVIII.1 et AHHKXI_1.1 respectivement (incluant le gène de résistance à l'HygB) et le système de recyclage FLP/*FRT* (Figures 66 et 67).

Ainsi, les cassettes de délétion ont été obtenues pour l'ensemble des gènes *HHKs*, à l'exception de l'*HHKVIII* qui est actuellement encore en cours d'élaboration. Elles renferment toutes le gène de résistance *hph*, sous le contrôle du *PAnGPDA* et du *TAnTRPC*, ainsi que le système de recyclage FLP.

5.4.2. Délétion des autres gènes *HHKs* dans la souche sauvage *S. apiospermum ku70Δ*

Lorsque les cassettes de délétion AHHKV.1, AHHKVI.1 et AHHKXI_1.1 ont été obtenues, des mutants *HHKIIIΔ* avaient été validés dans la souche *ku70Δ* de *S. apiospermum*. C'est ainsi que la transgénèse des différentes cassettes de délétion a été réalisée directement dans cette souche réceptrice.

a) Transformation

Les plasmides contenant les cassettes de délétion AHHKV.1, AHHKVI.1 et AHHKXI_1.1 ont tout d'abord été linéarisés par les enzymes *Cla*I, *Pci*I et *Pci*I, respectivement. Des clones transformants ont été obtenus pour l'ensemble des cassettes de délétion testées. Cependant, ces nouvelles souches n'ont pas été obtenues dès le premier essai de transgénèse. Il s'est avéré que la quantité initiale d'ADN (5 µg) mis au contact des protoplastes n'était pas suffisante. Nous avons donc ensuite utilisé 10 µg de plasmide digéré par expérience de transformation.

Une trentaine de transformants ont été repiqués à partir de la boîte de transformation de l'HHKV. Six de ces clones ont été conservés pour la suite de l'étude. Concernant les autres *HHKs*, 3 transformants ont été obtenus pour l'HHKVI et 2 pour l'HHKXI_1.

b) Caractérisation moléculaires des transformants par Southern blot

Les Southern blot des clones transformants pour lesquels le gène *HHKV*, *HHKVI* ou *HHKXI_1* ont potentiellement été délétés sont en cours de réalisation afin de pouvoir les valider et les étudier par la suite au niveau phénotypique.

c) Conclusion

L'obtention de ces nouveaux transformants AHSaHHKV.1, AHSaHHKVI.1 et AHSaHHKXI_1.1 est plus qu'encourageant. En effet, une seule cassette est manquante pour permettre l'invalidation du dernier gène *HHK* (*HHKVIII*) de *S. apiospermum* (en ne tenant pas compte des deux dernières séquences *HHKIV* et *HHKXI_2* récemment identifiées). A présent il est essentiel d'obtenir les Southern blot afin de pouvoir valider l'insertion homologue au locus ciblé des différentes cassettes de délétion et pouvoir ensuite construire les souches complémentées afin de caractériser au niveau phénotypique ces nouveaux mutants.

Partie III

Développement d'outils moléculaires adaptés à *Scedosporium apiospermum*

1. Introduction générale

Le génome de *S. apiospermum* IHEM 14462 n'étant disponible que depuis quelques années, les outils moléculaires dédiés à cette espèce fongique sont aujourd'hui peu nombreux au laboratoire. En effet, à l'heure actuelle, seule la méthode de transgénése par choc thermique de protoplastes et le système de recyclage de gènes basé sur le système FLP/FRT sont utilisés chez notre modèle fongique. De plus, la caractérisation fonctionnelle des gènes *HHKs* de *S. apiospermum* s'est révélée compliquée, notamment i) par la difficulté à insérer les cassettes de délétion dans le génome de *S. apiospermum* au locus donné, malgré l'absence du gène *ku70* dans la souche réceptrice récemment obtenue et ii) la lenteur de la croissance du champignon qui nécessite 1 semaine pour la souche sauvage et jusqu'à 4 semaines pour les transformants (en fonction de l'HHK ciblée).

C'est pourquoi, en parallèle de la caractérisation fonctionnelle des gènes *HHKs*, nous avons porté une partie de nos efforts sur le développement d'outils moléculaires adaptés à *S. apiospermum*. La particularité de ces outils sera la présence de nombreux sites de restriction qui borderont à la fois les séquences promotrices et terminatrices ainsi que les gènes à exprimer. Il sera donc possible d'évoluer sous forme de « modules » ou « briques » moléculaires et de pouvoir modifier à loisir les fragments présents dans ces constructions. De ce fait, lorsque les outils moléculaires auront été validés chez *S. apiospermum*, il sera envisagé de tester leur potentiel chez d'autres espèces appartenant au genre *Scedosporium*.

Le premier outil que nous avons souhaité développer est un système d'expression incluant comme gène rapporteur une séquence codant une protéine fluorescente de couleur verte (GFP) afin d'envisager de futures études de localisation cellulaire des HHKs dans notre modèle. Le second outil, dont le projet de développement a fait l'objet d'un financement par l'association « Vaincre La Mucoviscidose » et l'association « Grégory Lemarchal », correspond à un système d'expression qui cette fois contient un gène codant une luciférase (LUC) dans le but de développer l'imagerie de bioluminescence (IBL) de notre agent infectieux. Cet outil permettrait à terme un suivi non invasif et en temps réel de l'infection *in vivo* par *S. apiospermum*.

2. Cassette de fluorescence

Jusqu'à ce jour, la localisation subcellulaire des différentes classes d'HHKs est peu détaillée. L'essentiel des travaux menés sur cette thématique, plus communément chez les bactéries, relate la localisation membranaire des HHKs qui possèdent des hélices hydrophobes transmembranaires dans leur partie N-terminale (Ouchane et Kaplan, 1999 ; Boyd, 2000 ; Sciochetti *et al.*, 2002; Scheu *et al.*, 2008 ; Hao *et al.*, 2009 ; Kimura *et al.*, 2009 ; Wayne *et al.*, 2010 ; Héricourt *et al.*, 2013 ; Foureau *et al.*, 2014 ; Devi *et al.*, 2015). Quelques études, principalement conduites chez *Caulobacter crescentus*, décrivent des HHKs cytoplasmiques (Calera *et al.*, 1998 ; Jacobs *et al.*, 1999 ; Wheeler et Shapiro, 1999 ; Gao *et al.*, 2003 ; Hallez *et al.*, 2007 ; Angelastro *et al.*, 2010 ; Iniesta *et al.*, 2010 ; Mignolet *et al.*, 2010 ; Caesar *et al.*, 2011 ; Foureau *et al.*, 2014). Ainsi, dans la perspective d'étudier la localisation subcellulaire

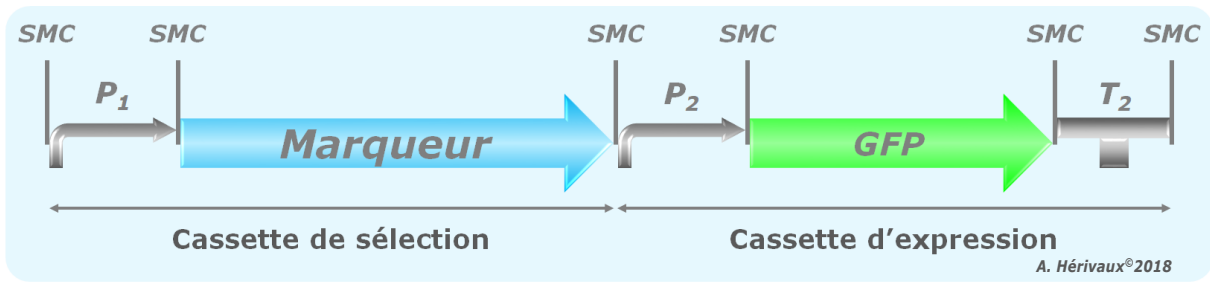


Figure 68. Schématisation de la cassette de fluorescence.

GFP : Green Fluorescent Protein ; P_1 : séquence promotrice 1 ; P_2 : séquence promotrice 2 ; SMC : site multiple de clonage ; T_2 : séquence terminatrice 2.

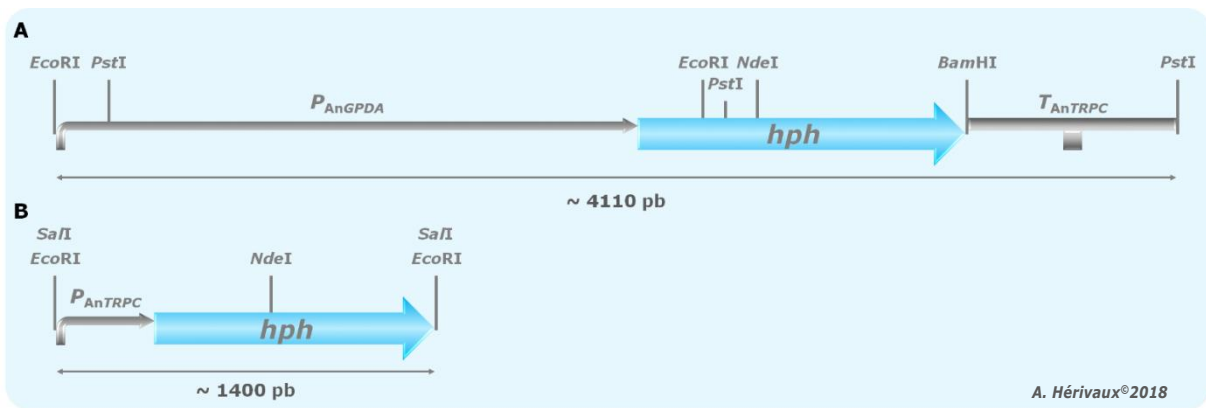


Figure 69. Optimisation de la taille de la cassette de sélection à l'hygromycine B.

A. Cassette de sélection à l'hygromycine B (~ 4,11 kb) disponible dans le vecteur pAN7-1 (Punt et al., 1987). Cette cassette se compose du promoteur P_{AnGPDA} (~ 2,13 kb), du gène *hph* (~ 1,2 kb) et du terminateur T_{AnTRPC} (~ 760 pb).

B. Cassette de sélection à l'hygromycine B optimisée (~ 1,4 kb) disponible dans le vecteur pCT74 (Caroll et al., 1994 ; Lorang et al., 2001). Cette cassette se caractérise par une séquence promotrice P_{AnTRPC} réduite (~ 200 pb), une séquence *hph* (~ 1,2 kb) dépourvue de certains sites de restriction initiaux et l'absence de séquence terminatrice.

hph : gène de résistance à l'hygromycine B ; P_{AnGPDA} : promoteur du gène Glycéraldéhyde-3-Phosphate Déshydrogénase d'*Aspergillus nidulans* ; P_{AnTRPC} : promoteur du gène TRPC d'*Aspergillus nidulans* impliqué dans la voie de biosynthèse du tryptophane ; T_{AnTRPC} : terminateur du gène TRPC d'*Aspergillus nidulans*.

des HHKs chez *S. apiospermum*, il nous a semblé intéressant de développer un système d'expression de protéines fusionnées à la GFP.

2.1. Introduction

La structure de base que nous souhaitons élaborer pour ce système d'expression de protéines fusionnées à la GFP se compose de deux modules principaux : i) une cassette de sélection qui contient un marqueur de sélection et ii) une cassette d'expression incluant un gène codant une protéine fluorescente (**Figure 68**). Suite à l'intégration de la cassette de fluorescence dans le génome de *S. apiospermum*, les souches transformées seront sélectionnées grâce au marqueur de résistance à l'HygB et la localisation subcellulaire de la protéine de fusion HHK-GFP pourra alors être étudiée.

2.2. Pré-requis

Certains pré-requis à l'élaboration d'un système moléculaire sont essentiels. Nous avons pu suggérer dans les parties précédentes que l'intégration d'une construction moléculaire dans le génome d'un organisme sera d'autant plus aisée qu'elle sera de petite taille. D'autre part, l'expression des gènes composant la construction doit être sous la dépendance de séquences promotrices et terminatrices s'exprimant constitutivement et fortement. Il apparaît ainsi impératif que ces séquences soient adaptées à l'organisme dans lequel on souhaite réaliser le transfert de cette cassette.

2.2.1. Optimisation de la taille de la cassette de sélection

Pour rappel, le seul marqueur de sélection pouvant encore être utilisé dans notre souche IHEM 14462 au cours des essais de transgénèse est le marqueur de résistance à l'HygB, le gène *hph*. Jusqu'à présent, nous disposons uniquement de la cassette de sélection à l'HygB issue du pAN7-1 ([Punt et al., 1987](#)). Cette grande cassette de 4,11 kb se compose du gène *hph* (1,2 kb) encadré par la très longue séquence promotrice P_{AnGPD}A (2,13 kb) et la séquence terminatrice T_{AnTRPC} (0,76 kb) (**Figure 69**).

Les travaux de [Carroll et al.](#) ont permis d'optimiser la cassette de sélection à l'HygB ([1994](#)). Tout d'abord, la séquence terminatrice T_{AnTRPC} a été éliminée, l'absence du terminateur n'affectant pas l'expression du gène *hph*. Ensuite, la taille de la séquence promotrice P_{AnTRPC} a été réduite de sorte que la cassette de sélection finale mesure environ 1,4 kb. Enfin, plusieurs sites de restriction fréquemment employés en ingénierie moléculaire ont été éliminés de la séquence de la cassette (*Bam*HI, *Cla*I, *Eco*RI, et *Pst*I) (**Figure 69**).

2.2.2. Choix de la séquence promotrice de la cassette d'expression

Dans le but d'assurer une expression forte de la GFP dont la séquence codante est insérée dans le plasmide d'expression, il était essentiel d'identifier un promoteur constitutif à fort taux d'expression.

Dans un premier temps, nous nous sommes orientés vers les promoteurs des gènes de l'actine (P_{ACT1}) et du facteur d'élongation de la traduction (P_{TEF1}) puisqu'il est admis que ces deux gènes s'expriment

fortement chez de nombreux champignons filamenteux. En revanche, ces séquences ne pouvaient pas provenir du génome de notre souche pour éviter une recombinaison au locus *ACT1* ou *TEF1* suite à la transgénése.

C'est pourquoi, nous avons recherché ces deux promoteurs dans le génome d'un champignon phylogénétiquement proche de *S. apiospermum*, *Scopulariopsis brevicaulis*, et dont le génome venait d'être séquencé. Cependant, nous avons rencontré quelques difficultés puisque les données déposées étaient encore brutes, et l'annotation du génome de la souche LF580 de *S. brevicaulis* n'était pas encore disponible à cette époque. De ce fait, avec l'aide du Dr. Dugé de Bernonville T. (EA2106, Université de Tours), nous avons dû au préalable annoter ce génome à partir des données brutes obtenues après le séquençage de la souche, gracieusement fournies par le Pr. Kempken F. (Kumar et al., 2015). Le génome de *S. brevicaulis* a ensuite été comparé aux séquences P_{ACT1} et P_{TEF1} bien connues de *S. cerevisiae*. Une fois les deux gènes *ACT1* et *TEF1* de *S. brevicaulis* identifiés par homologie des séquences, nous avons essayé d'identifier les séquences promotrices de ces deux gènes. Nous avons au final conclu qu'il était très compliqué de prédire avec certitude le positionnement des séquences introniques et surtout le codon d'initiation de la traduction ATG pour ces deux gènes. Nous avons de ce fait interrompu cette stratégie.

Nous nous sommes finalement orientés vers l'exploration du potentiel d'un troisième promoteur : le P_{TOXA} . Le gène *TOXA* de *Pyrenophora tritici-repentis*, un champignon phytopathogène, a été identifié par Ciuffetti et al. et code la protéine TOXA qui serait liée à la pathogénicité de cette espèce fongique (Ciuffetti et al., 1997). Le P_{PtTOXA} a déjà prouvé son efficacité chez de nombreuses espèces de champignons filamenteux appartenant aux genres *Alternaria*, *Botrytis*, *Fusarium* ou encore *Colletotrichum* (Lorang et al., 2001). Ce promoteur est présent dans le plasmide pCT74 (Figure 69). Ce même plasmide renferme la cassette de sélection à l'HygB optimisée et décrite ci-dessus (Lorang et al., 2001).

2.2.3. Optimisation du châssis moléculaire

La cassette de sélection à l'HygB, le P_{PtTOXA} et la séquence codant une version de la GFP (SGFP) étant tous présents dans le pCT74, il aurait été envisageable d'utiliser directement cette construction comme cassette de fluorescence. Seulement, comme indiqué dans l'introduction, les gènes *HHKs* doivent être fusionnés à la GFP pour permettre leur localisation cellulaire. Or le pCT74 ne présente aucun site de restriction au niveau de la séquence d'initiation de la traduction de la SGFP pour permettre le clonage de ces grands gènes entre le P_{PtTOXA} et la SGFP.

En revanche, le plasmide pAYCU171 développé par le Dr Defosse T. possède lui de nombreux sites de restriction dans sa séquence (Defosse et al., 2018). De plus, ce vecteur se compose d'une cassette de sélection *URA5* et d'une cassette d'expression contenant le gène *yeGFP* (pour *yeast-enhanced GFP*), une version optimisée de la séquence codant la GFP d'*Aequora victoria* pour les espèces *Candida* (Cormack et al., 1997 ; Papon et al., 2012). Par conséquent, le pAYCU171 servira de châssis moléculaire pour la construction de la cassette GFP dans lequel le marqueur de sélection *URA5* sera remplacé par la cassette

Tableau XVI. Vecteurs plasmidiques utilisés dans les stratégies de clonage de la cassette de fluorescence.

Vecteur plasmidique	Origine	Principaux éléments constituant le vecteur
pAYCU171	-	✓ Cassette de sélection URA5 ✓ Cassette d'expression yeGFP
pCT74	-	✓ Cassette de résistance à l'hygromycine B ✓ Promoteur P _{PtTOXA}
pBluescript II KS + (pKS)	-	✓ Site multiple de clonage
pAHSaGFP.1	Clonage dans le pAYCU171	✓ Cassette de résistance à l'hygromycine B du pCT74 ✓ yeGFP et T _{MgTRPI} du pAYCU171
pAHSaGFP.2	Clonage dans le pAYCU171	✓ Cassette de résistance à l'hygromycine B du pCT74 ✓ P _{PtTOXA} du pCT74 ✓ yeGFP et T _{MgTRPI} du pAYCU171
pAHSaGFP.3	Clonage dans le pAYCU171	✓ Cassette de résistance à l'hygromycine B du pCT74 ✓ P _{PtTOXA} du pCT74 ✓ SGFP du pCT74 ✓ T _{MgTRPI} du pAYCU171

Tableau XVII. Amorces utilisées pour la construction de la cassette de fluorescence.

Amorce sens	Séquence 5' → 3'	T _m (°C)	Amorce anti-sens	Séquence 5' → 3'	T _m (°C)	Taille des amplicons (pb)	Annotation
Construction de la cassette de fluorescence							
Clonage dans le pAYCU171							
HPH-F-sm1-NotI	CTGAGAGCGGCCGCTGATATTGAAGGAGCATTTTTGGG	67	HPH-F-sm2-NotI	CTGAGAGCGGCCCGTTAACTGGTCCCGGTCGGC	73	1410	HPH_F1
HPH-F-sm1-ApaI	CTGAGAGGGCCCTGATATTGAAGGAGCATTTTTGGG	65	TOXA-R-XhoI	CTGAGACTCGAGGACCTATATTCATTATTGTCAGC	62	400	P _{PtTOXA} _F1
TOXA-F-KpnI	CTGAGAGGTACCCATGGAGGAGTTCTGTACGCGC	67	SGFP-R-AvrII	GCGCAAACCTAGGCTTTGTACAGCTCGTCCATGCCG	69	720	SGFP_F1
SGFP-F-XhoI	GCGCAAACCTCGAGATGGTGAGCAAGGCGGAGGAGC	71	GYCS2	CTGAGAGTCGACTTTGTACAATTCATCCATACCA	59	715	yeGFP_F1
GYCN1	CTGAGAGCTAGCATGTCTAAAGGTGAAGAATTAT	56					

ATCG : adaptateur ; **ATCG** : site de restriction enzymatique ; **ATCG** : séquence de l'ADN à amplifier.

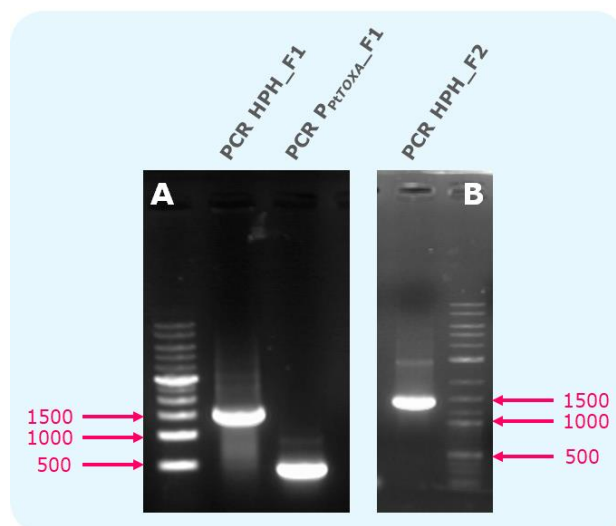


Figure 70. Amplification des fragments de PCR nécessaires à la construction de la cassette de fluorescence par clonage dans le plasmide pAYCU171.

L'ensemble des fragments ont été amplifiés par PCR conventionnelle à l'aide de la GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase. **A.** Amplification des fragments HPH_F1 (~ 1,4 kb) et P_{PTOXA}-F1 (~ 400 pb) possédant les sites de restriction NotI et KpnI puis NotI et XhoI à leurs extrémités 5' et 3', respectivement. **B.** Amplification du fragment HPH_F2 (~ 1,4 kb) possédant le site de restriction ApaI à son extrémité 5' et NotI à son extrémité 3'.

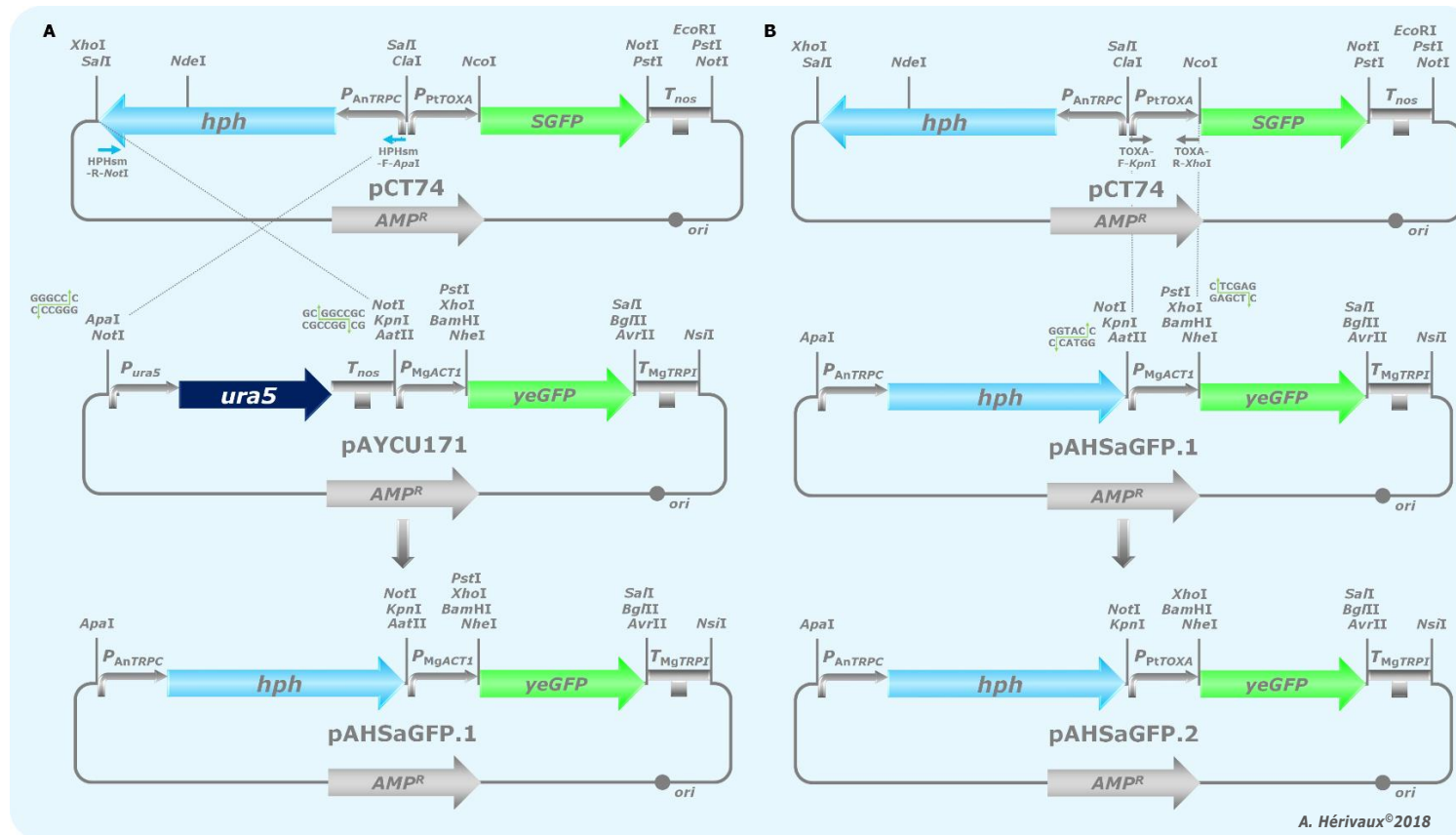


Figure 71. Construction de la cassette de fluorescence par clonage dans le plasmide pAYCU171.

A. Le pAHSaGFP.1 a été obtenu après amplification de la cassette de sélection à l'hygromycine B (HPHsm-R-NotI/HPHsm-F-ApaI) issue du pCT74 puis digérée par les enzymes ApaI et NotI. Le pAYCU171 a été digéré par le même couple d'endonucléases afin d'exciser la cassette de sélection URA5. Ensuite, la cassette de résistance à l'hygromycine B a été insérée au niveau de ces mêmes sites dans le pAYCU171. **B.** Le pAHSaGFP.2 a été généré suite à l'amplification du promoteur P_{PtTOXA} (TOXA-F-KpnI/TOXA-R-XhoI) issu du pCT74 puis digéré par les enzymes KpnI et XhoI. Le fragment correspondant au P_{PtTOXA} a ensuite été inséré au niveau de ces mêmes sites de restriction dans le pAHSaGFP.1. La séquence terminatrice de *Meyerozyma guilliermondii* T_{MgTRPI} du pAYCU171 a été conservée derrière le gène de la yeGFP dans la construction finale. Le vecteur plasmidique final mesure environ 5,7 kb dont 2,5 kb correspondent à la cassette de fluorescence.

de résistance à l'HygB optimisée du pCT74 et le promoteur P_{PtTOXA} remplacera le P_{MgACT1} de *Meyerozyma guilliermondii* d'origine.

La cassette de fluorescence n'étant pas actuellement finalisée, nous avons ici souhaité présenter les premières étapes du développement de cet outil moléculaire. L'ensemble des plasmides utilisés et générés au cours de ces manipulations sont détaillés dans le **Tableau XVI**. Les amorces nécessaires à l'élaboration de la cassette de fluorescence sont présentées dans le **Tableau XVII**.

2.3. Construction du système d'expression

2.3.1. Clonage dans le pAYCU171

Les fragments HPH_F1 et P_{PtTOXA_F1} ont été amplifiés par PCR conventionnelle à partir du pCT74 en utilisant les couples d'amorces respectifs HPH-F-sm1-NotI/HPH-F-sm2-NotI et TOXA-F-KpnI/TOXA-R-XhoI (**Figure 70.A**). Au préalable, la cassette de sélection *URA5* a été excisée du plasmide pAYCU171 après digestion par l'endonucléase *NotI*. Le fragment HPH_F1, digéré par la même endonucléase, a été inséré au niveau du site de restriction *NotI* du pAYCU171. La digestion du vecteur pAYCU171 étant réalisée avec une seule enzyme, *NotI*, la probabilité que le plasmide puisse se recirculariser est importante. Par conséquent, une étape de déphosphorylation du plasmide a été réalisée en amont de la ligature. Cependant, suite à cette étape préliminaire le clonage du HPH_F1 dans le pAYCU171 déphosphorylé n'a jamais pu s'opérer. Nous avons de ce fait recherché une alternative de clonage.

Le SMC situé à l'extrémité 5' de la cassette *URA5* dans le pAYCU171 se compose de deux sites de restriction enzymatiques : *NotI* et *ApaI* (**Figure 71**). Ainsi, la cassette de sélection à l'HygB a de nouveau été amplifiée en conservant l'amorce 3' précédemment utilisée alors que le site *NotI* a été remplacé par un site *ApaI* à l'extrémité 5' (**Figure 70.B**). Ainsi, le fragment HPH_F2 a parfaitement été inséré dans le pAYCU171 au niveau des sites *ApaI* et *NotI*, générant le vecteur pAHSaGFP.1.

Puis, le fragment amplifié correspondant au P_{PtTOXA_F1} a été digéré par le couple d'enzymes *KpnI/XhoI* et ensuite inséré au niveau des sites de restriction correspondants du pAHSaGFP.1, remplaçant le P_{MgACT1} . La construction plasmidique pAHSaGFP.2 d'environ 5,7 kb a ainsi été obtenue (**Figure 71**).

La construction finale se compose donc : i) d'une cassette de sélection représentée par le fragment HPH_F2 (lui-même composé du gène *hph*, d'une partie du promoteur P_{AnTRPC} et du P_{PtTOXA}) et ii) d'une cassette d'expression qui renferme la séquence codant la protéine yeGFP dont l'expression est sous le contrôle du promoteur constitutif P_{PtTOXA} et du terminateur T_{MgTRP1} (**Figure 71 et 72**).

2.3.2. Transgénèse du pAHSaGFP.2 dans la souche de *S. apiospermum* IHEM 14462

La cassette de fluorescence, après digestion du plasmide pAHSaGFP.2 par le couple d'enzymes *ApaI/XhoI*, a été intégrée dans le génome de la souche IHEM 14462. Les transformants obtenus, au nombre de 7, ont été analysés par microscopie de fluorescence dans le but d'observer l'expression *in situ* de la yeGFP. Un faible signal fluorescent a pu être visualisé mais hélas d'intensité comparable au signal

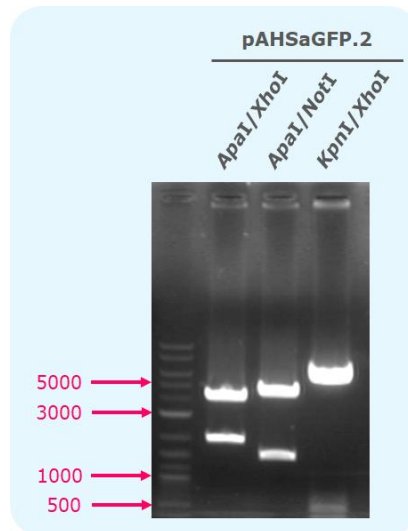


Figure 72. Vérification de la construction plasmidique pAHSaGFP.2.

Le plasmide pAHSaGFP.2 a été validé après digestion par différentes enzymes de restriction. Les profils de digestion attendus en fonction des enzymes étaient les suivants : ApaI/XhoI : ~ 3850 et 1850 pb, ApaI/NotI : ~ 4300 et 1400 pb, KpnI/XhoI : ~ 5280 et 400 pb.

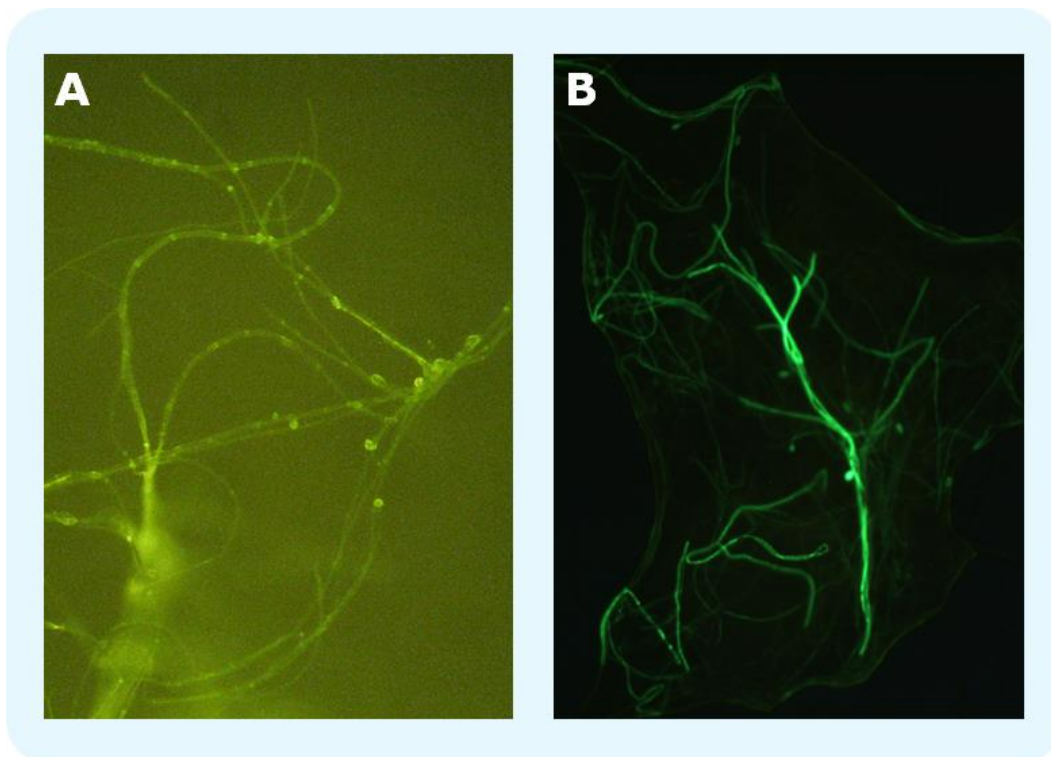


Figure 73. Fluorescence chez *Scedosporium apiospermum* IHEM 14462.

La fonctionnalité des protéines fluorescentes étudiées a pu être appréciée après transformation de *S. apiospermum* IHEM 14462 et observation du mycélium en microscopie à épifluorescence. **A.** Autofluorescence observée chez la souche IHEM 14462 de *S. apiospermum*. **B.** Expression de la protéine SGFP du vecteur pCT74 et sous la dépendance du P_{PtTOXA} chez *S. apiospermum* IHEM 14462.

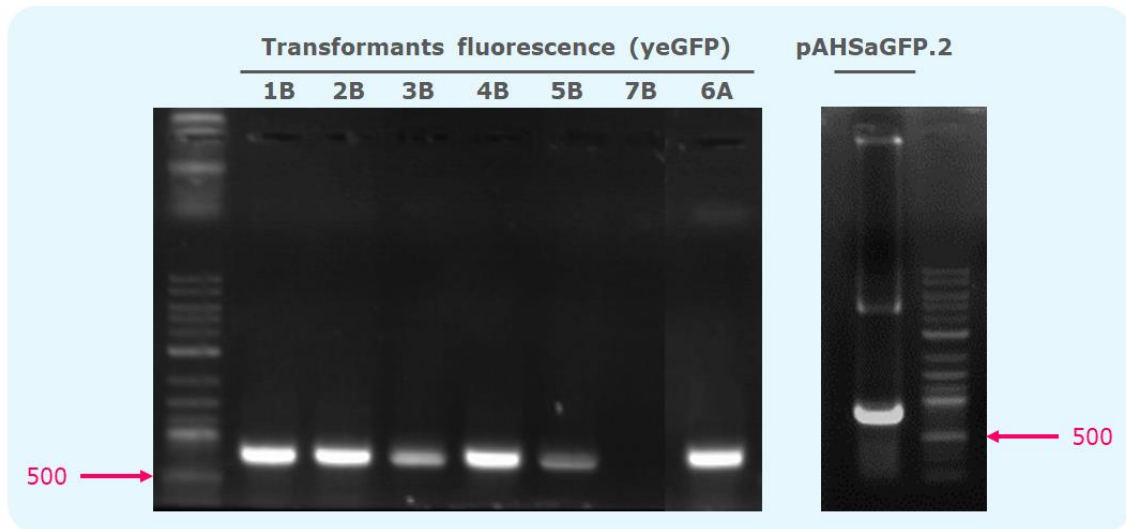


Figure 74. Amplification du fragment yeGFP_F1.

Le fragment yeGFP_F1 a été amplifié par PCR conventionnelle (GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase) à partir de l'ADN des transformants issus de la transformation de *S. apiospermum* IHEM 14462 avec le vecteur de fluorescence pAHSaGFP.2. Une bande d'environ 700 pb est attendue.

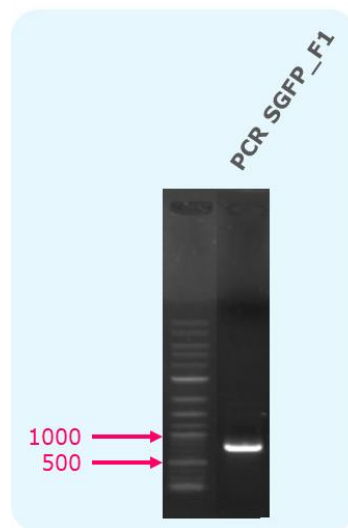


Figure 75. Amplification du fragment de PCR nécessaire à la construction de la cassette de fluorescence par clonage dans le plasmide pAHSaGFP.2.

Le fragment SGFP_F1 (~ 700 pb) a été amplifié par PCR conventionnelle à l'aide de la GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase. Ce fragment comporte les sites de restriction *XhoI* à son extrémité 5' et *AvrII* à son extrémité 3'.

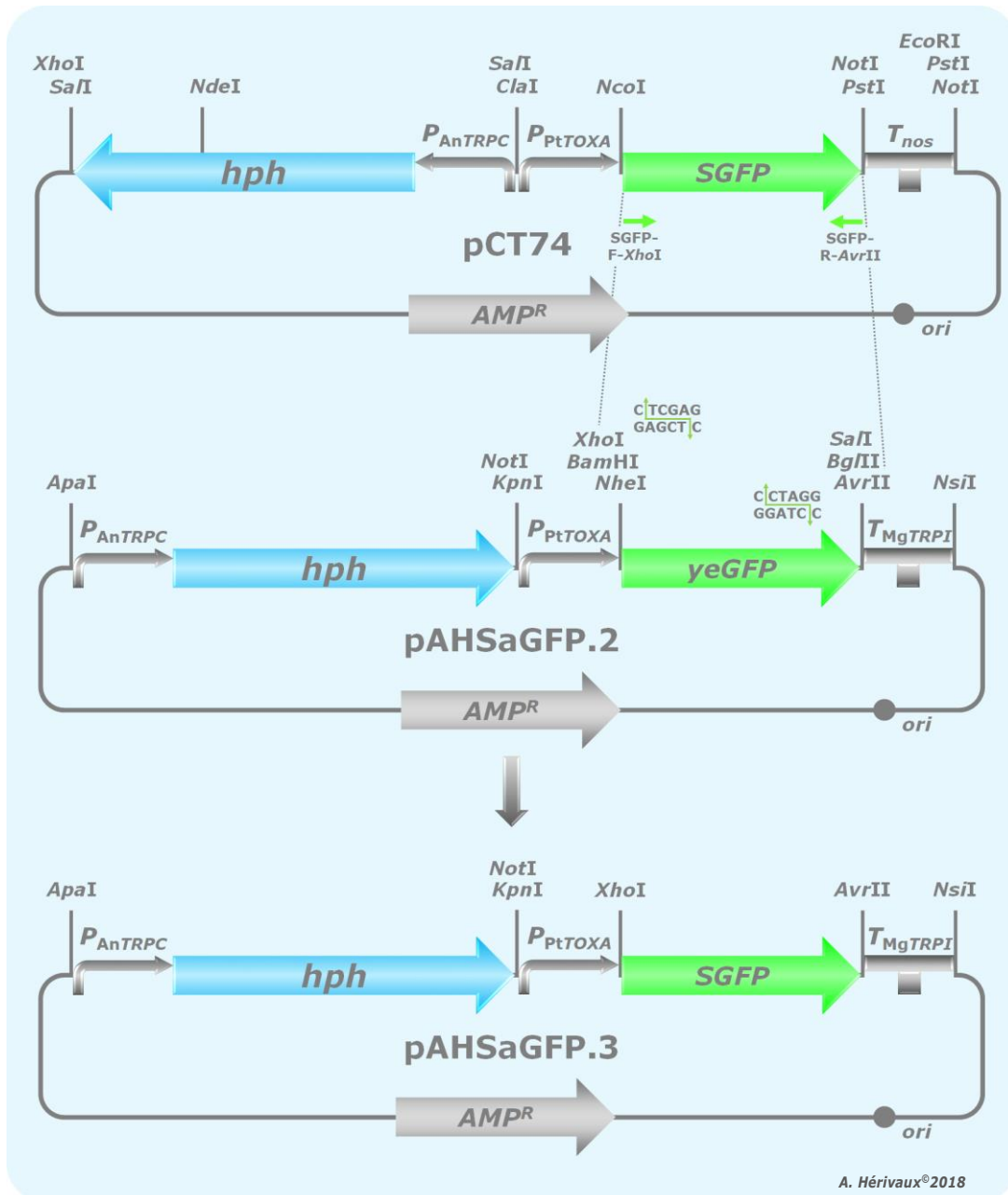


Figure 76. Construction de la cassette de fluorescence par clonage dans le plasmide pAHSaGFP.2.

Le fragment *SGFP* a été amplifié à partir du vecteur pCT74 (*SGFP-F-XhoI/SGFP-R-AvrII*) puis digéré par le couple d'enzymes *XhoI/AvrII*. Le plasmide pAHSaGFP.2 a été digéré par le même couple enzymatique afin d'exciser le gène codant la *yeGFP* dans le but de pouvoir ensuite y insérer le fragment *SGFP* et ainsi générer le pAHSaGFP.3. Le vecteur plasmidique final mesure environ 5,7 kb dont 2,5 kb correspondent à la cassette de fluorescence.

d'autofluorescence de la souche non transformée (**Figure 73.A**). Ainsi, nous en avons conclu que la séquence de la GFP présente dans le système d'expression pAHSaGFP.2 n'est pas exprimée dans les conditions testées.

La première hypothèse dressée s'orientait vers une possible excision du P_{PtTOXA} et/ou de la séquence codant la yeGFP lors de la transgénèse fongique. Les transformants étant capables de se développer sur les milieux contenant de l'HygB, il nous semblait logique d'affirmer que la cassette de sélection à l'HygB avait bien été intégrée. Des PCR ont été réalisées sur les ADN des différents transformants à l'aide des amorces utilisées précédemment pour le P_{PtTOXA_F1} et du couple GYCN1/GYCS2 pour la yeGFP_F1. La PCR permettant de visualiser le fragment P_{PtTOXA_F1} s'est révélée négative à la fois pour les transformants et pour le témoin positif correspondant à la cassette AHSaGFP.2. En revanche, les résultats ont révélé la présence du fragment yeGFP_F1 chez tous les transformants (**Figure 74**).

Nous avons donc émis une seconde hypothèse. La séquence codant la protéine fluorescente de notre construction a été optimisée en vue d'une utilisation chez les espèces du genre *Candida* (Cormack *et al.*, 1997 ; Cormack, 1998 ; Papon *et al.*, 2012). Il est donc possible que la séquence de cette yeGFP ne soit pas adaptée à une expression dans notre champignon.

Ainsi, nous nous sommes orientés vers la séquence codant la SGFP, qui a été utilisée avec succès chez plusieurs champignons filamenteux (Lorang *et al.*, 2001). De plus, le Dr. Vandeputte P. avait pu démontrer au cours de l'année que la protéine SGFP, dont la séquence codante est présente dans le vecteur d'expression pCT74 et sous le contrôle du P_{PtTOXA} , s'exprimait fortement chez notre souche fongique (**Figure 73.B**).

2.3.3. Changement de séquence codant la protéine fluorescente

La séquence codant la protéine SGFP a été amplifiée à partir du plasmide pCT74 avec le couple d'amorces SGFP-F-*XhoI*/SGFP-R-*AvrII*, en prenant soin de ne pas amplifier le codon stop (**Figure 75**). Avant insertion du fragment SGFP_F1, le plasmide pAHSaGFP.2 a été digéré par les endonucléases *XhoI* et *AvrII* afin que la yeGFP soit excisée. Le vecteur d'expression pAHSaGFP.3 (~ 5,7 kb) a ainsi été généré en remplaçant le fragment yeGFP_F1 par le fragment SGFP_F1 (**Figure 76**).

Après digestion des minipréparations issues de la ligature de la SGFP dans le plasmide pAHSaGFP.3 par le même couple d'enzymes, le gène codant la protéine GFP semblait correctement excisé (**Figure 77.A**). En revanche, lorsque nous avons procédé à des vérifications enzymatiques supplémentaires sur ce même plasmide, les résultats n'étaient pas cohérents (**Figure 77.B**). Les expérimentations concernant le développement de la cassette de fluorescence chez *S. apiospermum* en sont actuellement à ce point.

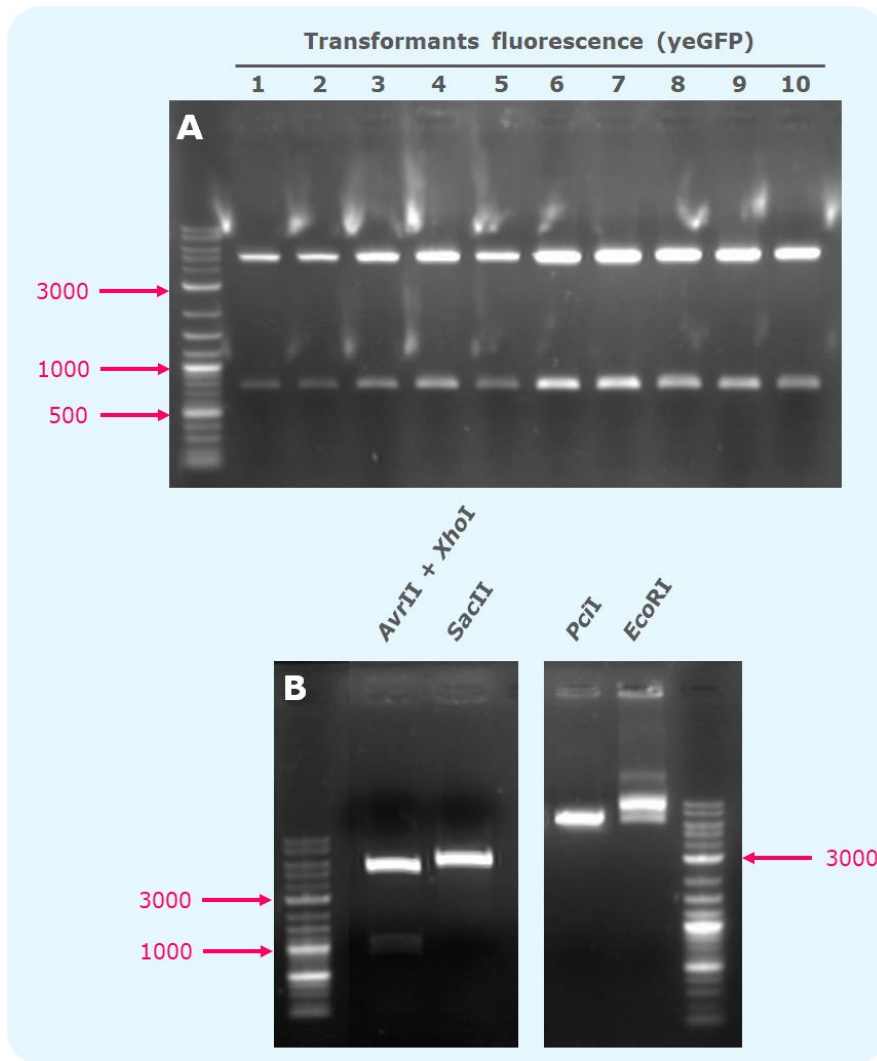


Figure 77. Vérification de la construction plasmidique pAHSaGFP.3.

A. Le fragment SGFP_F1 (~ 700 pb) a été excisé de la construction plasmidique pAHSaGFP.3 à l'aide des mêmes enzymes qui ont été utilisées lors du clonage, à savoir XhoI et AvrII. **B.** Des digestions enzymatiques complémentaires de vérification ont été effectuées sur le plasmide pAHSaGFP.3. Les profils de digestion attendus en fonction des enzymes étaient les suivants : AvrII/XhoI : ~ 4950 et 700 pb, SacII : ~ 4250, 1140 et 280 pb, PciII : ~ 4000 et 1650 pb, EcoRI : ~ 5700 pb.

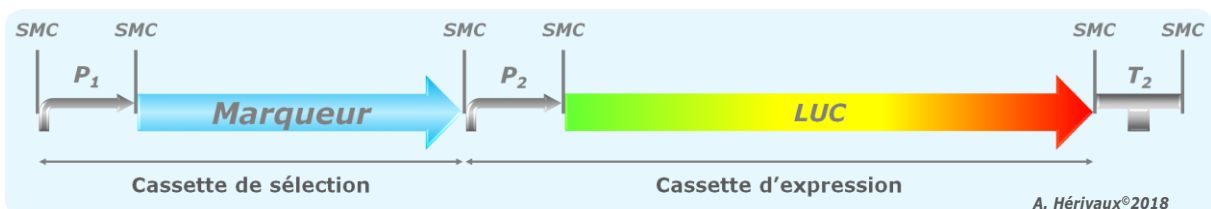


Figure 78. Schématisation de la cassette de bioluminescence.

LUC : gène luciférase ; P₁ : séquence promotrice 1 ; P₂ : séquence promotrice 2 ; SMC : site multiple de clonage ; T₂ : séquence terminatrice 2.

3. Casette de bioluminescence

Comme évoqué dans l'introduction, les HHKs sont des protéines qui ont été démontrées comme étant impliquées dans la virulence chez certains champignons pathogènes, notamment celles appartenant aux classes III et X. De ce fait, dans le cadre de cette thèse, il semblait primordial de pouvoir évaluer au sein même de l'équipe l'impact de la délétion de gènes codant des HHKs sur la pathogénicité de *S. apiospermum*. Actuellement, seul un modèle d'infection invasive à *S. apiospermum* chez le rat Sprague-Dawley est disponible au laboratoire, conduisant généralement à une scédosporiose cérébrale chez les animaux. Dans tous les cas, ces expérimentations invasives nécessitent le sacrifice de l'animal afin de pouvoir récupérer les organes pour évaluer au mieux la dissémination hématogène du champignon dans l'organisme et la charge fongique dans les différents organes (Lelièvre *et al.*, 2013 ; Lelièvre *et al.*, 2018).

Dans ce contexte, développer l'IBL semble une excellente alternative puisqu'elle est peu invasive, hautement sensible, non toxique pour l'animal et permet le suivi *in vivo* et en temps réel d'une infection par un agent pathogène et donc l'utilisation d'un nombre plus restreint en animaux (Papon *et al.*, 2014). Grâce à cette technique, il serait alors possible de comparer la virulence de différentes souches de *S. apiospermum*, l'efficacité *in vivo* de molécules antifongiques mais aussi d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

3.1. Introduction

La cassette de bioluminescence que nous souhaitons élaborer comprend i) une cassette de sélection identique à celle développée pour la cassette GFP et ii) une cassette d'expression renfermant une séquence codant une LUC. L'expression de la protéine sera régulée par le P_{PTOXA} (Figure 78).

3.2. Pré-requis

Comme mentionné précédemment, trois gènes *LUC* sont actuellement utilisés en IBL chez les champignons pathogènes (cf Analyse bibliographique, 4. Outils moléculaires) (Papon *et al.*, 2014). Toutefois, le modèle animal disponible au laboratoire étant un modèle d'infection invasive, il est alors essentiel que la protéine LUC sélectionnée pour l'IBL soit adaptée au suivi des infections profondes.

3.2.1. Choix du gène codant la luciférase

Des études de suivi d'infections invasives à *A. fumigatus* et à *C. albicans* chez l'animal ont permis de recommander l'utilisation du gène *fLUC* de la luciole (*Photinus pyralis*) pour le suivi des infections profondes *in vivo* (Papon *et al.*, 2014). En effet, la luciférase *fLUC* émet naturellement de la lumière à une longueur d'onde comprise entre 580 et 612 nm lorsqu'elle oxyde son substrat luciférine. A cette longueur d'onde, le signal n'est pas absorbé par l'hémoglobine, contrairement aux deux autres gènes *LUC* disponibles pour l'étude des champignons. Ainsi, cet argument majeur nous a d'ores et déjà conduits à sélectionner le gène *fLUC* de la luciole pour la construction de notre cassette d'IBL.

Tableau XVIII. Tableau d'usage des codons pour *Scedosporium apiospermum* IHEM 14462.

Acide aminé	Codon	Nombre	/ 1000	Fraction	Acide aminé	Codon	Nombre	/ 1000	Fraction
Ala	GCG	389	22,04	0,33	Leu	TTG	416	23,57	0,26
	GCA	311	17,62	0,26		TTA	190	10,77	0,12
	GCT	197	11,16	0,17		CTG	340	19,27	0,22
Arg	GCC	288	16,32	0,24	CTA	191	10,82	0,12	
	AGG	593	33,61	0,26	CTT	170	9,63	0,11	
	AGA	493	27,94	0,22	CTC	269	15,24	0,17	
	CGG	363	20,57	0,16	AAG	280	15,87	0,59	
	CGA	311	17,62	0,14	AAA	195	11,05	0,41	
Asn	CGT	166	9,41	0,07	Met	ATG	420	23,80	1,00
	CGC	316	17,91	0,14	Phe	TTT	179	10,14	0,39
	AAT	136	7,71	0,43	TTC	285	16,15	0,61	
	AAC	177	10,03	0,57	CCG	591	33,49	0,34	
Asp	GAT	96	5,44	0,48	Pro	CCA	525	29,75	0,30
	GAC	106	6,01	0,52	CCT	291	16,49	0,17	
Cys	TGT	204	11,56	0,42	CCC	327	18,53	0,19	
	TGC	284	16,09	0,58	AGT	275	15,58	0,10	
Gln	CAG	181	10,26	0,54	AGC	407	23,06	0,14	
	CAA	153	8,67	0,46	TCG	664	37,63	0,24	
Glu	GAG	176	9,97	0,54	Ser	TCA	610	34,57	0,22
	GAA	151	8,56	0,46	TCT	361	20,46	0,13	
	GGG	226	12,81	0,31	TCC	505	28,62	0,18	
Gly	GGA	194	10,90	0,26	ACG	514	29,13	0,32	
	GGT	129	7,31	0,18	ACA	389	22,04	0,24	
	GGC	186	10,54	0,25	ACT	314	17,79	0,19	
His	CAT	114	6,46	0,42	ACC	414	23,46	0,25	
	CAC	159	9,01	0,58	Trp	TGG	385	21,82	1,00
Ile	ATA	209	11,84	0,33	Tyr	TAT	77	4,36	0,42
	ATT	159	9,01	0,25	TAC	105	5,95	0,58	
	ATC	266	15,07	0,42	GTG	276	15,64	0,38	
					GTA	151	8,56	0,21	
				Val	GTT	94	5,33	0,13	
					GTC	200	11,33	0,28	
					TGA	308	17,45	0,61	
				Stop	TAG	125	7,08	0,25	
					TAA	70	3,97	0,14	

Analyse réalisée sur 52 490 nucléotides couvrant les codons des gènes actine, tubuline, superoxyde dismutase, HHKVIII, pig1, glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénase, FKS1, catalase, facteur d'élongation de la transcription, DNA polymérase, glutathion-S-transférase, adénylate cyclase, bêta-glucosidase SUN, NRPS, calmoduline pk, chitine synthase V, pyruvate déshydrogénase.

Tableau XIX. Vecteurs plasmidiques utilisés dans les stratégies de clonage de la cassette de bioluminescence.

Vecteur plasmidique	Origine	Principaux éléments constituant le vecteur
pAYCU171	-	✓ Cassette de sélection URA5 ✓ Cassette d'expression yeGFP
pCgflLUC	-	✓ Gène luciférase <i>CgflLUC</i>
pCT74	-	✓ Cassette de résistance à l'hygromycine B ✓ Promoteur P _{PtTOXA}
pBluescript II KS + (pKS)	-	✓ Site multiple de clonage
pAHSaLUC.1	Clonage dans le pBluescript II KS +	✓ T _{MgTRPI} du pAYCU171
pAHSaLUC.2	Clonage dans le pBluescript II KS +	✓ <i>CgflLUC</i> du pCgflLUC ✓ T _{MgTRPI} du pAYCU171
pAHSaLUC.3	Clonage dans le pBluescript II KS +	✓ P _{PtTOXA} du pCT74 ✓ <i>CgflLUC</i> du pCgflLUC ✓ T _{MgTRPI} du pAYCU171
pAHSaLUC.4	Clonage dans le pBluescript II KS +	✓ Cassette de résistance à l'hygromycine B du pCT74 ✓ P _{PtTOXA} du pCT74 ✓ <i>CgflLUC</i> du pCgflLUC ✓ T _{MgTRPI} du pAYCU171
pAHSaLUC.5	Clonage dans le pAHSaGFP.2	✓ Cassette de résistance à l'hygromycine B du pCT74 ✓ P _{PtTOXA} du pCT74 ✓ <i>CgflLUC</i> du pCgflLUC ✓ T _{MgTRPI} du pAYCU171

Tableau XX. Amorces utilisées pour le développement de la cassette de bioluminescence.

