



**HAL**  
open science

# Facteurs de virulence de champignons filamenteux au cours de la mucoviscidose : l'exemple de la mélanine

Hélène Guegan

► **To cite this version:**

Hélène Guegan. Facteurs de virulence de champignons filamenteux au cours de la mucoviscidose : l'exemple de la mélanine. Microbiologie et Parasitologie. Université de Rennes, 2023. Français. NNT : 2023URENB004 . tel-04436060

**HAL Id: tel-04436060**

**<https://theses.hal.science/tel-04436060>**

Submitted on 3 Feb 2024

**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.



**Université  
de Rennes**

# THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE RENNES

ECOLE DOCTORALE N° 637

*Science de la vie et de la santé*

Spécialité : Microbiologie, Virologie, Parasitologie

Par

**Hélène GUEGAN**

## **Facteurs de virulence de champignons filamenteux au cours de la mucoviscidose : l'exemple de la mélanine**

Thèse présentée et soutenue à Rennes, le 2 février 2023

Unité de recherche : UMR U1085 – Institut de Recherche en Santé, Environnement et Travail

### **Rapporteurs avant soutenance :**

Isabelle Mouyna, CR, Institut Pasteur, Paris  
Stéphane Ranque, PU-PH, Université de Marseille

### **Composition du Jury :**

Présidente :	Laurence Lachaud	PU-PH, Université de Montpellier
Examineur :	Matthieu Barret	CR, IHRS-INRAE, Angers
Dir. de thèse :	Jean-Pierre Gangneux	PU-PH, Université de Rennes 1
Co-dir. de thèse :	Amandine Gastebois	MCF, Université d'Angers

# PREAMBULE

*Le rôle de l'environnement dans les maladies infectieuses émergentes et ré-émergentes est de plus en plus reconnu. Le changement climatique en cours est susceptible de créer des pressions environnementales qui favorisent l'apparition de nouvelles infections fongiques. Pour la grande majorité des champignons, la capacité à croître à des températures élevées limite leur capacité à infecter et s'établir chez les mammifères. Cependant, les champignons peuvent évoluer vers la thermo-tolérance, et l'adaptation progressive aux températures croissantes engendrées par le changement climatique pourrait accroître le nombre d'espèces potentiellement pathogènes. Les catastrophes naturelles liées à ce phénomène participent aussi à la dispersion et à l'aérosolisation des champignons, provoquant des infections par des espèces auparavant très rares, ou inconnues (1,2).*

*Devant l'extraordinaire capacité d'adaptation des champignons à leur environnement et la menace représentée en pathologie humaine, l'élucidation des déterminants de leur virulence prend toute son importance.*

# Table des matières

Liste des abréviations .....	1
Liste des figures.....	2
Liste des tableaux.....	3
Liste des annexes.....	3
<b>REVUE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>4</b>
<b>I. Mucoviscidose et risque fongique .....</b>	<b>6</b>
1. La mucoviscidose.....	6
2. Infections fongiques au cours de la mucoviscidose .....	10
3. Approches thérapeutiques antifongiques et défi de la résistance.....	32
<b>II. Interaction d'<i>Aspergillus fumigatus</i> et de <i>Scedosporium-spp</i> avec leur hôte .....</b>	<b>34</b>
1. Présentation des champignons.....	34
2. Réponse immunitaire de l'hôte.....	40
3. Facteurs de virulence.....	49
<b>III. La mélanine dans le règne fongique .....</b>	<b>54</b>
1. Généralités .....	54
2. Rôles de la mélanine dans l'interaction hôte-champignon.....	65
3. La mélanine fongique, une cible thérapeutique ? .....	72
<b>OBJECTIFS .....</b>	<b>76</b>
<b>PARTIE EXPERIMENTALE .....</b>	<b>78</b>
<b>I. Epidémiologie fongique au cours de la mucoviscidose .....</b>	<b>80</b>
1. Comparaison 2011-2020 de la prévalence des colonisations/infections fongiques : données des cohortes de Rennes et d'Angers.....	80
2. Surveillance de la résistance aux azolés (2015-2020).....	88
<b>II. Réponse macrophagique à l'infection par <i>Scedosporium apiospermum</i> comparativement à l'infection par <i>Aspergillus fumigatus</i> .....</b>	<b>100</b>
<b>III. Etude du rôle de PIG1 et de la DHN-mélanine chez <i>Scedosporium apiospermum</i> .....</b>	<b>130</b>
<b>DISCUSSION GENERALE.....</b>	<b>172</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>182</b>
<b>ANNEXE .....</b>	<b>200</b>



# Liste des abréviations

1,3,6,8-THN : 1,3,6,8-Tetrahydroxynaphtalène	L-DOPA : L- 3,4-dihydroxyphenylalanine
ABC : ATP binding cassette	MAC : Membrane attack complex
ABPA : Aspergillose broncho-pulmonaire allergique	MAP : Mitogen-activated protein kinase
AHG : Acide homogentisique	MBI : Melanin biosynthesis inhibitor
AmB : Amphotéricine B	MBL : Mannose binding lectin
AMR1 : Alternaria melanin regulation	MBPA : Mycose broncho-pulmonaire allergique
APC : Aspergillose pulmonaire chronique	MelLec : Melanin-sensing C-type lectin receptor
APCC : Aspergillose pulmonaire chronique cavitaire	moDC : Monocyte-derived dendritic cell
APCN : Aspergillose pulmonaire chronique nécosante	MR : Mannose receptor
API : Aspergillose pulmonaire invasive	MYD88 : Myeloid differentiation primary response protein 88
ASL : Airway surface liquid	NET : Neutrophil extracellular trap
ASSF : Asthme sévère avec sensibilisation fongique	NHEJ : Non-homologous end-joining
BPCO : Bronchopneumopathie chronique obstructive	NK : Natural killer
CARD9 : Caspase recruitment domain-containing protein 9	NLRP3 : NOD-, LRR- and pyrin domain-containing 3
CF : Cystic fibrosis	PAMP : Pathogen associated molecular pattern
CFTR : Cystic fibrosis transmembrane regulator	PBMC : Peripheral blood mononuclear cell
CLR : C-type lectin receptor	pDC : Plasmacytoid dendritic cell
CMI : Concentration minimale inhibitrice	PIG1 : Pigment of Magnaporthe 1
CMR1 : Colletotrichum melanin regulation	PKS : Polyketide synthase
CPA : Cellule présentatrice d'antigène	PNE : Polynucléaire éosinophile
CRCM : Centre de ressources et de compétences de la mucoviscidose	PNN : Polynucléaire neutrophile
CRP : C-reactive protein	PRM : Peptidorhamnomannane
DC : Dendritic cell	PRR : Pattern recognition receptor
DC-SIGN : DC-specific ICAM3-grabbing non-integrin	PTX-3 : Pentraxine-3
DHN-mélanine : 1,8-dihydroxynaphtalène mélanine	ROS : Reactive oxygen species
ENaC : Epithelial sodium channel	RPE : Résonance paramagnétique électronique
EpCAM : Epithelial cell adhesion molecule	SCD : Scytalone deshydratase
FT : Facteur de transcription	SIDA : Syndrome d'immunodéficience humaine acquise
GlcCer : Glucosylcéramide	SOD : Superoxyde dismutase
Hog : High osmolarity glycerol	SP-D : Surfactant protein D
ILC2 : Innate lymphoid cell 2	SYK : Spleen tyrosine kinase
ISHAM : International society for human and animal mycology	TDP : Tyrosine degradation pathway
IV : Intraveineuse	TLR : Toll-like receptor
LAP : LC3 associated phagocytosis	TNF : Tumor necrosis factor
	T <sub>reg</sub> : Cellule T régulatrice
	UV : Ultraviolet
	VEMS : Volume Expiratoire Maximal Seconde
	VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

# Liste des figures

Figure 1 : Prévalence de la mucoviscidose par département de résidence en France en 2021 (nombre de patients pour 100 000 habitants) (5).....	6
Figure 2 : Physiopathologie de l'atteinte respiratoire dans la mucoviscidose. Schéma personnel adapté de (8,11). .....	9
Figure 3 : Aspects macroscopique (A) et microscopique (B) d' <i>Aspergillus fumigatus</i> cultivé sur milieu Sabouraud-chloramphénicol (72h, 30°C).....	35
Figure 4 : Spectre d'atteintes cliniques provoquées par <i>Aspergillus</i> et <i>Scedosporium</i> en fonction de l'intensité de réponse immunitaire de l'hôte, adapté de (32,33).....	36
Figure 5 : Aspects macroscopique et microscopique de <i>Scedosporium apiospermum</i> cultivé sur milieu Sabouraud-chloramphenicol (14 jours, 30°C).....	39
Figure 6 : Réponse immunitaire antifongique à l'infection pulmonaire par les spores d' <i>A. fumigatus</i> (modèle), initiée par les macrophages alvéolaires et autres effecteurs innés. Schéma personnel inspiré de (65,66,69)...	42
Figure 7 : TLRs des cellules dendritiques et des macrophages impliqués dans la reconnaissance de <i>Scedosporium</i> , d'après la revue (60).....	43
Figure 8 : Voies de signalisation impliquées dans la défense antifongique à partir de la reconnaissance des champignons par les CLR's présents à la surface des phagocytes, en lien avec l'activation des réponses cellulaires T, par Speakman et coll. (70).....	44
Figure 9 : Structure pariétale des spores d' <i>Aspergillus fumigatus</i> et de <i>Scedosporium</i> spp. (A,B) Représentation schématique d'après (119,143). (B) Surface des spores d' <i>A. fumigatus</i> (C) et <i>S. boydii</i> (D) en microscopie de force atomique, d'après (115,116).....	52
Figure 10 : Structures des principaux types de mélanine décrits dans le règne fongique (164).....	55
Figure 11 : Schéma simplifié des principales voies de biosynthèse de mélanines fongiques et des molécules utilisées pour inhiber ces voies (156,163,165–168). ....	56
Figure 12 : Cluster génique contrôlant la biosynthèse de DHN-mélanine, schéma personnel d'après (172,173). Hyp. : hypothetical ; TF : transcription factor. ....	59
Figure 13 : Exemple de structures fongiques mélanisées.....	61
Figure 14 : Microstructure de la levure <i>Cryptococcus neoformans</i> (A) (adapté de (196)) et des spores d' <i>Aspergillus fumigatus</i> (B) (140) et de <i>Scedosporium boydii</i> (C) (144) en microscopie électronique à transmission. ....	63
Figure 15 : Mécanismes d'échappement à la réponse phagocytaire induits par la présence de DHN-mélanine dans les spores fongiques. ....	67
Figure 16 : Prévalence des colonisations respiratoires bactériennes (A) et fongiques (B) chez les patients atteints de mucoviscidose aux CRCM de Rennes et d'Angers (2011, 2020). ....	84
Figure 17 : Prévalence des colonisation bactériennes (A) et fongiques (B) par classe d'âge, chez les patients atteints de mucoviscidose suivis aux CRCM de Rennes et d'Angers, en 2011 et 2020. ....	85
Figure 18 : Pourcentage de patients recevant un modulateur de CFTR par classe d'âge. ....	85
Figure 19 : Représentation de Venn des gènes différentiellement exprimés entre le mutant M1 et le mutant T, respectivement comparés à leur souche parentale : (A) Gènes surexprimés ; (B) Gènes réprimés, par rapport à la souche parentale .....	168

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification des mutations CFTR, d'après (6,7).....	8
Tableau 2 : Principales manifestations cliniques de la mucoviscidose, d'après (9). ....	8
Tableau 3 : Critères diagnostiques de l'ABPA, d'après (37). ....	37
Tableau 4 : Principaux facteurs de virulence connus chez <i>A. fumigatus</i> et <i>Scedosporium</i> spp.....	50
Tableau 5 : Types de mélanine et voies de biosynthèse présumés chez différents champignons impliqués en pathologie humaine, d'après la revue de Smith & Casadevall (170) et (160). ....	58
Tableau 6 : Impact de la mélanine fongique sur la sensibilité aux antifongiques (revue de la littérature non exhaustive). ....	74
Tableau 7 : Recueil épidémio-clinique des colonisations microbiennes des patients atteints de mucoviscidose suivis aux CRCM des CHU de Rennes et d'Angers, en 2011 et 2020. ....	83
Tableau 8 : Recueil épidémio-clinique des patients sous modulateurs de CFTR ou non, en 2020. ....	86
Tableau 9 : Gènes différentiellement exprimés communs aux mutants M1 et T, comparativement à leur souche parentale respective.....	168

## Annexe

Annexe 1 : Moisissures dans l'environnement et impacts sur la santé humaine. ....	200
---	-----



# REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

---



# I. Mucoviscidose et risque fongique

## 1. La mucoviscidose

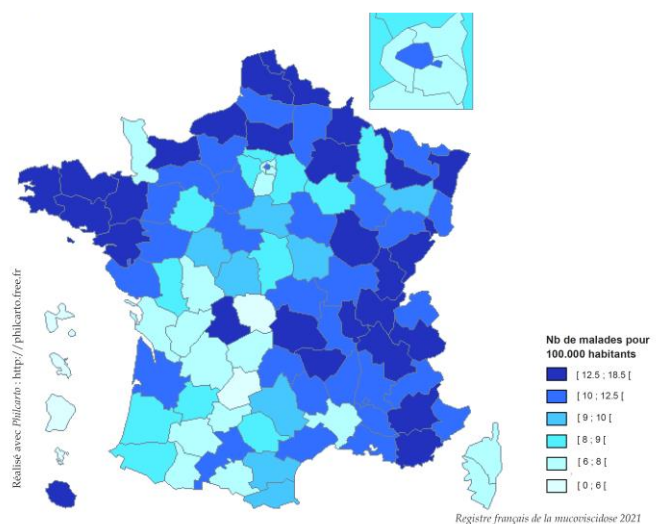
### a. Définition, épidémiologie

Du latin *mucus* (« mucus ») et *viscum* (« glu »), la mucoviscidose ou fibrose kystique (*cystic fibrosis*, CF) est la plus fréquente des maladies génétiques héréditaires graves dans la population caucasienne. Transmise sur le mode autosomique récessif, cette affection résulte d'une ou plusieurs mutation(s) du gène *CFTR* (*Cystic fibrosis transmembrane regulator*), qui n'a été identifié qu'en 1989.

La mucoviscidose est traditionnellement considérée comme affectant exclusivement la population caucasienne et donc prévalente seulement en Europe, en Amérique du Nord et en Australasie. Cependant, bien que sévissant à des niveaux plus faibles qu'en Europe et en Amérique du Nord, cette maladie existe aussi au Moyen-Orient, en Asie et en Amérique latine.

### Quelques chiffres

- Dans le monde : le nombre de personnes diagnostiquées est estimé à **105 000**, ce qui ne représenterait que 65% de la population réellement atteinte (3).
- En Europe : il existe un dense réseau d'infrastructures participant au recensement des cas (registres actifs dans 37 pays) et la population diagnostiquée est estimée à près de **48 000** patients (données de la société européenne de la mucoviscidose). La prévalence estimée à la naissance est d'environ une naissance sur **2500** (4,3).
- En France :
  - Il y avait **7 513** patients recensés en 2021, avec des disparités régionales en termes de prévalence, **Fig.1**. Environ 2 millions de personnes sont porteuses d'une mutation à l'état hétérozygote.
  - L'âge médian des patients est de 22,8 ans, avec une espérance de vie qui ne cesse d'augmenter ; de 7 ans pour les enfants nés en 1965 à près de 50 ans pour ceux qui naissent aujourd'hui.



**Figure 1 : Prévalence de la mucoviscidose par département de résidence en France en 2021 (nombre de patients pour 100 000 habitants) (5).**

L'évolution et l'amélioration de la prise en charge médicale en France ont été notamment marquées par :

- La création de l'Observatoire National de la Mucoviscidose (2001), rebaptisé Registre Français de la Mucoviscidose en 2007.
- La mise en place du dépistage néonatal systématique et la désignation des Centres de Ressources et de Compétences de la Mucoviscidose (CRCM) en 2002.
- La disponibilité des traitements modulateurs de CFTR (correcteurs, potentialisateurs, stabilisateurs) agissant directement sur la cause et qui ont un impact très positif sur la santé des patients éligibles (Kalydeco® en 2012, Orkambi® en 2015, Symkevi® en 2018, Kaftrio® en 2021).

En France, le diagnostic est majoritairement porté dans le contexte du diagnostic néonatal (63%), de la survenue d'un iléus méconial (13%), de symptômes respiratoires (14%), d'antécédents familiaux (12%), d'un retard de croissance ou encore de diarrhées chroniques (5).

## b. Physiopathologie

La protéine CFTR est une glycoprotéine de la superfamille des transporteurs ABC (*ATP Binding Cassette*) présente à la surface des cellules épithéliales, qui assure le transport des ions chlorures et bicarbonates vers le milieu extracellulaire. Depuis la découverte originale de la mutation de *CFTR* la plus fréquente, résultant en la délétion d'une phénylalanine (Phe508del,  $\Delta F508$ ), près de 2 000 mutations ont été progressivement identifiées. Les mutations sont séparées en deux groupes : les mutations considérées comme sévères (classes I, II et III) en cas de fonction de CFTR minimale ou absente, et comme non sévères (classes IV, V, VI) s'il persiste une fonction résiduelle de CFTR, comme détaillé dans le **Tableau 1**.

Le défaut de la protéine CFTR engendrée (absence totale ou déficit fonctionnel, défaut de transport, défaut de stabilité, etc...) dépend de l'anomalie génétique. Les génotypes homozygotes Phe508del (mutation sévère de classe II) sont classiquement associés à des formes plus graves.

Ce canal ionique est présent à la membrane apicale des cellules épithéliales de nombreux organes incluant les poumons et le tractus respiratoire supérieur, le pancréas, le foie et la vésicule biliaire, les intestins, les glandes sudoripares et l'appareil génital reproducteur. Étant donné la très large distribution de la protéine CFTR dans l'organisme, la mucoviscidose est une maladie multi-systémique, mais l'atteinte pulmonaire est la principale cause de morbidité et de mortalité, **Tableau 2**.

**Tableau 1 : Classification des mutations CFTR, d'après (6,7).**

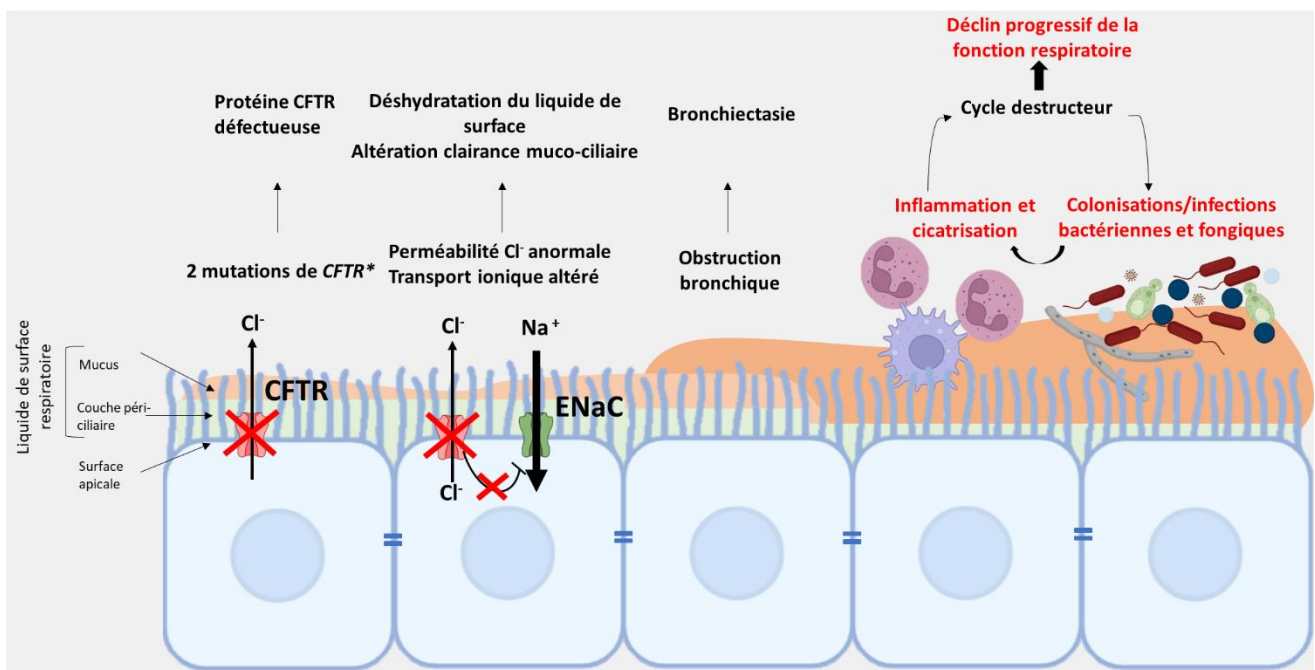
Classe	Mutations sévères			Mutations peu sévères		
	I <sup>a</sup>	II	III	IV	V	VI
Type d'anomalie de la protéine CFTR	Défaut de synthèse (protéine tronquée)	Défaut de maturation et d'export à la membrane	Défaut d'ouverture du canal	Défaut de conductance	Synthèse réduite	Instabilité protéique, demi-vie courte
	<b>Absence de protéines</b>	<b>Absence de transport</b>	<b>Protéines non fonctionnelles</b>	<b>Protéines avec une fonctionnalité réduite</b>	<b>Moins de protéines</b>	<b>Protéines avec une stabilité réduite</b>
Exemple de mutations	G542X 394delTT 1717-1G>A	F508del R1066C A561E	G551D S549R G1349D	R117H R334W	3849+10kb C>T A455E 3272-26A>G	Q1412X c.120del23

<sup>a</sup> Cette classe est séparée en 2 sous-groupes dans la classification de De Boeck (8) pour distinguer les patients potentiels répondeurs à une thérapie correctrice de CFTR (I : ARNm présent), des non-répondeurs (classe VII : absence d'ARNm de *CFTR*).

**Tableau 2 : Principales manifestations cliniques de la mucoviscidose, d'après (9).**

Organe	Manifestations cliniques
<b>Poumons</b>	Infections bactériennes et fongiques récurrentes ou chroniques Bronchiectasies, pneumothorax, hémoptysie et détresse respiratoire
<b>Voies respiratoires supérieures</b>	Sinusite chronique et polypes nasaux
<b>Pancréas</b>	Insuffisance pancréatique exocrine par destruction pancréatique, et pancréatite
<b>Foie</b>	Ictère néonatal, stéatose hépatique, cirrhose, et calcul biliaire
<b>Intestins</b>	Iléus méconial, syndrome d'occlusion distale de l'intestin, malnutrition et dyslipidémie
<b>Appareil reproducteur</b>	Homme : agénésie des canaux déférents, azoospermie et infertilité Femme : anomalie du mucus cervical, hypofertilité
<b>Endocrine</b>	Diabète

La protéine CFTR est principalement connue comme un canal chlore<sup>-</sup> des glandes exocrines qui interagit avec d'autres canaux ioniques, de façon à maintenir la balance osmotique du mucus et sa viscosité. Dans un épithélium respiratoire sain, la protéine CFTR secrète normalement les ions Cl<sup>-</sup> à la membrane apicale des cellules épithéliales, ce qui limite la réabsorption des ions Na<sup>+</sup> par régulation négative sur le canal ENaC (*Epithelial sodium channel*), afin de maintenir l'équilibre hydro-électrolytique (10). Dans la mucoviscidose, le défaut de protéine CFTR fonctionnelle bloque la sécrétion d'ions Cl<sup>-</sup> et bicarbonates, qui résulte en une hyper-réabsorption des ions Na<sup>+</sup> à l'origine de la déshydratation du liquide de surface respiratoire (ASL, *airway surface liquid*) et de l'hyperviscosité du mucus, **Fig.2**. Les conséquences sont une clairance muco-ciliaire altérée, des colonisations/infections bactériennes et fongiques chroniques, et des dommages progressifs du tissu pulmonaire, se traduisant cliniquement par un encombrement respiratoire et la diminution progressive du VEMS (Volume Expiratoire Maximal Seconde) avec l'âge.



**Figure 2 : Physiopathologie de l'atteinte respiratoire dans la mucoviscidose.** Schéma personnel adapté de (8,11).

\* La maladie ne s'exprime que si les deux allèles du gène *CFTR* sont mutés.

## 2. Infections fongiques au cours de la mucoviscidose

Dans la mucoviscidose, le risque d'infection fongique associé à l'exposition environnementale n'est que partiellement connu. Le poids des différents champignons retrouvés chez les patients atteints de mucoviscidose, ainsi que leurs réservoirs et les modalités de prévention du risque fongique, sont abordés dans la revue ci-dessous.

Manuscrit en préparation

### 1 **Exposure of cystic fibrosis patients to fungi: the role of the environmental** 2 **reservoir**

3 Ravenel Kévin<sup>1</sup>, Guegan Hélène<sup>2</sup>, Gastebois Amandine<sup>1</sup>, Bouchara Jean-Philippe<sup>1</sup>, Gangneux Jean-Pierre<sup>2</sup> and  
4 Giraud Sandrine<sup>1</sup>

5 <sup>1</sup>Univ Angers, Univ Brest, IRF (Infections Respiratoires Fongiques), SFR ICAT 4208, Angers, France.

6 <sup>2</sup> Univ Rennes, CHU Rennes, Inserm, EHESP, IRSET (Institut de Recherche en Santé Environnement et Travail) -  
7 UMR\_S 1085, Rennes, France

8

### 9 **Introduction**

10 With an incidence of 1:4000 and 1:5000 in North America and in Europe respectively, cystic fibrosis (CF) is one  
11 of the most common inherited disease in Caucasian populations (1,2). This disease results from mutations of  
12 the gene *CFTR* (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) encoding a transmembrane protein at  
13 the apical membrane of numerous epithelial cells (3). The CFTR protein corresponds to an anion channel  
14 involved in exchanges of chloride and other halogen ions across the cell membrane. Although several organs  
15 are affected, morbidity and mortality hinge on the severity of lungs lesions. In the airways, the impaired function  
16 of CFTR proteins leads to a defect in the chloride efflux and an increased activity of epithelial sodium channel,  
17 resulting in a higher absorption of sodium and water, and therefore to the dehydration of the bronchial mucus.  
18 The resulting sticky viscous mucus fails to be cleared by muco-ciliary system and facilitates the entrapment of  
19 airborne microorganisms (virus, bacteria and fungi), responsible for colonization and infections. These latter  
20 trigger periods of pulmonary exacerbations resulting in progressive lung function decline and ultimately in  
21 respiratory failure.

22 Fungi account for a significant part of the exposome during CF. In particular, filamentous fungi may contribute  
23 together with other microbial and chemical allergens and toxics to inflammation and clinical deterioration (4).  
24 The knowledge of fungal reservoirs and the monitoring of long-term contamination in dwellings are pivotal  
25 steps to propose remediation and prevention to the patients (5,6).

26

## 27 **Microbiology of respiratory tracts of CF patients**

### 28 **1. Viral and bacterial colonizations/infections**

29 The overall prevalence of viral infections is estimated at around 40% and mainly affect children. The most  
30 commonly identified viruses in CF patients are the respiratory syncytial virus (RSV), rhinovirus, Influenza A and  
31 B (7). Although these infections occur with the same frequency as in healthy people, they are associated with  
32 an increased severity in the context of CF, and result in a progressive deterioration of the respiratory function  
33 (8,9). This clinical observation has been linked to a reduced innate antiviral response in CF individuals (10,11).  
34 Moreover, it may be due to interactions of viruses with bacteria (12). Indeed, recent studies suggest that the  
35 presence of RSV promotes *P. aeruginosa* biofilm formation by an increased secretion of transferrin used by the  
36 bacteria to obtain iron (13).

37 Bacteria are the most commonly microorganisms encountered in the respiratory tract, especially  
38 *Staphylococcus aureus* (prevalence of chronic infection: from 12% to 57%) and *Pseudomonas aeruginosa*  
39 (prevalence of chronic infection: from 19% to 53.3%) (14). *Staphylococcus aureus* is commonly found in younger  
40 children (prevalence of chronic infection up to 80% of CF children) whereas the prevalence of *P. aeruginosa*  
41 increased in older children and adults (prevalence of chronic infection up to 80% of the adult CF population)  
42 (15). *Haemophilus influenzae* is isolated with a prevalence of 22% during the first 20 years of life (16). Other  
43 opportunistic bacterial pathogens are found in the respiratory airways of CF patients with lower prevalence,  
44 such as *Stenotrophomonas maltophilia* and *Achromobacter xylosoxidans* (14). Moreover, despite its low  
45 frequency (2 to 4%), *Burkholderia cepacia* complex, mainly reported in the CF context, is of important concern;  
46 it has been linked to a decrease in long-term survival of CF patients (17–19). Infections by non-tuberculous  
47 mycobacteria, especially *Mycobacterium abscessus* have been also described and may be favored by previous  
48 antimicrobial exposure, responsible for selection pressure of these bacteria frequently resistant *in vitro* to  
49 multiple antibiotics (20,21).

50  
51 Within the global CF care improvement, the suitable management of the bacterial respiratory infections lead  
52 to a significant increase in life expectancy of the CF patient (from 7 years old in 1965 to 47 years old when born  
53 after 2000) (2). Consequently, this has resulted in an increased frequency of fungal colonization/infections of  
54 the airways of CF patients, which generally occur in a pre-damaged lung. A recent study performed in 9  
55 European CF centers indicated that a respiratory colonization by at least one fungus was observed in 28% of  
56 patients in Germany, and up to 78% of samples in Austria) (22).

57



## 58 **2. Fungal infections**

### 59 **i. Yeast colonizations/infections**

60 Yeast infections are almost exclusively due to *Candida* species, which prevalence can reach 93% in adults, as  
61 they are classical colonizers of upper respiratory tract. The most common species identified is *C. albicans*, but  
62 it is not uncommon to detect other species such as *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, or *C. parapsilosis* in sputum  
63 samples from CF patients. *Candida dubliniensis* is more and more usually reported; this may be related to its  
64 increased adherence properties (23), but also to the growing use of matrix-assisted laser desorption ionization-  
65 time of flight/mass spectrometry (MALDI-TOF/MS) for routine yeast identification that easily distinguishes *C.*  
66 *dubliniensis* from *C. albicans*, compared to chromogenic media. A prospective study including 56 CF patients  
67 over a 30 month-period confirmed that *Candida* may be persistent colonizers of the respiratory tract, and that  
68 transmission between siblings may be possible (24). Moreover, Chotirmall *et al.* suggested that a chronic  
69 colonization was associated with worse clinical outcomes (25) and that this effect was more pronounced with  
70 *C. dubliniensis* (26).

71 Other yeast species have been sporadically reported in the CF context, such as *Trichosporon* spp, especially *T.*  
72 *mycotoxinivorans* or *Arxula (Blastobotrys) adenivorans* that have been reported in pneumonia or fatal  
73 systemic infections in lung transplant CF patients (27–29). Of note, with the current development of high-  
74 throughput sequencing approaches that enhance the knowledge of microbial diversity, some fungi have been  
75 recently identified as potentially relevant in studies focusing on the CF airway mycobiome. For instance,  
76 *Malassezia* yeasts may be associated to CF pulmonary exacerbations, whereas until now, the lipid dependency  
77 of this yeast prevented its growth on standard mycological media, and thus its consideration (30,31)

### 78 **ii. Colonizations/infections with filamentous fungi**

79 Several different filamentous fungi can be recovered from the airways of CF patients. It is important to  
80 differentiate colonization and infections. In the CF context, a repeated fungal isolation in the absence of clinical  
81 symptoms and impairment of respiratory functions corresponds to a colonization, whereas the repeated fungal  
82 recovery combined with clinical symptoms are more consistent with an infection. The mycological examination  
83 of CF sputum samples is mainly performed by cultural methods, and it was previously demonstrated that the  
84 procedures used in clinical laboratories (digestion of the sputum, nature of culture media, duration of  
85 incubation) highly affect the fungal recovery (32,33). Moreover, various identification methods can be  
86 employed: microscopic examination remains the gold standard whereas MALDI-TOF/MS is increasingly used as  
87 complementary identification tool. Molecular identification methods can also be useful (34,35), especially in  
88 case of poorly sporulating fungal isolates (*a fortiori* from patients under antifungal therapy) or to identify cryptic  
89 species in *Aspergillus* for example (36).

90

91 • **Aspergillus**

92 *Aspergillus* spp are the most common filamentous fungi recovered from the airways of CF patients and species  
93 from the *Aspergillus Fumigati* section are the most prevalent, especially *A. fumigatus sensu stricto*, which is  
94 recovered in 4 to 60% of patients, with a steady increase with age (37). This fungus is an ubiquitous germ present  
95 both indoors and outdoors, in the air or on any surface, promoting colonization of the respiratory tract.  
96 *Aspergillus* section *Terrei* is considered as the third filamentous fungi reported in frequency in the CF context  
97 (prevalence from 1.9% to 6.2%), although the species distribution can vary according to the center and the  
98 geographical area (37). Other *Aspergilli* were also significantly found in the sputum of CF patients: *A. Flavi*, *A.*  
99 *Nigri* and *A. Nidulantes* were detected in respectively 3.4%, 2.9% and 1.9% of CF patients (38). Colonization with  
100 cryptic species from the *Fumigati* section were also sporadically reported, such as *A. lentulus* and *Neosartoya*  
101 *pseudofischeri* (39).

102 Genotyping studies performed on *A. fumigatus* and *A. terreus* identified three distinct colonization patterns: i)  
103 a chronic colonization by a predominant genotype, ii) chronic colonization by several genotypes concomitantly  
104 and, iii) transient colonizations by several genotypes (40–42). Moreover, a genotype selection was observed  
105 with a prolonged colonization by *A. fumigatus*: several genotypes were recovered from patients recently  
106 colonized but their number decreased with the duration of colonization (43,44). The same *A. fumigatus*  
107 genotype can also be recovered from both sputum sample and cough aerosol, suggesting a possible human-to-  
108 human transmission (45). The clinical relevance of *Aspergillus* colonization is still a matter of debate. According  
109 to Vrankrijker *et al.*, it is difficult to conclude whether the infection induces lung damages, or whether the  
110 weakened state of the lungs allows colonization (46). In the CF context, *A. fumigatus* is responsible for various  
111 diseases including asthma, allergic broncho-pulmonary aspergillosis (ABPA), bronchitis, aspergilloma but also  
112 invasive pulmonary infections after lung transplantation (47,48). The most common clinical manifestation  
113 caused by *Aspergillus* in CF is ABPA, with a prevalence of 0.9% to 15%, and this complication may be associated  
114 with a deterioration of respiratory functions from CF patients (46,49). Outside any ABPA context, although *A.*  
115 *fumigatus*-colonized patients have a lower lung capacity, combined with more prominent radiological  
116 abnormalities and are more frequently hospitalized, a causal relationship still needs to be confirmed (50).

117 • **Scedosporium**

118 *Scedosporium* ranks the second among filamentous fungi colonizing the airways of CF patients (51–53), and are  
119 of particular importance because of their difficult diagnosis and their low susceptibility to current antifungals.  
120 *Scedoporium* prevalence varies widely according to the study and the identification methods used (32). Several  
121 independent studies demonstrated that *Scedosporium* isolation was increased by the use of semi-selective  
122 culture media such as YPDA supplemented with cycloheximide, DRBC- benomyl or Sce-Sel<sup>+</sup>, and Scedo-SelectIII  
123 (54–56). The inhibition of fast-growing fungi (like *Aspergillus* species) by these media facilitates *Scedosporium*  
124 isolation. Except *S. dehoogii*, all *Scedosporium* species are able to colonize the airways of CF patients. However,  
125 geographical discrepancies in species prevalence were observed. In France, *S. boydii* is the most frequent

126 species isolated in CF context (62% of isolates), followed by *S. apiospermum* (24%) (51). *S. apiospermum* and *S.*  
 127 *aurantiacum* are predominant in Germany and in Australia, respectively (57,58). Finally, similar prevalence of  
 128 *S. aurantiacum*, *S. boydii* and *S. apiospermum* were found in China (59).

129 Usually, the colonization pattern of *Scedosporium* corresponds to a chronic colonization by a predominant  
 130 genotype (52,60). The presumed entry portal of *Scedosporium* conidia into the airways involves nasal cavity and  
 131 sinuses, before reaching the lungs (*via* trachea), where they stayed entrapped due to the particular  
 132 microenvironment. *Scedosporium* spp are not commensal microorganisms of the respiratory tracts. Although  
 133 no clear association with clinical relevance was established, chronic colonization may contribute to the  
 134 exacerbation of the inflammatory reaction and, therefore, to the progressive deterioration of lung function  
 135 (61). If in most cases, airway colonization with *Scedosporium* is asymptomatic, allergic bronchopulmonary  
 136 mycosis (MBPA) may occur, as reported due to *S. apiospermum* (62) alone or combined with *Aspergillus*  
 137 (38,63,64). Moreover, *Scedosporium* spp may be responsible for disseminated scedosporiosis, often fatal in case  
 138 of severe immunosuppression, as in the specific context of lung transplantation (28,65,66).

#### 139 • **Other fungi**

140 The respiratory tracts of CF patients may also be colonized by other filamentous fungi such as *Rasamsonia*  
 141 *argillacea* species complex, *Lomentospora prolificans* or *Exophiala dermatitidis*.

142 *L. prolificans*, initially considered as a member of the *Scedosporium* genus, appeared finally  
 143 phylogenetically distinct, based on molecular analyses (67). A European multicenter study carried out in the  
 144 first half of the 2010s identified only a few patients (up to 3.8%) who were transiently or chronically colonized  
 145 by *L. prolificans*. This fungus exhibits a low susceptibility to the main antifungal drugs. According to recent  
 146 treatment guidelines, the voriconazole has the highest efficacy, and should be combined with terbinafine as  
 147 first-line treatment (68). In the CF context, lung colonization by *L. prolificans* is usually asymptomatic, but it can  
 148 become threatening in case of immunodeficiency related to a lung transplant, and cause invasive disseminated  
 149 infections in specific localizations such as endophthalmitis and osteomyelitis.

150 *Rasamsonia argillacea* (previously known as *Geosmithia argillacea*) is a species complex (69) able to  
 151 colonize the airways of CF patients (70–73). Three of the four species of this complex have been recovered in  
 152 CF context: *R. argillacea sensu stricto*, *R. aegroticola* and *R. piperina* (72,74,75). As previously reported for *A.*  
 153 *fumigatus* and *Scedosporium* species, these fungi may be chronic colonizers. No clear relationship was  
 154 established between this colonization of the airways of CF patient and a clinical and functional deterioration  
 155 (74,76). However, a case report of *R. argillacea* pathogenicity in a CF patient prompt us to vigilance and further  
 156 investigations (77).

157 *Exophiala dermatitidis* grows as a black yeast at 37°C, and as a filamentous fungus at room temperature.  
 158 This worldwide distributed fungus has been described in the CF context mainly in Germany and in the  
 159 Netherlands with a prevalence varying from 0.5 to 17% depending on the geographical areas and the use of a  
 160 selective media (Erythritol- Chloramphenicol agar, ECA). Airway colonization by *A. fumigatus* and homozygosity

161 F508del would be predisposing factors for the colonization by *E. dermatitidis* (78). Typing isolates demonstrated  
162 a typical colonization from specific reservoirs of the fungus (79). Initially reported in saunas and steam rooms  
163 in Japan and Europe (80), *E. dermatitidis* is commonly found in indoor environments, especially bathroom,  
164 kitchen and dishwashers (81–83). A recent report from Ayling-Smith *et al.* suggests a temporal relationship  
165 between *E. dermatitidis* colonization and the decline of lung function in a retrospective case-control study  
166 involving 31 *E. dermatitidis*-colonized patients (84).  
167 Finally, others were sporadically reported in the CF context, such as *Acrophialophora fuispora* (37) or  
168 *Pneumocytis jirovecii*, as recently reviewed (85).

### 169 ***iii. Toward a new epidemiological landscape of fungal infections in CF patients ?***

170 It is to be expected that in the coming years, the global burden of microbial infections may change in patients  
171 eligible for therapy with the new combined therapies of CFTR modulators, potentiators or correctors (86–88).  
172 These promising triple combinations have been shown to greatly improve overall mucus clearance and lung  
173 function in adult patients with lung function impairment. However, it remains to be addressed to what extent  
174 these drugs can break the viscous cycle of chronic polymicrobial infections (89).

## 175 ***3. Environmental sources of fungi***

176 In the line of the “One health” approach which recognizes that the human health is interconnected to the health  
177 of animals and the environment, it may also be important to better understand the ecology of these fungi to  
178 prevent human infections. Alternative and preventive measures should be proposed for people at risk such as  
179 CF patients, in order to reduce their risk of exposure to these fungi.

### 180 ***i. Outdoor reservoirs***

181 Numerous fungi are ubiquitous in the environment that represent a major reservoir for yeasts and filamentous  
182 fungi. Specifically, the environmental niche of *Aspergillus* is the soil and decaying vegetation, thus numerous  
183 spores contribute to outdoor but also indoor bioaerosols. More recently, the environmental reservoir of  
184 *Aspergillus* is becoming a reservoir of azole-resistant *A. fumigatus* that constitutes a major public health concern  
185 as discussed below.

- 186 • ***Azole fungicide use in the environment and azole-resistant Aspergillus***

187 Azoles are antifungal agents with a broad-spectrum activity used in human health, as well as in plant and crop  
188 protection or in preservation of material such as woods, paints and wall paper paste. Medical triazoles such as  
189 voriconazole, itraconazole, posaconazole and isavuconazole are essential to treat invasive aspergillosis and  
190 other severe fungal infections. The Infectious Diseases Society of America (IDSA) recommends the  
191 administration of voriconazole as primary treatment for invasive aspergillosis. Itraconazole is preferred in cases  
192 of chronic pulmonary aspergillosis (90), most frequently encountered in patients with CF. Agricultural azoles

193 such as tebuconazole, belong to plant protection products (PPP) and are widely used against phytopathogenic  
194 fungi. Their popularity may be explained by their inexpensive cost and by their persistence under an active form  
195 in soil and water for several months, as well as in several fruits and vegetables. Considering the mechanism of  
196 action, all azole molecules affect the biosynthesis of ergosterol, which is an important membrane lipid of fungal  
197 cells, common to yeast and filamentous fungi. By analogy with mammalian cholesterol, the ergosterol is  
198 involved in the structure and the fluidity of the cell membrane, and its absence in other eukaryotic cells makes  
199 it a perfect antifungal target. Azole drugs act on the CYP51A enzyme which catalyzes the lanosterol  
200 demethylation reaction, an important step in ergosterol biosynthesis (91).

201 Widely described in bacteria, the development of antimicrobial resistance also emerged among fungi, especially  
202 against the triazole class. The first case of triazole resistance in *Aspergillus fumigatus* (itraconazole) was  
203 described in an isolate from a patient in Manchester, UK in 1997 (92). Since this discovery, pan-azole resistant  
204 *A. fumigatus* strains have been reported in clinical and environmental samples all over the world, displaying a  
205 decreased susceptibility to several triazoles. The definition of resistance is based on the determination of  
206 minimum inhibitory concentration (MIC), corresponding to the lowest dose of antifungal that inhibits the fungal  
207 growth. Based on pharmacokinetic and pharmacodynamic characteristics, as well as on *in vitro* intrinsic fungal  
208 susceptibility, clinical MIC breakpoints were defined to categorize *Aspergillus* strains according to their  
209 susceptibility to the 4 triazoles (itraconazole, voriconazole, posaconazole and isavuconazole), into 3 categories:  
210 susceptible at standard dose, susceptible at increased exposure and resistant. The values provided by the  
211 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) in the USA and the European Union Committee on  
212 Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) for Europe are the same for itraconazole and voriconazole and  
213 are very close for the other two azoles (93).

214 Two routes of CYP51A-mediated resistance have been identified and are characterized by distinct and specific  
215 molecular mechanisms: i) *in vivo* selection of resistant *A. fumigatus* isolates as a consequence of long-term  
216 triazoles exposure and, ii) *de novo* acquisition of a resistant strain directly acquired from the environment.

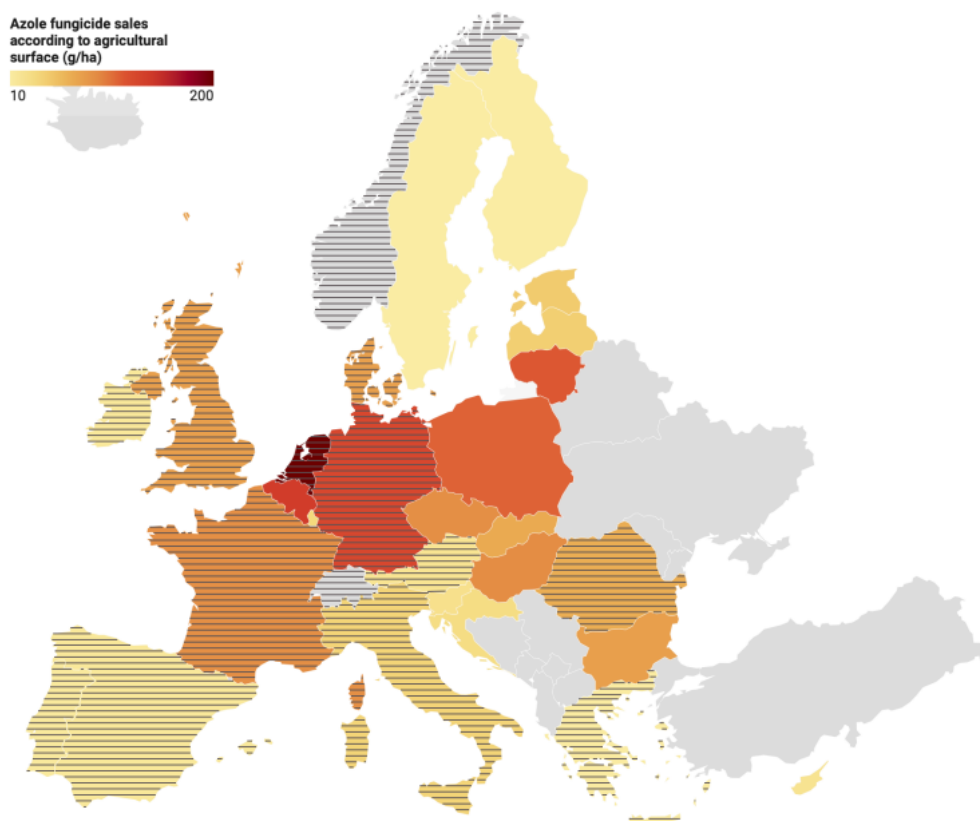
217 The selection pressure under medical triazole therapy is mainly due to nonsynonymous nucleotide substitutions  
218 in the CYP51A gene. Positions G54, M220 and G448 may be considered as hot spot mutations. The resulting  
219 inhibition of the ergosterol biosynthesis pathway affects cell transport and membrane structure. Of note,  
220 although less predominant, other relevant CYP51A6 independent mechanisms of resistance have been recently  
221 reviewed in *A. fumigatus* (94), including the overexpression of multidrug efflux pumps (95), or mutations  
222 affecting other signaling pathways such as the HMG-CoA reductase (*HMG1*) (96).

223 Two specific signatures were reported in azole resistant environmental strains : a tandem repeat of 34 or 46  
224 base pairs in the promoter region of the CYP51A gene, leading to upregulation of its mRNA expression,  
225 combined with one or several substitutions in the gene, reducing the binding affinity of azoles for the enzyme  
226 (TR<sub>34</sub>/L98H and TR<sub>46</sub>/Y121F/T289A) (97,98). Due to similar structure and activities, azoles used in agriculture  
227 can induce cross-resistance to medical azoles in *Aspergillus* (99,100). A recent study based on population

228 genomics data demonstrated that environmental-to-clinical acquisition *via* inhalation of fungal spores occurs  
229 and is not a rare occurrence (101).

230 Several studies were carried out around the world, in order to precise and characterize the presence of azole-  
231 resistant *Aspergillus* isolates in the environment. A majority of the azole-resistant isolates were found in Europe,  
232 where the azole use is common. There is significant overlap between their geographical presence and the  
233 environmental azole use, as shown in **Figure 1**. This correlation is particularly true in regions where the azole  
234 part in overall use of antifungal and bactericidal molecules is high, as in the Netherland and in Germany, and in  
235 a lesser extent in France, Denmark, Romania and UK. However, clinical azole-resistant *Aspergillus* isolates with  
236 TR<sub>34</sub>/L98H or TR<sub>46</sub>/Y121F/T289A mutations were reported in Poland (102,103) and in Belgium (104,105). More  
237 than half of the resistant isolates were recovered from developed environments (*i.e.* public parks, gardens,  
238 homes, workplaces or hospitals), although agricultural sites were sampled more frequently. The board  
239 application of agricultural azole fungicides is not sufficient to explain the global spread of azole resistance. Plant  
240 bulbs, and more generally floriculture products has been demonstrated to participate in this phenomenon  
241 (106), incriminating specifically plants or flower gardens, potted plants and commercial compost.

242



243

244 **Figure 1. Agricultural azole fungicides use and azole-resistant *Aspergillus fumigatus* environmental strains**  
245 **in Europe.** Colors represent azole fungicide sales, according agricultural surface (g/ha) obtained from Eurostat  
246 (<https://ec.europa.eu/eurostat/fr/home>). Dash lines indicate that azole-resistant *Aspergillus fumigatus* isolates from the  
247 environment (agricultural, developed or others) have been reported in literature.

248

249

250 Based on these results, it becomes obvious the problem of azole-resistance selection should be considered  
 251 using a One health approach. This process was initiated in early 2019, during a workshop including medical and  
 252 agricultural researchers, fungicide producers, end-users, as well as representatives from government and public  
 253 health. Results from such collaborative work may be expected in the medium and long-term.

254 How do resistant *A. fumigatus* strains impact on the clinical management of CF patients?

255 As triazoles are still the mainstay of the antifungal therapy during CF-associated ABPA, the high spread of azole  
 256 resistance among CF *A. fumigatus* isolates may threaten the adequate therapeutic management of these  
 257 patients. There are currently no clinical data available for guiding therapeutic considerations, and many hopes  
 258 are pinned on the new antifungal molecules potential active on azole resistant *A. fumigatus*, still under  
 259 validation in clinical trials (107).

260 • ***Fungi in the composting process***

261 Organic wastes have become an environmental concern in modern society and composting represents one of  
 262 the most efficient methods for sustainable waste management. This complex biological conversion of solid  
 263 organic waste into end products like fertilizers depends on various factors which can be related to or influenced  
 264 by each other: the resident microbial community (108,109), the substrate (nature, size, composition) or the  
 265 physico-chemical conditions (temperature, oxygen content, humidity...) (110,111). Usually, the compost  
 266 process entails 3 different phases characterized by different microbial communities. Firstly, during the  
 267 mesophilic phase (up to 40°C), a degradation of the soluble and readily degradable compounds is carried out  
 268 by mesophilic microorganisms. The following thermophilic phase (over 40°C) allows a strong selection of  
 269 thermotolerant and extremotolerant organisms, which are adapted to high temperatures and are essential for  
 270 biochemical process (like lignin degradation). Finally, mesophilic microorganisms take over for the mesophilic  
 271 curing phase and participate to the maturation of the remaining organic content (112).

272 As they use various carbon sources and can survive in extreme conditions, fungi play a very important role in  
 273 the composting process: the ratio between fungal and bacterial biomasses in compost is about 2:1 (113). During  
 274 the last decade, some authors studied the mycobiota of compost, and several potentially harmful fungal species  
 275 were found. *A. fumigatus*, *A. terreus* and *S. apiospermum* were recovered during the whole process including  
 276 the final products in an active composting plant, in Liguria (northwestern Italy). Moreover, *S. aurantiacum*, *S.*  
 277 *dehoogii* and *Rasamsonia emersonii* were also identified as important compost-associated fungal species (114),  
 278 **Table 1.** A Brazilian study demonstrated that *A. fumigatus* was abundant during all pressmud (a substrate  
 279 derived from sugarcane juice filtrate) composting stages, and that *L. prolificans* was still present at the end of  
 280 the process (115). *L. prolificans* also appeared during the maturation phase of a tomato plant and pine  
 281 woodchips compost (116). Moreover, *A. fumigatus* and *S. boydii* were reported as the most abundant species  
 282 in a mesophilic compost as vermicomposting, an alternative technology increasingly used in many countries  
 283 (117).

284 **Table 1. Location settings, detection methods and frequency of fungal species in compost processes**  
 285 **and indoor environments.**

Matrix	Detection Method (complementary information)	Opportunistic pathogen for CF patient	Species among fungi	proportionRef detected
Compost	Molecular identification (ITS)	<i>Lomentospora prolificans</i>		(116)
	Molecular identification (ITS)	<i>Lomentospora prolificans</i>	43.1%	(115)
	Culture (PDA, 25°C, 1-28 days)	<i>Aspergillus</i> spp		(118)
	Culture (Sabouraud, 2-7 days)	<i>Aspergillus</i> spp	34.4%	(119)
	Molecular identification (ITS and LSU)	<i>Aspergillus</i> spp		
		<i>Scedosporium</i> spp		(114)
		<i>Lomentospora prolificans</i>		
	Culture (PDA, 50°C, 7 days)	<i>Rasamsonia emersonii</i>	8.2–39.5%	(120)
	Molecular identification (ITS)			
	Culture (PDA/CMC, 24/37/45°C)	<i>Aspergillus</i> spp		
<i>Scedosporium</i> spp			(117)	
Molecular identification (ITS)	<i>Exophiala</i> spp			
	<i>Aspergillus</i> spp			
	<i>Scedosporium</i> spp		(121)	
Potted plants	Culture (Sabouraud + 30% sucrose and Littman agar, RT or 37°C, 7-28 days)	<i>Scedosporium</i> spp		(122)
	Culture (DRBC medium)	<i>Scedosporium</i> spp		(123)
Dishwasher	Culture (ECA and Cherry decoction agar, 36-40°C, at least 21 days) + Molecular identification (ITS)	<i>Exophiala</i> spp	11.3%	(80)
		<i>Exophiala dermatitidis</i>	2.3%	
	Molecular identification (ITS)	<i>Exophiala</i> spp	24.6%	(124)
		<i>Exophiala dermatitidis</i>	1.6%	
	Molecular identification (ITS and LSU)	<i>Exophiala dermatitidis</i>		(125)
	Molecular identification (ITS)	<i>Exophiala dermatitidis</i>		(126)
Pets	Culture (Sabouraud, 37°C, 1-3 days) + Molecular identification (ITS)	<i>Exophiala dermatitidis</i>		(127)
	Retrospective study based on a questionnaire survey	<i>Aspergillus fumigatus</i>		(128)
	Retrospective study based on a questionnaire survey	<i>Aspergillus fumigatus</i>		(129)

286 CMC: carboxymethylcellulose; DRBC: dichloran rose-bengal chloramphenicol; ECA: erythrol chloramphenicol agar; PDA:  
 287 potato dextrose agar; ITS: internal transcribed spacer of ribosomal DNA; LSU: large subunit of ribosomal DNA.  
 288

289  
 290 Considering azole-resistant *Aspergillus*, the concept of azole resistance hotspot emerged recently. The presence  
 291 of resistant isolates in a sample does not implicate that the resistance developed in that sample. An azole



292 resistance hotspot is defined as an environment (i) containing azole fungicides, (ii) exhibiting favourable  
293 conditions for the fungal growth and, (iii) spread for a prolonged period (130). As decaying plant waste appeared  
294 to be characteristics of these sites, flower bulb waste, green waste and wood chipping were the first azole  
295 resistant hotspots identified (91,130,131).

296 Finally, during the composting process, bioaerosols are generated containing biological hazards like bacteria  
297 and fungi, and consequently represent a risk to human health (especially workers and public living in close  
298 proximity to compost facilities). Implications of the released bioaerosols are especially significant for open  
299 composting plants, since they are directly released into the surrounding environment. *A. fumigatus* was  
300 regularly reported as one of the dominant culturable microorganisms in composting bioaerosols (132,133).  
301 Moreover, investigation on thermophilic fungi near 3 different compost types (municipal, agricultural and  
302 horticultural), evidenced a high occurrence of *Rasamsonia emersonii* in the air (120). Differences observed for  
303 some species between their incidence in bioaerosols and associated compost, may be partly explained by  
304 differences on spore ontogeny and spore liberation (120). The distance at which composting aerosols remains  
305 detectable is one important parameter health risk assessment. Highly variable results can be found in the  
306 literature: from 30m to 1400m (134–136). To date, inflammatory and respiratory outcomes among compost  
307 workers were associated with exposure to composting aerosols (137–139). Concerning nearby residents,  
308 divergent results were obtained. However, Herr et al. reported irritative respiratory complaints similar to  
309 mucous membrane irritation, and excessive tiredness, within a population living close (150-200 m) to a plant  
310 composting site (137).

## 311 **ii. Indoor reservoirs**

312 The environmental reservoir to which any individual may be exposed results from all their activities  
313 (professional, school or hobbies). In a modern society, most of time is spent in indoor environments, usually  
314 confined due to thermal insulation. Thus, indoor air quality contributes to the potential risk of being exposed  
315 to environmental molds and some elements increased the presence of opportunistic fungal pathogens.

### 316 • **Wet indoor environments**

317 Humidity is a major factor of mold growth, either visible on painting walls or wallpapers, or invisible. When  
318 visible, macroscopic colonies allow a rapid diagnosis, usually associated to water damage or thermal bridge.  
319 However, techniques more sensitive than culture evidenced also microscopic and/or invisible indoor  
320 contamination, particularly in wet places such as bathrooms or kitchens. Flooded buildings following hurricanes  
321 and tsunamis represent the extreme and persistent dampness situation, that results in long-term moldy  
322 dwellings. Indoor dampness is also associated to house dust mites, bacteria, mycotoxins and endotoxins, and  
323 volatile organic compounds. Moisture levels required for growth of selected microorganisms, in construction,  
324 finishing and furnishing materials are presented in **Table 2**.

325 **Table 2. Moisture levels required for growth of selected microorganisms in construction, finishing**  
 326 **and furnishing materials (140).**

High moisture level (aw, > 0.90; ERH, > 90%)	Tertiary colonizers (hydrophilic)	
	<i>Alternaria alternata</i> <i>Aspergillus fumigatus</i> <i>Epicoccum</i> spp. <i>Exophiala</i> spp. <i>Fusarium moniliforme</i> <i>Mucor plumbeus</i> <i>Phoma herbarum</i> <i>Phialophora</i> spp.	<i>Rhizopus</i> spp. <i>Stachybotrys chartarum</i> ( <i>S. atra</i> ) <i>Trichoderma</i> spp. <i>Ulocladium consortiale</i> <i>Rhodotorula</i> spp. <i>Sporobolomyces</i> spp. Actinobacteria (or Actinomycetes)
Intermediate moisture level (aw, 0.80–0.90; ERH, 80–90%)	Secondary colonizers	
	<i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus versicolora</i> <i>Cladosporium cladosporioides</i> <i>Cladosporium herbarum</i>	<i>Cladosporium sphaerospermum</i> <i>Mucor circinelloides</i> <i>Rhizopus oryzae</i>
Low moisture level (aw, < 0.80; ERH, < 80%)	Primary colonizers (xerophilic)	
	<i>Alternaria citri</i> <i>Aspergillus (Eurotium) amstelodami</i> <i>Aspergillus candidus</i> <i>Aspergillus (Eurotium) glaucus</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus penicillioides</i> <i>Aspergillus (Eurotium) repens</i> <i>Aspergillus restrictus</i> <i>Aspergillus versicolorb</i>	<i>Paecilomyces variotii</i> <i>Penicillium aurantiogriseum</i> <i>Penicillium brevicompactum</i> <i>Penicillium chrysogenum</i> <i>Penicillium commune</i> <i>Penicillium expansum</i> <i>Penicillium griseofulvum</i> <i>Wallemia sebi</i>

327 ERH: equilibrium relative humidity

328 • **Potted plants and *Scedosporium***

329 *Scedosporium* is mainly found in anthropized outdoor environments, such as soil or polluted water, but it is  
 330 scarce in indoor environments. The first isolation of *Scedosporium* inside buildings was reported in 1989. It was  
 331 recovered from five potted plants in a corridor of the medical unit of Toronto hospital. Four out of the five  
 332 plants were invaded by a significant load of *S. apiospermum* among other fungi (97 CFU/g soil) (122).  
 333 Another study was carried out in France in 2007, in the homes of six CF patients colonized by *Scedosporium*. A  
 334 total of 136 samples were collected in different rooms of the indoor environment (bedroom, living room,  
 335 bathroom), including air, water, surface and soil samples. *Scedosporium* was absent from all air, water or  
 336 surface samples (except one). Although soil samples from garden were also negative, more than 70% of soil  
 337 samples from potted plants were positive (41/57) (123). This study clearly identified potted plant as indoor  
 338 reservoir of *Scedosporium*. The association of these data with the potential role of floriculture products in the  
 339 global spread of azole-resistant *Aspergillus*, lead to a ban of potted plants in medical units, and this interdiction  
 340 should be extended to the homes of patients with CF (Table 1).

341 • **Dishwashers and *Exophiala***

342 By contrast with *A. fumigatus* which is a fungus ubiquitous in indoor environments, some fungal species are  
343 specifically associated with water-related parts, such as bathrooms or kitchens. Although scarce outdoors,  
344 *Exophiala dermatitidis* was regularly recovered in these specific indoor environments (124,141). The first  
345 isolation of *E. dermatitis* in household was reported in 1982 from a humidifier (142). It was then detected in  
346 steam baths in various countries where the high temperature favored its development (80,143,144). Moreover,  
347 its presence in biofilms at water taps was correlated with some water chemical parameters, *i.e.* concentration  
348 of calcium and magnesium ions and nitrates (125). However, the main indoor reservoir of *E. dermatitis* is  
349 represented by dishwaters (124,125,127). Only extremotolerant fungi are able to survive to conditions inside  
350 dishwashers, *i.e.* high temperature, changing pH and high salt concentrations. Various studies demonstrated  
351 that *E. dermatitidis* mainly colonizes rubbers, drains and sides nozzles of the dishwasher interiors. The  
352 phenomenon may be linked to its capacity to degrade aromatic compound (present in added surfactant from  
353 the rubber seals) (124,125,127) (**Table 1**). Fungi may be spread in the kitchen *via* dishwasher waste water and  
354 hot aerosols released after the washing cycle, where they were detected. A Turkish study revealed that *E.*  
355 *dermatitidis* was the most prevalent black yeast colonizing surfaces of kitchens with dishwasher, whereas it was  
356 negligible on surface of kitchens without dishwasher (145). Of note, among the three genotypes of *E. dermatitis*,  
357 the genotype A preponderant in human infections, is also prevalent in dishwashers (146). Finally, *E. dermatitis*  
358 was also isolated from rubbers seals in refrigerators (147).

359 • **Pets and Aspergillus**

360 Colonization of indoor environments can result from several phenomena, and pets which are vectors of  
361 microorganisms, may play a significant role. For example, dogs carried many fungi (148), some of which are  
362 similar to those found in houses. In the context of CF, case reports demonstrated that contamination by an  
363 airborne opportunistic pathogen from a pet was possible. Only interspecies transmission of bacteria such as *P.*  
364 *aeruginosa* (149) or *B. bronchiseptica* (150) have been clearly observed, but the transfer of fungal spores is  
365 conceivable (**Table 1**). Researchers in Berlin have investigated the prevalence of ABPA in CF patients owning a  
366 pet. Thereby, they found that there was a significantly greater occurrence of ABPA in the group of pet-owner  
367 patients, compared to patients who do not have pets (128). To clarify these preliminary observations, and to  
368 determine whether the type of pet had an impact on the risk of fungal disease, another study was conducted  
369 on a larger cohort of patients, supporting a higher rate of ABPA case among adult dog owners (129).

370

371 **iii. Indoor fungal contamination assessment**

372 The aim of the environmental monitoring in dwellings of patients with chronic respiratory diseases such as  
373 patients with asthma or CF is to evaluate the exposure to the total fungal flora (151). By comparison,  
374 environmental monitoring in hospitals focus on the detection of viable and virulent fungi that may cause  
375 potential nosocomial infections. The detection of abnormal fungal development at home must evaluate the  
376 abundance and the diversity of fungi using numerous methods, from culturomics to genomics and biochemistry.

377 • **Samples**

378 The most pertinent samples to study the mycoflora in dwellings are air samples, surface samples and dust  
379 (152,153). Air sampling with air liquid impaction device is preferred to bioimpaction, because it allows fungal  
380 detection by culture but also with molecular methods. The limitation of air samples is, that they represent the  
381 airborne microbial concentrations during only a limited time, usually a few minutes of sampling. Surface  
382 samples using cotton swabs (standardized using 5x5 to 20x20 cm areas) allow a long-term monitoring of the  
383 contamination and the evaluation of efficacy of remediation and cleaning. Finally, dust sampling is probably the  
384 preferred method to evaluate the long-term contamination of dwellings. Two main technics are used: dust  
385 obtained by vacuum cleaning from a given area of carpets or hard floors (usually 1–2m<sup>2</sup>), and dust passive  
386 sedimentation on electrostatic dust textiles. Dust accumulates the mycoflora during days and days and, is the  
387 most representative sample of the past fungal exposure. Furthermore, mycotoxins and other allergens can also  
388 be detected on this matrix.