Amorce sens	Séquence 5' → 3'	Tm (°C)	Amorce anti-sens	Séquence 5' → 3'	Tm (°C)	Taille des amplicons (pb)	Annotation
Construction de la cassette de bioluminescence							
PCR Fusion							
LUC-fus1	CAATTGACCAAGGGCCAGCCGTAGATGAGA	65	LUC-fus2	ACCTTCTTGATGTTCTTAGCGTCTCCATGACCTATATTCATTCTGTCAGCTATCGC	67	1860	HPH/P _{PlTOXA} _L1
LUC-fus3	AGCGATAGCTGACAATGAATGAATATAGGTCATGGAAGACGCTAAGAACATCAAGAAGGGT	67	LUC-fus4	TAAAATTGAAATTCCTACACTGTATGCTTTGTTAGACAGCAATCTTACCACCTTCTTAG	65	4190	CgflUC_L1
LUC-fus5	GCTAAGAAGGGTGGTAAGATTGCTGTCTAA	65	LUC-fus6	TTGGCTACTGAAGCCGCTACCACCATCTTG	65	240	T _{MgTRPL} _L1
5'-Nest-LUC	AAGGAAACGGGAGCCTGCTCACGAC	65	3'-Nest-LUC	CGACCAAATCATCATGGCCAAGCGT	62	3630	K7LUC_L1
Clonage dans le pBlueScript II KS+							
LUC-1-BstXI	CTGAGACACCCGGTGGTGATATTGAAGGAGCATTITTTGGG	68	LUC-2-XbaI	CTGAGATCTAGAGACCTATATTCATTCTTGT	56	1840	HPH/P _{PlTOXA} _L2
LUC-3-XbaI	CTGAGATCTAGAATGGAAGACGCTAAGAACAT	59	LUC-4-BamHI	CTGAGAGGATCCTTAGACAGCAATCTACCAC	61	1665	CgflUC_L2
LUC-5-BamHI	CTGAGAGGATCCTAACAAAGCATAACAAGTGTA	59	LUC-6-HindIII	CTGAGAAAGCTTTGGCTACTGAAGCCGCTAC	63	215	T _{MgTRPL} _L2
HPHsm-F-BstXI	GCGCAAAACACCCGGTGGTGATATTGAAGGAGCATTITTTGGG	70	HPHsm-R-NotI	GCGCAAAACCGCCGCTTAAGTGGTCCCGGTCGGC	75	1410	HPH_L2
TOXA-F-NotI	GCGCAAAACCGCCGCTATGAGGAGTTCTGTACGC	72	TOXA-R-XbaI	GCGCAAACTAGAGACCTATATTCATTCTTGTGAGC	61	400	P _{PlTOXA} _L2
Clonage du gène <i>CGfLUC</i> dans le pAHSaGFP.2							
LUC-F-XhoI	GCGCAAACTGAGATGGAAGACGCTAAGAACAT	64	LUC-R-AvrII	GCGCAAACTAGGTTAGACAGCAATCTTACCAC	63	1665	CgflUC_L3

ATCG : adaptateur ; **ATCG** : site de restriction enzymatique ; **ATCG** : séquence chevauchante ; **ATCG** : séquence de l'ADN à amplifier.

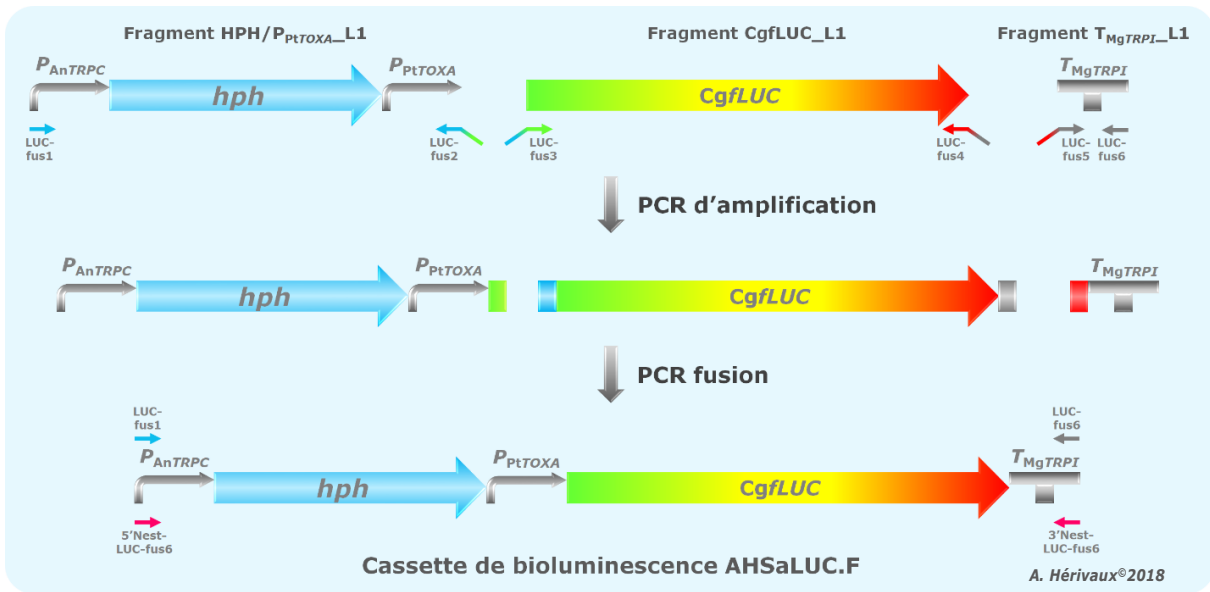


Figure 79. Construction de la cassette de fluorescence par PCR fusion.

Les trois fragments composant la cassette de bioluminescence ont tout d'abord été amplifiés indépendamment. Le fragment HPH/P_{PtTOXA}_L1 (~ 1850 pb) a été amplifié à l'aide des amorces LUC-fus1 et LUC-fus2 à partir du pCT74. Le fragment CgfLUC_L1 (~ 1650 pb) a été amplifié à partir du pCgfLUC à l'aide du couple d'amorces LUC-fus3/LUC-fus4. Le dernier fragment qui correspond au terminateur du pAYCU171 (T_{MgTRPI}_L1 de ~ 250 pb) a été amplifié à l'aide des amorces LUC-fus5 et LUC-fus6. Suite à cette première étape d'amplification, les trois fragments qui présentaient des régions chevauchantes à leurs extrémités ont été obtenus. La seconde étape a consisté à réaliser une nouvelle amplification en présence uniquement de nos 3 fragments afin de générer la cassette de bioluminescence. Cette nouvelle étape a été réalisée avec les amorces LUC-fus1 et LUC-fus6 dans un premier temps, puis avec les amorces 5' et 3'-Nest-LUC dans un second temps. La cassette de bioluminescence ainsi générée mesure environ 3750 pb.

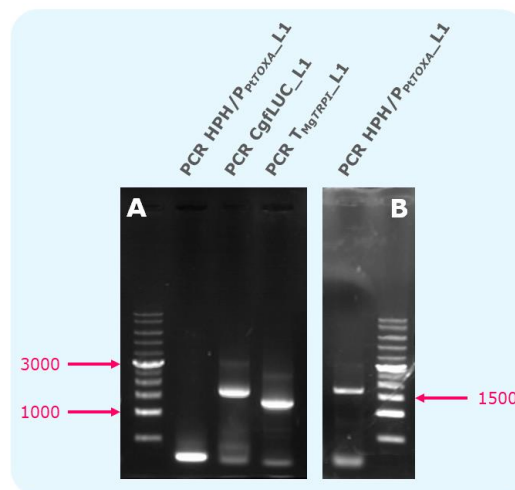


Figure 80. Amplification des fragments de PCR nécessaires à la construction de la cassette de bioluminescence par PCR fusion.

Les fragments de PCR HPH/P_{PtTOXA}_L1, CgfLUC_L1 et T_{MgTRPI}_L1 sont attendus aux tailles de ~ 1850, 1650 et 250 pb, respectivement. **A.** Amplifications réalisées à l'aide de la GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase. **B.** Amplification réalisée à l'aide de la Q5® High-Fidelity sans enhancer.

3.2.2. Optimisation du gène *fLUC*

Afin d'identifier une séquence *fLUC* disponible et dont la composition en codons serait en faveur d'une forte expression de la LUC dans notre modèle, nous avons dans un premier temps réalisé un tableau d'usage de codon chez *S. apiospermum*. Pour cela, nous avons étudié la composition en codons d'une quinzaine de gènes fortement exprimés dans l'espèce (**Tableau XVIII**). L'étude de la composition en codons des différentes versions de la *fLUC* disponibles dans les bases données et la comparaison avec notre tableau d'usage généré pour *S. apiospermum* nous a permis de sélectionner la version *fLUC* optimisée pour l'espèce *C. glabrata* (*CgflUCopt*). Il est à noter que, de surcroît, cette dernière ne présente pas de séquence PTS1, conduisant à une localisation cytosolique de la LUC produite (Papon *et al.*, 2014). Cette séquence *CgflUCopt* nous a été gracieusement transférée par le Pr. Brock M. (Université de Nottingham).

De nombreuses difficultés ayant été rencontrées, la cassette d'IBL est toujours en cours de développement. Il nous semblait donc intéressant d'exposer l'ensemble des étapes du processus de construction de ce système d'expression. L'ensemble des plasmides utilisés et générés au cours de ces manipulations sont détaillés dans le **Tableau XIX** et les amorces nécessaires à l'élaboration de la cassette de bioluminescence sont présentées dans le **Tableau XX**.

3.3. Construction du système d'expression

3.3.1. PCR fusion

La première approche concernant la construction de la cassette de bioluminescence reposait sur la PCR fusion (**Figure 79**). Les fragments de PCR HPH/*P_{PtTOXA}_L1*, *CgflUC_L1* et *T_{MgTRPI}_L1* ont tout d'abord été amplifiés à l'aide des couples d'amorces respectifs suivants LUC-fus1/LUC-fus2, LUC-fus3/LUC-fus4 et LUC-fus5/LUC-fus6. Le premier fragment a été synthétisé à partir du pCT74, le second à partir du pCgflUCopt et le dernier fragment est issu du pAYCU171.

La Q5® High-Fidelity DNA polymerase est généralement préférée à la GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase pour amplifier l'ADN qui servira à la PCR fusion afin de minimiser au maximum les mutations potentiellement introduites durant la polymérisation et lorsque la taille des amplicons est importante. Cependant, les fragments correspondant *CgflUC_L1* et *T_{MgTRPI}_L1* n'ont pu être obtenus qu'avec la GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase (**Figure 80.A**). En ce qui concerne le premier fragment HPH/*P_{PtTOXA}_L1*, un fragment d'environ 1,4 kb a été obtenu avec la GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase alors qu'un fragment de 1,8 kb était attendu. Cet amplicon a finalement été obtenu en utilisant cette fois la Q5® High-Fidelity DNA polymerase (**Figure 80.B**).

Ensuite, nous avons procédé à la PCR fusion en présence des 3 fragments générés et des amorces extérieures LUC-fus1 et LUC-fus6, sans réaliser de PCR intermédiaire. Comme illustré sur la **Figure 81.A** il semblerait que nous soyons parvenus à générer notre cassette puisque nous pouvons observer une bande à la taille attendue de 3,8 kb. Cependant, nous visualisons également une bande artéfact qui semblerait correspondre au fragment HPH/*P_{PtTOXA}_L1*. La PCR fusion a été répétée en optimisant les

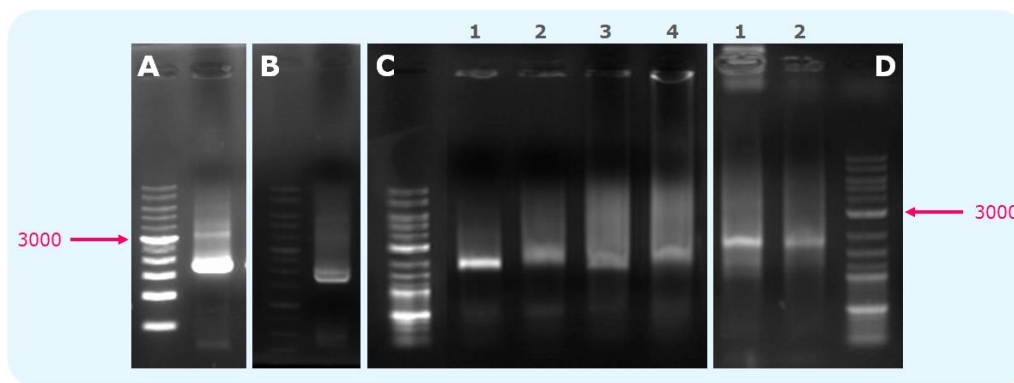
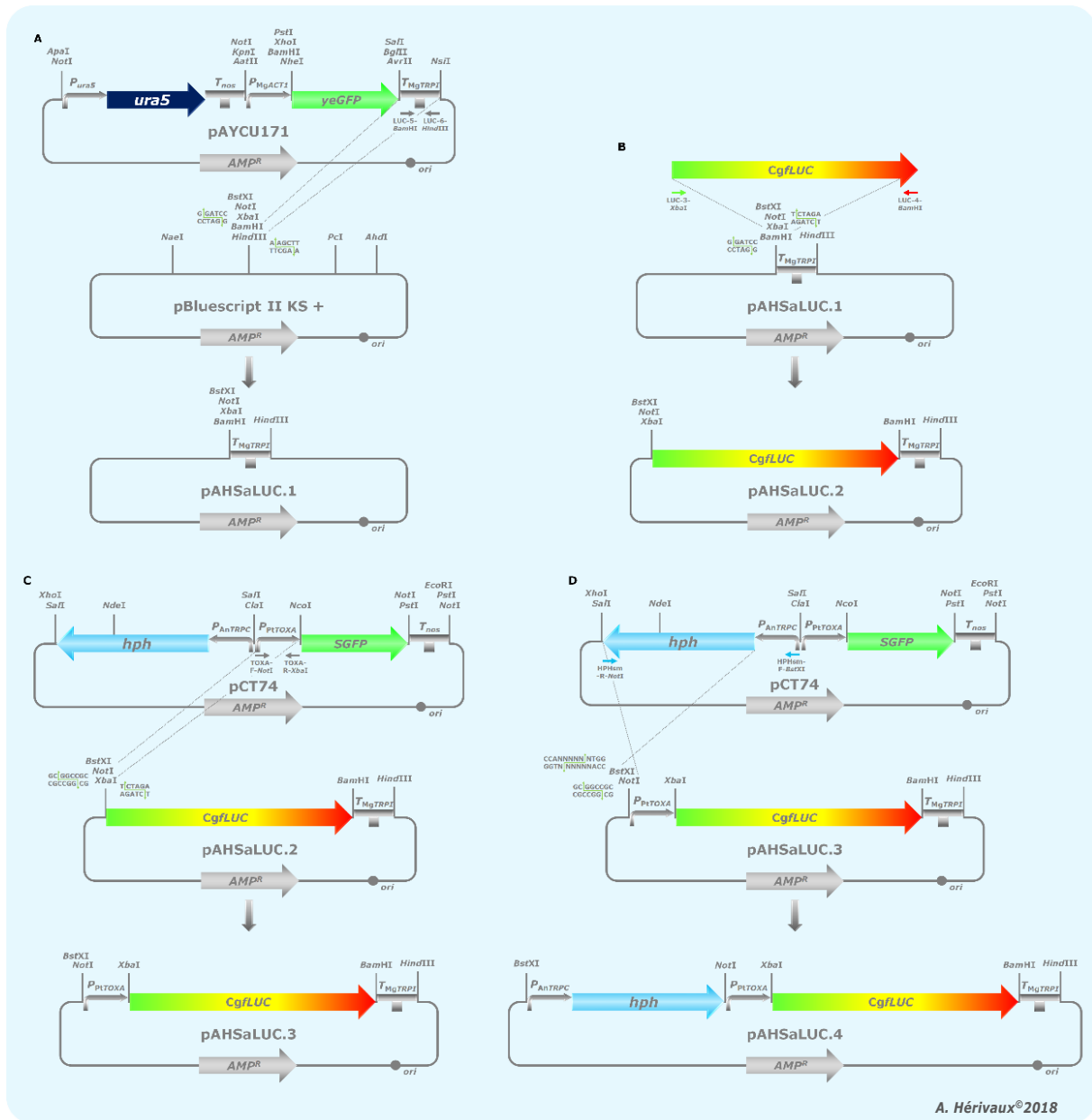


Figure 81. Résultats de la PCR fusion.

La cassette de bioluminescence générée par PCR fusion, à l'aide de la Q5[®] High-Fidelity DNA polymerase, devrait mesurer environ 3750 pb. **A.** PCR fusion réalisée en présence des amorces externes LUC-fus1 et LUC-fus6. **B.** PCR fusion réalisée en présence des amorces externes LUC-fus1 et LUC-fus6 suite à une étape d'amplification intermédiaire. **C.** PCR fusion réalisée en présence des amorces 5'-Nest-LUC et 3'-Nest-LUC sans enhancer. **D.** PCR fusion réalisée en présence des amorces 5'-Nest-LUC et 3'-Nest-LUC en présence de l'enhancer.



A. Hérivaux®2018

Figure 82. Construction de la cassette de bioluminescence par clonage dans le pBluescript II KS +.

A. La séquence terminatrice T_{MgTRP1} (~ 200 pb) du vecteur pAYCU171 a été amplifiée à l'aide des amorces LUC5-BamHI et LUC6-HindIII puis insérée dans le pKS au niveau des sites de restriction BamHI et HindIII après digestion. Le plasmide pAHSaLUC.1 a ainsi été obtenu. **B.** Le vecteur pAHSaLUC.1 résulte de l'amplification du gène qui code la Cgfluc (~ 16500 pb) par les amorces LUC3-XbaI et LUC4-BamHI et son insertion au niveau des sites XbaI et BamHI du pAHSaLUC.1. **C.** Le promoteur $P_{P_{TDXA}}$ (~ 400 pb) a été inséré aux sites enzymatiques NotI et XbaI dans le pAHSaLUC.3 après avoir été amplifié à partir du pCT74 et des amorces TOXA-F-NotI et TOXA-R-XbaI. **D.** Pour finir, la version optimisée de la cassette à l'hygromycine (~ 1400 pb) présente dans le pCT74 a été amplifiée à l'aide du couple d'amorces HPH-F-BstXI/HPH-R-NotI et insérée aux sites BstXI/NotI du pAHSaLUC.3. Le vecteur plasmidique final pAHSaLUC.4 (~ 6600 pb) aurait ainsi dû être obtenu et contenir la cassette de bioluminescence (~ 3700 pb).

paramètres de l'amplification mais les essais n'ont pas été concluants. C'est pourquoi nous nous sommes inspirés du protocole de *Yu et al.* dans lequel ils réalisent une PCR intermédiaire avant de procéder à la PCR fusion terminale (2004). Malgré cette optimisation, l'obtention de la cassette reste un échec (**Figure 81.B**). Jusqu'à présent, la PCR finale était réalisée à l'aide des amorces externes LUC-fus1 et LUC-fus6.

La stratégie suivante a consisté à dessiner de nouvelles amorces 5' et 3' internes (5'-Nest-LUC et 3'-Nest-LUC) pour réaliser une « PCR-nested » qui correspond à une « PCR dégénérée imbriquée » (*Yu et al.*, 2004). Plus précisément, l'amorce 5' externe débute après un résidu thymine ce qui empêche le décalage du cadre de lecture et donc l'insertion de mutations à l'extrémité 3'. En effet, les ADN polymérases ont la capacité d'ajouter des résidus adénines lors de la synthèse du brin complémentaire à la matrice qui dans le cas présent empêcherait la fusion des fragments d'ADN. Cette stratégie s'est une nouvelle fois révélée infructueuse (**Figure 81.C**). L'addition ou non du tampon *enhancer* en présence de la Q5® High-Fidelity DNA Polymerase n'a pas changé l'issue (**Figure 81.D**).

Pour sortir de cette impasse, nous avons décidé de nous réorienter vers le clonage de nos fragments d'intérêts dans le vecteur pKS.

3.3.2. Clonage dans le pKS

Après l'analyse des séquences à amplifier et de la carte de restriction du pKS, nous avons pu identifier 4 sites de restriction nous permettant le clonage des 3 fragments nécessaires à la construction de la cassette d'IBL (**Figure 82**).

Ainsi, le fragment HPH/P_{PtTOXA}_L2 a été amplifié à partir du pCT74 à l'aide du couple d'amorces LUC1-*Bst*XI/LUC2-*Xba*I. Le second fragment Cgfluc_L2 a été obtenu avec les amorces LUC3-*Xba*I et LUC4-*Bam*HI. Le dernier fragment T_{MgTRPI}_L2 a été obtenu en amplifiant le terminateur du pAYCU171 en utilisant les amorces LUC5-*Bam*HI et LUC6-*Hind*III. Les amplifications ont été réalisées par PCR conventionnelle. Nous avons aisément amplifié les fragments Cgfluc_L2 et T_{MgTRPI}_L2 (**Figure 83**). En revanche, l'obtention du premier fragment (HPH/P_{PtTOXA}_L2) s'est révélée infructueuse malgré de nombreux essais. En effet, nous obtenions une bande de taille largement inférieure à celle escomptée (< 1 kb au lieu d'environ 1,8 kb) (**Figure 83**).

La stratégie de clonage nous a tout d'abord amenés à digérer l'amplicon T_{MgTRPI}_L2 par les enzymes *Bam*HI et *Hind*III afin de l'insérer au niveau de ces mêmes sites de restriction dans le pKS. Le plasmide obtenu est dénommé pAHSaLUC.1 (**Figure 82**). Puis, le fragment Cgfluc_L2 a été digéré par le couple enzymatique *Xba*I/*Bam*HI. Cependant, ne parvenant pas à cloner cet ADN aux sites correspondants dans le pAHSaLUC.1, nous avons au préalable cloné le fragment Cgfluc_L2 dans le pGEM®-T Easy. Nous avons obtenu des résultats surprenants puisque nous ne sommes pas parvenus à exciser le fragment du vecteur en utilisant les enzymes *Xba*I/*Bam*HI (**Figure 84.A**). D'autant plus surprenant qu'en utilisant *Not*I, nous sommes parvenus à exciser ce fragment (**Figure 84.B**). L'hypothèse qui s'offre à nous est qu'au moins un des deux sites de restriction n'est pas fonctionnel. Après avoir réalisé des digestions de vérification, il s'est avéré que le site de restriction *Bam*HI était fonctionnel contrairement au site *Xba*I (**Figure 84.C**). Il

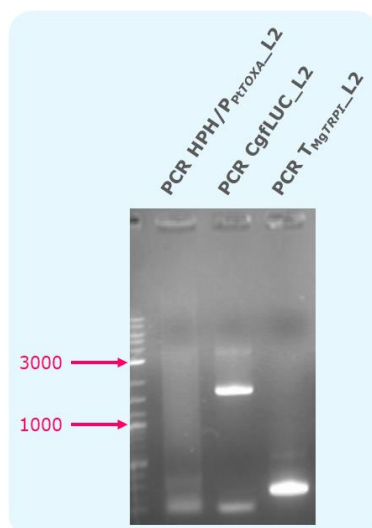


Figure 83. Amplification des fragments de PCR nécessaires à la construction de la cassette de bioluminescence par clonage dans le pBluescript II KS +.

Les fragments de PCR HPH/P_{PtTOXA_L2} , $CgfLUC_L2$ et T_{MgTRPL_L2} ont été amplifiés à l'aide des couples d'amorces respectifs $LUC1-BstXI/LUC2-XbaI$, $LUC3-XbaI/LUC4-BamHI$ et $LUC5-BamHI/LUC6-HindIII$, et sont attendus aux tailles de ~ 1850, 1650 et 200 pb.

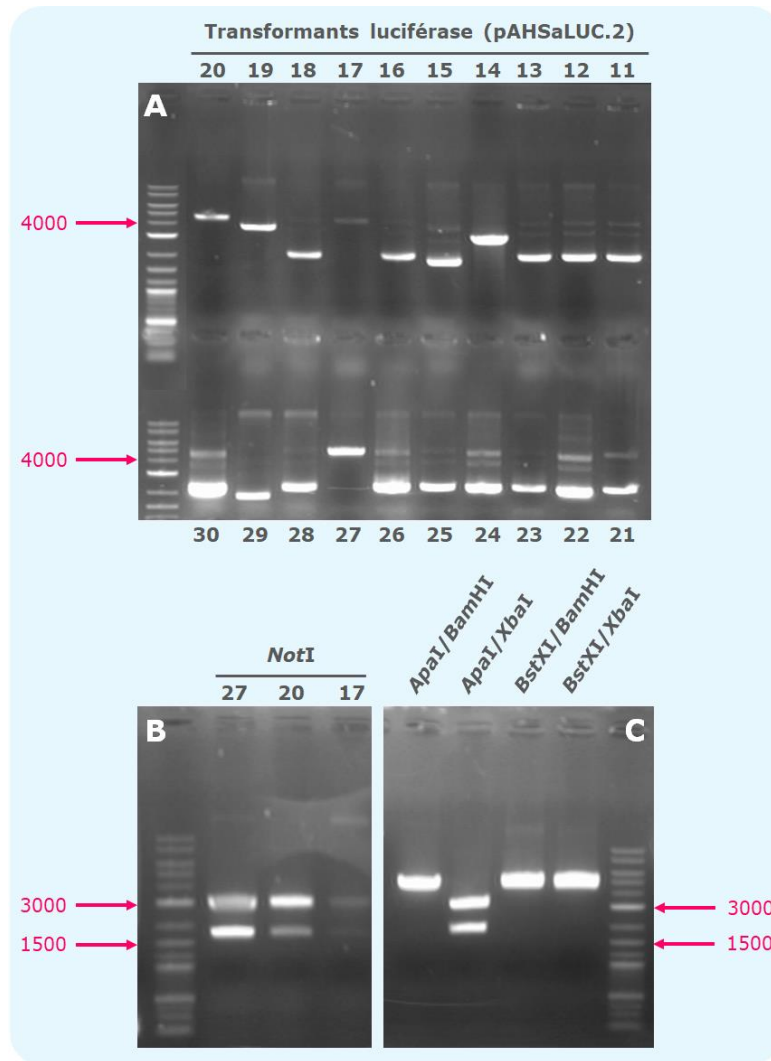


Figure 84. Excision du fragment Cgfluc₂ du pGEM[®]-T Easy.

A. Digestion du vecteur pGEM[®]-T Easy (~ 3000 pb) par les enzymes XbaI et BamHI pour exciser le fragment Cgfluc_{L2} (~ 1660 pb). Les minipréparations n° 17, 19, 20 et 27 ont été digérées puisqu'une seule bande est visible après migration. Cette bande est > 4000 pb donc il semble bien que le plasmide ait intégré le fragment Cgfluc_{L2} mais que celui-ci n'ait pas été excisé. **B.** Après digestion par NotI qui coupe de part et d'autre du fragment Cgfluc_{L2}, deux bandes sont observées aux tailles attendues (~ 3000 et 1660 pb) pour les minipréparations n° 17, 20 et 27. **C.** Digestions de vérification de l'excision du fragment Cgfluc_{L2} du pGEM[®]-T Easy réalisées sur la minipréparation n°27. Deux bandes sont observées aux tailles attendues pour la digestion ApaI/XbaI, indiquant que le site XbaI est fonctionnel. En revanche, une seule bande est observée à environ 4700 pb pour les digestions en présence de l'enzyme BamHI, indiquant que ce site de restriction n'est pas fonctionnel puisque le fragment Cgfluc_{L2} n'a pas été excisé du plasmide.

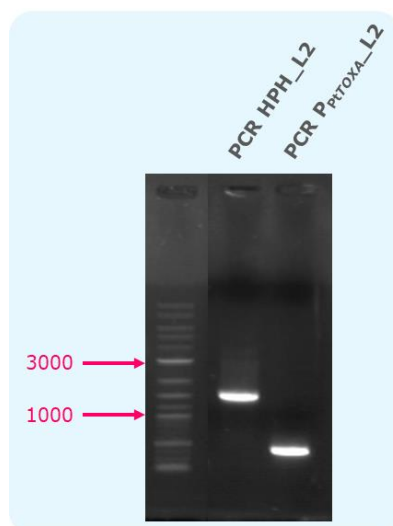


Figure 85. Amplification des seconds fragments de PCR nécessaires à la construction de la cassette de bioluminescence par clonage dans le pBluescript II KS +.

Les fragments de PCR *HPH_L1* et *P_{PTOXA_L1}* ont été amplifiés (GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase) à l'aide des couples d'amorces respectifs *HPH-F-BstXI/HPH-R-NotI* et *TOXA-F-NotI/TOXA-R-XbaI*, et sont attendus aux tailles de ~ 1400 et 400 pb.

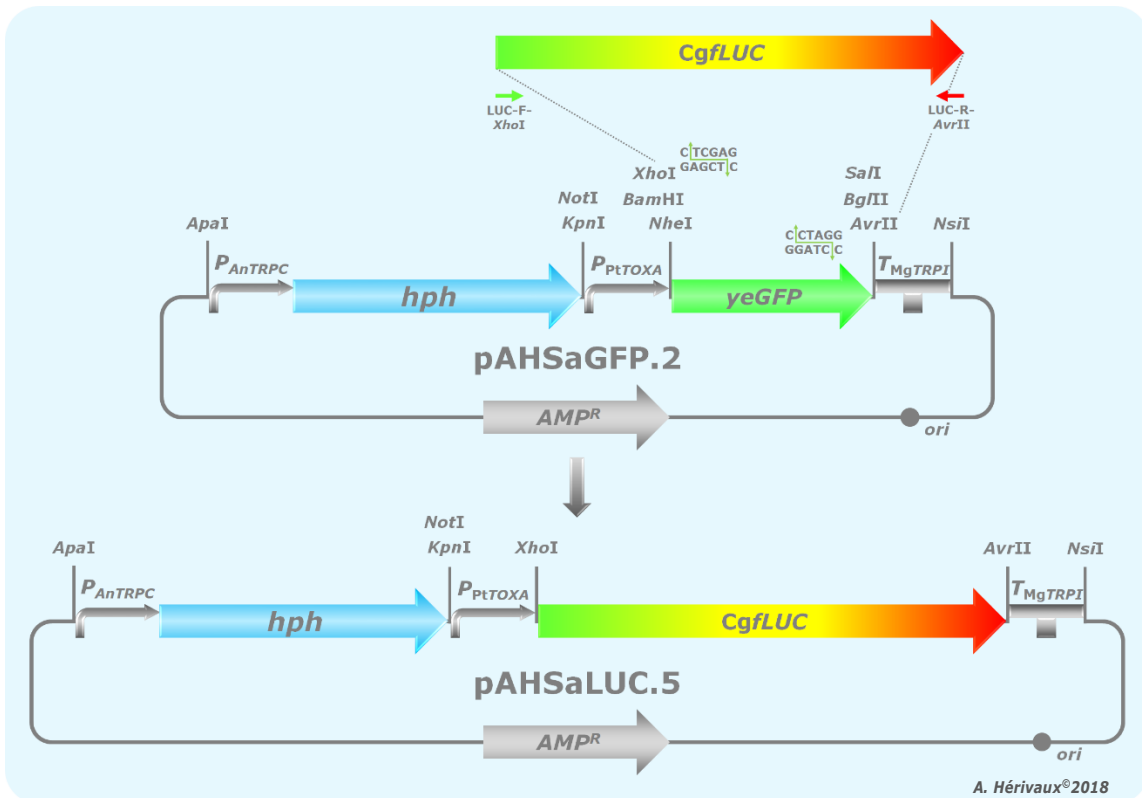


Figure 86. Construction de la cassette de bioluminescence par clonage dans le pAHSaGFP.2.

La séquence *Cgfluc* a été amplifiée à l'aide des amorces LUC-F-XhoI et LUC-R-AvrII puis insérée aux sites de restriction XhoI et AvrII dans le plasmide pAHSaGFP.2 à la place du gène *yeGFP*. Le plasmide pAHSaLUC.5 ainsi généré mesure environ 6,6 kb et contient la cassette de bioluminescence d'environ 3,7 kb.

est connu que le site de restriction *Xba*I peut être sensible à l'activité des méthylases bactériennes. Plus précisément, si le site de restriction 5' TCTAGA 3' est précédé par le doublet GA ou suivi de TC, alors l'un des résidus adénosine du site de restriction sera méthylé lors de l'amplification du plasmide par une souche bactérienne classique, comme celle utilisée au laboratoire. L'amorce LUC3-*Xba*I présentait des résidus GA en amont du site de restriction de l'enzyme, entraînant la méthylation du site de restriction lors des transformations bactériennes du pGEM®-T Easy. Cependant, l'extrémité 5' de l'amplicon CgfLUC_L2 étant digérée avant son intégration dans le vecteur pAHSaLUC_1, nous n'aurions pas dû être impactés par les phénomènes de méthylation et obtenir aisément le nouveau vecteur pAHSaLUC.2.

Devant ces difficultés, deux nouvelles stratégies ont été initiées. La première a consisté à amplifier individuellement la cassette de sélection à l'*Hyg*B et le promoteur P_{PtTOXA} , comme opéré pour la cassette de fluorescence, bien que générant la réalisation de 2 étapes de clonages alors qu'initialement une seule aurait suffi. De ce fait, les fragments HPH_L2 et P_{PtTOXA} _L2 issus du pCT74 ont été amplifiés par les couples d'amorces respectifs HPH-F-*Bst*XI/HPH-R-*Not*I et TOXA-F-*Not*I/TOXA-R-*Xba*I (Figure 85). Les fragments étant amplifiés, nous pouvions à présent envisager l'élaboration des vecteurs pAHSaLUC.3 et pAHSaLUC.4 (~ 6,6 kb).

La seconde stratégie a consisté à insérer le gène *CgfLUCopt* à la place du gène *SGFP* dans le plasmide fluorescent pAHSaGFP.2.

3.3.3. Clonage dans le pAHSaGFP.2

En parallèle des clonages dans le pKS, il a été possible d'envisager l'intégration du gène codant la protéine LUC à la place du gène *SGFP* dans le pAHSaGFP.2. La séquence codante de la protéine SGFP a donc été éliminée du vecteur pAHSaGFP.2 après digestion par *Xho*I et *Avr*II. Le fragment CgfLUC_L3 a été amplifié par PCR conventionnelle à l'aide des amorces LUC-F-*Xho*I et LUC-R-*Avr*II puis digéré par les mêmes enzymes que la SGFP de façon à ce qu'il puisse ensuite être intégré dans le vecteur aux mêmes sites de restriction et ainsi générer le vecteur pAHSaLUC.5 (~ 6,6 kb) (Figure 86). Les expérimentations concernant le développement d'une cassette d'IBL chez *S. apiospermum* en sont actuellement à ce point.

4. Conclusion générale

Concernant la cassette de fluorescence, il semblerait que la cassette finale ait été obtenue puisque le gène *SGFP* semble être inséré dans le vecteur pAHSaGFP.2. Cependant, lorsque nous procédons à des vérifications enzymatiques complémentaires, les profils électrophorétiques restent incohérents. Lorsque la cassette de fluorescence sera validée, il sera encore nécessaire de s'assurer de l'expression de la SGFP chez notre organisme fongique. Ensuite, des ADN complémentaires des HHKs seront générés puis insérés entre le P_{PtTOXA} et la SGFP. Nous espérons par cette approche à moyen terme pouvoir étudier la localisation subcellulaire des différentes HHKs identifiées chez *S. apiospermum*.

Concernant la cassette de bioluminescence, nous essayons d'intégrer en vain les fragments CgfLUC_L2 et CgfLUC_L3 dans leurs plasmides respectifs pAHSaLUC.1 et pAHSaGFP.2.

DISCUSSION GENERALE

ET PERSPECTIVES

Depuis le début des années 2000, il est admis que la famille des HKs est largement représentée dans l'ensemble des clades procaryotes et confère à ces micro-organismes la capacité de percevoir les variations environnementales. Ces protéines « senseurs » seraient notamment impliquées dans l'adaptation aux stressés et la virulence de nombreuses bactéries pathogènes (Mascher *et al.*, 2006). A l'ébauche de cette thèse, les connaissances concernant la structure et la distribution des HKs chez les eucaryotes étant limitées aux données disponibles chez les Streptophyta (plantes terrestres), les Dikarya (champignons supérieurs) et les Dictyostelides (amibes sociales) (Schaller *et al.*, 2011), nous avons souhaité dans un premier temps explorer *in silico* la distribution et la structure des HKs à travers les différents super-groupes eucaryotes.

D'autre part, les modifications environnementales, climatiques ou comportementales que nous connaissons depuis quelques années ont favorisé l'émergence de nombreuses maladies infectieuses. La lutte contre ces maladies passe par une bonne connaissance de l'écologie des micro-organismes en cause et de leur mode de transmission mais également par l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques qui pourrait résulter d'une meilleure compréhension de leur physiologie et de leurs mécanismes pathogéniques. Dans ce contexte, les travaux scientifiques développés par l'équipe du GEIHP portent depuis plus de 10 ans sur les infections respiratoires fongiques au cours de la mucoviscidose, et notamment celles causées par *Scedosporium apiospermum* qui se situe au deuxième rang parmi les champignons filamenteux. Dans le domaine de la microbiologie, les HKs attirant l'attention de la communauté scientifique depuis quelques années en tant que nouvelles cibles thérapeutiques pour le développement d'antibiotiques et d'antifongiques (Bem *et al.*, 2015 ; Shor and Chauhan 2015), nous avons ainsi proposé en parallèle des objectifs de bio-informatique d'étudier la fonction des HKs chez *S. apiospermum*.

Suite aux diverses expérimentations menées au cours de ce travail de thèse, nous proposons ici une discussion qui émane des différents résultats générés et qui s'ouvrira sur quelques perspectives.

Pour commencer, suite à l'invitation à rédiger une mini-revue dans le périodique *PLoS Pathogens*, il nous est apparu essentiel de progressivement appréhender la structure et la distribution des HKs chez l'ensemble des clades eucaryotes (Hérivaux *et al.*, 2016). En effet, les ressources génomiques ne cessant de se développer, il devenait possible alors d'identifier des séquences d'HKs dans des clades peu explorés jusqu'ici. Ainsi, une première étude bio-informatique s'est intéressée aux HKs chez les champignons inférieurs (*Early Diverging Fungi*, EDF) et a conduit à la publication d'un article dans le journal *mBio* (Hérivaux *et al.*, 2017). Dans la continuité, une seconde étude bio-informatique publiée dans le journal *Current Genetics* a été menée chez les levures *Saccharomycotina* afin de m'aguerrir aux outils de bio-informatique (Hérivaux *et al.*, 2018). Cette seconde étude nous a confortés dans l'idée d'initier une analyse bio-informatique des HKs « à plus grande échelle » et de l'étendre à l'ensemble des clades eucaryotes. Les résultats générés ont fait l'objet de la rédaction d'un article qui est en cours de révision pour publication dans le journal *Genome Biology and Evolution* (Kabbara *et al.*, unpublished).

Au-delà de consolider la classification des HKs fongiques décrites dans la revue précédente (*PloS Pathogens*) (Hérivaux *et al.*, 2016), l'article paru dans le journal *mBio* (Hérivaux *et al.*, 2017) a permis d'identifier pour la première fois chez les EDF des séquences homologues à celles de récepteurs à hormones (cytokinine et éthylène) décrits initialement chez les plantes. La présence de telles HKs chez les espèces EDF vivant en symbiose avec les végétaux suggère ainsi que ces récepteurs pourraient jouer un rôle majeur dans l'interaction des champignons inférieurs avec les plantes. De plus, compte tenu de la distribution de ces homologues de récepteurs à phytohormones dans la phylogénie des EDF, il serait même permis de spéculer sur une implication de ces récepteurs qui, au cours de l'évolution, auraient orchestrés via des communications hormonales il y a plus de 400 millions d'années les premières interactions champignons-plantes ayant potentialisées leur colonisation de l'espace terrestre. A plus large échelle, il semblerait que ces récepteurs à hormones soient impliqués dans les communications inter-organismes, mêmes entre espèces appartenant à des règnes différents. En effet, nous avons pu identifier des séquences homologues à ces récepteurs chez bien d'autres clades eucaryotes dans l'étude actuellement en révision pour le journal *Genome Biology and Evolution* (Kabbara *et al.*, unpublished). Ces résultats confortent d'ailleurs l'hypothèse exposée dans le manuscrit valorisé dans *mBio* mais aussi dans un second article récemment publié par l'étudiante Master 2 que j'ai pu encadrer durant ma seconde année de thèse (Kabbara *et al.*, 2018). Plus que la description de ces protéines homologues aux récepteurs à phytohormones chez divers clades eucaryotes, notre dernière étude de bio-informatique a également permis d'améliorer nos connaissances sur la distribution globale des HKs chez les eucaryotes. Nous avons pu en particulier décrire pour la première fois cette famille de protéines chez des super-groupes eucaryotes jusqu'alors jamais explorés (ex. Apusozoa, Excavata et SAR). La leçon sans doute la plus intéressante que nous avons pu tirer de cette étude émane de l'observation de l'acquisition progressive de diverses classes d'HKs dans certains clades et dont la fonction supposée peut être corrélée à l'acquisition de nouveaux traits physiologiques des organismes concernés au cours de l'évolution.

S'ajoutant aux objectifs principaux d'explorer la structure et la distribution des HKs chez les eucaryotes, nous souhaitons également à travers ces différentes études bio-informatiques développer nos connaissances concernant les mécanismes mis en jeu lors de l'acquisition et de la diversification structurale des HKs par les organismes eucaryotes. A cet effet, la littérature avançait jusqu'alors deux processus essentiels qui ont sans doute mené à l'acquisition d'un pool initial d'HKs chez les eucaryotes : l'endosymbiose mitochondriale puis l'endosymbiose d'une cyanobactérie ayant notamment aboutit à l'acquisition de plastes (Schaller *et al.*, 2011). Des évènements de duplication suivis de mutations à partir de cette série primitive de gènes HKs ont certainement par la suite participé à un premier niveau de diversification de ces protéines au sein des eucaryotes. Dans notre étude, nous avons pu mettre en évidence d'autres processus ayant potentiellement permis aux eucaryotes de diversifier leur batterie de gènes HKs au cours de l'évolution et relèveraient d'exceptionnelles intégrations d'ADN de virus géants ayant notamment abouti à l'acquisition de récepteurs aux cytokinines chez certains Straménopiles ou encore de sporadiques évènements plus ou moins récents de transferts latéraux de gènes (LGT pour *Lateral*

Gene Transfer) à partir de bactéries, bien plus rarement à partir d'autres eucaryotes (Kabbara *et al.*, unpublished).

Si l'élucidation des mécanismes à l'origine de l'acquisition et la diversification de la famille des HKs chez les eucaryotes a représenté un champ d'investigation passionnant dans mon projet, les différentes études *in silico* que nous avons menées dans le cadre de cette thèse ont également révélé le constat intrigant qu'une fois l'explosion précoce (multiplication et diversification des structures) des gènes HKs réalisée chez les eucaryotes, il semblerait que ces gènes soient par la suite progressivement perdus au cours de l'évolution. Bien que des profils différents aient pu être observés en fonction des clades considérés, une tendance commune concernant l'évolution tardive de la composition des génomes en gènes codant des HKs a pu être révélée à l'étude de deux super-groupes : les Archaeplastida (végétaux) et les Opisthokonta (incluant les champignons). En effet, les espèces végétales ancestrales, aux modes de vies aquatiques originels, semblent effectivement avoir tout d'abord diversifié leurs gènes HKs en vue de l'adaptation aux nouvelles contraintes environnementales liées à la colonisation progressive du milieu terrestre (détection d'HKs pouvant percevoir les chocs osmotiques, différentes ondes de lumière, les stress oxydants ou encore les nitrates chez les espèces représentant la transition « mode de vie aquatique »/ « mode de vie terrestre »). Une fois le processus de terrestrialisation opéré, les espèces végétales ont évolué vers des modes de vie et des écotopes de plus en plus spécialisés, et une perte progressive des gènes HKs y est associée. Il en va de même au sein du règne fongique. Suite à l'explosion du nombre de gènes HKs accompagnant la terrestrialisation, une perte progressive de ces gènes est observée au cours de l'évolution des espèces fongiques vers des modes de vies ou des écotopes de plus en plus spécialisés. Cette hypothèse est soutenue à travers les résultats générés chez les levures Saccharomycotina pour lesquelles une perte des gènes HKs par érosion des génomes a pu être mise en évidence (Hérivaux *et al.*, 2018). Il semblerait que la disparition tardive des HKs au cours de l'évolution ne soit pas exclusivement le résultat du phénomène d'érosion des génomes. En effet, l'activité HK est supposée être l'ancêtre de l'activité Ser/Thr kinase. Ceci est argumenté par le fait que le domaine catalytique des protéines HKs présente principalement des homologues avec celui des Ser/Thr kinases (Schaller *et al.*, 2011). De plus, certaines classes d'HKs, à l'instar des récepteurs à l'éthylène, les phytochromes ou encore les rhodopsines présentent à l'origine une activité HK chez les espèces primitives et moyennes mais une activité Ser/Thr kinase est décrite pour les protéines issues des gènes orthologues chez des espèces plus évoluées d'un même super-groupe. Une certitude reste que l'activité HK correspond à l'une des premières activités enzymatiques sélectionnées sur terre pour efficacement orchestrer les voies de signalisation cellulaires indispensables à la perception, la transduction et la mise en place de réponses adaptées des organismes aux différents signaux et contraintes du milieu dans lesquels ils se développent. Au cours de l'évolution des eucaryotes, il semblerait cependant que l'activité HK ait été progressivement remplacée par de nouvelles voies de signalisation (Ser/Thr kinases, Tyr kinases, voie de l'AMPc, protéines G, ...). Les spéculations pouvant justifier ce remplacement seront réservées à des aspects ayant trait à la thermodynamique et ne seront pas consolidées ici.

Une ultime interrogation, restant encore à ce jour énigmatique, concerne l'absence totale d'HKs chez les animaux. Fort heureusement, ce constat reste précisément la base de considération de ces protéines en tant que cibles thérapeutiques potentielles. Cependant, nous avons pu décrire une vingtaine de gènes codant des HKs chez l'espèce actuellement reconnue comme un ancêtre commun des différents clades animaux : *Capsaspora owczarzaki*. L'évolution rapide des génomes du règne animal semble corrélée avec l'éviction précoce des HKs des génomes ancestraux animaux. Cependant, les réels arguments génétiques expliquant cette absence de gènes *HKs* dans les génomes animaux demeurent plus qu'hypothétiques.

Le nombre de séquences de génomes disponibles allant exploser de manière exponentielle dans les années à venir, il sera possible dans un futur proche d'explorer à une échelle encore plus étendue la distribution de ces protéines chez les eucaryotes et donc de mieux appréhender l'évolution de ces senseurs.

Comme décrit dans la seconde partie des résultats présentés dans ce manuscrit, nos efforts ne se sont pas uniquement concentrés sur des aspects de bio-informatique. En effet, si l'exploration *in silico* de l'évolution de la structure et la distribution des HKs chez les eucaryotes m'est apparue un fascinant champ d'investigation, il n'en demeure pas moins qu'il est essentiel d'approfondir les connaissances concernant la fonctionnalité de ces protéines. Chez les champignons, les connaissances concernant le rôle des différents groupes d'HHKs restant très fragmentaires (Defosse et al., 2015 ; Hérivaux et al., 2016), le but de la seconde partie expérimentale a donc été de caractériser la fonction des HHKs chez l'espèce fongique modèle du laboratoire GEIHP : *S. apiospermum*.

Cette étude a été initiée par la recherche des gènes *HHKs* dans le génome de *S. apiospermum*. Au total, 8 protéines ont été identifiées. Jusqu'à ce jour, aucune recherche d'HHKs n'avait été menée chez les espèces appartenant aux Microascales. Les 8 HHKs identifiées appartiennent à 7 classes différentes : HHKIII, HHKIV, HHKV, HHKVI, HHKVIII, HHKX et HHKXI (Catlett et al., 2003). Parmi ces classes d'HHKs identifiées chez *S. apiospermum*, certaines sont également représentées chez les levures bourgeonnantes (Saccharomycotina). L'unique HHK de *S. cerevisiae* qui est considérée comme une espèce modèle levuriforme parmi les plus évoluée, appartient à la classe HHKVI (nommée Sln1p, un osmosenseur). Les 3 classes représentées chez *C. albicans* (HHKIII, HHKVI et HHKX) sont connues pour être impliquées dans la pathogénicité de cette levure. Enfin, l'espèce modèle basale de levures Saccharomycotina *Lipomyces starkeyi* présente 5 classes d'HHKs (HHKIII, HHKV, HHKVI, HHKX et HHKXI). La présence des 5 classes d'HHKs chez cette espèce basale de levure reflète sans doute les origines filamenteuses des Saccharomycotina (Hérivaux et al., 2018). Ainsi, *S. apiospermum* ne présente que deux classes supplémentaires d'HHKs par rapport aux levures (HHKIV et HHKVIII). Au sein des Ascomycota, la diversité des HHKs chez *S. apiospermum* est donc peu marquée comparé à d'autres espèces qui peuvent contenir jusqu'à 11 classes d'HHKs différentes (Catlett et al., 2003 ; Defosse et al., 2015 ; Hérivaux et al., 2016).

Bien que les classes IV, V, VI et XI aient également été démontrées comme liées à la virulence chez quelques espèces modèles telles qu'*A. fumigatus* (Clemons et al., 2002), *C. albicans* (Yamada-Okabe

et al., 1999) ou *M. oryzae* (Jacob *et al.*, 2014), les classes III et X restent les plus largement documentées comme impliquées dans les processus pathogéniques chez les champignons (Defosse *et al.*, 2015 ; Hérivaux *et al.*, 2016). C'est pourquoi les stratégies d'inactivation de gènes se sont tout d'abord focalisées vers l'obtention de mutants pour les gènes *HHKIII* et *HHKX*. En outre, peu de données étant disponibles sur les autres classes d'HHKs, nous avons également envisagé de les déléter chez *S. apiospermum*.

Il est essentiel de conserver à l'esprit que les expérimentations de génétique fongique et la génération de mutants n'étaient qu'à leurs prémices à mon arrivée au laboratoire pour débiter ma thèse. Ainsi, l'inactivation de 6 gènes chez *S. apiospermum* représentait réellement un projet ambitieux compte tenu des outils génétiques disponibles dans l'équipe et qui consistaient en deux marqueurs de sélection et un système de transformation qui avaient permis jusqu'à présent la génération d'un seul mutant (gène *CYR1* par le Dr. Vandeputte P.).

Dans l'optique de générer des mutants multiples ou encore d'envisager la construction de souches complémentées, de nouveaux marqueurs de résistance aux drogues devaient être identifiés. C'est pourquoi nous avons dans un premier temps initié des expériences visant à développer de nouveaux marqueurs de sélection pour la transgénèse de *S. apiospermum*. Ces recherches se sont malheureusement révélées infructueuses puisqu'aucun nouveau marqueur de sélection n'a pu être mis au point. En effet, les spores de *S. apiospermum* se sont montrées naturellement résistantes à un grand nombre de xénobiotiques testés (des profils différents de sensibilité aux drogues ont pu être observés chez les autres espèces de *Scedosporium* testées en parallèle). Quelques drogues semblaient pourtant prometteuses sur les spores mais les protoplastes correspondants ont révélé globalement une sensibilité moindre par rapport à ces composés. Ceci reste bien entendu surprenant. Il nous aurait semblé en effet plus cohérent que les protoplastes soient plus sensibles que les spores à ces molécules toxiques puisque les protoplastes sont dépourvus de paroi.

Au vu de nos résultats, les perspectives proposées ne s'orienteront donc pas vers l'identification de nouvelles drogues de sélection mais plutôt vers le développement d'un système de recyclage du marqueur de sélection. Dans cette optique et suite aux premiers essais de transgénèse, nous avons pu valider le premier système recyclable au laboratoire même si ce protocole mérite encore d'être optimisé. Grâce à ce nouvel outil, la complémentation de souches mutées est à présent envisageable dans l'équipe.

Au-delà de disposer de la capacité de recycler notre marqueur de sélection, générer facilement une souche mutante demeure un enjeu majeur puisque la souche de référence de *S. apiospermum*, IHEM 14462, présentait d'ores et déjà lors de nos expériences préliminaires un faible taux de recombinaison homologue des cassettes apportées par transgénèse. En effet, les Fungi, et plus particulièrement les champignons filamenteux, possèdent une voie dite de « réparation illégitime » ou « NHEJ » impliquant le complexe protéique Ku70/Ku80/Lig4. Dans le but de favoriser les événements de recombinaison homologue lors de la transgénèse de *S. apiospermum*, une souche *ku70Δ* a été générée. Cependant, les différents phénotypes des mutants issus de cette souche parentale devront être interprétés avec précaution car des différences ont pu être observées entre la souche *ku70Δ* et la souche sauvage IHEM 14462.

Comme relaté dans ce manuscrit, nous avons hélas dû faire face à de nombreux écueils. Toutefois, nous sommes parvenus à générer des souches mutantes pour le gène *HHKIII*. Des transformants ont également été obtenus pour les autres *HHKs* mais la caractérisation moléculaire de ces clones devra être finalisée. Lorsque les souches mutées auront été complémentées, bien d'autres phénotypes que ceux présentés dans le manuscrit seront étudiés tels que le dosage de la mélanine, l'étude de l'interaction hôte-pathogène *in vitro* (résistance à la phagocytose) ou encore des tests de virulence en modèle murin.

Parallèlement, les efforts sont à poursuivre afin d'optimiser les outils de biologie moléculaire actuellement disponibles au laboratoire. Suite aux expérimentations menées au cours de ce travail de thèse, il s'est avéré que la construction des cassettes de délétion ainsi que la transgénèse du champignon constituent des facteurs limitants en vue de l'obtention de mutants et donc de la caractérisation fonctionnelle des gènes chez *S. apiospermum*. Le système CRISPR/Cas9 (pour *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) pourrait permettre de lever ces verrous qui retardent continuellement nos programmes de recherche en génétique fongique. Ce système a été décrit initialement en 1987 chez *E. coli* puis il a été identifié chez de nombreuses autres espèces bactériennes (Lander, 2016 ; Peng et al., 2016). A l'origine, le système CRISPR-Cas9 de type II constitue un mécanisme de défense adaptatif des cellules bactériennes contre les agressions des bactériophages et des virus par scission de l'ADN (Lander, 2016 ; Wright et al., 2016). La protéine Cas9 reconnaît spécifiquement une séquence sur un ARN guide. Cet ARN possède une seconde séquence modifiable qui définit la cible. Ainsi, l'ARN guide se fixe sur l'ADN cible, la protéine Cas9 reconnaît la séquence présente sur cet ARN et induit une cassure double-brin de l'ADN cible via son activité endonucléase (Peng et al., 2016 ; Wang et al., 2016 ; Deng et al., 2017). Depuis le début des années 2010, ce système apparaît comme un nouvel outil puissant utilisé notamment pour l'inactivation de gènes. Au départ restreint aux cellules mammifères (Lander, 2016 ; Wright et al., 2016 ; Mojica et Montoliu, 2016), l'utilisation de ce nouvel outil se démocratise petit à petit chez les champignons filamenteux (Deng et al., 2017 ; Nødvig et al., 2015 ; Shi et al., 2017 ; Wang et al., 2017).

Pour finir, nous avons souhaité construire de nouveaux outils qui permettront à terme de développer l'imagerie de fluorescence et de bioluminescence chez *Scedosporium*. Ces approches sont au final encore très peu démocratisées dans le domaine de la mycologie médicale.

Actuellement, le vecteur permettant d'exprimer une GFP est en cours de validation. Une fois que la construction sera fonctionnelle, les premiers essais de localisation subcellulaire des *HHKs* pourront être entrepris. En effet, dans le cas où nos études phénotypiques de mutants révéleraient que les *HHKs* de *S. apiospermum* pourraient constituer de nouvelles cibles thérapeutiques, la localisation cellulaire de la cible fongique demeure une donnée indispensable au développement de nouveaux inhibiteurs (optimisation du ciblage). Les voies de signalisation impliquant des HKs sont à l'origine d'une cascade de phosphorylation. C'est pourquoi, l'inhibition de l'autophosphorylation de l'HK apparaît comme une cible précoce idéale. Plus précisément, la majorité des inhibiteurs d'HKs bactériennes actuellement en cours de développement

ciblent le domaine cytoplasmique de liaison à l'ATP de l'HK puisque celui-ci n'est pas présent chez les Ser/Thr kinases et les Tyr kinases (Wilke *et al.*, 2015 ; Velikova *et al.*, 2016 ; Tiwari *et al.*, 2017 ; Utsumi *et al.*, 2017 ; Wilke *et al.*, 2018). L'inhibition de l'autophosphorylation de l'HK peut également résulter de la fixation d'un inhibiteur sur le domaine de dimérisation (H-box) ou le domaine de régulation de la réponse (Tiwari *et al.*, 2017 ; Utsumi *et al.*, 2017). Malheureusement, ces molécules, bien que démontrant une capacité d'inhibition effective de l'HK, sont généralement toxiques pour la cellule mammifère (Wilke *et al.*, 2015).

L'imagerie de fluorescence au laboratoire ne devra pas seulement se limiter à l'expression de protéines de fusion avec la seule GFP pour la localisation cellulaire. D'autres variants de gènes codant des protéines fluorescentes, comme ceux codant la *Yellow Fluorescent Protein* (YFP), la *Cyan Fluorescent Protein* (CFP) et la *Red Fluorescent Protein* (RFP) devront être expérimentés dans l'équipe. En effet, les protéines fluorescentes peuvent également permettre d'appréhender la dynamique de protéines ou encore les interactions protéines-protéines mais ces approches nécessitent au préalable la disponibilité de divers variants de protéines fluorescentes (Enterina *et al.*, 2015 ; Senutovitch *et al.*, 2015). Mettre au point ce type de technologies deviendra à court terme un enjeu majeur dans l'équipe dans le cadre du développement progressif de thèmes de recherche liés à l'étude des voies de signalisation cellulaires.