389 • **Methods**

390 There is no “gold standard method” and all these techniques have specific advantages and limits (153).  
391 Culture on Sabouraud Agar, Malt extract Agar or DG 18 medium, allow the detection in a few days of most of  
392 viable fungi. However, dead fungi may also represent a threat because fungal fragments and fungal components  
393 and secondary metabolites also account for host reactions that can be associated to health deterioration.  
394 Furthermore, culture only partially describes the fungal flora and may underestimate the burden of some fungi  
395 depending on their equilibrium relative humidity (ERH – see **table 2**) and the temperature of culture.  
396 Quantitative PCR allow the detection of the total flora with a higher sensitivity, without missing non-viable and  
397 non-culturable flora. A pan-fungal qPCR gives an evaluation of the total burden of fungi, but without distinction  
398 between species. By contrast, targeted detection is possible by qPCR using specific primers and the most refined  
399 multiplex approach is the evaluation of the Environmental relative-moldiness index (ERMI) described by Steve  
400 Vesper from the Environmental protection agency (EPA) in Cincinnati, Missouri, USA. The mould specific  
401 quantitative PCR (MSQPCR) amplifies 26 common fungi associated with water-damaged homes (Group 1) and  
402 10 common fungi in all homes because they originate primarily from outdoors (vegetation, soil etc) (Group 2).  
403 Then a complex equation produces an index and a scale that proved usefull for comparing the mold burden in  
404 homes (154). Metagenomics methods, especially new generation sequencing (NGS) are more and more useful

405 to describe and understand complex environments in deciphering the different communities of micro-  
406 organisms (155). The method consists either in targeted metagenomics to detect bacteria (sequencing of the  
407 16S rRNA gene), fungi (ITS gene), and all eukaryote (18S rRNA gene), or using a shotgun whole genome approach  
408 (Danish homes/Sassi). Characterization of the environmental microbiome and mycobiome is the most powerful  
409 method to detect non-viable and non-culturable flora and to compare different conditions. Finally, surrogate  
410 markers such as cell wall components (mainly ergosterol and beta-glucans), mycotoxins, fungal volatile organic  
411 compounds or other fungal allergens can be detected using various methods from ELISA to mass spectrometry.  
412 Until now, these markers are considered less specific and discriminant than culture or molecular detection.

413

414 This review emphasizes the diversity of the microbial environmental reservoir, to which CF patients are  
415 constantly exposed. *A. fumigatus* and *S. apiospermum* are the most frequently isolated fungi in these patients  
416 and may be associated with an important morbidity. Their ubiquitous presence in both indoor and outdoor  
417 environments implies the need to monitor the overall fungal environmental load, through adequate methods,  
418 in order to implement primary prevention strategies.

419

420

421

422 **References**

- 423 1. Scotet V, Gutierrez H, Farrell PM. Newborn Screening for CF across the Globe-Where Is It Worthwhile? Int  
424 J Neonatal Screen. 2020;6(1):18.
- 425 2. Elborn JS. Cystic fibrosis. Lancet. 2016;388(10059):2519-31.
- 426 3. Audrézet MP, Munck A, Scotet V, Claustres M, Roussey M, Delmas D, et al. Comprehensive CFTR gene  
427 analysis of the French cystic fibrosis screened newborn cohort: implications for diagnosis, genetic  
428 counseling, and mutation-specific therapy. Genet Med. 2015;17(2):108-16.
- 429 4. Schwarz C, Hartl D, Eickmeier O, Hector A, Benden C, Durieu I, et al. Progress in Definition, Prevention and  
430 Treatment of Fungal Infections in Cystic Fibrosis. Mycopathologia. 2018;183(1):21-32.
- 431 5. Szczesniak R, Rice JL, Brokamp C, Ryan P, Pestian T, Ni Y, et al. Influences of environmental exposures on  
432 individuals living with cystic fibrosis. Expert Rev Respir Med. 2020;14(7):737-48.
- 433 6. Ramsay KA, Stockwell RE, Bell SC, Kidd TJ. Infection in cystic fibrosis: impact of the environment and  
434 climate. Expert Rev Respir Med. 2016;10(5):505-19.
- 435 7. Blanchard AC, Waters VJ. Microbiology of Cystic Fibrosis Airway Disease. Semin Respir Crit Care Med.  
436 2019;40(06):727-36.
- 437 8. van Ewijk BE, van der Zalm MM, Wolfs TFW, Fleer A, Kimpen JLL, Wilbrink B, et al. Prevalence and impact  
438 of respiratory viral infections in young children with cystic fibrosis: prospective cohort study. Pediatrics.  
439 2008;122(6):1171-6.
- 440 9. Hiatt PW, Grace SC, Kozinetz CA, Raboudi SH, Treece DG, Taber LH, et al. Effects of viral lower respiratory  
441 tract infection on lung function in infants with cystic fibrosis. Pediatrics. 1999;103(3):619-26.
- 442 10. Schögler A, Stokes AB, Casaulta C, Regamey N, Edwards MR, Johnston SL, et al. Interferon response of the  
443 cystic fibrosis bronchial epithelium to major and minor group rhinovirus infection. J Cyst Fibros.  
444 2016;15(3):332-9.
- 445 11. Esther CR, Lin FC, Kerr A, Miller MB, Gilligan PH. Respiratory viruses are associated with common  
446 respiratory pathogens in cystic fibrosis. Pediatr Pulmonol. 2014;49(9):926-31.
- 447 12. Johansen HK, Høiby N. Seasonal onset of initial colonisation and chronic infection with *Pseudomonas*  
448 *aeruginosa* in patients with cystic fibrosis in Denmark. Thorax. 1992;47(2):109-11.
- 449 13. Hendricks MR, Lashua LP, Fischer DK, Flitter BA, Eichinger KM, Durbin JE, et al. Respiratory syncytial virus  
450 infection enhances *Pseudomonas aeruginosa* biofilm growth through dysregulation of nutritional  
451 immunity. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016;113(6):1642-7.
- 452 14. Ciofu O, Hansen CR, Høiby N. Respiratory bacterial infections in cystic fibrosis. Curr Opin Pulm Med.  
453 2013;19(3):251-8.
- 454 15. Ryan C, Ross S, Davey P, Duncan EM, Francis JJ, Fielding S, et al. Prevalence and causes of prescribing errors:  
455 the PRescribing Outcomes for Trainee Doctors Engaged in Clinical Training (PROTECT) study. PLoS One.  
456 2014;9(1):e79802.
- 457 16. Cardines R, Giufrè M, Pompilio A, Fiscarelli E, Ricciotti G, Bonaventura GD, et al. *Haemophilus influenzae* in  
458 children with cystic fibrosis: Antimicrobial susceptibility, molecular epidemiology, distribution of adhesins  
459 and biofilm formation. International Journal of Medical Microbiology. 2012;302(1):45-52.
- 460 17. Whiteford ML, Wilkinson JD, McColl JH, Conlon FM, Michie JR, Evans TJ, et al. Outcome of *Burkholderia*  
461 (*Pseudomonas*) *cepacia* colonisation in children with cystic fibrosis following a hospital outbreak. Thorax.  
462 1995;50(11):1194-8.
- 463 18. Stephenson AL, Sykes J, Berthiaume Y, Singer LG, Aaron SD, Whitmore GA, et al. Clinical and demographic  
464 factors associated with post-lung transplantation survival in individuals with cystic fibrosis. J Heart Lung  
465 Transplant. 2015;34(9):1139-45.
- 466 19. Murray S, Charbeneau J, Marshall BC, LiPuma JJ. Impact of *burkholderia* infection on lung transplantation  
467 in cystic fibrosis. Am J Respir Crit Care Med. 2008;178(4):363-71.
- 468 20. Wetzstein N, Diricks M, Kohl TA, Wichelhaus TA, Andres S, Paulowski L, et al. Molecular Epidemiology of  
469 *Mycobacterium abscessus* Isolates Recovered from German Cystic Fibrosis Patients. Microbiol Spectr.  
470 2022;10(4):e0171422.
- 471 21. Degiacomi G, Sammartino JC, Chiarelli LR, Riabova O, Makarov V, Pasca MR. *Mycobacterium abscessus*, an  
472 Emerging and Worrisome Pathogen among Cystic Fibrosis Patients. Int J Mol Sci. 2019;20(23):E5868.
- 473 22. Schwarz C, Bouchara JP, Buzina W, Chrenkova V, Dmeńska H, de la Pedrosa EGG, et al. Organization of  
474 Patient Management and Fungal Epidemiology in Cystic Fibrosis. Mycopathologia. 2018;183(1):7-19.

- 475 23. Wahab AA, Taj-Aldeen SJ, Kolecka A, ElGindi M, Finkel JS, Boekhout T. High prevalence of *Candida*  
476 *dubliniensis* in lower respiratory tract secretions from cystic fibrosis patients may be related to increased  
477 adherence properties. Int J Infect Dis. 2014;24:14-9.
- 478 24. Muthig M, Hebestreit A, Ziegler U, Seidler M, Müller FMC. Persistence of *Candida* species in the respiratory  
479 tract of cystic fibrosis patients. Med Mycol. 2010;48(1):56-63.
- 480 25. Chotirmall SH, O'Donoghue E, Bennett K, Gunaratnam C, O'Neill SJ, McElvaney NG. Sputum *Candida*  
481 *albicans* presages FEV<sub>1</sub> decline and hospital-treated exacerbations in cystic fibrosis. Chest.  
482 2010;138(5):1186-95.
- 483 26. Al Shakirchi M, Klingspor L, Bergman P, Hjelte L, de Monestrol I. A 16-year retrospective study on fungal  
484 prevalence and diversity in patients with cystic fibrosis: *Candida dubliniensis* was associated with a decline  
485 in lung function. Int J Infect Dis. 2020;96:663-70.
- 486 27. Hickey PW, Sutton DA, Fothergill AW, Rinaldi MG, Wickes BL, Schmidt HJ, et al. *Trichosporon*  
487 *mycotoxivorans*, a novel respiratory pathogen in patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol.  
488 2009;47(10):3091-7.
- 489 28. Hirschi S, Letscher-Bru V, Pottecher J, Lannes B, Jeung MY, Degot T, et al. Disseminated *Trichosporon*  
490 *mycotoxivorans*, *Aspergillus fumigatus*, and *Scedosporium apiospermum* coinfection after lung and liver  
491 transplantation in a cystic fibrosis patient. J Clin Microbiol. 2012;50(12):4168-70.
- 492 29. Roehmel JF, Tintelnot K, Bernhardt A, Seibold M, Staab D, Schwarz C. *Arxula adenivorans* causing invasive  
493 pulmonary mycosis and fungaemia in cystic fibrosis. Lancet. 2015;385(9976):1476.
- 494 30. Soret P, Vandenborgh LE, Francis F, Coron N, Enaud R, Avalos M, et al. Respiratory mycobiome and  
495 suggestion of inter-kingdom network during acute pulmonary exacerbation in cystic fibrosis. Sci Rep.  
496 2020;10(1):3589.
- 497 31. Abdillah A, Ranque S. Chronic Diseases Associated with Malassezia Yeast. J Fungi (Basel). 2021;7(10):855.
- 498 32. Borman AM, Palmer MD, Delhaes L, Carrère J, Favennec L, Ranque S, et al. Lack of standardization in the  
499 procedures for mycological examination of sputum samples from CF patients: a possible cause for  
500 variations in the prevalence of filamentous fungi. Med Mycol. 2010;48 Suppl 1:S88-97.
- 501 33. Coron N, Pihet M, Fréalle E, Lemeille Y, Pinel C, Pelloux H, et al. Toward the Standardization of Mycological  
502 Examination of Sputum Samples in Cystic Fibrosis: Results from a French Multicenter Prospective Study.  
503 Mycopathologia. 2018;183(1):101-17.
- 504 34. Bouchara JP, Symoens F, Schwarz C, Chaturvedi V. Fungal Respiratory Infections in Cystic Fibrosis (CF):  
505 Recent Progress and Future Research Agenda. Mycopathologia. 2018;183(1):1-5.
- 506 35. Tortorano AM, Richardson M, Roilides E, van Diepeningen A, Caira M, Munoz P, et al. ESCMID and ECMM  
507 joint guidelines on diagnosis and management of hyalohyphomycosis: *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp.  
508 and others. Clin Microbiol Infect. 2014;20 Suppl 3:27-46.
- 509 36. Sabino R, Ferreira JAG, Moss RB, Valente J, Veríssimo C, Carolino E, et al. Molecular epidemiology of  
510 *Aspergillus* collected from cystic fibrosis patients. J Cyst Fibros. 2015;14(4):474-81.
- 511 37. Pihet M, Carrère J, Cimon B, Chabasse D, Delhaes L, Symoens F, et al. Occurrence and relevance of  
512 filamentous fungi in respiratory secretions of patients with cystic fibrosis-a review. Med Mycol.  
513 2009;47(4):387-97.
- 514 38. Paugam A, Baixench MT, Demazes-Dufeu N, Burgel PR, Sauter E, Kanaan R, et al. Characteristics and  
515 consequences of airway colonization by filamentous fungi in 201 adult patients with cystic fibrosis in  
516 France. Med Mycol. 2010;48 Suppl(Suppl 1):S32-36.
- 517 39. Symoens F, Haase G, Pihet M, Carrère J, Beguin H, Degand N, et al. Unusual *Aspergillus* species in patients  
518 with cystic fibrosis. Med Mycol. 2010;48(Suppl 1):S10-16.
- 519 40. Vanhee LM, Symoens F, Bouchara JP, Nelis HJ, Coenye T. High-resolution genotyping of *Aspergillus*  
520 *fumigatus* isolates recovered from chronically colonised patients with cystic fibrosis. Eur J Clin Microbiol  
521 Infect Dis. 2008;27(10):1005-7.
- 522 41. de Valk HA, Klaassen CH, Yntema JB, Hebestreit A, Seidler M, Haase G, et al. Molecular typing and  
523 colonization patterns of *Aspergillus fumigatus* in patients with cystic fibrosis. J Cyst Fibros. 2009;8(2):110-4.
- 524 42. Rougeron A, Giraud S, Razafimandimby B, Meis JF, Bouchara JP, Klaassen CH. Different colonization  
525 patterns of *Aspergillus terreus* in patients with cystic fibrosis. Clin Microbiol Infect. 2013; Disponible sur:  
526 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23927682>
- 527 43. Neuvéglise C, Sarfati J, Debeauvais JP, Vu Thien H, Just J, Tournier G, et al. Longitudinal study of *Aspergillus*  
528 *fumigatus* strains isolated from cystic fibrosis patients. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1997;16(10):747-50.

- 529 44. Cimon B, Symoens F, Zouhair R, Chabasse D, Nolard N, Defontaine A, et al. Molecular epidemiology of  
530 airway colonisation by *Aspergillus fumigatus* in cystic fibrosis patients. J Med Microbiol.  
531 2001;50(4):367-74.
- 532 45. Engel TGP, Erren E, Vanden Driessche KSJ, Melchers WJG, Reijers MH, Merkus P, et al. Aerosol Transmission  
533 of *Aspergillus fumigatus* in Cystic Fibrosis Patients in the Netherlands. Emerg Infect Dis. 2019;25(4):797-9.
- 534 46. de Vrankrijker AMM, van der Ent CK, van Berkhout FT, Stellato RK, Willems RJL, Bonten MJM, et al.  
535 *Aspergillus fumigatus* colonization in cystic fibrosis: implications for lung function? Clin Microbiol Infect.  
536 2011;17(9):1381-6.
- 537 47. Solé A, Vicente R, Morant P, Salavert M, Santos M, Morales P, et al. [Lung transplantation for cystic fibrosis:  
538 infectious events]. Med Clin (Barc). 2006;126(7):255-8.
- 539 48. Iversen M, Burton CM, Vand S, Skovfoged L, Carlsen J, Milman N, et al. *Aspergillus* infection in lung  
540 transplant patients: incidence and prognosis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2007;26(12):879-86.
- 541 49. Wojnarowski C, Eichler I, Gartner C, Götz M, Renner S, Koller DY, et al. Sensitization to *Aspergillus fumigatus*  
542 and lung function in children with cystic fibrosis. Am J Respir Crit Care Med. 1997;155(6):1902-7.
- 543 50. Speirs JJ, van der Ent CK, Beekman JM. Effects of *Aspergillus fumigatus* colonization on lung function in  
544 cystic fibrosis. Curr Opin Pulm Med. 2012;18(6):632-8.
- 545 51. Zouhair R, Rougeron A, Razafimandimby B, Kobi A, Bouchara JP, Giraud S. Distribution of the different  
546 species of the *Pseudallescheria boydii/Scedosporium apiospermum* complex in French patients with cystic  
547 fibrosis. Med Mycol. 2013;51(6):603-13.
- 548 52. Defontaine A, Zouhair R, Cimon B, Carrère J, Bailly E, Symoens F, et al. Genotyping study of *Scedosporium*  
549 *apiospermum* isolates from patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol. 2002;40(6):2108-14.
- 550 53. Lackner M, Rezusta A, Villuendas MC, Palacian MP, Meis JF, Klaassen CH. Infection and colonisation due to  
551 *Scedosporium* in Northern Spain. An in vitro antifungal susceptibility and molecular epidemiology study of  
552 60 isolates. Mycoses. 2011;54 Suppl 3:12-21.
- 553 54. Rainer J, Kaltseis J, de Hoog SG, Summerbell RC. Efficacy of a selective isolation procedure for members of  
554 the *Pseudallescheria boydii* complex. Antonie Van Leeuwenhoek. 2008;93(3):315-22.
- 555 55. Horrè R, Marklein G. Isolation and clinical significance of *Pseudallescheria* and *Scedosporium* species. Med  
556 Mycol. 2009;47(4):415-21.
- 557 56. Sedlacek L, Graf B, Schwarz C, Albert F, Peter S, Würstl B, et al. Prevalence of *Scedosporium* species and  
558 *Lomentospora prolificans* in patients with cystic fibrosis in a multicenter trial by use of a selective medium.  
559 J Cyst Fibros. 2015;14(2):237-41.
- 560 57. Bernhardt A, Sedlacek L, Wagner S, Schwarz C, Würstl B, Tintelnot K. Multilocus sequence typing of  
561 *Scedosporium apiospermum* and *Pseudallescheria boydii* isolates from cystic fibrosis patients. J Cyst Fibros.  
562 2013;12(6):592-8.
- 563 58. Blyth CC, Middleton PG, Harun A, Sorrell TC, Meyer W, Chen SC. Clinical associations and prevalence of  
564 *Scedosporium* spp. in Australian cystic fibrosis patients: identification of novel risk factors? Med Mycol.  
565 2010;48 Suppl 1:S37-44.
- 566 59. Chen M, Kondori N, Deng S, Gerrits van den Ende AHG, Lackner M, Liao W, et al. Direct detection of  
567 *Exophiala* and *Scedosporium* species in sputa of patients with cystic fibrosis. Med Mycol.  
568 2018;56(6):695-702.
- 569 60. Morio F, Horeau-Langlard D, Gay-Andrieu F, Talarmin JP, Haloun A, Treilhaud M, et al. Disseminated  
570 *Scedosporium/Pseudallescheria* infection after double-lung transplantation in patients with cystic fibrosis.  
571 J Clin Microbiol. 2010;48(5):1978-82.
- 572 61. Giraud S, Bouchara JP. *Scedosporium apiospermum* Complex: Diagnosis and Species Identification. Current  
573 Fungal Infection Reports. 2014;8(3):211-9.
- 574 62. Cimon B, Carrère J, Vinatier JF, Chazalotte JP, Chabasse D, Bouchara JP. Clinical significance of  
575 *Scedosporium apiospermum* in patients with cystic fibrosis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2000;19(1):53-6.
- 576 63. Lake FR, Tribe AE, McAleer R, Froudust J, Thompson PJ. Mixed allergic bronchopulmonary fungal disease  
577 due to *Pseudallescheria boydii* and *Aspergillus*. Thorax. 1990;45(6):489-91.
- 578 64. Kramer R, Sauer-Heilborn A, Welte T, Guzman CA, Abraham WR, Höfle MG. Cohort Study of Airway  
579 Mycobiome in Adult Cystic Fibrosis Patients: Differences in Community Structure between Fungi and  
580 Bacteria Reveal Predominance of Transient Fungal Elements. J Clin Microbiol. 2015;53(9):2900-7.



- 581 65. Castiglioni B, Sutton DA, Rinaldi MG, Fung J, Kusne S. *Pseudallescheria boydii* (Anamorph *Scedosporium*  
582 *apiospermum*). Infection in solid organ transplant recipients in a tertiary medical center and review of the  
583 literature. *Medicine (Baltimore)*.2002;81(5):333-48.
- 584 66. Thomson S, Alibhai K, Winkelaar G, Lien D, Halloran K, Kapasi A, et al. Case report of vertebral osteomyelitis  
585 and mycotic abdominal aortic aneurysm caused by *Scedosporium apiospermum* in a lung transplant patient  
586 with cystic fibrosis. *Transplant Proc.* 2015;47(1):204-9.
- 587 67. Lackner M, de Hoog GS, Yang L, Ferreira Moreno L, Ahmed SA, Andreas F, et al. Proposed nomenclature  
588 for *Pseudallescheria*, *Scedosporium* and related genera. *Fungal Diversity.* 2014;67(1):1-10.
- 589 68. Hoenigl M, Salmanton-García J, Walsh TJ, Nucci M, Neoh CF, Jenks JD, et al. Global guideline for the  
590 diagnosis and management of rare mould infections: an initiative of the European Confederation of  
591 Medical Mycology in cooperation with the International Society for Human and Animal Mycology and the  
592 American Society for Microbiology. *Lancet Infect Dis.* 2021;21(8):e246-57.
- 593 69. Houbraken J, Spierenburg H, Frisvad JC. *Rasamsonia*, a new genus comprising thermotolerant and  
594 thermophilic *Talaromyces* and *Geosmithia* species. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2012;101(2):403-21.
- 595 70. Barton RC, Borman AM, Johnson EM, Houbraken J, Hobson RP, Denton M, et al. Isolation of the fungus  
596 *Geosmithia argillacea* in sputum of people with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol.* 2010;48(7):2615-7.
- 597 71. Giraud S, Pihet M, Razafimandimby B, Carrere J, Degand N, Mely L, et al. *Geosmithia argillacea*: an  
598 emerging pathogen in patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol.* 2010;48(7):2381-6.
- 599 72. Masoud-Landgraf L, Badura A, Eber E, Feierl G, Marth E, Buzina W. Modified culture method detects a high  
600 diversity of fungal species in cystic fibrosis patients. *Med Mycol.* 2013; Disponible sur:  
601 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23651180>
- 602 73. Manso E, Cariani L, Fiscarelli E, Ravenni N, Tula VD, De Intinis G, et al. Isolation of filamentous fungi in the  
603 sputum of cystic fibrosis patients in Italy : state of the art and epidemiology. In: 2nd meeting of the  
604 ECMM/ISHAM Working group Fungal respiratory infections in Cystic Fibrosis (Fri-CF) Angers, France.
- 605 74. Giraud S, Favennec L, Bougnoux ME, Bouchara JP. *Rasamsonia argillacea* species complex: taxonomy,  
606 pathogenesis and clinical relevance. *Future Microbiol.* 2013;8(8):967-ç78.
- 607 75. Houbraken J, Giraud S, Meijer M, Bertout S, Frisvad JC, Meis JF, et al. Taxonomy and antifungal  
608 susceptibility of clinically important *Rasamsonia* species. *J Clin Microbiol.* 2013;51(1):22-30.
- 609 76. Abdolrasouli A, Bercusson AC, Rhodes JL, Hagen F, Buil JB, Tang AYY, et al. Airway persistence by the  
610 emerging multi-azole-resistant *Rasamsonia argillacea* complex in cystic fibrosis. *Mycoses.*  
611 2018;61(9):665-73.
- 612 77. Marguet C, Favennec L, Matray O, Bertout S, Giraud S, Couderc L, et al. Clinical and microbiological efficacy  
613 of micafungin on *Geosmithia argillacea* infection in a cystic fibrosis patient. *Med Mycol Case Reports.*  
614 2012;1:79-81.
- 615 78. Lebecque P, Leonard A, Huang D, Reyhler G, Boeras A, Leal T, et al. *Exophiala (Wangiella) dermatitidis* and  
616 cystic fibrosis - Prevalence and risk factors. *Med Mycol.* 2010;48 Suppl 1:S4-9.
- 617 79. Packeu A, Lebecque P, Rodriguez-Villalobos H, Boeras A, Hendrickx M, Bouchara JP, et al. Molecular typing  
618 and antifungal susceptibility of *Exophiala* isolates from patients with cystic fibrosis. *J Med Microbiol.*  
619 2012;61(Pt 9):1226-33.
- 620 80. Matos T, de Hoog GS, de Boer AG, de Crom I, Haase G. High prevalence of the neurotrope *Exophiala*  
621 *dermatitidis* and related oligotrophic black yeasts in sauna facilities. *Mycoses.* 2002;45(9-10):373-7.
- 622 81. Hamada N, Abe N. Comparison of fungi found in bathrooms and sinks. *Biocontrol Sci.* 2010;15(2):51-6.
- 623 82. Zalar P, Novak M, de Hoog GS, Gunde-Cimerman N. Dishwashers--a man-made ecological niche  
624 accommodating human opportunistic fungal pathogens. *Fungal Biol.* 2011;115(10):997-1007.
- 625 83. Döğen A, Ilkit M, de Hoog GS. Black yeast habitat choices and species spectrum on high altitude creosote-  
626 treated railway ties. *Fungal Biol.* 2013;117(10):692-6.
- 627 84. Ayling-Smith J, Speight L, Dhillon R, Backx M, White PL, Hood K, et al. The Presence of *Exophiala*  
628 *dermatitidis* in the Respiratory Tract of Cystic Fibrosis Patients Accelerates Lung Function Decline: A  
629 Retrospective Review of Lung Function. *J Fungi (Basel).* 2022;8(4):376.
- 630 85. Bonnet P, Le Gal S, Calderon E, Delhaes L, Quinio D, Robert-Gangneux F, et al. *Pneumocystis jirovecii* in  
631 Patients With Cystic Fibrosis: A Review. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020;10:571253.
- 632 86. Harvey C, Weldon S, Elborn S, Downey DG, Taggart C. The Effect of CFTR Modulators on Airway Infection  
633 in Cystic Fibrosis. *Int J Mol Sci.* 2022;23(7):3513.

- 634 87. Bercusson A, Jarvis G, Shah A. CF Fungal Disease in the Age of CFTR Modulators. *Mycopathologia*.  
635 2021;186(5):655-64.
- 636 88. Chesnay A, Bailly É, Cosson L, Flament T, Desoubeaux G. Advent of elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor for  
637 cystic fibrosis treatment: What consequences on *Aspergillus*-related diseases? Preliminary insights. *J Cyst*  
638 *Fibros*. 2022;S1569-1993(22)00683-X.
- 639 89. Bell SC, Mall MA, Gutierrez H, Macek M, Madge S, Davies JC, et al. The future of cystic fibrosis care: a global  
640 perspective. *Lancet Respir Med*. 2020;8(1):65-124.
- 641 90. Denning DW, Cadranell J, Beigelman-Aubry C, Ader F, Chakrabarti A, Blot S, et al. Chronic pulmonary  
642 aspergillosis: rationale and clinical guidelines for diagnosis and management. *Eur Respir J*.  
643 2016;47(1):45-68.
- 644 91. Burks C, Darby A, Gómez Londoño L, Momany M, Brewer MT. Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* in the  
645 environment: Identifying key reservoirs and hotspots of antifungal resistance. *PLoS Pathog*.  
646 2021;17(7):e1009711.
- 647 92. Denning DW, Venkateswarlu K, Oakley KL, Anderson MJ, Manning NJ, Stevens DA, et al. Itraconazole  
648 resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997;41(6):1364-8.
- 649 93. Jeanvoine A, Rocchi S, Bellanger AP, Reboux G, Millon L. Azole-resistant *Aspergillus fumigatus*: A global  
650 phenomenon originating in the environment? *Med Mal Infect*. 2020;50(5):389-95.
- 651 94. Pérez-Cantero A, López-Fernández L, Guarro J, Capilla J. Azole resistance mechanisms in *Aspergillus*: update  
652 and recent advances. *Int J Antimicrob Agents*. 2020;55(1):105807.
- 653 95. Fraczek MG, Bromley M, Buied A, Moore CB, Rajendran R, Rautemaa R, et al. The *cdr1B* efflux transporter  
654 is associated with non-*cyp51a*-mediated itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *J Antimicrob*  
655 *Chemother*. 2013;68(7):1486-96.
- 656 96. Rybak JM, Ge W, Wiederhold NP, Parker JE, Kelly SL, Rogers PD, et al. Mutations in *hmg1*, Challenging the  
657 Paradigm of Clinical Triazole Resistance in *Aspergillus fumigatus*. *mBio*. 2019;10(2):e00437-19.
- 658 97. Mellado E, Garcia-Effron G, Alcázar-Fuoli L, Melchers WJG, Verweij PE, Cuenca-Estrella M, et al. A new  
659 *Aspergillus fumigatus* resistance mechanism conferring in vitro cross-resistance to azole antifungals  
660 involves a combination of *cyp51A* alterations. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51(6):1897-904.
- 661 98. Verweij PE, Mellado E, Melchers WJG. Multiple-triazole-resistant aspergillosis. *N Engl J Med*.  
662 2007;356(14):1481-3.
- 663 99. Snelders E, Camps SMT, Karawajczyk A, Schaftenaar G, Kema GHJ, van der Lee HA, et al. Triazole fungicides  
664 can induce cross-resistance to medical triazoles in *Aspergillus fumigatus*. *PLoS One*. 2012;7(3):e31801.
- 665 100. Faria-Ramos I, Farinha S, Neves-Maia J, Tavares PR, Miranda IM, Estevinho LM, et al. Development of cross-  
666 resistance by *Aspergillus fumigatus* to clinical azoles following exposure to prochloraz, an agricultural  
667 azole. *BMC Microbiol*. 2014;14:155.
- 668 101. Rhodes J, Abdolrasouli A, Dunne K, Sewell TR, Zhang Y, Ballard E, et al. Population genomics confirms  
669 acquisition of drug-resistant *Aspergillus fumigatus* infection by humans from the environment. *Nat*  
670 *Microbiol*. 2022;7(5):663-74.
- 671 102. Nawrot U, Kurzyk E, Arendrup MC, Mroczynska M, Włodarczyk K, Sulik-Tyszka B, et al. Detection of Polish  
672 clinical *Aspergillus fumigatus* isolates resistant to triazoles. *Med Mycol*. 2018;56(1):121-4.
- 673 103. Brillowska-Dąbrowska A, Mroczyńska M, Nawrot U, Włodarczyk K, Kurzyk E. Examination of *cyp51A* and  
674 *cyp51B* expression level of the first Polish azole resistant clinical *Aspergillus fumigatus* isolate. *Acta Biochim*  
675 *Pol*. 2015;62(4):837-9.
- 676 104. Vermeulen E, Maertens J, De Bel A, Nulens E, Boelens J, Surmont I, et al. Nationwide Surveillance of Azole  
677 Resistance in *Aspergillus* Diseases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(8):4569-76.
- 678 105. Montesinos I, Dodemont M, Lagrou K, Jacobs F, Etienne I, Denis O. New case of azole-resistant *Aspergillus*  
679 *fumigatus* due to TR46/Y121F/T289A mutation in Belgium. *J Antimicrob Chemother*. 2014;69(12):3439-40.
- 680 106. Dunne K, Hagen F, Pomeroy N, Meis JF, Rogers TR. Intercountry Transfer of Triazole-Resistant *Aspergillus*  
681 *fumigatus* on Plant Bulbs. *Clin Infect Dis*. 2017;65(1):147-9.
- 682 107. Hoenigl M, Sprute R, Egger M, Arastehfar A, Cornely OA, Krause R, et al. The Antifungal Pipeline:  
683 Fosmanogepix, Ibrexafungerp, Olorofim, Opelconazole, and Rezafungin. *Drugs*. 2021;81(15):1703-29.
- 684 108. Liu L, Wang S, Guo X, Zhao T, Zhang B. Succession and diversity of microorganisms and their association  
685 with physicochemical properties during green waste thermophilic composting. *Waste Manag*.  
686 2018;73:101-12.