Depuis quelques années, les travaux menés au sein du laboratoire s'appliquent notamment à générer des souches mutantes pour des gènes qui sont potentiellement impliqués dans la virulence de *S. apiospermum* et qui pourraient constituer de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles (ex. gène *CYR1* impliqué dans la résistance aux antifongiques azolés, gène *ACYA* qui code une adénylate cyclase responsable de l'accumulation progressive de mélanine dans la paroi du champignon qui est ensuite capable d'échapper à la réponse immunitaire, gènes impliqués dans le métabolisme du fer, gènes codant les HHKs, ...). Si les techniques classiques d'étude phénotypique sont bien maîtrisées par les chercheurs de notre groupe, l'absence d'un système simple d'évaluation de la virulence de nos souches de *S. apiospermum*, et en particulier les mutants, freine notre capacité à finaliser nos approches de génomique fonctionnelle. Le système d'évaluation de la virulence des souches par la technologie d'imagerie de bioluminescence (IBL) que nous proposons de développer en dernière partie de ce travail viendrait donc compléter l'arsenal des techniques à notre disposition pour valider la fonction des gènes candidats potentiellement impliqués dans l'adaptation et la virulence du champignon. Cette approche s'inscrit donc parfaitement dans notre stratégie globale visant à identifier de nouvelles cibles fongiques ce qui constitue une étape importante pour le développement de nouveaux inhibiteurs utilisés seuls ou en association avec les antifongiques actuels. Depuis quelques années, de nouveaux modèles animaux sont proposés pour étudier la pathogénicité de différents micro-organismes, y compris des champignons comme *A. fumigatus* ou *C. albicans*. Ces mini-modèles s'imposent progressivement comme des alternatives intéressantes à l'usage de modèles murins dans le domaine de l'infectiologie (le papillon de nuit *Galleria mellonella*, le ver de farine *Tenebrio molitor* ou encore la larve de poisson zèbre *Danio rerio*) (Papon *et al.*, 2014). A la différence des techniques de PCR développées pour apprécier la charge fongique dans les organes, qui ne sont pas toujours transférables d'une espèce à une autre, la souche bioluminescente de *S. apiospermum*

que nous produirons sera également transposable à ces nouveaux modèles expérimentaux. Enfin, par le suivi *in vivo* et en temps réel de l'infection, ces systèmes d'imagerie s'imposent de plus en plus pour la recherche de nouveaux protocoles thérapeutiques. En effet, contrairement à l'approche classique basée sur le sacrifice des animaux et l'analyse des organes par rétrocultures ou PCR quantitative, ce système non-invasif de détection permet un suivi en temps réel de la progression/régression de l'infection par le pathogène, minimisant ainsi le nombre d'animaux nécessaires. Il existe une forte demande au sein même de notre équipe pour ce dernier aspect dans la mesure où un de nos axes thématiques consiste à rechercher de nouveaux protocoles thérapeutiques visant à améliorer le traitement des scédosporioses disséminées (Dr. Lelièvre B). Compléter la construction d'expression de la luciférase et obtenir une souche bioluminescente de *S. apiospermum* constituent aujourd'hui une des priorités de notre équipe.

BIBLIOGRAPHIE

- ✓ Abzug M. J. et T. J. Walsh. **2004**. « Interferon-gamma and colony-stimulating factors as adjuvant therapy for refractory fungal infections in children ». *The Pediatric Infectious Disease Journal* 23 (8): 769-73.
- ✓ Accurso F. J. **2007**. « Update in cystic fibrosis 2006 ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 175 (8): 754-57. <https://doi.org/10.1164/rccm.200701-160UP>.
- ✓ Ahmed J, D. M. Ditmars, T. Sheppard, R. del Busto, K. K. Venkat et R. Parasuraman. **2004**. « Recurrence of *Scedosporium apiospermum* infection following renal re-transplantation ». *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 4 (10): 1720-24. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2004.00576.x>.
- ✓ Alanio A et S. Bretagne. **2017**. « Performance evaluation of multiplex PCR including *Aspergillus*-not so simple! ». *Medical Mycology* 55 (1): 56-62. <https://doi.org/10.1093/mmy/myw080>.
- ✓ Albarrag A. M., M. J. Anderson, S. J. Howard, G. D. Robson, P. A. Warn, D. Sanglard et D. W. Denning. **2011**. « Interrogation of related clinical pan-azole-resistant *Aspergillus fumigatus* strains: G138C, Y431C, and G434C single nucleotide polymorphisms in Cyp51A, upregulation of Cyp51A, and integration and activation of transposon Atf1 in the Cyp51A promoter ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55 (11): 5113-21. <https://doi.org/10.1128/AAC.00517-11>.
- ✓ Albernaz V., B. Huston, M. Castillo, S. Mukherji et T. W. Bouldin. **1996**. « *Pseudallescheria boydii* infection of the brain: imaging with pathologic confirmation ». *AJNR. American Journal of Neuroradiology* 17 (3): 589-92.
- ✓ Alvarez E. et C. Sanhueza. **2016**. « New record of *Scedosporium dehoogii* from Chile: phylogeny and susceptibility profiles to classic and Novel putative antifungal agents ». *Revista Iberoamericana De Micología* 33 (4): 224-29. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2016.03.007>.
- ✓ Amaral M. D. **2015**. « Novel personalized therapies for cystic fibrosis: treating the basic defect in all patients ». *Journal of Internal Medicine* 277 (2): 155-66. <https://doi.org/10.1111/joim.12314>.
- ✓ Amich J., L. Schafferer, H. Haas et S. Krappmann. **2013**. « Regulation of sulphur assimilation is essential for virulence and affects iron homeostasis of the human-pathogenic mould *Aspergillus fumigatus* ». *PLoS Pathogens* 9 (8): e1003573. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003573>.
- ✓ Andersen D. H. **1938**. « Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease: a clinical and pathologic study ». *American Journal of Diseases of Children* 56 (2): 344-99. <https://doi.org/10.1001/archpedi.1938.01980140114013>.
- ✓ Angelastro P. S., O. Sliusarenko et C. Jacobs-Wagner. **2010**. « Polar localization of the CckA histidine kinase and cell cycle periodicity of the essential master regulator CtrA in *Caulobacter crescentus* ». *Journal of Bacteriology* 192 (2): 539-52. <https://doi.org/10.1128/JB.00985-09>.
- ✓ Arif S. et J. R. Perfect. **2017**. « Emergence of the molds other than *Aspergillus* in immunocompromised patients ». *Clinics in Chest Medicine* 38 (3): 555-73. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2017.04.014>.
- ✓ Attwood P. V. **2013**. « Histidine kinases from bacteria to humans ». *Biochemical Society Transactions* 41 (4): 1023-28. <https://doi.org/10.1042/BST20130019>.
- ✓ Bacconi A., G. S. Richmond, M. A. Baroldi, T. G. Laffler, L. B. Blyn, H. E. Carolan, M. R. Frinder, D. M. Toleno, D. Metzgar, J. R. Gutierrez, C. Massire, M. Rounds, N. J. Kennel, R. E. Rothman, S. Peterson, K. C. Carroll, T. Wakefield, D. J. Ecker et R. Sampath. **2014**. « Improved sensitivity for molecular detection of bacterial and *Candida* infections in blood ». *Journal of Clinical Microbiology* 52 (9): 3164-74. <https://doi.org/10.1128/JCM.00801-14>.
- ✓ Baxter C. G., G. Dunn, A. M. Jones, K. Webb, R. Gore, M. D. Richardson et D. W. Denning. **2013**. « Novel immunologic classification of aspergillosis in adult cystic fibrosis ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 132 (3): 560-566.e10. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.04.007>.
- ✓ Bayram O., G. H. Braus, R. Fischer et J. Rodriguez-Romero. **2010**. « Spotlight on *Aspergillus nidulans* photosensory systems ». *Fungal Genetics and Biology: FG & B* 47 (11): 900-908. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2010.05.008>.
- ✓ Bellis G., C. Dehillotte et L. Lemonnier. **2017**. Registre français de la mucoviscidose – Bilan des données 2016.
- ✓ Bellis G., C. Dehillotte et L. Lemonnier. **2016**. Registre français de la mucoviscidose – Bilan des données 2015.
- ✓ Bem A. E., N. Velikova, M. T. Pellicer, P. van Baarlen, A. Marina et J. M. Wells. **2015**. « Bacterial histidine kinases as novel antibacterial drug targets ». *ACS Chemical Biology* 10 (1): 213-24. <https://doi.org/10.1021/cb5007135>.
- ✓ Berenguer J., J. Diaz-Mediavilla, D. Urrea et P. Muñoz. **1989**. « Central nervous system infection caused by *Pseudallescheria boydii*: case report and review ». *Reviews of Infectious Diseases* 11 (6): 890-96.
- ✓ Bernhard M., A. E. Zautner, J. Steinmann, M. Weig, U. Groß et O. Bader. **2016**. « Towards proteomic species barcoding of fungi - an example using *Scedosporium/Pseudallescheria* complex isolates ». *Fungal Biology* 120 (2): 162-65. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2015.07.001>.
- ✓ Bernhardt A., L. Sedlacek, S. Wagner, C. Schwarz, B. Würstl et K. Tintelnot. **2013**. « Multilocus sequence typing of *Scedosporium apiospermum* and *Pseudallescheria boydii* isolates from cystic fibrosis patients ». *Journal of*

- Cystic Fibrosis: Official Journal of the European Cystic Fibrosis Society* 12 (6): 592-98. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2013.05.007>.
- ✓ Bertrand S., J. P. Bouchara, M. C. Venier, P. Richomme, O. Duval et G. Larcher. **2010**. « N(a)-methyl coprogen B, a potential marker of the airway colonization by *Scedosporium apiospermum* in patients with cystic fibrosis ». *Medical Mycology* 48 Suppl 1 (novembre): S98-107. <https://doi.org/10.3109/13693786.2010.503972>.
 - ✓ « Biologie médicale N 25. Cahier Formation les moisissures d'intérêt médical. Mars PDF ». s. d. Consulté le 1 septembre 2018. <https://docplayer.fr/7573503-Biologie-medicale-n-25-c-ahier-formation-les-moisissures-d-interet-medical-mars-2002.html>.
 - ✓ Biswas C., T. C. Sorrell, J. T. Djordjevic, X. Zuo, K. A. Jolliffe et S. C. A. Chen. **2013**. « *In vitro* activity of miltefosine as a single agent and in combination with voriconazole or posaconazole against uncommon filamentous fungal pathogens ». *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 68 (12): 2842-46. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt282>.
 - ✓ Bloemendal S., D. Löper, D. Terfehr, K. Kopke, J. Kluge, I. Teichert et U. Kück. **2014**. « Tools for advanced and targeted genetic manipulation of the β -Lactam antibiotic producer *Acremonium chrysogenum* ». *Journal of Biotechnology* 169 (janvier): 51-62. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.10.036>.
 - ✓ a. Blyth C. C., A. Harun, P. G. Middleton, S. Sleiman, O. Lee, T. C. Sorrell, W. Meyer et S. C. A. Chen. **2010**. « Detection of occult *Scedosporium* species in respiratory tract specimens from patients with cystic fibrosis by use of selective media ». *Journal of Clinical Microbiology* 48 (1): 314-16. <https://doi.org/10.1128/JCM.01470-09>.
 - ✓ b. Blyth C. C., P. G. Middleton, A. Harun, T. C. Sorrell, W. Meyer et S. C. A. Chen. **2010**. « Clinical associations and prevalence of *Scedosporium* spp. in Australian cystic fibrosis patients: identification of novel risk factors? ». *Medical Mycology* 48 Suppl 1 (novembre): S37-44. <https://doi.org/10.3109/13693786.2010.500627>.
 - ✓ Bobadilla J. L., M. Macek, J. P. Fine et P. M. Farrell. **2002**. « Cystic fibrosis: a worldwide analysis of CFTR mutations--correlation with incidence data and application to screening ». *Human Mutation* 19 (6): 575-606. <https://doi.org/10.1002/humu.10041>.
 - ✓ Boeke J. D., F. LaCroute et G. R. Fink. **1984**. « A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-fluoro-orotic acid resistance ». *Molecular & General Genetics: MGG* 197 (2): 345-46.
 - ✓ Bonifaz A., A. Tirado-Sánchez, L. Calderón, A. Saúl, J. Araiza, M. Hernández, G. M. González et R. M. Ponce. **2014**. « Mycetoma: experience of 482 cases in a single center in Mexico ». *PLoS Neglected Tropical Diseases* 8 (8): e3102. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003102>.
 - ✓ Borman A. M., M. D. Palmer, L. Delhaes, J. Carrère, L. Favennec, S. Ranque, J. P. Gangneux, R. Horré et J. P. Bouchara. **2010**. « Lack of standardization in the procedures for mycological examination of sputum samples from CF patients: a possible cause for variations in the prevalence of filamentous fungi ». *Medical Mycology* 48 Suppl 1 (novembre): S88-97. <https://doi.org/10.3109/13693786.2010.511287>.
 - ✓ Bouchara J. P., H. Yi Hsieh, S. Croquefer, R. Barton, V. Marchais, M. Pihet et T. Chain Chang. **2009**. « Development of an oligonucleotide array for direct detection of fungi in sputum samples from patients with cystic fibrosis ». *Journal of Clinical Microbiology* 47 (1): 142-52. <https://doi.org/10.1128/JCM.01668-08>.
 - ✓ Boyce K. J., L. Schreider, L. Kirszenblat et A. Andrianopoulos. **2011**. « The two-component histidine kinases DrkA and SlnA are required for *in vivo* growth in the human pathogen *Penicillium marneffeii* ». *Molecular Microbiology* 82 (5): 1164-84. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07878.x>.
 - ✓ Boyd J. M. **2000**. « Localization of the histidine kinase PilS to the poles of *Pseudomonas aeruginosa* and identification of a localization domain ». *Molecular Microbiology* 36 (1): 153-62.
 - ✓ Boyle M. P. et K. De Boeck. **2013**. « A new era in the treatment of cystic fibrosis: correction of the underlying CFTR defect ». *The Lancet. Respiratory Medicine* 1 (2): 158-63. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(12\)70057-7](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(12)70057-7).
 - ✓ Bryan C. S., A. F. DiSalvo, L. Kaufman, W. Kaplan, A. H. Brill et D. C. Abbott. 1980. « *Petriellidium boydii* infection of the sphenoid sinus ». *American Journal of Clinical Pathology* 74 (6): 846-51.
 - ✓ Bui D. K. et P. E. Carvounis. **2016**. « Favorable outcomes of filamentous fungal endophthalmitis following aggressive management ». *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics: The Official Journal of the Association for Ocular Pharmacology and Therapeutics* 32 (9): 623-30. <https://doi.org/10.1089/jop.2016.0055>.
 - ✓ Buryanov Y. I., I. G. Bogdarina et A. A. Bayev. **1978**. « Site specificity and chromatographic properties of *E. Coli* K12 and EcoRIIDNA-cytosine methylases ». *FEBS Letters* 88 (2): 251-54.
 - ✓ Buzina W., G. Feierl, D. Haas, F. F. Reinthaler, A. Holl, R. Kleinert, B. Reichenpfader, P. Roll et E. Marth. **2006**. « Lethal brain abscess due to the fungus *Scedosporium apiospermum* (Teleomorph *Pseudallescheria boydii*) after a near-drowning incident: case report and review of the literature ». *Medical Mycology* 44 (5): 473-77. <https://doi.org/10.1080/13693780600654588>.
 - ✓ Caesar K., A. M. K. Thamm, J. Witthöft, K. Elgass, P. Huppenberger, C. Grefen, J. Horak et K. Harter. **2011**. « Evidence for the localization of the *Arabidopsis* cytokinin receptors AHK3 and AHK4 in the endoplasmic reticulum ». *Journal of Experimental Botany* 62 (15): 5571-80. <https://doi.org/10.1093/jxb/err238>.

- ✓ Caira M., C. Girmenia, C. G. Valentini, M. Sanguinetti, A. Bonini, G. Rossi, L. Fianchi, G. Leone et L. Pagano. **2008**. « Scedosporiosis in patients with acute leukemia: a retrospective multicenter report ». *Haematologica* 93 (1): 104-10. <https://doi.org/10.3324/haematol.11740>.
- ✓ Cairns T. C., D. J. Studholme, N. J. Talbot et K. Haynes. **2016**. « New and improved techniques for the study of pathogenic fungi ». *Trends in Microbiology* 24 (1): 35-50. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.09.008>.
- ✓ Calera J. A., G. H. Choi et R. A. Calderone. **1998**. « Identification of a putative histidine kinase two-component phosphorelay gene (CaHK1) in *Candida albicans* ». *Yeast* 14 (7): 665-74. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(199805\)14:7<665::AID-YEA246>3.0.CO;2-#](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(199805)14:7<665::AID-YEA246>3.0.CO;2-#).
- ✓ Cant N., N. Pollock et R. C. Ford. **2014**. « CFTR structure and cystic fibrosis ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 52 (juillet): 15-25. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2014.02.004>.
- ✓ Capilla J., E. Mayayo, C. Serena, F. J. Pastor et J. Guarro. **2004**. « A novel murine model of cerebral scedosporiosis: lack of efficacy of amphotericin B ». *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 54 (6): 1092-95. <https://doi.org/10.1093/jac/dkh468>.
- ✓ Carroll A., J. Sweigard et B. Valent. 1994. « Improved vectors for selecting resistance to hygromycin ». *Fungal Genetics Reports* 41 (1): 22. <https://doi.org/10.4148/1941-4765.1367>.
- ✓ Castanheira M., F. P. Duncanson, D. J. Diekema, J. Guarro, R. N. Jones et M. A. Pfaller. **2012**. « Activities of E1210 and Comparator Agents Tested by CLSI and EUCAST Broth Microdilution Methods against *Fusarium* and *Scedosporium* Species Identified Using Molecular Methods ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56 (1): 352-57. <https://doi.org/10.1128/AAC.05414-11>.
- ✓ Castellani C., H. Cuppens, M. Macek, J. J. Cassiman, E. Kerem, P. Durie, E. Tullis, B. M. Assael, C. Bombieri, A. Brown, T. Casals, M. Claustres, G. R. Cutting, E. Dequeker, J. Dodge, I. Doull, P. Farrell, C. Ferec, E. Girodon, M. Johannesson, B. Kerem, M. Knowles, A. Lunck, P. F. Pignatti, D. Radojkovic, P. Rizzotti, M. Schwarz, M. Stuhmann, M. Tzetis, J. Zielenski et J. S. Elborn. **2008**. « Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice ». *Journal of Cystic Fibrosis: Official Journal of the European Cystic Fibrosis Society* 7 (3): 179-96. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2008.03.009>.
- ✓ Castiglioni B., D. A. Sutton, M. G. Rinaldi, J. Fung et S. Kusne. **2002**. « *Pseudallescheria boydii* (Anamorph *Scedosporium apiospermum*). Infection in solid organ transplant recipients in a tertiary medical center and review of the literature ». *Medicine* 81 (5): 333-48.
- ✓ Castro L. G., W. Belda Júnior, A. Salebian et L. C. Cucé. **1993**. « Mycetoma: a retrospective study of 41 cases seen in São Paulo, Brazil, from 1978 to 1989 ». *Mycoses* 36 (3-4): 89-95.
- ✓ Catlett N. L., O. C. Yoder et B. G. Turgeon. **2003**. « Whole-genome analysis of two-component signal transduction genes in fungal pathogens ». *Eukaryotic Cell* 2 (6): 1151-61.
- ✓ Chen M., J. Zeng, G. S. de Hoog, B. Stielow, A. H. G. G. Van Den Ende, W. Liao et M. Lackner. **2016**. « The "species complex" issue in clinically relevant fungi: a case study in *Scedosporium apiospermum* ». *Fungal Biology* 120 (2): 137-46. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2015.09.003>.
- ✓ Choquer M., E. Fournier, C. Kunz, C. Levis, J. M. Pradier, A. Simon et M. Viaud. **2007**. « *Botrytis cinerea* virulence factors: new insights into a necrotrophic and polyphagous pathogen ». *FEMS Microbiology Letters* 277 (1): 1-10. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00930.x>.
- ✓ Cimon B., M. Pihet et J. P. Bouchara. **2015**. « Infections dues aux champignons du genre *Scedosporium* et apparentés ». /data/traites/bio/emb-62777/, septembre. <http://emvmsa1a.jouve-hdi.com/article/1004043>.
- ✓ Cimon, Bernard, Dominique Chabasse, et Jean-Philippe Bouchara. **2008**. « Rôle des champignons dans la pathologie respiratoire au cours de la mucoviscidose ». /data/revues/1773035X/00370397/59/, mai. <http://www.em-consulte.com/en/article/158829>.
- ✓ Cimon B., J. Carrère, J. F. Vinatier, J. P. Chazalotte, D. Chabasse et J. P. Bouchara. **2000**. « Clinical significance of *Scedosporium apiospermum* in patients with cystic fibrosis ». *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology* 19 (1): 53-56.
- ✓ Ciuffetti L. M., R. P. Tuori et J. M. Gaventa. **1997**. « A single gene encodes a selective toxin causal to the development of tan spot of wheat. » *The Plant Cell* 9 (2): 135-44. <https://doi.org/10.1105/tpc.9.2.135>.
- ✓ Clemons K. V., T. K. Miller, C. P. Selitrennikoff et D. A. Stevens. **2002**. « Fos-1, a putative histidine kinase as a virulence factor for systemic aspergillosis ». *Medical Mycology* 40 (3): 259-62.
- ✓ Cohen-Cyberknoh M., D. Shoseyov et E. Kerem. **2011**. « Managing cystic fibrosis: strategies that increase life expectancy and improve quality of life ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 183 (11): 1463-71. <https://doi.org/10.1164/rccm.201009-1478CI>.
- ✓ Collins F. S. **1992**. « Cystic fibrosis: molecular biology and therapeutic implications ». *Science (New York, N.Y.)* 256 (5058): 774-79.
- ✓ Compain F., F. Botterel, E. Sitterlé, A. Paugam, M. E. Bognoux et E. Dannaoui. **2015**. « *In vitro* activity of miltefosine in combination with voriconazole or amphotericin B against clinical isolates of *Scedosporium* spp ». *Journal of Medical Microbiology* 64 (Pt 3): 309-11. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000019>.

- ✓ Cormack B. **1998**. « Green fluorescent protein as a reporter of transcription and protein localization in fungi ». *Current Opinion in Microbiology* 1 (4): 406-10.
- ✓ Cormack B. P., G. Bertram, M. Egerton, N. A. Gow, S. Falkow et A. J. Brown. **1997**. « Yeast-enhanced green fluorescent protein (YEGFP): a reporter of gene expression in *Candida albicans* ». *Microbiology (Reading, England)* 143 (Pt 2) (février): 303-11. <https://doi.org/10.1099/00221287-143-2-303>.
- ✓ Coron N., M. Pihet, E. Fréalle, Y. Lemeille, C. Pinel, H. Pelloux, G. Gargala, L. Favennec, I. Accoceberry, I. Durand-Joly, F. Dalle, F. Huet, A. Fanton, A. Boldron, G. A. Loeuille, P. Domblides, B. Coltey, I. Pin, C. Llerena, F. Troussier, C. Person, C. Marguet, N. Wizla, C. Thumerelle, D. Turck, S. Bui, M. Fayon, A. Duhamel, A. Prévotat, B. Wallaert, S. Leroy, J. P. Bouchara et L. Delahès. **2018**. « Toward the standardization of mycological examination of sputum samples in cystic fibrosis: results from a french multicenter prospective study ». *Mycopathologia* 183 (1): 101-17. <https://doi.org/10.1007/s11046-017-0173-1>.
- ✓ Cortez K. J., E. Roilides, F. Quiroz-Telles, J. Meletiadis, C. Antachopoulos, T. Knudsen, W. Buchanan, J. Milanovich, D. A. Sutton, A. Fothergill, M. G. Rinaldi, Y. R. Shea, T. Zaoutis, S. Kottitil et T. J. Walsh. **2008**. « Infections caused by *Scedosporium* spp. » *Clinical Microbiology Reviews* 21 (1): 157-97. <https://doi.org/10.1128/CMR.00039-07>.
- ✓ Coulibaly O., C. Marinach-Patrice, C. Cassagne, R. Piarroux, D. Mazier et S. Ranque. **2011**. « *Pseudallescheria/Scedosporium* complex species identification by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry ». *Medical Mycology* 49 (6): 621-26. <https://doi.org/10.3109/13693786.2011.555424>.
- ✓ Crous P. W., M. J. Wingfield, T. I. Burgess, G. E. St J. Hardy, C. Crane, S. Barrett, J. F. Cano-Lira, et al. **2016**. « Fungal planet description sheets: 469-557 ». *Persoonia* 37: 218-403. <https://doi.org/10.3767/003158516X694499>.
- ✓ Cuenca-Estrella M., A. Alastruey-Izquierdo, L. Alcazar-Fuoli, L. Bernal-Martinez, A. Gomez-Lopez, M. J. Buitrago, E. Mellado et J. L. Rodriguez-Tudela. **2008**. « *In vitro* activities of 35 double combinations of antifungal agents against *Scedosporium apiospermum* and *Scedosporium prolificans* ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52 (3): 1136-39. <https://doi.org/10.1128/AAC.01160-07>.
- ✓ Davis P. B. **2006**. « Cystic fibrosis since 1938 ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 173 (5): 475-82. <https://doi.org/10.1164/rccm.200505-840OE>.
- ✓ Dean R. A., N. J. Talbot, D. J. Ebole, M. L. Farman, T. K. Mitchell, M. J. Orbach, M. Thon, R. Kulkarni, J. R. Xu, H. Pan, N. D. Read, Y. H. Lee, I. Carbone, D. Brown, Y. Y. Oh, N. Donofrio, J. S. Jeong, D. M. Soanes, S. Djonovic, E. Kolomiets, C. Rehmeier, W. Li, M. Harding, S. Kim, M.H. Lebrun, H. Bohnert, S. Coughlan, J. Butler, S. Calvo, L. J. Ma, R. Nicol, S. Purcell, C. Nusbaum, J. E. Galagan et B. W. Birren. **2005**. « The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* ». *Nature* 434 (7036): 980-86. <https://doi.org/10.1038/nature03449>.
- ✓ Debeljak N., M. Fink et D. Rozman. **2003**. « Many facets of mammalian lanosterol 14alpha-demethylase from the evolutionarily conserved cytochrome P450 family CYP51 ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 409 (1): 159-71.
- ✓ Defontaine A., R. Zouhair, B. Cimon, J. Carrère, E. Bailly, F. Symoens, M. Diouri, J. N. Hallet et J. P. Bouchara. **2002**. « Genotyping study of *Scedosporium apiospermum* isolates from patients with cystic fibrosis ». *Journal of Clinical Microbiology* 40 (6): 2108-14. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.6.2108-2114.2002>.
- ✓ Defosse T. A., V. Courdavault, A. T. Coste, M. Clastre, T. Dugé de Bernonville, C. Godon, P. Vandeputte, A. Lanoue, A. Touzé, T. Linder, S. droby, C. A. Rosa, D. Sanglard, C. D'Enfert, J. P. Bouchara, N. Giglioli-Guivarc'h et N. Papon. **2018**. « A standardized toolkit for genetic engineering of CTG clade yeasts ». *Journal of Microbiological Methods* 144 (janvier): 152-56. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2017.11.015>.
- ✓ Defosse T. A., A. Sharma, A. K. Mondal, T. Dugé de Bernonville, J. P. Latgé, R. Calderone, N. Giglioli-Guivarc'h, V. Courdavault, M. Clastre et N. Papon. **2015**. « Hybrid histidine kinases in pathogenic fungi ». *Molecular Microbiology* 95 (6): 914-24. <https://doi.org/10.1111/mmi.12911>.
- ✓ Defosse T. A., C. Melin, E. J. Obando Montoya, A. Lanoue, E. Foureau, G. Glévarec, A. Oudin, A. J. Simkin, J. Crèche, L. Atehortúa, N. Giglioli-Guivarc'h, M. Clastre, V. Courdavault et N. Papon. **2014**. « A new series of vectors for constitutive, inducible or repressible gene expression in *Candida guilliermondii* ». *Journal of Biotechnology* 180 (juin): 37-42. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.03.034>.
- ✓ Delaroque N., D. G. Müller, G. Bothe, T. Pohl, R. Knippers et W. Boland. **2001**. « The complete DNA sequence of the *Ectocarpus siliculosus* Virus EsV-1 Genome ». *Virology* 287 (1): 112-32. <https://doi.org/10.1006/viro.2001.1028>.
- ✓ Deng H., R. Gao, X. Liao et Y. Cai. **2017**. « CRISPR system in filamentous fungi: current achievements and future directions ». *Gene* 627 (septembre): 212-21. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.06.019>.
- ✓ Devi S. N., M. Vishnoi, B. Kiehler, L. Haggett et M. Fujita. **2015**. « *In vivo* functional characterization of the transmembrane histidine kinase KinC in *Bacillus subtilis* ». *Microbiology (Reading, England)* 161 (Pt 5): 1092-1104. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000054>.
- ✓ Duan Y., C. Ge, S. Liu, J. Wang et M. Zhou. **2013**. « A two-component histidine kinase Shk1 controls stress response, sclerotial formation and fungicide resistance in *Sclerotinia sclerotiorum* ». *Molecular Plant Pathology* 14 (7): 708-18. <https://doi.org/10.1111/mpp.12041>.

- ✓ Duvaux L., J. Shiller, P. Vandeputte, T. Dugé de Bernonville, C. Thornton, N. Papon, B. Le Cam, J. P. Bouchara et A. Gastebois. **2017**. « Draft genome sequence of the human-pathogenic fungus *Scedosporium boydii* ». *Genome Announcements* 5 (37). <https://doi.org/10.1128/genomeA.00871-17>.
- ✓ Elborn J. S. **2016**. « Cystic fibrosis ». *The Lancet* 388 (10059): 2519-31. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00576-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00576-6).
- ✓ Elizondo-Zertuche M., A. M. Montoya, E. Robledo-Leal, I. Garza-Veloz, A. L. Sánchez-Núñez, R. Ballesteros-Elizondo et G. M. González. **2017**. « Comparative pathogenicity of *Lomentospora prolificans* (*Scedosporium prolificans*) isolates from Mexican patients ». *Mycopathologia* 182 (7-8): 681-89. <https://doi.org/10.1007/s11046-017-0137-5>.
- ✓ Elizur A., C. L. Cannon et T. W. Ferkol. **2008**. « Airway inflammation in cystic fibrosis ». *Chest* 133 (2): 489-95. <https://doi.org/10.1378/chest.07-1631>.
- ✓ Enterina J. R., L. Wu et R. E. Campbell. **2015**. « Emerging fluorescent protein technologies ». *Current Opinion in Chemical Biology* 27 (août): 10-17. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2015.05.001>.
- ✓ European Cystic Fibrosis Society Patient Registry (ECFSRP), **2017**. Annual data report (year 2016) version 1.2018.
- ✓ Fanen P., A. Wohlhuter-Haddad et A. Hinzpeter. **2014**. « Genetics of cystic fibrosis: CFTR mutation classifications toward genotype-based CF therapies ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 52 (juillet): 94-102. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2014.02.023>.
- ✓ Fernandez-Flores A., R. Lopez-Medrano et C. Fuster-Foz. **2016**. « Histopathological clues in the diagnosis of fungal infection by *Scedosporium* in a case of endophthalmitis starting as conjunctivitis ». *Journal of Cutaneous Pathology* 43 (5): 461-67. <https://doi.org/10.1111/cup.12689>.
- ✓ Fessler R. G. et F. D. Brown. **1989**. « Superior sagittal sinus infection with *Petriellidium boydii*: case report ». *Neurosurgery* 24 (4): 604-7.
- ✓ Fincham J. R. **1989**. « Transformation in fungi ». *Microbiological Reviews* 53 (1): 148-70.
- ✓ Florea S., K. Andreeva, C. Machado, P. M. Mirabito et C. L. Schardl. **2009**. « Elimination of marker genes from transformed filamentous fungi by unselected transient transfection with a Cre-expressing plasmid ». *Fungal Genetics and Biology: FG & B* 46 (10): 721-30. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2009.06.010>.
- ✓ Forment J. V., D. Ramón et A. P. MacCabe. **2006**. « Consecutive gene deletions in *Aspergillus nidulans*: application of the Cre/LoxP System ». *Current Genetics* 50 (3): 217-24. <https://doi.org/10.1007/s00294-006-0081-2>.
- ✓ Foureau E., M. Clastre, E. J. Obando Montoya, S. Besseau, A. Oudin, G. Glévarec, A. J. Simkin, J. Crèche, L. Atehortúa, N. Giglioli-Guivarc'h, V. Courdavault et N. Papon. **2014**. « Subcellular localization of the histidine kinase receptors Sln1p, Nik1p and Chk1p in the yeast CTG clade species *Candida guilliermondii* ». *Fungal Genetics and Biology: FG & B* 65 (avril): 25-36. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2014.01.007>.
- ✓ Foureau E., V. Courdavault, A. J. Simkin, A. A. Sibirny, J. Crèche, N. Giglioli-Guivarc'h, M. Clastre et N. Papon. **2013**. « Transformation of *Candida guilliermondii* wild-type strains using the *Staphylococcus aureus* MRSA 252 ble gene as a phleomycin-resistant marker ». *FEMS Yeast Research* 13 (3): 354-58. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12034>.
- ✓ Foureau E., M. Clastre, Y. Millerioux, A. J. Simkin, L. Cornet, C. Dutilleul, S. Besseau, E. Marais, C. Melin, J. Guillard, J. Crèche, N. Giglioli-Guivarc'h, V. Courdavault et N. Papon. **2012**. « A TRP5/5-Fluoroanthranilic Acid Counter-Selection System for Gene Disruption in *Candida guilliermondii* ». *Current Genetics* 58 (4): 245-54. <https://doi.org/10.1007/s00294-012-0377-3>.
- ✓ Fraczek M. G., M. Bromley, A. Buied, C. B. Moore, R. Rajendran, R. Rautemaa, G. Ramage, D. W. Denning et P. Bowyer. **2013**. « The Cdr1B efflux transporter is associated with non-Cyp51a-mediated itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus* ». *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 68 (7): 1486-96. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt075>.
- ✓ Frandsen R. et J. Normand. **2011**. « A guide to binary vectors and strategies for targeted genome modification in fungi using *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation ». *Journal of Microbiological Methods* 87 (3): 247-62. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.09.004>.
- ✓ Gadsby D. C., P. Vergani et L. Csanády. **2006**. « The ABC Protein turned chloride channel whose failure causes cystic fibrosis ». *Nature* 440 (7083): 477-83. <https://doi.org/10.1038/nature04712>.
- ✓ Galperin M. Y., K. S. Makarova, Y. I. Wolf et E. V. Koonin. **2018**. « Phyletic distribution and lineage-specific domain architectures of archaeal two-component signal transduction systems ». *Journal of Bacteriology* 200 (7). <https://doi.org/10.1128/JB.00681-17>.
- ✓ Gao Z., Y. F. Chen, M. D. Randlett, X. C. Zhao, J. L. Findell, J. J. Kieber et G. E. Schaller. **2003**. « Localization of the Raf-like kinase CTR1 to the endoplasmic reticulum of *Arabidopsis* through participation in ethylene receptor signaling complexes ». *The Journal of Biological Chemistry* 278 (36): 34725-32. <https://doi.org/10.1074/jbc.M305548200>.

- ✓ Geier G. E. et P. Modrich. **1979**. « Recognition sequence of the Dam methylase of *Escherichia Coli* K12 and mode of cleavage of Dpn I endonuclease ». *The Journal of Biological Chemistry* 254 (4): 1408-13.
- ✓ Gilgado F., J. Gené, J. Cano et J. Guarro. **2010**. « Heterothallism in *Scedosporium apiospermum* and description of its teleomorph *Pseudallescheria apiosperma* sp. Nov ». *Medical Mycology* 48 (1): 122-28. <https://doi.org/10.3109/13693780902939695>.
- ✓ Gilgado F., J. Cano, J. Gené, C. Serena et J. Guarro. **2009**. « Different virulence of the species of the *Pseudallescheria boydii* complex ». *Medical Mycology* 47 (4): 371-74. <https://doi.org/10.1080/13693780802256539>.
- ✓ Gilgado F., J. Cano, J. Gené, D. A. Sutton et J. Guarro. **2008**. « Molecular and phenotypic data supporting distinct species statuses for *Scedosporium apiospermum* and *Pseudallescheria boydii* and the proposed new species *Scedosporium dehoogii* ». *Journal of Clinical Microbiology* 46 (2): 766-71. <https://doi.org/10.1128/JCM.01122-07>.
- ✓ Gilgado F., C. Serena, J. Cano, J. Gené et J. Guarro. **2006**. « Antifungal susceptibilities of the species of the *Pseudallescheria boydii* complex ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50 (12): 4211-13. <https://doi.org/10.1128/AAC.00981-06>.
- ✓ Gilgado F., J. Cano, J. Gené et J. Guarro. **2005**. « Molecular phylogeny of the *Pseudallescheria boydii* species complex: proposal of two new species ». *Journal of Clinical Microbiology* 43 (10): 4930-42. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.10.4930-4942.2005>.
- ✓ Gil-Lamainere C., E. Roilides, C. A. Lyman, M. Simitsopoulou, T. Stergiopoulou, A. Maloukou et T. J. Walsh. **2003**. « Human phagocytic cell responses to *Scedosporium apiospermum* (*Pseudallescheria boydii*): variable susceptibility to oxidative injury ». *Infection and Immunity* 71 (11): 6472-78. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.11.6472-6478.2003>.
- ✓ Gilligan P. H. **2014**. « Infections in patients with cystic fibrosis: diagnostic microbiology update ». *Clinics in Laboratory Medicine* 34 (2): 197-217. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2014.02.001>.
- ✓ Goins C. L., K. J. Gerik et J. K. Lodge. **2006**. « Improvements to gene deletion in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*: absence of Ku proteins increases homologous recombination, and co-transformation of independent DNA molecules allows rapid complementation of deletion phenotypes ». *Fungal Genetics and Biology: FG & B* 43 (8): 531-44. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2006.02.007>.
- ✓ Goldman, Chloe, Matthew J. Akiyama, Julian Torres, Eddie Louie, et Shane A. Meehan. **2016**. « *Scedosporium Apiospermum* Infections and the Role of Combination Antifungal Therapy and GM-CSF: A Case Report and Review of the Literature ». *Medical Mycology Case Reports* 11 (mars): 40-43. <https://doi.org/10.1016/j.mmcr.2016.04.005>.
- ✓ Goosen, T., G. Bloemheugel, C. Gysler, D. A. de Bie, H. W. van den Broek, et K. Swart. **1987**. « Transformation of *Aspergillus Niger* Using the Homologous Orotidine-5'-Phosphate-Decarboxylase Gene ». *Current Genetics* 11 (6-7): 499-503.
- ✓ Grisham, M. B., M. M. Jefferson, D. F. Melton, et E. L. Thomas. **1984**. « Chlorination of Endogenous Amines by Isolated Neutrophils. Ammonia-Dependent Bactericidal, Cytotoxic, and Cytolytic Activities of the Chloramines ». *The Journal of Biological Chemistry* 259 (16): 10404-13.
- ✓ Gruber, Martina, Ivan Moser, Markus Nagl, et Michaela Lackner. **2017**. « Bactericidal and Fungicidal Activity of N-Chlorotaurine Is Enhanced in Cystic Fibrosis Sputum Medium ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 61 (5). <https://doi.org/10.1128/AAC.02527-16>.
- ✓ Gu, Zhengming, Daelynn R. Buelow, Ruta Petraitiene, Vidmantas Petraitis, Thomas J. Walsh, et Randall T. Hayden. **2014**. « Quantitative Multiplexed Detection of Common Pulmonary Fungal Pathogens by Labeled Primer Polymerase Chain Reaction ». *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 138 (11): 1474-80. <https://doi.org/10.5858/arpa.2013-0592-OA>.
- ✓ Guarro, Josep, A. Serda Kantarcioglu, Regine Horr , Juan Luis Rodriguez-Tudela, Manuel Cuenca Estrella, Juan Berenguer, et G. Sybren de Hoog. **2006**. « *Scedosporium Apiospermum*: Changing Clinical Spectrum of a Therapy-Refractory Opportunist ». *Medical Mycology* 44 (4): 295-327. <https://doi.org/10.1080/13693780600752507>.
- ✓ Hachimi-Idrissi, S., M. Willemsen, B. Desprechins, A. Naessens, A. Goossens, L. De Meirleir, et J. Ramet. **1990**. « *Pseudallescheria Boydii* and Brain Abscesses ». *The Pediatric Infectious Disease Journal* 9 (10): 737.
- ✓ Hagiwara, Daisuke, Azusa Takahashi-Nakaguchi, Takahito Toyotome, Akira Yoshimi, Keietsu Abe, Katsuhiko Kamei, Tohru Gonoi, et Susumu Kawamoto. **2013**. « NikA/TcsC Histidine Kinase Is Involved in Conidiation, Hyphal Morphology, and Responses to Osmotic Stress and Antifungal Chemicals in *Aspergillus Fumigatus* ». *PLoS One* 8 (12): e80881. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080881>.
- ✓ Hallez, Régis, Johann Mignolet, Vincent Van Mullem, Maxime Wery, Jean Vandenhautte, Jean-Jacques Letesson, Christine Jacobs-Wagner, et Xavier De Bolle. **2007**. « The Asymmetric Distribution of the Essential Histidine Kinase PdhS Indicates a Differentiation Event in *Brucella Abortus* ». *The EMBO Journal* 26 (5): 1444-55. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601577>.

- ✓ Halliday, Catriona L., Sharon C.-A. Chen, Sarah E. Kidd, Sebastian van Hal, Belinda Chapman, Christopher H. Heath, Andie Lee, et al. **2016**. « Antifungal Susceptibilities of Non-Aspergillus Filamentous Fungi Causing Invasive Infection in Australia: Support for Current Antifungal Guideline Recommendations ». *International Journal of Antimicrobial Agents* 48 (4): 453-58. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.07.005>.
- ✓ Hao, Shufeng, Damon Hamel, Hongjun Zhou, et Frederick W. Dahlquist. **2009**. « Structural Basis for the Localization of the Chemotaxis Phosphatase CheZ by CheAS ». *Journal of Bacteriology* 191 (18): 5842-44. <https://doi.org/10.1128/JB.00323-09>.
- ✓ Hargreaves, Katherine R., Andrew M. Kropinski, et Martha R. J. Clokie. **2014**. « What Does the Talking?: Quorum Sensing Signalling Genes Discovered in a Bacteriophage Genome ». *PLoS One* 9 (1): e85131. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085131>.
- ✓ Hartmann T., T. C. Cairns, P. Olbermann, J. Morschhäuser, E. M. Bignell et S. Krappmann. **2011**. « Oligopeptide transport and regulation of extracellular proteolysis are required for growth of *Aspergillus fumigatus* on complex substrates but not for virulence ». *Molecular Microbiology* 82 (4): 917-35. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07868.x>.
- ✓ Hartmann T., M. Dümig, B. M. Jaber, E. Szewczyk, P. Olbermann, J. Morschhäuser et S. Krappmann. **2010**. « Validation of a self-excising marker in the human pathogen *Aspergillus fumigatus* by employing the beta-Rec/six site-specific recombination system ». *Applied and Environmental Microbiology* 76 (18): 6313-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.00882-10>.
- ✓ Harun A., C. C. Blyth, F. Gilgado, P. Middleton, S. C. A. Chen et W. Meyer. **2011**. « Development and validation of a multiplex PCR for detection of *Scedosporium* spp. in respiratory tract specimens from patients with cystic fibrosis ». *Journal of Clinical Microbiology* 49 (4): 1508-12. <https://doi.org/10.1128/JCM.01810-10>.
- ✓ Harun A., F. Gilgado, S. C. A. Chen et W. Meyer. **2010**. « Abundance of *Pseudallescheria/Scedosporium* species in the Australian urban environment suggests a possible source for scedosporiosis including the colonization of airways in cystic fibrosis ». *Medical Mycology* 48 Suppl 1 (novembre): S70-76. <https://doi.org/10.3109/13693786.2010.515254>.
- ✓ Hata K., T. Horii, M. Miyazaki, N. A. Watanabe, M. Okubo, J. Sonoda, K. Nakamoto, K. Tanaka, S. Shirotori, N. Murai, S. Inoue, M. Matsukura, S. Abe, K. Yoshimatsu et M. Asada. **2011**. « Efficacy of oral E1210, a new broad-spectrum antifungal with a novel mechanism of action, in murine models of candidiasis, aspergillosis, and fusariosis ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55 (10): 4543-51. <https://doi.org/10.1128/AAC.00366-11>.
- ✓ Hawksworth D. L., P. W. Crous, S. A. Redhead, D. R. Reynolds, R. A. Samson, K. A. Seifert, J. W. Taylor, et al. **2011**. « The Amsterdam Declaration on fungal nomenclature ». *IMA Fungus: The Global Mycological Journal* 2 (1): 105-12. <https://doi.org/10.5598/imafungus.2011.02.01.14>.
- ✓ Henao-Martínez A. F., J. R. Castillo-Mancilla, M. A. Barron et A. Cunningham Nichol. **2013**. « Combination antifungal therapy in the treatment of *Scedosporium apiospermum* central nervous system infections ». *Case Reports in Infectious Diseases* 2013: 589490. <https://doi.org/10.1155/2013/589490>.
- ✓ Héricourt F., F. Chedor, L. Bertheau, M. Tanigawa, T. Maeda, G. Guirimand, V. Courdavault, M. Larcher, C. Depierreux, H. Bénédicti, D. Morabito, F. Brignolas et S. Carpin. **2013**. « Characterization of histidine-aspartate kinase HK1 and identification of histidine phosphotransfer proteins as potential partners in a *Populus* multistep phosphorelay ». *Physiologia Plantarum* 149 (2): 188-99. <https://doi.org/10.1111/ppl.12024>.
- ✓ Hérivaux A., J. L. Lavín, T. Dugé de Bernonville, P. Vandeputte, J. P. Bouchara, A. Gastebois, J. A. Oguiza et N. Papon. **2018**. « Progressive loss of hybrid histidine kinase genes during the evolution of budding yeasts (Saccharomycotina) ». *Current Genetics* 64 (4): 841-51. <https://doi.org/10.1007/s00294-017-0797-1>.
- ✓ Hérivaux A., T. Dugé de Bernonville, C. Roux, M. Clastre, V. Courdavault, A. Gastebois, J. P. Bouchara, T. Y. James, J. P. Latgé, F. Martin et N. Papon. **2017**. « The identification of phytohormone receptor homologs in early diverging fungi suggests a role for plant sensing in land colonization by fungi ». *MBio* 8 (1). <https://doi.org/10.1128/mBio.01739-16>.
- ✓ Hérivaux A., Y. S. So, A. Gastebois, J. P. Latgé, J. P. Bouchara, Y. S. Bahn et N. Papon. **2016**. « Major sensing proteins in pathogenic fungi: the hybrid histidine kinase family ». *PLoS Pathogens* 12 (7): e1005683. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005683>.
- ✓ Heyn K., A. Tredup, S. Salvenmoser et F. M. C. Müller. **2005**. « Effect of voriconazole combined with micafungin against *Candida*, *Aspergillus*, and *Scedosporium* spp. and *Fusarium solani* ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49 (12): 5157-59. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.12.5157-5159.2005>.
- ✓ Hittinger C. T., A. Rokas, F. Y. Bai, T. Boekhout, P. Gonçalves, T. W. Jeffries, J. Kominek, M. A. Lachance, D. Libkind, C. A. Rosa, J. P. Sampaio et C. P. Kurtzman. **2015**. « Genomics and the making of yeast biodiversity ». *Current Opinion in Genetics & Development* 35 (décembre): 100-109. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2015.10.008>.
- ✓ Homa M., L. Galgóczy, E. Tóth, L. Tóth, T. Papp, M. Chandrasekaran, S. Kadaikunnan, N. S. Alharbi et C. Vágvolgyi. **2015**. « *In vitro* antifungal activity of antipsychotic drugs and their combinations with conventional antifungals against *Scedosporium* and *Pseudallescheria* isolates ». *Medical Mycology* 53 (8): 890-95. <https://doi.org/10.1093/mmy/myv064>.

- ✓ Hong G., H. B. Miller, S. Allgood, R. Lee, N. Lechtzin et S. X. Zhang. **2017**. « Use of selective fungal culture media increases rates of detection of fungi in the respiratory tract of cystic fibrosis patients ». *Journal of Clinical Microbiology* 55 (4): 1122-30. <https://doi.org/10.1128/JCM.02182-16>.
- ✓ Hongsanan S., S. S. N. Maharachchikumbura, K. D. Hyde, M. C. Samarakoon, R. Jeewon, Q. Zhao, A. M. Al-Sadi et A. H. Bahkali. **2017**. « An updated phylogeny of Sordariomycetes based on phylogenetic and molecular clock evidence ». *Fungal Diversity* 84 (1): 25-41. <https://doi.org/10.1007/s13225-017-0384-2>.
- ✓ De Hoog G. S., F. D. Marvin-Sikkema, G. A. Lahpoor, J. C. Gottschall, R. A. Prins et E. Guého. **1994**. « Ecology and physiology of the emerging opportunistic fungi *Pseudallescheria boydii* and *Scedosporium prolificans* ». *Mycoses* 37 (3-4): 71-78.
- ✓ Horré R., K. P. Schaal, G. Marklein, G. S. de Hoog et S.-M. Reiffert. **2011**. « Physiological typing of *Pseudallescheria* and *Scedosporium* strains using taxa profile, a semi-automated, 384-well microtitre system ». *Mycoses* 54 Suppl 3 (octobre): 56-65. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2011.02111.x>.
- ✓ Horré R. et G. Marklein. **2009**. « Isolation and clinical significance of *Pseudallescheria* and *Scedosporium* species ». *Medical Mycology* 47 (4): 415-21. <https://doi.org/10.1080/13693780902801259>.
- ✓ Horré R., G. Marklein, R. Siekmeier, S. Nidermajer et S. M. Reiffert. **2009**. « Selective isolation of *Pseudallescheria* and *Scedosporium* species from respiratory tract specimens of cystic fibrosis Patients ». *Respiration; International Review of Thoracic Diseases* 77 (3): 320-24. <https://doi.org/10.1159/000167419>.
- ✓ Husain S., P. Muñoz, G. Forrest, B. D. Alexander, J. Somani, K. Brennan, M. M. Wagener et N. Singh. **2005**. « Infections due to *Scedosporium apiospermum* and *Scedosporium prolificans* in transplant recipients: clinical characteristics and impact of antifungal agent therapy on Outcome ». *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 40 (1): 89-99. <https://doi.org/10.1086/426445>.
- ✓ Iniesta A. A., N. J. Hillson et L. Shapiro. **2010**. « Cell pole-specific activation of a critical bacterial cell cycle kinase ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (15): 7012-17. <https://doi.org/10.1073/pnas.1001767107>.
- ✓ Irinyi L., C. Serena, D. Garcia-Hermoso, M. Arabatzis, M. Desnos-Ollivier, D. Vu, G. Cardinali, et al. **2015**. « International Society of Human and Animal Mycology (ISHAM)-ITS reference DNA barcoding Database--the Quality Controlled Standard Tool for Routine Identification of Human and Animal pathogenic fungi ». *Medical Mycology* 53 (4): 313-37. <https://doi.org/10.1093/mmy/myv008>.
- ✓ Issakainen J., J. Jalava, E. Eerola et C. K. Campbell. **1997**. « Relatedness of *Pseudallescheria*, *Scedosporium* and *Graphium* pro parte based on SSU rDNA sequences ». *Journal of Medical and Veterinary Mycology* 35 (6): 389-98. <https://doi.org/10.1080/02681219780001481>.
- ✓ Jabado N., J. L. Casanova, E. Haddad, F. Dulieu, J. C. Fournet, B. Dupont, A. Fischer, C. Hennequin et S. Blanche. **1998**. « Invasive pulmonary infection due to *Scedosporium apiospermum* in two children with chronic granulomatous disease ». *Clinical Infectious Diseases* 27 (6): 1437-41. <https://doi.org/10.1086/515015>.
- ✓ Jacob S., A. J. Foster, A. Yemelin et E. Thines. **2014**. « Histidine kinases mediate differentiation, stress response, and pathogenicity in *Magnaporthe oryzae* ». *MicrobiologyOpen* 3 (5): 668-87. <https://doi.org/10.1002/mbo3.197>.
- ✓ Jacobs C., I. J. Domian, J. R. Maddock et L. Shapiro. **1999**. « Cell cycle-dependent polar localization of an essential bacterial histidine kinase that controls DNA replication and cell division ». *Cell* 97 (1): 111-20.
- ✓ Jastrzębowska K. et I. Gabriel. **2015**. « Inhibitors of amino acids biosynthesis as antifungal agents ». *Amino Acids* 47: 227-49. <https://doi.org/10.1007/s00726-014-1873-1>.
- ✓ Jimenez A. L. et N. L. Salvo. **2011**. « Mycetoma or synovial sarcoma? A case report with review of the literature ». *The Journal of Foot and Ankle Surgery: Official Publication of the American College of Foot and Ankle Surgeons* 50 (5): 569-76. <https://doi.org/10.1053/j.jfas.2011.04.014>.
- ✓ Johnson M. E., S. K. Katiyar et T. D. Edlind. **2011**. « New Fks hot spot for acquired echinocandin resistance in *Saccharomyces cerevisiae* and its contribution to intrinsic resistance of *Scedosporium* species ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55 (8): 3774-81. <https://doi.org/10.1128/AAC.01811-10>.
- ✓ Kaltseis J., J. Rainer et G. S. de Hoog. **2009**. « Ecology of *Pseudallescheria* and *Scedosporium* species in human-dominated and natural environments and their distribution in clinical samples ». *Medical Mycology* 47 (4): 398-405. <https://doi.org/10.1080/13693780802585317>.
- ✓ Kanafani Z. A., Y. Comair et S. S. Kanj. **2004**. « *Pseudallescheria boydii* cranial osteomyelitis and subdural empyema successfully treated with voriconazole: a case report and literature review ». *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology* 23 (11): 836-40. <https://doi.org/10.1007/s10096-004-1233-2>.
- ✓ Kaskova Z. M., A. S. Tsarkova et I. V. Yampolsky. **2016**. « 1001 lights: luciferins, luciferases, their mechanisms of action and applications in chemical analysis, biology and medicine ». *Chemical Society Reviews* 45 (21): 6048-77. <https://doi.org/10.1039/c6cs00296j>.
- ✓ Kaufman L., P. G. Standard, M. Jalbert et D. E. Kraft. **1997**. « Immunohistologic identification of *Aspergillus* spp. and other hyaline fungi by using polyclonal fluorescent antibodies. » *Journal of Clinical Microbiology* 35 (9): 2206-9. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC229940/>.

- ✓ Kaur J., S. Y. Duan, L. A. I. Vaas, A. Penesyan, W. Meyer, I. T. Paulsen et H. Nevalainen. **2015**. « Phenotypic profiling of *Scedosporium aurantiacum*, an opportunistic pathogen colonizing human lungs ». *PLOS ONE* 10 (3): e0122354. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122354>.
- ✓ Kepez Y. B., M. Hasanreisoglu, Z. Aktas, G. Aksu, B. C. Kocak et F. Akata. **2014**. « Fungal keratitis secondary to *Scedosporium apiospermum* infection and successful treatment with surgical and medical intervention ». *International Ophthalmology* 34 (2): 305-8. <https://doi.org/10.1007/s10792-013-9777-8>.
- ✓ Kerem B., J. M. Rommens, J. A. Buchanan, D. Markiewicz, T. K. Cox, A. Chakravarti, M. Buchwald et L. C. Tsui. **1989**. « Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis ». *Science (New York, N.Y.)* 245 (4922): 1073-80.
- ✓ Kershaw P., R. Freeman, D. Templeton, P. C. DeGirolami, U. DeGirolami, D. Tarsy, S. Hoffmann, G. Eliopoulos et A. W. Karchmer. **1990**. « *Pseudallescheria boydii* infection of the central nervous system ». *Archives of Neurology* 47 (4): 468-72.
- ✓ Khrunyk Y., K. Münch, K. Schipper, A. N. Lupas et R. Kahmann. **2010**. « The use of FLP-mediated recombination for the functional analysis of an effector gene family in the biotrophic smut fungus *Ustilago maydis* ». *The New Phytologist* 187 (4): 957-68. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03413.x>.
- ✓ Kimura M., O. Maenishi, H. Ito et K. Ohkusu. **2010**. « Unique histological characteristics of *Scedosporium* that could aid in its identification ». *Pathology International* 60 (2): 131-36. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1827.2009.02491.x>.
- ✓ Kimura S., Y. Shiraiwa et I. Suzuki. **2009**. « Function of the N-terminal region of the phosphate-sensing histidine kinase, SphS, in *Synechocystis* sp. PCC 6803 ». *Microbiology (Reading, England)* 155 (Pt 7): 2256-64. <https://doi.org/10.1099/mic.0.028514-0>.
- ✓ King A. D., A. D. Hocking et J. I. Pitt. **1979**. « Dichloran-Rose Bengal medium for enumeration and isolation of molds from foods ». *Applied and Environmental Microbiology* 37 (5): 959-64.
- ✓ Kojima K., Y. Takano, A. Yoshimi, C. Tanaka, T. Kikuchi et T. Okuno. **2004**. « Fungicide activity through activation of a fungal signalling pathway ». *Molecular Microbiology* 53 (6): 1785-96. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04244.x>.
- ✓ Kooijman C. M., G. A. Kampinga, G. Sybren de Hoog, W. B. Goudswaard et M. M. P. J. Reijnen. **2007**. « Successful treatment of *Scedosporium aurantiacum* osteomyelitis in an immunocompetent patient ». *Surgical Infections* 8 (6): 605-10. <https://doi.org/10.1089/sur.2006.038>.
- ✓ Kopke K., B. Hoff et U. Kück. **2010**. « Application of the *Saccharomyces cerevisiae* FLP/FRT Recombination System in Filamentous Fungi for Marker Recycling and Construction of Knockout strains devoid of heterologous genes ». *Applied and Environmental Microbiology* 76 (14): 4664-74. <https://doi.org/10.1128/AEM.00670-10>.
- ✓ Krappmann S. **2014**. « Genetic surgery in fungi: employing site-specific recombinases for genome manipulation ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 98 (5): 1971-82. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5480-y>.
- ✓ Krappmann S., O. Bayram et G. H. Braus. **2005**. « Deletion and allelic exchange of the *Aspergillus fumigatus* VeA locus via a novel recyclable marker module ». *Eukaryotic Cell* 4 (7): 1298-1307. <https://doi.org/10.1128/EC.4.7.1298-1307.2005>.
- ✓ Kumar A., B. Henrissat, M. Arvas, M. F. Syed, N. Thieme, J. P. Benz, J. L. Sørensen, E. Record, S. Pöggeler et F. Kempken. **2015**. « *De novo* assembly and genome analyses of the marine-derived *Scopulariopsis brevicaulis* strain LF580 unravels life-style traits and anticancerous scopularide biosynthetic gene cluster ». *PLoS ONE* 10 (10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140398>.
- ✓ Lackner M., U. Binder, M. Reindl, B. Gönül, H. Fankhauser, C. Mair et M. Nagl. **2015**. « N-chlorotaurine exhibits fungicidal activity against therapy-refractory *Scedosporium* species and *Lomentospora prolificans* ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 59 (10): 6454-62. <https://doi.org/10.1128/AAC.00957-15>.
- ✓ a. Lackner M., F. Fernández-Silva, J. Guarro et C. Lass-Flörl. **2014**. « Assessing micafungin/triazole combinations for the treatment of invasive scedosporiosis due to *Scedosporium apiospermum* and *Scedosporium boydii* ». *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 69 (11): 3027-32. <https://doi.org/10.1093/jac/dku224>.
- ✓ b. Lackner M., F. Hagen, J. F. Meis, A. H. G. Gerrits van den Ende, D. Vu, V. Robert, J. Fritz, T. A. A. Moussa et G. S. de Hoog. **2014**. « Susceptibility and diversity in the therapy-refractory genus *Scedosporium* ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58 (10): 5877-85. <https://doi.org/10.1128/AAC.03211-14>.
- ✓ c. Lackner M., G. S. De Hoog, L. Yang, L. Ferreira Moreno, S. A. Ahmed, F. Andreas, J. Kaltseis, et al. **2014**. « Proposed Nomenclature for *Pseudallescheria*, *Scedosporium* and related genera ». *Fungal Diversity* 67 (1): 1-10. <https://doi.org/10.1007/s13225-014-0295-4>.
- ✓ a. Lackner M., G. S. De Hoog, P. E. Verweij, M. J. Najafzadeh, I. Curfs-Breuker, C. H. Klaassen et J. F. Meis. **2012**. « Species-specific antifungal susceptibility patterns of *Scedosporium* and *Pseudallescheria* Species ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56 (5): 2635-42. <https://doi.org/10.1128/AAC.05910-11>.
- ✓ b. Lackner M., C. H. Klaassen, J. F. Meis, A. H. G. Gerrits van den Ende et G. S. de Hoog. **2012**. « Molecular identification tools for sibling species of *Scedosporium* and *Pseudallescheria* ». *Medical Mycology* 50 (5): 497-508. <https://doi.org/10.3109/13693786.2011.618939>.

- ✓ Lackner M., A. Rezusta, M. C. Villuendas, M. P. Palacian, J. F. Meis et C. H. Klaassen. **2011**. « Infection and colonisation due to *Scedosporium* in Northern Spain. An *in vitro* antifungal susceptibility and molecular epidemiology study of 60 isolates ». *Mycoses* 54 Suppl 3 (**octobre**): 12-21. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2011.02110.x>.
- ✓ Lander E. S. **2016**. « The heroes of CRISPR ». *Cell* 164 (**1-2**): 18-28. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.041>.
- ✓ Lelièvre B., M. Briet, C. Godon, P. Legras, J. Riou, P. Vandeputte, B. Diquet et J. P. Bouchara. **2018**. « Impact of infection status and cyclosporine on voriconazole pharmacokinetics in an experimental model of cerebral scedosporiosis ». *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 365 (**2**): 408-12. <https://doi.org/10.1124/jpet.117.245449>.
- ✓ Lelièvre B., P. Legras, C. Godon, F. Franconi, J. P. Saint-André, J. P. Bouchara et B. Diquet. **2013**. « Experimental models of disseminated scedosporiosis with cerebral involvement ». *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 345 (**2**): 198-205. <https://doi.org/10.1124/jpet.112.201541>.
- ✓ Lipuma J. J. **2010**. « The changing microbial epidemiology in cystic fibrosis ». *Clinical Microbiology Reviews* 23 (**2**): 299-323. <https://doi.org/10.1128/CMR.00068-09>.
- ✓ Liu Z. et T. L. Friesen. **2012**. « Polyethylene glycol (PEG)-mediated transformation in filamentous fungal pathogens ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 835: 365-75. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-501-5_21.
- ✓ Ljungdahl P. O. et B. Daignan-Fornier. **2012**. « Regulation of amino acid, nucleotide, and phosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* ». *Genetics* 190 (**3**): 885-929. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.133306>.
- ✓ Lorang J. M., R. P. Tuori, J. P. Martinez, T. L. Sawyer, R. S. Redman, J. A. Rollins, T. J. Wolpert, K. B. Johnson, R. J. Rodriguez, M. B. Dickman et L. M. Ciuffetti. **2001**. « Green fluorescent protein is lighting up fungal biology ». *Applied and Environmental Microbiology* 67 (**5**): 1987-94. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.5.1987-1994.2001>.
- ✓ Lu Q., Y. Sun, D. Tian, S. Xiang et L. Gao. **2017**. « Effects of photodynamic therapy on the growth and antifungal susceptibility of *Scedosporium* and *Lomentospora* spp ». *Mycopathologia* 182 (**11-12**): 1037-43. <https://doi.org/10.1007/s11046-017-0195-8>.
- ✓ Lu Q., A. H. G. Gerrits van den Ende, G. S. de Hoog, R. Li, I. Accoceberry, I. Durand-Joly, J. P. Bouchara, F. Hernandez et L. Delhaes. **2011**. « Reverse line blot hybridisation screening of *Pseudallescheria/Scedosporium* species in patients with cystic fibrosis ». *Mycoses* 54 Suppl 3 (**octobre**): 5-11. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2011.02108.x>.
- ✓ Luo Y. Y., J. K. Yang, M. L. Zhu, C. J. Liu, H. Y. Li, Z. B. Lu, W. Z. Pan, Z. H. Zhang, W. Bi et K. Q. Zhang. **2012**. « The group III two-component histidine kinase ALHK1 is involved in fungicides resistance, osmosensitivity, spore production and impacts negatively pathogenicity in *Alternaria longipes* ». *Current Microbiology* 64 (**5**): 449-56. <https://doi.org/10.1007/s00284-012-0093-8>.
- ✓ Mager H. I. et S. C. Tu. **1995**. « Chemical aspects of bioluminescence ». *Photochemistry and Photobiology* 62 (**4**): 607-14.
- ✓ Marie C. et T. C. White. **2009**. « Genetic basis of antifungal drug resistance ». *Current Fungal Infection Reports* 3 (**3**): 163-69. <https://doi.org/10.1007/s12281-009-0021-y>.
- ✓ Marinus M. G. et N. R. Morris. **1973**. « Isolation of deoxyribonucleic acid methylase mutants of *Escherichia coli* K-12 ». *Journal of Bacteriology* 114 (**3**): 1143-50.
- ✓ a.Martin-Vicente A., J. Guarro et J. Capilla. **2017**. « Does a triple combination have better activity than double combinations against multiresistant fungi? experimental *in vitro* evaluation ». *International Journal of Antimicrobial Agents* 49 (**4**): 422-26. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.12.015>.
- ✓ b.Martin-Vicente A., J. Guarro, G. M. González, C. Lass-Flörl, M. Lackner et J. Capilla. **2017**. « Voriconazole MICs are predictive for the outcome of experimental disseminated scedosporiosis ». *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 72 (**4**): 1118-22. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw532>.
- ✓ Mascher T., J. D. Helmann et G. Uden. **2006**. « Stimulus perception in bacterial signal-transducing histidine kinases ». *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR* 70 (**4**): 910-38. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00020-06>.
- ✓ Mattern I., P. Punt et C. Van den Hondel. **1988**. « A vector for *Aspergillus* transformation conferring phleomycin resistance. » *Fungal Genetics Reports* 35 (**1**): 25. <https://doi.org/10.4148/1941-4765.1533>.
- ✓ McCormick A., I. D. Jacobsen, M. Broniszewska, J. Beck, J. Heesemann et F. Ebel. **2012**. « The two-component sensor kinase TcsC and its role in stress resistance of the human-pathogenic mold *Aspergillus fumigatus* ». *PLoS One* 7 (**6**): e38262. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038262>.
- ✓ De Mello T. P., A. C. Aor, S. Santiago Carvalho de Oliveira, M. H. Branquinha et A. L. Souza Dos Santos. **2016**. « Conidial germination in *Scedosporium apiospermum*, *S. aurantiacum*, *S. minutisporum* and *Lomentospora prolificans*: influence of growth conditions and antifungal susceptibility profiles ». *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* 0 (**juin**): 0. <https://doi.org/10.1590/0074-02760160200>.
- ✓ Metzgar D., M. Frinder, R. Lovari, D. Toleno, C. Massire, L. B. Blyn, R. Ranken, H. E. Carolan, T. A. Hall, D. Moore, C. J. Hansen, R. Sampath et D. J. Ecker. **2013**. « Broad-spectrum biosensor capable of detecting and identifying

- diverse bacterial and *Candida* species in blood ». *Journal of Clinical Microbiology* 51 (8): 2670-78. <https://doi.org/10.1128/JCM.00966-13>.
- ✓ Mignolet J., C. Van der Henst, C. Nicolas, M. Deghelt, D. Dotreppe, J. J. Letesson et X. De Bolle. **2010**. « PdhS, an old-pole-localized histidine kinase, recruits the fumarase FumC in *Brucella abortus* ». *Journal of Bacteriology* 192 (12): 3235-39. <https://doi.org/10.1128/JB.00066-10>.
 - ✓ Millerioux Y., M. Clastre, A. J. Simkin, V. Courdavault, E. Marais, A. A. Sibirny, T. Noël, J. Crèche, N. Giglioli-Guivarc'h et N. Papon. **2011**. « Drug-resistant cassettes for the efficient transformation of *Candida guilliermondii* wild-type strains ». *FEMS Yeast Research* 11 (6): 457-63. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2011.00731.x>.
 - ✓ Mina S., A. Marot-Leblond, B. Cimon, M. J. J. Fleury, G. Larcher, J. P. Bouchara et R. Robert. **2015**. « Purification and characterization of a mycelial catalase from *Scedosporium boydii*, a useful tool for specific antibody detection in patients with cystic fibrosis ». *Clinical and Vaccine Immunology: CVI* 22 (1): 37-45. <https://doi.org/10.1128/CVI.00482-14>.
 - ✓ Miyazaki M., T. Horii, K. Hata, N. A. Watanabe, K. Nakamoto, K. Tanaka, S. Shirotori, N. Murai, S. Inoue, M. Matsukura, S. Abe, K. Yoshimatsu et M. Asada. **2011**. « *In vitro* activity of E1210, a novel antifungal, against clinically important yeasts and molds ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55 (10): 4652-58. <https://doi.org/10.1128/AAC.00291-11>.
 - ✓ Mojica F. J. M. et L. Montoliu. **2016**. « On the origin of CRISPR-Cas technology: from prokaryotes to mammals ». *Trends in Microbiology* 24 (10): 811-20. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.06.005>.
 - ✓ Morales L. T., L. N. González-García, M. C. Orozco, S. Restrepo et M. J. Vives. **2017**. « The genomic study of an environmental isolate of *Scedosporium apiospermum* shows its metabolic potential to degrade hydrocarbons ». *Standards in Genomic Sciences* 12: 71. <https://doi.org/10.1186/s40793-017-0287-6>.
 - ✓ Motoyama T., K. Kadokura, T. Ohira, A. Ichiishi, M. Fujimura, I. Yamaguchi et T. Kudo. **2005**. « A two-component histidine kinase of the rice blast fungus is involved in osmotic stress response and fungicide action ». *Fungal Genetics and Biology: FG & B* 42 (3): 200-212. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2004.11.002>.
 - ✓ Mylonakis E., C. J. Clancy, L. Ostrosky-Zeichner, K. W. Garey, G. J. Alangaden, J. A. Vazquez, J. S. Groeger, M. A. Judson, Y. M. Vinagre, S. O. Heard, F. N. Zervou, I. M. Zacharioudakis, D. P. Kontoyiannis et P. G. Pappas. **2015**. « T2 magnetic resonance assay for the rapid diagnosis of candidemia in whole blood: a clinical trial ». *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 60 (6): 892-99. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu959>.
 - ✓ Nierman W. C., A. Pain, M. J. Anderson, J. R. Wortman, H. S. Kim, J. Arroyo, M. Berriman, et al. **2005**. « Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus* ». *Nature* 438 (7071): 1151-56. <https://doi.org/10.1038/nature04332>.
 - ✓ Ninomiya Y., K. Suzuki, C. Ishii et H. Inoue. **2004**. « Highly efficient gene replacements in *Neurospora* strains deficient for nonhomologous end-joining ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (33): 12248-53. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402780101>.
 - ✓ Nødvig C. S., J. B. Nielsen, M. E. Kogle et U. H. Mortensen. **2015**. « A CRISPR-Cas9 system for genetic engineering of filamentous fungi ». *PloS One* 10 (7): e0133085. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133085>.
 - ✓ Noguchi R., S. Banno, R. Ichikawa, F. Fukumori, A. Ichiishi, M. Kimura, I. Yamaguchi et M. Fujimura. **2007**. « Identification of OS-2 MAP kinase-dependent genes induced in response to osmotic stress, antifungal agent fludioxonil, and heat shock in *Neurospora crassa* ». *Fungal Genetics and Biology: FG & B* 44 (3): 208-18. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2006.08.003>.
 - ✓ Nweze E. I. et J. I. Okafor. **2010**. « *In vitro* activity of conventional antifungal agents against *Scedosporium apiospermum* isolates recovered from clinical and environmental samples in Nigeria ». *Acta Microbiologica Et Immunologica Hungarica* 57 (3): 209-14. <https://doi.org/10.1556/AMicr.57.2010.3.5>.
 - ✓ Obando Montoya E. J., C. Mélin, N. Blanc, A. Lanoue, E. Foureau, L. Boudesocque, G. Prie, A. J. Simkin, J. Crèche, L. Atehortúa, N. Giglioli-Guivarc'h, M. Clastre, V. Courdavault, N. Papon. **2014**. « Disrupting the Methionine Biosynthetic Pathway in *Candida guilliermondii*: Characterization of the MET2 Gene as Counter-Selectable Marker ». *Yeast (Chichester, England)* 31 (7): 243-51. <https://doi.org/10.1002/yea.3012>.
 - ✓ O'Bryan T. A., F. A. Browne et J. F. Schonder. **2002**. « *Scedosporium apiospermum* (*Pseudallescheria boydii*) endocarditis ». *The Journal of Infection* 44 (3): 189-92. <https://doi.org/10.1053/jinf.2002.0960>.
 - ✓ Oliver J. D., G. E. M. Sibley, N. Beckmann, K. S. Dobb, M. J. Slater, L. McEntee, S. du Pré, J. Livermore, M. J. Bromley, N. P. Wiederhold, W. W. Hope, A. J. Kennedy, D. Law, M. Birch. **2016**. « F901318 represents a novel class of antifungal drug that inhibits dihydroorotate dehydrogenase ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, octobre. <https://doi.org/10.1073/pnas.1608304113>.
 - ✓ Olorunniji F. J., S. J. Rosser et W. M. Stark. **2016**. « Site-specific recombinases: molecular machines for the genetic revolution ». *The Biochemical Journal* 473 (6): 673-84. <https://doi.org/10.1042/BJ20151112>.
 - ✓ Osakabe Y., K. Yamaguchi-Shinozaki, K. Shinozaki et L. S. Phan Tran. **2013**. « Sensing the environment: key roles of membrane-localized kinases in plant perception and response to abiotic stress ». *Journal of Experimental Botany* 64 (2): 445-58. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers354>.

- ✓ Oshero N. et D. P. Kontoyiannis. **2017**. « The anti-*Aspergillus* drug pipeline: is the glass half full or empty? » *Medical Mycology* 55 (1): 118-24. <https://doi.org/10.1093/mmy/myw060>.
- ✓ O'Sullivan B. P. et S. D. Freedman. **2009**. « Cystic fibrosis ». *Lancet (London, England)* 373 (9678): 1891-1904. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60327-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60327-5).
- ✓ Ouchane S. et S. Kaplan. **1999**. « Topological analysis of the membrane-localized redox-responsive sensor kinase PrrB from *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 ». *The Journal of Biological Chemistry* 274 (24): 17290-96.
- ✓ Papon N., V. Courdavault, A. Lanoue, M. Clastre et M. Brock. **2014**. « Illuminating fungal infections with bioluminescence ». *PLOS Pathogens* 10 (7): e1004179. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004179>.
- ✓ Papon N., V. Courdavault, M. Clastre, A. J. Simkin, J. Crèche et N. Giglioli-Guivarc'h. **2012**. « Deus ex *Candida* genetics: overcoming the hurdles for the development of a molecular toolbox in the CTG clade ». *Microbiology (Reading, England)* 158 (Pt 3): 585-600. <https://doi.org/10.1099/mic.0.055244-0>.
- ✓ Paranjape S. M. et P. J. Mogayzel. **2018**. « Cystic fibrosis in the era of precision medicine ». *Paediatric Respiratory Reviews* 25 (janvier): 64-72. <https://doi.org/10.1016/j.prrv.2017.03.001>.
- ✓ Paugam A., M. T. Baixench, N. Demazes-Dufeu, P. R. Burgel, E. Sauter, R. Kanaan, D. Dusser, J. Dupouy-Camet et D. Hubert. **2010**. « Characteristics and consequences of airway colonization by filamentous fungi in 201 adult patients with cystic fibrosis in France ». *Medical Mycology* 48 Suppl 1 (novembre): S32-36. <https://doi.org/10.3109/13693786.2010.503665>.
- ✓ Peng R., G. Lin et J. Li. **2016**. « Potential pitfalls of CRISPR/Cas9-mediated genome editing ». *The FEBS Journal* 283 (7): 1218-31. <https://doi.org/10.1111/febs.13586>.
- ✓ Pérez-Bercoff Å., A. Papanicolaou, M. Ramsperger, J. Kaur, H. R. Patel, A. Harun, S. Y. Duan, L. Elbourne, J. P. Bouchara, I. T. Paulsen, H. Nevalainen, W. Meyer, G. A. Huttley. **2015**. « Draft genome of australian environmental strain WM 09.24 of the opportunistic human pathogen *Scedosporium aurantiacum* ». *Genome Announcements* 3 (1). <https://doi.org/10.1128/genomeA.01526-14>.
- ✓ Perfect J. R. **2017**. « The antifungal pipeline: a reality check ». *Nature Reviews. Drug Discovery* 16 (9): 603-16. <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.46>.
- ✓ Pfaller M. A., D. M. Wolk et T. J. Lowery. **2016**. « T2MR and T2*Candida*: novel technology for the rapid diagnosis of candidemia and invasive candidiasis ». *Future Microbiology* 11 (1): 103-17. <https://doi.org/10.2217/fmb.15.111>.
- ✓ Pham T., S. Giraud, G. Schuliar, A. Rougeron et J. P. Bouchara. **2015**. « Scedo-Select III: a new semi-selective culture medium for detection of the *Scedosporium apiospermum* species complex ». *Medical Mycology* 53 (5): 512-19. <https://doi.org/10.1093/mmy/myv015>.
- ✓ Pihet M., J. Carrere, B. Cimon, D. Chabasse, L. Delhaes, F. Symoens et J. P. Bouchara. **2009**. « Occurrence and relevance of filamentous fungi in respiratory secretions of patients with cystic fibrosis a Review ». *Medical Mycology* 47 (4): 387-97. <https://doi.org/10.1080/13693780802609604>.
- ✓ Pinto M. R., B. Mulloy, R. M. Haido, L. R. Travassos et E. Barreto Bergter. **2001**. « A peptidorhamnomannan from the mycelium of *Pseudallescheria boydii* is a potential diagnostic antigen of this emerging human pathogen ». *Microbiology (Reading, England)* 147 (Pt 6): 1499-1506. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-6-1499>.
- ✓ Pittman J. E. et T. W. Ferkol. **2015**. « The evolution of cystic fibrosis care ». *Chest* 148 (2): 533-42. <https://doi.org/10.1378/chest.14-1997>.
- ✓ Pluháček T., K. Lemr, D. Ghosh, D. Milde, J. Novák et V. Havlíček. **2016**. « Characterization of microbial siderophores by mass spectrometry ». *Mass Spectrometry Reviews* 35 (1): 35-47. <https://doi.org/10.1002/mas.21461>.
- ✓ Pöggeler S., M. Nowrousian, I. Teichert, A. Beier et U. Kück. **2018**. « Fruiting-body development in ascomycetes ». In *Physiology and Genetics*, 1-56. The Mycota. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-71740-1_1.
- ✓ Poza G., J. Montoya, C. Redondo, J. Ruiz, N. Vila, J. L. Rodriguez-Tudela, A. Cerón et E. Simarro. **2000**. « Meningitis caused by *Pseudallescheria boydii* treated with voriconazole ». *Clinical Infectious Diseases* 30 (6): 981-82. <https://doi.org/10.1086/313817>.
- ✓ Punt P. J., R. P. Oliver, M. A. Dingemans, P. H. Pouwels et C. A. van den Hondel. **1987**. « Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli* ». *Gene* 56 (1): 117-24.
- ✓ Queiroz-Telles F., M. R. McGinnis, I. Salkin et J. R. Graybill. **2003**. « Subcutaneous mycoses ». *Infectious Disease Clinics of North America* 17 (1): 59-85, viii.
- ✓ Rainer J. et J. Kaltseis. **2010**. « Diversity in *Scedosporium dehoogii* (Microascaceae): *S. deficiens* sp. Nov. » *Sydowia* 62 (1): 137-47. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20103275634>.
- ✓ Rainer J., J. Kaltseis, S. G. de Hoog et R. C. Summerbell. **2008**. « Efficacy of a selective isolation procedure for members of the *Pseudallescheria boydii* complex ». *Antonie Van Leeuwenhoek* 93 (3): 315-22. <https://doi.org/10.1007/s10482-007-9206-y>.

- ✓ Rainer J., G. S. de Hoog, M. Wedde, Y. Gräser et S. Gilges. **2000**. « Molecular variability of *Pseudallescheria boydii*, a neurotropic opportunist ». *Journal of Clinical Microbiology* 38 (9): 3267-73. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC87372/>.
- ✓ Ramirez-Garcia A., A. Pellon, A. Rementeria, I. Buldain, E. Barreto-Bergter, R. Rollin-Pinheiro, J. V. De Meirelles, M. I. D. S. Xisto, S. Ranque, V. Havlicek, P. Vandeputte, Y. L. Govic, J. P. Bouchara, S. Giraud, S. Chen, J. Rainer, A. Alastruey-Izquierdo, M. T. Martin-Gomez, L. M. López-Soria, J. Peman, C. Schwarz, A. Bernhardt, K. Tintelnot, J. Capilla, A. Martin-Vincente, J. Cano-Lira, M. Nagl, M. Lackner, L. Irinyi, W. Meyer, S. De Hoog, F. L. Hernando. **2018**. « *Scedosporium* and *Lomentospora*: an updated overview of underrated opportunists ». *Medical Mycology* 56 (suppl_1): 102-25. <https://doi.org/10.1093/mmy/myx113>.
- ✓ Ratjen F. et G. Döring. **2003**. « Cystic fibrosis ». *Lancet (London, England)* 361 (9358): 681-89. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)12567-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)12567-6).
- ✓ Riordan J. R., J. M. Rommens, B. Kerem, N. Alon, R. Rozmahel, Z. Grzelczak, J. Zielenski, S. Lok, N. Plavsic et J. L. Chou. **1989**. « Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA ». *Science (New York, N.Y.)* 245 (4922): 1066-73.
- ✓ Rippon J. W. et J. W. Carmichael. **1976**. « Petriellidiosis (allescheriosis): four unusual cases and review of literature ». *Mycopathologia* 58 (2): 117-24.
- ✓ Rispaill N. et A. Di Pietro. **2010**. « The two-component histidine kinase Fhk1 controls stress adaptation and virulence of *Fusarium oxysporum* ». *Molecular Plant Pathology* 11 (3): 395-407. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2010.00612.x>.
- ✓ Roberts F. J., P. Allen et T. K. Maybee. **1977**. « *Petriellidium boydii* (*Allescheria boydii*) endocarditis associated with porcine valve replacement ». *Canadian Medical Association Journal* 117 (11): 1250, 1252.
- ✓ Rolfe N. E., T. J. Haddad et T. S. Wills. **2013**. « Management of *Scedosporium apiospermum* in a pre- and post-lung transplant patient with cystic fibrosis ». *Medical Mycology Case Reports* 2 (janvier): 37-39. <https://doi.org/10.1016/j.mmcr.2013.01.002>.
- ✓ Romey, M.-C. 2006. « Caractérisation fonctionnelle de mutants CFTR naturels : intérêt pour la mucoviscidose ». *Annales de Biologie Clinique* 64 (5): 429-37. <https://doi.org/10.1684/abc.2006.0005>.
- ✓ Rommens J. M., M. C. Iannuzzi, B. Kerem, M. L. Drumm, G. Melmer, M. Dean, R. Rozmahel, J. L. Cole, D. Kennedy et N. Hidaka. **1989**. « Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping ». *Science (New York, N.Y.)* 245 (4922): 1059-65.
- ✓ Rondeau S., L. Couderc, S. Dominique, S. Pramila, C. Leguillon, B. Masseline, L. Favennec et C. Marguet. **2012**. « High frequency of voriconazole-related phototoxicity in cystic fibrosis patients ». *The European Respiratory Journal* 39 (3): 782-84. <https://doi.org/10.1183/09031936.00097611>.
- ✓ Rougeron A., S. Giraud, A. Alastruey-Izquierdo, J. Cano-Lira, J. Rainer, A. Mouhajir, S. Le Gal, G. Nevez, W. Meyer et J. P. Bouchara. **2018**. « Ecology of *Scedosporium* species: present knowledge and future research ». *Mycopathologia* 183 (1): 185-200. <https://doi.org/10.1007/s11046-017-0200-2>.
- ✓ Rougeron A., G. Schuliar, J. Leto, E. Sitterlé, D. Landry, M. E. Bougnoux, A. Kobi, J. P. Bouchara et S. Giraud. **2015**. « Human-impacted areas of France are environmental reservoirs of the *Pseudallescheria boydii*/*Scedosporium apiospermum* species complex ». *Environmental Microbiology* 17 (4): 1039-48. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12472>.
- ✓ Ruiz-Díez, B. **2002**. « Strategies for the transformation of filamentous fungi ». *Journal of Applied Microbiology* 92 (2): 189-95.
- ✓ Salas-Delgado G., L. Ongay-Larios, L. Kawasaki-Watanabe, I. López-Villaseñor et R. Coria. **2017**. « The yeasts phosphorelay systems: a comparative view ». *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 33 (6): 111. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2272-z>.
- ✓ Schaap P. **2016**. « Evolution of developmental signalling in dictyostelid social Amoebas ». *Current Opinion in Genetics & Development* 39 (août): 29-34. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2016.05.014>.
- ✓ Schaller G. E., S. H. Shiu et J. P. Armitage. **2011**. « Two-component systems and their co-option for eukaryotic signal transduction ». *Current Biology: CB* 21 (9): R320-330. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.02.045>.
- ✓ Scheu P., S. Sdorra, Y. F. Liao, M. Wegner, T. Basché, G. Udden et W. Erker. **2008**. « Polar accumulation of the metabolic sensory histidine kinases DcuS and CitA in *Escherichia coli* ». *Microbiology (Reading, England)* 154 (Pt 8): 2463-72. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2008/018614-0>.
- ✓ Schuster A. et M. Schmoll. **2010**. « Biology and biotechnology of *Trichoderma* ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 87 (3): 787-99. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2632-1>.
- ✓ Schwartz S., A. Reisman et P. F. Troke. **2011**. « The efficacy of voriconazole in the treatment of 192 fungal central nervous system infections: a retrospective analysis ». *Infection* 39 (3): 201-10. <https://doi.org/10.1007/s15010-011-0108-6>.
- ✓ Sciochetti S. A., T. Lane, N. Ohta et A. Newton. **2002**. « Protein sequences and cellular factors required for polar localization of a histidine kinase in *Caulobacter crescentus* ». *Journal of Bacteriology* 184 (21): 6037-49.

- ✓ Sedlacek L., B. Graf, C. Schwarz, F. Albert, S. Peter, B. Würstl, S. Wagner, M. Klotz, A. Becker, G. Haase, G. Laniado, B. Kahl, S. Suerbaum, M. Seibold et K. Tintelnot. **2015**. « Prevalence of *Scedosporium* species and *Lomentospora prolificans* in patients with cystic fibrosis in a multicenter trial by use of a selective medium ». *Journal of Cystic Fibrosis: Official Journal of the European Cystic Fibrosis Society* 14 (2): 237-41. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2014.12.014>.
- ✓ Senutovitch N., L. Verneti, R. Boltz, R. DeBiasio, A. Gough et D. L. Taylor. **2015**. « Fluorescent protein biosensors applied to microphysiological systems ». *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)* 240 (6): 795-808. <https://doi.org/10.1177/1535370215584934>.
- ✓ Sharma C. et Anuradha Chowdhary. **2017**. « Molecular bases of antifungal resistance in filamentous fungi ». *International Journal of Antimicrobial Agents* 50 (5): 607-16. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.06.018>.
- ✓ Shi T. Q., G. N. Liu, R. Y. Ji, K. Shi, P. Song, L. J. Ren, H. Huang et X. J. J. Ji. **2017**. « CRISPR/Cas9-based genome editing of the filamentous fungi: the state of the art ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 101 (20): 7435-43. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8497-9>.
- ✓ Shih L. Y. et N. Lee. **1984**. « Disseminated petriellidiosis (allescheriasis) in a patient with refractory acute lymphoblastic leukaemia ». *Journal of Clinical Pathology* 37 (1): 78-82.
- ✓ Shin J. H., R. Ranken, S. E. Sefers, R. Lovari, C. D. Quinn, S. Meng, H. E. Carolan, D. Toleno, H. Li, J. N. Lee, C. W. Stratton, C. Massire et Y. W. Tang. **2013**. « Detection, identification, and distribution of fungi in bronchoalveolar lavage specimens by use of multilocus PCR coupled with electrospray ionization/mass spectrometry ». *Journal of Clinical Microbiology* 51 (1): 136-41. <https://doi.org/10.1128/JCM.01907-12>.
- ✓ Shor E. et N. Chauhan. **2015**. « A case for two-component signaling systems as antifungal drug targets ». *PLoS Pathogens* 11 (2): e1004632. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004632>.
- ✓ Sidot C., P. Simon, J. P. Bouchara, D. Chabasse, T. Urban et J. L. Giniès. **2007**. « 116 *Scedosporium apiospermum*. Environmental study in the homes of patients with cystic fibrosis ». *Journal of Cystic Fibrosis* 6 (juin): S29. [https://doi.org/10.1016/S1569-1993\(07\)60106-4](https://doi.org/10.1016/S1569-1993(07)60106-4).
- ✓ Siewers V. **2014**. « An overview on selection marker genes for transformation of *Saccharomyces cerevisiae* ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1152: 3-15. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0563-8_1.
- ✓ Da Silva Ferreira M. E., M. R. Kress, M. Savoldi, M. H. Goldman, A. Härtl, T. Heinekamp, A. A. Brakhage et G. H. Goldman. **2006**. « The *AkuB*(KU80) mutant deficient for nonhomologous end joining is a powerful tool for analyzing pathogenicity in *Aspergillus fumigatus* ». *Eukaryotic Cell* 5 (1): 207-11. <https://doi.org/10.1128/EC.5.1.207-211.2006>.
- ✓ Sitterlé E., S. Giraud, J. Leto, J. P. Bouchara, A. Rougeron, F. Morio, B. Dauphin, C. Angebault, G. Quesne, J. L. BerettiN. Hassouni, X. Nassif, M. E. Bognoux. **2014**. « Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and accurate identification of *Pseudallescheria/Scedosporium* species ». *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 20 (9): 929-35. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12574>.
- ✓ Sleiman S., C. L. Halliday, B. Chapman, M. Brown, J. Nitschke, A. F. Lau et S. C. A. Chen. **2016**. « Performance of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of *Aspergillus*, *Scedosporium*, and *Fusarium* spp. in the Australian clinical setting ». *Journal of Clinical Microbiology* 54 (8): 2182-86. <https://doi.org/10.1128/JCM.00906-16>.
- ✓ Solé A., A. A. García-Robles, C. Jordá, E. Cases Viedma, N. Mancheño, J. L. Poveda-Andrés, J. P. Reig Mezquida et J. Pemán. **2018**. « Salvage therapy with topical posaconazole in lung transplant recipients with invasive *Scedosporium* infection ». *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 18 (2): 504-9. <https://doi.org/10.1111/ajt.14580>.
- ✓ Spatafora J. W., Y. Chang, G. L. Benny, K. Lazarus, M. E. Smith, M. L. Berbee, G. Bonito, N. Corradi, I. Grigoriev, A. Gryganskyi, T.Y. James, K. O'Donnell, R. W. Roberson, T. N. Taylor, J. Uehling, R. Vilgalys, M. M. White, J. E. Stajich. **2016**. A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data. *Mycologia* 108(5):1028-1046.
- ✓ Stensvold C. R., L. N. Jørgensen et M. C. Arendrup. **2012**. « Azole-resistant invasive aspergillosis: relationship to agriculture ». *Current Fungal Infection Reports* 3 (6): 178-91. <https://doi.org/10.1007/s12281-012-0097-7>.
- ✓ Strausbaugh S. D. et P. B. Davis. **2007**. « Cystic fibrosis: a review of epidemiology and pathobiology ». *Clinics in Chest Medicine* 28 (2): 279-88. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2007.02.011>.
- ✓ Summerbell, R. C. **1993**. « The benomyl test as a fundamental diagnostic method for medical mycology ». *Journal of Clinical Microbiology* 31 (3): 572-77.
- ✓ Summerbell R. C., S. Krajden et J. Kane. **1989**. « Potted plants in hospitals as reservoirs of pathogenic fungi ». *Mycopathologia* 106 (1): 13-22.
- ✓ Szweczyk E., T. Kasuga et Z. Fan. **2013**. « Efficient sequential repetitive gene deletions in *Neurospora crassa* employing a self-excising β -Recombinase/*six* Cassette ». *Journal of Microbiological Methods* 92 (3): 236-43. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.12.004>.

- ✓ Taj-Aldeen S. J., B. Rammaert, M. Gamaletsou, N. V. Sipsas, V. Zeller, E. Roilides, D. P. Kontoyiannis, A. O. Miller, V. Petraitis, T. J. Walsh et O. Lortholary. **2015**. « Osteoarticular Infections Caused by Non-Aspergillus Filamentous Fungi in Adult and Pediatric Patients: A Systematic Review ». *Medicine* 94 (50): e2078. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000002078>.
- ✓ Thornton C. R. **2009**. « Tracking the emerging human pathogen *Pseudallescheria boydii* by using highly specific monoclonal antibodies ». *Clinical and Vaccine Immunology: CVI* 16 (5): 756-64. <https://doi.org/10.1128/CVI.00061-09>.
- ✓ Tintelnot K., N. Wagner, M. Seibold, G. S. de Hoog et R. Horré. **2008**. « Re-identification of clinical isolates of the *Pseudallescheria boydii*-complex involved in near-drowning ». *Mycoses* 51 Suppl 3 (septembre): 11-16. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2008.01579.x>.
- ✓ Tiwari S., S. B. Jamal, S. S. Hassan, P. V. S. D. Carvalho, S. Almeida, D. Barh, P. Ghosh, A. Silva, T. L. P. Castro et V. Azevedo. **2017**. « Two-component signal transduction systems of pathogenic bacteria as targets for antimicrobial therapy: an overview ». *Frontiers in Microbiology* 8: 1878. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01878>.
- ✓ Tortorano A. M., M. Richardson, E. Roilides, A. van Diepeningen, M. Caira, P. Munoz, E. Johnson, J. Meletiadis, Z. D. Pana, M. Lackner, P. Verweij, T. Freiburger, O. A. Cornely, S. Arian-Akdagli, E. Dannaoui, A. H. Groll, K. Lagrou, A. Chakrabarti, F. Lanternier, L. Pagano, A. Skiada, M. Akova, M. C. Arendrup, T. Boekhout, A. Chowdhary, M. Cuenca-Estrella, J. Guinea, J. Guarro, S. De Hoog, W. Hope, S. Kathuria, O. Lortholary, J. F. Meis, A. J. Ullmann, G. Petrikos, C. Lass-Flörl. **2014**. « ESCMID and ECMM joint guidelines on diagnosis and management of hyalohyphomycosis: *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp. and others ». *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 20 Suppl 3 (avril): 27-46. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12465>.
- ✓ Tóth E. J., G. R. Nagy, M. Homa, M. Ábrók, I. É Kiss, G. Nagy, Z. Bata-Csörgő, L. Kemény, E. Urbán, C. Vágvolgyi et T. Papp. **2017**. « Recurrent *Scedosporium apiospermum* mycetoma successfully treated by surgical excision and terbinafine treatment: a case report and review of the literature ». *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 16 (1): 31. <https://doi.org/10.1186/s12941-017-0195-z>.
- ✓ Toyn J. H., P. L. Gunyuzlu, W. H. White, L. A. Thompson et G. F. Hollis. **2000**. « A counterselection for the tryptophan pathway in yeast: 5-fluoroanthranilic acid resistance ». *Yeast (Chichester, England)* 16 (6): 553-60. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(200004\)16:6<553::AID-YEA554>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(200004)16:6<553::AID-YEA554>3.0.CO;2-7).
- ✓ Troke P. K., Aguirrebengoa, C. Arteaga, D. Ellis, C. H. Heath, I. Lutsar, M. Rovira, Q. Nguyen, M. Slavin, S. C. Chen. **2008**. « Treatment of scedosporiosis with voriconazole: clinical experience with 107 patients ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52 (5): 1743-50. <https://doi.org/10.1128/AAC.01388-07>.
- ✓ Turgeon B. G., B. Condon, J. Liu et N. Zhang. **2010**. « Protoplast transformation of filamentous fungi ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 638: 3-19. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-611-5_1.
- ✓ Utsumi R. **2017**. « Bacterial signal transduction networks via connectors and development of the inhibitors as alternative antibiotics ». *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 81 (9): 1663-69. <https://doi.org/10.1080/09168451.2017.1350565>.
- ✓ Van Grunderbeeck N., V. Conseil, S. Leroy, B. Wallaert et L. Delhaes. **2010**. « The fungal risk in cystic fibrosis: a pilot study ». *Annales De Biologie Clinique* 68 (2): 157-62. <https://doi.org/10.1684/abc.2010.0404>.
- ✓ Vandeputte P., S. Ghamrawi, M. Rechenmann, A. Iltis, S. Giraud, M. Fleury, C. Thornton, L. Delhaès, W. Meyer, N. Papon et J. P. Bouchara. **2014**. « Draft genome sequence of the pathogenic fungus *Scedosporium apiospermum* ». *Genome Announcements* 2 (5). <https://doi.org/10.1128/genomeA.00988-14>.
- ✓ Vankeerberghen A., H. Cuppens et J. J. Cassiman. **2002**. « The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: an intriguing protein with pleiotropic functions ». *Journal of Cystic Fibrosis: Official Journal of the European Cystic Fibrosis Society* 1 (1): 13-29.
- ✓ Velikova N., S. Fulle, A. Sousa Manso, M. Mechkarska, P. Finn, J. M. Conlon, M. Rinaldo Oggioni, J. M. Wells et A. Marina. **2016**. « Putative histidine kinase inhibitors with antibacterial effect against multi-drug resistant clinical isolates identified by *in vitro* and *in silico* screens ». *Scientific Reports* 6: 26085. <https://doi.org/10.1038/srep26085>.
- ✓ Venugopal P. V. et T. V. Venugopal. **1995**. « Pale grain eumycetomas in Madras ». *The Australasian Journal of Dermatology* 36 (3): 149-51.
- ✓ Verweij P. E., A. Chowdhary, W. J. G. Melchers et J. F. Meis. **2016**. « Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: can we retain the clinical use of mold-active antifungal azoles? ». *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 62 (3): 362-68. <https://doi.org/10.1093/cid/civ885>.
- ✓ Verweij P. E., N. J. Cox et J. F. Meis. **1997**. « Oral terbinafine for treatment of pulmonary *Pseudallescheria boydii* infection refractory to itraconazole therapy ». *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology* 16 (1): 26-28.
- ✓ Viaud M., S. Fillinger, W. Liu, J. Santosh Polepalli, P. Le Pêcheur, A. Reddy Kunduru, P. Leroux et L. Legendre. **2006**. « A class III histidine kinase acts as a novel virulence factor in *Botrytis cinerea* ». *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI* 19 (9): 1042-50. <https://doi.org/10.1094/MPMI-19-1042>.

- ✓ Villalba F., J. Collemare, P. Landraud, K. Lambou, V. Brozek, B. Cirer, D. Morin, C. Bruel, R. Beffa et M. H. Lebrun. **2008**. « Improved gene targeting in *Magnaporthe grisea* by inactivation of MgKU80 required for non-homologous end joining ». *Fungal Genetics and Biology: FG & B* 45 (1): 68-75. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2007.06.006>.
- ✓ Walsh T. J., A. Groll, J. Hiemenz, R. Fleming, E. Roilides et E. Anaissie. **2004**. « Infections due to emerging and uncommon medically important fungal pathogens ». *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 10 Suppl 1 (mars): 48-66.
- ✓ a. Walsh T. J., I. Lutsar, T. Driscoll, B. Dupont, M. Roden, P. Ghahramani, M. Hodges, A. H. Groll et J. R. Perfect. **2002**. « Voriconazole in the treatment of aspergillosis, scedosporiosis and other invasive fungal infections in children ». *The Pediatric Infectious Disease Journal* 21 (3): 240-48.
- ✓ b. Walsh T. J., E. Roilides, C. Gonzalez, D. Shetty, J. Peter, H. Katsifa et C. A. Lyman. **2002**. « Mechanisms of phagocytic host defense against *Pseudallescheria boydii* (*Scedosporium apiospermum*): an emerging polyene-resistant fungal pathogen in immunocompromised hosts ». *International Journal of Infectious Diseases* 6 (juin): S49. [https://doi.org/10.1016/S1201-9712\(02\)90282-1](https://doi.org/10.1016/S1201-9712(02)90282-1).
- ✓ Walsh T. J., J. Peter, D. A. McGough, A. W. Fothergill, M. G. Rinaldi et P. A. Pizzo. **1995**. « Activities of amphotericin B and antifungal azoles alone and in combination against *Pseudallescheria boydii*. » *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39 (6): 1361-64. <https://doi.org/10.1128/AAC.39.6.1361>.
- ✓ Walts A. E. **2001**. « *Pseudallescheria*: an underdiagnosed fungus? » *Diagnostic Cytopathology* 25 (3): 153-57.
- ✓ Wang H., M. La Russa et L. S. Qi. **2016**. « CRISPR/Cas9 in genome editing and beyond ». *Annual Review of Biochemistry* 85 (juin): 227-64. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060815-014607>.
- ✓ Wang S., H. Chen, X. Tang, H. Zhang, W. Chen et Y. Q. Chen. **2017**. « Molecular tools for gene manipulation in filamentous fungi ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 101 (22): 8063-75. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8486-z>.
- ✓ Wang Y., Y. Y. Yau, D. Perkins-Balding et J. G. Thomson. **2011**. « Recombinase technology: applications and possibilities ». *Plant Cell Reports* 30 (3): 267-85. <https://doi.org/10.1007/s00299-010-0938-1>.
- ✓ Wayne K. J., L. T. Sham, H. C. T. Tsui, A. D. Gutu, S. M. Barendt, S. K. Keen et M. E. Winkler. **2010**. « Localization and cellular amounts of the WalRKJ (VicRKX) two-component regulatory system proteins in serotype 2 *Streptococcus pneumoniae*. » *Journal of Bacteriology* 192 (17): 4388-94. <https://doi.org/10.1128/JB.00578-10>.
- ✓ Weld R. J., K. M. Plummer, M. A. Carpenter et H. J. Ridgway. **2006**. « Approaches to functional genomics in filamentous fungi ». *Cell Research* 16 (1): 31-44. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7310006>.
- ✓ Welsh M. J. et A. E. Smith. **1993**. « Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis ». *Cell* 73 (7): 1251-54.
- ✓ Wheeler R. T. et L. Shapiro. **1999**. « Differential localization of two histidine kinases controlling bacterial cell differentiation ». *Molecular Cell* 4 (5): 683-94.
- ✓ Wiederhold N. P. **2017**. « Antifungal resistance: current trends and future strategies to combat ». *Infection and Drug Resistance* 10: 249-59. <https://doi.org/10.2147/IDR.S124918>.
- ✓ a. Wiederhold N. P., D. Law et M. Birch. **2017**. « Dihydroorotate dehydrogenase inhibitor F901318 has potent *in vitro* activity against *Scedosporium* species and *Lomentospora prolificans*. » *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 72 (7): 1977-80. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx065>.
- ✓ b. Wiederhold N. P., T. F. Patterson, A. Srinivasan, A. K. Chaturvedi, A. W. Fothergill, F. L. Wormley, A. K. Ramasubramanian et J. L. Lopez-Ribot. **2017**. « Repurposing auranofin as an antifungal: *in vitro* activity against a variety of medically important fungi ». *Virulence* 8 (2): 138-42. <https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1196301>.
- ✓ Wilke K. E., C. A. Fihn et E. E. Carlson. **2018**. « Screening serine/threonine and tyrosine kinase inhibitors for histidine kinase inhibition ». *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, avril. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.04.047>.
- ✓ Wilke K. E., S. Francis et E. E. Carlson. **2015**. « Inactivation of multiple bacterial histidine kinases by targeting the ATP-binding domain ». *ACS Chemical Biology* 10 (1): 328-35. <https://doi.org/10.1021/cb5008019>.
- ✓ Williams J. R., M. W. Tenforde, J. D. Chan, A. Ko et S. M. Graham. **2016**. « Safety and clinical response of intraventricular caspofungin for *Scedosporium apiospermum* complex central nervous system infection ». *Medical Mycology Case Reports* 13 (septembre): 1-4. <https://doi.org/10.1016/j.mmcr.2016.07.003>.
- ✓ Wright A. V., J. K. Nuñez et J. A. Doudna. **2016**. « Biology and applications of CRISPR systems: Harnessing nature's toolbox for genome engineering ». *Cell* 164 (1-2): 29-44. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.035>.
- ✓ a. Xu C., X. Zhang, Y. Qian, X. Chen, R. Liu, G. Zeng, H. Zhao et W. Fang. **2014**. « A high-throughput gene disruption methodology for the entomopathogenic fungus *Metarhizium robertsii*. » *PloS One* 9 (9): e107657. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107657>.
- ✓ b. Xu Q. R., L. Yan, Q. Z. Lv, M. Zhou, X. Sui, Y. B. Cao et Y. Y. Jiang. **2014**. « Molecular genetic techniques for gene manipulation in *Candida albicans*. » *Virulence* 5 (4): 507-20. <https://doi.org/10.4161/viru.28893>.

- ✓ Yamada-Okabe T., T. Mio, N. Ono, Y. Kashima, M. Matsui, M. Arisawa et H. Yamada-Okabe. **1999**. « Roles of three histidine kinase genes in hyphal development and virulence of the pathogenic fungus *Candida albicans* ». *Journal of Bacteriology* 181 (23): 7243-47.
- ✓ Yoo D., W. H. Lee et K. J. Kwon-Chung. **1985**. « Brain abscesses due to *Pseudallescheria boydii* associated with primary non-Hodgkin's lymphoma of the central nervous system: a case report and literature review ». *Reviews of Infectious Diseases* 7 (2): 272-77.
- ✓ Yoshimi A., K. Kojima, Y. Takano et C. Tanaka. **2005**. « Group III histidine kinase is a positive regulator of Hog1-type mitogen-activated protein kinase in filamentous fungi ». *Eukaryotic Cell* 4 (11): 1820-28. <https://doi.org/10.1128/EC.4.11.1820-1828.2005>.
- ✓ Yu, J. H., Z. Hamari, K. H. Han, J. A. Seo, Y. Reyes-Domínguez et C. Scazzocchio. **2004**. « Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi ». *Fungal Genetics and Biology: FG & B* 41 (11): 973-81. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2004.08.001>.
- ✓ Zeng J. S., K. Fukushima, K. Takizawa, Y. C. Zheng, K. Nishimura, Y. Gräser et G. S. De Hoog. **2007**. « Intraspecific diversity of species of the *Pseudallescheria boydii* complex ». *Medical Mycology* 45 (6): 547-58. <https://doi.org/10.1080/13693780701435341>.
- ✓ Zhang D. X., H. L. Lu, X. Liao, R. J. St Leger et D. L. Nuss. **2013**. « Simple and efficient recycling of fungal selectable marker genes with the Cre-loxP recombination system via anastomosis ». *Fungal Genetics and Biology: FG & B* 61 (décembre): 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2013.08.013>.
- ✓ Zhang Y., R. Lamm, C. Pillonel, S. Lam et J. R. Xu. **2002**. « Osmoregulation and fungicide resistance: the *Neurospora crassa* os-2 gene encodes a HOG1 mitogen-activated protein kinase homologue ». *Applied and Environmental Microbiology* 68 (2): 532-38.
- ✓ Zhou G., J. Wang, L. Qiu et M. G. Feng. **2012**. « A group III histidine kinase (Mhk1) upstream of high-osmolarity glycerol pathway regulates sporulation, multi-stress tolerance and virulence of *Metarhizium robertsii*, a fungal entomopathogen ». *Environmental Microbiology* 14 (3): 817-29. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02643.x>.
- ✓ Zouhair R., A. Rougeron, J. Bienvenue Razafimandimby, A. Kobi, J. P. Bouchara et S. Giraud. **2013**. « Distribution of the different species of the *Pseudallescheria boydii*/*Scedosporium apiospermum* complex in French patients with cystic fibrosis ». *Medical Mycology* 51 (6): 603-13. <https://doi.org/10.3109/13693786.2013.770606>.
- ✓ Zouhair R., A. Defontaine, C. Ollivier, B. Cimon, F. Symoens, J. N. Halle, J. Deunff et J. P. Bouchara. **2001**. « Typing of *Scedosporium apiospermum* by multilocus enzyme electrophoresis and random amplification of polymorphic DNA ». *Journal of Medical Microbiology* 50 (10): 925-32. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-50-10-925>.

ANNEXES

LISTE DES ANNEXES

Annexe I. Milieux de culture et réactifs	364
Annexe II. Version préliminaire d'une revue sur les marqueurs de résistance aux drogues chez les levures et les champignons filamenteux.....	371

Annexe I

Milieux de culture et réactifs

1. Milieux de culture

1.1. Luria Bertani Agar (LBA) et LB

Pour 1 L de préparation :

*Tryptone :	10 g
*Extrait de levure :	5 g
*NaCl :	10 g
*+/- Agar :	20 g
*Eau distillée :	qsp. 1 L

1.2. Potato Dextrose Agar

Pour 1 L de préparation :

*Chloramphénicol :	0,5 g
*Potato Dextrose Agar (Pronadisa) :	39 g
*Eau distillée :	qsp. 1 L

1.3. Yeast Carbon Base (YCB)

Pour 1 L de préparation :

*Chloramphénicol :	0,5 g
*Yeast Carbon Base (Sigma-Aldrich) :	11,5 g
*Eau distillée :	qsp. 1 L

1.4. Yeast Nitrogen Base (YNB)

Pour 1 L de préparation :

*Chloramphénicol :	0,5 g
*Yeast Nitrogen Base :	7 g
*Agar :	20

1.5. Yeast Peptone Dextrose Agar (YPDA) et YPD

Pour 1 L de préparation :

*Chloramphénicol :	0,5 g
*Extrait de levure :	5 g
*Peptone pancréatique :	10 g
*Glucose :	20 g
*+/- Agar :	20 g
*Eau distillée :	qsp. 1 L

2. Réactifs

2.1. Réactifs pour l'extraction de l'ADN génomique

2.1.1. Tris-EDTA 1X (TE 1X)

Pour 1 L de préparation :

*Tris-HCl 1M pH7,5 (10mM) :	10 mL
*EDTA disodium 2.H ₂ O 0,5M pH8 (1mM) :	2 mL
*Eau distillée :	qsp. 1 L

2.1.2. Acétate de sodium 3M pH5,2

Pour 100 mL de préparation :

*Acétate de sodium :	40,82 mL
*Acide acétique :	pH5,2
*Eau distillée :	qsp. 100 mL

2.1.3. Tampon de lyse

Pour 100 mL de préparation :

*Triton 100X :	2 mL
*SDS (20%) :	5 mL
*NaCl 5M :	2 mL
*Tris-HCl 1M pH8 :	1 mL
*EDTA 0,5M :	200 µL
*Eau distillée :	qsp. 100 mL

2.2. Réactifs pour l'extraction de l'ADN plasmidique

2.2.1. Solution de resuspension

Pour 50 mL de préparation :

*Tris-HCl 1M pH7,5 (10mM) :	2,5 mL
*EDTA dosodium 2.H ₂ O 0,5M pH8 (1mM) :	100 µL
*RNase (10 mg.mL ⁻¹)	250 µL
*Eau distillée :	qsp. 50 mL

2.2.2. Solution de lyse

Pour 100 mL de préparation :

*NaOH :	0,8 g
*SDS (20%) :	5 mL
*Eau distillée :	qsp. 100 mL

2.2.3. Solution de neutralisation

Pour 100 mL de préparation :

*Acétate de potassium (2,55M) :	0,8 g
*Acide acétique :	15 mL
*Hydroxyde de potassium :	pH 4,8
*Eau distillée :	qsp. 100 mL

2.3. Réactifs pour la transformation fongique

2.3.1. OM/Glucanex extemporané

Pour 80 mL de préparation :

*MgSO ₄ .7H ₂ O (1,2M) :	24 g
*NaPO ₄ 1M pH5,8 (10mM) :	0,8 mL
*Glucanex (Sigma-Aldrich) :	1 g
*Na ₂ HPO ₄ 1M pH5,6 (1M) :	4,4 mL
*Eau distillée :	qsp. 80 mL

2.3.2. Tampon ST

Pour 500 mL de préparation :

*Sorbitol (1,2M) :	54,6 g
*Tris-HCl 1M pH7,5 (10mM) :	50 mL
*Eau distillée :	qsp. 500 mL

2.3.3. Tampon STC

Pour 500 mL de préparation :

*Sorbitol (1,2M) :	109,4 g
*Tris-HCl 1M pH7,5 (10mM) :	5 mL
*CaCl ₂ 1M (10mM) :	5 mL
*Eau distillée :	qsp. 500 mL

2.3.4. Tampon PTC extemporané

Pour 10 mL de préparation :

*Tris-HCl 1M pH7,5 (10mM) :	0,1 mL
*CaCl ₂ 1M (10mM) :	0,1 mL
*PEG 3350 60% :	qsp. 10 mL

2.3.5. Molten Agar

Pour 1 L de préparation :

*Solution 1 : Saccharose 2M	500 mL
*Solution 2 : Yeast/AA 20%	100 mL
*Solution 3 : Soft agar 3,2%	400 mL

Solution 1 : Saccharose 2M

Ajuster à pH7,5

*Saccharose :	342 g
*Eau distillée :	qsp. 500 mL

Solution 2 : Yeast/AA 20%

*Extrait de levure :	5 g
*Casaminoacides :	5 g
*Eau distillée :	qsp. 500 mL

Solution 3 : Soft agar 3,2%

*Soft agar :	16 g
*Eau distillée :	qsp. 500 mL

2.4. Réactifs pour le Southern blot

2.4.1. Solution de transfert 1

Pour 1 L de préparation :

*Eau distillée :	989 mL
*HCl 0,25M :	11 mL

2.4.2. Solution de transfert 2Pour 1 L de préparation :

*NaCl (1,5M) :	87,7 g
*NaOH (0,5M) :	20 g
*Eau distillée :	qsp. 1 L

2.4.3. Solution de transfert 3Pour 1 L de préparation :

*NaCl (1,5M) :	87,7 g
*Tris-hydroxyméthyl-aminométhane (0,5M) :	60,5 g
*Eau distillée :	qsp. 800 mL
*HCl :	Ajuster à pH7,5
*Eau distillée :	qsp. 1 L

2.4.4. Solution de transfert SSC 20XPour 1 L de préparation :

*Tris-sodium citrate :	88,2 g
*NaCl :	175,3 g
*Eau distillée :	qsp. 1 L

2.4.5. Solution d'hybridationPour 100 mL de préparation :

*NaCl :	2,9 g
*Hybridization buffer :	100 mL
*Blocking reagent :	4 g
*Eau distillée :	qsp. 100 mL

2.4.6. Tampon de lavage primairePour 100 mL de préparation :

*Urée :	120 g
*Sodium dodécyl sulfate :	1 g
*Phosphate de sodium 0,5M pH7 :	100 mL
*NaCl :	8,7 g
*MgCl ₂ 1M :	1 mL
*Blocking reagent :	2 g
*Eau distillée :	qsp. 100 mL

2.4.7. Tampon de lavage secondaire 20X

Pour 1L de préparation :

*Tris-hydroxyméthyl-aminométhane (1M) :	121 g
*NaCl (2M) :	112 g
*Eau distillé :	800 mL
*HCl :	Ajuster à pH10
*Eau distillée :	qsp. 1 L

2.4.8. Tampon de lavage secondaire 1X extemporané

Pour 1L de préparation :

*Tampon de lavage secondaire 20X :	50 mL
*MgCl ₂ 1M :	2 mL
*Eau distillée :	qsp. 1 L

Annexe II

Version préliminaire d'une revue sur les marqueurs de résistance aux drogues chez les levures et les champignons filamenteux

1. Title

Selection markers conferring drug resistance in Fungi: an overview.