- 687 109. Song C, Li M, Jia X, Wei Z, Zhao Y, Xi B, et al. Comparison of bacterial community structure and dynamics  
688 during the thermophilic composting of different types of solid wastes: anaerobic digestion residue, pig  
689 manure and chicken manure. *Microb Biotechnol.* 2014;7(5):424-33.
- 690 110. Cerda A, Artola A, Font X, Barrena R, Gea T, Sánchez A. Composting of food wastes: Status and challenges.  
691 *Bioresour Technol.* 2018;248(Pt A):57-67.
- 692 111. Reyes-Torres M, Oviedo-Ocaña ER, Dominguez I, Komilis D, Sánchez A. A systematic review on the  
693 composting of green waste: Feedstock quality and optimization strategies. *Waste Manag.* 2018;77:486-99.
- 694 112. Mehta CM, Palni U, Franke-Whittle IH, Sharma AK. Compost: Its role, mechanism and impact on reducing  
695 soil-borne plant diseases. *Waste Management.* 2014;34(3):607-22.
- 696 113. Sparling GP, Fermor TR, Wood DA. Measurement of the microbial biomass in compost wheat straw, and  
697 the possible contribution of the biomass to the nutrition of *Agaricus bisporus*. *Soil bio.l biochem.*  
698 1982;14:609-11.
- 699 114. Di Piazza S, Houbraken J, Meijer M, Cecchi G, Kraak B, Rosa E, et al. Thermotolerant and Thermophilic  
700 Mycobiota in Different Steps of Compost Maturation. *Microorganisms.* 2020;8(6):880.
- 701 115. Oliveira TB de, Lopes VCP, Barbosa FN, Ferro M, Meirelles LA, Sette LD, et al. Fungal communities in  
702 pressmud composting harbour beneficial and detrimental fungi for human welfare. *Microbiology.*  
703 2016;162(7):1147-56.
- 704 116. López-González JA, Suárez-Estrella F, Vargas-García MC, López MJ, Jurado MM, Moreno J. Dynamics of  
705 bacterial microbiota during lignocellulosic waste composting: Studies upon its structure, functionality and  
706 biodiversity. *Bioresource Technology.* janv 2015;175:406-16.
- 707 117. Anastasi A, Varese GC, Marchisio VF. Isolation and identification of fungal communities in compost and  
708 vermicompost. *Mycologia.* 2005;97(1):33-44.
- 709 118. Paroha S, Kachhwaha A, Singh S. Diversity of micro-flora in different combinations of press-mud for biogas  
710 production. *International Journal of Microbiology Research.* 2020;12(4):1821\_1827.
- 711 119. Dehghani R, Asadi MA, Charkhloo E, Mostafaie G, Saffari M, Mousavi GA, et al. Identification of Fungal  
712 Communities in Producing Compost by Windrow Method. *JEP.* 2012;03(01):61-7.
- 713 120. Sebők F, Dobolyi C, Bobvos J, Szoboszlai S, Kriszt B, Magyar D. Thermophilic fungi in air samples in  
714 surroundings of compost piles of municipal, agricultural and horticultural origin. *Aerobiologia.*  
715 2016;32(2):255-63.
- 716 121. Langarica-Fuentes A, Handley PS, Houlden A, Fox G, Robson GD. An investigation of the biodiversity of  
717 thermophilic and thermotolerant fungal species in composts using culture-based and molecular  
718 techniques. *Fungal Ecology.* 2014;11:132-44.
- 719 122. Summerbell RC, Krajden S, Kane J. Potted plants in hospitals as reservoirs of pathogenic fungi.  
720 *Mycopathologia.* 1989;106(1):13-22.
- 721 123. Sidot C, Simon P, Bouchara JP, Chabasse D, Urban T, Giniès JL. 116 *Scedosporium apiospermum*.  
722 Environmental study in the homes of patients with cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis.* 2007;6:S29.
- 723 124. Döğen A, Kaplan E, Öksüz Z, Serin MS, Ilkit M, de Hoog GS. Dishwashers are a major source of human  
724 opportunistic yeast-like fungi in indoor environments in Mersin, Turkey. *Med Mycol.* 2013;51(5):493-8.
- 725 125. Zupančič J, Novak Babič M, Zalar P, Gunde-Cimerman N. The Black Yeast *Exophiala dermatitidis* and Other  
726 Selected Opportunistic Human Fungal Pathogens Spread from Dishwashers to Kitchens. *PLoS ONE.*  
727 2016;11(2):e0148166.
- 728 126. Wang X, Cai W, van den Ende AHGG, Zhang J, Xie T, Xi L, et al. Indoor wet cells as a habitat for melanized  
729 fungi, opportunistic pathogens on humans and other vertebrates. *Sci Rep.* 2018;8(1):7685.
- 730 127. Kulesza K, Biedunkiewicz A, Nowacka K, Dynowska M, Urbaniak M, Stępień Ł. Dishwashers as an Extreme  
731 Environment of Potentially Pathogenic Yeast Species. *Pathogens.* 2021;10(4):446.
- 732 128. Thronicke A, Heger N, Antweiler E, Krannich A, Roehmel J, Brandt C, et al. Allergic bronchopulmonary  
733 aspergillosis is associated with pet ownership in cystic fibrosis. *Pediatr Allergy Immunol.*  
734 2016;27(6):597-603.
- 735 129. Grehn C, Eschenhagen P, Temming S, Düesberg U, Neumann K, Schwarz C. Frequent Pet Contact as Risk  
736 Factor for Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis in Cystic Fibrosis. *Front Cell Infect Microbiol.*  
737 2021;10:601821.
- 738 130. Verweij PE, Lucas JA, Arendrup MC, Bowyer P, Brinkmann AJF, Denning DW, et al. The one health problem  
739 of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: current insights and future research agenda. *Fungal Biology*  
740 *Reviews.* 2020;34(4):202-14.

- 741 131. Schoustra SE, Debets AJM, Rijs AJMM, Zhang J, Snelders E, Leendertse PC, et al. Environmental Hotspots  
742 for Azole Resistance Selection of *Aspergillus fumigatus*, the Netherlands. *Emerg Infect Dis*.  
743 2019;25(7):1347-53.
- 744 132. Ryckeboer J, Mergaert J, Vaes K, Klammer S, De Clercq D, Cossemans J, et al. A survey of bacteria and fungi  
745 occurring during composting and self-heating processes. *Annals of microbiology*. 53<sup>e</sup> éd. 2003;349-410.
- 746 133. Wéry N. Bioaerosols from composting facilities: a review. *Front Cell Infect Microbiol*. 2014  
747 <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2014.00042/abstract>
- 748 134. Fischer G, Albrecht A, Jäckel U, Kämpfer P. Analysis of airborne microorganisms, MVOC and odour in the  
749 surrounding of composting facilities and implications for future investigations. *International Journal of*  
750 *Hygiene and Environmental Health*. 2008;211(1-2):132-42.
- 751 135. Pankhurst LJ, Deacon LJ, Liu J, Drew GH, Hayes ET, Jackson S, et al. Spatial variations in airborne  
752 microorganism and endotoxin concentrations at green waste composting facilities. *International Journal*  
753 *of Hygiene and Environmental Health*. 2011;214(5):376-83.
- 754 136. Le Goff O, Godon JJ, Milferstedt K, Bacheley H, Steyer JP, Wéry N. A new combination of microbial  
755 indicators for monitoring composting bioaerosols. *Atmospheric Environment*. 2012;61:428-33.
- 756 137. Herr CEW. Effects of bioaerosol polluted outdoor air on airways of residents: a cross sectional study.  
757 *Occupational and Environmental Medicine*. 2003;60(5):336-42.
- 758 138. Büniger J, Schappler-Scheele B, Hilgers R, Hallier E. A 5-year follow-up study on respiratory disorders and  
759 lung function in workers exposed to organic dust from composting plants. *Int Arch Occup Environ Health*.  
760 2007;80(4):306-12.
- 761 139. Schlosser O, Huyard A, Cartnick K, Yañez A, Catalán V, Do Quang Z. Bioaerosol in Composting Facilities:  
762 Occupational Health Risk Assessment. *Water Environment Research*. 2009;81(9):866-77.
- 763 140. WHO Guidelines for Indoor Air Quality: Dampness and Mould. Geneva: World Health Organization; 2009.  
764 (WHO Guidelines Approved by the Guidelines Review Committee). Disponible sur:  
765 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK143941/>
- 766 141. Hamada N, Abe N. Physiological characteristics of 13 common fungal species in bathrooms. *Mycoscience*.  
767 2009;50(6):421-9.
- 768 142. Nishimura K, Miyaji M. Studies on a saprophyte of *Exophiala dermatitidis* isolated from a humidifier.  
769 *Mycopathologia*. 1982;77(3):173-81.
- 770 143. Hoog GS, Matos T, Sudhadham M, Luijsterburg KF, Haase G. Intestinal prevalence of the neurotropic black  
771 yeast *Exophiala (Wangiella) dermatitidis* in healthy and impaired individuals. *Mycoses*. 2005;48(2):142-5.
- 772 144. Sudhadham M, Prakitsin S, Sivichai S, Chaiyarat R, Dorrestein GM, Menken SBJ, et al. The neurotropic black  
773 yeast *Exophiala dermatitidis* has a possible origin in the tropical rain forest. *Stud Mycol*. 2008;61:145-55.
- 774 145. Zupančič J, Novak Babič M, Zalar P, Gunde-Cimerman N. The Black Yeast *Exophiala dermatitidis* and Other  
775 Selected Opportunistic Human Fungal Pathogens Spread from Dishwashers to Kitchens. *PLoS ONE*.  
776 2016;11(2):e0148166.
- 777 146. Babič MN, Zupančič J, Gunde-Cimerman N, de Hoog S, Zalar P. Ecology of the Human Opportunistic Black  
778 Yeast *Exophiala dermatitidis* Indicates Preference for Human-Made Habitats. *Mycopathologia*.  
779 2018;183(1):201-12.
- 780 147. Wang X, Cai W, van den Ende AHGG, Zhang J, Xie T, Xi L, et al. Indoor wet cells as a habitat for melanized  
781 fungi, opportunistic pathogens on humans and other vertebrates. *Sci Rep*. 2018;8(1):7685.
- 782 148. Jang KS, Yun YH, Yoo HD, Kim SH. Molds Isolated from Pet Dogs. *Mycobiology*. 2007;35(2):100-2.
- 783 149. Mohan K, Fothergill JL, Storrar J, Ledson MJ, Winstanley C, Walshaw MJ. Transmission of *Pseudomonas*  
784 *aeruginosa* epidemic strain from a patient with cystic fibrosis to a pet cat. *Thorax*. 2008;63(9):839-40.
- 785 150. Register KB, Sukumar N, Palavecino EL, Rubin BK, Deora R. *Bordetella bronchiseptica* in a Paediatric Cystic  
786 Fibrosis Patient: Possible Transmission from a Household Cat: *B. bronchiseptica* in a CF Patient. *Zoonoses*  
787 *and Public Health*. 2012;59(4):246-50.
- 788 151. Gangneux JP, Bouvrais M, Frain S, Morel H, Deguen S, Chevrier S, et al. Asthma and Indoor Environment:  
789 Usefulness of a Global Allergen Avoidance Method on Asthma Control and Exposure to Molds.  
790 *Mycopathologia*. 2020;185(2):367-71.
- 791 152. Le Cann P, Paulus H, Glorennec P, Le Bot B, Frain S, Gangneux JP. Home Environmental Interventions for  
792 the Prevention or Control of Allergic and Respiratory Diseases: What Really Works. *J Allergy Clin Immunol*  
793 *Pract*. 2017;5(1):66-79.

- 794 153. Méheust D, Le Cann P, Reboux G, Millon L, Gangneux JP. Indoor fungal contamination: health risks and  
795 measurement methods in hospitals, homes and workplaces. *Crit Rev Microbiol.* 2014;40(3):248-60.
- 796 154. Vesper S, McKinstry C, Haugland R, Wymer L, Bradham K, Ashley P, et al. Development of an Environmental  
797 Relative Moldiness index for US homes. *J Occup Environ Med.* 2007;49(8):829-33.
- 798 155. Gangneux JP, Sassi M, Lemire P, Le Cann P. Metagenomic Characterization of Indoor Dust Bacterial and  
799 Fungal Microbiota in Homes of Asthma and Non-asthma Patients Using Next Generation Sequencing. *Front*  
800 *Microbiol.* 2020;11:1671.

Les outils de surveillance du réservoir fongique environnemental et les approches de remédiation sont également abordés dans l'article récemment accepté, présenté dans l'**annexe 1** (Gangneux et coll., *Revue française des laboratoires*, 2022).

### 3. Approches thérapeutiques antifongiques et défi de la résistance

Dans le contexte de la mucoviscidose, la colonisation transitoire par les champignons n'est généralement pas une indication au traitement antifongique. L'initiation d'un traitement antifongique peut, en revanche, être justifiée en cas d'isolement récurrent d'un champignon filamenteux associé à la mucoviscidose (*Aspergillus*, mais aussi *Scedosporium*, *Exophiala*, *Rasamsonia*) à partir des cultures d'expectorations et/ou en cas de stigmates sérologiques de sensibilisation allergique associés à une aggravation clinique (exacerbation respiratoire) concomitante, et à l'inefficacité d'une cure d'antibiotiques. Il n'existe pas, à ce jour, d'algorithme décisionnel de traitement dans ce contexte spécifique et l'initiation d'un traitement antifongique est laissée à l'appréciation du clinicien.

*Aspergillus fumigatus* est le chef de file des champignons filamenteux retrouvés dans la mucoviscidose, et est également le champignon le plus pourvoyeur de formes allergiques dans le cas de l'aspergillose broncho-pulmonaire allergique (ABPA) (cf. II.1). Si les glucocorticoïdes constituent la première ligne de traitement de l'ABPA afin de réduire l'inflammation, il est possible d'associer un traitement antifongique oral par triazolés en cas d'exacerbations ou d'échec de la corticothérapie seule (12). En cas de cortico-dépendance ou d'effets indésirables, des anticorps monoclonaux à activité anti-T<sub>H</sub>2 (anti-IgE, anti-IL-5) peuvent être également envisagés (13,14).

Des études majoritairement observationnelles dans la mucoviscidose ont montré que la molécule antifongique de référence dans le traitement de l'ABPA est l'itraconazole (15,16), qui permettait une amélioration du VEMS et des critères biologiques (diminution des polynucléaires éosinophiles et des IgE) (17). Le voriconazole et le posaconazole constituent des alternatives thérapeutiques (18,19). La durée de traitement, souvent longue

(plusieurs mois) et expérimentale, n'a toujours pas fait l'objet d'un consensus. Le traitement des scedosporioses dans la mucoviscidose est encore moins codifié. Du fait de la sensibilité souvent réduite de *Scedosporium* vis-à-vis des antifongiques, les bithérapies combinant voriconazole ou posaconazole à une échinocandine seraient supérieures à l'utilisation d'azolés en monothérapie (20). La prise en charge thérapeutique des formes invasives fait, par ailleurs, l'objet de recommandations internationales spécifiques (21).

L'utilisation des antifongiques triazolés au long cours peut parfois se compliquer *via* deux phénomènes : i) la survenue d'effets secondaires non négligeables (troubles digestifs, photosensibilisation, risque accru de cancers cutanés au long cours, particulièrement avec le voriconazole) qui motivent l'arrêt du traitement (22) ; ii) l'émergence croissante de souches d'*A. fumigatus* résistantes aux antifongiques triazolés qui impose l'arrêt du traitement devenu inefficace. Le développement de la résistance d'*Aspergillus* vis-à-vis des triazolés est lié à l'apparition de mutation de leur cible (*CYP51A*) par le biais de deux mécanismes : d'une part, la pression de sélection induite *in vivo* par l'exposition aux triazolés au long cours de souches d'*A. fumigatus* initialement sauvages et, d'autre part, la colonisation par inhalation de souches environnementales déjà résistantes à cause de l'utilisation intensive des fongicides triazolés en agriculture au cours des dernières années (23,24). L'épidémiologie de la résistance d'*A. fumigatus* aux azolés isolés au laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Rennes entre 2015 et 2019 a fait l'objet d'une publication présentée dans une partie expérimentale.

## II. Interaction d'*Aspergillus fumigatus* et de *Scedosporium* spp avec leur hôte

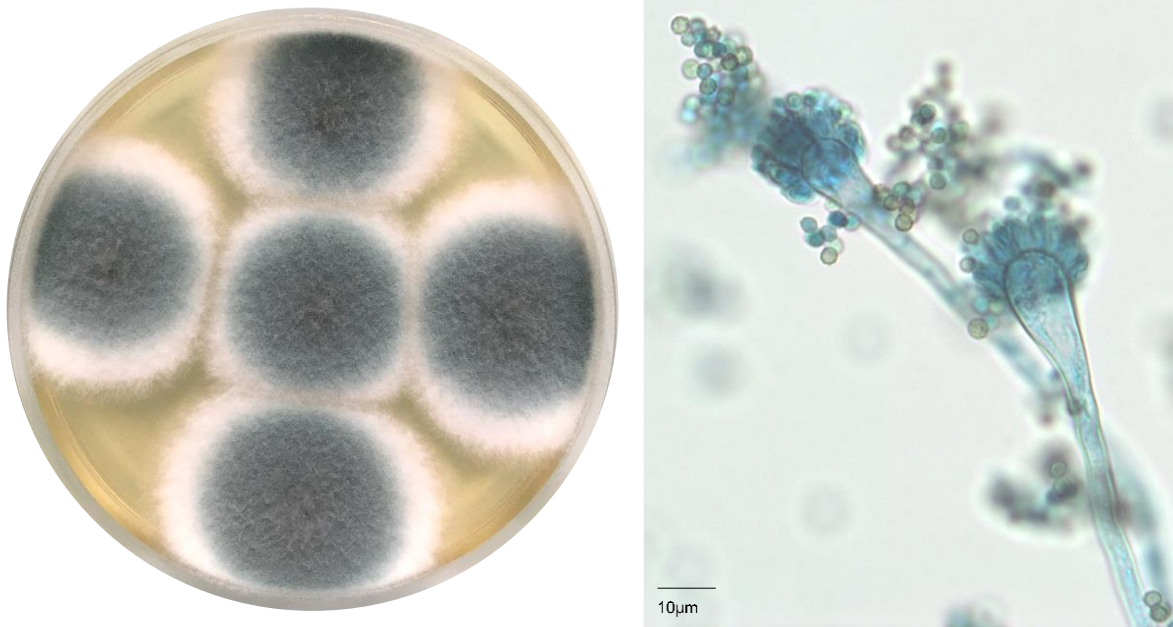
### 1. Présentation des champignons

#### a. *Aspergillus* et aspergilloses

##### i. *Aspergillus* spp

Les champignons du genre *Aspergillus* sont des champignons filamenteux appartenant au phylum des Ascomycètes, à la classe des Eurotiomycètes et à l'ordre des Eurotiales (25). Ce sont des champignons saprophytes retrouvés de façon ubiquitaire dans l'environnement, en particulier dans les sols, les matières végétales en décomposition, l'eau et l'air. Le cycle de vie d'*Aspergillus* est généralisable à tous les champignons filamenteux responsables d'infections chez l'Homme. La dispersion d'*Aspergillus* est assurée par les spores asexuées ou conidies, libérées par les phialides au sommet de la vésicule (tête aspergillaire) portées par un conidiophore (26), **Fig.3**. Ces conidies sont rondes et de très petit diamètre (2 à 3  $\mu\text{m}$  pour *A. fumigatus*). Dans un milieu nutritionnel approprié, les conidies sont capables de germer et de former des filaments, également appelés mycélium ou hyphes, dont certains se différencieront en conidiophores, débutant un nouveau cycle mycélien. Les hyphes hyalins, septés, et ramifiés à angle aigu constituent la forme d'invasion tissulaire retrouvée chez l'hôte.

Le genre *Aspergillus* comprend plus de 300 espèces regroupées en différentes sections. La section prévalente dans les infections humaines est la section *Fumigati*, suivie de la section *Flavi* fréquente dans les pays du Sud, puis des sections *Nigri* et *Terrei*. *Aspergillus fumigatus stricto sensu* est de loin l'espèce la plus souvent isolée en mycologie médicale, formant des colonies poudreuses, caractérisées par la présence d'un pigment vert-gris sur milieu mycologique Sabouraud, **Fig.3**.



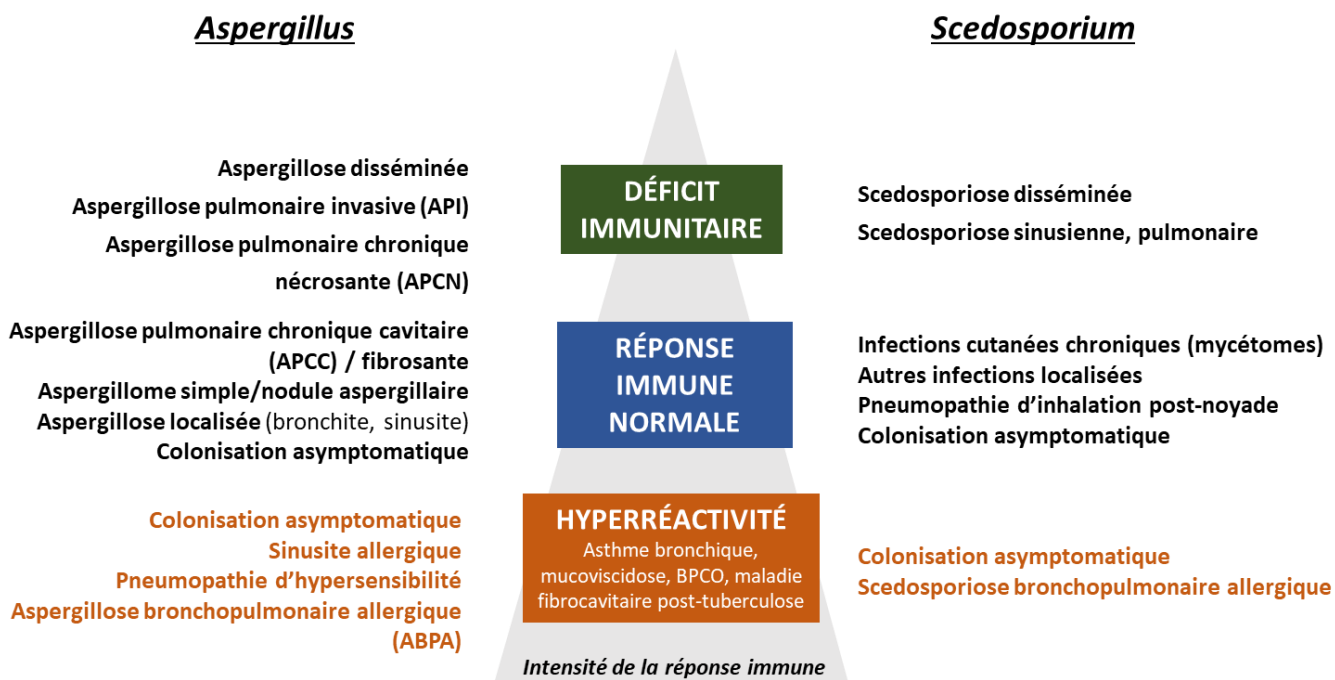
**Figure 3 : Aspects macroscopique (A) et microscopique (B) d'*Aspergillus fumigatus* cultivé sur milieu Sabouraud-chloramphénicol (72h, 30°C).**

*ii. Atteintes cliniques*

L'inhalation continue des conidies aspergillaires aéroportées de très petite taille fait de l'arbre respiratoire la principale porte d'entrée, et des poumons le site d'infection privilégié. *Aspergillus* spp est impliqué dans un large spectre d'atteintes cliniques de gravité variable qui dépendent en grande partie de l'hôte, de l'efficacité de son système immunitaire et de ses comorbidités, **Fig.4**.

Pour rappel, les **aspergilloses pulmonaires invasives (API)** atteignent les individus sévèrement immunodéprimés, en particulier en cas de neutropénie profonde et prolongée chez les patients atteints d'hémopathies malignes traitées par chimiothérapies intensives, ou chez les patients sous immunosuppresseurs dans le cadre de transplantation de cellules souches hématopoïétiques ou d'organes solides. Plus récemment, les infections virales sévères dues aux virus de la grippe ou au SARS-CoV-2 ont aussi été montrées comme un facteur de risque d'API chez les patients en réanimation (27,28). Le diagnostic de certitude repose sur l'association d'arguments épidémiocliniques, radiologiques et biologiques (29). L'incidence des API est estimée en France à 1,8 cas pour 100 000 habitants (30,31). Ces pneumopathies sont associées à un pronostic défavorable, avec un taux de mortalité observé de 30 à 50%, même en cas de prise en charge adéquate.





**Figure 4 : Spectre d'atteintes cliniques provoquées par *Aspergillus* et *Scedosporium* en fonction de l'intensité de réponse immunitaire de l'hôte, adapté de (32,33).**

Chez l'hôte immunocompétent, *Aspergillus* spp est responsable d'atteintes localisées présentant des caractéristiques communes, allant du développement d'une balle fongique au sein d'une cavité préformée (aspergillome), à des processus fibrotiques et inflammatoires chroniques regroupés au sein des **aspergilloses pulmonaires chroniques (APC)**. Il existe d'ailleurs un continuum entre les APC et les API, avec des formes frontières incluant les aspergilloses pulmonaires chroniques cavitaires (APCC) et nécrosantes (APCN) qui surviennent en cas d'immunodépression mineure. Ces atteintes sont, par exemple, retrouvées chez les patients cirrhotiques ou les patients atteints de bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) sous corticothérapie inhalée (34). A la différence des API, l'épidémiologie des APC est moins bien caractérisée mais néanmoins considérable, avec une incidence en France estimée à 5,24/100 000 habitants (30). La prise en charge très hétérogène de ces atteintes reste encore à standardiser (35,36).

Après l'asthme sévère avec sensibilisation fongique (ASSF), l'**aspergillose broncho-pulmonaire allergique (ABPA)** est la forme de sensibilisation aspergillaire la plus sévère, qui survient essentiellement chez les patients asthmatiques chroniques, et en particulier chez les patients atteints de **mucoviscidose**. Sur terrain atopique, caractérisée par une réponse immunitaire exacerbée (hyperréactivité), l'atteinte clinique n'est plus directement liée à la présence du champignon chez l'hôte, mais à la composante immuno-allergique développée en réponse à la colonisation aspergillaire chronique.

Le diagnostic d'ABPA repose sur un ensemble de critères cliniques, radiologiques et biologiques, qui peuvent varier en fonction de la classification utilisée. Le **Tableau 3** présente les critères proposés par un comité d'experts internationaux (*International society for human and animal mycology*, ISHAM) en 2013 (37). Cliniquement, l'ABPA est caractérisée par une clairance muco-ciliaire altérée, des impactions mucoïdes, des épisodes d'obstruction bronchique, et des infiltrats pulmonaires (38). Immunologiquement, l'ABPA se traduit par des épisodes récurrents d'inflammation respiratoire éosinophilique, pouvant être associés à une éosinophilie sanguine, un taux d'IgE totales élevé, et une augmentation des taux d'IgE et d'IgG dirigées contre *A. fumigatus*, reflet d'une réponse cellulaire T<sub>H</sub>2 exacerbée (cf. II.1.b)(39).

**Tableau 3 : Critères diagnostiques de l'ABPA, d'après (37).**

<b>Conditions prédisposantes</b> : asthme et/ou mucoviscidose
<b>Critères obligatoires</b> (les deux doivent être présents)
Test cutané d'hypersensibilité type I positif (hypersensibilité cutanée immédiate à un antigène d' <i>Aspergillus</i> ) <b>ou</b> taux élevé d'IgE dirigées contre <i>Aspergillus fumigatus</i> <b>et</b> taux élevé d'IgE totales (>1000 UI/mL) <sup>a</sup>
<b>Autres critères</b> (au moins <b>deux</b> sur trois doivent être présents)
Présence de précipitines ou d'anticorps IgG anti- <i>Aspergillus</i> dans le sérum
Anomalies pulmonaires radiologiques récemment apparues compatibles avec une ABPA :
Bronchiectasies cylindriques centrales et proximales
Prédominance dans le lobe supérieur
Nodules
Atélectasie
Air trapping
Taux d'éosinophiles >0,5G/L chez des patients ne recevant pas de corticoïdes

\* Si le patient remplit tous les autres critères, un taux <1000UI/mL peut être accepté

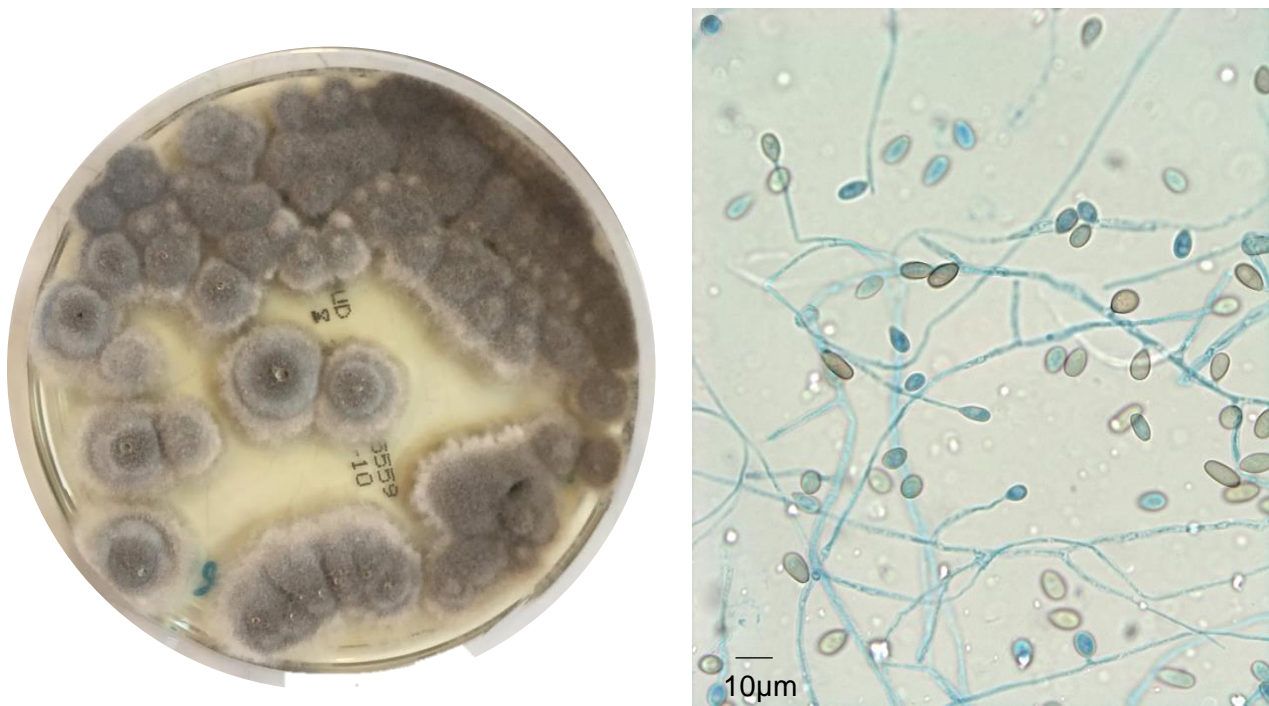
Les facteurs de risque d'une colonisation aspergillaire chronique chez les patients atteints de mucoviscidose ne sont pas clairement élucidés. Cependant, selon une étude multicentrique américaine, incluant près de 15 000 individus atteints de mucoviscidose dont plus de 1 500 colonisés par *Aspergillus*, l'insuffisance pancréatique, l'utilisation de macrolides et l'administration d'antibiotiques et corticoïdes inhalés, ainsi que la co-colonisation par *P. aeruginosa* ont été retrouvés indépendamment associés à la survenue d'une colonisation aspergillaire prolongée (40). Enfin, la colonisation chronique par *Aspergillus* a été, dans certaines études, associée à la sévérité de la maladie et au déclin des fonctions respiratoires (41,42).

## b. *Scedosporium* et scedosporioses

### i. *Scedosporium* spp

Les espèces du genre *Scedosporium* appartiennent au phylum des Ascomycètes, à la classe des Sordariomycètes, et à l'ordre des Microascales. Le genre comprend actuellement 15 espèces dont les plus fréquentes en pathologie humaine en France sont *S. apiospermum* et *S. boydii*, suivies par *S. aurantiacum* et *S. minutisporum* (43–48). Initialement incluse au sein du genre *Scedosporium*, l'espèce *prolificans* appartient depuis 2014 au genre *Lomentospora*, du fait de la distance phylogénétique avec les autres espèces (49). Comme *Aspergillus* spp, il s'agit de moisissures saprophytes retrouvées dans l'environnement, de façon ubiquitaire, et en particulier dans les sols et environnements aquatiques (50). *Scedosporium* spp possède cependant un tropisme particulier pour les biotopes pollués, et s'adapte à des environnements présentant des conditions extrêmes, notamment dans des milieux acides et/ou riches en azote et/ou faiblement oxygénés (51). La présence de ces champignons est fortement corrélée à l'anthropisation, puisque *Scedosporium* a été préférentiellement isolé de prélèvements issus de zones urbanisées comme les parcs en ville, les eaux usées de station d'épuration, dans les eaux stagnantes de fossés en bord de route, ou encore au fond des étangs et sur les terres agricoles (51–53).

De façon similaire au cycle de vie décrit chez *Aspergillus*, la dispersion de *Scedosporium* est assurée par les spores asexuées, aussi appelées annelospores ou conidies, émises par les annelides. Les aspects macroscopiques et microscopiques de *S. apiospermum* sont représentés dans la **Fig.5**. A la différence d'*Aspergillus*, les spores sont ovoïdes et de grande taille (4-6µm de large par 5-7µm de long), pouvant expliquer la fréquence d'isolement plus faible dans les prélèvements aériens. Les conidies germent et donnent naissance à des hyphes hyalins et ramifiés. Sur milieu Sabouraud, les colonies de *S. apiospermum* présentent un aspect caractéristique duveteux-cotonneux, développant une coloration grise en vieillissant, **Fig.5**.



**Figure 5 : Aspects macroscopique et microscopique de *Scedosporium apiospermum* cultivé sur milieu Sabouraud-chloramphenicol (14 jours, 30°C).**

*ii. Atteintes cliniques*

Comme représenté dans la **Fig.4**, par analogie avec *Aspergillus*, *Scedosporium* spp est impliqué dans différentes pathologies en fonction du système immunitaire de l'hôte. Les infections opportunistes invasives et disséminées surviennent majoritairement chez les individus lourdement immunodéprimés avec une prédominance de localisations pulmonaires, mais également ostéo-articulaires et cérébrales (33). Si leur incidence est faible, le pronostic associé est particulièrement sombre chez les patients atteints d'hémopathie. Une récente revue de 90 cas de scedosporioses/lomentosporioses invasives déclarées en France sur une période de 13 ans (recueil non exhaustif) a rapporté un taux de mortalité à 3 mois de 48% dans cette population, contre seulement 12% dans les contextes de traumatismes/inoculations (45). D'ailleurs, *Scedosporium* spp est reconnu comme le champignon le plus fréquemment responsable d'infections chez des patients développant des atteintes sino-pulmonaires disséminant au système nerveux central, après noyade dans des eaux polluées, même en l'absence d'immunosuppression (33).