2. Authors

A. Hérivaux¹, P. Vandeputte^{1,2}, A. Gastebois¹, J-P Bouchara^{1,2}, J-P Latgé³, N. Papon¹

¹ Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène, GEIHP, EA3142, Université d'Angers, Angers, France

² Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Centre Hospitalier Universitaire d'Angers, Angers, France

³ Unité des Aspergillus, Institut Pasteur, Paris, France

3. Introduction

Nowadays, it is well established that Fungi deeply impact human health and environment. Thus, fungal species are studied in a wide range of research fields, such as human and animal health, agronomy or biotechnology. With more than a million of fungal genomes available in databases, plenty of fungal genes are identified and need to be characterized. With the goal to better understand fungal genetic mechanisms that regulate physiological process or antifungal resistance for example, researchers have to develop an effective procedure to transform their fungal organism. Fungal transformation consists in different strategies according the intended goal (eg. integration of a disruption cassette, a fluorescent protein, a luciferase, ...). Numerous molecular tools and strategies are available for model fungal organisms. Otherwise, the development of adapted molecular tools and transformation systems is necessary. The essential prerequisite is the development of an effective selection marker in the studied strain.

In Fungi, two categories of dominant selectable markers have been identified and used in the transformation of different yeast and mold models: i) auxotrophic markers and ii) resistance genes. Auxotrophic markers do not suit to all fungal species as far as auxotrophic recipient strains must be generated. This step is limiting in a wide range of fungal species. However, genes conferring resistance to drugs permit to overcome the nutritional status of the strain and thus can be applied to a great variety of fungal organisms.

In this paper we propose an overview of the major dominant drug resistance selection markers available in yeast and fungal transformation strategies. This work aimed at reviewing, for each drug, the mechanism of action, the mechanism of resistance, the application in yeast and/or mold models, and evaluating the quality/price ratio compared to selection markers that are already widely used as selection markers in fungal transformation (hygromycin B, geneticin and nourseothricin).

4. Antibiotic resistance

4.1. Aminoglycosides

Three antibiotics belonging to the aminoglycoside family, that inhibit protein biosynthesis, have been widely used in both yeast and fungal transformation experiments: i) hygromycin B (HmB), ii) geneticin (G418), and iii) nourseothricin (Nour). These three drugs won't be widely described here as several papers have already gathered data on their mechanisms of action and resistance, their uses in yeast and fungal transgenesis. Nevertheless, alternative to these three drugs are required because they are quite expensive molecules and usually a high concentration in drug is needed in the media to totally inhibit the growth of fungi.

HmB is a natural antibiotic synthesized by *Streptomyces hygroscopicus*. Resistance to HmB is due to the *hph* gene, isolated in both *Escherichia coli* and *S. hygroscopicus*, which encodes the hygromycin phosphotransferase. Thus, the phosphorylation inactivates HmB. This drug has been widely used in a variety of yeasts and mold models even if some species remain highly resistant to HmB (eg. *Aspergillus nidulans* and *Penicillium chrysogenum* growth was not inhibited with 1 mg.mL⁻¹ HmB in the medium). Another interesting feature is the decreased of HmB activity in hypertonic media, such as the one used for protoplast regeneration. Thus it is necessary to use a two-fold concentration than the one that inhibits spores growth on isotonic media. As a consequence, high concentrations are needed in transformation strategies but HmB is quite expensive (Fincham, 1989; Reiser *et al.*, 1990; Punt *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 2001; Ruiz-Diez, 2002; Weld *et al.*, 2006; Frandsen, 2011; Papon *et al.*, 2012; Saraya *et al.*, 2011; Siewers *et al.*, 2014).

G418 is a natural molecule synthesized by *Micromonospora rhodorangea*. Resistance to G418 is due to a 3'-phosphotransferase encoded by the *neo* gene from transposon Tn5 of *Escherichia coli*. Transformed yeasts such as *Kluyveromyces* spp., *Pichia* spp., *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* and fungi such as *Schizophyllum* spp., *Ustilago maydis* have already been selected on media containing G418. Even if this drug is phenotypically neutral, high concentrations are usually necessary to select transformed cells (Fincham, 1989; Reiser *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 2001; Jiang *et al.*, 2013; Saraya *et al.*, 2011; Siewers *et al.*, 2014).

Nour is naturally produced by *Streptomyces noursei*. The resistance gene *SAT-1* encodes a streptothricin acetyltransferase. Concentrations ranging from 100 to 200 µg.mL⁻¹ were necessary to inhibit *Candida* spp. growth. This *SAT-1* gene has been widely used in yeasts (eg. *Candida* spp., *Meyerozyma guilliermondii*, *Saccharomyces* spp., *Schizosaccharomyces pombe*, ...) and fungal (eg. *Penicillium chrysogenum*, *Pleurotus ostreatus*, *Ustilago maydis*, ...) transgenesis (Papon *et al.*, 2012; Saraya *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2014b).

4.2. Aureobasidin A

Aureobasidin A (AbA) is a natural compound produced by *Aureobasidium pullulans* (Ikai *et al.*, 1991; Takesako *et al.*, 1991). This antibiotic is a cyclic depsipeptide characterized by eight L- amino acids and a hydroxyl acid (Ikai *et al.*, 1991; Takesako *et al.*, 1991, 1993). It display a fungicidal activity against a wide range of fungi (eg. Dematiaceous and dimorphic fungi) (Takesako *et al.*, 1993). Some pathogenic species are particularly susceptible to AbA such as *Candida albicans* (MIC < 0.05 µg/mL (Takesako *et al.*, 1991)), *Cryptococcus neoformans*, *Blastobotrys dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe* (MIC 0.1-0.5 µg/mL (Hashida-Okado *et al.*, 1996, 1998; Shimizu *et al.*, 2006)) and some *Aspergillus* species (Ikai *et al.*, 1991; Takesako *et al.*, 1991, 1993; Endo *et al.*, 1997; Hashida-Okado *et al.*, 1998). Nevertheless, AbA is less active on the most important pathogenic aspergilli species as *A. fumigatus* (MIC 50 µg/mL (Zhong *et al.*, 1999)) *A. niger*, and *A. flavus* (Takesako *et al.*, 1993; Zhong *et al.*, 1999). Dermatophytes are documented to be highly resistant to AbA (Takesako *et al.*, 1993).

AbA targets the fungal inositol phosphorylceramide synthase (IPC synthase). This enzyme is involved in the biosynthesis of sphingolipids which are major membrane components of fungal cells (Zhong *et al.*, 1999; Aeed *et al.*, 2009). This step is essential for the viability and the growth of fungi (Takesako *et al.*, 1993; Heidler and Radding, 1995; Endo *et al.*, 1997; Nagiec *et al.*, 1997). Importantly, the target enzyme is absent in mammals (Takesako *et al.*, 1993; Kuroda *et al.*, 1999; Zhong *et al.*, 1999). In fungi, the IPC synthase activity may be inhibited by very low concentrations of AbA as it had been demonstrated for *S. cerevisiae* (100% inhibitory concentration: 1 nM of AbA (Nagiec *et al.*, 1997)) or *Candida* and aspergilli strains (50% inhibitory concentration: 0.2-4.9 nM of AbA (Zhong *et al.*, 1999)).

AbA resistance relies on mutations in the IPC synthase gene. Such mutations have been identified in various fungal organisms: *Saccharomyces cerevisiae* (Heidler and Radding, 1995; Hashida-Okado *et al.*, 1996), *Schizosaccharomyces pombe* (Hashida-Okado *et al.*, 1998), and *Aspergillus nidulans* (Kuroda *et al.*, 1999). A single dominant point mutation in the sequence of the IPC synthase is able to confer a high resistance toward AbA. For example, a mutation was identified in the *aur1* gene of *A. nidulans* at position 880 (glycine to valine substitution) (Kuroda *et al.*, 1999). A similar mutation was observed at position 718 (glycine to cysteine substitution) in *S. pombe* (Hashida-Okado *et al.*, 1998). Finally, Hashida-Okado *et al.* identified a phenylalanine to tyrosine substitution at position 158 in the *AUR1-1* resistance gene of *S. cerevisiae*. Strains bearing the *AUR1-R* gene were 100-fold more resistant than the wild type strains (Hashida-Okado *et al.*, 1996). Nevertheless, in Heidler and Radding's experiment, they showed two point mutations in the *S. cerevisiae* *ABR1* resistance gene. The first one corresponded to the change of a leucine to a phenylalanine at position 137 and the second one to the change of a histidine amino acid into a tyrosine at position 157. The couple of mutation led to a 500-fold increase of the MIC compared to wild-type strains (Heidler and Radding, 1995).

All the described mutations are considered to be dominant (Heidler and Radding, 1995 ; Hashida-Okado *et al.*, 1996 ; Kuroda *et al.*, 1999). It seems that these modifications in the AbA gene lead to the

structural modification of the binding site in the Aur1p and in a decrease of the affinity for the drug (Hashida-Okado *et al.*, 1996). In addition, Kuroda *et al.* suggested that the AbA resistance gene may be conserved by evolution in different fungi (Kuroda *et al.*, 1999).

In the kingdom Fungi, several AbA resistance genes are available and used as selection markers in gene disruption strategies. The *aur1* resistance gene of *A. nidulans* was first used to transform some *Aspergillus* species (Kuroda *et al.*, 1999) and more recently *Monascus purpureus* (Shimizu *et al.*, 2005). In addition, several industrial yeast strains were successfully transformed with the *aur1^R* resistance gene of *S. pombe* (Hashida-Okado *et al.*, 1998). No transformants were obtained with the wild-type *AUR1-R* and *ABR1* resistance gene of *S. cerevisiae* (Hashida-Okado *et al.*, 1998). Thus, an engineered point mutation was added in the *AUR1-R* resistance gene of *S. cerevisiae*, by replacing the alanine at position 240 of the *AUR1-R* gene with a cysteine. But no transformants were obtained in *S. pombe* (Hashida-Okado *et al.*, 1998). Nevertheless, other genes of *S. cerevisiae* or phylogenetically related species (eg. *C. glabrata*, *K. marxianus*, *K. lactis*) are known to be efficient in *S. pombe* (Hashida-Okado *et al.*, 1998). After all, the *AUR1-C* gene was used in the transformation of different yeasts with success (eg. sake yeast *S. cerevisiae* with 0.2-1 µg/mL AbA (Akada *et al.*, 1999; Asano *et al.*, 1999; Nakazawa *et al.*, 1999; Hansen *et al.*, 2003; Kang *et al.*, 2003; Nakazawa and Iwano, 2004), *S. cerevisiae* wine yeasts with 0.7 µg/mL AbA (Nakazawa and Iwano, 2004), *S. carlsbergensis*, an industrial brewing yeast, with 0.2 µg/mL AbA (Hansen *et al.*, 2003)). This modified version of *S. cerevisiae*'s resistance gene is stable in the transformed cells (Asano *et al.*, 1999; Kang *et al.*, 2003). Nevertheless, according to the experiment, some spontaneous resistant mutants could develop on the media at a low frequency (Hansen *et al.*, 2003).

The transformed cells can be selected on both rich (Hashida-Okado *et al.*, 1998; Akada *et al.*, 1999; Asano *et al.*, 1999; Hansen *et al.*, 2003; Kang *et al.*, 2003; Nakazawa and Iwano, 2004; Shimizu *et al.*, 2005) and minimal medium (Nakazawa *et al.*, 1999; Hansen *et al.*, 2003) containing Aba. It is also important to keep in mind that AbA is insoluble in water (Yakesako *et al.*, 1991) thus a stock solution is usually prepared in dimethyl sulfoxide (Zhong *et al.*, 1999), methanol (Takesko *et al.*, 1991) or ethanol (Heidler and Radding, 1995; Akada *et al.*, 1999; Shimizu *et al.*, 2005).

Finally, AbA seems to be a convenient selection drug for fungal genetic transformation. First, many AbA resistance genes are available from different fungal species such as *S. cerevisiae*, *S. pombe* or *A. nidulans*. These genes can be easily integrated in the genome of the strains aimed at being disrupted thanks to their relatively short length: approximately 1,320 bp for *A. nidulans* (Kuroda *et al.*, 1999), 1,200 bp for *S. cerevisiae* (Heidler and Radding, 1995) and 1,270 bp for *S. pombe* (Hashida-Okado *et al.*, 1998). Another interesting point is the low concentrations of AbA required in the selection media thanks to a very low resistance of the majority of the fungal strains toward this antibiotic. Nevertheless, Aba is extremely expensive. Lastly, after *in vivo* assays on mice, AbA does not seem to present any toxicity (Takesako *et al.*, 1991 and 1993).

4.3. Blasticidin

Blasticidin S (BS), 4-amino-1-[4-((3S)-3-amino-5-[[amino(imino)methyl](methyl)amino]pentanoyl)amino]-2,3,4-trideoxy-β-D-erythro-hex-2-enopyranuronosyl]pyrimidin-2(1H)-one, is naturally produced by the bacterium *Streptomyces griseochromogenes* (Takeuchi *et al.*, 1958). This aminoacylnucleoside antibiotic is composed of both a β-amino acid (blasticidic acid) and a pyrimidine nucleoside (cytosinine) (Ötake *et al.*, 1966). Since its discovery in 1958 (Takeuchi *et al.*, 1958), this compound has been commonly used as a fungicide, mainly in Eastern Asia and South America, to control the proliferation of the rice blast disease caused by the fungus *Magnaporthe oryzae* (Misato *et al.*, 1959 ; Ötake *et al.*, 1966).

BS acts on the peptidyl transferase reaction (Yamaguchi, 1995), an essential step in the protein synthesis process. More precisely, BS inhibits the amino acid incorporation by aborting aminoacyl-sRNA transfer to polypeptide linkage. The drug inhibits protein synthesis (Yamaguchi *et al.*, 1965) in both prokaryotes (Yamaguchi and Tanaka, 1966) and eukaryotes (Huang *et al.*, 1964). Yamaguchi and Tanaka demonstrated that BS blocks the transfer of peptidyl groups in *Escherichia coli* ribosomes (Yamaguchi and Tanaka, 1966) while it blocks the formation of the peptide bond on yeast polysomes (Barbacid *et al.*, 1975).

As mentioned beforehand, this molecule possesses a broad spectrum of activity. Interestingly, it is known that plant monocots species (e.g. rice, maize) are less susceptible to BS compared to most of the plant dicots (e.g. tobacco, eggplant, tomato) (Yamaguchi *et al.*, 1964). For instance, callus development in *Arabidopsis thaliana* is markedly reduced and completely inhibited by BS at 5 and 20 µg.mL⁻¹, respectively (Tamura *et al.*, 1995). BS efficiently inhibits the growth of mammalian cells such as HeLa (Izumi *et al.*, 1991) and FM3A (Kimura *et al.*, 1994) (approximately 2 µg.mL⁻¹) while the growth of the yeast *Schizosaccharomyces pombe* was completely inhibited with 10 µg.mL⁻¹ BS (Kimura *et al.*, 1994).

Three different genes conferring resistance toward BS have been described. The first one, which is the less documented, is the *bls* gene isolated from a *Streptoverticillium* sp. strain. This gene encodes a BS-acetyltransferase (Sugiyama *et al.*, 1986; Pérez-Gonzalez *et al.*, 1990) that acetylates BS in the presence of coenzyme A, leading to an inactive secondary product (Sugiyama *et al.*, 1988). The *Streptoverticillium* sp. strain, naturally expressing the *bls* gene, was shown to be resistant to BS up to 100 µg.mL⁻¹ while other strains from *S. griseus* and *S. flavotricini* subsp. *Pseudochromogenes* were susceptible to BS concentrations lower than 40 µg.mL⁻¹ (Sugiyama *et al.*, 1986). Two other resistance genes are deeply described: the *bsr* gene from *Bacillus cereus* (Endö *et al.*, 1987; Endö *et al.*, 1987) and the *bsd* gene from *Aspergillus terreus* (Yamaguchi *et al.*, 1972; Yamaguchi *et al.*, 1974). Both the *bsr* and *bsd* genes encode a blasticidin S deaminase (aminohydrolase, EC 3.5.4.23). BS deaminase catalyzes the deamination of the cytosine moiety in the drug (Yamaguchi *et al.*, 1975) leading to a deaminohydroxy-derivative less toxic for cells (Seto *et al.*, 1966). Other species were found to be naturally resistant to BS as *Fusarium oxysporum* (Yamaguchi *et al.*, 1972).

Although the *bsr* and *bsd* genes both encode a BS deaminase, it was shown that the *bsd* gene was more suitable to be used as a dominant selectable marker for eukaryotic cells transformation (Kamakura *et al.*, 1987; Kobayashi *et al.*, 1991; Kimura *et al.*, 1994). Indeed, the *bsd* gene was successfully used in mold and yeast transformations (eg. *Magnaporthe oryzae* (Kimura *et al.*, 1994; Kimura *et al.*, 1995 ; Noguchi *et al.*, 2006), *Podospora anserina* (Hamman *et al.*, 2005), *Schizosaccharomyces pombe* (Erler *et al.*, 2006), but also in plant transformations (eg. *Arabidopsis thaliana* and *Nicotiana tabacum* (Tamura *et al.*, 1995)) or in mammalian cell transformations (eg. FM3A mammalian cells (Izumi *et al.*, 1991)). However, the bacterial *bsr* gene could also be used for the transformation of eukaryotic cells such as fungi (eg. *Rhizopus niveus* (Yanai *et al.*, 1991)) or mammalian cells (eg. HeLa (Izumi *et al.*, 1991)). Both constructions with the *bsr* or the *bsd* genes seem to be stable (Kimura *et al.*, 1994a ; Kimura *et al.*, 1994b), even though a high background could be observed in some experiments (Yanai *et al.*, 1991; Kimura *et al.*, 1994; Kimura *et al.*, 1995).

Some cautions have to be mentioned for BS users. The drug is photosensitive. The hydrochloride form should be preferably used and dissolved in water (Yamaguchi *et al.*, 1972). BS is considered to be stable when introduced in rich or poor media (Kimura and Yamaguchi, 1996) when non-alkaline conditions are applied (pH < 8) (Izumi *et al.*, 1991; Kimura *et al.*, 1994).

As a conclusion, the use of BS as a selection drug for genetic transformation of fungal species remains poorly documented. The susceptibility of fungi appears highly variable from a species to another, thus, a special attention must be paid to preliminary *in vitro* BS susceptibility tests for your favorite fungi. The minimal inhibitory concentration must be lower than 50 µg.mL⁻¹ since the resistance conferred by BS resistance gene seems not to exceed 100 µg.mL⁻¹ (Sugiyama *et al.*, 1986). Although all the three currently known BS resistance genes may be used, it is preferable to experiment in a first hand, as a fungal gene, the *bsd* gene from *Aspergillus terreus* for yeast or mold genetic transformation. BS resistance genes have the advantage of being short sequences (410 bp for the *bsl* gene (Pérez-Gonzalez *et al.*, 1990), 420 bp for the *bsr* (Kamakura *et al.*, 1987; Kobayashi *et al.*, 1991) and 390 for the *bsd* gene (Kimura *et al.*, 1994)), thus easily to manipulate for genetic constructs. Nevertheless, BS is at least two times more expensive than hygromycin or geneticin according the supplier. Finally, BS is authorized as a chemical in the agricultural field and was considered safer than other molecules for the environment (Yamaguchi *et al.*, 1972; Kimura and Yamaguchi, 1996), as it can be easily inactivated by alkaline solutions (pH > 8) (Kimura *et al.*, 1994). It does not seem toxic for human cells.

4.4. Chloramphenicol

Chloramphenicol (CAM), 2,2-dichloro-N-[1,3-dihydroxy-1-(4-nitrophenyl)propan-2-yl] acétamide, is a synthetic molecule of the phenicol antibiotic family. It was first isolated from *Streptomyces venezuelae* in 1947 (Fernandez-Martinez *et al.*, 2014). It is used as a bacteriostatic antibiotic in human medicine, particularly to treat bacterial meningitis due to *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* or *Haemophilus influenzae* (Rahal and Simberkoff, 1979).

CAM in bacteria inhibits the protein synthesis by inhibition of the peptidyl transferase after fixation to the ribosome 50S subunit (Hadfield *et al.*, 1986). The antibiotic can also target mitochondria, as described in bacteria and yeasts (Cohen *et al.*, 1980; Wilkie, 1983). Nevertheless, this molecule does not bind to the 80S ribosomes of eukaryotic cells. Thus, eukaryotic cells are not targeted by CAM until the carbon source they use does not only depend on mitochondria metabolism (Hadfield *et al.*, 1986).

Saccharomyces cerevisiae strains have been demonstrated to be susceptible to CAM. Nevertheless, this susceptibility is strain dependent (Hadfield *et al.*, 1986). Thus, preliminary tests of susceptibility are needed to consider further using CAM as a marker of selection in *Saccharomyces cerevisiae* strains.

Very few studies were conducted to transform *S. cerevisiae* strains using CAM as a dominant selection marker. A first strategy used the *E. coli cam^R* gene encoding the resistance to CAM, leading to the synthesis of an acetyltransferase enzyme (acetyl-CoA:chloramphenicol-3-O-acetyltransferase, E.C. 2.3.1.28) (Cohen *et al.*, 1980; Cohen *et al.*, 1983; Hadfield *et al.*, 1986; Hadfield *et al.*, 1987). In addition, during the experiment, Cohen *et al.*, demonstrated that transformants were able to grow on media containing 500 µg.mL⁻¹ CAM and in parallel other transformants presented a highest degree of resistance toward CAM. They were able to grow on media with 4 mg.mL⁻¹ CAM. This super resistance phenotype was associated to a deletion of 127 bp in the *cam^R* gene. A second strategy was to use a mutated *PDR3* gene to transform *S. cerevisiae* strains (Lackova and Subik, 1999). The corresponding mutated protein, containing an amino acid substitution at codon 276 from a tyrosine to a histidine residue, activates the transcription of membrane efflux pumps, leading to resistance to a huge number of unrelated drugs, such as CAM (Nourani *et al.*, 1997).

Selection of *Saccharomyces cerevisiae* strains was conducted on rich media (Cohen *et al.*, 1980). CAM was added in the medium after dissolution in ethanol (Hadfield *et al.*, 1986; Lackova and Subik, 1999) at 2 mg.mL⁻¹ with Hadfield *et al.* (Hadfield *et al.*, 1986) while 1 µg.mL⁻¹ (Lackova and Subik, 1999). The construction with the *Escherichia coli cam^R* resistance gene seems not to be stable in *Saccharomyces cerevisiae* transformed cells (Cohen *et al.*, 1980).

Chloramphenicol does not seem to be a good candidate in fungal transformation as no data were available. However, it presents some advantages in the transformation of *Saccharomyces cerevisiae* strains, haploid or diploid ones. In addition, the resistance marker, which is approximately 1,000 bp, is able to confer the resistance toward CAM, even integrated in a single copy in the yeast genome (Hadfield *et al.*, 1986; Hadfield *et al.*, 1987). The price of this drug is similar to the one of commonly used selectable marker. Users must be cautious since CAM seems to be carcinogenic for human cells.

4.5. Bleomycin/Phleomycin/Zeoicin

Zeoicin® (Zeo) is composed of phleomycin D1 (Ph) (other Ph molecules are available) (Maeda *et al.*, 1956) which is closely related to the bleomycin (Bm) (more than 13 Bms are available) (Umezawa *et al.*, 1966; Suzuki *et al.*, 1970) and the tallysomycin families. All these compounds belong to metalloglycopeptide antibiotics and have a bacterial origin since they are naturally produced by

Streptomyces verticillus (Suzuki *et al.*, 1979; Griggr *et al.*, 1984). In addition, these molecules are available as copper chelates (Griggr *et al.*, 1984). Nevertheless, Phs and Bms structurally differ from one to another according to the presence of a dihydrothiazole ring for Phs instead of a thiazole for Bms (Griggr *et al.*, 1984). Members of the Ph family differ according to the structure of a basic group which is different for each Ph molecule, influencing their spectrum of action (Griggr *et al.*, 1984). These differences in structure will impact on the strength of the link between the antibiotic and the DNA, thus on the degree of resistance (Collis and Hall, 1985).

All these related antibiotics have a strong activity since they are able to kill both prokaryotic and eukaryotic cells, even at low concentrations (Umezawa, 1979; Berdy, 1980). They express their cytotoxic action by inducing single- or double-stranded DNA scissions (Reiter *et al.*, 1972; Waring, 1981; Burger, 1998). The phenomenon is only possible in presence of iron salts and oxygen (Suzuki *et al.*, 1970; Sleight, 1976; Kross *et al.*, 1982; Gatignol *et al.*, 1987; Burger, 1998). These molecules are already prescribed in the treatment of cancer and bacterial infections (Ishizuka *et al.*, 1967; Carter *et al.*, 1978; Hecht, 1979; Franklin and Snow, 1981; Bodet *et al.*, 1985).

Ascomycota and Basidiomycota fungi (e.g. *Aspergillus* species (Punt *et al.*, 1992; He *et al.*, 2007), *Botrytis cinerea*: MIC 15 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Santos *et al.*, 1996), *Claviceps purpurea*: MIC 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Van Engelenburg *et al.*, 1989), *Cochliobolus lunatus*: MIC 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Rozman and Komel, 1992), *Colletotrichum gloeosporioides*: MIC 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Poplawski *et al.*, 1997), *Hebeloma cylindrosporum*: MIC > 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Pardo *et al.*, 2002), *Paxillus involutus*: MIC 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Pardo *et al.*, 2002), *Penicillium chrysogenum*: MIC 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Kolar *et al.*, 1988; Queener *et al.*), *Penicillium roqueforti*: MIC 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Durand *et al.*, 1991), *Suillus bovinus*: MIC 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Pardo *et al.*, 2002), *Ustilago maydis*: MIC 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Gold *et al.*, 1994)) and yeasts (*Candida glycerinogenes*: MIC 150 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Gao *et al.*, 2012), *Candida rugosa*: MIC 400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Tang *et al.*, 2003), *Cryptococcus neoformans*: MIC 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Hua *et al.*, 2000), *Schizosaccharomyces pombe*: MIC < 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Belenguer *et al.*, 1995; Hentges *et al.*, 2005)) seem to be relatively sensitive to Ph and Bm even if the resistance level can differ between species and strains (e.g. *A. nidulans* and *A. niger* MIC is 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ while the *A. oryzae* one is ten-fold higher, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Punt *et al.*, 1992), *Candida glabrata* strains: MIC from 3.125 to 6.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Alderton *et al.*, 2006).

Nevertheless, differences in the susceptibility to Zeo, Ph and Bm are observed for a same strain. Zeo seems to be less effective than Ph and Bm. For example, *Aspergillus oryzae* growth was inhibited by 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Bm toward 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Ph (Suzuki *et al.*, 2009). A high concentration of Zeo was necessary to inhibit, but not completely, *A. sojae* growth (300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) while the growth was completely inhibited at 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ with Ph (Mora-Lugo *et al.*, 2014). The same statement was observed with *Clitopilus passeckerianus* and *Coprinopsis cinerea* for which Ph 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ was able to completely inhibit the fungal growth while with 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Zeo growth inhibition was not complete (Kilaru *et al.*, 2009). An extreme case of resistance to Zeo was reported for *Mortierella alpina*. The strain was able to grow, but not without difficulties, on medium containing 20 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Takeno *et al.*, 2005). Zeo susceptibility was more studied in yeast species and seems to be suitable for these organisms as the total inhibition growth was obtained

with acceptable concentrations (e.g. *Pichia faronisa*: MIC = 200 µg/mL⁻¹ (Wang *et al.*, 2005), *Pichia stipitis*: MIC = 100 µg.mL⁻¹ (Laplaza *et al.*, 2006), *Rhodospiridium toruloides*: MIC = 50 µg.mL⁻¹ (Tsai *et al.*, 2017)). On the other hand, Ph seems to have a higher activity than Bm as demonstrated in *Saccharomyces cerevisiae* (Ph MIC = 0.1 µg.mL⁻¹ toward Bm MIC = 5 µg.mL⁻¹) (Gatignol *et al.*, 1987). While in *Aspergillus nidulans* and *Neurospora crassa*, the opposite statement was observed (Austin *et al.*, 1990).

Different genes, all originated from bacteria, encoding resistance to Ph, Bm and Zeo are available. According the gene, the resulting proteins can inhibit antibiotic activity through stoichiometric or enzymatic mechanisms. Three resistance genes seem to encode a protein which bind to the antibiotic and thus inhibit reversibly the action of this latter (Gatignol *et al.*, 1988; Gatignol *et al.*, 1990): i) the *ble* gene from transposon Tn5 of *Escherichia coli* (Genilloud *et al.*, 1984; Collis and Hall, 1985; Mazodier *et al.*, 1985; Gatignol *et al.*, 1987), ii) the *Shble* gene from *Streptoalloteichus hindustanus*, a tallysomyacin-producing bacteria (Drocourt *et al.*, 1990; Gatignol *et al.*, 1988), and iii) the *blmA* gene from *Streptomyces verticillus* (Sugiyama *et al.*, 1994). Another resistance gene is the *blmB* gene from *Streptomyces verticillus*, encoding a *N*-acetyltransferase (Sugiyama *et al.*, 1994). Finally, the *ble* gene from *Staphylococcus aureus* encodes a glyoxalase protein (Semon *et al.*, 1987; Foureau *et al.*, 2013). All these genes are able to confer resistance to both Ph and Bm (Gatignol *et al.*, 1990). Nevertheless, the *Shble* resistance gene was demonstrated to express a higher resistance to Ph than the Tn5 *ble* gene in plants (Perez *et al.*, 1991) and animal cells (Mulsant *et al.*, 1988).

All the Ph/Bm resistance genes have been demonstrated to be suitable for the genetic disruption of genes in yeast and fungal organisms. The most frequently used is the *Shble* gene from *S. hindustanus* in Ascomycota (Mattern and Punt, 1988; Drocourt, 1990; Punt and Hondel, 1992; Renno *et al.*, 1992; Silar, 1995; Santos *et al.*, 1996; Poplawsky *et al.*, 1997; Teunissen *et al.*, 2002; Banuelo *et al.*, 2003; Cardoza *et al.*, 2006; Marmeisse *et al.*, 2006) and Basidiomycota (Calmels *et al.*, 1991; Gessner and Raeder, 1993; Schuren and Wessels, 1993; Gold *et al.*, 1994; Schuren and Wessels, 1994; Birch *et al.*, 1998; Bartholomev *et al.*, 2001; Pardo *et al.*, 2002; Van Peer *et al.*, 2008; Kilaru *et al.*, 2009) species but also in yeasts (Glumoff *et al.*, 1989; Higgins *et al.*, 1998; Hentges *et al.*, 2005; Sato *et al.*, 2005; Alderton *et al.*, 2006; Spirek *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2014; Tsai *et al.*, 2017). The *E. coli ble* gene was also reported, at a lower extent, in both fungal (Ascomycota (Kolar *et al.*, 1988; van Engelenburg *et al.*, 1989; Cheevadhanarak *et al.*, 1991; Rozman and Komel, 1992; He *et al.*, 2007; Mora-Lugo *et al.*, 2014; Han *et al.*, 2018) and Basidiomycota (Calmels *et al.*, 1991; Kim *et al.*, 2003)) and yeast species (Gaillardin and Ribet, 1987; Gatignol *et al.*, 1987; Gatignol *et al.*, 1990; Wenzel *et al.*, 2002; Adamikova *et al.*, 1998; Kudla *et al.*, 1988; Gueldener *et al.*, 2002; Alderton *et al.*, 2006; Benko *et al.*, 2011; Chee and Haase, 2012; Zhang *et al.*, 2012). The three other resistance genes available are less mentioned in the literature. The *ble* gene from *S. aureus* was reported in *Candida famata* transformation (Dmytruk *et al.*, 2006) and the *blm* genes from *S. verticillus* was used in *Pichia pastoris* and *Aspergillus oryzae* transformation (Munshi and Lee, 1997; Suzuki *et al.*, 2009).

The stability of the integration of the resistance gene in fungi is species dependant. In most cases the Ph/Zeo resistance gene was stably inherited (Van Engelenburg *et al.*, 1989; Calmels *et al.*, 1991; Cheevadhanarak *et al.*, 1991; Durand *et al.*, 1991; Renno *et al.*, 1992; Rozman and Komel, 1992; Schuren and Wessels, 1994; Santos *et al.*, 1996; Munshi and Lee, 1997; Bartholomew *et al.*, 2001; Van Dijk *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2003; Tang *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2005; He *et al.*, 2007; Zhiming *et al.*, 2008; Kummasook *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2017). Only few reports showed a low stability in the resistance gene integration, like in *Aspergillus sojae* (Mora-Luogo *et al.*, 2014), *Cryptococcus neoformans* (Hua *et al.*, 2000), *Dipodascus magnusii* (Adamikova *et al.*, 1998), *Phanerochaete chrysosporium* (Gessner and Raeder, 1993), *Trichoderma* spp. (Cardoza *et al.*, 2006), *Trichosporon cutaneum* (Glumoff *et al.*, 1989).

According the studies, a low or high background is observed on plates containing the transformed cells, particularly in Basidiomycota transformation (Gaillardin and Ribet, 1987; Kolar *et al.*, 1988; Calmels *et al.*, 1991_High ; Durand *et al.*, 1991; Santos *et al.*, 1996; Johansson and Hahn-Hägerdal; Kim *et al.*, 2003). This background is frequently but not always mentioned (Wenzel *et al.*, 1992; Gueldener *et al.*, 2002) and it can disappear when the concentration in drug in the medium is sufficient (Cheevadhanarak *et al.*, 1991; Lin *et al.*, 2014). Another hypothesis could be the one that other resistant mechanisms toward Ph may occur (Mora-Lugo *et al.*, 2014). For example, in the case of *Trametes versicolor*, the observed background was associated with the presence of osmotic stabilizers and the acidification of the medium by the fungus (Bartholomew *et al.*, 2001).

Some subtleties are important to keep in mind prior the use of these different resistance genes in fungal transformation. Indeed, all these genes are not functional in yeast species belonging to the CTG clade (Wang *et al.*, 2005; Laplaza *et al.*, 2006; Foureau *et al.*, 2013; Puseenam *et al.*, 2015). To overcome this problem, research teams constructed codon-modified Ph/Zeo resistance genes consisting in modifying the five CTG codons of the *Shble* gene by leucine codons as yeasts belonging to the CTG clade will traduce a serine instead of a leucine (CUG) (Tang *et al.*, 2003). Dmytruk *et al.*, proposed another alternative which consisting in using the *ble* gene from *S. aureus* methicillin resistant which do not contain any CTG codons (Dmytruk *et al.*, 2006_Insertion). Secondly, it was reported that an intron may be necessary for the Ph/Zeo resistance gene expression in Basidiomycota, as described for *Coprinopsis cinerea* (Kilaru *et al.*, 2009; Kilaru *et al.*, 2009).

Other important points must be underlined when using Ph or Bm as selection markers. First, the selection of transformed cells is mainly done on minimal medium (Kolar *et al.*, 1988; Kudla *et al.*, 1988; Van Engelenburg *et al.*, 1989; Austin *et al.*, 1990; Cheevadhanarak *et al.*, 1991; Renno *et al.*, 1992; Rozman and Komel, 1992; Santos *et al.*, 1996; Birch *et al.*, 1998; Van Dijk *et al.*, 2001; Pardo *et al.*, 2002; Teunissen *et al.*, 2002; Banuelos *et al.*, 2003; Krappman *et al.*, 2005; Marmeisse *et al.*, 2006; He *et al.*, 2007; Van Peer *et al.*, 2008; Suzuki *et al.*, 2009; Benko and Zhao, 2011; Mora-Lugo *et al.*, 2014; Han *et al.*, 2018), even if some experiments used rich media mostly in yeast transformations (Gatignol *et al.*, 1987; Gatignol *et al.*, 1990; Adamikova *et al.*, 1998; Higgins *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2000; Hua *et al.*,

2000; Alderton *et al.*, 2006; Gueldener *et al.*, 2002; Laplaza *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2008; Sadowsky *et al.*, 2008; Sunga *et al.*, 2008; Zamocky *et al.*, 2008; Kilaru *et al.*, 2009; Papakonstantinou *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2009; Kummasook *et al.*, 2010; Pan *et al.*, 2011; Reis *et al.*, 2012; Carter and Delneri, 2013; Lin *et al.*, 2014; Puseenam *et al.*, 2015; Song *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2017). Secondly, the concentration in metal ions and the osmolality of the medium impact on the activity of both Ph and Bm (Van Engelenburg *et al.*, 1989; Santos *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2005; Alderton *et al.*, 2006, Suzuki *et al.*, 2009). The pH of the medium is also an important parameter (Punt and van del Hondel, 1992; Vickers *et al.*, 2013), varying according the species. That is to say that the optimum medium pH to use Ph and Bm in *Candida glabrata* (Alderton *et al.*, 2006), *Mortierella alpina* (Takeno *et al.*, 2005), *Pichia pastoris* (Sunga *et al.*, 2008), *Pichia stipitis* (Laplaza *et al.*, 2006), *Aspergillus flavus* (He *et al.*, 2007), *Botrytis cinerea* (Santos *et al.*, 1996), *Clitopilus passeckerianus* (Kilaru *et al.*, 2009) and *Trametes versicolor* (Bartholomew *et al.*, 2001) is more or less 7.0 against 5.5 for *Neurospora crassa* (Austin *et al.*, 1990), 6.0 for *Candida glycerinogenes* (Gao *et al.*, 2012) or 8.0 for *Claviceps purpurea* (Van Engelenburg *et al.*, 1989). Then, it was shown that Ph activity in *Saccharomyces cerevisiae* was dependent on aerobic conditions and growth phase (Vickers *et al.*, 2013). In addition, these structurally related glycopeptides are dissolved in water prior their use (Suzuki *et al.*, 1970; Prentice and Kingston, 1992; Punt and Hondel, 1992; Higgins *et al.*, 1998; Gueldener *et al.*, 2002; Hentges *et al.*, 2005). Finally, plates must be prepared extemporaneously to avoid Ph and Bm loss of activity in the medium (Hentges *et al.*, 2005).

As a conclusion, the phleomycin/bleomycin/zeocin family can be used in numerous fungal species. One of the advantages of these selection markers is that they do not bring any additional phenotype than the one desired (Gatignol *et al.*, 1987; Gaillardin and Ribet, 1987; Glumoff *et al.*, 1989; Drocourt *et al.*, 1990; Austin *et al.*, 1990; Calmels *et al.*, 1991; Gueldener *et al.*, 2002; Hentges *et al.*, 2005). In addition, the different resistance genes are very small (< 500 bp) (Collis and Hall, 1985; Semon *et al.*, 1987; Sugiyama *et al.*, 1994; Higgins *et al.*, 1998). Nevertheless, these compounds are expensive, zeocin particularly, and they are characterized by a background on transformation plates (Gao *et al.*, 2012; Aw *et al.*, 2016; Johansson and Hahn-Hägerdal), even this background seems to be lower than for geneticin (Johansson and Hahn-Hägerdal). In addition, they can induce DNA double-strand breaks thus they must be used with caution because they are highly toxic (Hentges *et al.*, 2005; Benko and Zhao, 2011).

4.6. Blasticidin/Glufosinate/Phosphinotricin

Phosphinotricin (PPT) is the ammonium salt of glufosinate, DL-homoalanin-4-yl(methyl)phosphinic acid. They are organophosphorus molecules naturally produced by *Streptomyces* strains. PPT was first used as an antibiotic which was isolated from *Streptomyces viridochromogenes* (Strauch *et al.*, 1988). Later, herbicidal properties were described and the molecule was commercially proposed under the name Basta® (Bartsch and Tebbe, 1989; Pall *et al.*, 1993). A third molecule called bialaphos belongs to this family and corresponds to the L-alanine-L-alanine-PPT tripeptide and is produced by *Streptomyces hygroscopicus* (Thompson *et al.*, 1987; Yanai *et al.*, 1996). It was reported that many fungi are sensitive to PPT (Leem *et al.*, 1999) even if the degree of susceptibility is very heterogeneous between species (Ahuja and

Punekar, 2008). In addition, Basidiomycota species seem to be more sensitive to PPT (eg. 50 and 80 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ PPT were necessary to inhibit the growth of *Pleurotus ostreatus* and *Phanerochaete chrysosporium*, respectively (Yanai *et al.*, 1996; Ma *et al.*, 2003; Fang *et al.*, 2004; Ying and Feng, 2006)) than Ascomycota ones (eg. Susceptibilities ranging from 50 to more than 1,000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ PPT (Avalos *et al.*, 1989; Ahmad *et al.*, 1995; Chung *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2008; Figueiredo *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2015)), with a few exceptions (eg. *Cercospora kikuchii* and *Erysiphe graminis* presented a very high susceptibility to 0.5 and 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ PPT, respectively) (Upchurch *et al.*, 1994; Chaure *et al.*, 2000).

All the three compounds are analogs of L-glutamate. Thus they will inhibit the glutamine synthetase, a key enzyme in nitrogen metabolism and resulting in ammonia accumulation and thus in the cell death (Avalos *et al.*, 1989; Dröge-Laser *et al.*, 1994). In *Aspergillus* spp. for example, this pathway is the only mean to synthesize glutamine (Margelis *et al.*, 2001). Some studies reported that this family of compounds may also target, on a lesser scale, cellular components and induce depolarization or alterations in membrane transports for example (Trogisch *et al.*, 1989; Ullrich *et al.*, 1990). Nevertheless, bialaphos is an inactive form of PPT. Both L-alanine residues have to be removed thanks to intracellular peptidases to activate bialaphos (Straubinger *et al.*, 1992).

Resistance to PPT is due to the *pat* or the *bar* gene which both encode a *N*-acetyltransferase enzyme (Block *et al.*, 1987; Bartsch and Tebbe, 1989; Dröge-Laser *et al.*, 1994). The *pat* gene was isolated from *Streptomyces viridochromogenes* while the *bar* gene was isolated from *Streptomyces hygroscopicus* (Thompson *et al.*, 1987; Strauch *et al.*, 1988). The *pat* gene was only reported in the transformation of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* (Goldstein and McCusker, 1999; Chee and Haase, 2012). On the contrary, the *bar* resistance gene was used as a selection marker in a wide range of fungal species, including both Basidiomycota (eg. *Coprinus cinereus*, *Coprinus congregates*, *Ganoderma lucidum*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor*) and Ascomycota species (eg. *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Beauveria bassiana*, *Cercospora kikuchii*, *Cochliobolus heterostrophus*, *Erysiphe graminis*, *Fusarium solani*, *Fusarium venenatum*, *Guignardia citricarpa*, *Magnaporthe grisea*, *Magnaporthe oryzae*, *Metarhizium anisopliae*, *Myceliphthora thermophile*, *Neurospora crassa*, *Paecilomyces fumosoroseus*) (Avalos *et al.*, 1989; Straubinger *et al.*, 1992; Pall, 1993; Upchurch *et al.*, 1994; Yanai *et al.*, 1996; Cantone and Vanderberg, 1999; Ma *et al.*, 2003; Leem *et al.*, 1999; Chaure *et al.*, 2000; Inglis *et al.*, 2000; Fang *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2004; Ying and Feng, 2006; Jiang *et al.*, 2007; Yeo *et al.*, 2007; Ahuja and Punekar, 2008; Jin *et al.*, 2008; Liao *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2008; Noguchi *et al.*, 2008; Figueiredo *et al.*, 2010; Fan *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2015). As species belonging to the Basidiomycota lineage seem to be more sensitive to PPT, lower concentrations in drug are required to select transformed cells. For example, 30, 50, 100 and 300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ PPT were employed for *P. chrysosporium*, *P. ostreatus*, *C. cinereus* and *T. versicolor*, respectively (Ahuja and Punekar, 2008). In Ascomycota strains, concentrations in PPT ranking from 0.5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ to more than 6,000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ were applied in disruption experiments (Ahuja and Punekar, 2008). In addition, spontaneous mutants were reported at a high frequency in few experiments (Calderon *et al.*, 1990; Pall *et al.*, 1993; Ahuja and Punekar, 2008; Fan *et al.*, 2011). Some authors also mentioned that micro-organisms may be able to

develop other mechanisms conferring resistance to PPT such as enzymatic transamination or oxidative deamination (Bartsch and Tebbe, 1989; Calderon *et al.*, 1990; Drogelaser *et al.*, 1994; Calderon *et al.*, 1997). However, a high mitotic stability was usually reported in the transformation systems (Avalos *et al.*, 1989; Upchurch *et al.*, 1994; Leem *et al.*, 1999; Chaure *et al.*, 2000; Fang *et al.*, 2004; Ying and Feng, 2006; Jiang *et al.*, 2007; Liao *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2008; Figueiredo *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2015).

In order to select transformed cells by using PPT, the experiments must be realized on minimal medium (Avalos *et al.*, 1989; Pall *et al.*, 1993; Cantone and Vandenberg, 1999; Goldstein and McCusker, 1999; Leem *et al.*, 1999; Inglis *et al.*, 2000; Ma *et al.*, 2003; Fang *et al.*, 2004; Ying and Feng, 2006; Jiang *et al.*, 2007; Ahuja and Puneekar, 2008; Jin *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2008; Fan *et al.*, 2011; Szewczyk *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2015). Fan *et al.*, showed that an efficient PPT selection in *Beauveria bassiana* with a low background was associated with a pH 6.3 (Fan *et al.*, 2011). In addition, Goldstein and McCusker pointed out that PPT is an amino acid analog while bialaphos is a peptide. Thus they used a synthetic minimal medium that did not contain other peptides or amino acids that may compete for uptake (Goldstein and McCusker, 1999). They also underlined the fact that bialaphos is not a stable compound. Thus plates, if prepared in advance, must be conserved at 4°C for one month at most.

To conclude, the family of the PPT compound seems to be a good candidate for filamentous fungi transformation as far as both resistance genes, *bar* and *pat*, are small genes (less than 1,000 bp). Data are too limited to conclude on its use in yeasts. However, according the filamentous fungal species, sometimes a very high concentration of PPT is needed (500 – 6,000 µg.mL⁻¹). Yet, PPT is more expensive than geneticin according the provider but much lesser expensive than hygromycin B. Thus, the manipulator must evaluate the quality/price ratio according the fungal species he would like to transform before using PPT in selection experiments. People using PPT must be careful as far as PPT can induce a neurological and a pulmonary toxicity as well as this compound is probably toxic for reproduction.

4.7. Puromycin

Puromycin, 3'-[[2S-Amino-3-(4-methoxyphenyl)-1-oxopropyl]amino]-3'-deoxy-N,N-dimethyladenosine, 3'-(α -amino-p-methoxy-hydrocinnamido)-3'-deoxy-N,N-dimethyladenosine.2HCl, belongs to the aminoacylnucleoside antibiotic family and is naturally biosynthesized by the bacterium *Streptomyces alboniger* (Porter *et al.*, 1952). This molecule is known to inhibit the growth of Gram-positive bacteria but also insect and animal cells (Vara *et al.*, 1986; Kuwano *et al.*, 1979; Fallon and Stollar, 1982) whereas fungi are usually resistant because of the low permeability of the compound (Vazquez, 1979), as well as observed for Gram-negative bacteria. To date, only one strain of *Saccharomyces cerevisiae* was shown to be sensitive to puromycin, the mutant strain EPP (Cary *et al.*, 2014). Indeed, *S. cerevisiae* wild-type strain is insensitive to puromycin because of a phenomenon of pleiotropic drug resistance observed in *Saccharomyces* strains. That is to say that resistance to drug is governed by, at least, seven genes which are altered or amplified (e.g. *PDR1* and *PDR4* encoding transcriptional regulators, *PDR5* encoding transmembrane proteins) (Meyers *et al.*, 1992; Dexter *et al.*, 1994). Recently, it has been shown that after

modification of these genes a decrease in the resistance of *Saccharomyces* strains towards a panel of drugs could be observed (e.g. *pdr1p* and *pdr3p* encoding transcription factor, or *erg6p* involved in ergosterol biosynthesis) (Dunstan *et al.*, 2002; Sipos and Kuchler, 2006; Simon and Bedalov, 2004).

Puromycin inhibits the synthesis of proteins after binding with the peptidyl t-RNA of the ribosomal A site on both 70S and 80S large ribosomal subunit (Vazquez, 1979; for a review see Cundliffe, 1981). As a consequence, a reaction of chain termination will occur and the nascent peptide chain will be released, resulting in subunit dissociation (Traut and Monro, 1964; Schmeing *et al.*, 2002).

Resistance to puromycin is conferred by the *pac* gene, encoding a puromycin-*N*-acetyltransferase (PAC) from *Streptomyces alboniger* (Pérez-Gonzalez *et al.*, 1983; Pérez-Gonzalez *et al.*, 1985; Lacalle *et al.*, 1989; Vara *et al.*, 1989), which can be used as a heterologous dominant marker. The *N*-acetylation of the tyrosinyl group of the drug inhibits the capacity of the modified puromycin to accept peptidyl moieties (Pérez-Gonzalez *et al.*, 1983).

Molecular cassettes containing the *pac* gene are already used for the transformation of mammalian cells (Vara *et al.*, 1986; De la Luna *et al.*, 1988; De la Luna *et al.*, 1992) and the nematode *Caenorhabditis elegans* (Semple *et al.*, 2010; Semple *et al.*, 2014), while it has only been reported twice in genetic engineering of the specifically modified *Saccharomyces cerevisiae* EPP strain (Cary *et al.*, 2014; Mac Donald *et al.*, 2015). Fungi and yeasts are naturally resistant to puromycin, as mentioned above. As a comparison, the *S. cerevisiae* wild-type strain growth was not altered even at relatively high concentrations (540 µg.mL⁻¹) while complete growth inhibition was observed at 110 µg.mL⁻¹ for the modified *S. cerevisiae* EPP strain (Cary *et al.*, 2014). Mac Donald *et al.* demonstrated that the growth of *S. cerevisiae* wild-type strain was completely inhibited at 11 mg.mL⁻¹ of puromycin (Mac Donald *et al.*, 2015). Some authors reported that the concentration affecting the viability of yeast is similar in liquid and solid media (Mac Donald *et al.*, 2015) while in others stated that the concentration must be higher in liquid media (Cary *et al.*, 2014). No data were available about the stability of the insertion of the resistance cassette into the yeast. Nevertheless, in mammalian cells genetic transformations seem to be stable even though it could be dependent on the cell line used (De la Luna *et al.*, 1988; De la Luna *et al.*, 1992).

Transformants of *S. cerevisiae* modified strain were selected on standard solid media composed of Yeast-Peptone-Dextrose (YPD) (Rose *et al.*, 1990; Cary *et al.*, 2014). In genetic transformation, the salt puromycin (dihydrochloride) which is recommended. A stock solution of the powder in distilled water is required before adding the drug in the selection plates (Cary *et al.*, 2014).

To conclude, puromycin shows limited applications hitherto as a selection marker for genetic engineering of fungi, apart from yeasts, as soon as the strain sensitivity toward puromycin is confirmed. Indeed, this compound is inexpensive (approximately 10 times lower than geneticin price and roughly the same as hygromycin), rapidly incorporated into the cells, in favor of a rapid selection step (De la Luna *et al.*, 1992; Semple *et al.*, 2010; Cary *et al.*, 2014). Another advantage for laboratories is the moderate concentration required in selection plates (200 µM corresponding to 110 µg.mL⁻¹, MW = 544.4 g.mol⁻¹ according to Cary *et al.*, 2014) and the versatile use of the resistance gene from *Streptomyces alboniger*,

as its nucleotide sequence is relatively small (roughly 900 bp [Lacalle et al., 1989](#)). A special care should be taken concerning the possible teratogenic effect of puromycin in case of chronic exposition and few data are available about its accurate toxicity. Nevertheless, a study conducted on mammalian cells show that the toxic concentration was very low ($2.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ according to [De la Luna et al., 1992](#)). A structural analogue to puromycin, chryscandin, may constitute an alternative ([Vara et al., 1985](#)) until it was demonstrated to inhibit the growth of *Candida albicans* ([Yamashita et al., 1984](#)).

5. Fungicide resistance

5.1. Benomyl

Benomyl (Ben), methyl-1-(butylcarbamoyl)-2-benzimidazole carbamate, commercially known as Benlate®, belongs to the benzimidazole family ([Davidse, 1986](#)). This compound has been used since the end of the 60's as an antifungal to control diseases induced by phytopathogenic fungi in crops ([Delp and Klopping, 1968](#); [Erwin, 1973](#); [Timmer, 1998](#); [Peres et al., 2002](#)). Nevertheless, some fungi are naturally resistant to Ben such as *Colletotrichum acutatum*. Thus, benomyl was considered inefficient to control anthracnose on leatherleaf fern ([Stamps et al., 1997](#)) or anthracnose fruit rot on strawberries ([Legard and Chandler, 2000](#)) due to *C. acutatum*. Difficulties to overcome plant diseases due to *Alternaria sp.* or *Sclerotium rolfsii* were also observed ([Delp and Klopping, 1968](#)). Overall, Ascomycetes fungal species (e.g. *Aspergillus parasiticus* (MIC = $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) ([Wu et al., 1996](#)), *Cercospora kikuchii* ([Upchurch et al., 1991](#)), *Erysiphe graminis* (MIC $\geq 5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) ([Chaure et al., 1999_Stable](#)), *Metarhizium anisopliae* (MIC = $0 \mu\text{g.mL}^{-1}$) ([Goettel et al., 1990](#)), *Penicillium islandicum* (MIC = $0.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) ([Huang et al., 1995](#)), *Pseudocercospora herpotrichoides* (MIC = $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) ([Bunkers, 1991](#)), *Septoria nodorum* (MIC = $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$) ([Cooley et al., 1991](#)), *Trichoderma harzianum* (MIC = $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) ([Inglis et al., 1999](#))) are sensitive to Ben while most of Basidiomycetes, Zygomycetes or Oomycetes species and many medically important yeasts (e.g. *Candida albicans* (MIC = $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$) ([Gil et al., 1988](#); [Fling et al., 1991](#); [Goldway et al., 1995](#))) are naturally resistant ([Edgington et al., 1971](#); [Bollen and Fuchs, 1970](#); [Erwin, 1973](#); [Summerbell, 1987](#); [Summerbell, 1993](#)). Resistance toward Ben could arise in wild-type susceptible strains (e.g. *Botrytis cinerea* with a Ben-sensitive strain (MIC $< 1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) and a highly Ben-resistant strain (MIC $\geq 5,000 \mu\text{g.mL}^{-1}$) ([Parke et al., 1996](#))). Some difference in Ben susceptibility in members of a same genus could also be observed as illustrated with *Colletotrichum sp.* ([Dickman et al., 1988](#); [Adaskaveg and Hartin, 1997](#); [Ishii et al., 2001](#); [Peres et al., 2002](#); [Talhinhas et al., 2002](#); [Peres et al., 2004](#); [Talhinhas et al., 2005](#); [Nakaune and Nakano, 2007](#)).

Benzimidazole compounds bind to β -tubulin proteins, preventing microtubules assembly in eukaryotic cells ([Davidse, 1986](#); [Osmani and Oakley, 1991](#)). An interesting point is that benzimidazole molecules seem not to be active on plant and mammalian cells ([Davidse and Flach, 1977](#); [Jung et al., 1992](#); [Elslahi et al., 2014](#)).

A huge number of studies demonstrated that naturally Ben-susceptible mold and yeast strains are able to become resistant to Ben after mutations in their β -tubulin genes ([Osmani and Oakley, 1991](#)). In

most cases, a single point mutation is sufficient to confer resistance to Ben in fungi (e.g. *Acremonium chrysogenum* (Nowak and Kück, 1994), *Aspergillus flavus* (Seip *et al.*, 1990), *Aspergillus nidulans* (Jung *et al.*, 1992; May *et al.*, 1985), *Colletotrichum gloeosporioides* (Peres *et al.*, 2004), *Neurospora crassa* (Orbach *et al.*, 1986; Fujirama *et al.*, 1992), *Septoria nodorum* (Cooley and Caten, 1993), *Trichoderma viridie* (Goldman *et al.*, 1993)) and yeasts species (*Geotrichum candidum* (Gold *et al.*, 1991), (Thomas *et al.*, 1985)). These point mutations are usually affecting amino acids at position 198 or 200 (Osmani and Oakley, 1991; Koenraadt *et al.*, 1992; Koenraadt and Jones, 1993). However, in some species several point mutations are needed to confer Ben resistance (e.g. *Aspergillus parasiticus* (Wu *et al.*, 1996)). Then, the single point mutation usually affect amino acids 198 or 200 Mutations in β -tubulin genes caused an alteration in the sensitivity to Ben, and benzimidazole compounds more generally, because of a lesser binding affinity of β -tubulin genes for Ben (Jung *et al.*, 1992; Ishii *et al.*, 2001). On the other hand, it has been demonstrated that according the amino acid substitution occurring, the susceptibility to Ben is more or less altered (Koenraadt *et al.*, 1992; Yarden and Katen, 1993).

In some species, natural resistance to Ben was observed but no point mutation was found in their beta-tubulin gene (e.g. *Colletotrichum acutatum* (Peres *et al.*, 2004), *Candida albicans* (Smith *et al.*, 1990; Fling *et al.*, 1991)). A multidrug resistance gene was identified in the latter and considered to be at the origin of the resistance to Ben in *Candida albicans* (Ben-Yaacov *et al.*, 1994; Goldway *et al.*, 1995).