Chez l'immunocompétent, une autre particularité épidémiologique de *Scedosporium* est son tropisme cutané et sa propension à induire des mycétomes. Ces mycoses cutanées et sous-cutanées chroniques se développent à partir de l'inoculation traumatique du champignon par des végétaux. Majoritairement localisées au niveau des membres inférieurs, les lésions sont caractérisées par la présence de grains blancs constitués de filaments

fongiques, émis par des pertuis cutanés. L'évolution indolente se fait progressivement vers des atteintes parfois sévères avec envahissement osseux, pouvant compliquer le traitement (33,54).

Dans le contexte spécifique de la mucoviscidose, *Scedosporium* est le 2<sup>e</sup> champignon filamenteux colonisant de façon chronique les voies respiratoires, et n'intervient généralement qu'à l'âge adulte, sur un terrain pulmonaire probablement déjà altéré. La prévalence de *Scedosporium* dépend de la zone géographique considérée, comme le suggèrent les chiffres de colonisation rapportés dans la littérature, s'étendant de 3-5% en Allemagne (55), 8,6% en France (56), à 11-17% en Australie (57). Bien que souvent bien tolérée, la colonisation peut évoluer vers des atteintes bronchitiques et des formes immuno-allergiques ou mycoses (scedosporioses) broncho-pulmonaires allergiques (MBPA), par analogie à l'ABPA (58). L'implication de *Scedosporium* dans les cas de MBPA rapportés se traduit par des épisodes de bronchospasme et d'infiltrats pulmonaires labiles, associés à un taux d'IgE sériques totales élevé sans IgE spécifiques d'*Aspergillus*, une éosinophilie sanguine dans les épisodes aigus, l'isolement répété de *Scedosporium* dans les expectorations en l'absence d'autres champignons, et la détection d'anticorps anti-*Scedosporium* dans le sérum (56).

A noter que dans une étude prospective multicentrique allemande, les facteurs retrouvés associés à la colonisation par *Scedosporium* étaient l'insuffisance pancréatique exocrine et l'ABPA (59). Bien que le lien physiopathologique ne soit pas complètement élucidé, l'ABPA pourrait favoriser la colonisation par *Scedosporium* du fait i) de l'orientation « tolérogène » T<sub>H</sub>2 de la réponse immune et ii) du risque de bronchiectasie post-ABPA et donc de défense locale défaillante.

## 2. Réponse immune de l'hôte

La possibilité qu'une infection puisse s'établir chez l'hôte dépend non seulement de propriétés intrinsèques au champignon (facteurs de virulence), mais aussi de caractéristiques liées à l'hôte, c'est-à-dire à l'efficacité de son système immunitaire. Afin de mieux comprendre les déterminants de la relation hôte-pathogène, les acteurs-clés de la réponse de l'hôte sont rappelés ci-dessous, dans le cas particulier d'une infection pulmonaire.

### a. Réponse immune antifongique dans le cas général

#### i. Immunité innée

Pour se développer chez l'hôte et initier un processus invasif dans le tissu pulmonaire, les spores inhalées doivent d'abord parcourir et traverser les barrières de l'arbre respiratoire (épithéliums ciliés, mucus). La majorité des spores est piégée par le mécanisme de clairance muco-ciliaire, et les autres atteignent les alvéoles pulmonaires, siège de la rencontre avec les différents acteurs immunitaires. Le système immunitaire inné est constamment en alerte vis-à-vis de pathogènes microbiens, et orchestre une réponse efficace, impliquant des

effecteurs cellulaires et humoraux, comme dans le cas de l'infection par *A. fumigatus*, schématisé dans la **Fig.6**. Bien que beaucoup moins étudiée, la réponse immune suscitée par *Scedosporium* implique des effecteurs communs, qui seront également discutés (60).

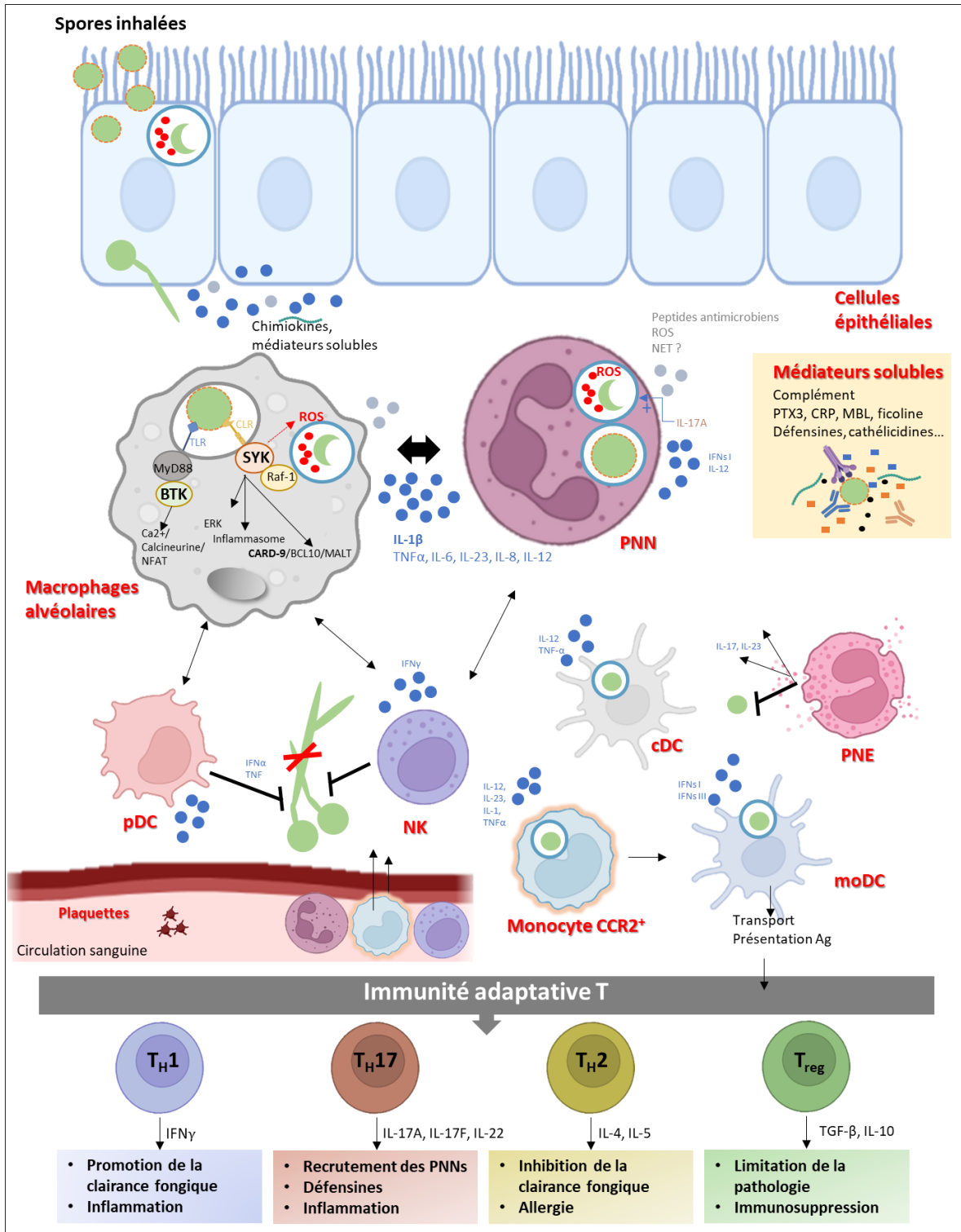
### **Effecteurs cellulaires**

Dans l'immunité antifongique innée, la réponse cellulaire a été la plus étudiée. Elle est d'abord assurée par les cellules épithéliales alvéolaires, dont le rôle est souvent négligé (61–64) et par l'action coordonnée de différentes cellules myéloïdes.

**Les macrophages résidents** assurent une surveillance continue des voies respiratoires et des alvéoles pulmonaires pour combattre et neutraliser les agressions infectieuses. Si la charge microbienne excède les capacités cellulaires locales, ces cellules sentinelles recrutent les **polynucléaires neutrophiles** (PNNs) circulants afin d'amplifier la réponse inflammatoire *in situ*. Macrophages et PNNs assurent surtout la phagocytose et la destruction des pathogènes. Les **cellules dendritiques** (DCs) également recrutées subissent une maturation en cellules présentatrices d'antigène (CPA) professionnelles après internalisation du pathogène, qui aboutit à la libération d'une avalanche cytokinique spécifique et orchestre la réponse adaptative, médiée par la différenciation des cellules T naïves en différents sous-types de lymphocytes T *helper* (T<sub>H1</sub>, T<sub>H2</sub>, T<sub>H17</sub> et T<sub>reg</sub>) (65).

D'un point de vue temporel, dans un modèle de macrophages alvéolaires murins, la spore aspergillaire est phagocytée en 2h, puis l'acidification phago-lysosomale aboutit à son *killing* en 6h et à son élimination complète en 24h (66–68). Chez *Scedosporium*, la cinétique de cette séquence n'est pas précisément décrite.

Lorsqu'une spore fongique pénètre dans l'organisme, les **PAMPs** (*pathogen associated molecular patterns*) présents à sa surface sont rapidement reconnus par des récepteurs innés exprimés par les phagocytes, les *pattern recognition receptors* (**PRRs**). Les PAMPs sont des motifs conservés chez les champignons et absents chez l'Homme, incluant des polysaccharides pariétaux comme les  $\beta$ -glucanes, les rhamnomanannes, la chitine et d'autres molécules immunostimulantes (43,66). Leur liaison aux récepteurs transmembranaires spécifiques initie des cascades de signalisation intracellulaire qui activent, en aval, les mécanismes fongicides : phagocytose, *killing*, et production de cytokines et de chimiokines.

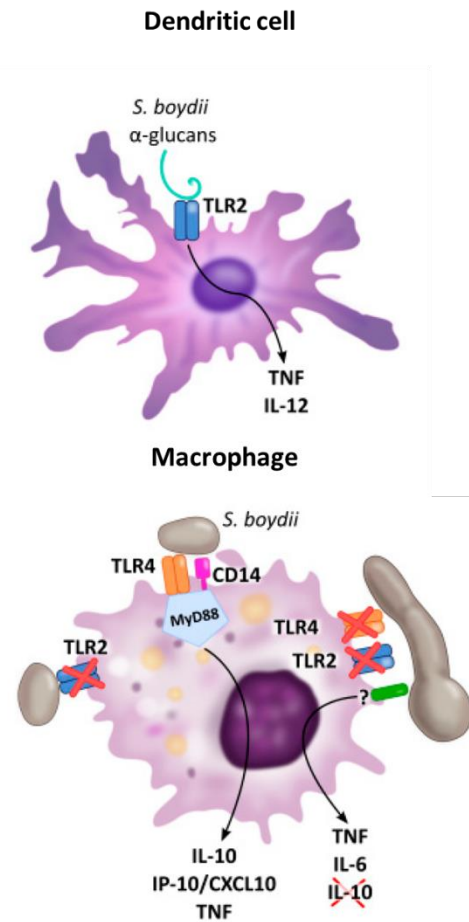


**Figure 6 : Réponse immunitaire antifongique à l'infection pulmonaire par les spores d'*A. fumigatus* (modèle), initiée par les macrophages alvéolaires et autres effecteurs innés. Schéma personnel inspiré de (65,66,69).**

cDC : conventional dendritic cell; CRP: c-reactive protein; MBL : mannose binding lectin; moDC : monocyte-derived dendritic cell; NET : neutrophil extracellular trap; NK : natural killer cell; pDC : plasmacytoid dendritic cell; PNE : polynucléaire eosinophile; PNN : polynucléaire neutrophile; PTX3 : pentraxine 3; ROS : reactive oxygen species; TNF- $\alpha$  : tumor necrosis factor  $\alpha$ ; T<sub>H</sub> cell : CD4<sup>+</sup> T helper.

Deux familles majeures de PRRs ont été particulièrement explorées pour leur rôle dans le *sensing* des champignons (65,70) :

- **Les récepteurs de type Toll (TLR, Toll-like receptor)** en particulier les TLRs 2, 4 et 9 qui reconnaissent notamment les phospholipomannanes, les résidus O-mannanes et l'ADN fongique intracellulaire, respectivement. La contribution individuelle de chaque TLR varie en fonction du champignon considéré, du morphotype fongique (spore/hyphe), de la voie d'infection et de la coopération entre récepteurs (65). Par exemple, la reconnaissance des  $\alpha$ -glucanes de la paroi sporale de *S. boydii* par les DCs, implique nécessairement le TLR2, et induit la sécrétion d'IL-12 et de TNF (71), **Fig.7**. Concernant les macrophages, contrairement au TLR2, le TLR4 est impliqué dans la reconnaissance des spores *via* les rhamnmannanes, et stimule en association avec le CD14 la libération de TNF, d'IL-6, d'IL-10 et de CXCL10 (60), **Fig.7**. En revanche, ni le TLR2 ni TLR4 n'interviendraient dans la reconnaissance des hyphes (72).



**Figure 7 : TLRs des cellules dendritiques et des macrophages impliqués dans la reconnaissance de *Scedosporium*, d'après la revue (60).**

Cette avalanche cytokinique résulte de l'activation de différentes voies de signalisation intracellulaires. En particulier, l'activation de l'axe BTK/calcineurine/NFAT par le couple TLR/MYD88 en aval de TLRs régule le recrutement cellulaire, et notamment celui des PNNs. D'autres voies de signalisation macrophagiques comme JAK/STAT interviendraient également, comme décrit chez *A. fumigatus* (66).

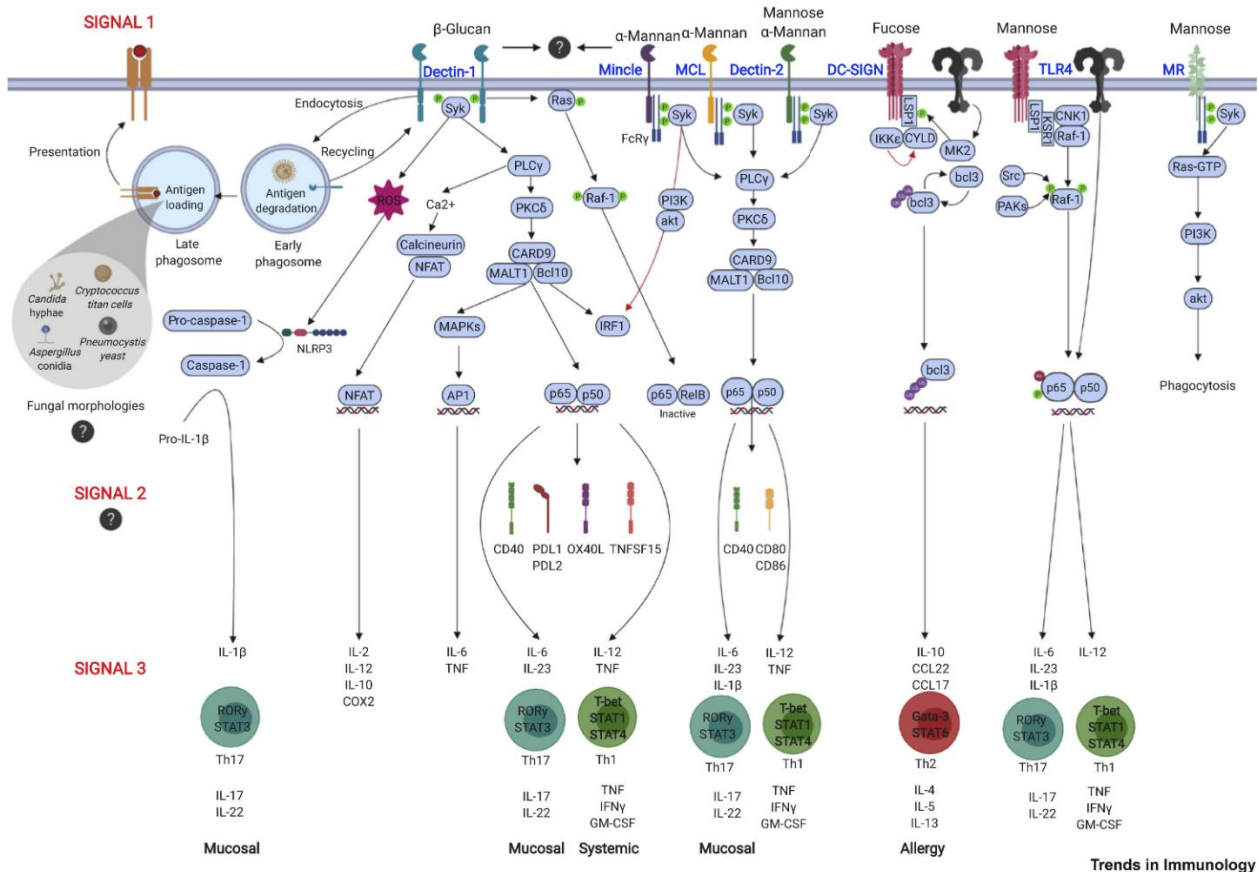
A noter que des études chez l'Homme ont montré que des polymorphismes du TLR4 étaient associés à un risque accru d'API (73), d'APCC (74) ou encore de candidose systémique (75). A l'inverse, le TLR9 atténuerait la réponse inflammatoire antifongique et des polymorphismes dans ce récepteur intracellulaire ont été associés à un surrisque d'asthme et d'ABPA (74,76).

- **Les lectines de type C (CLR, C-type lectins)**, en particulier Dectin-1 (*CLEC7A*), Dectin-2 (*CLEC6A*), Mincle (*CLEC4E*), DC-SIGN (*DC-specific ICAM3-grabbing non-integrin*) et Mannose receptor (MR, CD206), jouent un rôle important dans l'initiation des réponses inflammatoires antifongiques (70,77), **Fig.8**. Ces CLR partagent des molécules de transduction communes (78,70,79), comme SYK (*spleen tyrosine kinase*) et



CARD9 (*caspase recruitment domain-containing protein 9*), essentielles à la production de cytokines pro-inflammatoires dont l'IL-1 $\beta$  et l'IL-6.

Tout comme les TLRs, des polymorphismes génétiques affectant les CLR et leur molécules de transduction favorisent la survenue d'infections fongiques, comme décrit pour Dectin-1 et CARD9 notamment (80–82).



**Figure 8 : Voies de signalisation impliquées dans la défense antifongique à partir de la reconnaissance des champignons par les CLR présents à la surface des phagocytes, en lien avec l'activation des réponses cellulaires T, par Speakman et coll. (70).**

L'activation par les  $\beta$ -glucanes de Dectin-1 en particulier, induit des voies de signalisation macrophagiques, aboutissant à différents mécanismes effecteurs (60,66) :

- **L'activation de la LAP (*LC3 associated phagocytosis*)** : il s'agit d'une voie d'autophagie alternative, dépendant de la NADPH-oxydase et des espèces réactives de l'oxygène (**ROS, reactive oxygen species**). Bien décrite chez *A. fumigatus*, cette voie est importante pour la formation du phagosome et la production de cytokines (66).
- **La production de ROS** : Les ROS incluent les radicaux superoxyde ( $O_2^-$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), les radicaux hydroxyl ( $\bullet OH$ ), ainsi que des molécules non radicalaires comme l'acide hydrochlorique et l'ozone. Les dommages induits par les ROS concernent de multiples composants cellulaires, incluant l'ADN et les

protéines, et induisent la peroxydation des lipides. Ces molécules jouent un rôle important dans la défense immunitaire antifongique, et des défauts génétiques affectant la production de ROS exposent à un risque accru d'infection fongique, comme dans la granulomatose septique chronique (83,84). Les ROS servent aussi de messagers dans les réponses innées et adaptatives, en contribuant à l'activation de certains TLR nécessaires à l'activité des macrophages.

- **L'activation de l'inflammasome NLRP3** (*NOD*-, *LRR*- and *pyrin domain-containing 3*) : ce complexe protéique formé à la suite de la reconnaissance d'un signal inflammatoire, résulte en l'activation protéolytique des cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\beta$  et d'IL-18. Ces cytokines induisent les réponses T<sub>H</sub>1 et stimulent en retour la production d'IFN- $\gamma$ , cruciale pour le contrôle d'une infection fongique disséminée.
- **La production de cytokines et chimiokines**, dont IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17A, IL-23, IL-12, TNF- $\alpha$ ... *via* l'activation de voies impliquant CARD9, NF $\kappa$ B et IRF1/5, bien décrites chez *Aspergillus* (66). La nature des cytokines synthétisées peut varier en fonction du champignon considéré et du site d'infection. L'intensité de la réponse cytokinique dépendrait également du champignon, comme évoqué dans un modèle d'infection de macrophages humains par *L. prolificans*, qui induirait une libération d'IL-6 et de TNF, supérieure à la réponse cytokinique induite par *Aspergillus* spp (85).

Les PNN sont recrutés par les signaux émanant des cellules épithéliales (axe IL-1R/Myd88), des macrophages résidents et monocytes inflammatoires CCR2<sup>+</sup> (voie CARD9). La destruction des spores intracellulaires est principalement médiée par l'action des ROS, dont la production est dépendante de voies impliquant les interférons de type I et III et de la production d'IL-17A autocrine *via* les voies de signalisation IL-6/IL-23 et Dectin-2. Des mécanismes indépendants des ROS, médiés par la privation en Zn et Fe (lactoferrine) sont également mis en jeu dans l'inhibition intracellulaire des spores aspergillaires. Enfin, la production de NET (*Neutrophil Extracellular Trap*) ou NETose, participerait à l'inhibition des formes hyphales *in vitro* (86), comme démontré chez *S. apiospermum* (87). L'action fongicide de ces réseaux de fibres chromatiniennes recouvertes d'histones nucléaires et de granules protéiques (myéloperoxydase, élastase) a également été explorée *in vivo*. Dans un modèle murin immunocompétent d'infection pulmonaire par *S. apiospermum*, la libération des NETs par les PNNs est significative 3 jours après l'infection et participerait à la clairance du champignon (88).

D'autres effecteurs cellulaires ont été explorés chez *Aspergillus* :

- **Les cellules dendritiques plasmocytoïdes** (pDCs) constituent un sous-type rare de DCs initialement connu dans l'immunité antivirale, qui jouerait un rôle important dans l'immunité anti-*Aspergillus*, en attaquant sélectivement les hyphes, en inhibant la croissance fongique et en libérant des cytokines (IFN- $\alpha$  and TNF) *via* une voie médiée par Dectin-2 (89).
- **Les cellules NK** (*Natural killer*) présentent une cytotoxicité directe sur les hyphes aspergillaires médiée par l'IFN- $\gamma$ , et jouent un rôle crucial dans la défense antifongique en cas de neutropénie (90).

- **Les polynucléaires éosinophiles (PNE)** participent également à la défense contre *Aspergillus* via leurs propriétés fongicides intrinsèques, ainsi que la production d'IL-23 et IL-17 dans les poumons, participant au recrutement phagocytaire (91,92).
- **Les plaquettes** enfin, sont capables de se lier directement aux structures fongiques, de s'activer, et de libérer le contenu de leurs granules intracellulaires, incluant des peptides microbicides qui réduisent la viabilité fongique et participent au dialogue avec les autres cellules immunitaires (66,93).

Il n'y a encore, en revanche, aucune donnée concernant le rôle de ces cellules dans l'immunité vis-à-vis de *Scedosporium*.

### **Effecteurs humoraux**

Aussi regroupés sous le terme de **médiateurs solubles**, la place de ces effecteurs dans la défense antifongique est de plus en plus explorée, comme revu par Dellière et coll. (69). De façon notable, les médiateurs solubles ne sont que peu ou pas affectés en cas d'immunosuppression, du fait de leurs origines tissulaires et cellulaires variées (poumon, foie, cellules phagocytaires, etc).

Contrairement à ce qui est souvent considéré, le système immunitaire humoral n'est pas uniquement médié par les anticorps, mais inclut le système du complément et un large panel de collectines (dont MBL, *Mannose binding lectin*), peptides antimicrobiens et autres protéines de la phase aigüe (protéine C-réactive, pentraxine-3 (PTX-3), fractions C3 et C4 du complément). Orchestrant la réponse cellulaire ou exerçant une activité directement microbicide, l'action des médiateurs solubles repose sur différents moyens :

- Fixation à la surface du pathogène, afin de faciliter sa phagocytose (opsonisation).
- Neutralisation du pathogène, empêchant son entrée dans des cellules non immunitaires et donc sa dissémination.
- Agrégation, inhibition de la croissance et de la migration du pathogène.
- Action directe de *killing* ou lyse de pathogène extracellulaire.

L'activation du **système du complément** en particulier, jouerait un rôle important dans l'élimination des spores d'*A. fumigatus*, comme démontré dans le cadre d'une étude collaborative avec l'équipe de V. Aimanianda (Institut Pasteur, Paris) (94) :

- i) Différents composants pariétaux (galactomannane,  $\beta$ -1,3-D-glucane, hydrophobine A (RodA)) sont capables d'activer certaines fractions du complément (majoritairement C3), induisant l'opsonisation des spores.
- ii) L'opsonisation des spores par le complément facilite l'agrégation, la reconnaissance et la phagocytose des spores par les macrophages humains, mais n'induit pas la formation de complexe lytique à leur surface (MAC, *membrane attack complex*).

Parmi les protéines de la phase aigüe, la PTX-3 libérée par les cellules épithéliales et les phagocytes, occupe une place significative dans la défense anti-aspergillaire, en promouvant l'activation du complément (interaction avec C1q) et la phagocytose des spores (95). Les souris PTX3<sup>-/-</sup> sont plus susceptibles de développer des API que les souris sauvages (96), et l'administration de PTX restaure la résistance à l'infection (96). Le rôle de polymorphismes hypofonctionnels de PTX3 a également été mis en évidence chez des patients atteints de BPCO, qui développent une colonisation aspergillaire et sont susceptibles de développer une APC (97).

### ii. Immunité adaptative

L'avalanche cytokinique et l'activation des voies de transduction intracellulaires durant la réponse innée, orientent la réponse adaptative coordonnée par les cellules T CD4<sup>+</sup> vers un ou plusieurs sous-types de cellules T helper (T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2, T<sub>H</sub>17 et T<sub>reg</sub>). Si ces cellules T CD4<sup>+</sup> ont une activité directement antifongique, elles médient les réponses adaptatives en libérant des cytokines et en supportant les cellules B et T CD8<sup>+</sup>. L'extrême sensibilité aux infections fongiques des patients infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) au stade SIDA illustre bien l'importance de ces cellules. De plus, le transfert adoptif de cellules T CD4 spécifiques d'*Aspergillus* confère une protection vis-à-vis de l'API. Dans le contexte d'immunodéficience touchant la réponse innée, par exemple la neutropénie, l'immunité médiée par les cellules T devient une voie effectrice anti-aspergillaire importante. En revanche, il n'y a aucune donnée relative à la réponse T à l'infection par *Scedosporium*. Les rares études menées sur *L. prolificans* supportent notamment l'expansion *in vitro* de cellules T (majoritairement CD4<sup>+</sup>) après stimulation par des lysats fongiques (98).

Des études suggèrent un rôle pivot des réponses inflammatoires T<sub>H</sub>1 (*via* la production d' IFN- $\gamma$ ) et T<sub>H</sub>17 (*via* la production d'IL-17) dans la survie à l'infection par *Candida* et *Aspergillus* (99,100). Alors que la réponse T<sub>H</sub>1 médiée par l'IFN- $\gamma$  et le TNF- $\alpha$  a été largement explorée et démontrée comme étant nécessaire à la clairance efficace des spores fongiques, l'importance de la réponse T<sub>H</sub>17 dans l'immunité antifongique a été reconnue plus tardivement.

Induite par les cytokines IL-1 $\beta$ , IL-23 et IL-6, la réponse T<sub>H</sub>17 est bivalente : bien que cruciale pour le recrutement et l'activation des PNNs et des macrophages sur le site de l'infection, elle est aussi associée à l'inflammation chronique, aux désordres auto-immuns et à l'allergie (101,102). La stimulation des PNNs par l'IL-17A augmente la production de ROS, d'enzymes protéolytiques et de peptides antimicrobiens, participant à la clairance fongique. En revanche, l'activation incontrôlée et prolongée de la réponse T<sub>H</sub>17 est responsable de dommages pulmonaires et d'inflammation persistante, délétère pour l'hôte.

iii. Cas particuliers des mycoses allergiques

Les cellules T jouent un rôle critique dans la physiopathologie immunitaire des aspergilloses chroniques non invasives, retrouvées dans l'asthme, l'ABPA et possiblement l'APC. Dans les stades précoces de l'infection, la réponse  $T_H2$ , dont le rôle est d'atténuer la réponse immunitaire innée ( $T_H1$  notamment), peut exacerber l'infection et favoriser l'inflammation allergique. Les réponses inflammatoires T générées étant susceptibles d'être délétères pour l'hôte, les  $T_{regs}$  contrôlent la tolérance périphérique et l'inflammation excessive en produisant de grandes quantités d'IL-10, ce qui permet de limiter les dommages tissulaires. En revanche, si les cellules régulatrices  $T_{regs}$  sont cruciales pour l'homéostasie immune dans les poumons, leur expansion défectueuse observée dans l'asthme ou en réponse aux allergènes aspergillaires participe à la mise en place d'une réponse  $T_H2$  excessive.

A cela s'ajoutent les cellules T, B, NK et les PNE qui peuvent devenir hyper-répondeuses à l'IL-4, résultant en une boucle de rétrocontrôle positif sur les cellules  $CD4^+ T_H2$ , sur la synthèse d'IL-4 et d'autres cytokines et chimiokines  $T_H2$  (dont CCL17, IL-5, IL-9-et IL-13) et sur l'activation polyclonale des cellules B productrices d'IgE (39,103), un marqueur établi de maladies allergiques. Dans les poumons, l'IL-5, l'IL-9 et l'IL-13 sont notamment libérées par les cellules lymphoïdes innées 2 (ILC2) en réponse à la stimulation par l'alarmine IL-33 produite par les cellules épithéliales endommagées (104). Dans les mycoses allergiques, les ILC2 jouent un rôle inflammatoire mais aussi protecteur dans le contrôle et la réparation des tissus épithéliaux. L'IL-9 en particulier, stimule la production d'IL-2 par les cellules mastocytaires, et favorise en retour l'expansion des ILC2 qui activent les cellules  $T_H9$  et amplifie l'inflammation allergique (105). La surproduction d'IL-9 observée dans des expectorations de patients atteints de mucoviscidose et une étude menée sur des souris *CFTR*<sup>-/-</sup> ont d'ailleurs mis en évidence l'importance de l'axe IL-9/ILC2 dans l'inflammation pulmonaire chronique au cours de la mucoviscidose (106).

b. Dysfonctions immunitaires dans la mucoviscidose :

Si la mucoviscidose ne prédispose pas au développement d'infections fongiques invasives, le défaut d'activité du canal *CFTR* engendre des anomalies à différents niveaux, participant à la persistance des spores dans l'arbre respiratoire qui entretiennent alors un processus inflammatoire chronique. La colonisation, par *Aspergillus* notamment, pourra évoluer vers une forme immuno-allergique, de la sensibilisation aspergillaire jusqu'à l'ABPA, comme précédemment décrit.

L'état hyper-inflammatoire allergique prédomine, mais des déficits fonctionnels des barrières innées ont été décrits. Tout d'abord, le **défaut de clairance muco-ciliaire** dû à la déshydratation du liquide de surface respiratoire et à la sécrétion anormale de mucine, contribue à l'obstruction des voies respiratoires, à la stase prolongée des microorganismes et donc à la susceptibilité accrue aux infections (107). De plus, l'**acidification et l'hypersalinité** du mucus et du liquide de surface respiratoire des cellules épithéliales *CFTR*<sup>-/-</sup> par rapport aux

cellules sauvages participeraient également à l'inactivation de certains effecteurs innés (tels que les peptides antimicrobiens), à l'origine d'une clairance bactérienne réduite (108).

A la dysfonction des cellules épithéliales, s'associe une dysrégulation des réponses inflammatoires des PNNs et macrophages, du fait de l'expression altérée du canal CFTR à leur surface.

La chimiotaxie accélérée et l'auto-activation des PNNs augmentent la libération de ROS et de protéases, qui entretiennent l'inflammation et les lésions tissulaires (109). Cependant, la capacité des PNNs de patients atteints de mucoviscidose à inhiber la croissance bactérienne et fongique est significativement réduite. Ce défaut de *killing* par les PNNs CF serait notamment expliqué par une alcalinisation anormalement élevée des phagosomes (110,111). Si les recherches sur l'inflammation dans la mucoviscidose se sont beaucoup concentrées sur les PNNs, la dysfonction macrophagique chez les patients CF a également été explorée (112). Le dysfonctionnement phagosomal a similairement été impliqué dans la susceptibilité aux infections et associé à l'incapacité des lysosomes *CFTR*<sup>-/-</sup> à acidifier et tuer les pathogènes, comme démontré dans un modèle de macrophages alvéolaires issus de souris *CFTR*<sup>-/-</sup> (113). Ce défaut d'acidification serait d'ailleurs corrigé par les thérapies utilisant des modulateurs de CFTR (114).

### 3. Facteurs de virulence

La plupart des champignons sont ubiquitaires dans l'environnement, et l'Homme y est exposé par inhalation de spores ou de petites levures. La remarquable faculté des champignons à percevoir des signaux et des changements dans l'environnement leur permet de s'adapter et de survivre. Cette plasticité est d'ailleurs indispensable à leur interaction avec les plantes, les animaux ou les Hommes, *via* l'établissement de relations de symbiose, de commensalisme, de latence ou encore de pathogénicité. Leur capacité à coloniser presque toutes les niches au sein de l'organisme implique des reprogrammations spécifiques, afin de vivre avec - voire d'exploiter - les « stress » générés par les mécanismes de défense de l'hôte.

#### a. Résumé des facteurs de virulence décrits chez *A. fumigatus* et *Scedosporium* spp

Le **Tableau 4** résume les principales stratégies mises en œuvre par *A. fumigatus* et *Scedosporium* spp, participant à la pathogénicité de ces deux champignons. L'objectif est ici de donner une vision globale (non exhaustive) des facteurs de virulence rapportés dans la littérature, avec un volet spécifiquement dédié à la paroi, qui joue un rôle crucial dans la survie du champignon.



(Suite Légende Tableau 4)

<sup>b</sup> Le mécanisme d'action toxique *in vivo* de ces molécules n'est pas toujours connu. Certaines, comme la gliotoxine, agissent notamment par inhibition du système muco-ciliaire, effet pro-apoptotique et inhibition de la production de ROS par les PNNs.

<sup>c</sup> Des gènes codant des enzymes intervenant dans la synthèse de métabolites comme la gliotoxine, la fumiglavine C et la fumiquinazoline ont été identifiés par analyse *in silico*. Leur implication dans la virulence reste à démontrer.

SOD : superoxyde dismutase ; FT : facteur de transcription ; NC : non connu.

## b. La paroi sporale dans l'interaction avec l'hôte

Conservée dans le règne fongique, la paroi constitue un squelette dynamique essentiel au maintien de la structure et de l'intégrité cellulaire (138). Elle est majoritairement composée de carbohydrates (70 à 90%), dont la nature et la proportion varient entre les espèces. La composition pariétale dépend également du morphotype, du stade de croissance (spores ou hyphe) et de l'environnement du champignon. La paroi occupe une place centrale dans la virulence et les interactions avec les cellules-hôtes du fait de sa position superficielle très exposée à l'environnement extérieur. Les polysaccharides pariétaux constituent la principale source de PAMPs reconnus par les PRRs à la surface des cellules de l'hôte, comme présenté précédemment. La structure polysaccharidique de la paroi d'*A. fumigatus* a été extensivement explorée par l'équipe de J-P. Latgé à l'Institut Pasteur, Paris (139–141).

Bien que la structure pariétale ne soit pas précisément élucidée, les parois des spores d'*A. fumigatus* et de *Scedosporium* spp présentent des similitudes et des différences structurales, discutées brièvement ci-dessous et représentées dans la **Fig.9-A,B**.

Les points communs entre les spores de *Scedosporium* et celles d'*A. fumigatus* :

- La **chitine** (polymère de motifs N-acetylglucosamine) : elle confère rigidité et résistance des spores à différents stress. Le rôle immunostimulant de la chitine a longtemps été sous-estimé, notamment chez *A. fumigatus* où ce composant est associé à une signature inflammatoire variable (anti- ou pro-inflammatoire) en fonction de la présence de PAMPs et d'immunoglobulines (142).
- Les  **$\alpha$ -glucanes et  $\beta$ -glucanes** (polymères de glucose) induisent une résistance mécanique et possèdent un rôle de PAMPs.
- La **DHN-mélanine** : c'est un polymère ayant un rôle majeur dans l'interaction avec l'hôte, qui fera l'objet d'une partie spécifique.



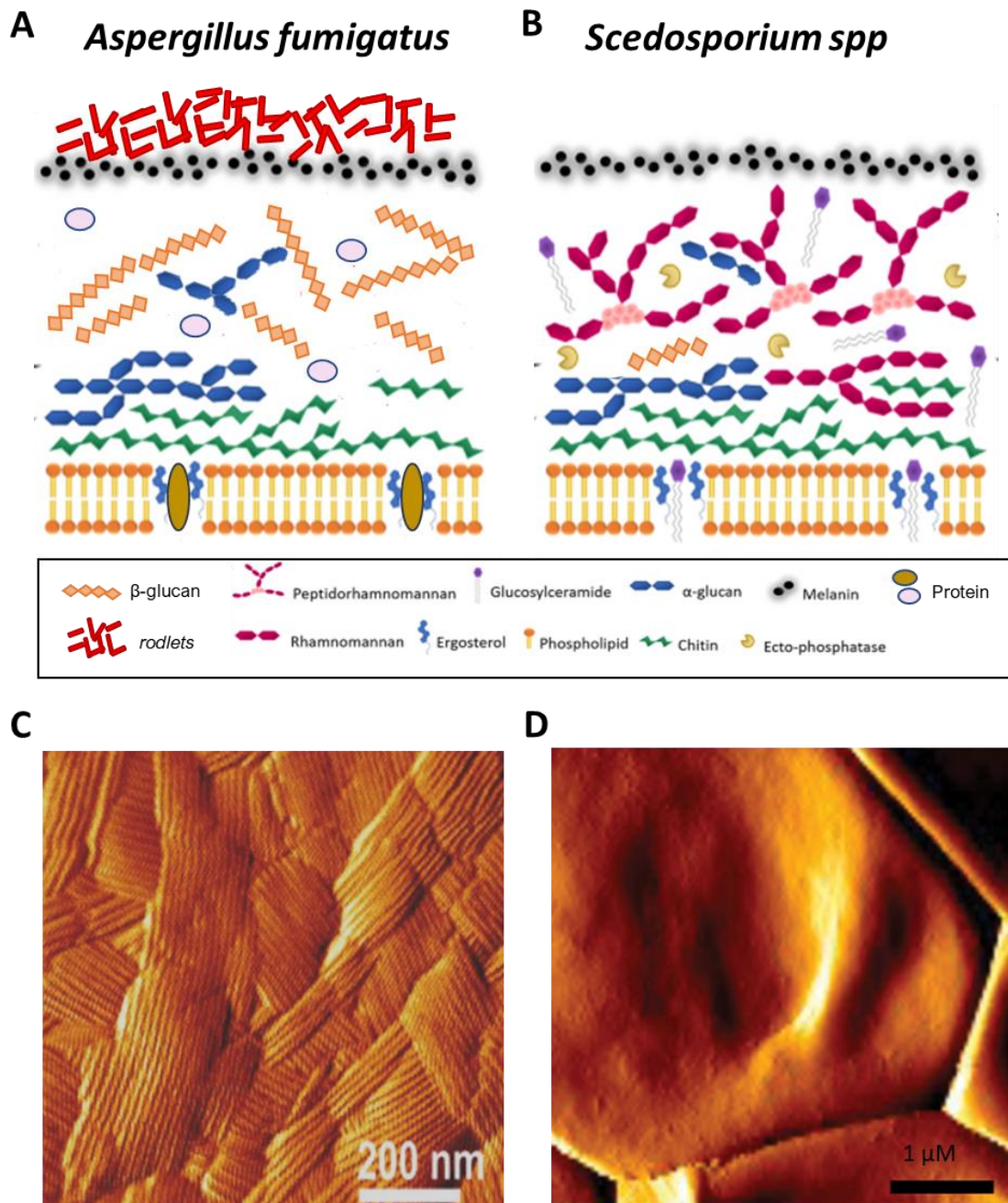


Figure 9 : Structure pariétale des spores d'*Aspergillus fumigatus* et de *Scedosporium spp.* (A,B) Représentation schématique d'après (119,143). (B) Surface des spores d'*A. fumigatus* (C) et *S. boydii* (D) en microscopie de force atomique, d'après (115,116).

Les différences pariétales des spores de *Scedosporium*, comparativement à celles d'*A. fumigatus* :

- L'absence d'ornementations protéiques visibles à la surface des spores, dont la surface apparaît lisse, comme démontré en microscopie de force atomique chez *S. boydii* (116,144), **Fig.9-D**. Cette apparence contraste avec les aspérités visibles à la surface des spores d'*A. fumigatus* constituées par les **hydrophobines** (*rodlets*), des protéines hydrophobes contribuant au masquage des PAMPs et à l'inertie immunologique des spores dormantes (118), **Fig.9-C**.
- Les **rhamnomananes** et **peptidorhamnomananes** (PRMs) sont des PAMPs particulièrement étudiés chez *Scedosporium*, et non décrits chez *A. fumigatus*. Les PRMs participent notamment à l'adhésion des spores aux cellules épithéliales, à la phagocytose et à la production de TNF- $\alpha$  et d'IL-10 par les macrophages, notamment par activation du TLR4 (72,145). Les PRMs présents dans la paroi sporale participent également à l'action cytotoxique exercée par *L. proliferans* sur les macrophages murins, facilitant sa survie chez l'hôte (146). *In vivo*, l'immunisation préalable de souris par du PRM de *L. proliferans* atténue la réponse inflammatoire, favorise le processus infectieux et augmente la mortalité, par rapport aux souris non immunisées (147).
- Le rôle des **glycosylcéramides** (GlcCer) comme PAMPs est particulièrement investigué chez *Scedosporium*. Ces sphingolipides sont impliqués dans la croissance fongique et l'interaction avec les macrophages (148,120,127,149). Si le récepteur cellulaire des GlcCers n'est pas encore connu, ces PAMPs induisent également une sécrétion importante de cytokines pro-inflammatoires par les splénocytes, et favorisent le recrutement des PNNs, des PNEs, et des macrophages péritonéaux chez la souris infectée par *L. proliferans* (150).
- La proportion d' **$\alpha$ -glucanes** et de  **$\beta$ -glucanes**. Chez *Scedosporium*, les  $\alpha$ -glucanes figurent parmi les PAMPs majoritaires, alors que la quantité de  $\beta$ -glucanes pariétaux est faible (151). Les  $\alpha$ -glucanes sont impliqués dans le processus de phagocytose et de sécrétion de TNF- $\alpha$  et d'IL-12 par les macrophages, notamment par activation du TLR2, du CD14 et de Myd88 (71). Dans les spores d'*A. fumigatus*, les  $\beta$ -glucanes jouent un rôle plus important dans la reconnaissance par Dectin-1 (CLR) et l'activation de la réponse inflammatoire macrophagique (152).

A noter que la structure de la paroi subit des modifications lors de la transition conidie-hyphe. Cette plasticité pariétale est particulièrement bien décrite chez *A. fumigatus*, dont le gonflement et la germination des spores s'accompagne de la disparition des hydrophobines et de la mélanine (141,143). La présence de galactomannanes et de glycosaminogalactanes est caractéristique de la forme hyphale (143). Chez *Scedosporium*, les modifications structurales lors de la filamentation sont moins caractérisées. Néanmoins, il a été montré que la germination de *S. boydii* s'accompagnent de modifications de surface (diminution de l'hydrophobicité et de la charge électro-négative), d'une meilleure accessibilité des polysaccharides pariétaux et d'une altération de la couche dense aux électrons, constituée de mélanine (116).

## III. La mélanine dans le règne fongique

### 1. Généralités

Introduit pour la première fois en 1840 par le chimiste suédois Berzelius, et issu du grec « *mèlas* » signifiant « noir », le terme « mélanine » était employé pour évoquer les pigments noirs extraits des membranes oculaires humaines (choroïdes). Les mélanines font partie des grands pigments biologiques naturels, qui comprennent des structures monomériques (caroténoïdes, flavonoïdes, chlorophylles, hémoglobine, etc...) et polymériques (substances humiques, tannins, mélanines). Les mélanines sont des biopolymères hydrophobes complexes, de haut poids moléculaire et négativement chargés qui diffèrent, selon leur structure, leurs propriétés et leurs fonctions (153). Ubiquitaires, elles sont synthétisées par l'ensemble des grands règnes biologiques, incluant les mammifères, dont l'Homme, mais aussi une grande variété de bactéries, champignons et helminthes, responsables d'infections humaines. La production de mélanine est une adaptation universelle des organismes à la vie sur Terre, et nous verrons ultérieurement en quoi la présence de mélanine constitue un avantage de survie dans le règne fongique.

#### a. Structures et diversité des mélanines fongiques

Bien que largement répandues dans la biomasse terrestre, la structure précise des mélanines n'est que partiellement caractérisée du fait de différentes difficultés. D'une part, l'association forte du pigment à la matrice pariétale polysaccharidique complique son extraction et sa purification en grande quantité. D'autre part, la détermination structurale se heurte à sa forte insolubilité qui rend les techniques biophysiques et biochimiques comme la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire, la spectroscopie électronique et la spectrométrie de masse peu contributives. La structure radicaire des mélanines, c'est-à-dire la présence d'une population stable d'électrons libres au sein du polymère, a rendu possible l'utilisation de la spectroscopie de résonance paramagnétique électronique (RPE), aussi appelée résonance de spin électronique (154). Des méthodes combinant la dégradation chimique partielle pour individualiser les monomères, couplée à la chromatographie liquide haute performance, ont aussi contribué à la caractérisation de types de mélanines spécifiques (155).

Les champignons sont capables de synthétiser 3 principaux types de mélanines, constituées de polymères de composés indoliques ou phénoliques, représentés dans la **Fig.10**.

- **La DOPA-mélanine** : elle est assez semblable à la voie métabolique menant à la formation des eumélanines chez les mammifères. La DOPA-mélanine est la structure la plus proche de la mélanine humaine, et a été particulièrement étudiée chez la levure *Cryptococcus neoformans* (153,156,157).
- **La pyomélanine** : elle a initialement été décrite chez la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* (158). Par opposition à la DOPA et la DHN-mélanine qui sont des pigments insolubles, les pyomélanines sont solubles

(159–161). Ce type de mélanine semble être moins répandu dans le règne fongique que les deux autres ou du moins, fait l'objet d'un nombre d'études plus restreint. La pyomélanine est notamment chez *A. fumigatus* (161).

- La **1,8-dihydroxynaphtalène (DHN)-mélanine** : décrite par Wheeler et Bell en 1986 (162), cette dernière voie est la plus empruntée au sein du règne fongique, et permet l'économie de ressources azotées (163).

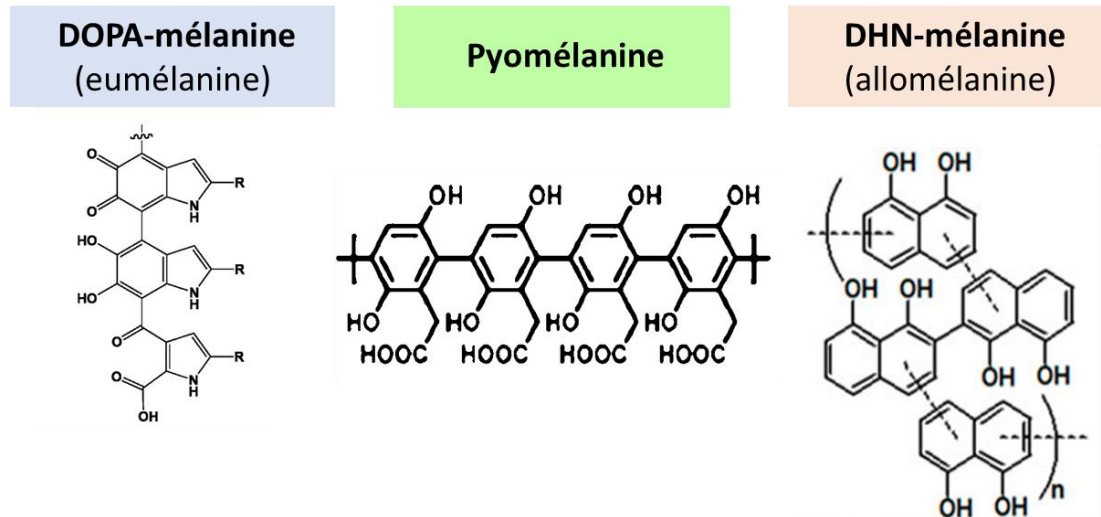


Figure 10 : Structures des principaux types de mélanine décrits dans le règne fongique (164).

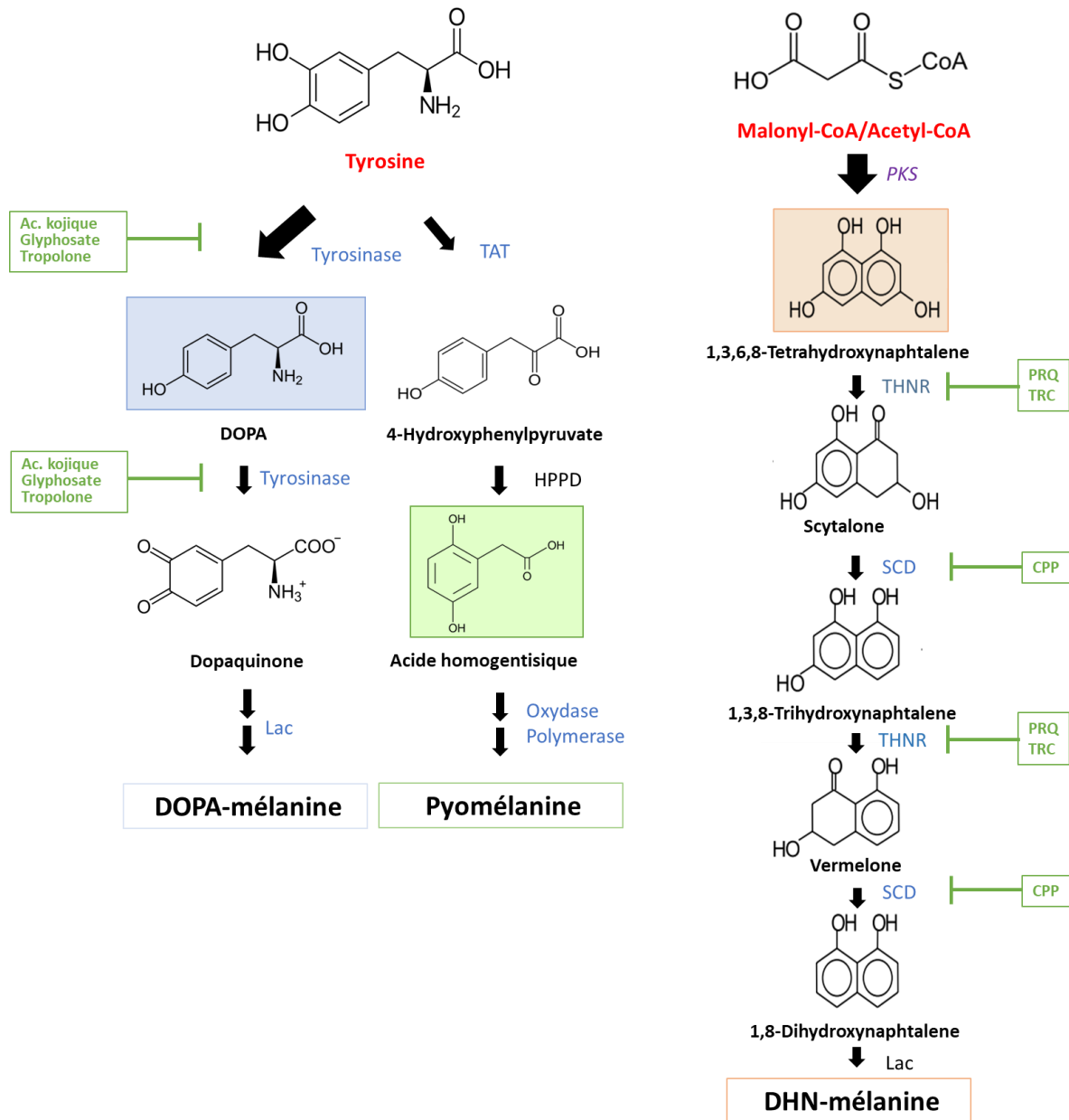
## b. Voies de biosynthèse et régulation

### i. Présentation des voies de biosynthèse

La **Fig.11** est une représentation de la biosynthèse des trois principaux types de mélanines fongiques. Cependant, la diversité des mélanines dans le règne fongique n'est pas totalement élucidée, et des voies enzymatiques alternatives peuvent être empruntées à partir des mêmes précurseurs pour aboutir aux mêmes structures.

- La biosynthèse de **DOPA-mélanine** est initiée à partir de L-tyrosine transformée en L- 3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) par des tyrosinases et laccases, puis convertie en dopaquinone, pour être enfin auto-oxydée et polymérisée.
- La **pyomélanine** est, comme la précédente, produite à partir d'intermédiaires du catabolisme de la L-tyrosine (TDP, *Tyrosine degradation Pathway*), incluant le 4-hydroxyphenylpyruvate et l'acide homogentisique (AHG). La pyomélanine est ensuite formée par auto-oxydation et polymérisation de l'AHG.
- La biosynthèse de **DHN-mélanine** suit une cascade enzymatique conservée au sein des champignons, même si la voie enzymatique présente des variations en fonction des espèces. Cette voie initiée par la construction du squelette 1,3,6,8-tetrahydroxynaphtalène (1,3,6,8-THN) à partir de 5 molécules d'acétyl-CoA et de malonyl-CoA endogènes sous l'action de la polyketide synthase (PKS). Puis une réductase spécifique réduit

le 1,3,6,8 THN en scytalone, qui est déshydratée en 1,3,8-trihydroxynaphtalène (1,3,8-THN) sous l'action d'une scytalone deshydratase (SCD). La vermelone est ensuite formée par réduction du 1,3,8-THN. Une seconde réaction de déshydratation faisant intervenir la SCD aboutit à la formation du 1,8-DHN, qui est ensuite polymérisé en DHN-mélanine sous l'action de laccases.



**Figure 11 : Schéma simplifié des principales voies de biosynthèse de mélanines fongiques et des molécules utilisées pour inhiber ces voies, d'après (156,163,165–168).**

TAT : L-tyrosine aminotransferase ; DOPA : 3,4-dihydroxyphenylalanine ; 4-HPPD : 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase ; PKS : polyketide synthase ; THNR : tetra/trihydroxynaphtalene reductase ; SCD : scytalone deshydratase ; Lac : laccase ; PRQ : pyroquilon ; TRC : tricyclazole ; CPP : carpropamide.

Contrairement à la synthèse de DOPA-mélanine, qui dépend d'une enzyme et repose sur un cycle redox spontané et continu, la synthèse de DHN-mélanine requiert une enzyme pour synthétiser chaque intermédiaire.

Si l'activité d'une enzyme est bloquée, l'intermédiaire s'accumule et s'oxyde spontanément pour former différents métabolites et pigments.

Compte tenu des difficultés analytiques rencontrées, la plupart des connaissances sur la mélanine fongique sont issues d'approches indirectes, passant par l'identification et la délétion des enzymes impliquées dans les voies de biosynthèse de mélanine (pentaketide synthase, laccase, tyrosinase) ou encore par l'inhibition sélective de certaines voies de biosynthèse : utilisation d'acide kojique, tropolone et glyphosate (inhibition de la voie de la L-DOPA) ou encore de tricyclazole, pyroquilon et carpropamide (inhibition de la voie du 1,8-DHN), comme indiqué dans la **Fig.11**. Ces différentes approches ont d'ailleurs été précédemment mises en œuvre dans l'équipe sur *S. boydii*, pour mettre en évidence la présence de DHN-mélanine et l'absence de DOPA-mélanine (144). A noter que l'inhibition de la biosynthèse de DOPA-mélanine et de pyomélanine est aussi possible, et facilitée par culture du champignon sur un milieu minimum dépourvu des précurseurs (tyrosine ou DOPA), ce qui n'est pas possible pour la DHN-mélanine, dont la synthèse est initiée à partir de métabolites fongiques endogènes.

Il n'existe pas de corrélation directe entre le type de mélanine fongique et le phylum duquel dérive chaque champignon, même si la 1,8-DHN-mélanine semble être commune au phylum des Ascomycètes, alors que les Basidiomycètes utilisent la voie de la DOPA et autres voies alternatives. Comme indiqué dans le **Tableau 5**, certains champignons comme *A. fumigatus* sont capables de produire plusieurs types de mélanines, principalement de la DHN-mélanine mais aussi, en moindre quantité de la DOPA- et de la pyomélanine. Chez d'autres champignons comme *A. niger*, *Histoplasma capsulatum* ou *Paracoccidioides brasiliensis*, l'identification du type de mélanine reste controversée.

Il existe d'autres types de mélanine rapportés de façon anecdotique. Par exemple, chez *Aspergillus terreus*, l'absence des gènes de la voie de la DHN-mélanine et l'absence de pigment produit en présence des précurseurs de DOPA, a conduit à l'identification par Geib et coll. d'une enzyme NRPS-like (MelA) et d'une tyrosinase (TyrA) exprimées durant la conidiogenèse. Leur expression aboutit à la production d'aspulvinone E, puis à la polymérisation en un pigment dénommé Asp-mélanine, proche de pigments retrouvés chez des macromycètes basidiomycètes (169).

A noter que chez un champignon capable de synthétiser plusieurs types de mélanine, il peut exister une co-régulation de leur biosynthèse, à l'image de la synthèse de pyomélanine et DHN-mélanine chez *Alternaria*. En effet, Fernandes et coll. ont montré qu'en cultivant *Alternaria* sur milieu minimum supplémenté en tyrosine ou phénylalanine (précurseurs de la pyomélanine), la biosynthèse de DHN-mélanine était réprimée, au profit de celle de la pyomélanine (160).

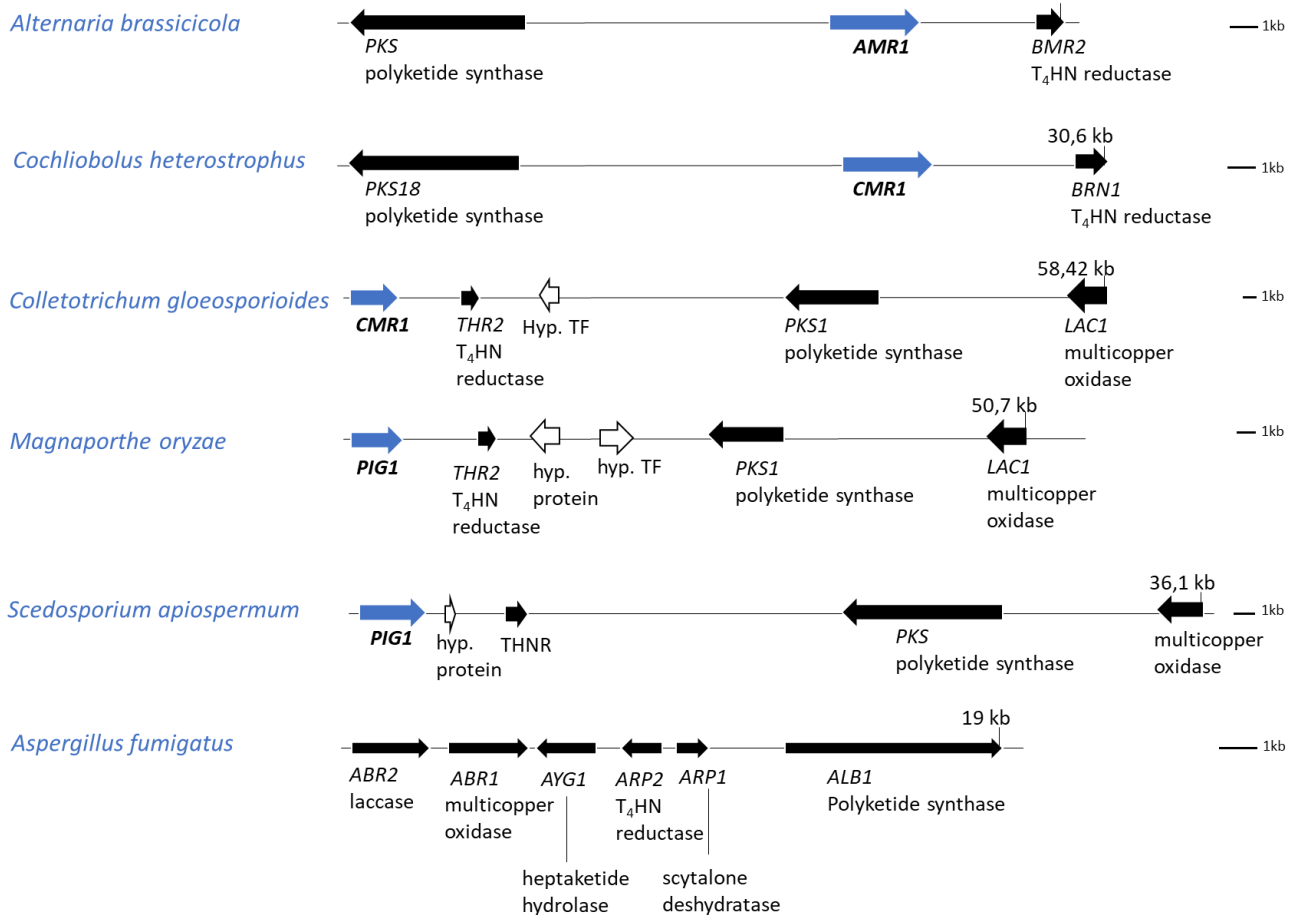
**Tableau 5 : Types de mélanine et voies de biosynthèse présumés chez différents champignons impliqués en pathologie humaine, d'après la revue de Smith & Casadevall (170) et (160).**

Espèce	Forme	Type de mélanine	Enzymes et voies de biosynthèse
<i>Aspergillus flavus</i>	Conidie	DOPA	Tyrosinase
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Conidie	DOPA, DHN, Pyo	Laccase, PKS ( <i>ALB1</i> , <i>ARP1</i> , <i>ARP2</i> ), TDP ( <i>HPPD</i> , <i>HMGA</i> )
<i>Aspergillus nidulans</i>	Conidie	DOPA, DHN ?	Tyrosinase, Laccase
<i>Aspergillus niger</i>	Conidie	DOPA, DHN	Non connu, PKS ( <i>ALBA</i> , <i>AYGA</i> )
<i>Alternaria alternata</i>	Conidie, hyphe	DHN, Pyo	PKS, TDP
<i>Candida albicans</i>	Levure	DOPA	Laccase
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Levure	DOPA, Pyo	Laccase ( <i>CNLAC1</i> , <i>CNLAC2</i> )
<i>Cryptococcus gattii</i>	Levure	DOPA	Laccase
<i>Exophiala dermatitidis</i>	Levure, Hyphe	DOPA, DHN	Laccase, PKS ( <i>PKS1</i> )
<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	Conidie, Hyphe	DHN	PKS
<i>Histoplasma capsulatum</i>	Levure, Conidie	DOPA, Pyo, DHN	Laccase, TDP, PKS? Laccase?
<i>Lomentospora prolificans</i>	Conidie	DHN	PKS ( <i>PKS1</i> , <i>4HNR</i> , <i>SCD1</i> )
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	Levure, Conidie	DOPA, DHN?	Laccase, PKS?
<i>Sporothrix schenckii</i>	Levure, Conidie, Hyphe	DOPA, Pyo, DHN	Laccase, TDP, PKS
<i>Talaromyces marneffeii</i>	Levure, Conidie/hyphe	DOPA, DHN, Pyo	Laccase, PKS ( <i>ALB1</i> , <i>ARP1</i> , <i>ARP2</i> ), TDP ( <i>HPDA</i> , <i>HMGR</i> )

PKS : Polyketide Synthase Pathway; TDP : Tyrosine Degradation Pathway.

#### ii. Régulation de la biosynthèse de DHN-mélanine : *PIG1* et autres facteurs de transcription

Les enzymes impliquées dans la cascade de biosynthèse de la DHN-mélanine sont codées par un nombre variable de gènes - entre 3 et 6 gènes selon le champignon -, qui sont conservés et organisés pour certains en clusters (171), **Fig.12**. Le cluster le plus complet a été décrit chez *A. fumigatus*. Ce cluster est le plus court (19kb), avec le plus grand nombre de gènes, et est probablement le plus proche du cluster ancestral, qui a subi ultérieurement des modifications majeures, dont la perte d'un ou plusieurs gènes (171–173). De plus, chez certains champignons, des gènes de synthèse de mélanine ont été identifiés en dehors du cluster dans le génome, comme celui de la scytalone deshydratase (*SCD*) chez *Alternaria alternata* (174) ou *Scedosporium apiospermum*, qui a été localisé dans une autre région du génome.



**Figure 12 : Cluster génique contrôlant la biosynthèse de DHN-mélanine, schéma personnel d'après (172,173). Hyp. : hypothetical ; TF : transcription factor.**

A l'exception d'*A. fumigatus*, il existe au sein des clusters géniques de biosynthèse représentés dans la **Fig.12**, un facteur de transcription (FT) conservé susceptible d'intervenir dans le contrôle de la biosynthèse de la DHN-mélanine (flèche bleue). Il a en effet été démontré, chez un certain nombre de champignons phytopathogènes, que cette régulation faisait intervenir le gène *PIG1* (*Pigment of Magnaporthe 1*) initialement décrit chez *Magnaporthe oryzae* ou d'autres gènes orthologues comme *CMR1* (*Colletotrichum Melanin Regulation*) chez *Colletotrichum* et *Cochliobolus* (172,175), et *AMR1* (*Alternaria melanin regulation*) chez *Alternaria brassicicola* (176).