Numerous mutated β -tubulin genes are available in filamentous fungi to be used for homologous (e.g. *Acremonium chrysogenum* (Nowak and Kück, 1994), *Aspergillus flavus* (Seip *et al.*, 1990), *Aspergillus nidulans* (May *et al.*, 1985; Dunne and Oakley, 1988), *Aspergillus parasiticus* (Wu *et al.*, 1996)) or heterologous transformation (Finkelstein, 1992). This includes the *ben^R* gene from *Neurospora crassa* (Orbach *et al.*, 1986; Vollmer and Yanofsky, 1986) which was successfully used for the transformation of *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus niger* (Orbach *et al.*, 1986), *Colletotrichum trifolii* (Dickman, 1988), *Cryphonectria parasitica* (Churchill *et al.*, 1990; Razanamparany *et al.*, 1992), *Erysiphe graminis* (Chaure *et al.*, 1999), *Gaeumannomyces graminis* (Henson *et al.*, 1988), *Geotrichum candidum* (Gold *et al.*, 1991), *Gliocladium virens* (Ossanna and Mischke, 1990), *Magnaporthe grisea* (Czymmek *et al.*, 2005), *Metarhizium anisopliae* (McClung *et al.*, 1989; Bogo *et al.*, 1996; Duarte *et al.*, 2006), *Penicillium chrysogenum* (Picknett and Saunders, 1989), *Penicillium islandicum* and *Penicillium frequentans* (Huang *et al.*, 1995), *Pseudocercospora herpotrichoides* (Bunkers, 1991), *Podospora anserina* (Fernandez-Larrea and Stahl, 1989), *Trichoderma harzianum* (Inglis *et al.*, 1999) but also the *benA* gene from *Aspergillus nidulans* (Shier-Neiss *et al.*, 1978; Jung and Oakley, 1990) used to transform *Metarhizium anisopliae* (Goettel *et al.*, 1990; St Leger *et al.*, 1995; Fang *et al.*, 2006) and *Septoria nodorum* (Cooley *et al.*, 1991).

Benomyl is usually solubilized in dimethyl sulfoxide (Wood, 1982; Haptmann *et al.*, 1985; Dickman, 1988; Goettel *et al.*, 1990; Seip *et al.*, 1990; Upchurch *et al.*, 1991; Goldway *et al.*, 1995; St Leger *et al.*, 1995; Czymmek *et al.*, 2005; Pham *et al.*, 2014) or absolute ethanol (Fernandez-Larrea and Stahl, 1989; Picknett and Saunders, 1989; Ossanna and Mischke, 1990; Bunkers, 1991). Transformed cells should be selected on rich media containing Ben (May *et al.*, 1985; Dickman, 1988; Fernandez-Larrea and Stahl,

1989; Churchill *et al.*, 1990; Goettel *et al.*, 1990; Seip *et al.*, 1990; Ossanna and Mischke, 1990; Bunkers, 1991; Razanamparany *et al.*, 1992; Nowak and Kück, 1994; Hang *et al.*, 1995; St Leger *et al.*, 1995; Bogo *et al.*, 1996; Duarte *et al.*, 1996; Inglis *et al.*, 1999; Cao *et al.*, 2007). Although, the Ben resistance gene appeared highly stable after transformation (Churchill *et al.*, 1990; Bunkers, 1991; Hang *et al.*, 1995; Wu *et al.*, 1996), it was reported that low frequencies of transformation are associated with the use of *ben^R* or *benA* as a selectable marker, particularly in filamentous fungi (Fernandez-Larrea *et al.*, 1989; Churchill *et al.*, 1990; Upchurch *et al.*, 1991; Bogo *et al.*, 1996). Another benefit in using Ben-resistance markers is that no spontaneous mutants were observed on the transformation control plates (Dickman, 1988; Fernandez-Larrea and Stahl, 1989; Goettel *et al.*, 1990; Ossanna and Mischke, 1990; Upchurch *et al.*, 1991; Hang *et al.*, 1995; Bogo *et al.*, 1996; Duarte *et al.*, 1996; Cao *et al.*, 2007). Finally, low concentrations of Ben in the medium are sufficient to select transformed cells ranging from 0.1 to 2.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for *Cercospora kikuchii* (Upchurch *et al.*, 1991), *Cryphonectria parasitica* (Churchill *et al.*, 1990; Razanamparany *et al.*, 1992), *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* (Pham *et al.*, 2014), *Geotrichum candidum* (Gold *et al.*, 1991), *Gliocladium virens* (Ossanna and Mischke, 1990), *Penicillium sp.* (Picknett and Saunders, 1989; Huang *et al.*, 1995), *Pseudocercospora herpotrichoides* (Bunkers, 1991), *Podospora anserina* (Fernandez-Larrea and Stahl, 1989), *Septoria nodorum* (Cooley *et al.*, 1991), *Trichoderma harzianum* (Inglis *et al.*, 1999), and from 5 to 13 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for *Acremonium chrysogenum* (Nowak and Kück, 1994), *Aspergillus nidulans* (May *et al.*, 1985; Dunne and Oakley, 1988), *Colletotrichum trifolii* (Dickman, 1988), *Metarhizium anisopliae* (Goettel *et al.*, 1990; St Leger *et al.*, 1995; Bogo *et al.*, 1996; Duarte *et al.*, 2006; Fang *et al.*, 2006; Cao *et al.*, 2007).

To conclude, Ben-resistance genes seems to be convenient selectable marker to transform fungi such as the *ben^R* gene from *Neurospora crassa* (Orbach *et al.*, 1986) or the *benA* gene from *Aspergillus nidulans* (Jung and Oakley, 1990). These resistance genes are relatively short, approximatively 1,340 bp (Orbach *et al.*, 1986; Seip *et al.*, 1990; Nowak and Kück, 1994; Parke *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 1996), thus easy to integrate in a construction. Moreover, benomyl is inexpensive in comparison to other commonly used selectable markers (Gold *et al.*, 1994_Three). Ben seems to present a potential teratogen effect on mammal cells and a carcinogenic effect on animal cells. Noteworthy, the worldwide provider of Benlate®, Dupont, has decided to stop the production of this fungicide.

5.2. Carboxin

Carboxin (Cbx) or Vitavax®, 2,3-dihydro-5-carboxanilido-6-methyl-1,4-oxathiin, is part of the synthetic anilide compounds. Since its discovery in the middle of the 60s (von Schmeling *et al.*, 1966), this molecule has been widely employed as a systemic fungicide (Snel and Edgington, 1970; Erwin, 1970) to control the spread of phytopathogen fungal species (Powelson and Shaner, 1966; Edgington and Baron, 1967; Hardison, 1967; Rowell, 1967). The particularity of Cbx is that it is widely active against Basidiomycete fungal species (Edgington *et al.*, 1966; Newcombe and Thomas, 1990) (e.g. *Clitopilus passeckerianus* MIC = 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Kilaru *et al.*, 2009), *Coprinopsis cinerea* MIC = 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Kilaru *et al.*, 2009), *Magnaporthe oryzae* MIC = 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Guo *et al.*, 2016), *Pleurotus ostreatus* MIC = 2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

(Honda *et al.*, 2000), *Uromyces fabae* MIC = 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Wirsel *et al.*, 2004), *Ustilago esculenta* MIC = 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Yu *et al.*, 2015)) while most of the ascomycetous are non-susceptible to Cbx. However, some members of the Ascomycete phylum are susceptible to Cbx like in Deuteromycetes or Phycomycetes (Edgington *et al.*, 1966; Edgington and Baron, 1967; Snel *et al.*, 1970) (e.g. *Aspergillus oryzae* MIC = 200 μM (Shima *et al.*, 2011), *Mortierella alpina* MIC = 100 g.mL^{-1} (Ando *et al.*, 2009), *Zymoseptoria tritici* MIC = 75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Skinner *et al.*, 1998)).

Cbx and relatives are respiratory poisons by affecting the electron transport in mitochondria Complex II (Mathre, 1970; Ragsdale and Sisler, 1970; Snel *et al.*, 1970; Ulrich and Mathre, 1972). More precisely, Cbx acts by inhibiting the mitochondrial enzyme, succinate dehydrogenase (EC 1.3.99.1) (SDH), oxidation (Mathre, 1971; White, 1971; Georgopoulos *et al.*, 1972; Ackrell *et al.*, 1977). The SDH plays an essential role in the Krebs cycle as it oxidizes succinate into fumarate and reduces ubiquinone to ubiquinol. It was found that Cbx is also able to inhibit the succinate oxidation yeast, bacteria, plant and mammalian cells. Therefore, fungi (e.g. *Ustilago maydis*), bacteria (e.g. *Micrococcus denitrificans*) and animal species (e.g. pig heart, rat liver) seem to be more sensitive to Cbx than yeast (e.g. *Saccharomyces cerevisiae*) or higher plant ones (e.g. *P. vulgaris*) (Ulrich and Mathre, 1972; Tucker and Lillich, 1974; Day *et al.*, 1978; White *et al.*, 1978). For example, Mathre reported that 150 μM of Cbx inhibited the succinate oxidation in *Fusarium oxysporum* and *Ustilago maydis*, at 100% and 93% respectively, while only 25% inhibition was reached for pinto beans (Mathre, 1971).

In addition, it has been demonstrated that fungal susceptibility to Cbx can be increased when acetate is added in the growth medium as the carbon source (Gunatilleke *et al.*, 1975). It can be explained by the fact that the acetate metabolism in the cell is inhibited by Cbx whereas not the glucose metabolism (Mathre, 1970; Ragsdale and Sisler, 1970) during the Krebs cycle.

Because of an intensive use in crops, natural resistance to Cbx appeared in fungi (Dhitaphichit and Jones, 1991; Newcombe and Thomas, 1991; Newcombe and Thomas, 2000) leading to engineer synthetic resistant strains in research since the beginning of the 90s (Broomfields and Hargreaves, 1992; Irie *et al.*, 1988b; Keon *et al.*, 1991; Keon *et al.*, 1994; Skinner *et al.*, 1998; Honda *et al.*, 2000; Kilaru *et al.*, 2009; Ando *et al.*, 2009; Shima *et al.*, 2009; Yin *et al.*, 2011).

For a better understanding of the mechanism of resistance toward Cbx it is essential to well understand the Cbx mode of action on SDH. Complex II (succinate-ubiquinone oxidoreductase) of the respiratory electron transport chain in mitochondria in filamentous fungi is composed of two ubiquinone-binding proteins (SdhC and SdhD) and the SDH, itself composed of two subunits: *i*) an iron sulfur protein (Ip, SdhB or Sdi1), and *ii*) a flavoprotein (FP or SdhA) (Ulrich and Mathre, 1972; Ackrell *et al.*, 1977; Hatefi *et al.*, 1985). Three iron-sulfur centers, containing cysteine residues, are part of the Ip subunit. Cbx seems to target the third center, encoded by the *SdhB* gene (Skinner *et al.*, 1998), thanks to a conformational change exposing this center to Cbx in sensitive strains (Georgopoulos *et al.*; Skinner *et al.*, 1998). Other studies mentioned that carboxin binds to quinone-binding sites which are also present in the SdhC and SdhD subunits (Sun *et al.*, 2005; Horsefield *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2006).

It is mainly reported that a single amino acid substitution of a conserved histidine to a leucine, contained in the third cysteine rich cluster subunit of the Ip subunit of the SDH, is able to confer resistance to Cbx in fungi (Keon *et al.*, 1991; Broomfield and Hargreaves, 1992; Skinner *et al.*, 1998; Honda *et al.*, 2000; Irie *et al.*, 2003; Ito *et al.*, 2004; Ando *et al.*, 2009; Honda *et al.*, 2009; Kilaru *et al.*, 2009; Ngari *et al.*, 2009; Shima *et al.*, 2009; Kano *et al.*, 2012; Guo *et al.*, 2016). Shima *et al.*, showed that an amino acid substitution in the SdhC and SdhD subunits could confer Cbx resistance in *Aspergillus oryzae* (Shima *et al.*, 2009). Indeed, in the SdhC a change from a threonine residue to an isoleucine was observed and an asparagine change for glutamine in the SdhD. The first described mutation was different from the one identified in the SdhC from *Coprinopsis cinerea* (Ito *et al.*, 2004) while the mutation identified in the SdhD was already described in the bacteria *Paracoccus denitrificans* (Matsson *et al.*, 1998). What is interesting is that the three mutations have never been described at the same time in one organism (Shima *et al.*, 2011) apart in *Aspergillus nidulans* (Gunatilleke *et al.*, 1976).

Thanks to the identification of the origin of the Cbx resistance, it was thus easy to develop these resistance gene as selection agents in fungal transformation. Nevertheless, these genes can only be used for homologous recombination (e.g. *Aspergillus oryzae* (Shima *et al.*, 2009), *Coprinopsis cinerea* (Kilaru *et al.*, 2009), *Hebeloma cylindrosporum* (Ngari *et al.*, 2009), *Lentinula edodes* (Irie *et al.*, 2003), *Magnaporthe oryzae* (Guo *et al.*, 2016), *Mortierella alpina* (Ando *et al.*, 2009), *Pleurotus ostreatus* (Honda *et al.*, 2000; Irie *et al.*, 2001; Honda *et al.*, 2001; Tsukihara *et al.*, 2006; Salame *et al.*, 2012), *Uromyces fabae* (Wirsal *et al.*, 2004; Djulic *et al.*, 2011), *Ustilago esculenta* (Yu *et al.*, 2015), *Ustilago maydis* (Georgopoulos *et al.*, 1972; Keon *et al.*, 1991; Broomfield and Hargreaves, 1992; Ruiz-Herrera *et al.*, 1999), *Zymoseptoria tritici* (Skinner *et al.*, 1998; Bowler *et al.*, 2010; Kilaru *et al.*, 2015; Kilaru *et al.*, 2015)). Some experiments tried to use a gene for a heterologous transformation but they were abortive (e.g. the *Aosdhb^{CXR}* gene from *Aspergillus oryzae* in *Penicillium simplicissimum* (Shima *et al.*, 2009), the *sdi^R* gene from *Pleurotus ostreatus* in *Hebeloma cylindrosporum* (Ngari *et al.*, 2009) or in *Lentinula edodes* (Irie *et al.*, 2003). Nevertheless, in some rare cases, heterologous transformation gave rise to carboxin-resistant transformants (e.g. the *sdi^R* gene from *Agaricus bisporus* in *Coprinopsis cinerea* (Challen *et al.*, 2000), the *Aosdhb^{CX}* gene from *Aspergillus oryzae* in *Aspergillus parasticus* (Shima *et al.*, 2009), the *sdi^{1R}* gene from *Coprinopsis cinerea* in *Clitopilus passeckerianus* (Kilaru *et al.*, 2009)).

Cbx resistance genes were successfully used as a dominant selection marker in fungal transformation (Honda *et al.*, 2000) but for a long time it was considered that using these resistance genes impaired the pathogenicity of the transformed strain, thus that Cbx resistance genes cannot be used as selection markers (Ruiz-Herrera *et al.*, 1999). This statement was refuted and Cbx was considered suitable to be used in fungal transformation (Topp *et al.*, 2004; Bielska *et al.*, 2014; Higuchi *et al.*, 2014; Treitschke *et al.*, 2010). Some studies reported that Cbx resistance genes allowed a better discrimination and a higher efficiency of transformation than the ones obtained with hygromycin as a selectable agent (Ando *et al.*, 2009; Ngari *et al.*, 2009; Irie *et al.*, 2003). Ngari *et al.*, had observed that a concentration in Cbx twenty times higher than the concentration used to inhibit the wild-type strain did not affect the growth of the transformants. While, if a concentration in hygromycin B 20 times higher to the one which inhibits the wild-

type strain is applied on transformants, their growth will be decreased by 50 to 90%. Cbx seems to be a good selection agent as far as the integration of the resistance cassette is stable in transformants (Honda *et al.*, 2000; Irie *et al.*, 2001; Ando *et al.*, 2009; Ngari *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2015). Therefore, some false-positive transformants can appear during the transformation process (Ando *et al.*, 2009; Ngari *et al.*, 2009). These generalities are not applicable to every transformation systems. For example, in a transformation of *Pleurotus ostreatus* made by Honda *et al.*, no negative transformants appeared but a low efficiency in the transformation was reported (Honda *et al.*, 2000).

Prior to use it, Cbx is dissolved in acetone (Edgington *et al.*, 1966) or methanol (Georgopoulos *et al.*, 1972; Gunatilleke *et al.*, 1976). Concentrations of Cbx used to select transformed cells is generally lower in basidiomycetous (e.g. 60 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ in *Clitopilus passeckerianus* (Kilaru *et al.*, 2009), 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ in *Coprinopsis cinerea* (Kilaru *et al.*, 2009), 0.2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ in *Hebeloma cylindrosporum* (Ngari *et al.*, 2009), 2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ in *Lentinula edodes* (Irie *et al.*, 2003), 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ in *Magnaporthe oryzae* (Guo *et al.*, 2016), 2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ in *Pleurotus ostreatus* (Honda *et al.*, 2000; Irie *et al.*, 2001; Honda *et al.*, 2001; Tsukihara *et al.*, 2006; Salame *et al.*, 2012), 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ in *Ustilago esculenta* (Yu *et al.*, 2015), 2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ in *Ustilago maydis* (Broomfield and Hargreaves, 1992)) than in ascomycetous (e.g. 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ in *Aspergillus oryzae* and 75 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ in *Aspergillus parasiticus* (Shima *et al.*, 2009), 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ in *Zyloseptoria tritici* (Bowler *et al.*, 2010; Kilaru *et al.*, 2015)) and zygomycetous fungi (e.g. 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ in *Mortierella alpina* (Ando *et al.*, 2009)). Selection of the transformed cells is usually done on rich media in basidiomycetes (Keon *et al.*, 1991; Honda *et al.*, 2000; Honda *et al.*, 2001; Irie *et al.*, 2001; Irie *et al.*, 2003; Kilaru *et al.*, 2009; Kilaru *et al.*, 2009; Ngari *et al.*, 2009; Salame *et al.*, 2012; Guo *et al.*, 2016) as well as in ascomycetes or zygomycetes (Ando *et al.*, 2009; Shima *et al.*, 2009; Kilaru *et al.*, 2015). Finally, in some experiments it was precised that transformation plates were incubated in the dark (Skinner *et al.*, 1998; Ngari *et al.*, 2009; Guo *et al.*, 2016).

As a conclusion, carboxin is interesting in the transformation of basidiomycetous fungal species as far as in most cases the transformation efficiency obtained is higher or the same as the one with traditional selection markers, the discrimination is better, few studies reported the presence of false-positive transformants. It is more complicate to rule on ascomycetes species transformation because few data are available. Then, this drug is less expensive than hygromycin or geneticin (Ando *et al.*, 2009). The resistance genes are constituted of more than 2,000 bp but they encoded an ORF of less than 1,000 bp. Cbx does not seem to be toxic for humans.

5.3. Glyphosate

Glyphosate, (N-[phosphonomethyl]-glycine), usually referred to as Roundup®, is a non-specific herbicide with a broad spectrum. It is known to inhibit plant growth (Jaworski *et al.*, 1972; Amrhein *et al.*, 1983; Mousdale and Coggins, 1984) but also bacteria (Steinrücken *et al.*, 1980; Comai *et al.*, 1983; Duncan *et al.*, 1984), yeasts and fungi (Boocock and Coggins, 1983; Bode *et al.*, 1985). The drug mainly inhibits the 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate (EPSP) synthase (EC 2.5.1.19) from the essential shikimate

biosynthetic pathway but two other upstream enzymes, the 3-désoxy-7-phosphoheptulonate synthase (DAHP) synthase (EC 4.1.2.15) and the dehydroquinate synthase (EC 4.6.1.3), could constitute secondary targets of glyphosate (Rubin *et al.*, 1982; Bode *et al.*, 1984). The inhibition of the activity of these enzymes disturbs the aromatic amino acids biosynthesis pathway since the EPSP synthase is a pivotal enzyme that catalyzes different steps of the pathway. . In fungi, the EPSP synthase has multiple functions, regulating approximately five consecutive steps in the shikimate pathway as described in *Saccharomyces cerevisiae* (Duncan *et al.*), *Neurospora crassa* (Lumsden and Coggins, 1977 and 1978; Coggins *et al.*, 1985), *Ustilago violacea* and *Schizosaccharomyces pombe* (Larimer *et al.*, 1983) while in bacteria or plants, the EPSP synthase is considered to be monofunctional (Mousdale and Coggins, 1984).

The EPSP synthase is encoded by the *aroA* gene (Gollub *et al.*, 1967). Species harboring the wild-type *aroA* gene are sensitive to glyphosate, while the presence of a mutated allele of this gene leads to resistance towards glyphosate action (Comai *et al.*, 1983). In addition, Comai *et al.* demonstrated the dominant character of the mutated allele in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. In-depth studies identified a single substitution at codon 101 of the *aroA* gene leading to a proline to serine substitution (Stalker *et al.*, 1985).

Susceptibility of yeast species against glyphosate appears extremely heterogeneous. For example, *Yarrowia lipolytica* is 400-fold more sensitive than *Candida albicans*, *Candida utilis* or *Hansenula polymorpha* (Bode *et al.*, 1986). The unique study dealing with the use of glyphosate as selection drug for fungal genetics concerns *Saccharomyces cerevisiae* (Kunze *et al.*, 1989). First, it was shown that the susceptibility of *S. cerevisiae* towards the drug was depending on the pH of the media used since at pH 4.0 the strain was inhibited with 3 mg.mL⁻¹ glyphosate while at pH 6.8 the inhibitory concentration of the drug was 2 mg.mL⁻¹ (Kunze *et al.*, 1989). A autonomously replicating plasmid containing the *aroA* gene from *Escherichia coli* (Duncan *et al.*, 1984; Duncan and Coggins, 1984) was used to transform some *Saccharomyces cerevisiae* strains (Kunze *et al.*, 1989). Transformants were selected on a minimal media containing 2 mg.mL⁻¹ glyphosate.

To conclude, the resistance gene *aroA* could potentially represents a convenient selection marker for fungal engineering since since the price of glyphosate remains very low compared to hygromycin or geneticin for instance. Nevertheless, glyphosate is highly toxic for humans (teratogen toxicity) and too little information is available to determine if the *aroA* gene is broadly suitable for fungal transformation strategies.

5.4. Pyriithiamin

Pyriithiamin (PT), 2-[1-[(4-amino-2-methylpyrimidin-5-yl)methyl]-2-methylpyridin-1-ium-3-yl], is a pyrimidine derivative. It has been demonstrated that yeasts die when exposed to this compound. Indeed, wild-type strain of *Saccharomyces cerevisiae* was completely inhibited by 0.84 µg.mL⁻¹ PT (Iwashima *et al.*, 1975). Concerning filamentous fungi, *Aspergillus sp.* (e.g. *A. aculeatus* with a MIC 0.05 µg.mL⁻¹, *A. flavus* with a MIC 0.01 µg.mL⁻¹, *A. niger* with a MIC 2 µg.mL⁻¹, *A. oryzae* with a MIC 0.01 µg.mL⁻¹) and

Trichoderma reesei are sensitive to the molecule whereas *Penicillium citrinum* and *Fusarium solani* are not (Kubodera *et al.*, 2000; Kubodera *et al.*, 2002; Kanasama *et al.*, 2003; Chang *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2017).

This agent is an antagonist of thiamine (vitamin B1) (Iwashima *et al.*, 1975). It acts by reducing the thiamine transport and induces the inhibition of the thiamine pyrophosphokinaes (TPK) (Iwashima *et al.*, 1975; Schweingruber and Edenharter, 1990; Schweingruber *et al.*, 1991; Nosaka *et al.*, 1993). TPK is required to transform thiamine into thiamine pyrophosphate (TPP), an important cofactor of several enzymes. Whether TPK is inhibited, the amount of TPP is insufficient and the consequence is the death of the fungal cell (Nosaka *et al.*, 1993).

Resistance to PT is conferred by a mutated allele of the *ptrA* gene, potentially encoding an enzyme involved in thiamine biosynthesis and belonging to the TH14 protein family (Iwashima *et al.*, 1975; Schweingruber *et al.*, 1991; Kubodera *et al.*, 2000).

The use of PT as a dominant selectable marker is relatively recent since all the corresponding molecular cassettes described in fungal transformation contained the *ptrA* gene of *A. oryzae*, identified by Kubodera *et al.* in 2000 (Kubodera *et al.*, 2000; Kubodera *et al.*, 2002; Kanamasa *et al.*, 2003; Chang, 2008_A highly ; Chang *et al.*, 2010; Hartmann *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2017). The *A. nidulans ptrA* was used to construct a marker recycling cassette (Zhang *et al.*, 2017). The *ptrA* gene of *A. oryzae* was used to transform *Aspergillus* related strains, but also a dermatophytic species, *Trichoderma reesei*. The interesting point in the transformation of all these fungal strains is the low PT concentrations required to select transformed cells in minimal medium (e.g. 0.1 µg.mL⁻¹ for *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. kawachii*, *A. oryzae*, *A. parasiticus*, *A. terreus* and *T. reesei* (Kubodera *et al.*, 2000; Kubodera *et al.*, 2002; Chang, 2008; Chang *et al.*, 2010), 0.2 µg.mL⁻¹ for *A. aculeatus* (Kanamasa *et al.*, 2003), 2 µg.mL⁻¹ for *A. niger* (Zhang *et al.*, 2017)). In addition, integration of the disruption cassette seems to be stable in the transformed cells (Kanamasa *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2017). A unique experiment described the growth of small colonies in presence of PT for *A. aculeatus* transformation but these colonies were distinguishable from transformants (Kubodera *et al.*, 2002_Transformation).

Finally, PT seems to be a good candidate for filamentous fungi transformation as far as the *A. oryzae ptrA* gene is small (less than 1,000 bp) (Kubodera *et al.*, 2000_Pyrithiamine), PT price is inexpensive compared to hygromycin or geneticin, and very low concentrations are needed in the medium to select transformed cells. Be careful to chronic exposition which lead to alteration of the nervous system.

5.5. Sulfonylurea

Sulfonylurea is a family of compounds encompassing some synthetic and structurally similar molecules that were originally and primarily used as herbicides in agricultural fields to prevent the spread of weeds (Worthing and Hance, 1991). A couple of these compounds are now used as selection drugs for the genetic transformation of yeasts and filamentous fungi. Since the early 80's, sulfometuron methyl (SM), N-[(4,6-dimethylpyrimidin-2-yl)aminocarbonyl]-2-methoxycarbonylbenzene sulfonamide, was used

to genetically transform industrial yeast strains for metabolic engineering (Casey *et al.*, 1988; Xiao *et al.*, 1989; Xiao *et al.*, 1990; Ambrona *et al.*, 2005). Besides, chlorimuron ethyl (CE), (ethyl-2-[[[(4-chloro-6-methoxypyrimidin-2-yl)amino]carbonyl]amino]sulfonyl]benzoate, was rather used to date as selection drug in ascomycetous molds (Zhang *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2016; Sweigard *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2007; Yang and Naqvi, 2014; Lin *et al.*, 2011; Sidhu, Cairns *et al.*, 2015).

The cellular target of sulfonylurea molecules is the acetolactate synthase enzyme (ALS), also referred to the acetohydroxyacid synthase (AHAS) (Magee *et al.*, 1968; Chaleff and Mauvais, 1984; for a review: McCourt *et al.*, 2006). Briefly, ALS corresponds to the first crucial enzyme involved in the biosynthesis pathway of branched-chain amino acids: valine, leucine and isoleucine. When activated by a hitherto unknown fungal cell process, CE and SM are able to inhibit the activity of this enzyme (Chaleff and Mauvais, 1984). By this way, sulfonylureas are toxic compounds for cells that harbor an essential biosynthesis pathway of branched-chain amino acids and were thus reported to be active on bacteria (LaRossa *et al.*, 1984), higher plants (Chaleff and Mauvais, 1984; Ray, 1984), filamentous fungi (Valent *et al.*, 1991; Sweigard *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2011; Yang and Naqvi, 2014) and yeasts (Falco *et al.*, 1984; Falco *et al.*, 1985; Yadav *et al.*, 1986; Maiti *et al.*, 1987; Xiao *et al.*, 1989; Xie *et al.*, 1996).

Concerning CE and its potential in filamentous fungi genetics, the resistance in fungal cells is known to be mediated by dominant mutations that occur in alleles encoding the ALS enzyme. For instance, it was reported that the *sur* allele of the *ILV1* gene conferred CE resistance in *Magnaporthe grisea* (Valent *et al.*, 1991; Qing *et al.*, 2010) and similarly the *ILV2^{SUR}* allele of the *ILV2* gene conferred CE resistance in *Magnaporthe oryzae* (Valent *et al.*, 1991; Sweigard *et al.*, 1997; Yang and Naqvi, 2014). For SM and its particular applications in yeasts, a dozen of distinct dominant mutations in the *ILV2* gene have been shown to lead to strong SM resistance in *Saccharomyces cerevisiae* (Falco *et al.*, 1985a; Falco *et al.*, 1985b). This includes above all two mutations that modify the N-terminus amino acid sequence of the ALS enzyme: the *SMR1-410* mutation (also called *ILV2-410*) which corresponds to a C-to-T substitution at nucleotide position 574 resulting in a proline-to-serine conversion in the protein (Casey *et al.*, 1988; Falco *et al.*, 1985a; Yadav *et al.*, 1986) and the *SMR1B* mutation that relies on a C-to-T substitution at nucleotide 575 which implies a proline-to-leucine exchange (Falco *et al.*, 1996). These two independent and prominent mutations thus highlight a crucial role of the proline residue at position 191 of the protein in the binding of sulfonylurea molecules on ALS, and that a substitution of this important amino acid do not alter the essential activity of the enzyme.

Several fungal model species have been successfully transformed with a sulfonylurea resistant cassette. Genes conferring resistance to CE have been introduced in the genome of different filamentous fungi including *Beauveria bassiana* (Zhang *et al.*, 2010), *Cercospora nicotianae* (Chen *et al.*, 2007), *Colletotrichum acutatum* (Chung *et al.*, 2002), *Harpophora oryzae* (Liu *et al.*, 2016), *Metarhizium robertsii* (Lin *et al.*, 2011), *Neurospora crassa* (Li *et al.*, 2005) by using the *sur* resistance gene from *M. grisea* but also *Zymoseptoria tritici* by using the *ILV2^{SUR}* resistance gene from *M. oryzae* (Sidhu *et al.*, 2015a; Sidhu

et al., 2015b). Few other studies have reported the use of the SM resistance gene in industrial yeasts belonging to the *Saccharomyces* genus (Yadav *et al.*, 1986; Maiti *et al.*, 1987; Casey *et al.*, 1988; Xiao *et al.*, 1989; Kitamoto *et al.*, 1991; Ambrona *et al.*, 2005). Following the transformation experiments, these dominant markers were shown to be relatively stable in strains under non selective conditions (Falco *et al.*_1985a; Xiao *et al.*_1989; Zhang *et al.*_2010; Sidhu *et al.*_2015b; Liu *et al.*_2016), with the exception of some marker loss events observed in several *S. cerevisiae* industrial strains (Casey *et al.*, 1988; Kitamoto *et al.*, 1991).

The selection of transformants must be carried out on minimal media such as Czapeck-Dox. Zhang *et al.* noted the importance of the pH of the drug-containing selection medium by observing a reduction in the background when the pH of Czapeck-Dox has been lowered from 7.3 to 6.3 (Zhang *et al.*, 2010). Noteworthy, susceptibility towards sulfonyleurea compounds appears highly variable from a species to another. For instance, *Z. tritici* was found strongly susceptible (MIC = 2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) (Sidhu *et al.*, 2015b), *M. robertsii* moderately susceptible (MIC = 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) (Lin *et al.*, 2011), and *Aspergillus niger* highly resistant (MIC = 2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) (Sharma *et al.*, 2012) towards CE. Thus, drug concentrations in the medium plates reported to achieve a convenient selection of transformants ranged from 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for *B. bassiana* (Zhang *et al.*, 2010) and *Z. tritici* (Sidhu *et al.*, 2015b) to 400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for *H. oryzae* (Liu *et al.*, 2016). More precisely concerning *H. oryzae*, such a high concentration was applied in order to avoid the selection of any spontaneous mutants, as described by Valent *et al.* in *M. grisea* (Valent *et al.*, 1991). For the remaining Ascomycete molds, for which a sulfonyleurea selectable marker has been successfully used, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ CE was commonly added in selection plates. Concerning yeasts, *Saccharomyces* strains seems to be inhibited by very low SM concentrations (3 to 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) (Falco *et al.*, 1985a; Yadav *et al.*, 1986; Casey *et al.*, 1988; Xie *et al.*, 1996; Ambrona *et al.*, 2005). Nevertheless, it is important to keep in mind that spontaneous SM resistant colonies could arise on *Saccharomyces* transformation selection plates (Falco *et al.*, 1985a; Yadav *et al.*, 1986). As a consequence, 10 to 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ SM should be added in the media to prevent the growth of spontaneous yeast mutants.

Finally, it is noteworthy that sulfonyleureas compounds are light sensitive, at least CE and SM. Thus, it is crucial to accurately incubate transformation plates in the darkness during the whole life of the selection step. In addition, the drugs must not be directly added in the media due to a poor solubility in water of sulfonyleurea molecules. Thus, a stock solution must be primarily prepared, mostly in acetone for SM and dimethylformamide for CE.

In conclusion, molecules belonging to the sulfonyleurea family show interesting potentials as selection drugs for genetic engineering of a broad range of Ascomycete species (no data are available for Basidiomycete models) by using, as a resistance gene, a mutated allele encoding a modified target ALS. Their apparent low toxicity for mammalian cells, at least for SM (Falco *et al.*, 1985a ; Casey *et al.*, 1988 ; Xie *et al.*, 1996), the moderate concentration required in selection plates and the acceptable price of crude CE and SM thus make sulfonyleureas attractive selection drugs for laboratories. Nevertheless, CE and SM resistance genes are large nucleotide sequences (roughly 2,500 bp), and, adding to both a promoter and

a terminator sequences necessary for expression of the modified ALS, this could render difficult the DNA manipulation of sulfonyleurea resistance cassette and deriving molecular constructs.

6. Other drugs used in Human medicine

6.1. Methotrexate

Methotrexate (MTX) or amethopterin, (2S)-2-[4-[[[(2,4-diamino-7,8-dihydropteridin-6-yl)méthyl](methyl)amino}phenyl]formamido] pentanedioic acid or amethopterin-4-amino-10-methylpteroyl-glutamic acid, is a purine synthetic derivative, more precisely an antagonist of folic acid. Indeed, it lacks a hydroxyl function at the fourth amino group of the pteridin ring (Bleyer *et al.*, 1978). This drug is conventionally used in numerous hematological malignancies, and more particularly in acute lymphoblastic leukaemia of childhood, or to treat rheumatoid arthritis and psoriasis at lower doses (Bleyer *et al.*, 1978; Jolivet *et al.*, 1983). When MTX is added in a media, at concentrations found *in vivo*, it has been shown that it inhibits, or at least reduces, the *Candida albicans* (MIC = 750 µg.mL⁻¹ (Ghannoum and Al-Khars, 1984) or 450 µg.mL⁻¹ (Warnock *et al.*, 1989)) blastospore growth. Whereas it seems that it did not have any effect on germ tubes (Ghannoum and Al-Khars, 1984; Warnock *et al.*, 1989). The same conclusion was drawn for *Saccharomyces cerevisiae* with the exception that sulfanilamide must be associated to MTX (Miyajima *et al.*, 1984; Mac Donald *et al.*, 2015). MTX has only a fungistatic activity on yeasts (Ghannoum and Al-Khars, 1984).

The mechanism of action of this drug on mammalian and prokaryotic cells relies on the inhibition of the dihydrofolate reductase (DHFR, EC 1.5.1.3). This enzyme converts folic acid into folate, its reduced form, which is a primordial cofactor in nucleic acid and protein synthesis (Bleyer *et al.*, 1978). Disruption of both phenomenon are observed in the early step of spore germination and seems to be necessary for germ tube elongation (Lovett, 1976). Yeasts present a *de novo* dihydrofolate synthesis pathway (Bush *et al.*, 1981; Miyajima *et al.*, 1984). That is why *Saccharomyces cerevisiae* is only susceptible to MTX when sulfanilamide, a molecule which inhibits this *de novo* pathway, is added (Brendel *et al.*, 1975; Little and Hayes, 1979; Wickner, 1975).

Resistance to MTX is due to a mutated allele of the dihydrofolate reductase (Thillet *et al.*, 1988). Disruption cassettes containing the *Mdhfr* resistance gene of *Mus musculus* or the one of human or the bacterial *R.dhfr* were used in *Saccharomyces cerevisiae* strains (Miyajima *et al.*, 1984; Zhu *et al.*, 1985; Mac Donald *et al.*, 2015). Natural resistance to the drug was observed in *Saccharomyces cerevisiae* strains thanks to mutations in their DHFR thus a lower affinity for MTX (Mac Donald *et al.*, 2015). When integrated, the stability of the disruption cassette is controversial according the study, when using the same *Mdhfr* resistance gene (Zhu *et al.*, 1985; Zhu *et al.*, 1986).

Selection of *Saccharomyces cerevisiae* transformants occurred in rich or poor media incubated in the dark since MTX is photosensible (Miyajima *et al.*, 1984; Zhu *et al.*, 1986). MTX and sulfanilamide were

added in the media, in relatively low concentrations (Miyajima *et al.*, 1984; Zhu *et al.*, 1985; Zhu *et al.*, 1986; Mac Donald *et al.*, 2015).

As a conclusion, the drug MTX could be used in *Saccharomyces cerevisiae* disruption experiments but it is difficult to extend its use to fungi as no data is available. The advantages are a small length of the resistance gene (approximately 560 bp), relatively low concentrations for the selection of transformants. Nevertheless, its price is almost twice higher than the one of commonly used marker of selection. In addition, MTX is extremely toxic.

6.2. Mycophenolic acid

Mycophenolic acid (MPA), E-6-(1, 3-dihydro-4-hydroxy-6-methoxy-7-methyl-3-oxo-5-isobenzofuranyl)-4-methyl-4-hexanoic acid, is a meroterpenoid characterized by the presence of a farnesyl group (Bentley, 2000). It was first isolated from *P. brevicompactum* in 1893. This natural antibiotic is produced by several other species belonging to the *Penicillium* genus (eg. *P. bialoowieziense*, *P. canescens*, *P. olivicolor*, *P. paxilli*, *P. roqueforti*, *P. viridicatum*) (Lafont *et al.*, 1979; Engel *et al.*, 1982; Wu, 1994; Frisvad *et al.*, 2004; Vinokurova *et al.*, 2005; Regueira *et al.*, 2011). MPA was first noted for its antimicrobial, antitumoral, antiviral and antiparasitic properties (Wu, 1994). Today, it is widely used for its immunosuppressive properties in particular in the prevention of allograft rejection (Escobar-Henriques *et al.*, 2001; Vinokurova *et al.*, 2005; Bentley, 2000). Concerning *P. brevicompactum*, 7 genes involved in MPA biosynthesis (*mpaA-mpaH*) were identified and constitute the mycophenolic acid gene cluster (Regueira *et al.*, 2011; Hansen *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2015). Only 5 of these genes (*mpaA*, *mpaC*, *mpaDE*, *mpaG* and *mpaH*) seem to be really involved in the synthesis of MPA. *P. roqueforti* presents a similar organization but only 6 genes (Del-Cid *et al.*, 2016). Differences in the promoter sequences may explain the difference in the amount of MPA biosynthesis. Indeed, *P. brevicompactum* synthesizes a huge amount of MPA compared to *P. roqueforti* (Lafont *et al.*, 1979; Engel *et al.*, 1982; Vinokurova *et al.*, 2005).

MPA acts by inhibiting reversibly the inositol-5'-monophosphate dehydrogenases (IMPDH, EC 1.1.1.205) (Wu, 1994; Ransom, 1995; Link and Straub, 1996; Hedstrom, *et al.*, 2009; Bentley, 2000). This enzyme is involved in the *de novo* GMP synthesis by converting IMP into xanthosine-5'-monophosphate (XMP). This conversion is a key step in guanine biosynthesis (Link and Straub, 1996; Sintchak *et al.*, 1996; Hyle *et al.*, 2003). It was shown that a cellular depletion in GTP leads to a growth arrest in microorganisms (Jackson *et al.*, 1975; Escobar-Henriques *et al.*, 2001).

According to the species, the number of IMPDH enzymes and their susceptibility to MPA, according to the amino acid substitutions, are different (Köhler *et al.*, 1997; Hyle *et al.*, 2003; McPhillips *et al.*, 2004; Köhler *et al.*, 2005). It is known that bacterial IMPDH are highly resistant while the human ones are susceptible. Humans and mice possess two different IMPDH genes while the majority of invertebrates only have one. *P. brevicompactum* contains two IMPDH proteins (IMPDH-A and IMPDH-B) diverging their susceptibility to MPA (Regueira *et al.*, 2011; Hansen *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2011). Indeed, the type B-IMPDH encoded by the *mpaF* gene is approximately 1,000-fold more resistant than IMPDH-A (Sun *et al.*,

2011). Both proteins confer a higher resistance to MPA compared to non MPA-producing fungi (eg. *A. nidulans*) (Hansen *et al.*, 2011; Hansen *et al.*, 2012). In *Saccharomyces cerevisiae*, a cluster containing four IMPDH genes (*IMD1-IMD4*), all with a different mechanism of action, was identified (Shaw *et al.*, 2001; Hyle *et al.*, 2003). *IMD2* seems to be the only one involved in MPA resistance even if it shares 92% and 84% homology with *IMD3* and *IMD4*, respectively (Hyle *et al.*, 2003; McPhillips *et al.*, 2004; Jenks and Reines, 2005). Jenks and Reines also demonstrated that the insertion of a hydroxyl side-chain at position 523 confers MPA resistance. *Candida* species show different degrees of resistance toward MPA. Indeed, in liquid and solid complete medium, *C. parapsilosis* was inhibited with 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ and 150 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ in liquid minimal medium (Gacser *et al.*, 2005). *Candida auris* was inhibited in minimal solid media containing 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ MPA (Defosse *et al.*, 2018). *C. albicans* strains showed a more limited resistance to MPA as far as their growth was inhibited between 5 and 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ of drug in the medium (Goshorn and Scherer, 1989; Köhler *et al.*, 1997; Thei *et al.*, 2002; Köhler *et al.*, 2005). MPA induces cytokinesis defects in *C. albicans* morphogenesis and the *IMH3* gene, even in a single copy, seems to be at the origin of the resistance to MPA (Gallagher *et al.*, 1987; Goshorn and Scherer, 1989; Quinn *et al.*, 1990; Köhler *et al.*, 1997; Staib *et al.*, 1999_Host ; Staib *et al.*, 2000; Wirsching *et al.*, 2000; Beckerman *et al.*, 2001). Finally, *Meyerozyma guilliermondii* is highly resistant to MPA until 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Defosse *et al.*, 2016). What is interesting here concerning the high resistance to MPA is that *M. guilliermondii* is not a MPA-producing species contrary to *P. brevicompactum*. Further investigations demonstrated that this yeast possess an additional *IMH3.2* gene and the presence of a serine at position 251 is responsible for MPA resistance (Defosse *et al.*, 2016). The presence of a serine residue may be at the origin of the MPA resistance in fungi as far as *P. brevicompactum* and *S. cerevisiae* IMPDH resistance genes also present an amino acid substitution by a serine (Jenks and Reines, 2005; Sun *et al.*, 2011). However, a threonine insertion is observed in *C. albicans* IMPDH resistance gene (Köhler *et al.*, 2005). These mutations could interfered in the conformation of the binding-site or modified the equilibrium between the intermediates conformation of the enzyme (Köhler *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2011).

Transformation experiments using the IMPDH resistance genes were only reported in yeasts. The *IMH3* resistance gene from *C. albicans* was both used as a homologous (Köhler *et al.*, 1997; Staib *et al.*, 1999; Wirsching *et al.*, 2000; Wirsching *et al.*, 2000; Beckerman *et al.*, 2001; Thei *et al.*, 2002; Du *et al.*, 2004; Morschhäuser *et al.*,) and heterologous (Staib *et al.*, 2000; Staib *et al.*, 2001; Wirsching *et al.*, 2001; Gacser *et al.*, 2005; Kosa *et al.*, 2007) selection marker. In these experiments, *C. albicans*, *C. dubliniensis* strains were selected with low concentrations of MPA (5, 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) while *C. parapsilosis* necessitated 150 to 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ MPA. The *IMH3.2* gene from *M. guilliermondii* was used in heterologous transformation of a huge number of yeasts belonging to the CTG clade such as *C. auris* and *Lodderomyces elongisporus* with 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ MPA (Defosse *et al.*, 2016; Defosse *et al.*, 2018), *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. lusitanae*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* and *Schefferomyces stipitis* with 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ MPA (Defosse *et al.*, 2016). *Candida famata* was transformed with the *IMH3* gene of *Debaryomyces hansenii* on plates containing 15 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ MPA (Dmytruk *et al.*, 2011). Recently, an IMPDH gene from *E. coli* annotated *guaB* was successfully used in the selection of *Yarrowia lipolytica* transformed cells with 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ MPA

(Wagner *et al.*, 2018). A background was sometimes reported in *C. albicans* transformation (Köhler *et al.*, 1997; Beckerman *et al.*, 2001; Thei *et al.*, 2002; Du *et al.*, 2004). When mentioned, the integration of the MPA resistance gene was always stably integrated (Beckerman *et al.*, 2001; Gacser *et al.*, 2005).

Transformation of yeasts and fungal susceptibility to MPA were always done on a minimal medium like the Czapeck's Dox or yeast nitrogen base dextrose without amino acids media for example (Köhler *et al.*, 1997; Staib *et al.*, 1999; Staib *et al.*, 2000; Wirsching *et al.*, 2000; Wirsching *et al.*, 2000; Beckerman *et al.*, 2001; Staib *et al.*, 2001; Wirsching *et al.*, 2001; Du *et al.*, 2004; Hansen *et al.*, 2012; Morschhäuser *et al.*; Defosse *et al.*, 2016; Defosse *et al.*, 2018; Wagner *et al.*, 2018). An exception was made for *C. parapsilosis* in which selection was made on the rich YPG medium (Gacser *et al.*, 2005; Kosa *et al.*, 2007). MPA is dissolved in water, ethanol or methanol prior its use (Bentley *et al.*, 2000_Mycophenolic ; Köhler *et al.*, 1997_Overexpression ; Beckerman *et al.*, 2001; Du *et al.*, 2004; Hansen *et al.*, 2012; Morschhäuser *et al.*; Defosse *et al.*, 2016; Defosse *et al.*, 2018). In addition plates containing the drug were not conserved for a long period (Hansen *et al.*, 2012).

As a conclusion, MPA is a good selection marker in many yeast species even the resistance genes are not small. Indeed the *IMH3* resistance gene from *C. albicans* is approximately 2,900 bp (Köhler *et al.*, 1997) and the *IMH3.2* resistance gene from *M. guilliermondii* is 1,600 bp (Defosse *et al.*, 2016). In addition, this drug is very expensive compared to hygromycin B and geneticin. Nevertheless, manipulators have to be aware of the MPA cytotoxic effect on cells, more particularly on lymphocytes B and T cells (Engel *et al.*, 1982).

7. Conclusion

A large panel of dominant resistance selection markers are available for fungal transformation although some drugs have been only described in yeast species or fungal species. The majority of these molecules have a bacterial origin. Contrary to auxotrophic markers, these selectable markers have the advantage to neither require the generation of an auxotrophic mutant upstream, nor the complementation of this mutated strain.

Anyhow, it is necessary to evaluate the susceptibility of the working strain prior the construction of molecular tools because susceptibility to a drug is strain-dependant. In addition, the medium used in transformation strategies may influence the expression of the drug activity according the osmolarity, the pH, or the richness of the medium. Finally, it is important to evaluate all the possibilities to choose the drug with the better quality/price ratio.

8. References

- ✓ Ackrell, Brian A. C., Edna B. Kearney, C. J. Coles, Thomas P. Singer, Helmut Beinert, Yieh-Ping Wan, and Karl Folkers. 1977. "Kinetics of the Reoxidation of Succinate Dehydrogenase." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 182 (1): 107–17. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(77\)90288-0](https://doi.org/10.1016/0003-9861(77)90288-0).
- ✓ Adamíková, L., P. Griac, L. Tomáška, and J. Nosek. 1998. "Development of a Transformation System for the Multinuclear Yeast *Dipodascus (Endomyces) Magnusii*." *Yeast (Chichester, England)* 14 (9): 805–12. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(19980630\)14:9<805::AID-YEA279>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(19980630)14:9<805::AID-YEA279>3.0.CO;2-8).

- ✓ Adaskaveg, J. E., and R. J. Hartin. 1997. "Characterization of Colletotrichum Acutatum Isolates Causing Anthracnose of Almond and Peach in California." *Phytopathology* 87 (9): 979–87. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1997.87.9.979>.
- ✓ Aeed, Paul A., Casey L. Young, Marek M. Nagiec, and Ake P. Elhammer. 2009. "Inhibition of Inositol Phosphorylceramide Synthase by the Cyclic Peptide Aureobasidin A." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53 (2): 496–504. <https://doi.org/10.1128/AAC.00633-08>.
- ✓ Ahuja, Manmeet, and Narayan S. Punekar. 2008. "Phosphinothricin Resistance in Aspergillus Niger and Its Utility as a Selectable Transformation Marker." *Fungal Genetics and Biology: FG & B* 45 (7): 1103–10. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2008.04.002>.
- ✓ Akada, R., K. Matsuo, K. Aritomi, and Y. Nishizawa. 1999. "Construction of Recombinant Sake Yeast Containing a Dominant FAS2 Mutation without Extraneous Sequences by a Two-Step Gene Replacement Protocol." *Journal of Bioscience and Bioengineering* 87 (1): 43–48.
- ✓ Alderton, Alex J., Ian Burr, Fritz A. Mühlischlegel, and Mick F. Tuite. 2006. "Zeocin Resistance as a Dominant Selective Marker for Transformation and Targeted Gene Deletions in Candida Glabrata." *Mycoses* 49 (6): 445–51. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2006.01271.x>.
- ✓ Ambrona, Jesús, Matilde Maqueda, Emiliano Zamora, and Manuel Ramírez. 2005. "Sulfometuron Resistance as a Genetic Marker for Yeast Populations in Wine Fermentations." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (19): 7438–43. <https://doi.org/10.1021/jf0514468>.
- ✓ Amelina, Hanna, Vera Moiseeva, Laura Catharine Collopy, Siân Rosanna Pearson, Christine Anne Armstrong, and Kazunori Tomita. 2016. "Sequential and Counter-Selectable Cassettes for Fission Yeast." *BMC Biotechnology* 16 (1): 76. <https://doi.org/10.1186/s12896-016-0307-4>.
- ✓ Amrhein, N., J. Schab, and H. C. Steinrücken. 1980. "The Mode of Action of the Herbicide Glyphosate." *Naturwissenschaften* 67 (7): 356–57. <https://doi.org/10.1007/BF01106593>.
- ✓ Amrhein, Nikolaus, Detlef Johanning, Joachim Schab, and Arno Schulz. 1983. "Biochemical Basis for Glyphosate-Tolerance in a Bacterium and a Plant Tissue Culture." *FEBS Letters* 157 (1): 191–96. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(83\)81143-0](https://doi.org/10.1016/0014-5793(83)81143-0).
- ✓ Ando, Akinori, Eiji Sakuradani, Kota Horinaka, Jun Ogawa, and Sakayu Shimizu. 2009. "Transformation of an Oleaginous Zygomycete Mortierella Alpina 1S-4 with the Carboxin Resistance Gene Conferred by Mutation of the Iron-Sulfur Subunit of Succinate Dehydrogenase." *Current Genetics* 55 (3): 349–56. <https://doi.org/10.1007/s00294-009-0250-1>.
- ✓ Aouida, Mustapha, Nicolas Pagé, Anick Leduc, Matthias Peter, and Dindial Ramotar. 2004. "A Genome-Wide Screen in Saccharomyces Cerevisiae Reveals Altered Transport as a Mechanism of Resistance to the Anticancer Drug Bleomycin." *Cancer Research* 64 (3): 1102–9.
- ✓ Arazoe, Takayuki, Tetsuya Younomaru, Shuichi Ohsato, Makoto Kimura, Tsutomu Arie, and Shigeru Kuwata. 2014. "Site-Specific DNA Double-Strand Break Generated by I-SceI Endonuclease Enhances Ectopic Homologous Recombination in Pyricularia Oryzae." *FEMS Microbiology Letters* 352 (2): 221–29. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12396>.
- ✓ Asano, T., N. Kurose, N. Hiraoka, and S. Kawakita. 1999. "Effect of NAD⁺-Dependent Isocitrate Dehydrogenase Gene (IDH1, IDH2) Disruption of Sake Yeast on Organic Acid Composition in Sake Mash." *Journal of Bioscience and Bioengineering* 88 (3): 258–63.
- ✓ Austin, B., R. M. Hall, and B. M. Tyler. 1990. "Optimized Vectors and Selection for Transformation of Neurospora Crassa and Aspergillus nidulans to Bleomycin and Phleomycin Resistance." *Gene* 93 (1): 157–62.
- ✓ Avalos, J., R. F. Geever, and M. E. Case. 1989. "Bialaphos Resistance as a Dominant Selectable Marker in Neurospora Crassa." *Current Genetics* 16 (5–6): 369–72.
- ✓ Aw, Rochelle, and Karen M. Polizzi. 2016. "Liquid PTVA: A Faster and Cheaper Alternative for Generating Multi-Copy Clones in Pichia Pastoris." *Microbial Cell Factories* 15 (February). <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0432-8>.
- ✓ Bañuelos, Oscar, Leopoldo Naranjo, Javier Casqueiro, Santiago Gutiérrez, and Juan F. Martín. 2003. "Co-Transformation with Autonomous Replicating and Integrative Plasmids in Penicillium Chrysogenum Is Highly Efficient and Leads in Some Cases to Rescue of the Intact Integrative Plasmid." *Fungal Genetics and Biology: FG & B* 40 (2): 83–92.
- ✓ Barbacid, M., M. Fresno, and D. Vazquez. 1975. "Inhibitors of Polypeptide Elongation on Yeast Polysomes." *The Journal of Antibiotics* 28 (6): 453–62.
- ✓ Baron, M., G. Tiraby, T. Calmels, M. Parriche, and H. Durand. 1992. "Efficient Secretion of Human Lysozyme Fused to the Sh Ble Phleomycin Resistance Protein by the Fungus Tolypocladium Geodes." *Journal of Biotechnology* 24 (3): 253–66.
- ✓ Bartholomew, K., G. Dos Santos, T. Dumonceaux, T. Charles, and F. Archibald. 2001. "Genetic Transformation of Trametes Versicolor to Phleomycin Resistance with the Dominant Selectable Marker Shble." *Applied Microbiology and Biotechnology* 56 (1–2): 201–4.

- ✓ Bartsch, Klaus, and Christoph C. Tebbe. 1989. "Initial Steps in the Degradation of Phosphinothricin (Glufosinate) by Soil Bacteria." *Applied and Environmental Microbiology* 55 (3): 711–16. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC184185/>.
- ✓ Beckerman, J., H. Chibana, J. Turner, and P. T. Magee. 2001. "Single-Copy IMH3 Allele Is Sufficient to Confer Resistance to Mycophenolic Acid in *Candida Albicans* and to Mediate Transformation of Clinical *Candida* Species." *Infection and Immunity* 69 (1): 108–14. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.1.108-114.2001>.
- ✓ Belenguer, P., M. L. Oustrin, G. Tiraby, and B. Ducommun. 1995. "Effects of Phleomycin-Induced DNA Damage on the Fission Yeast *Schizosaccharomyces Pombe* Cell Cycle." *Yeast (Chichester, England)* 11 (3): 225–31. <https://doi.org/10.1002/yea.320110305>.
- ✓ Benko, Zsigmond, and Richard Y. Zhao. 2011. "Zeocin for Selection of BleMX6 Resistance in Fission Yeast." *BioTechniques* 51 (1): 57–60. <https://doi.org/10.2144/000113706>.
- ✓ Bentley, R. 2000. "Mycophenolic Acid: A One Hundred Year Odyssey from Antibiotic to Immunosuppressant." *Chemical Reviews* 100 (10): 3801–26.
- ✓ Ben-Yaacov, R., S. Knoller, G. A. Caldwell, J. M. Becker, and Y. Koltin. 1994. "Candida Albicans Gene Encoding Resistance to Benomyl and Methotrexate Is a Multidrug Resistance Gene." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 38 (4): 648–52.
- ✓ Birch, P. R., P. F. Sims, and P. Broda. 1998. "A Reporter System for Analysis of Regulatable Promoter Functions in the Basidiomycete Fungus *Phanerochaete Chrysosporium*." *Journal of Applied Microbiology* 85 (3): 417–24.
- ✓ Bleyer, W. A. 1978. "The Clinical Pharmacology of Methotrexate: New Applications of an Old Drug." *Cancer* 41 (1): 36–51.
- ✓ Bode, R., C. Melo, and D. Birnbaum. 1984. "Mode of Action of Glyphosate in *Candida Maltosa*." *Archives of Microbiology* 140 (1): 83–85.
- ✓ Bode, R., F. Schauer, and D. Birnbaum. 1986. "Comparative Studies on the Enzymological Basis for Growth Inhibition by Glyphosate in Some Yeast Species." *Biochemie Und Physiologie Der Pflanzen* 181 (1): 39–46. [https://doi.org/10.1016/S0015-3796\(86\)80018-X](https://doi.org/10.1016/S0015-3796(86)80018-X).
- ✓ Bogo, M. R., M. H. Vainstein, F. J. Aragão, E. Rech, and A. Schrank. 1996. "High Frequency Gene Conversion among Benomyl Resistant Transformants in the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium Anisopliae*." *FEMS Microbiology Letters* 142 (1): 123–27.
- ✓ Bollen, G. J., and A. Fuchs. 1970. "On the Specificity of the in Vitro and in Vivo Antifungal Activity of Benomyl." *Netherlands Journal of Plant Pathology* 76 (6): 299–312. <https://doi.org/10.1007/BF03041361>.
- ✓ Boocock, Martin R., and John R. Coggins. 1983. "Kinetics of 5-Enolpyruvylshikimate-3-Phosphate Synthase Inhibition by Glyphosate." *FEBS Letters* 154 (1): 127–33. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(83\)80888-6](https://doi.org/10.1016/0014-5793(83)80888-6).
- ✓ Bowler, Judith, Eileen Scott, Ravi Tailor, Gabriel Scalliet, John Ray, and Michael Csukai. 2010. "New Capabilities for *Mycosphaerella Graminicola* Research." *Molecular Plant Pathology* 11 (5): 691–704. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2010.00629.x>.
- ✓ Broomfield, P. L., and J. A. Hargreaves. 1992. "A Single Amino-Acid Change in the Iron-Sulphur Protein Subunit of Succinate Dehydrogenase Confers Resistance to Carboxin in *Ustilago Maydis*." *Current Genetics* 22 (2): 117–21.
- ✓ Brown, J. S., A. Aufauvre-Brown, J. Brown, J. M. Jennings, H. Arst, and D. W. Holden. 2000. "Signature-Tagged and Directed Mutagenesis Identify PABA Synthetase as Essential for *Aspergillus Fumigatus* Pathogenicity." *Molecular Microbiology* 36 (6): 1371–80.
- ✓ Buhr, T. L., and M. B. Dickman. 1994. "Isolation, Characterization, and Expression of a Second Beta-Tubulin-Encoding Gene from *Colletotrichum Gloeosporioides* f. Sp. *Aeschynomene*." *Applied and Environmental Microbiology* 60 (11): 4155–59.
- ✓ Bunkers, G. J. 1991. "Expression of the *Escherichia Coli* Beta-Glucuronidase Gene in *Pseudocercospora Herpotrichoides*." *Applied and Environmental Microbiology* 57 (10): 2896–2900.
- ✓ Burger, Richard M. 1998. "Cleavage of Nucleic Acids by Bleomycin." *Chemical Reviews* 98 (3): 1153–70.
- ✓ Bush, K., J. S. Freudenberg, D. S. Slusarchyk, R. B. Sykes, and E. Meyers. 1982. "Activity of Sulfa Drugs and Dihydrofolate Reductase Inhibitors against *Candida Albicans*." *Experientia* 38 (4): 436–37.
- ✓ Calmels, T., M. Parriche, H. Durand, and G. Tiraby. 1991. "High Efficiency Transformation of *Tolypocladium Geodes* Conidiospores to Phleomycin Resistance." *Current Genetics* 20 (4): 309–14.
- ✓ Cantone, null, and null Vandenberg. 1999. "Genetic Transformation and Mutagenesis of the Entomopathogenic Fungus *Paecilomyces Fumosoroseus*." *Journal of Invertebrate Pathology* 74 (3): 281–88. <https://doi.org/10.1006/jipa.1999.4885>.
- ✓ Cao, Yueqing, Guoxiong Peng, Zhengbo He, Zhongkang Wang, Youping Yin, and Yuxian Xia. 2007. "Transformation of *Metarhizium Anisopliae* with Benomyl Resistance and Green Fluorescent Protein Genes Provides a Tag for Genetically Engineered Strains." *Biotechnology Letters* 29 (6): 907–11. <https://doi.org/10.1007/s10529-007-9332-7>.

- ✓ Cardoza, Rosa Elena, Juan Antonio Vizcaino, Maria Rosa Hermosa, Enrique Monte, and Santiago Gutiérrez. 2006. "A Comparison of the Phenotypic and Genetic Stability of Recombinant *Trichoderma* Spp. Generated by Protoplast- and *Agrobacterium*-Mediated Transformation." *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)* 44 (4): 383–95.
- ✓ Carter, Zorana, and Daniela Delneri. 2010. "New Generation of *LoxP*-Mutated Deletion Cassettes for the Genetic Manipulation of Yeast Natural Isolates." *Yeast (Chichester, England)* 27 (9): 765–75. <https://doi.org/10.1002/yea.1774>.
- ✓ Cary, Gregory A., Sung Hwan Yoon, Cecilia Garmendia Torres, Kathie Wang, Michelle Hays, Catherine Ludlow, David R. Goodlett, and Aimée M. Dudley. 2014. "Identification and Characterization of a Drug-Sensitive Strain Enables Puromycin-Based Translational Assays in *Saccharomyces Cerevisiae*." *Yeast (Chichester, England)* 31 (5): 167–78. <https://doi.org/10.1002/yea.3007>.
- ✓ Casey, Gregory P., Wei Xiao, and G. H. Rank. 1988. "A Convenient Dominant Selection Marker for Gene Transfer in Industrial Strains of *Saccharomyces* Yeast: Smri Encoded Resistance to the Herbicide Sulfometuron Methyl." *Journal of the Institute of Brewing* 94 (2): 93–97. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1988.tb04564.x>.
- ✓ Chaleff, R. S., and C. J. Mauvais. 1984. "Acetolactate Synthase Is the Site of Action of Two Sulfonylurea Herbicides in Higher Plants." *Science (New York, N.Y.)* 224 (4656): 1443–45. <https://doi.org/10.1126/science.224.4656.1443>.
- ✓ Challen, M. P., K. E. Gregory, S. Sreenivasaprasad, C. C. Rogers, S. B. Cutler, D. C. Diaper, T. J. Elliott, and G. D. Foster. 2000. "Transformation Technologies for Mushrooms." *Science and Cultivation of Edible Fungi. Proceedings of the 15th International Congress on the Science and Cultivation of Edible Fungi, Maastricht, Netherlands, 15-19 May, 2000.*, 165–72. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20001612878>.
- ✓ Chang, Perng-Kuang, Leslie L. Scharfenstein, Qijian Wei, and Deepak Bhatnagar. 2010. "Development and Refinement of a High-Efficiency Gene-Targeting System for *Aspergillus Flavus*." *Journal of Microbiological Methods* 81 (3): 240–46. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.03.010>.
- ✓ Chang, P.-K. 2008. "A Highly Efficient Gene-Targeting System for *Aspergillus Parasiticus*." *Letters in Applied Microbiology* 46 (5): 587–92. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02345.x>.
- ✓ Chaure, P., S. J. Gurr, and P. Spanu. 2000. "Stable Transformation of *Erysiphe Graminis* an Obligate Biotrophic Pathogen of Barley." *Nature Biotechnology* 18 (2): 205–7. <https://doi.org/10.1038/72666>.
- ✓ Chee, Mark K., and Steven B. Haase. 2012. "New and Redesigned PRS Plasmid Shuttle Vectors for Genetic Manipulation of *Saccharomyces cerevisiae*." *G3 (Bethesda, Md.)* 2 (5): 515–26. <https://doi.org/10.1534/g3.111.001917>.
- ✓ Cheevadhanarak, S., G. Saunders, D. V. Renno, T. W. Flegel, and G. Holt. 1991. "Transformation of *Aspergillus Oryzae* with a Dominant Selectable Marker." *Journal of Biotechnology* 19 (1): 117–22. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(91\)90079-B](https://doi.org/10.1016/0168-1656(91)90079-B).
- ✓ Chen, C. M., W. T. Cheng, Y. C. Chang, T. J. Chang, and H. L. Chen. 2000. "Growth Enhancement of Fowls by Dietary Administration of Recombinant Yeast Cultures Containing Enriched Growth Hormone." *Life Sciences* 67 (17): 2103–15.
- ✓ Chen, Hui-Qin, Miin-Huey Lee, and Kuang-Ren Chung. 2007. "Functional Characterization of Three Genes Encoding Putative Oxidoreductases Required for Cercosporin Toxin Biosynthesis in the Fungus *Cercospora Nicotianae*." *Microbiology (Reading, England)* 153 (Pt 8): 2781–90. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/007294-0>.
- ✓ Chen, Xianzhong, Huiying Fang, Zhiming Rao, Wei Shen, Bin Zhuge, Zhengxiang Wang, and Jian Zhuge. 2008. "An Efficient Genetic Transformation Method for Glycerol Producer *Candida Glycerinogenes*." *Microbiological Research* 163 (5): 531–37. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2008.05.003>.
- ✓ Chung, Kuang Ren, Turksen Shilts, Wei Li, and L. W. Timmer. 2002. "Engineering a Genetic Transformation System for *Colletotrichum Acutatum*, the Causal Fungus of Lime Anthracnose and Postbloom Fruit Drop of Citrus." *FEMS Microbiology Letters* 213 (1): 33–39.
- ✓ Churchill, A. C. L., L. M. Ciuffetti, D. R. Hansen, H. D. Van Etten, and N. K. Van Alfen. 1990. "Transformation of the Fungal Pathogen *Cryphonectria Parasitica* with a Variety of Heterologous Plasmids." *Current Genetics* 17 (1): 25–31. <https://doi.org/10.1007/BF00313245>.
- ✓ Cohen, J. D., E. Abrams, T. R. Eccleshall, B. Buchferer, and J. Marmur. 1983. "Expression of a Prokaryotic Gene in Yeast: Isolation and Characterization of Mutants with Increased Expression." *Molecular and General Genetics MGG* 191 (3): 451–59. <https://doi.org/10.1007/BF00425762>.
- ✓ Cohen, J. D., T. R. Eccleshall, R. B. Needleman, H. Federoff, B. A. Buchferer, and J. Marmur. 1980. "Functional Expression in Yeast of the *Escherichia Coli* Plasmid Gene Coding for Chloramphenicol Acetyltransferase." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77 (2): 1078–82.
- ✓ Collis, C. M., and R. M. Hall. 1985. "Identification of a *Tn5* Determinant Conferring Resistance to Phleomycins, Bleomycins, and Tallysomycins." *Plasmid* 14 (2): 143–51.
- ✓ Comai, L., L. C. Sen, and D. M. Stalker. 1983. "An Altered *AroA* Gene Product Confers Resistance to the Herbicide Glyphosate." *Science (New York, N.Y.)* 221 (4608): 370–71. <https://doi.org/10.1126/science.221.4608.370>.

- ✓ Cooley, R. N., R. F. M. van Gorcom, C. A. M. J. J. van den Hondel, and C. E. Caten. 1991. "Isolation of a Benomyl-Resistant Allele of the Beta-Tubulin Gene from *Septoria Nodorum* and Its Use as a Dominant Selectable Marker." *Journal of General Microbiology*. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201301745314>.
- ✓ Czymbek, Kirk J., Timothy M. Bourett, Ying Shao, Todd M. DeZwaan, James A. Sweigard, and Richard J. Howard. 2005. "Live-Cell Imaging of Tubulin in the Filamentous Fungus *Magnaporthe Grisea* Treated with Anti-Microtubule and Anti-Microfilament Agents." *Protoplasma* 225 (1–2): 23–32. <https://doi.org/10.1007/s00709-004-0081-3>.
- ✓ Davidse, L. C. 1986. "Benzimidazole Fungicides: Mechanism of Action and Biological Impact." *Annual Review of Phytopathology* 24 (1): 43–65. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.24.090186.000355>.
- ✓ Davidse, L. C., and W. Flach. 1977. "Differential Binding of Methyl Benzimidazol-2-Yl Carbamate to Fungal Tubulin as a Mechanism of Resistance to This Antimitotic Agent in Mutant Strains of *Aspergillus Nidulans*." *The Journal of Cell Biology* 72 (1): 174–93.
- ✓ Defosse, Tatiana A., Yohann Le Govic, Patrick Vandeputte, Vincent Courdavault, Marc Clastre, Jean-Philippe Bouchara, Anuradha Chowdhary, Nathalie Giglioli-Guivarc'h, and Nicolas Papon. 2018. "A Synthetic Construct for Genetic Engineering of the Emerging Engineering Yeast *Candida Auris*." *Plasmid* 95 (January): 7–10. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2017.11.001>.
- ✓ Defosse, Tatiana A., Céline Mélin, Marc Clastre, Sébastien Besseau, Arnaud Lanoue, Gaëlle Glévarec, Audrey Oudin, et al. 2016. "An Additional *Meyerozyma Guilliermondii* IMH3 Gene Confers Mycophenolic Acid Resistance in Fungal CTG Clade Species." *FEMS Yeast Research* 16 (6). <https://doi.org/10.1093/femsyr/fow078>.
- ✓ Desmoucelles, Christine, Benoit Pinson, Christelle Saint-Marc, and Bertrand Daignan-Fornier. 2002. "Screening the Yeast 'Disruptome' for Mutants Affecting Resistance to the Immunosuppressive Drug, Mycophenolic Acid." *The Journal of Biological Chemistry* 277 (30): 27036–44. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111433200>.
- ✓ Dexter, D., W. S. Moye-Rowley, A. L. Wu, and J. Golin. 1994. "Mutations in the Yeast PDR3, PDR4, PDR7 and PDR9 Pleiotropic (Multiple) Drug Resistance Loci Affect the Transcript Level of an ATP Binding Cassette Transporter Encoding Gene, PDR5." *Genetics* 136 (2): 505–15.
- ✓ Dickman, Martin B. 1988. "Whole Cell Transformation of the Alfalfa Fungal Pathogen *Colletotrichum Trifolii*." *Current Genetics* 14 (3): 241–46. <https://doi.org/10.1007/BF00376744>.
- ✓ Dijk, R. van, K. N. Faber, A. T. Hammond, B. S. Glick, M. Veenhuis, and J. A. Kiel. 2001. "Tagging *Hansenula Polymorpha* Genes by Random Integration of Linear DNA Fragments (RALF)." *Molecular Genetics and Genomics: MGG* 266 (4): 646–56. <https://doi.org/10.1007/s004380100584>.
- ✓ Djulic, Alma, Annette Schmid, Heike Lenz, Pia Sharma, Christin Koch, Stefan G. R. Wirsal, and Ralf T. Voegelé. 2011. "Transient Transformation of the Obligate Biotrophic Rust Fungus *Uromyces Fabae* Using Biolistics." *Fungal Biology* 115 (7): 633–42. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2011.03.007>.
- ✓ Dmytruk, Kostyantyn V., Andriy Y. Voronovsky, and Andriy A. Sibirny. 2006. "Insertion Mutagenesis of the Yeast *Candida Famata* (*Debaryomyces Hansenii*) by Random Integration of Linear DNA Fragments." *Current Genetics* 50 (3): 183–91. <https://doi.org/10.1007/s00294-006-0083-0>.
- ✓ Dmytruk, Kostyantyn V., Valentyna Y. Yatsyshyn, Natalia O. Sybirna, Daria V. Fedorovych, and Andriy A. Sibirny. 2011. "Metabolic Engineering and Classic Selection of the Yeast *Candida Famata* (*Candida Flareri*) for Construction of Strains with Enhanced Riboflavin Production." *Metabolic Engineering* 13 (1): 82–88. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2010.10.005>.
- ✓ Drocourt, D., T. Calmels, J. P. Reynes, M. Baron, and G. Tiraby. 1990. "Cassettes of the *Streptoalloteichus Hindustanus* *Ble* Gene for Transformation of Lower and Higher Eukaryotes to Phleomycin Resistance." *Nucleic Acids Research* 18 (13): 4009.
- ✓ Droge-Laser, W., U. Siemeling, A. Puhler, and I. Broer. 1994. "The Metabolites of the Herbicide L-Phosphinothricin (Glufosinate) (Identification, Stability, and Mobility in Transgenic, Herbicide-Resistant, and Untransformed Plants)." *Plant Physiology* 105 (1): 159–66. <https://doi.org/10.1104/pp.105.1.159>.
- ✓ Duarte, R. T. D., C. C. Staats, M. H. P. Fungaro, A. Schrank, M. H. Vainsten, L. Furlaneto-Maia, C. V. Nakamura, W. de Souza, and M. C. Furlaneto. 2007. "Development of a Simple and Rapid *Agrobacterium Tumefaciens*-Mediated Transformation System for the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium Anisopliae* Var. *Acridum*." *Letters in Applied Microbiology* 44 (3): 248–54. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.02092.x>.
- ✓ Duncan, K., and J. R. Coggins. 1986. "The SerC-Aro A Operon of *Escherichia Coli*. A Mixed Function Operon Encoding Enzymes from Two Different Amino Acid Biosynthetic Pathways." *The Biochemical Journal* 234 (1): 49–57.
- ✓ Duncan, K., A. Lewendon, and J. R. Coggins. 1984. "The Purification of 5-Enolpyruvylshikimate 3-Phosphate Synthase from an Overproducing Strain of *Escherichia Coli*." *FEBS Letters* 165 (1): 121–27.
- ✓ Duncan, Kenneth, and John R. Coggins. 1984. "Subcloning of the *Escherichia Coli* Genes *AroA* (5-Enolpyruvylshikimate 3-Phosphate Synthase) and *AroB* (3-Dehydroquinase Synthase)." *Biochemical Society Transactions* 12 (2): 274–75. <https://doi.org/10.1042/bst0120274>.
- ✓ Duncan, Kenneth, R. Mark Edwards, and John R. Coggins. 1988. "The *Saccharomyces Cerevisiae* *ARO1* Gene An Example of the Co-Ordinate Regulation of Five Enzymes on a Single Biosynthetic Pathway." *FEBS Letters* 241 (1): 83–88. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(88\)81036-6](https://doi.org/10.1016/0014-5793(88)81036-6).

- ✓ Duncan, Kenneth, Ann Lewendon, and John R. Coggins. 1984. "The Complete Amino Acid Sequence of Escherichia Coli 5-Enolpyruvylshikimate 3-Phosphate Synthase." *FEBS Letters* 170 (1): 59–63. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(84\)81368-X](https://doi.org/10.1016/0014-5793(84)81368-X).
- ✓ Dunne, P. W., and B. R. Oakley. 1988. "Mitotic Gene Conversion, Reciprocal Recombination and Gene Replacement at the BenA, Beta-Tubulin, Locus of Aspergillus Nidulans." *Molecular & General Genetics: MGG* 213 (2–3): 339–45.
- ✓ Durand, Nathalie, Pascale Reymond, and Michel Fèvre. 1991. "Transformation of Penicillium Roqueforti to Phleomycin- and to Hygromycin B-Resistance." *Current Genetics* 19 (2): 149–53. <https://doi.org/10.1007/BF00326296>.
- ✓ Durand-Poussereau, N., and M. Fevre. 1996. "Characterization of a Protease Deficient Strain of Penicillium Roqueforti Generated by Heterologous Plasmid Integration: Potential Use for Protein Production." *Journal of Biotechnology* 51 (1): 97–105.
- ✓ Edgington, L. V., G. S. Walton, and P. M. Miller. 1966. "Fungicide Selective for Basidiomycetes." *Science (New York, N.Y.)* 153 (3733): 307–8. <https://doi.org/10.1126/science.153.3733.307>.
- ✓ Elslahi, Randa H., Awad G. Osman, Ashraf M. Sherif, and Adil A. Elhussein. 2014. "Comparative Study of the Fungicide Benomyl Toxicity on Some Plant Growth Promoting Bacteria and Some Fungi in Pure Cultures." *Interdisciplinary Toxicology* 7 (1): 12–16. <https://doi.org/10.2478/intox-2014-0002>.
- ✓ Endo, M., K. Takesako, I. Kato, and H. Yamaguchi. 1997. "Fungicidal Action of Aureobasidin A, a Cyclic Depsipeptide Antifungal Antibiotic, against Saccharomyces Cerevisiae." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41 (3): 672–76.
- ✓ Endo, T., K. Kobayashi, N. Nakayama, T. Tanaka, T. Kamakura, and I. Yamaguchi. 1988. "Inactivation of Blastidicin S by Bacillus Cereus. II. Isolation and Characterization of a Plasmid, PBSR8, from Bacillus Cereus." *The Journal of Antibiotics* 41 (2): 271–73.
- ✓ Engel, Günter, Karl Ernst von Milczewski, Dieter Prokopek, and Michael Teuber. 1982. "Strain-Specific Synthesis of Mycophenolic Acid by Penicillium Roqueforti in Blue-Veined Cheese." *Applied and Environmental Microbiology* 43 (5): 1034–40. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC244182/>.
- ✓ Engelenburg, Frank van, Ralf Smit, Theo Goosen, Henk van den Broek, and Paul Tudzynski. 1989. "Transformation of Claviceps Purpurea Using a Bleomycin Resistance Gene." *Applied Microbiology and Biotechnology* 30 (4): 364–70. <https://doi.org/10.1007/BF00296625>.
- ✓ Erler, Axel, Marcello Maresca, Jun Fu, and A. Francis Stewart. 2006. "Recombineering Reagents for Improved Inducible Expression and Selection Marker Re-Use in Schizosaccharomyces Pombe." *Yeast (Chichester, England)* 23 (11): 813–23. <https://doi.org/10.1002/yea.1396>.
- ✓ Erwin, D C. 1973. "Systemic Fungicides: Disease Control, Translocation, and Mode of Action." *Annual Review of Phytopathology* 11 (1): 389–422. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.11.090173.002133>.
- ✓ Falco, S. C., and K. S. Dumas. 1985. "Genetic Analysis of Mutants of Saccharomyces Cerevisiae Resistant to the Herbicide Sulfometuron Methyl." *Genetics* 109 (1): 21–35.
- ✓ Falco, S. C., K. S. Dumas, and K. J. Livak. 1985. "Nucleotide Sequence of the Yeast ILV2 Gene Which Encodes Acetolactate Synthase." *Nucleic Acids Research* 13 (11): 4011–27.
- ✓ Fan, Yanhua, Shizhu Zhang, Nathan Kruer, and Nemat O. Keyhani. 2011. "High-Throughput Insertion Mutagenesis and Functional Screening in the Entomopathogenic Fungus Beauveria Bassiana." *Journal of Invertebrate Pathology* 106 (2): 274–79. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2010.11.003>.
- ✓ Fang, Weiguo, Yan Pei, and Michael J. Bidochka. 2006. "Transformation of Metarhizium Anisopliae Mediated by Agrobacterium Tumefaciens." *Canadian Journal of Microbiology* 52 (7): 623–26. <https://doi.org/10.1139/w06-014>.
- ✓ Fang, Weiguo, Yongjun Zhang, Xingyong Yang, Xuelian Zheng, Hui Duan, Yi Li, and Yan Pei. 2004. "Agrobacterium Tumefaciens-Mediated Transformation of Beauveria Bassiana Using an Herbicide Resistance Gene as a Selection Marker." *Journal of Invertebrate Pathology* 85 (1): 18–24. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2003.12.003>.
- ✓ Fernández-Larrea, Juan, and Ulf Stahl. 1989. "Transformation of Podospora Anserina with a Dominant Resistance Gene." *Current Genetics* 16 (1): 57–60. <https://doi.org/10.1007/BF00411085>.
- ✓ Figueiredo, J. G., E. H. Goulin, F. Tanaka, D. Stringari, V. Kava-Cordeiro, L. V. Galli-Terasawa, C. C. Staats, A. Schrank, and C. Glienke. 2010. "Agrobacterium Tumefaciens-Mediated Transformation of Guignardia Citricarpa." *Journal of Microbiological Methods* 80 (2): 143–47. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2009.11.014>.
- ✓ Fling, M. E., J. Kopf, A. Tamarkin, J. A. Gorman, H. A. Smith, and Y. Koltin. 1991. "Analysis of a Candida Albicans Gene That Encodes a Novel Mechanism for Resistance to Benomyl and Methotrexate." *Molecular & General Genetics: MGG* 227 (2): 318–29.
- ✓ Foureau, Emilien, Vincent Courdavault, Andrew J. Simkin, Andriy A. Sibirny, Joël Crèche, Nathalie Giglioli-Guivarc'h, Marc Clastre, and Nicolas Papon. 2013. "Transformation of Candida Guilliermondii Wild-Type Strains Using the Staphylococcus Aureus MRSA 252 Ble Gene as a Phleomycin-Resistant Marker." *FEMS Yeast Research* 13 (3): 354–58. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12034>.

- ✓ Frandsen, Rasmus John Normand. 2011. « A Guide to Binary Vectors and Strategies for Targeted Genome Modification in Fungi Using Agrobacterium Tumefaciens-Mediated Transformation ». *Journal of Microbiological Methods* 87 (3): 247-62. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.09.004>.
- ✓ Frazer, LilyAnn Novak, and Raymond T. O’Keefe. 2007. “A New Series of Yeast Shuttle Vectors for the Recovery and Identification of Multiple Plasmids from *Saccharomyces Cerevisiae*.” *Yeast (Chichester, England)* 24 (9): 777–89. <https://doi.org/10.1002/yea.1509>.
- ✓ Fukunaga, Kazuo, Tomomasa Misato, Itaru Ishii, and Masaru Asakawa. 1955. “Blasticidin, A New Anti-Phytopathogenic Fungal Substance. Part I.” *Bulletin of the Agricultural Chemical Society of Japan* 19 (3): 181–88. <https://doi.org/10.1080/03758397.1955.10857286>.
- ✓ Gácsér, Attila, Siegfried Salomon, and Wilhelm Schäfer. 2005. “Direct Transformation of a Clinical Isolate of *Candida Parapsilosis* Using a Dominant Selection Marker.” *FEMS Microbiology Letters* 245 (1): 117–21. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.02.035>.
- ✓ Gaillardin, Claude, and Anne-Marie Ribet. 1987. “LEU2 Directed Expression of β -Galactosidase Activity and Phleomycin Resistance in *Yarrowia Lipolytica*.” *Current Genetics* 11 (5): 369–75. <https://doi.org/10.1007/BF00378179>.
- ✓ Gao, Xiaona, Bin Zhuge, Huiying Fang, and Jian Zhuge. 2012. “The Construction of a New Integrative Vector with a New Selective Marker of Copper Resistance for Glycerol Producer *Candida Glycerinogenes*.” *Current Microbiology* 64 (4): 357–64. <https://doi.org/10.1007/s00284-011-0075-2>.
- ✓ Gatignol, A., M. Baron, and G. Tiraby. 1987. “Phleomycin Resistance Encoded by the *Ble* Gene from Transposon Tn 5 as a Dominant Selectable Marker in *Saccharomyces Cerevisiae*.” *Molecular & General Genetics: MGG* 207 (2–3): 342–48.
- ✓ Genilloud, O., M. C. Garrido, and F. Moreno. 1984. “The Transposon Tn5 Carries a Bleomycin-Resistance Determinant.” *Gene* 32 (1–2): 225–33.
- ✓ Georgopoulos, S. G., M. Chrysayi, and G. A. White. 1975. “Carboxin Resistance in the Haploid, the Heterozygous Diploid, and the Plant-Parasitic Dicaroytic Phase of *Ustilago Maydis*.” *Pesticide Biochemistry and Physiology* 5 (6): 543–51. [https://doi.org/10.1016/0048-3575\(75\)90029-2](https://doi.org/10.1016/0048-3575(75)90029-2).
- ✓ Gessner, M., and U. Raeder. 1994. “A Histone H4 Promoter for Expression of a Phleomycin-Resistance Gene in *Phanerochaete Chrysosporium*.” *Gene* 142 (2): 237–41.
- ✓ Ghannoum, M. A., and A. Al-Khars. 1984. “Effect of Antineoplastic Agents on the Growth and Ultrastructure of *Candida Albicans*.” *Mycoses* 27 (9): 452–64. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.1984.tb02060.x>.
- ✓ Gil, C., R. Pomés, and C. Nombela. 1988. “A Complementation Analysis by Parasexual Recombination of *Candida Albicans* Morphological Mutants.” *Journal of General Microbiology* 134 (6): 1587–95. <https://doi.org/10.1099/00221287-134-6-1587>.
- ✓ Glumoff, V., O. Käppeli, A. Fiechter, and J. Reiser. 1989. “Genetic Transformation of the Filamentous Yeast, *Trichosporon Cutaneum*, Using Dominant Selection Markers.” *Gene* 84 (2): 311–18.
- ✓ Goettel, Mark S., Raymond J. S. Leger, Srirama Bhairi, M. Katherine Jung, Berl R. Oakley, Donald W. Roberts, and Richard C. Staples. 1990. “Pathogenicity and Growth of *Metarhizium Anisopliae* Stably Transformed to Benomyl Resistance.” *Current Genetics* 17 (2): 129–32. <https://doi.org/10.1007/BF00312857>.
- ✓ Gold, S. E., G. Bakkeren, J. E. Davies, and J. W. Kronstad. 1994. “Three Selectable Markers for Transformation of *Ustilago Maydis*.” *Gene* 142 (2): 225–30.
- ✓ Gold, S. E., W. L. Casale, and N. T. Keen. 1991. “Characterization of Two Beta-Tubulin Genes from *Geotrichum Candidum*.” *Molecular & General Genetics: MGG* 230 (1–2): 104–12.
- ✓ Goldstein, A. L., and J. H. McCusker. 1999. “Three New Dominant Drug Resistance Cassettes for Gene Disruption in *Saccharomyces Cerevisiae*.” *Yeast (Chichester, England)* 15 (14): 1541–53. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(199910\)15:14<1541::AID-YEA476>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(199910)15:14<1541::AID-YEA476>3.0.CO;2-K).
- ✓ Goldway, M., D. Teff, R. Schmidt, A. B. Oppenheim, and Y. Koltin. 1995. “Multidrug Resistance in *Candida Albicans*: Disruption of the *BENr* Gene.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39 (2): 422–26.
- ✓ Grigg, G. W., R. M. Hall, N. K. Hart, D. R. Kavulak, J. A. Lamberton, and A. Lane. 1985. “Amplification of the Antibiotic Effects of the Bleomycins, Phleomycins and Tallysomycins: Its Dependence on the Nature of the Variable Basic Groups.” *The Journal of Antibiotics* 38 (1): 99–110.
- ✓ Gueldener, U., J. Heinisch, G. J. Koehler, D. Voss, and J. H. Hegemann. 2002. “A Second Set of *LoxP* Marker Cassettes for Cre-Mediated Multiple Gene Knockouts in Budding Yeast.” *Nucleic Acids Research* 30 (6): e23.
- ✓ Gunatilleke, I. A., H. N. Arst, and C. Scazzocchio. 1975. “Three Genes Determine the Carboxin Sensitivity of Mitochondrial Succinate Oxidation in *Aspergillus Nidulans*.” *Genetical Research* 26 (3): 297–305.
- ✓ Guo, Min, Xiaolei Zhu, Hongxia Li, Leyong Tan, and Yuemin Pan. 2016. “Development of a Novel Strategy for Fungal Transformation Based on a Mutant Locus Conferring Carboxin-Resistance in *Magnaporthe Oryzae*.” *AMB Express* 6 (1): 57. <https://doi.org/10.1186/s13568-016-0232-x>.

- ✓ Haan, Gert Jan, Ralf van Dijk, Jan A. K. W. Kiel, and Marten Veenhuis. 2002. "Characterization of the *Hansenula Polymorpha* PUR7 Gene and Its Use as Selectable Marker for Targeted Chromosomal Integration." *FEMS Yeast Research* 2 (1): 17–24.
- ✓ Hadfield, C., A. M. Cashmore, and P. A. Meacock. 1986. "An Efficient Chloramphenicol-Resistance Marker for *Saccharomyces Cerevisiae* and *Escherichia Coli*." *Gene* 45 (2): 149–58.
- ✓ ———. 1987. "Sequence and Expression Characteristics of a Shuttle Chloramphenicol-Resistance Marker for *Saccharomyces Cerevisiae* and *Escherichia Coli*." *Gene* 52 (1): 59–70.
- ✓ Hamann, Andrea, Kristin Krause, Alexandra Werner, and Heinz D. Osiewacz. 2005. "A Two-Step Protocol for Efficient Deletion of Genes in the Filamentous Ascomycete *Podospira Anserina*." *Current Genetics* 48 (4): 270–75. <https://doi.org/10.1007/s00294-005-0018-1>.
- ✓ Han, Guomin, Qian Shao, Cuiping Li, Kai Zhao, Li Jiang, Jun Fan, Haiyang Jiang, and Fang Tao. 2018. "An Efficient Agrobacterium-Mediated Transformation Method for Aflatoxin Generation Fungus *Aspergillus Flavus*." *Journal of Microbiology* 56 (5): 356–64. <https://doi.org/10.1007/s12275-018-7349-3>.
- ✓ Hansen, Bjarne G., Xin E. Sun, Hans J. Genee, Christian S. Kaas, Jakob B. Nielsen, Uffe H. Mortensen, Jens C. Frisvad, and Lizbeth Hedstrom. 2012. "Adaptive Evolution of Drug Targets in Producer and Non-Producer Organisms." *The Biochemical Journal* 441 (1): 219–26. <https://doi.org/10.1042/BJ20111278>.
- ✓ Hansen, Jørgen, Troels Felding, Pia Francke Johannesen, Jure Piskur, Christina Lund Christensen, and Kjeld Olesen. 2003. "Further Development of the Cassette-Based PYC Plasmid System by Incorporation of the Dominant *Hph*, *Nat* and *AUR1-C* Gene Markers and the *LacZ* Reporter System." *FEMS Yeast Research* 4 (3): 323–27.
- ✓ Hartl, Lukas, and Bernhard Seiboth. 2005. "Sequential Gene Deletions in *Hypocrea Jecorina* Using a Single Blaster Cassette." *Current Genetics* 48 (3): 204–11. <https://doi.org/10.1007/s00294-005-0011-8>.
- ✓ Hartmann, Thomas, Michaela Dümig, Basem M. Jaber, Edyta Szewczyk, Patrick Olbermann, Joachim Morschhäuser, and Sven Krappmann. 2010. "Validation of a Self-Excising Marker in the Human Pathogen *Aspergillus Fumigatus* by Employing the Beta-Rec/Six Site-Specific Recombination System." *Applied and Environmental Microbiology* 76 (18): 6313–17. <https://doi.org/10.1128/AEM.00882-10>.
- ✓ Hashida-Okado, T., A. Ogawa, M. Endo, R. Yasumoto, K. Takesako, and I. Kato. 1996. "AUR1, a Novel Gene Conferring Aureobasidin Resistance on *Saccharomyces Cerevisiae*: A Study of Defective Morphologies in *Aur1p*-Depleted Cells." *Molecular & General Genetics: MGG* 251 (2): 236–44.
- ✓ Hashida-Okado, T., A. Ogawa, I. Kato, and K. Takesako. 1998. "Transformation System for Prototrophic Industrial Yeasts Using the AUR1 Gene as a Dominant Selection Marker." *FEBS Letters* 425 (1): 117–22.
- ✓ Hashida-Okado, T., R. Yasumoto, M. Endo, K. Takesako, and I. Kato. 1998. "Isolation and Characterization of the Aureobasidin A-Resistant Gene, *Aur1R*, on *Schizosaccharomyces Pombe*: Roles of *Aur1p+* in Cell Morphogenesis." *Current Genetics* 33 (1): 38–45.
- ✓ Hatefi, Y. 1985. "The Mitochondrial Electron Transport and Oxidative Phosphorylation System." *Annual Review of Biochemistry* 54: 1015–69. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.54.070185.005055>.
- ✓ Hauptmann, R. M., J. M. Widholm, and J. D. Paxton. 1985. "Benomyl: A Broad Spectrum Fungicide for Use in Plant Cell and Protoplast Culture." *Plant Cell Reports* 4 (3): 129–32. <https://doi.org/10.1007/BF00571298>.
- ✓ He, C., A. G. Rusu, A. M. Poplawski, J. A. Irwin, and J. M. Manners. 1998. "Transfer of a Supernumerary Chromosome between Vegetatively Incompatible Biotypes of the Fungus *Colletotrichum Gloeosporioides*." *Genetics* 150 (4): 1459–66.
- ✓ He, Zhu-Mei, Michael S. Price, Gregory R. Obrian, D. Ryan Georgianna, and Gary A. Payne. 2007. "Improved Protocols for Functional Analysis in the Pathogenic Fungus *Aspergillus Flavus*." *BMC Microbiology* 7 (November): 104. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-7-104>.
- ✓ Heidler, S. A., and J. A. Radding. 1995. "The AUR1 Gene in *Saccharomyces Cerevisiae* Encodes Dominant Resistance to the Antifungal Agent Aureobasidin A (LY295337)." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39 (12): 2765–69.
- ✓ Hentges, Pierre, Benoit Van Driessche, Lionel Tafforeau, Jean Vandenhoute, and Antony M. Carr. 2005. "Three Novel Antibiotic Marker Cassettes for Gene Disruption and Marker Switching in *Schizosaccharomyces Pombe*." *Yeast (Chichester, England)* 22 (13): 1013–19. <https://doi.org/10.1002/yea.1291>.
- ✓ Higgins, D. R., K. Busser, J. Comiskey, P. S. Whittier, T. J. Purcell, and J. P. Hoeffler. 1998. "Small Vectors for Expression Based on Dominant Drug Resistance with Direct Multicopy Selection." *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 103: 41–53. <https://doi.org/10.1385/0-89603-421-6:41>.
- ✓ Honda, Y., T. Matsuyama, T. Irie, T. Watanabe, and M. Kuwahara. 2000. "Carboxin Resistance Transformation of the Homobasidiomycete Fungus *Pleurotus Ostreatus*." *Current Genetics* 37 (3): 209–12.
- ✓ Hua, J., J. D. Meyer, and J. K. Lodge. 2000. "Development of Positive Selectable Markers for the Fungal Pathogen *Cryptococcus Neoformans*." *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 7 (1): 125–28.
- ✓ Huang, K. X., N. Iwakami, I. Fujii, Y. Ebizuka, and U. Sankawa. 1995. "Transformations of *Penicillium Islandicum* and *Penicillium Frequentans* That Produce Anthraquinone-Related Compounds." *Current Genetics* 28 (6): 580–84.

- ✓ Ikai, K., K. Takesako, K. Shiomi, M. Moriguchi, Y. Umeda, J. Yamamoto, I. Kato, and H. Naganawa. 1991. "Structure of Aureobasidin A." *The Journal of Antibiotics* 44 (9): 925–33.
- ✓ Inglis, P. W., F. J. Aragão, H. Frazão, B. P. Magalhães, and M. C. Valadares-Inglis. 2000. "Biolytic Co-Transformation of *Metarhizium Anisopliae* Var. *Acridum* Strain CG423 with Green Fluorescent Protein and Resistance to Glufosinate Ammonium." *FEMS Microbiology Letters* 191 (2): 249–54.
- ✓ Inglis, Peter W., Paulo R. Queiroz, and M. Cléria Valadares-Inglis. 1999. "Transformation with Green Fluorescent Protein of *Trichoderma Harzianum* 1051, a Strain with Biocontrol Activity against *Crinipellis Perniciosa*, the Agent of Witches'-Broom Disease of Cocoa." *The Journal of General and Applied Microbiology* 45 (2): 63–67.
- ✓ Irie, T., Y. Honda, T. Matsuyama, T. Watanabe, and M. Kuwahara. 1998. "Cloning and Characterization of the Gene Encoding the Iron-Sulfur Protein of Succinate Dehydrogenase from *Pleurotus Ostreatus*." *Biochimica Et Biophysica Acta* 1396 (1): 27–31.
- ✓ Irie, T., Y. Honda, T. Watanabe, and M. Kuwahara. 2001a. "Efficient Transformation of Filamentous Fungus *Pleurotus Ostreatus* Using Single-Strand Carrier DNA." *Applied Microbiology and Biotechnology* 55 (5): 563–65.
- ✓ ———. 2001b. "Homologous Expression of Recombinant Manganese Peroxidase Genes in Ligninolytic Fungus *Pleurotus Ostreatus*." *Applied Microbiology and Biotechnology* 55 (5): 566–70.
- ✓ Irie, Toshikazu, Toshitsugu Sato, Kumiko Saito, Yoichi Honda, Takashi Watanabe, Masaaki Kuwahara, and Hitoshi Enei. 2003. "Construction of a Homologous Selectable Marker Gene for *Lentinula Edodes* Transformation." *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 67 (9): 2006–9.
- ✓ Ishiguro, J., and M. Miyazaki. 1985. "Characterization of Blastocidin S-Resistant Mutants of *Saccharomyces Cerevisiae*." *Current Genetics* 9 (2): 179–81.
- ✓ Ishii, Hideo. 2001. "DNA-Based Approaches for Diagnosis of Fungicide Resistance." In *Agrochemical Resistance*, 808:242–59. ACS Symposium Series 808. American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/bk-2002-0808.ch016>.
- ✓ Ito, Y., H. Muraguchi, Y. Seshime, S. Oita, and S. O. Yanagi. 2004. "Flutolanil and Carboxin Resistance in *Coprinus Cinereus* Conferred by a Mutation in the Cytochrome B560 Subunit of Succinate Dehydrogenase Complex (Complex II)." *Molecular Genetics and Genomics: MGG* 272 (3): 328–35. <https://doi.org/10.1007/s00438-004-1060-2>.
- ✓ Iwashima, Akio, Yasuo Wakabayashi, and Yoshitsugu Nose. 1975. "Thiamine Transport Mutants of *Saccharomyces Cerevisiae*." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 413 (2): 243–47. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(75\)90108-X](https://doi.org/10.1016/0005-2736(75)90108-X).
- ✓ Izumi, M., H. Miyazawa, T. Kamakura, I. Yamaguchi, T. Endo, and F. Hanaoka. 1991. "Blasticidin S-Resistance Gene (Bsr): A Novel Selectable Marker for Mammalian Cells." *Experimental Cell Research* 197 (2): 229–33.
- ✓ Javadekar, V. S., H. SivaRaman, and D. V. Gokhale. 1995. "Industrial Yeast Strain Improvement: Construction of a Highly Flocculent Yeast with a Killer Character by Protoplast Fusion." *Journal of Industrial Microbiology* 15 (2): 94–102.
- ✓ Jaworski, Ernest G. 1972. "Mode of Action of N-Phosphonomethylglycine. Inhibition of Aromatic Amino Acid Biosynthesis." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 20 (6): 1195–98. <https://doi.org/10.1021/jf60184a057>.
- ✓ Jiang, Dewei, Wei Zhu, Yunchuan Wang, Chang Sun, Ke-Qin Zhang, et Jinkui Yang. 2013. « Molecular Tools for Functional Genomics in Filamentous Fungi: Recent Advances and New Strategies ». *Biotechnology Advances* 31 (8): 1562-74. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.08.005>.
- ✓ Jiang, Qiong, Sheng-Hua Ying, and Ming-Guang Feng. 2007. "Enhanced Frequency of *Beauveria Bassiana* Blastospore Transformation by Restriction Enzyme-Mediated Integration and Electroporation." *Journal of Microbiological Methods* 69 (3): 512–17. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.03.005>.
- ✓ Jin, Kai, Yongjun Zhang, Zhibing Luo, Yuehua Xiao, Yanhua Fan, Di Wu, and Yan Pei. 2008. "An Improved Method for *Beauveria Bassiana* Transformation Using Phosphinothricin Acetyltransferase and Green Fluorescent Protein Fusion Gene as a Selectable and Visible Marker." *Biotechnology Letters* 30 (8): 1379–83. <https://doi.org/10.1007/s10529-008-9713-6>.
- ✓ Johansson, Björn, and Bärbel Hahn-Hägerdal. 2002. "Overproduction of Pentose Phosphate Pathway Enzymes Using a New CRE-LoxP Expression Vector for Repeated Genomic Integration in *Saccharomyces Cerevisiae*." *Yeast (Chichester, England)* 19 (3): 225–31. <https://doi.org/10.1002/yea.833>.
- ✓ ———. 2004. "Multiple Gene Expression by Chromosomal Integration and CRE-LoxP-Mediated Marker Recycling in *Saccharomyces Cerevisiae*." *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 267: 287–96. <https://doi.org/10.1385/1-59259-774-2:287>.
- ✓ Jung, M. K., I. B. Wilder, and B. R. Oakley. 1992. "Amino Acid Alterations in the BenA (Beta-Tubulin) Gene of *Aspergillus Nidulans* That Confer Benomyl Resistance." *Cell Motility and the Cytoskeleton* 22 (3): 170–74. <https://doi.org/10.1002/cm.970220304>.
- ✓ Kamakura, Takashi, Kaori Kobayashi, Teruo Tanaka, Isamu Yamaguchi, and Toyoshige Endo. 1987. "Cloning and Expression of a New Structural Gene for Blastocidin S Deaminase, a Nucleoside Aminohydrolase." *Agricultural and Biological Chemistry* 51 (11): 3165–68. <https://doi.org/10.1271/abb1961.51.3165>.

- ✓ Kanamasa, Shin, Kana Yamaoka, Takashi Kawaguchi, Jun-ichi Sumitani, and Motoo Arai. 2003. "Transformation of *Aspergillus Aculeatus* Using the Drug Resistance Gene of *Aspergillus Oryzae* and the PyrG Gene of *Aspergillus Nidulans*." *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 67 (12): 2661–63. <https://doi.org/10.1271/bbb.67.2661>.
- ✓ Kang, Na-Young, Jeong-Nam Park, Jong-Eon Chin, Hwanghee Blaise Lee, Suh-Young Im, and Suk Bai. 2003. "Construction of an Amyolytic Industrial Strain of *Saccharomyces Cerevisiae* Containing the *Schwanniomyces Occidentalis* Alpha-Amylase Gene." *Biotechnology Letters* 25 (21): 1847–51.
- ✓ Kano, Sanae, Kotaro Akagi, Satoko Kanematsu, and Tsutomu Morinaga. 2012. "Cloning and Characterization of the Gene for the Iron-Sulfur Subunit of Succinate Dehydrogenase from the Violet Root Rot Fungus, *Helicobasidium Mompa*." *Journal of Basic Microbiology* 52 (2): 132–40. <https://doi.org/10.1002/jobm.201100014>.
- ✓ Keon, J. P., P. L. Broomfield, G. A. White, and J. A. Hargreaves. 1994. "A Mutant Form of the Succinate Dehydrogenase Iron-Sulphur Protein Subunit Confers Resistance to Carboxin in the Maize Smut Pathogen *Ustilago Maydis*." *Biochemical Society Transactions* 22 (1): 234–37.
- ✓ Keon, J. P., G. A. White, and J. A. Hargreaves. 1991. "Isolation, Characterization and Sequence of a Gene Conferring Resistance to the Systemic Fungicide Carboxin from the Maize Smut Pathogen, *Ustilago Maydis*." *Current Genetics* 19 (6): 475–81.
- ✓ Kilaru, S., M. Schuster, M. Latz, S. Das Gupta, N. Steinberg, H. Fones, S. J. Gurr, N. J. Talbot, and G. Steinberg. 2015. "A Gene Locus for Targeted Ectopic Gene Integration in *Zymoseptoria Tritici*." *Fungal Genetics and Biology: FG & B* 79 (June): 118–24. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.03.018>.
- ✓ Kilaru, S., and G. Steinberg. 2015. "Yeast Recombination-Based Cloning as an Efficient Way of Constructing Vectors for *Zymoseptoria Tritici*." *Fungal Genetics and Biology: FG & B* 79 (June): 76–83. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.03.017>.
- ✓ Kilaru, Sreedhar, Catherine M. Collins, Amanda J. Hartley, Andy M. Bailey, and Gary D. Foster. 2009. "Establishing Molecular Tools for Genetic Manipulation of the Pleuromutilin-Producing Fungus *Clitopilus Passeckerianus*." *Applied and Environmental Microbiology* 75 (22): 7196–7204. <https://doi.org/10.1128/AEM.01151-09>.
- ✓ Kilaru, Sreedhar, Catherine M. Collins, Amanda J. Hartley, Claire Burns, Gary D. Foster, and Andy M. Bailey. 2009. "Investigating Dominant Selection Markers for *Coprinopsis Cinerea*: A Carboxin Resistance System and Re-Evaluation of Hygromycin and Phleomycin Resistance Vectors." *Current Genetics* 55 (5): 543–50. <https://doi.org/10.1007/s00294-009-0266-6>.
- ✓ Kim, Beom-Gi, Jung-Ho Joh, Young-Bok Yoo, and Yumi Magae. 2003. "Transformation of the Edible Basidiomycete, *Pleurotus Ostreatus* to Phleomycin Resistance." *Mycobiology* 31 (1): 42–45. <https://doi.org/10.4489/MYCO.2003.31.1.042>.
- ✓ Kim, Sunkyung, Jaemahn Song, and Hyoung T. Choi. 2004. "Genetic Transformation and Mutant Isolation in *Ganoderma Lucidum* by Restriction Enzyme-Mediated Integration." *FEMS Microbiology Letters* 233 (2): 201–4. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.02.010>.
- ✓ Kimura, M., T. Kamakura, Q. Z. Tao, I. Kaneko, and I. Yamaguchi. 1994. "Cloning of the Blastocidin S Deaminase Gene (BSD) from *Aspergillus Terreus* and Its Use as a Selectable Marker for *Schizosaccharomyces Pombe* and *Pyrularia Oryzae*." *Molecular & General Genetics: MGG* 242 (2): 121–29.
- ✓ Kimura, M., A. Takatsuki, and I. Yamaguchi. 1994. "Blasticidin S Deaminase Gene from *Aspergillus Terreus* (BSD): A New Drug Resistance Gene for Transfection of Mammalian Cells." *Biochimica Et Biophysica Acta* 1219 (3): 653–59.
- ✓ Kimura, Makoto, Kiyoko Izawa, Katsuyoshi Yoneyama, Tsutomu Arie, Takashi Kamakura, and Isamu Yamaguchi. 1995. "A Novel Transformation System for *Pyrularia Oryzae*: Adhesion of Regenerating Fungal Protoplasts to Collagen-Coated Dishes." *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 59 (6): 1177–80. <https://doi.org/10.1271/bbb.59.1177>.
- ✓ Kimura, Makoto, and Isamu Yamaguchi. 1996. "Recent Development in the Use of Blastocidin S, a Microbial Fungicide, as a Useful Reagent in Molecular Biology." *Pesticide Biochemistry and Physiology* 56 (3): 243–48. <https://doi.org/10.1006/pest.1996.0077>.
- ✓ Kinal, Hai, Chung-Mo Park, and Jeremy A. Bruenn. 1993. "A Family of *Ustilago Maydis* Expression Vectors: New Selectable Markers and Promoters." *Gene* 127 (1): 151–52. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(93\)90632-D](https://doi.org/10.1016/0378-1119(93)90632-D).
- ✓ Kitamoto, K., K. Oda, K. Gomi, and K. Takahashi. 1991. "Genetic Engineering of a Sake Yeast Producing No Urea by Successive Disruption of Arginase Gene." *Applied and Environmental Microbiology* 57 (1): 301–6.
- ✓ Kobayashi, K., T. Kamakura, T. Tanaka, I. Yamaguchi, and T. Endo. 1991. "Nucleotide Sequence of the Bsr Gene and N-Terminal Amino Acid Sequence of Blastocidin S Deaminase from Blastocidin S Resistant *Escherichia Coli* TK121." *Agricultural and Biological Chemistry* 55 (12): 3155–57.
- ✓ Köhler, G. A., T. C. White, and N. Agabian. 1997. "Overexpression of a Cloned IMP Dehydrogenase Gene of *Candida Albicans* Confers Resistance to the Specific Inhibitor Mycophenolic Acid." *Journal of Bacteriology* 179 (7): 2331–38.
- ✓ Kolar, M., P. J. Punt, C. A. van den Hondel, and H. Schwab. 1988. "Transformation of *Penicillium Chrysogenum* Using Dominant Selection Markers and Expression of an *Escherichia Coli* LacZ Fusion Gene." *Gene* 62 (1): 127–34.

- ✓ Kosa, Peter, Barbora Gavenciakova, and Jozef Nosek. 2007. "Development of a Set of Plasmid Vectors for Genetic Manipulations of the Pathogenic Yeast *Candida Parapsilosis*." *Gene* 396 (2): 338–45. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2007.04.008>.
- ✓ Krappmann, Sven, Ozgür Bayram, and Gerhard H. Braus. 2005. "Deletion and Allelic Exchange of the *Aspergillus Fumigatus* VeA Locus via a Novel Recyclable Marker Module." *Eukaryotic Cell* 4 (7): 1298–1307. <https://doi.org/10.1128/EC.4.7.1298-1307.2005>.
- ✓ Kross, J., W. D. Henner, S. M. Hecht, and W. A. Haseltine. 1982. "Specificity of Deoxyribonucleic Acid Cleavage by Bleomycin, Phleomycin, and Tallysomylin." *Biochemistry* 21 (18): 4310–18.
- ✓ Kubodera, T., N. Yamashita, and A. Nishimura. 2000. "Pyriothiamine Resistance Gene (PtrA) of *Aspergillus Oryzae*: Cloning, Characterization and Application as a Dominant Selectable Marker for Transformation." *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 64 (7): 1416–21. <https://doi.org/10.1271/bbb.64.1416>.
- ✓ Kubodera, Takafumi, Nobuo Yamashita, and Akira Nishimura. 2002. "Transformation of *Aspergillus Sp.* and *Trichoderma Reesei* Using the Pyriothiamine Resistance Gene (PtrA) of *Aspergillus Oryzae*." *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 66 (2): 404–6. <https://doi.org/10.1271/bbb.66.404>.
- ✓ Kudla, B., Marie-Annick Persuy, C. Gaillardin, and H. Heslot. 2016. "Construction of an Expression Vector for the Fission Yeast *Schizosaccharomyces Pombe*." *Nucleic Acids Research* 16, 16 (17, 17). <https://prodinra.inra.fr/?locale=fr#!ConsultNotice:84172>.
- ✓ Kummasook, Aksarakorn, Chester R. Cooper, and Nongnuch Vanittanakom. 2010. "An Improved Agrobacterium-Mediated Transformation System for the Functional Genetic Analysis of *Penicillium Marneffeii*." *Medical Mycology* 48 (8): 1066–74. <https://doi.org/10.3109/13693781003801219>.
- ✓ Kunze, G., R. Bode, H. Rintala, and J. Hofemeister. 1989a. "Heterologous Gene Expression of the Glyphosate Resistance Marker and Its Application in Yeast Transformation." *Current Genetics* 15 (2): 91–98.
- ✓ ———. 1989b. "Heterologous Gene Expression of the Glyphosate Resistance Marker and Its Application in Yeast Transformation." *Current Genetics* 15 (2): 91–98.
- ✓ Kuroda, M., T. Hashida-Okado, R. Yasumoto, K. Gomi, I. Kato, and K. Takesako. 1999. "An Aureobasidin A Resistance Gene Isolated from *Aspergillus* Is a Homolog of Yeast AUR1, a Gene Responsible for Inositol Phosphorylceramide (IPC) Synthase Activity." *Molecular & General Genetics: MGG* 261 (2): 290–96.
- ✓ Lacalle, R. A., D. Pulido, J. Vara, M. Zalacaín, and A. Jiménez. 1989. "Molecular Analysis of the Pac Gene Encoding a Puromycin N-Acetyl Transferase from *Streptomyces Alboniger*." *Gene* 79 (2): 375–80.
- ✓ Lacková, D., and J. Subík. 1999. "Use of Mutated PDR3 Gene as a Dominant Selectable Marker in Transformation of Prototrophic Yeast Strains." *Folia Microbiologica* 44 (2): 171–76.
- ✓ Laplaza, Jose M., Beatriz Rivas Torres, Yong-Su Jin, and Thomas W. Jeffries. 2006. "Sh Ble and Cre Adapted for Functional Genomics and Metabolic Engineering of *Pichia Stipitis*." *Enzyme and Microbial Technology* 38 (6): 741–47. <https://doi.org/10.1016/j.enzymictec.2005.07.024>.
- ✓ Larimer, F. W., C. C. Morse, A. K. Beck, K. W. Cole, and F. H. Gaertner. 1983. "Isolation of the ARO1 Cluster Gene of *Saccharomyces Cerevisiae*." *Molecular and Cellular Biology* 3 (9): 1609–14.
- ✓ LaRossa, R. A., and J. V. Schloss. 1984. "The Sulfonylurea Herbicide Sulfometuron Methyl Is an Extremely Potent and Selective Inhibitor of Acetolactate Synthase in *Salmonella Typhimurium*." *The Journal of Biological Chemistry* 259 (14): 8753–57.
- ✓ Lebel, Karine, Sarah MacPherson, and Bernard Turcotte. 2006. "New Tools for Phenotypic Analysis in *Candida Albicans*: The WAR1 Gene Confers Resistance to Sorbate." *Yeast (Chichester, England)* 23 (4): 249–59. <https://doi.org/10.1002/yea.1346>.
- ✓ Leger, Raymond J. St., Susumu Shimizu, Lokesh Joshi, Michael J. Bidochka, and Donald W. Roberts. 1995. "Co-Transformation of *Metarhizium Anisopliae* by Electroporation or Using the Gene Gun to Produce Stable GUS Transformants." *FEMS Microbiology Letters* 131 (3): 289–94. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(95\)00272-7](https://doi.org/10.1016/0378-1097(95)00272-7).
- ✓ Li, Dan, Piotr Bobrowicz, Heather H. Wilkinson, and Daniel J. Ebole. 2005. "A Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway Essential for Mating and Contributing to Vegetative Growth in *Neurospora Crassa*." *Genetics* 170 (3): 1091–1104. <https://doi.org/10.1534/genetics.104.036772>.
- ✓ Li, Ding, Bo Zhang, Shuting Li, Jie Zhou, Hui Cao, Yan Huang, and Zhongli Cui. 2017. "A Novel Vector for Construction of Markerless Multicopy Overexpression Transformants in *Pichia Pastoris*." *Frontiers in Microbiology* 8 (September). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01698>.
- ✓ Li, Li, Jun Wu, Zixin Deng, T. Mark Zabriskie, and Xinyi He. 2013. "Streptomyces Lividans Blastocidin S Deaminase and Its Application in Engineering a Blastocidin S-Producing Strain for Ease of Genetic Manipulation." *Applied and Environmental Microbiology* 79 (7): 2349–57. <https://doi.org/10.1128/AEM.03254-12>.
- ✓ Liao, Xing-gang, Wei-guo Fang, Yong-jun Zhang, Yan-hua Fan, Xing-wei Wu, Qun Zhou, and Yan Pei. 2008. "Characterization of a Highly Active Promoter, P_{Bbgpd}, in *Beauveria Bassiana*." *Current Microbiology* 57 (2): 121–26. <https://doi.org/10.1007/s00284-008-9163-3>.