Selon le champignon d'intérêt, ces FT ne régulent pas toujours la mélanisation de l'ensemble des structures fongiques, à l'image de *PIG1* chez *Magnaporthe oryzae*, dont la délétion n'affecte la mélanisation que des hyphes et non des conidiophores et des spores (177).

Pour rappel, une caractéristique des champignons phytopathogènes est la production d'appressoria, correspondant à des structures renflées et mélanisées, formées par différenciation des tubes germinatifs issus de la germination des spores. Chez *Colletotrichum lagenarium*, agent de l'antracnose du concombre, la



délétion de *CMR1* affecte l'expression des gènes de biosynthèse de mélanine dans les hyphes, alors que la mélanisation des appressoria est inchangée (175). De même chez des mutants  $\Delta$ *CMR1* de *Cochliobolus heterostrophus* (agent de la rouille du maïs) dont le défaut de mélanisation des hyphes est associé à une expression indétectable de *BRN1* et *BRN2* (THN réductases) et *SCD*, tandis que l'expression de *PKS18* n'est que modérément réduite par rapport à la souche sauvage (172).

En revanche, chez *Colletotrichum gloeosporioides* (responsable notamment de l'antracnose du peuplier), la mélanisation de mutants  $\Delta$ *CMR1* est réduite dans les appressoria (-40%) et dans les hyphes (173). Ce défaut de mélanisation se traduit par le développement d'un pigment brun clair et non plus noir dans les colonies, et résulte de la répression des gènes-clés de la synthèse de mélanine (*CgPKS1*, *CgTHR1*, *CgTHR2*, *CgSCD1* et *CgAYG1*), comparativement à la souche sauvage.

Chez *Verticillium dahliae*, la délétion du facteur de transcription *VDPF* (non orthologue de *PIG1*) résulte en un défaut de mélanisation des hyphes et en l'absence de microsclérotés, qui constituent d'autres formes mélanisées de dissémination et d'invasion. L'absence de mélanine chez les mutants  $\Delta$ *VDPF* est la conséquence de l'expression indétectable des gènes *BRN1*, *BRN2* et *SCD1*, alors que celle de *PKS1* est inchangée (178).

Ces différents résultats illustrent le rôle régulateur de ces FT sur la biosynthèse de mélanine, conservé au sein des champignons phytopathogènes étudiés.

Sur la base du génome de *S. apiospermum* séquencé et annoté dans l'équipe (179), le cluster de la DHN-mélanine a pu être identifié et comprend le gène *PIG1* (SAPIO\_CDS8655) situé en amont du cluster, composé des gènes codant la THNR, la PKS et une multicopper oxidase. Le gène séparant *PIG1* de *THNR* code une protéine dont la fonction est indéterminée. Chez *S. apiospermum*, le gène *PIG1* est composé de 2793 pb réparties en 3 exons, et code une protéine de 931 acides aminés qui présente 60,1% et 67% de similarités avec les orthologues *PIG1* de *M. grisea* et *CMR1* de *C. lagenarium*, respectivement. L'alignement de la séquence protéique de *PIG1* de *S. apiospermum* avec les protéines orthologues *PIG1* et *CMR1* des champignons phytopathogènes a révélé la conservation d'un domaine en doigt de zinc de type Zn(II)<sub>2</sub>/Cys<sub>6</sub> dans la région N-terminale de la protéine, motif commun aux facteurs de transcription fongiques (175).

S'il a été montré que le facteur de transcription *PIG1* régulaient positivement la synthèse de mélanine chez des phytopathogènes, il n'existe à ce jour aucune donnée concernant *Scedosporium* dans la littérature.

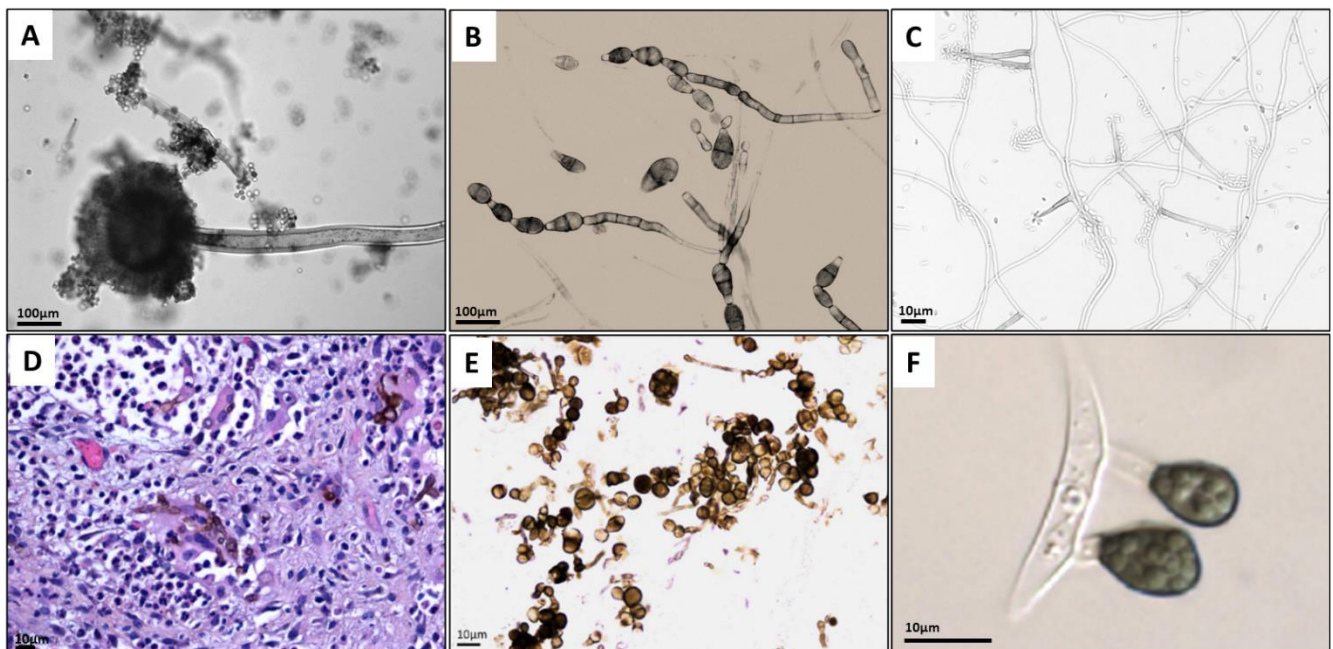
Comme suggéré par l'absence de FT orthologue de *PIG1* chez *A. fumigatus*, la biosynthèse de la mélanine dans le règne fongique est un mécanisme particulièrement complexe qui fait intervenir d'autres voies de régulation, encore très partiellement élucidées. Par exemple, chez *A. fumigatus*, des FT tels que DevR et RlmA ont été identifiés comme ayant des domaines de liaison au promoteur du gène de la polyketide synthase (*PKS*), et interviendraient dans la régulation de la DHN-mélanine (180,181). Des voies de signalisation cellulaire ont

également été identifiées, telles que la voie PKA/AMPC et plus récemment celle des MAP kinases (*Mitogen-activated protein kinases*) comme Pmk1, Hog (*High Osmolarity Glycerol*) ou MpkB, qui constituent par ailleurs d'importants nœuds de régulation dans les cellules eucaryotes (181–184).

Les mécanismes moléculaires mis en jeu dans la biosynthèse de mélanine sont susceptibles d'être modulés par des stimuli externes, en tant que moyens d'adaptation du champignon à son environnement (cf. paragraphe suivant). En effet, des facteurs environnementaux ont été étudiés, notamment chez *A. niger*, dont l'exposition à la lumière induit une augmentation significative (+26%) du taux de mélanine contenue dans les hyphes (185).

### c. Localisation de la mélanine fongique

La mélanine est un pigment pariétal, visible dans différentes structures fongiques, en fonction du genre et/ou de l'espèce fongique. La mélanine est principalement visible dans les conidies et/ou les hyphes en culture, **Fig.13-A,C**, ou directement sur coupe histologique, **Fig.13-D**. Des structures particulières retrouvées au sein des tissus de l'hôte, comme les cellules fumagoïdes (ou cellules sclérotiques ou muriformes), sont pathognomoniques de la chromoblastomycose et extrêmement résistantes à l'attaque par le système immunitaire, **Fig.13-E** (186). Enfin, comme évoqué précédemment chez les champignons phytopathogènes, l'appressorium est un organe d'invasion des plantes, dont la mélanisation est indispensable à la rigidité et à la fonctionnalité de cette structure **Fig.13-F**.



**Figure 13 : Exemple de structures fongiques mélanisées.**

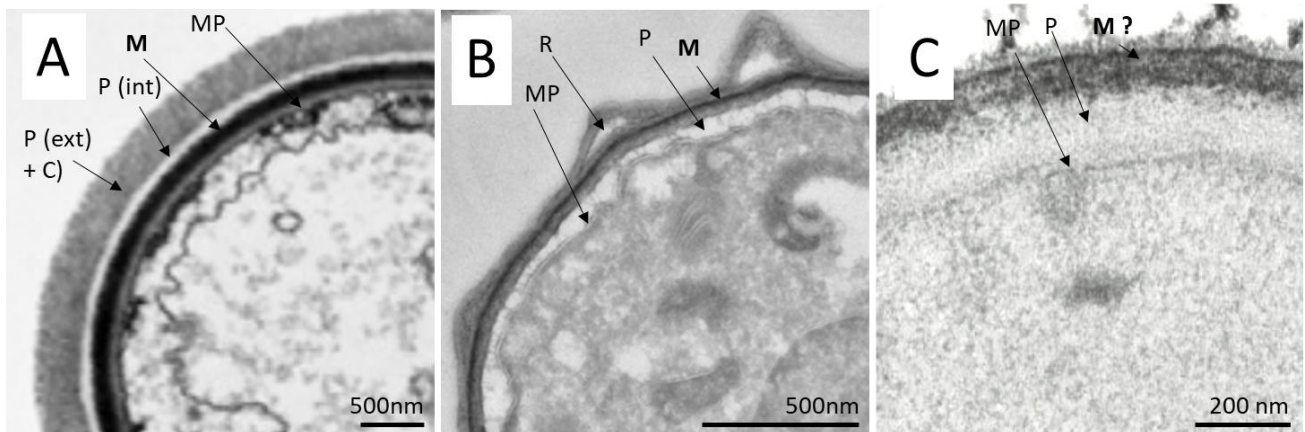
A. Culture d'*Aspergillus section Nigri* : Tête aspergillaire (x500 CHU de Rennes). B. Culture d'*Alternaria alternata* : hyphes et dictyospores (x500, CHU de Rennes). C. Culture d'*Exophiala dermatitidis* (x1000, CHU de Rennes). D-E. Examen histologique d'une biopsie cutanée (chromoblastomycose à *Kirschteiniothelia* sp), (D) Hyphes mélanisés (Hématoxyline Eosine Safran, x500, CHU de Rennes), (E) Cellules fumagoïdes à l'état frais, x500, CHU de Rennes). F. Appressorium (organe d'invasion) chez le phytopathogène *Colletotrichum graminicola* (187).

La pigmentation des hyphes est d'ailleurs à l'origine de la classification dichotomique classiquement utilisée en mycologie médicale, distinguant les phaeohyphomycètes ou « champignons noirs » ou « dématiés » caractérisés par le développement de filaments bruns dans les tissus, des hyalohyphomycètes produisant des filaments hyalins non mélanisés. Il est toutefois intéressant de noter que, chez certains champignons, la présence de mélanine est moins évidente, du fait de l'absence de pigment développé par les colonies sur milieu mycologique standard ; c'est le cas, par exemple, de la levure *Candida albicans* (188).

Dans le règne du vivant, la localisation de la mélanine et de ses intermédiaires de synthèse est très compartimentalisée, du fait de leur cytotoxicité. Ils sont donc susceptibles d'induire un stress oxydatif délétère dans les cellules-hôtes. C'est d'ailleurs une propriété sur laquelle repose la réponse immune innée des insectes, qui sont capables d'encapsuler et tuer des organismes pathogènes envahissant la cuticule, *via* l'activation d'une voie de mélanisation particulière de l'insecte (prophénoloxydase), à l'origine de la production d'effecteurs antimicrobiens (189).

Chez les mammifères, la mélanine est synthétisée et stockée dans des organites sphériques appelés mélanosomes, une organisation également décrite chez certains champignons comme *Fonsecaea pedrosoi* responsable de chromoblastomycose humaine (190), et plus particulièrement chez *C. neoformans* (191). Chez cette espèce, les mélanosomes sont produits dans le cytoplasme puis exportés vers la paroi, formant des structures sphériques d'environ 200 nm, les « granules » de mélanine, organisées en couches épaisses et concentriques, qui apparaissent denses aux électrons en microscopie électronique à transmission. De façon similaire chez *Aspergillus*, la biosynthèse de mélanine semble être initiée dans les endosomes, puis exportée en à la paroi par exocytose (192). La localisation exacte de la mélanine à la surface cellulaire varie entre les espèces et reste encore mal connue chez de nombreux champignons. Chez *C. neoformans*, les granules sont déposées entre la membrane plasmique et la couche interne de la paroi, **Fig.14-A**, tandis que chez d'autres comme *A. fumigatus* ou *Alternaria alternata* (193,194), la mélanine s'insère au sein de la paroi sporale ou à sa surface, **Fig.14-B**. Chez *Scedosporium*, la localisation de la mélanine au sein de la paroi n'a pas été précisément élucidée. Néanmoins, les observations rapportées par Ghamrawi et coll. tendent à démontrer que la DHN-mélanine se trouve dans la couche externe de la paroi sporale de *S. boydii*, **Fig.14-C**. En inhibant chimiquement la biosynthèse de DHN-mélanine, la couche externe dense aux électrons était plus fine, fragmentée et parfois détachée de la spore. De plus, l'inhibition de synthèse de mélanine s'accompagnait d'une diminution significative de la charge électro négative de surface (144).

Le dépôt dans la paroi implique d'étroites interactions moléculaires entre la mélanine et la chitine, un polymère de  $\beta$ -1,4-N-acétylglucosamine formant de solides microfibrilles (156). L'inhibition de la synthèse de chitine en particulier résulte, chez *C. neoformans*, en un « leaky melanin phenotype », ou « phénotype fuyant », c'est-à-dire que le pigment n'est plus contenu dans la paroi mais est libéré dans le milieu extracellulaire (195).



**Figure 14 : Microstructure de la levure *Cryptococcus neoformans* (A) (adapté de (196)) et des spores d'*Aspergillus fumigatus* (B) (140) et de *Scedosporium boydii* (C) (144) en microscopie électronique à transmission.**

MP : membrane plasmique ; M : mélanine ; P (int) : couche interne de la paroi ; P (ext) : couche externe de la paroi ; C : capsule polysaccharidique ; R : rodlets.

La mélanine a un impact important sur la structure globale et l'architecture de la paroi des spores, en servant d'ancrage, comme chez *A. fumigatus*, à d'autres protéines constituant les ornements visibles à la surface des spores (hydrophobines RodA ou *rodlets*) (197). Chez *Scedosporium*, bien que des gènes prédits comme codant des hydrophobines soient présents dans le génome, les observations en microscopie de force atomique n'ont pas mis en évidence d'aspérités semblables (cf. II. 3, Fig.9-D).

De plus, la présence de mélanine réduit la porosité de la paroi et en maintient les propriétés de surface, qui confèrent au champignon un bouclier extra-cellulaire vis-à-vis de facteurs environnementaux ou des défenses de l'hôte, comme exposé dans les paragraphes ci-dessous.

#### d. Propriétés générales

La distribution géographique très large des champignons « noirs » suggère que la mélanine offre à ces microorganismes des propriétés physico-chimiques particulières, conférant un avantage d'adaptation et/ou de survie à des environnements extrêmes. Les principales propriétés sont listées ci-dessous :

- **Radio- et photoprotection**

Le rôle photoprotecteur de la mélanine est bien connu au niveau de la peau humaine, jouant le rôle d'écran solaire naturel en absorbant et en dissipant les photons des radiations ionisantes au sein de sa structure. Chez les champignons, la mélanine protège également des rayonnements ultraviolets (UV), UVA et UVB qui atteignent la surface de la terre, et UVC (expérimentalement), mais aussi de rayonnements électromagnétiques de plus haute énergie ou de radiations ionisantes, incluant les rayonnements gamma et X (198). Ces radiations sont susceptibles de générer des radicaux libres ou ROS, capables d'endommager les structures et la fonction de certaines molécules biologiques, comme l'ADN. En dépit de l'hétérogénéité structurale des mélanines

fongiques, il est supposé que toutes les formes soient capables d'absorber ces rayonnements ; les propriétés optiques de chacune restent cependant largement inexplorées. A noter que, le radiotropisme de certains champignons, c'est-à-dire leur capacité à croître en présence de telles radiations ionisantes (gamma notamment) a été décrit pour la première fois lors de la mise en évidence de champignons noirs - dont *Cladosporium* - colonisant le réacteur endommagé à Tchernobyl ainsi que les sols environnants. Il s'agit probablement du meilleur exemple de champignons vivant dans des environnements fortement irradiés (199).

- **Propriétés anti-oxydantes**

En lien avec le rôle photoprotecteur, la mélanine joue le rôle de tampon redox physiologique capable de lier et neutraliser les radicaux libres exogènes, une propriété qui, de surcroît, contribue à la virulence des champignons, par interférence avec les mécanismes de défense de l'hôte, comme cela sera exposé dans la prochaine partie (153). La mélanine protège aussi des ions hypochlorite, du permanganate et du peroxyde d'hydrogène (200).

- **Thermorégulation et anti-dessiccation**

Le rôle de thermorégulation de la mélanine provient de sa capacité à absorber efficacement les radiations solaires et à les dissiper sous forme de chaleur. Bien qu'il n'existe que peu de données concernant la part de ce pigment dans la thermorégulation fongique, le rôle protecteur de la mélanine vis-à-vis de températures extrêmes a notamment été montré chez *C. neoformans* (201) ou encore chez *Exophiala dermatitidis*, avec une survie réduite de mutants albinos  $\Delta PKS$  exposés à 42°C et à -20°C, comparativement à la souche sauvage (202). Cette adaptation thermique explique aussi la capacité de champignons saprophytes de l'environnement à coloniser et se développer au sein d'un hôte à 37°C.

- **Résistance aux stress chimiques et mécaniques**

La capacité des champignons noirs à persister dans des environnements où les pressions osmotiques et hydrostatiques sont élevées, par exemple à haute altitude, dans des milieux hypersalins ou dans des eaux profondes, prouve bien le rôle protecteur de la mélanine pariétale. Cette propriété résulte de la stabilité chimique très importante de sa structure, ainsi que de sa position externe étroitement liée au maillage polysaccharidique qui confère à la paroi une grande rigidité. De plus, la mélanisation assure une protection contre la dégradation chimique, comme l'hydrolyse acide, mais aussi contre la toxicité des métaux lourds (chélation) (203). En fait, la mélanine est capable de former des liaisons covalentes, ioniques et hydrophobes avec des protéines, polysaccharides, pesticides et autres polluants, du fait de sa composition aromatique et la variété de groupements fonctionnels hydroxyl, carboxyl, amine et phénoliques.

Il est important de noter que la mélanine n'est pas le seul métabolite au sein de la cellule fongique contribuant à la résistance vis-à-vis d'agressions extérieures. Ainsi, conjointement à la mélanine pariétale, la protection des spores contre les radiations, par exemple, fait appel à des métabolites non chromogéniques absorbant les UV (ex : mycosporines), des systèmes antioxydants enzymatiques (ex : catalases, superoxyde dismutase (SOD)) et non enzymatiques (ex : caroténoïdes, glutathion), et des systèmes de réparation de l'ADN (204).

Du fait de ses multiples et remarquables propriétés, la mélanine fongique suscite actuellement un vif intérêt pour des applications dans des domaines variés. Il ne s'agit pas de l'objet de cet exposé mais il existe, depuis quelques années des travaux sur l'utilisation de dérivés synthétiques de mélanine dans la santé humaine (notamment dans un but de conception de matériaux de protection contre les radiations ionisantes pour les astronautes), l'élimination des polluants dans les écosystèmes et la rationalisation de procédés industriels (165). A titre d'exemple, des études réalisées sur des films minces de mélanine obtenus à partir de 2,7-DHN ont montré que ce matériau pouvait servir de point de départ au développement de surfaces techniques ayant des propriétés bactéricides et de piégeage des radicaux (205).

## 2. Rôles de la mélanine dans l'interaction hôte-champignon

Après avoir énuméré les propriétés et fonctions cruciales de la mélanine dans la machinerie fongique, l'objet de cette seconde partie est de comprendre pourquoi ce pigment figure actuellement parmi les facteurs de virulence les plus étudiés chez les champignons responsables d'infections humaines. Il est intéressant de remarquer que les études de virulence ont d'abord porté sur des espèces phytopathogènes, responsables de la destruction de cultures entières, avec un enjeu économique majeur en agriculture. La couche de mélanine présente dans les organes d'invasion (appressoria) autorise, notamment, une pression de turgescence très élevée qui facilite leur pénétration dans la cuticule des feuilles, et participe donc à la virulence des champignons.

Ces travaux se sont appuyés sur des mutants déficients en mélanine, par délétion d'un des facteurs de transcription régulateurs de la biosynthèse de mélanine présentés précédemment (cf. III. 1-b), ou par délétion spécifique de gènes impliqués dans la biosynthèse. Les différents modèles aboutissent à des conclusions parfois contradictoires selon le champignon étudié. Par exemple, des mutants  $\Delta CMR1$  déficients en mélanine chez *Colletotrichum gloeosporioides*, présentent une capacité de pénétration dans les cellules épithéliales d'oignon retardée et réduite dans les temps précoces, témoignant d'une perte de virulence (173). La délétion de la SCD chez ce champignon a conforté les premières observations, résultant en une moindre pénétration des appressoria non mélanisés dans les feuilles de plants de tomates et de citronniers (206). De même, chez des mutants  $\Delta VDPF$  de *Verticillium dahliae*, l'absence de mélanisation des hyphes et l'absence de microsclérotés est associée à une maladie moins sévère sur des cultures de coton, en lien avec une biomasse réduite au sein des racines (178). En revanche, la mélanine ne semble pas impliquée dans la virulence d'autres champignons

comme *Cochliobolus heterostrophus*, dont les mutants  $\Delta\text{CMR1}$  déficients en mélanine induisent des lésions sur des plants de maïs comparables à la souche sauvage (172). De plus, si la délétion de *SCD* et *THR* chez *Sclerotinia sclerotiorum* ralentit la croissance des hyphes *in vitro*, la pathogénicité sur feuille de colza reste inchangée (207). Chez *Alternaria brassicola*, la pathogénicité de mutants  $\Delta\text{PKS}$  dépourvus de mélanine n'est pas non plus modifiée (176). Cependant, de façon inattendue, dans la même étude, les mutants  $\Delta\text{AMR1}$  dont les spores sont déficientes en mélanine présentent une virulence exacerbée sur feuilles de chou vert, induisant des lésions 30 à 80% plus grandes que les lésions induites par les souches mélanisées WT et complémentée (176).

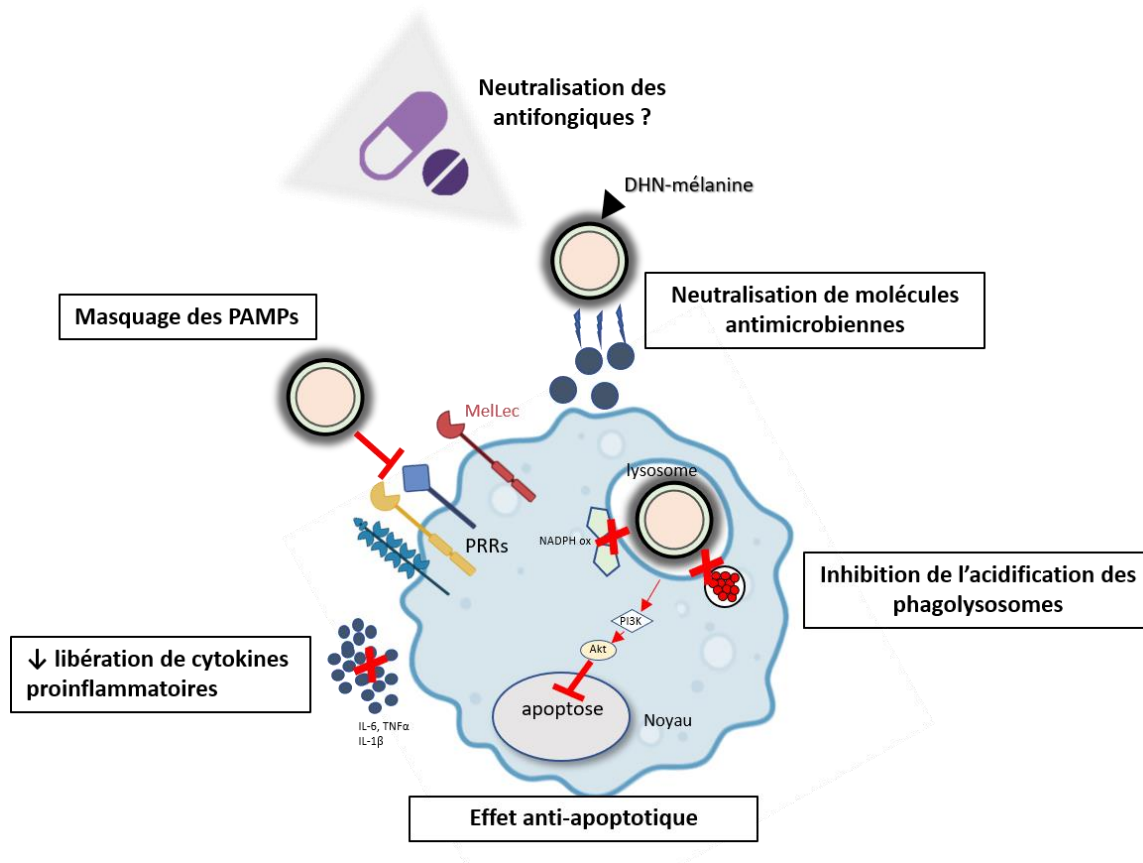
Le rôle très variable de la mélanine dans la virulence de ces champignons phytopathogènes s'explique probablement en partie par la diversité des structures fongiques impliquées (appressoria, microsclérotés, spores...) et des modèles végétaux utilisés.

Parmi les champignons retrouvés dans les infections humaines, beaucoup de travaux ont été menés sur l'interférence exercée par la DOPA-mélanine chez *Cryptococcus neoformans* et par la DHN-mélanine chez *A. fumigatus* (208) sur la réponse immunitaire de l'hôte. Le paragraphe suivant se focalisera sur la DHN-mélanine, qui demeure le type de mélanine le plus répandu parmi les champignons ascomycètes, en s'appuyant sur des études principalement menées sur *A. fumigatus*. A ce stade, il est important de souligner que la plasticité structurale d'*A. fumigatus* évoquée précédemment (cf. II.3) est, à ce jour, peu connue chez d'autres champignons. Par conséquent, les connaissances relevant de l'interaction de la DHN-mélanine d'*A. fumigatus* avec le système immunitaire de l'hôte ne sont probablement pas intégralement transposables à tous les champignons.

### a. Modulation/détournement de la réponse immune de l'hôte, virulence

#### i. Résistance à l'action des cellules phagocytaires

Si l'hôte est doté d'un arsenal d'effecteurs immuns efficaces dans la défense antifongique, la présence de ce pigment pariétal constitue une adaptation favorable à la résistance des conidies vis-à-vis de leur destruction par les cellules phagocytaires professionnelles. Différents mécanismes d'échappement sont progressivement élucidés, en particulier chez *A. fumigatus*, dont les principaux sont résumés ci-dessous et dans la **Fig.15**.



**Figure 15 : Mécanismes d'échappement à la réponse phagocytaire induits par la présence de DHN-mélanine dans les spores fongiques.**

Schéma personnel issu de la compilation non exhaustive de données provenant d'études conduites sur *A. fumigatus* (170,209–213), à l'exception de la neutralisation des antifongiques (*C. neoformans*) (214).

- **Blocage l'acidification phagolysosomale**

L'effet inhibiteur de la DHN-mélanine sur l'acidification des phagosomes et la fusion phagolysosomale a été particulièrement exploré, puisque ce blocage favorise directement la survie de conidies mélanisées au contact des phagocytes, incluant les monocytes/macrophages et polynucléaires neutrophiles (197,215). Supportant des données préliminaires menées sur lignées cellulaires THP-1 (monocytes immortalisés), Akoumianaki et coll. ont montré que l'infection de macrophages issus de PBMCs (*peripheral blood mononuclear cells*) humaines par des spores  $\Delta PKS$  déficientes en mélanine résultait en un pourcentage significativement plus élevé de spores contenues dans des phagosomes acidifiés comparativement aux conidies sauvages. De plus, la survie de ces spores  $\Delta PKS$  était significativement réduite par rapport à celle des spores mélanisées (209).

D'un point de vue mécanistique, durant la phagocytose de spores d'*A. fumigatus*, la reconnaissance des PAMPs par certains PRRs à la surface des phagocytes active la LAP, une voie d'autophagie non canonique qui facilite la maturation des phagosomes et la destruction des spores. Cette voie d'autophagie, qui est régulée par la NADPH



oxydase, intervient dans beaucoup d'autres réponses physiologiques mais joue un rôle crucial dans la défense de l'hôte et l'immunité. De façon très intéressante, en 2016, Akoumianaki et coll. montrent également que la DHN-mélanine inhibe l'activation de cette voie, en excluant de la membrane du phagosome une sous-unité p22phox nécessaire à l'assemblage fonctionnel du complexe de la NADPH oxydase, empêchant l'activation de la LAP et la destruction des spores intra-phagosomales. En 2020, Schmidt et coll. précisent que ce blocage est lié à la dérégulation exercée par la mélanine contenue dans les spores sur l'assemblage correct de microdomaines dépendants de la flotiline, présents dans la membrane phagolysosomale. Au total, cette interférence aboutit en une perte de fonctionnalité de l'ATPase vacuolaire et du complexe de la NADPH oxydase, nécessaires à l'acidification des phagolysosomes (216).

- **Atténuation de la réponse inflammatoire par masquage des PAMPs**

La présence de DHN-mélanine dans les conidies d'*A. fumigatus* limite la réponse cytokinique pro-inflammatoire de l'hôte, émanant en particulier de PBMCs humains (210), comme observé après infection par des transformants albinos  $\Delta PKS$  qui induisent des taux d'IL-6, TNF- $\alpha$  et IL-10 considérablement plus élevés que les conidies sauvages. Des résultats similaires ont été obtenus à partir de cellules dendritiques infectées par différents mutants d'*A. fumigatus* dont la biosynthèse de DHN-mélanine était interrompue à des étapes variables (211). Cette réponse inflammatoire, exacerbée en l'absence de mélanine, est probablement la conséquence de la reconnaissance facilitée de  $\beta$ -glucanes et autres PAMPs par Dectin-1, TLR4 et d'autres récepteurs qui activent des voies de signalisation alternatives (210), comme décrit précédemment.

De la même façon, le démasquage de motifs antigéniques observé chez des mutants  $\Delta ARP1$  facilite le dépôt de protéine du complément à la surface des spores, donnant lieu à une augmentation de l'opsonisation par la fraction C3 (217), susceptible de promouvoir la phagocytose et la destruction par les neutrophiles, notamment.

- **Effet anti-apoptotique sur les cellules phagocytaires**

Volling et coll. ont montré que les conidies aspergillaires inhibaient l'apoptose macrophagique en bloquant l'activation des caspases intervenant dans les voies extrinsèques et intrinsèques (212). Cet effet anti-apoptotique résulte de l'activation de la voie de survie PI3K/Akt exercée par la DHN-mélanine contenue dans les spores d'*A. fumigatus* préalablement phagocytées. L'association de ce mécanisme à l'inhibition de l'acidification phagolysosomale, décrite plus haut, fournit à ces spores une niche intracellulaire favorable à leur survie.

▪ **Autres mécanismes**

D'autres propriétés protectrices vis-à-vis d'effecteurs immuns ont été prêtées à la mélanine fongique, comme la détoxification des ROS, et la protection vis-à-vis de l'action d'enzymes et peptides anti-microbiens (153,218), mais certaines semblent controversées, selon le champignon considéré.

La mélanisation des champignons conférerait à certains une résistance accrue vis-à-vis du stress oxydatif intracellulaire (NO), du fait de la capacité de la mélanine à piéger les radicaux libres. Ainsi, quelques études ont démontré que cette faculté permettrait à des champignons comme *Sporothrix* (219,220), *Exophiala dermatitidis* (221,222) ou encore *Fonsecaea pedrosoi*, de résister davantage à l'action des neutrophiles et macrophages. Cunha et coll. ont notamment mis en évidence une exacerbation du *burst* oxydatif (mesure du NO libéré) dans des macrophages murins incubés avec *F. pedrosoi*, dont la biosynthèse de DHN-mélanine avait été préalablement inhibée par ajout de tricyclazole. Une diminution plus importante de la croissance du champignon traité par tricyclazole et exposé à des concentrations croissantes de NO ou d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> était aussi notée (223).