- ✓ Lin, Liangcai, Fengqing Wang, and Dongzhi Wei. 2011. "Chlorimuron Ethyl as a New Selectable Marker for Disrupting Genes in the Insect-Pathogenic Fungus *Metarhizium Robertsii*." *Journal of Microbiological Methods* 87 (2): 241–43. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.07.018>.
- ✓ Lin, Xinping, Yanan Wang, Sufang Zhang, Zhiwei Zhu, Yongjin J. Zhou, Fan Yang, Wenyi Sun, Xueying Wang, and Zongbao K. Zhao. 2014. "Functional Integration of Multiple Genes into the Genome of the Oleaginous Yeast *Rhodospiridium Toruloides*." *FEMS Yeast Research* 14 (4): 547–55. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12140>.
- ✓ Liu, Hongdi, Xiang Jiao, Yanan Wang, Xiaobing Yang, Wenyi Sun, Jihui Wang, Sufang Zhang, and Zongbao Kent Zhao. 2017. "Fast and Efficient Genetic Transformation of Oleaginous Yeast *Rhodospiridium Toruloides* by Using Electroporation." *FEMS Yeast Research* 17 (2). <https://doi.org/10.1093/femsyr/fox017>.
- ✓ Liu, Huaiwei, and Xiaoming Bao. 2009. "Overexpression of the Chitosanase Gene in *Fusarium Solani* via *Agrobacterium Tumefaciens*-Mediated Transformation." *Current Microbiology* 58 (3): 279–82. <https://doi.org/10.1007/s00284-008-9334-2>.
- ✓ Liu, Ning, Guo-Qing Chen, Guo-Ao Ning, Huan-Bin Shi, Chu-Long Zhang, Jian-Ping Lu, Li-Juan Mao, et al. 2016. "Agrobacterium *Tumefaciens*-Mediated Transformation: An Efficient Tool for Insertional Mutagenesis and Targeted Gene Disruption in *Harpophora Oryzae*." *Microbiological Research* 182 (January): 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.09.008>.
- ✓ Lorenz, Alexander. 2015. "New Cassettes for Single-Step Drug Resistance and Prototrophic Marker Switching in Fission Yeast." *Yeast (Chichester, England)* 32 (12): 703–10. <https://doi.org/10.1002/yea.3097>.
- ✓ Luna, S. de la, and J. Ortín. 1992. "Pac Gene as Efficient Dominant Marker and Reporter Gene in Mammalian Cells." *Methods in Enzymology* 216: 376–85.
- ✓ Luna, S. de la, I. Soria, D. Pulido, J. Ortín, and A. Jiménez. 1988. "Efficient Transformation of Mammalian Cells with Constructs Containing a Puromycin-Resistance Marker." *Gene* 62 (1): 121–26.
- ✓ Ma, Biao, Mary B. Mayfield, and Michael H. Gold. 2003. "Homologous Expression of *Phanerochaete Chrysosporium* Manganese Peroxidase, Using Bialaphos Resistance as a Dominant Selectable Marker." *Current Genetics* 43 (6): 407–14. <https://doi.org/10.1007/s00294-003-0418-z>.
- ✓ MacDonald, Chris, and Robert C. Piper. 2015. "Puromycin- and Methotrexate-Resistance Cassettes and Optimized Cre-Recombinase Expression Plasmids for Use in Yeast." *Yeast (Chichester, England)* 32 (5): 423–38. <https://doi.org/10.1002/yea.3069>.
- ✓ Maiti, S. N., M. W. Zink, and G. H. Rank. 1988. "Effect of Valine and the Herbicide Sulfometuron Methyl on Acetolactate Synthase Activity in Nuclear and Plasmid-Borne Sulphometuron Methyl Resistant *Saccharomyces Cerevisiae* Strains." *Canadian Journal of Microbiology* 34 (5): 680–85.
- ✓ Mao, Chanjuan, Hongjie Xie, Shiguo Chen, Bernal E. Valverde, and Sheng Qiang. 2017. "Error-Prone PCR Mutation of Ls-EPSPS Gene from *Liriope Spicata* Conferring to Its Enhanced Glyphosate-Resistance." *Pesticide Biochemistry and Physiology* 141 (September): 90–95. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2016.12.004>.
- ✓ Marmeisse, R., G. F. Van den Ackerveken, T. Goosen, P. J. De Wit, and H. W. Van den Broek. 1994. "The In-Planta Induced Ecp2 Gene of the Tomato Pathogen *Cladosporium Fulvum* Is Not Essential for Pathogenicity." *Current Genetics* 26 (3): 245–50.
- ✓ Mathre, D. E. 1971. "Mode of Action of Oxathiin Systemic Fungicides: III. Effect on Mitochondrial Activities." *Pesticide Biochemistry and Physiology* 1 (2): 216–24. [https://doi.org/10.1016/0048-3575\(71\)90198-2](https://doi.org/10.1016/0048-3575(71)90198-2).
- ✓ Matsunaga, Yukari, Megumi Ando, Kosuke Izumitsu, Kazumi Suzuki, Yoichi Honda, and Toshikazu Irie. 2017. "A Development and an Improvement of Selectable Markers in *Pleurotus Ostreatus* Transformation." *Journal of Microbiological Methods* 134 (January): 27–29. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2017.01.007>.
- ✓ Mattern, I., P. Punt, and C. Van den Hondel. 1988. "A Vector for *Aspergillus* Transformation Conferring Phleomycin Resistance." *Fungal Genetics Reports* 35 (1): 25. <https://doi.org/10.4148/1941-4765.1533>.
- ✓ May, G. S., J. Gambino, J. A. Weatherbee, and N. R. Morris. 1985. "Identification and Functional Analysis of Beta-Tubulin Genes by Site Specific Integrative Transformation in *Aspergillus Nidulans*." *The Journal of Cell Biology* 101 (3): 712–19.
- ✓ Mazodier, P., P. Cossart, E. Giraud, and F. Gasser. 1985. "Completion of the Nucleotide Sequence of the Central Region of Tn5 Confirms the Presence of Three Resistance Genes." *Nucleic Acids Research* 13 (1): 195–205.
- ✓ McClung, C. Robertson, John D. Phillips, Marc J. Orbach, and Jay C. Dunlap. 1989. "New Cloning Vectors Using Benomyl Resistance as a Dominant Marker for Selection In *Neurospora Crassa* and in Other Filamentous Fungi." *Experimental Mycology* 13 (3): 299–302. [https://doi.org/10.1016/0147-5975\(89\)90052-2](https://doi.org/10.1016/0147-5975(89)90052-2).
- ✓ McCourt, J. A., and R. G. Duggleby. 2006. "Acetohydroxyacid Synthase and Its Role in the Biosynthetic Pathway for Branched-Chain Amino Acids." *Amino Acids* 31 (2): 173–210. <https://doi.org/10.1007/s00726-005-0297-3>.
- ✓ Meyers, S., W. Schauer, E. Balzi, M. Wagner, A. Goffeau, and J. Golin. 1992. "Interaction of the Yeast Pleiotropic Drug Resistance Genes PDR1 and PDR5." *Current Genetics* 21 (6): 431–36.
- ✓ Miyajima, A., I. Miyajima, K. Arai, and N. Arai. 1984. "Expression of Plasmid R388-Encoded Type II Dihydrofolate Reductase as a Dominant Selective Marker in *Saccharomyces Cerevisiae*." *Molecular and Cellular Biology* 4 (3): 407–14.

- ✓ Moore, C. W. 1982. "Control of in Vivo (Cellular) Phleomycin Sensitivity by Nuclear Genotype, Growth Phase, and Metal Ions." *Cancer Research* 42 (3): 929–33.
- ✓ Mora-Lugo, Rodrigo, Judith Zimmermann, Amira M. Rizk, and Marcelo Fernandez-Lahore. 2014. "Development of a Transformation System for *Aspergillus Sojae* Based on the *Agrobacterium Tumefaciens*-Mediated Approach." *BMC Microbiology* 14 (September): 247. <https://doi.org/10.1186/s12866-014-0247-x>.
- ✓ Morschhäuser, Joachim, Peter Staib, and Gerwald Köhler. 2005. "Targeted Gene Deletion in *Candida Albicans* Wild-Type Strains by MPAR Flipping." *Methods in Molecular Medicine* 118: 35–44. <https://doi.org/10.1385/1-59259-943-5:035>.
- ✓ Mulsant, P., A. Gagnon, M. Dalens, and G. Tiraby. 1988. "Phleomycin Resistance as a Dominant Selectable Marker in CHO Cells." *Somatic Cell and Molecular Genetics* 14 (3): 243–52.
- ✓ Munshi, C., and H. C. Lee. 1997. "High-Level Expression of Recombinant *Aplysia* ADP-Ribosyl Cyclase in *Offhcia Pastoris* by Fermentation." *Protein Expression and Purification* 11 (1): 104–10.
- ✓ Nagiec, M. M., E. E. Nagiec, J. A. Baltisberger, G. B. Wells, R. L. Lester, and R. C. Dickson. 1997. "Sphingolipid Synthesis as a Target for Antifungal Drugs. Complementation of the Inositol Phosphorylceramide Synthase Defect in a Mutant Strain of *Saccharomyces Cerevisiae* by the AUR1 Gene." *The Journal of Biological Chemistry* 272 (15): 9809–17.
- ✓ Nakaune, Ryoji, and Masaaki Nakano. 2007. "Benomyl Resistance of *Colletotrichum Acutatum* Is Caused by Enhanced Expression of Beta-Tubulin 1 Gene Regulated by Putative Leucine Zipper Protein CaBEN1." *Fungal Genetics and Biology: FG & B* 44 (12): 1324–35. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2007.03.007>.
- ✓ Nakazawa, N., K. Okawa, T. Sato, H. Enei, and S. Harashima. 1999. "Mass Mating Method in Combination with G418- and Aureobasidin A-Resistance Markers for Efficient Selection of Hybrids from Homothallic Strains in *Saccharomyces Cerevisiae*." *Journal of Bioscience and Bioengineering* 88 (5): 468–71.
- ✓ Nakazawa, Nobushige, and Kimio Iwano. 2004. "Efficient Selection of Hybrids by Protoplast Fusion Using Drug Resistance Markers and Reporter Genes in *Saccharomyces Cerevisiae*." *Journal of Bioscience and Bioengineering* 98 (5): 353–58. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(04\)00295-6](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(04)00295-6).
- ✓ Neff, N. F., J. H. Thomas, P. Grisafi, and D. Botstein. 1983. "Isolation of the Beta-Tubulin Gene from Yeast and Demonstration of Its Essential Function in Vivo." *Cell* 33 (1): 211–19.
- ✓ Ngari, Chrise, Jean-Philippe Combiere, Jeanne Doré, Roland Marmeisse, Gilles Gay, and Delphine Melayah. 2009. "The Dominant Hc.Sdh (R) Carboxin-Resistance Gene of the Ectomycorrhizal Fungus *Hebeloma Cylindrosporium* as a Selectable Marker for Transformation." *Current Genetics* 55 (2): 223–31. <https://doi.org/10.1007/s00294-009-0231-4>.
- ✓ Noguchi, M. T., N. Yasuda, and Y. Fujita. 2006. "Evidence of Genetic Exchange by Parasexual Recombination and Genetic Analysis of Pathogenicity and Mating Type of Parasexual Recombinants in Rice Blast Fungus, *Magnaporthe Oryzae*." *Phytopathology* 96 (7): 746–50. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-0746>.
- ✓ Nosaka, K., Y. Kaneko, H. Nishimura, and A. Iwashima. 1993. "Isolation and Characterization of a Thiamin Pyrophosphokinase Gene, THI80, from *Saccharomyces Cerevisiae*." *The Journal of Biological Chemistry* 268 (23): 17440–47.
- ✓ Nowak, C., and U. Kück. 1994. "Development of an Homologous Transformation System for *Acremonium Chrysogenum* Based on the Beta-Tubulin Gene." *Current Genetics* 25 (1): 34–40.
- ✓ Ogawa, K., N. Yoshida, W. Gesnara, C. A. Omumasaba, and C. Chamuswarng. 2000. "Hybridization and Breeding of the Benomyl Resistant Mutant, *Trichoderma Harzianum* Antagonized to Phytopathogenic Fungi by Protoplast Fusion." *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 64 (4): 833–36. <https://doi.org/10.1271/bbb.64.833>.
- ✓ Orbach, M. J., E. B. Porro, and C. Yanofsky. 1986. "Cloning and Characterization of the Gene for Beta-Tubulin from a Benomyl-Resistant Mutant of *Neurospora Crassa* and Its Use as a Dominant Selectable Marker." *Molecular and Cellular Biology* 6 (7): 2452–61.
- ✓ Ortiz-Alvarado, R., G. A. Gonzalez-Hernandez, J. C. Torres-Guzman, and J. F. Gutierrez-Corona. 2006. "Transformation of *Mucor Circinelloides* with Autoreplicative Vectors Containing Homologous and Heterologous ARS Elements and the Dominant Cbx(r) Carboxine-Resistance Gene." *Current Microbiology* 52 (3): 178–81. <https://doi.org/10.1007/s00284-005-0088-9>.
- ✓ Ossanna, N., and S. Mischke. 1990. "Genetic Transformation of the Biocontrol Fungus *Gliocladium Virens* to Benomyl Resistance." *Applied and Environmental Microbiology* 56 (10): 3052–56.
- ✓ Pall, Martin. 1993. "The Use of Ignite (Basta;Glufosinate;Phosphinothricin) to Select Transformants of Bar-Containing Plasmids in *Neurospora Crassa*." *Fungal Genetics Reports* 40 (1): 58. <https://doi.org/10.4148/1941-4765.1412>.
- ✓ Pan, Rongqing, Ji Zhang, Wei-Liang Shen, Zheng-Qing Tao, Shun-Peng Li, and Xin Yan. 2011. "Sequential Deletion of *Pichia Pastoris* Genes by a Self-Excisable Cassette." *FEMS Yeast Research* 11 (3): 292–98. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2011.00716.x>.

- ✓ Papakonstantinou, Theo, Simon Harris, and Milton T. W. Hearn. 2009. "Expression of GFP Using Pichia Pastoris Vectors with Zeocin or G-418 Sulphate as the Primary Selectable Marker." *Yeast (Chichester, England)* 26 (6): 311–21. <https://doi.org/10.1002/yea.1666>.
- ✓ Papon, Nicolas, Vincent Courdavault, Marc Clastre, Andrew J. Simkin, Joël Crèche, and Nathalie Giglioli-Guivarc'h. 2012. "Deus Ex Candida Genetics: Overcoming the Hurdles for the Development of a Molecular Toolbox in the CTG Clade." *Microbiology (Reading, England)* 158 (Pt 3): 585–600. <https://doi.org/10.1099/mic.0.055244-0>.
- ✓ Pardo, Alejandro G., Mubashir Hanif, Marjatta Raudaskoski, and Markus Gorfer. 2002. "Genetic Transformation of Ectomycorrhizal Fungi Mediated by Agrobacterium Tumefaciens." *Mycological Research* 106 (2): 132–37. <https://doi.org/10.1017/S0953756201005378>.
- ✓ Park, S. Y., O. J. Jung, Y. R. Chung, and C. W. Lee. 1997. "Isolation and Characterization of a Benomyl-Resistant Form of Beta-Tubulin-Encoding Gene from the Phytopathogenic Fungus Botryotinia Fuckeliana." *Molecules and Cells* 7 (1): 104–9.
- ✓ Patel, Raunak D., Jennifer K. Lodge, and Lorina G. Baker. 2010. "Going Green in Cryptococcus Neoformans: The Recycling of a Selectable Drug Marker." *Fungal Genetics and Biology: FG & B* 47 (3): 191–98. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2009.11.007>.
- ✓ Peer, Arend F. van, Charissa de Bekker, Arman Vinck, Han A. B. Wösten, and Luis G. Lugones. 2009. "Phleomycin Increases Transformation Efficiency and Promotes Single Integrations in Schizophyllum Commune." *Applied and Environmental Microbiology* 75 (5): 1243–47. <https://doi.org/10.1128/AEM.02162-08>.
- ✓ Peres, N. a. R., N. L. Souza, T. L. Peever, and L. W. Timmer. 2004. "Benomyl Sensitivity of Isolates of Colletotrichum Acutatum and C. Gloeosporioides from Citrus." *Plant Disease* 88 (2): 125–30. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.2.125>.
- ✓ Peres, N. a. R., N. L. Souza, S. E. Zitko, and L. W. Timmer. 2002. "Activity of Benomyl for Control of Postbloom Fruit Drop of Citrus Caused by Colletotrichum Acutatum." *Plant Disease* 86 (6): 620–24. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2002.86.6.620>.
- ✓ Pérez-González, J. A., D. Ruiz, J. A. Esteban, and A. Jiménez. 1990. "Cloning and Characterization of the Gene Encoding a Blastocidin S Acetyltransferase from Streptovorticillum Sp." *Gene* 86 (1): 129–34.
- ✓ Pérez-González, J. A., J. Vara, and A. Jiménez. 1985. "The Mechanism of Resistance to Puromycin and to the Puromycin-Precursor O-Demethyl-Puromycin in Streptomyces Alboniger." *Journal of General Microbiology* 131 (11): 2877–83. <https://doi.org/10.1099/00221287-131-11-2877>.
- ✓ Pham, Cau D., Stacey Ahn, Lance A. Turner, Ron Wohrle, and Shawn R. Lockhart. 2014. "Development and Validation of Benomyl Birdseed Agar for the Isolation of Cryptococcus Neoformans and Cryptococcus Gattii from Environmental Samples." *Medical Mycology* 52 (4): 417–21. <https://doi.org/10.1093/mmy/myt028>.
- ✓ Picknett, T. M., and G. Saunders. 1989. "Transformation of Penicillium Chrysogenum with Selection for Increased Resistance to Benomyl." *FEMS Microbiology Letters* 51 (1): 165–68.
- ✓ Pont, Neus Planas, Catherine A. Kendall, and Naresh Magan. 2012. "Analysis of Volatile Fingerprints for Monitoring Anti-Fungal Efficacy against the Primary and Opportunistic Pathogen Aspergillus Fumigatus." *Mycopathologia* 173 (2–3): 93–101. <https://doi.org/10.1007/s11046-011-9490-y>.
- ✓ Poplawski, A. M., C. He, J. A. Irwin, and J. M. Manners. 1997. "Transfer of an Autonomously Replicating Vector between Vegetatively Incompatible Biotypes of Colletotrichum Gloeosporioides." *Current Genetics* 32 (1): 66–72.
- ✓ Prentice, H. L., and R. E. Kingston. 1992. "Mammalian Promoter Element Function in the Fission Yeast Schizosaccharomyces Pombe." *Nucleic Acids Research* 20 (13): 3383–90.
- ✓ Punt, P. J., and C. A. van den Hondel. 1992. "Transformation of Filamentous Fungi Based on Hygromycin B and Phleomycin Resistance Markers." *Methods in Enzymology* 216: 447–57.
- ✓ Puseenam, Aekkachai, Sutipa Tanapongpipat, and Niran Roongsawang. 2015. "Co-Expression of Endoxylanase and Endoglucanase in Scheffersomyces Stipitidis and Its Application in Ethanol Production." *Applied Biochemistry and Biotechnology* 177 (8): 1690–1700. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1846-1>.
- ✓ Qing, Chang, Yang Jing, Liu Lin, Su Yuan, Li Jinbin, Zhu Youyong, and Li Chengyun. 2011. "Chlorimuronethyl Resistance Selectable Marker Unsited for the Transformation of Rice Blast Fungus (Magnaporthe Grisea)." In *Computer and Computing Technologies in Agriculture IV*, edited by Daoliang Li, Yande Liu, and Yingyi Chen, 335–42. IFIP Advances in Information and Communication Technology. Springer Berlin Heidelberg.
- ✓ Queener, S. W., R. J. Beckmann, C. A. Cantwell, R. L. Hodges, D. L. Fisher, J. E. Dotzlaf, W. K. Yeh, D. McGilvray, M. Greaney, and P. Rosteck. 1994. "Improved Expression of a Hybrid Streptomyces Clavuligerus CefE Gene in Penicillium Chrysogenum." *Annals of the New York Academy of Sciences* 721 (May): 178–93.
- ✓ Ray, Thomas B. 1982. "The Mode of Action of Chlorsulfuron: A New Herbicide for Cereals." *Pesticide Biochemistry and Physiology* 17 (1): 10–17. [https://doi.org/10.1016/0048-3575\(82\)90120-1](https://doi.org/10.1016/0048-3575(82)90120-1).
- ✓ Razanamparany, V., P. Jara, R. Legoux, P. Delmas, F. Msayeh, M. Kaghad, and G. Loison. 1992. "Cloning and Mutation of the Gene Encoding Endothiapepsin from Cryphonectria Parasitica." *Current Genetics* 21 (6): 455–61.
- ✓ Reis, Viviane Castelo Branco, André Moraes Nicola, Osmar de Souza Oliveira Neto, Vinícius Daniel Ferreira Batista, Lidia Maria Pepe de Moraes, and Fernando Araripe Gonçalves Torres. 2012. "Genetic Characterization and

- Construction of an Auxotrophic Strain of *Saccharomyces Cerevisiae* JP1, a Brazilian Industrial Yeast Strain for Bioethanol Production." *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 39 (11): 1673–83. <https://doi.org/10.1007/s10295-012-1170-5>.
- ✓ Reiser, J., V. Glumoff, M. Kälin, et U. Ochsner. 1990. « Transfer and Expression of Heterologous Genes in Yeasts Other than *Saccharomyces Cerevisiae* ». *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 43: 75-102.
 - ✓ Renno, D. V., G. Saunders, P. Smith, A. T. Bull, and G. Holt. 1992. "Mitotic Instability of Integrated Plasmids in *Penicillium Chrysogenum* Transformants." *Journal of Biotechnology* 24 (3): 291–98.
 - ✓ "Reversal of Glyphosate-Induced Growth Inhibition of *Candida Maltosa* by Several Amino Acids and Pyruvate - ScienceDirect." n.d. Accessed September 4, 2018. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0015379685800433>.
 - ✓ Rozman, D., and R. Komel. 1992. "Transformation of *Cochliobolus Lunatus* with PUT 720 Changes the Steroid Hydroxylating Ability of the Fungus." *Current Genetics* 22 (2): 123–27.
 - ✓ Ruiz-Díez, B. 2002. « Strategies for the Transformation of Filamentous Fungi ». *Journal of Applied Microbiology* 92 (2): 189-95.
 - ✓ Ruiz-Herrera, null, null Martinez-Espinoza, null Alvarez, and null Xoconostle-Cazares. 1999. "Carboxin-Resistant Mutant of *Ustilago Maydis* Is Impaired in Its Pathogenicity for *Zea Mays*." *Current Microbiology* 39 (5): 291–94.
 - ✓ Sadowski, Ivan, Pedro Lourenco, and Jennifer Parent. 2008. "Dominant Marker Vectors for Selecting Yeast Mating Products." *Yeast (Chichester, England)* 25 (8): 595–99. <https://doi.org/10.1002/yea.1604>.
 - ✓ Salame, Tomer M., Doriv Knop, Dana Tal, Dana Levinson, Oded Yarden, and Yitzhak Hadar. 2012. "Predominance of a Versatile-Peroxidase-Encoding Gene, *Mnp4*, as Demonstrated by Gene Replacement via a Gene Targeting System for *Pleurotus Ostreatus*." *Applied and Environmental Microbiology* 78 (15): 5341–52. <https://doi.org/10.1128/AEM.01234-12>.
 - ✓ Santos, M., I. Vallejo, L. Rebordinos, S. Gutiérrez, I. G. Collado, and J. M. Cantoral. 1996. "An Autonomously Replicating Plasmid Transforms *Botrytis Cinerea* to Phleomycin Resistance." *FEMS Microbiology Letters* 137 (2–3): 153–58.
 - ✓ Saraya, Ruchi, Arjen M. Krikken, Jan A. K. W. Kiel, Richard J. S. Baerends, Marten Veenhuis, et Ida J. van der Klei. 2012. « Novel Genetic Tools for *Hansenula Polymorpha* ». *FEMS Yeast Research* 12 (3): 271-78. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2011.00772.x>.
 - ✓ Schuren, F. H., and J. G. Wessels. 1994. "Highly-Efficient Transformation of the Homobasidiomycete *Schizophyllum Commune* to Phleomycin Resistance." *Current Genetics* 26 (2): 179–83.
 - ✓ ———. 1998. "Expression of Heterologous Genes in *Schizophyllum Commune* Is Often Hampered by the Formation of Truncated Transcripts." *Current Genetics* 33 (2): 151–56.
 - ✓ Schweingruber, A. M., J. Dlugonski, E. Edenharter, and M. E. Schweingruber. 1991. "Thiamine in *Schizosaccharomyces Pombe*: Dephosphorylation, Intracellular Pool, Biosynthesis and Transport." *Current Genetics* 19 (4): 249–54.
 - ✓ Seip, E. R., C. P. Woloshuk, G. A. Payne, and S. E. Curtis. 1990. "Isolation and Sequence Analysis of a Beta-Tubulin Gene from *Aspergillus Flavus* and Its Use as a Selectable Marker." *Applied and Environmental Microbiology* 56 (12): 3686–92.
 - ✓ Semon, D., N. R. Movva, T. F. Smith, M. el Alama, and J. Davies. 1987. "Plasmid-Determined Bleomycin Resistance in *Staphylococcus Aureus*." *Plasmid* 17 (1): 46–53.
 - ✓ Semple, Jennifer I., Rosa Garcia-Verdugo, and Ben Lehner. 2010. "Rapid Selection of Transgenic *C. Elegans* Using Antibiotic Resistance." *Nature Methods* 7 (9): 725–27. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1495>.
 - ✓ Semple, Jennifer I., and Ben Lehner. 2014. "Single and Dual Drug Selection for Transgenes Following Bombardment of *Caenorhabditis* Species." *Methods (San Diego, Calif.)* 68 (3): 409–16. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2014.05.004>.
 - ✓ Seto, Haruo, Noboru Otake, and Hiroshi Yonehara. 1966. "Biological Transformation of Blastocidin S by *Aspergillus Fumigatus* Sp." *Agricultural and Biological Chemistry* 30 (9): 877–86. <https://doi.org/10.1271/bbb1961.30.877>.
 - ✓ Sharma, Seema, Kaushik Banerjee, and Partha P. Choudhury. 2012. "Degradation of Chlorimuron-Ethyl by *Aspergillus Niger* Isolated from Agricultural Soil." *FEMS Microbiology Letters* 337 (1): 18–24. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12006>.
 - ✓ Shima, Yoko, Yasuhiro Ito, Hidemi Hatabayashi, Akemi Koma, and Kimiko Yabe. 2011. "Five Carboxin-Resistant Mutants Exhibited Various Responses to Carboxin and Related Fungicides." *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 75 (1): 181–84.
 - ✓ Shima, Yoko, Yasuhiro Ito, Satoshi Kaneko, Hidemi Hatabayashi, Yasushi Watanabe, Yoshikazu Adachi, and Kimiko Yabe. 2009. "Identification of Three Mutant Loci Conferring Carboxin-Resistance and Development of a Novel Transformation System in *Aspergillus Oryzae*." *Fungal Genetics and Biology: FG & B* 46 (1): 67–76. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2008.10.005>.

- ✓ Shimizu, Takeo, Hiroshi Kinoshita, and Takuya Nihira. 2006. "Development of Transformation System in *Monascus Purpureus* Using an Autonomous Replication Vector with Aureobasidin A Resistance Gene." *Biotechnology Letters* 28 (2): 115–20. <https://doi.org/10.1007/s10529-005-4956-y>.
- ✓ Sidhu, Y. S., Y. K. Chaudhari, J. Usher, T. C. Cairns, M. Csukai, and K. Haynes. 2015. "A Suite of Gateway® Compatible Ternary Expression Vectors for Functional Analysis in *Zygomycetia*." *Fungal Genetics and Biology: FG & B* 79 (June): 180–85. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.03.021>.
- ✓ Siewers, Verena. 2014. « An Overview on Selection Marker Genes for Transformation of *Saccharomyces Cerevisiae* ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1152: 3-15. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0563-8_1.
- ✓ Singleton, C. K. 1997. "Identification and Characterization of the Thiamine Transporter Gene of *Saccharomyces Cerevisiae*." *Gene* 199 (1–2): 111–21.
- ✓ Skinner, W., A. Bailey, A. Renwick, J. Keon, S. Gurr, and J. Hargreaves. 1998. "A Single Amino-Acid Substitution in the Iron-Sulphur Protein Subunit of Succinate Dehydrogenase Determines Resistance to Carboxin in *Mycosphaerella Graminicola*." *Current Genetics* 34 (5): 393–98.
- ✓ Sleigh, M J. 1976. "The Mechanism of DNA Breakage by Phleomycin in Vitro." *Nucleic Acids Research* 3 (4): 891–901. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC342953/>.
- ✓ Slightom, Jerry L., Brian P. Metzger, Hang T. Luu, and Ake P. Elhammer. 2009. "Cloning and Molecular Characterization of the Gene Encoding the Aureobasidin A Biosynthesis Complex in *Aureobasidium Pullulans* BP-1938." *Gene* 431 (1–2): 67–79. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2008.11.011>.
- ✓ Smith, H. A., J. W. Gorman, Y. Koltin, and J. A. Gorman. 1990. "Functional Expression of the *Candida Albicans* Beta-Tubulin Gene in *Saccharomyces Cerevisiae*." *Gene* 90 (1): 115–23.
- ✓ Song, Panpan, Sha Liu, Xuena Guo, Xuejing Bai, Xiuping He, and Borun Zhang. 2015. "Scarless Gene Deletion in Methylophilic *Hansenula Polymorpha* by Using MazF as Counter-Selectable Marker." *Analytical Biochemistry* 468 (January): 66–74. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2014.09.006>.
- ✓ Spirek, Mario, Zsigmond Benko, Martina Carnecka, Cornelia Rumpf, Lubos Cipak, Monika Batova, Ivana Marova, et al. 2010. "S. Pombe Genome Deletion Project: An Update." *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 9 (12): 2399–2402. <https://doi.org/10.4161/cc.9.12.11914>.
- ✓ Staib, P., S. Michel, G. Köhler, and J. Morschhäuser. 2000. "A Molecular Genetic System for the Pathogenic Yeast *Candida Dublinsiensis*." *Gene* 242 (1–2): 393–98.
- ✓ Staib, P., G. P. Moran, D. J. Sullivan, D. C. Coleman, and J. Morschhäuser. 2001. "Isogenic Strain Construction and Gene Targeting in *Candida Dublinsiensis*." *Journal of Bacteriology* 183 (9): 2859–65. <https://doi.org/10.1128/JB.183.9.2859-2865.2001>.
- ✓ Stalker, D. M., W. R. Hiatt, and L. Comai. 1985. "A Single Amino Acid Substitution in the Enzyme 5-Enolpyruvylshikimate-3-Phosphate Synthase Confers Resistance to the Herbicide Glyphosate." *The Journal of Biological Chemistry* 260 (8): 4724–28.
- ✓ Steinrücken, H. C., and N. Amrhein. 1980. "The Herbicide Glyphosate Is a Potent Inhibitor of 5-Enolpyruvylshikimate-3-Phosphate Synthase." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 94 (4): 1207–12.
- ✓ Strauch, E., W. Wohlleben, and A. Pühler. 1988. "Cloning of a Phosphinothricin N-Acetyltransferase Gene from *Streptomyces Viridochromogenes* Tü494 and Its Expression in *Streptomyces Lividans* and *Escherichia Coli*." *Gene* 63 (1): 65–74.
- ✓ Sugiyama, M., A. Takeda, S. Y. Paik, and O. Nimi. 1989. "Isolation and Properties of a Blasticidin S Acetylating Enzyme from a Producer Organism." *The Journal of Antibiotics* 42 (1): 135–37.
- ✓ Sugiyama, M., A. Takeda, S. Y. Paik, O. Nimi, and R. Nomi. 1986. "Acetylation of Blasticidin S by Its Producing Actinomycetes." *The Journal of Antibiotics* 39 (6): 827–32.
- ✓ Sugiyama, M., C. J. Thompson, T. Kumagai, K. Suzuki, R. Deblaere, R. Villarroel, and J. Davies. 1994. "Characterisation by Molecular Cloning of Two Genes from *Streptomyces Verticillius* Encoding Resistance to Bleomycin." *Gene* 151 (1–2): 11–16.
- ✓ Summerbell, R. C. 1993. "The Benomyl Test as a Fundamental Diagnostic Method for Medical Mycology." *Journal of Clinical Microbiology* 31 (3): 572–77.
- ✓ Summerbell, Richard C. 1988. "Benomyl-Tolerant Microfungi Associated with Mycorrhizae of Black Spruce." *Canadian Journal of Botany* 66 (3): 553–57. <https://doi.org/10.1139/b88-079>.
- ✓ Sunga, Anthony Jay, Ilya Tolstorukov, and James M. Cregg. 2008. "Posttransformational Vector Amplification in the Yeast *Pichia Pastoris*." *FEMS Yeast Research* 8 (6): 870–76. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00410.x>.
- ✓ Suzuki, H., K. Nagai, E. Akutsu, H. Yamaki, and N. Tanaka. 1970. "On the Mechanism of Action of Bleomycin. Strand Scission of DNA Caused by Bleomycin and Its Binding to DNA in Vitro." *The Journal of Antibiotics* 23 (10): 473–80.

- ✓ Suzuki, Satoshi, Sawaki Tada, Mari Fukuoka, Hiroko Taketani, Yoshiki Tsukakoshi, Mayumi Matsushita, Kosuke Oda, Ken-Ichi Kusumoto, Yutaka Kashiwagi, and Masanori Sugiyama. 2009. "A Novel Transformation System Using a Bleomycin Resistance Marker with Chemosensitizers for *Aspergillus Oryzae*." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 383 (1): 42–47. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.03.108>.
- ✓ Sweigard, J., F. Chumley, A. Carroll, L. Farrall, and B. Valent. 1997. "A Series of Vectors for Fungal Transformation." *Fungal Genetics Reports* 44 (1): 52–53. <https://doi.org/10.4148/1941-4765.1287>.
- ✓ Szweczyk, Edyta, Takao Kasuga, and Zhiliang Fan. 2014. "A New Variant of Self-Excising β -Recombinase/Six Cassette for Repetitive Gene Deletion and Homokaryon Purification in *Neurospora Crassa*." *Journal of Microbiological Methods* 100 (May): 17–23. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.02.007>.
- ✓ Takeno, Seiki, Eiji Sakuradani, Akiko Tomi, Misa Inohara-Ochiai, Hiroshi Kawashima, and Sakayu Shimizu. 2005. "Transformation of Oil-Producing Fungus, *Mortierella Alpina* 1S-4, Using Zeocin, and Application to Arachidonic Acid Production." *Journal of Bioscience and Bioengineering* 100 (6): 617–22. <https://doi.org/10.1263/jbb.100.617>.
- ✓ Takesako, K., K. Ikai, F. Haruna, M. Endo, K. Shimanaka, E. Sono, T. Nakamura, I. Kato, and H. Yamaguchi. 1991. "Aureobasidins, New Antifungal Antibiotics. Taxonomy, Fermentation, Isolation, and Properties." *The Journal of Antibiotics* 44 (9): 919–24.
- ✓ Takesako, K., H. Kuroda, T. Inoue, F. Haruna, Y. Yoshikawa, I. Kato, K. Uchida, T. Hiratani, and H. Yamaguchi. 1993. "Biological Properties of Aureobasidin A, a Cyclic Depsipeptide Antifungal Antibiotic." *The Journal of Antibiotics* 46 (9): 1414–20.
- ✓ Talhinhos, Pedro, S. Sreenivasaprasad, João Neves-Martins, and Helena Oliveira. 2002. "Genetic and Morphological Characterization of *Colletotrichum Acutatum* Causing Anthracnose of Lupins." *Phytopathology* 92 (9): 986–96. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2002.92.9.986>.
- ✓ ———. 2005. "Molecular and Phenotypic Analyses Reveal Association of Diverse *Colletotrichum Acutatum* Groups and a Low Level of *C. Gloeosporioides* with Olive Anthracnose." *Applied and Environmental Microbiology* 71 (6): 2987–98. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.6.2987-2998.2005>.
- ✓ Tamura, K., M. Kimura, and I. Yamaguchi. 1995. "Blasticidin S Deaminase Gene (BSD): A New Selection Marker Gene for Transformation of *Arabidopsis Thaliana* and *Nicotiana Tabacum*." *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 59 (12): 2336–38.
- ✓ Tang, Shye-Jye, Kuang-Hui Sun, Guang-Huan Sun, Terng-Yuan Chang, Wan-Lin Wu, and Guan-Chiun Lee. 2003. "A Transformation System for the Nonuniversal CUG(Ser) Codon Usage Species *Candida Rugosa*." *Journal of Microbiological Methods* 52 (2): 231–38.
- ✓ Teunissen, H. a. S., J. Verkooijen, B. J. C. Cornelissen, and M. A. Haring. 2002. "Genetic Exchange of Avirulence Determinants and Extensive Karyotype Rearrangements in Parasexual Recombinants of *Fusarium Oxysporum*." *Molecular Genetics and Genomics: MGG* 268 (3): 298–310. <https://doi.org/10.1007/s00438-002-0747-5>.
- ✓ Thompson, C. J., N. R. Movva, R. Tizard, R. Cramer, J. E. Davies, M. Lauwereys, and J. Botterman. 1987. "Characterization of the Herbicide-Resistance Gene Bar from *Streptomyces Hygroscopicus*." *The EMBO Journal* 6 (9): 2519–23.
- ✓ Topp, Christopher N., José Ruiz-Herrera, Alfredo D. Martínez-Espinoza, and Scott E. Gold. 2002. "Integration of the Gene for Carboxin Resistance Does Not Impact the Ustilago Maydis-Maize Interaction." *Current Microbiology* 44 (1): 67–70.
- ✓ Traut, R. R., and R. E. Monro. 1964. "THE PUROMYCIN REACTION AND ITS RELATION TO PROTEIN SYNTHESIS." *Journal of Molecular Biology* 10 (October): 63–72.
- ✓ Tsai, Yung-Yu, Takao Ohashi, Takenori Kanazawa, Pirapan Polburee, Ryo Misaki, Savitree Limtong, and Kazuhito Fujiyama. 2017. "Development of a Sufficient and Effective Procedure for Transformation of an Oleaginous Yeast, *Rhodospiridium Toruloides* DMKU3-TK16." *Current Genetics* 63 (2): 359–71. <https://doi.org/10.1007/s00294-016-0629-8>.
- ✓ Tsukihara, Takahisa, Yoichi Honda, Takahito Watanabe, and Takashi Watanabe. 2006. "Molecular Breeding of White Rot Fungus *Pleurotus Ostreatus* by Homologous Expression of Its Versatile Peroxidase MnP2." *Applied Microbiology and Biotechnology* 71 (1): 114–20. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0136-1>.
- ✓ Tucker, A. N., and T. T. Lillich. 1974. "Effect of the Systemic Fungicide Carboxin on Electron Transport Function in Membranes of *Micrococcus Denitrificans*." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 6 (5): 572–78.
- ✓ "Two New Easy to Use Vectors for Transformations." n.d. Accessed September 4, 2018. <http://www.fgsc.net/fgn42/silar.html>.
- ✓ Ulrich, J. T., and D. E. Mathre. 1972. "Mode of Action of Oxathiin Systemic Fungicides V. Effect on Electron Transport System of *Ustilago Maydis* and *Saccharomyces Cerevisiae*." *Journal of Bacteriology* 110 (2): 628–32. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC247458/>.
- ✓ Upchurch, R. G., M. Ehrenschaft, D. C. Walker, and L. A. Sanders. 1991. "Genetic Transformation System for the Fungal Soybean Pathogen *Cercospora Kikuchii*." *Applied and Environmental Microbiology* 57 (10): 2935–39.

- ✓ Upchurch, R. G., M. J. Meade, R. C. Hightower, R. S. Thomas, and T. M. Callahan. 1994. "Transformation of the Fungal Soybean Pathogen *Cercospora Kikuchii* with the Selectable Marker Bar." *Applied and Environmental Microbiology* 60 (12): 4592–95.
- ✓ Valent, B., and F. G. Chumley. 1991. "Molecular Genetic Analysis of the Rice Blast Fungus, *Magnaporthe Grisea*." *Annual Review of Phytopathology* 29: 443–67. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.29.090191.002303>.
- ✓ Vara, J. A., A. Portela, J. Ortín, and A. Jiménez. 1986. "Expression in Mammalian Cells of a Gene from *Streptomyces Alboniger* Conferring Puromycin Resistance." *Nucleic Acids Research* 14 (11): 4617–24.
- ✓ "Versatile Fungal Transformation Vectors Carrying the Selectable Bar Gene of *Streptomyces Hygroscopicus*." n.d. Accessed September 4, 2018. <http://www.fgsc.net/fgn39/straub.html>.
- ✓ Vickers, Claudia E., Sarah F. Bydder, Yuchan Zhou, and Lars K. Nielsen. 2013. "Dual Gene Expression Cassette Vectors with Antibiotic Selection Markers for Engineering in *Saccharomyces Cerevisiae*." *Microbial Cell Factories* 12 (October): 96. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-96>.
- ✓ Vollmer, S. J., and C. Yanofsky. 1986. "Efficient Cloning of Genes of *Neurospora Crassa*." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83 (13): 4869–73.
- ✓ Wagner, James M., Eden V. Williams, and Hal S. Alper. 2018. "Developing a PiggyBac Transposon System and Compatible Selection Markers for Insertional Mutagenesis and Genome Engineering in *Yarrowia Lipolytica*." *Biotechnology Journal* 13 (5): e1800022. <https://doi.org/10.1002/biot.201800022>.
- ✓ Wang, Xiaoxing, Gang Li, Yuntao Deng, Xuanwei Yu, and Fang Chen. 2006. "A Site-Directed Integration System for the Nonuniversal CUG(Ser) Codon Usage Species *Pichia Farinosa* by Electroporation." *Archives of Microbiology* 184 (6): 419–24. <https://doi.org/10.1007/s00203-005-0062-8>.
- ✓ Wang, T. T., Y. J. Choi, et B. H. Lee. 2001. « Transformation Systems of Non-Saccharomyces Yeasts ». *Critical Reviews in Biotechnology* 21 (3): 177-218. <https://doi.org/10.1080/20013891081719>.
- ✓ Warnock, D. W., E. M. Johnson, J. Burke, and R. Prachartam. 1989. "Effect of Methotrexate Alone and in Combination with Antifungal Drugs on the Growth of *Candida Albicans*." *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 23 (6): 837–47.
- ✓ Warnock, D. W., D. A. Oliver, M. M. Cheung, and N. J. Zurick. 1992. "Effect of Methotrexate on the Germination and Growth of *Aspergillus Fumigatus* and *Aspergillus Flavus* Strains." *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 29 (4): 375–81.
- ✓ Watanabe, Hisayuki, Makoto Hatakeyama, Hiroshi Sakurai, Hirofumi Uchimiya, and Toshitsugu Sato. 2008. "Isolation of Industrial Strains of *Aspergillus Oryzae* Lacking Ferrichrysin by Disruption of the DffA Gene." *Journal of Bioscience and Bioengineering* 106 (5): 488–92. <https://doi.org/10.1263/jbb.106.488>.
- ✓ Weld, Richard J., Colin C. Eady, et Hayley J. Ridgway. 2006. « Agrobacterium-Mediated Transformation of *Sclerotinia Sclerotiorum* ». *Journal of Microbiological Methods* 65 (1): 202-7. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.07.010>.
- ✓ Wickner, R. B. 1975. "Mutants of *Saccharomyces Cerevisiae* That Incorporate Deoxythymidine 5'-Monophosphate into DNA in Vivo." *Methods in Cell Biology* 11: 295–302.
- ✓ Wirsching, S., S. Michel, and J. Morschhäuser. 2000. "Targeted Gene Disruption in *Candida Albicans* Wild-Type Strains: The Role of the MDR1 Gene in Fluconazole Resistance of Clinical *Candida Albicans* Isolates." *Molecular Microbiology* 36 (4): 856–65.
- ✓ Wirsching, S., G. P. Moran, D. J. Sullivan, D. C. Coleman, and J. Morschhäuser. 2001. "MDR1-Mediated Drug Resistance in *Candida Dubliniensis*." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45 (12): 3416–21. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.12.3416-3421.2001>.
- ✓ Wirsel, Stefan G.R., Ralf T. Voegelé, Reto Bänninger, and Kurt W. Mendgen. 2004. "Cloning of β -Tubulin and Succinate Dehydrogenase Genes from *Uromyces Fabae* and Establishing Selection Conditions for Their Use in Transformation." *European Journal of Plant Pathology* 110 (8): 767–77. <https://doi.org/10.1007/s10658-004-0608-7>.
- ✓ Wohlleben, W., W. Arnold, I. Broer, D. Hillemann, E. Strauch, and A. Pühler. 1988. "Nucleotide Sequence of the Phosphinothricin N-Acetyltransferase Gene from *Streptomyces Viridochromogenes* Tü494 and Its Expression in *Nicotiana Tabacum*." *Gene* 70 (1): 25–37.
- ✓ Wood, J. S. 1982. "Genetic Effects of Methyl Benzimidazole-2-Yl-Carbamate on *Saccharomyces Cerevisiae*." *Molecular and Cellular Biology* 2 (9): 1064–79. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC369899/>.
- ✓ Wu, T. S., C. D. Skory, J. S. Horng, and J. E. Linz. 1996. "Cloning and Functional Analysis of a Beta-Tubulin Gene from a Benomyl Resistant Mutant of *Aspergillus Parasiticus*." *Gene* 182 (1–2): 7–12.
- ✓ Xiao, W., and G. H. Rank. 1989. "The Construction of Recombinant Industrial Yeasts Free of Bacterial Sequences by Directed Gene Replacement into a Nonessential Region of the Genome." *Gene* 76 (1): 99–107.
- ✓ ———. 1990. "Cloning of Industrial *Saccharomyces* 2-Microns Plasmid Variants by in Vivo Site-Specific Recombination." *Plasmid* 23 (1): 67–70.
- ✓ Xie, Q., and A. Jiménez. 1996. "Molecular Cloning of a Novel Allele of SMR1 Which Determines Sulfometuron Methyl Resistance in *Saccharomyces Cerevisiae*." *FEMS Microbiology Letters* 137 (2–3): 165–68.

- ✓ Xu, Jing, Jingen Li, Liangcai Lin, Qian Liu, Wenliang Sun, Bangquan Huang, and Chaoguang Tian. 2015. "Development of Genetic Tools for Myceliophthora Thermophila." *BMC Biotechnology* 15 (May): 35. <https://doi.org/10.1186/s12896-015-0165-5>.
- ✓ Xu, Qiu-Rong, Lan Yan, Quan-Zhen Lv, Mi Zhou, Xue Sui, Yong-Bing Cao, et Yuan-Ying Jiang. 2014. « Molecular Genetic Techniques for Gene Manipulation in Candida Albicans ». *Virulence* 5 (4): 507-20. <https://doi.org/10.4161/viru.28893>.
- ✓ Yadav, N., R. E. McDevitt, S. Benard, and S. C. Falco. 1986. "Single Amino Acid Substitutions in the Enzyme Acetolactate Synthase Confer Resistance to the Herbicide Sulfometuron Methyl." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83 (12): 4418–22.
- ✓ Yamaguchi, H., and N. Tanaka. 1966. "Inhibition of Protein Synthesis by Blastidicin S. II. Studies on the Site of Action in E. Coli Polypeptide Synthesizing Systems." *Journal of Biochemistry* 60 (6): 632–42.
- ✓ Yamaguchi, H., C. Yamamoto, and N. Tanaka. 1965. "Inhibition of Protein Synthesis by Blastidicin S. I. Studies with Cell-Free Systems from Bacterial and Mammalian Cells." *Journal of Biochemistry* 57 (5): 667–77.
- ✓ Yamaguchi, I., H. Shibata, H. Seto, and T. Misato. 1975. "Isolation and Purification of Blastidicin S Deaminase from Aspergillus Terreus." *The Journal of Antibiotics* 28 (1): 7–14.
- ✓ Yamaguchi, Isamu, Kotaro Takagi, and Tomomasa Misato. 1972. "The Sites for Degradation of Blastidicin S." *Agricultural and Biological Chemistry* 36 (10): 1719–27. <https://doi.org/10.1271/bbb1961.36.1719>.
- ✓ Yanai, K., K. Yonekura, H. Usami, M. Hirayama, S. Kajiwarra, T. Yamazaki, K. Shishido, and T. Adachi. 1996. "The Integrative Transformation of Pleurotus Ostreatus Using Bialaphos Resistance as a Dominant Selectable Marker." *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 60 (3): 472–75. <https://doi.org/10.1271/bbb.60.472>.
- ✓ Yanai, Koji, Hiroyuki Horiuchi, Masamichi Takagi, and Keiji Yano. 1991. "Transformation of Rhizopus Niveus Using a Bacterial Blastidicin S Resistance Gene as a Dominant Selectable Marker." *Current Genetics* 19 (3): 221–26. <https://doi.org/10.1007/BF00336490>.
- ✓ Yang, Fan, and Naweed I. Naqvi. 2014. "Sulfonylurea Resistance Reconstitution as a Novel Strategy for ILV2-Specific Integration in Magnaporthe Oryzae." *Fungal Genetics and Biology: FG & B* 68 (July): 71–76. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2014.04.005>.
- ✓ Yang, Junjie, Weihong Jiang, and Sheng Yang. 2009. "MazF as a Counter-Selectable Marker for Unmarked Genetic Modification of Pichia Pastoris." *FEMS Yeast Research* 9 (4): 600–609. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2009.00503.x>.
- ✓ Yeo, Sumin, Nammee Park, Hong-Gyu Song, and Hyoung T. Choi. 2007. "Generation of a Transformant Showing Higher Manganese Peroxidase (Mnp) Activity by Overexpression of Mnp Gene in Trametes Versicolor." *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)* 45 (3): 213–18.
- ✓ Ying, Sheng-Hua, and Ming-Guang Feng. 2006. "Novel Blastospore-Based Transformation System for Integration of Phosphinothricin Resistance and Green Fluorescence Protein Genes into Beauveria Bassiana." *Applied Microbiology and Biotechnology* 72 (1): 206–10. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0447-x>.
- ✓ Yu, Jiajia, Yafen Zhang, Haifeng Cui, Peng Hu, Xiaoping Yu, and Zihong Ye. 2015. "An Efficient Genetic Manipulation Protocol for Ustilago Esculenta." *FEMS Microbiology Letters* 362 (12): fnv087. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnv087>.
- ✓ Zámocký, Marcel, Christina Schümann, Christoph Sygmund, John O'Callaghan, Alan D. W. Dobson, Roland Ludwig, Dietmar Haltrich, and Clemens K. Peterbauer. 2008. "Cloning, Sequence Analysis and Heterologous Expression in Pichia pastoris of a Gene Encoding a Thermostable Cellobiose Dehydrogenase from Myriococcum Thermophilum." *Protein Expression and Purification* 59 (2): 258–65. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2008.02.007>.
- ✓ Zhang, Cheng, Hong Zong, Bin Zhuge, Xinyao Lu, Huiying Fang, and Jian Zhuge. 2015. "Integrative Expression Vectors for Overexpression of Xylitol Dehydrogenase (XYL2) in Osmotolerant Yeast, Candida glycerinogenes WL2002-5." *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 42 (1): 113–24. <https://doi.org/10.1007/s10295-014-1530-4>.
- ✓ Zhang, Jing, Caixia Liu, Yijia Xie, Ning Li, Zhanguo Ning, Na Du, Xirong Huang, and Yaohua Zhong. 2017. "Enhancing Fructooligosaccharides Production by Genetic Improvement of the Industrial Fungus Aspergillus niger ATCC 20611." *Journal of Biotechnology* 249 (March): 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.03.021>.
- ✓ Zhang, Shizhu, Yanhua Fan, Yu Xian Xia, and Nemat O. Keyhani. 2010. "Sulfonylurea Resistance as a New Selectable Marker for the Entomopathogenic Fungus Beauveria bassiana." *Applied Microbiology and Biotechnology* 87 (3): 1151–56. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2636-x>.
- ✓ Zhang, Silai, Akihiko Ban, Naoki Ebara, Osamu Mizutani, Mizuki Tanaka, Takahiro Shintani, and Katsuya Gomi. 2016. "Self-Excising Cre/Mutant Lox Marker Recycling System for Multiple Gene Integrations and Consecutive Gene Deletions in Aspergillus oryzae." *Journal of Bioscience and Bioengineering*, December. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2016.11.001>.
- ✓ Zhiming, Rao, Ma Zheng, Shen Wei, Fang Huiying, and Zhuge Jian. 2008. "Transformation of Industrialized Strain Candida Glycerinogenes with Resistant Gene Zeocin via Agrobacterium Tumefaciens." *Current Microbiology* 57 (1): 12–17. <https://doi.org/10.1007/s00284-008-9144-6>.

- ✓ Zhong, W., M. W. Jeffries, and N. H. Georgopapadaku. 2000. "Inhibition of Inositol Phosphorylceramide Synthase by Aureobasidin A in *Candida* and *Aspergillus* Species." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44 (3): 651–53.
- ✓ Zhong, W., D. J. Murphy, and N. H. Georgopapadaku. 1999. "Inhibition of Yeast Inositol Phosphorylceramide Synthase by Aureobasidin A Measured by a Fluorometric Assay." *FEBS Letters* 463 (3): 241–44.
- ✓ Zhu, J., R. Contreras, and W. Fiers. 1986. "Construction of Stable Laboratory and Industrial Yeast Strains Expressing a Foreign Gene by Integrative Transformation Using a Dominant Selection System." *Gene* 50 (1–3): 225–37.
- ✓ Zhu, Jingdong, Roland Contreras, Dirk Gheysen, Joachim Ernst, and Walter Fiers. 1985. "A System for Dominant Transformation and Plasmid Amplification in *Saccharomyces Cerevisiae*." *Nature Biotechnology* 3 (5): 451–56. <https://doi.org/10.1038/nbt0585-451>.

ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussignée **HERIVAUX Anaïs**
déclare être pleinement consciente 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'étudiante le **10/09/2018**.

Présidence de l'université
40 rue de rennes – BP 73532
49035 Angers cedex
Tél. 02 41 96 23 23 | Fax 02 41 96 23 00



Titre : Les récepteurs histidine kinases : structure et distribution chez les eucaryotes et caractérisation fonctionnelle chez l'espèce *Scedosporium apiospermum* rencontrée au cours de la mucoviscidose

Mots clés : *Scedosporium apiospermum*, Mucoviscidose, Histidine kinases, Signalisation cellulaire, Mycologie médicale.

Résumé : Les histidine kinases (HKs) représentent une vaste famille de protéines impliquées dans la perception des signaux environnementaux chez les bactéries, les champignons et les plantes. Ces protéines joueraient notamment un rôle majeur dans l'adaptation aux stress, mais aussi dans la virulence de nombreux micro-organismes procaryotes et eucaryotes. Si les HKs sont à présent bien connues chez les bactéries et les plantes, tant sur un plan structural que fonctionnel, les connaissances concernant ces protéines chez les autres clades de l'arbre du vivant demeurent plus que fragmentaires. C'est ainsi que le premier objectif de ce travail a consisté en l'exploration *in silico* de la structure et de la distribution des HKs chez les organismes eucaryotes dans le cadre de plusieurs études bio-informatiques : i) chez les champignons inférieurs, ii) chez les levures bourgeonnantes et enfin iii) à travers l'ensemble des super-groupes eucaryotes. Les HKs n'étant pas retrouvées chez les mammifères, elles

suscitent depuis quelques années une attention particulière de la communauté scientifique en tant que nouvelles cibles pour le développement d'antimicrobiens. C'est précisément dans ce contexte que la partie expérimentale de ce projet a été initiée au sein du GEIHP. Cette équipe porte en effet ses efforts sur le filamentueux multi-résistant *Scedosporium apiospermum* qui se situe au second rang parmi les moisissures capables de coloniser chroniquement les poumons des patients atteints de mucoviscidose. Ainsi, dans l'optique d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques du champignon, la seconde partie de ce projet s'est focalisée sur la caractérisation fonctionnelle des HKs chez *Scedosporium apiospermum*. En parallèle, cette étude nous a également amenés à développer de nouveaux outils moléculaires adaptés à *S. apiospermum* en vue de futures études d'imageries de fluorescence et de bioluminescence.

Title : Histidine kinases : structure and distribution in eukaryotes and functional characterization in *Scedosporium apiospermum* encountered in cystic fibrosis.

Keywords : *Scedosporium apiospermum*, Cystic fibrosis, Histidine kinases, Cell signalling, Medical mycology.

Abstract : Histidine kinases (HKs) represent a broad family of proteins involved in the perception of environmental signals in bacteria, fungi and plants. These proteins play a major role in stress adaptation, but also in the virulence of many prokaryotic and eukaryotic microorganisms. Although HKs are now well known in bacteria and plants, both structurally and functionally, knowledge about these proteins in other clades of the living tree remains more than fragmentary. Thus the first objective of this work was the *in silico* exploration of the structure and distribution of HKs in eukaryotic organisms through several bioinformatics studies: i) in the lower fungi, ii) in budding yeasts, and finally iii) across all eukaryotic supergroups. Since HKs are not found in mammals, they have been attracting attention in recent years

from the scientific community as new targets for the development of antimicrobials. It is precisely in this context that the experimental part of this project was initiated in the GHEIHP. This team is focusing on the multi-resistant filamentous *Scedosporium apiospermum*, which ranks second among the molds capable of chronically colonizing the lungs of cystic fibrosis patients. Thus, in order to identify new therapeutic targets of the fungus, the second part of this project focused on the functional characterization of HKs in *S. apiospermum*. In parallel, this study also led us to develop new molecular tools adapted to *S. apiospermum* for future studies of fluorescence or bioluminescence imaging.