Enfin, chez *A. fumigatus*, Keizer et coll. ont très récemment réfuté les conclusions dressées dans une précédente étude (197) qui concluait à la moindre résistance de mutants albinos à l'exposition au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en démontrant *a posteriori* que ce phénotype était lié à une mutation additionnelle inattendue dans un gène codant une catalase (224). Ainsi, la DHN-mélanine ne serait pas impliquée dans la protection de ce champignon vis-à-vis des peroxydes d'hydrogène et des ions superoxydes.

ii. Rôle dans la virulence chez l'animal

Concernant la pathogénicité de champignons isolés d'infections humaines, les quelques travaux menés chez la souris tendent à démontrer que la mélanisation participe à la virulence des champignons, en dépit de facteurs de variabilité potentielle, liés en particulier au modèle utilisé (immunocompétent ou non) et à la voie d'infection (intranasale, intratrachéale, intraveineuse (IV)). Tsai et coll. ont montré que l'inoculation ponctuelle (voie IV) de conidies d'*A. fumigatus* albinos  $\Delta PKS$  à des souris immunocompétentes, résultait en une diminution considérable de la mortalité à J21 à moins de 10%, alors qu'elle dépassait 70% après infection par des conidies sauvages (225). Des résultats similaires ont été rapportés chez *Exophiala dermatitidis*, dont les mutants  $\Delta PKS$  induisaient une moindre mortalité chez des souris immunocompétentes infectées par voie IV comparativement à la souche parentale mélanisée (222). Sur le plan de la clairance fongique dans les tissus, les mutants d'*A. fumigatus* albinos étaient globalement plus rapidement phagocytés et dégradés que les souches sauvages, aussi bien dans des modèles murins immunodéprimés (197,225), qu'immunocompétents (226).

Un modèle d'infection utilisant des larves de papillons *Galleria mellonella* ayant prouvé sa pertinence dans l'étude d'infections fongiques a également été sporadiquement utilisé, notamment pour évaluer la virulence

de mutants  $\Delta PKS$  chez *Fonsecaea monophora*. Une diminution significative de la survie des larves infectées par les mutants albinos était observée, comparativement à celle de larves infectées par la souche sauvage (227).

## b. Réponse de la cellule hôte à la DHN-mélanine fongique

La DHN-mélanine fongique est donc un déterminant majeur de l'interaction fongique avec le système immunitaire inné, conférant des propriétés de survie au sein des phagocytes. Cependant, l'hôte déploie en retour des stratégies pour contrer les mécanismes inhibiteurs induits par la mélanine.

### i. La mélanine fongique stimule les défenses antifongiques via le récepteur MelLec

Chez *A. fumigatus*, la DHN-mélanine a été, avec la couche d'hydrophobines, longtemps considérée comme une structure immunologiquement inerte assurant le masquage des motifs de reconnaissance (PAMPs) fongiques et empêchant la reconnaissance par les récepteurs de l'hôte (PRRs) (118,211).

Pourtant, chez d'autres champignons comme *Fonsecaea pedrosoi*, Alviano et coll. ont mis en évidence le pouvoir immunogène de la DHN-mélanine, en détectant dans le sérum de patients atteint de chromoblastomycose, des anticorps capables de lier spécifiquement de la mélanine libre et d'inhiber *in vitro* la croissance du champignon. De plus, le taux de phagocytose des cellules sclérotiques ainsi que le *burst* oxydatif étaient accrus lorsque les neutrophiles humains étaient co-incubés en présence de mélanine soluble, suggérant l'effet stimulant de la mélanine sur les fonctions microbicides des cellules phagocytaires (228).

En 2018, Stappers et coll. ont mis en évidence pour la première fois un récepteur lectine de type C (*C-type lectin receptor*, CLR), appelé *melanin-sensing C-type lectin receptor* (MelLec) capable de reconnaître spécifiquement la DHN-mélanine de spores d'*A. fumigatus*. Des expérimentations additionnelles avaient montré que cette reconnaissance n'était pas spécifique d'*A. fumigatus*, et que MelLec était aussi capable de lier la mélanine d'autres champignons, comme *Cladosporium cladosporioides* et *Fonsecaea pedrosoi* (213).

Codé par le gène *CLEC1A*, le récepteur MelLec est exprimé chez la souris dans les cellules endothéliales CD31<sup>+</sup>, ainsi que dans une petite sous-population de cellules retrouvées dans le foie et les poumons, qui co-expriment EpCAM (*epithelial cell adhesion molecule*). Chez l'Homme, et contrairement à la souris, MelLec est également exprimé dans les cellules myéloïdes incluant les polynucléaires neutrophiles, les monocytes et les mo-DCs (229). Quoiqu'il en soit, le rôle essentiel de ce CLR dans la résistance à l'infection invasive par *A. fumigatus* a été démontré à la fois chez l'Homme et la souris (213). L'absence de MelLec induisait une augmentation des charges fongiques pulmonaires, associée à des réponses inflammatoires altérées dont la diminution du recrutement des neutrophiles, et à une moindre survie de souris préalablement immunodéprimées (213). Chez l'Homme, de façon très intéressante, un polymorphisme non synonyme (G26A) dans le récepteur MelLec a été identifié chez des donneurs de cellules souches hématopoïétiques, et associé à un risque accru d'API chez les receveurs,

probablement par anomalie de transduction du signal intracellulaire (213). Cette observation rappelle d'ailleurs les polymorphismes de PRRs précédemment évoqués.

Au total, le récepteur MelLec participe au contrôle de l'API en déclenchant une immunité protectrice inflammatoire contre *A. fumigatus*, après reconnaissance de la DHN-mélanine pariétale.

Indépendamment du récepteur MelLec, la DHN-mélanine est également capable d'activer d'autres mécanismes de l'immunité innée :

- La DHN-mélanine interagit par exemple avec les plaquettes, comme étudié chez *A. fumigatus*. Rembach et coll. ont démontré qu'au-delà de sa forte affinité pour les plaquettes, la DHN-mélanine était responsable de l'activation et de l'agrégation plaquettaire induites par les conidies d'*A. fumigatus*. Lorsqu'il est excessif, ce phénomène participe aux dommages tissulaires, induits par la libération de granules inflammatoires, et à la génération de thromboses, caractéristiques de la physiopathologie des infections fongiques invasives (230).
- Enfin, l'interaction de médiateurs solubles avec la DHN-mélanine d'*A. fumigatus* a également été explorée. En particulier, l'un des médiateurs solubles (collectines) les plus prévalents au sein du fluide alvéolaire, la protéine du surfactant SP-D (*surfactant protein D*), se lie spécifiquement à la mélanine des spores dormantes d'*A. fumigatus* et facilite leur phagocytose (231). Le rôle protecteur de la SP-D dans l'API avait été auparavant démontré dans un modèle murin, suggérant que l'absence de SP-D était associée à une mortalité plus précoce, une charge fongique et des dommages tissulaires pulmonaires plus importants (232).

#### ii. Reprogrammation métabolique

Il a été récemment montré chez *A. fumigatus*, que la présence de DHN-mélanine induisait dans les macrophages une reprogrammation métabolique, touchant le métabolisme du glucose et en particulier l'activation de la glycolyse. Ce mécanisme, conservé dans l'évolution car notamment retrouvé chez l'Homme et la souris, délivre rapidement l'énergie requise pour les fonctions microbicides et la production de cytokines indispensables à une réponse immune innée efficace (233). Cette très belle étude met, pour la première fois en exergue le rôle crucial de la mélanine fongique dans l'activation de la glycolyse dans la cellule hôte : l'élimination de la mélanine au sein du phagosome induit séquentiellement la séquestration de calcium intracellulaire, l'activation de l'axe de signalisation impliquant mTOR et HIF-1 $\alpha$ , et régule, *in fine*, des changements métaboliques dont l'activation de la glycolyse.

Ces données démontrent un mécanisme pivot initié par la DHN-mélanine dans la régulation immunométabolique des macrophages pendant l'infection fongique, et mettent en évidence le remodelage métabolique des cellules immunitaires comme une stratégie thérapeutique potentielle.

### 3. La mélanine fongique, une cible thérapeutique ?

#### a. Impact de la mélanisation sur la sensibilité aux antifongiques

En tant que composant de la paroi, la mélanine fongique est également considérée comme un facteur potentiel de résistance aux antifongiques disponibles dans l'arsenal thérapeutique. A la fin des années 1990, les premières études sur *Cryptococcus neoformans* ont démontré que la production de DOPA-mélanine par la levure réduisait sa sensibilité à l'amphotéricine B (AmB) et à la caspofungine, par rapport à la condition non mélanisée obtenue par privation du milieu en L-DOPA (234) ou déficience en laccase (214). Deux mécanismes principaux ont été avancés pour expliquer cette sensibilité réduite : la diminution de la perméabilité pariétale à l'AmB et/ou l'adsorption de l'AmB à la mélanine pariétale. Cette deuxième hypothèse a d'ailleurs été étayée par Duin et coll., qui ont montré que la pré-incubation de l'AmB et de la caspofungine avec de la mélanine synthétique, avant réalisation des tests de CMI (concentration minimale inhibitrice) ou de *killing*, réduisait significativement l'efficacité de ces antifongiques, par rapport à la condition sans ajout de mélanine libre. La capacité de liaison de la mélanine aux antifongiques a, enfin, été mise en évidence par une étude structurale démontrant la modification du ratio C/N de la mélanine exposée à ces composés (214).

L'impact de la mélanisation sur la sensibilité aux antifongiques a été évalué sur d'autres champignons, comme résumé dans le **Tableau 6**. Cette brève revue de la littérature illustre qu'il n'est pas possible de généraliser l'impact de ce pigment sur l'action des antifongiques, du fait des différences notables en fonction du type de mélanine produite et de l'antifongique considéré, bien que l'efficacité de l'AmB semble être plus souvent affectée.

Enfin, l'étude de Fernandes et coll. a rapporté la production accrue de DHN-mélanine chez *Alternaria infectoria*, en réponse à certains antifongiques, supportant une nouvelle fois le rôle de la mélanisation comme un mécanisme réactionnel de défense des champignons (235). Cette observation suggère d'ailleurs le potentiel thérapeutique de cibler la synthèse de mélanine, abordé dans la partie suivante.

#### b. Perspective des inhibiteurs de synthèse de mélanine en médecine humaine

A la lumière des nombreuses propriétés et interactions de la DHN-mélanine avec le système immunitaire de l'hôte, il est naturel d'évoquer la possibilité d'inhiber la synthèse de ce composant pariétal à des fins thérapeutiques chez l'Homme. Les MBIs (*melanin biosynthesis inhibitors*) sont d'ailleurs d'importants fongicides largement utilisés en agriculture pour combattre certains champignons phytopathogènes, comme *Magnaporthe oryzae*, agent de la pyriculariose du riz (236).

Depuis quelques années, ce concept émerge dans la littérature et porte en particulier sur des phaeohyphomycètes responsables d'infections cutanées chroniques telles que les chromoblastomycoses ou les

mycétomes. Ces infections évoluent parfois vers des atteintes extrêmement sévères sur lesquelles les traitements antifongiques disponibles sont souvent peu efficaces (diffusion tissulaire limitée, développement de résistance) et associés à une toxicité non négligeable au long-cours.

Des études de sensibilité *in vitro* ont par exemple été conduites sur *Fonsecaea* spp en présence de l'association d'un antifongique et du tricyclazole (inhibiteur de biosynthèse de DHN-mélanine), révélant une diminution significative des CMI de la terbinafine, de l'itraconazole et du posaconazole vis-à-vis du champignon, dont la synthèse de mélanine était inhibée par rapport au champignon exposé au seul antifongique (237). De même pour *Phialophora* spp, les CMI de l'itraconazole et du posaconazole étaient significativement réduites quand le tricyclazole était associé (237). Récemment, l'acide kojique, un puissant inhibiteur de tyrosine kinase a également montré son efficacité dans l'inhibition de la mélanisation de *Fonsecaea* spp, ainsi que dans la réduction de la filamentation des conidies incubées en présence de macrophages murins (238).

*In vivo*, les inhibiteurs de synthèse de DHN-mélanine sont également capables d'inhiber la mélanisation d'une partie des grains dans un modèle de mycétome établi sur des larves de *Galleria mellonella* par *Madurella mycetomatis*. Même si le nombre et la taille des grains étaient inchangés, la combinaison d'itraconazole à un inhibiteur de DHN-mélanine (carpropamide) s'accompagnait d'une augmentation de la survie des larves (239).

Etant donné la controverse autour de l'innocuité des pesticides - classe à laquelle appartiennent les différents inhibiteurs de biosynthèse de mélanine étudiés -, il n'est évidemment pas envisageable de considérer leur utilisation à des fins thérapeutiques chez l'Homme. Cependant, ces preuves de concept ouvrent la voie à la recherche de nouveaux composés dépourvus de toxicité, qui inhiberaient sélectivement la synthèse de mélanine fongique.

Tableau 6 : Impact de la mélanine fongique sur la sensibilité aux antifongiques (revue de la littérature non exhaustive).

Champignon	Type	Méthode	Viabilité après exposition à l'antifongique (condition mélanisée versus non mélanisée)					Réf	
			Amphotéricine B	Itraconazole	Voriconazole	Fluconazole	Kétoconazole		Caspofungine
<i>Cryptococcus neoformans</i>	DOPA-mélanine	MM ± L-DOPA	↑					(234)	
		MM ± L-DOPA	↑ (CMI=)	= (CMI=)	= (CMI=)	= (CMI=)		↑ (CMI=)	(214)
		Absence de laccase	↑					↑	
		MM ± L-DOPA	↑ (CMI=)			↑ légère (CMI =)		ND	(240)
<i>Histoplasma capsulatum</i>	DOPA-mélanine	MM ± L-DOPA	↑ (CMI=)	= (CMI=)	= (CMI=)	= (CMI=)		↑ (CMI=)	(214)
MM ± L-DOPA		↑ (CMI=)	↑ (CMI=)		↑ (CMI=)	↑ (CMI=)		(241)	
<i>Madurella mycetomatis</i>	DHN-mélanine	RPMI ± DHN-mélanine	CMI=	CMI >	CMI=	CMI=	CMI >		(242)
RPMI ± DOPA-mélanine		CMI=	CMI=	CMI=	CMI=	CMI=			
WT versus mutants Mel <sup>-1</sup>		CMI=	CMI=		CMI=	CMI=			(243)
WT vers ΔPKS		↑ (CMI=)		↑ (CMI=)				(CMI=)	(202)
<i>Fonsecaea monophora</i>	DHN-mélanine	WT vers ΔPKS	CMI>	CMI>					(227)

<sup>1</sup> méthode d'obtention ou gène délété non précisé

MM : milieu minimum ; CMI : concentration minimale inhibitrice ; les cases bleues indiquent les conditions ATF où la mélanine a un impact sur la sensibilité à l'antifongique testé.





# OBJECTIFS

La mucoviscidose constitue un terrain propice à la colonisation/infection des voies respiratoires par des microorganismes, et en particulier par les champignons, qui, à long terme, participent à la détérioration de la fonction respiratoire. L'interaction des champignons avec leur hôte est déterminée non seulement par leur virulence, c'est-à-dire leurs propriétés intrinsèques leur permettant de s'adapter et de se développer dans l'organisme, mais également par l'efficacité de la réponse de l'hôte. Ce travail de thèse a pour objectif global de participer à l'amélioration des connaissances des infections fongiques chez les patients atteints de mucoviscidose, et est articulé autour de trois axes thématiques : i) la surveillance biologique des infections fongiques respiratoires, ii) l'interaction de l'hôte avec deux champignons d'intérêt dans ce contexte : *Aspergillus fumigatus* et *Scedosporium apiospermum* et iii) l'étude de facteur de virulence.

La **partie I** s'intéresse à l'épidémiologie des infections/colonisations fongiques prévalentes chez les patients atteints de mucoviscidose, au sein des cohortes suivies à Rennes et à Angers, en lien direct avec mon activité diagnostique au laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Rennes. En particulier, des évolutions récentes constatées dans le paysage des infections fongiques seront abordées.

Le **premier objectif** sera d'établir une photographie des infections/colonisations chez les patients atteints de mucoviscidose suivis à Rennes et Angers, en comparant la prévalence de ces infections à deux périodes distinctes (2011 et 2020), entre lesquelles la prise en charge médicale de la mucoviscidose a connu des modifications importantes. Le **second objectif** sera spécifiquement dédié à *Aspergillus fumigatus* et à la description de l'émergence assez récente de la résistance aux antifongiques triazolés, majoritairement observée dans des isolats de patients atteints de mucoviscidose, pouvant impacter la prise en charge thérapeutique de ces patients.

Les parties II et III abordent des problématiques plus fondamentales, en lien avec l'étude des interactions hôte-champignon. Les différents facteurs de virulence évoqués dans la revue bibliographique, et notamment les différences structurales de la paroi d'*A. fumigatus* et de *S. apiospermum*, sont susceptibles d'impacter la reconnaissance par les cellules-hôtes. La **partie II** a donc pour objectif d'étudier et comparer la réponse *in vitro* de macrophages humains à l'infection par ces deux champignons, *via* des approches transcriptomiques et phénotypiques.

Enfin, la mélanine est un constituant pariétal hautement conservé dans le règne fongique qui interviendrait dans la virulence de certains champignons, en interférant avec la réponse fongicide mise en œuvre par l'hôte. La **partie III** vise à appréhender le rôle et l'importance de la mélanine dans la virulence de *S. apiospermum*.



# **PARTIE EXPERIMENTALE**

---



# I. Épidémiologie fongique au cours de la mucoviscidose

Cette première partie a pour objectif de décrire l'épidémiologie des infections retrouvées au cours de la mucoviscidose, à partir des cohortes de patients locales, suivies dans les Centres de Ressources et de Compétences de la Mucoviscidose (CRCM) de Rennes et d'Angers. Les données de prévalence des différentes espèces fongiques et bactériennes, en lien avec l'évolution de la prise en charge thérapeutique feront l'objet d'un premier volet. Ensuite, un focus sera fait sur *Aspergillus fumigatus*, dont l'émergence croissante de la résistance aux triazolés concerne plus particulièrement les isolats de patients atteints de mucoviscidose, exposés aux antifongiques au long cours.

## 1. Comparaison 2011-2020 de la prévalence des colonisations/infections fongiques : données des cohortes de Rennes et d'Angers

### Introduction

La mucoviscidose prédispose aux colonisations respiratoires bactériennes et fongiques, qui entretiennent un environnement pro-inflammatoire délétère et participent au déclin des fonctions respiratoires. L'écologie de ces colonisations/infections est très variable, car dépendante de la zone géographique, de l'imprégnation en antibiotiques et antifongiques, de la sévérité de l'atteinte pulmonaire, etc... Depuis une décennie, la prise en charge des patients a connu des évolutions majeures, notamment liées à la mise sur le marché des premières thérapies agissant directement sur le déficit protéique. Les modulateurs du canal CFTR ou « -caftor », agissent selon deux mécanismes distincts :

- Les potentialisateurs (dont l'ivacaftor, commercialisé en France en 2012) augmentent la fréquence d'ouverture du canal CFTR pour permettre le passage des ions chlorures.
- Les correcteurs (lumacaftor, tezacaftor, elexacaftor) facilitent la maturation et le transport intracellulaire de la protéine pour augmenter sa stabilité et son expression membranaire.

Ces molécules sont indiquées en monothérapie ou en association, en fonction du profil mutationnel du patient. Ces nouveaux traitements constituent une révolution dans la prise en charge de la maladie et améliorent considérablement la fonction respiratoire, la fonction digestive et, plus globalement, la qualité de vie dès le plus jeune âge. La réduction des taux de marqueurs inflammatoires circulants (taux de polynucléaires neutrophiles, IL-6, IL-8, IL-17A) et la réduction des colonisations bactériennes récemment rapportés (244) laissent présager un impact positif sur les colonisations fongiques.

L'objectif principal de cette partie est de dresser un état des lieux des colonisations bactériennes et fongiques chez les patients atteints de mucoviscidose à deux périodes distinctes, 2011 et 2020, respectivement avant et après le début d'utilisation des modulateurs de CFTR. Il s'agit ici de données préliminaires issues du recueil de patients suivis à Rennes et Angers, qui seront élargies à d'autres centres en Europe. Indépendamment d'étudier l'impact des nouveaux traitements, ces données sont incluses dans ce manuscrit afin d'illustrer l'épidémiologie fongique locale.

## Patients et méthodes

### *Design de l'étude*

Il s'agit d'un recueil rétrospectif des données cliniques et biologiques des patients atteints de mucoviscidose suivis aux CRCM de Rennes et d'Angers. Les patients étaient inclus de manière consécutive, s'ils avaient bénéficié d'au moins un dépistage de la colonisation bactérienne et fongique durant l'année 2011 et/ou l'année 2020.

Les données biologiques recueillies à partir des données des systèmes informatiques de laboratoire des CHU de Rennes (TD-Synergy®, Technidata) et d'Angers (GLIMS®, Clinisys) étaient :

- Les cultures bactériologiques et mycologiques, incluant les tests de sensibilité aux antifongiques réalisés sur les isolats d'*A. fumigatus*,
- Les dosages d'IgG et d'IgE anti-*Aspergillus*,
- La recherche d'IgG anti-*Scedosporium*,
- Les dosages d'IgE totales et de polynucléaires éosinophiles circulants.

Les données démographiques et cliniques recueillies étaient l'âge, le sexe, le génotype CFTR, le VEMS moyen sur l'année, la prise d'un traitement antifongique par triazolés pendant au minimum 15 jours et la prise de corticoïdes inhalés.

### *Analyse statistique*

L'analyse des données a été réalisée à l'aide du logiciel GraphPad, version 5.0 (Inc., La Jolla, CA, USA). Les variables quantitatives ont été analysées par un test de comparaison de moyennes (Mann-Whitney) et les variables qualitatives (proportions) ont été analysées par un test de Fisher.

## Résultats

### 1. Données démographiques et cliniques

Les cohortes de 2011 et 2020 étaient respectivement constituées de 220 et 263 patients, parmi lesquels 163 patients étaient présents au cours des deux périodes. De ce fait, l'âge médian de la cohorte de 2020 était de 24,1 ans, et significativement plus élevé que celui de 2011, qui était de 18,2 ans ( $p < 0,0001$ ), **Tableau 7**. Le sex ratio était équilibré (0,96 et 1,07, en 2011 et 2020 respectivement). La répartition des génotypes de *CFTR* était : homozygote pour la mutation  $\Delta F508$  chez 45,3% des patients, hétérozygote  $\Delta F508$ /autre chez 41,4% des patients, et les 13,2% restants présentaient un autre génotype (moyenne des deux années). Le taux de patients présentant un diabète associé à la mucoviscidose restait globalement stable entre les deux périodes, à 10,1% (22/217) en 2011 et 12,9% (34/263) en 2020. Le volume expiratoire maximal seconde (VEMS) médian était également stable, à 77% [55 ; 97] et 80% [58 ; 100] (25<sup>e</sup> ; 75<sup>e</sup> percentile), respectivement en 2011 et 2020.

### 2. Evolution des indicateurs de colonisation bactérienne et fongique (culture, marqueurs sérologiques) entre 2011 et 2020

Les colonisations/infections respiratoires transitoires ou chroniques observées au cours de la mucoviscidose impliquent un large panel de bactéries et champignons, dont la fréquence évolue avec l'âge des patients et l'état de leur fonction respiratoire. Tout d'abord, ces données montrent que la prévalence de la colonisation respiratoire par les principales bactéries retrouvées dans la mucoviscidose est considérable, puisque plus de 80% des patients ont eu au moins un isolat dans l'année, **Tableau 7**. *Staphylococcus aureus*, *P. aeruginosa* et *H. influenzae* étaient les bactéries les plus fréquentes, retrouvées respectivement chez 75,6%, 30,1% et 11,3% des patients, **Fig.16-A**. La colonisation bactérienne survient généralement très tôt dans l'enfance, avant la colonisation fongique. Ainsi, en 2020, parmi les enfants de moins de 10 ans, la colonisation par *Staphylococcus aureus* atteignait déjà 71% des patients, alors que seulement 23% étaient colonisés par des levures et 11% par des champignons filamenteux, au même âge. Dans l'ensemble, la prévalence de ces bactéries était globalement inchangée entre les deux périodes, à l'exception de la fréquence accrue d'isolement d'autres bactéries associées à la mucoviscidose, **Fig.17-A et Tableau 7**.

Du point de vue des colonisations/infections fongiques, ce recueil a révélé que l'isolement de levures dans les expectorations était très fréquent, constaté chez 57% des patients. *Candida albicans* était l'espèce prédominante, identifiée chez un patient sur deux, **Tableau 7**. L'impact clinique de cette colonisation n'est pas démontré. La prévalence globale des levures n'était pas significativement différente entre les deux périodes. En revanche, chez les patients âgés de plus de 15 ans, une diminution significative du taux de colonisation par des levures était observée, passant de 75% en 2011 à 60% en 2020 ( $p = 0,013$ ), **Fig.17-B**.

**Tableau 7 : Recueil épidémiologique des colonisations microbiennes des patients atteints de mucoviscidose suivis aux CRCM des CHU de Rennes et d'Angers, en 2011 et 2020.**

Paramètre	Nombre de patients N (%)		p-value	
	2011 (N=220)	2020 (N=263)		
<b>Démographie</b>				
Age (moy±SD)	18,2±12,9	24,1±13,5	<0,0001	
Sex ratio (M/F)	0,96 (108/112)	1,07 (136/127)	ns	
<b>Génotypage CFTR</b>				
ΔF508/ΔF508	99 (45,0)	120 (45,6)	ns	
ΔF508/autre	92 (41,8)	108 (41,1)		
Autre	29 (13,2)	35 (13,3)		
<b>Données cliniques</b>				
VEMS (% théorique) médiane [25 ;75]	77 [55 ;97] (n=147)	80 [58 ;100] (n=256)	ns	
Diabète	22/217 (10,1)	34/263 (12,9)	ns	
<b>Colonisation bactérienne (≥1/an)</b>				
Toutes bactéries d'intérêt	187 (85,0)	232 (88,2)	ns	
<i>Staphylococcus aureus</i>	162 (73,6)	204 (77,6)	ns	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	64 (29,1)	81 (31,2)	ns	
<i>Haemophilus influenzae</i>	30 (13,6)	24 (9,1)	ns	
Autres bactéries d'intérêt	12 <sup>a</sup> (5,0)	32 <sup>b</sup> (12,1)	<b>0,011</b>	
<b>Colonisation fongique (≥1/an)</b>				
Toutes levures	128 (58,2)	147 (55,9)	ns	
<i>Candida albicans</i>	112 (50,9)	132 (50,2)	ns	
<i>Candida glabrata</i>	5 (2,3)	4 (1,5)	ns	
<i>Candida parapsilosis</i>	8 (3,6)	15 (5,7)	ns	
Champignons filamenteux, total (≥1/an)	84 (38,2)	99 (37,6)	ns	
<i>Aspergillus</i> section <i>Fumigati</i>	79 (35,9)	88 (33,3)	ns	
≥3 isolats/an	28/79 (35,4)	30/88 (34,1)	ns	
<i>Aspergillus non Fumigati</i>	19 <sup>c</sup> (8,6)	12 <sup>d</sup> (4,5)	0,092	
<i>Scedosporium</i> spp	8 <sup>e</sup> (3,6)	8 <sup>e</sup> (3,0)	ns	
<i>Lomentospora</i> spp	2 <sup>e</sup> (0,9)	4 <sup>e</sup> (1,5)	ns	
<i>Exophiala</i> spp	3 (1,4)	7 (2,7)	ns	
<i>Rasamsonia</i> spp	2 (0,9)	4 (1,5)	ns	
<b>Marqueurs de sensibilisation fongique</b>				
Sérologie <i>Aspergillus</i> positive <sup>f</sup>	60/188 (31,9)	78/248 (31,4)	ns	
IgE anti- <i>Aspergillus</i> >0,1 kA/L	83/200 (41,5)	95/224 (42,4)	ns	
Sérologie <i>Scedosporium</i> positive	4/47 (8,5)	10/50 (20,0)	ns	
IgE totales >1 000 UI/mL	13/198 (6,6)	17/246 (6,9)	ns	
Eosinophilie >0,5G/L	16/205 (7,8)	24/246 (9,8)	ns	
<b>Traitements</b>				
Traitement antifongique (triazolés)	49/214 <sup>g</sup> (22,9)	24 <sup>g</sup> (9,1)	<0,0001	
Corticoïdes inhalés	76/198 (38,4)	139 (52,9)	<b>0,002</b>	
Modulateurs de CFTR	0	112 (42,6)	NA	

<sup>a</sup> *Achromobacter* spp (n=5); *Burkholderia* spp (n=2); *Stenotrophomonas maltophilia* (n=5).

<sup>b</sup> *Achromobacter* spp (n=10); *Burkholderia* spp (n=5); *Stenotrophomonas maltophilia* (n=15); *Mycobacterium non tuberculosis* (n=2).

<sup>c</sup> *A. Flavi* (n=9); *A. Terrei* (n=4); *A. Versicolores* (n=2); *A. Nidulantes* (n=5); *A. Nigri* (n=1).

<sup>d</sup> *A. Flavi* (n=6); *A. Terrei* (n=5); *A. Versicolores* (n=2); *A. Nigri* (n=1).

<sup>e</sup> Co-colonisation par *Lomentospora*+*Scedosporium* spp : 1 patient en 2011, 2 patients en 2020.

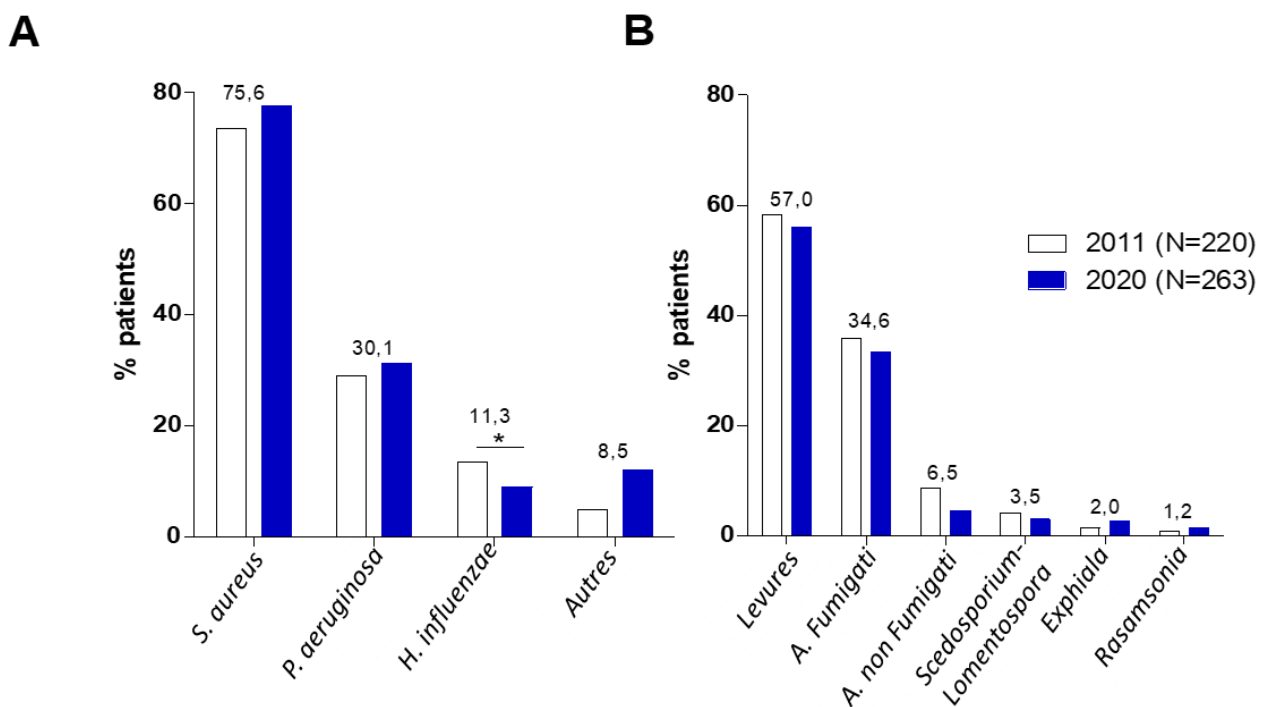
<sup>f</sup> Recherche d'IgG positive par ELISA (Platelia® Biorad ou Serion Diagnostics) ou HAI et/ou recherche de précipitines positive (Immunoélectrophorèse ou ouchterlony).

<sup>g</sup> En 2011 : itraconazole (n=35); voriconazole (n=10); posaconazole (n=4). En 2020 : posaconazole (n=13); itraconazole (n=10) voriconazole (n=1).



Après les levures, l'isolement de champignons filamenteux était dominé par *Aspergillus* section *Fumigati* (34,6%), suivi par *Aspergillus* non *Fumigati* (6,5%), *Scedosporium/Lomentospora* (3,5%), *Exophiala* (2%) et *Rasamsonia* (1,2%), **Fig.16-B**. La prévalence globale de ces différents champignons n'était pas significativement différente entre les deux périodes, **Tableau 7**. Néanmoins, dans la population âgée de plus de 15 ans, les prévalences d'*A. Fumigati* et d'*A. non Fumigati* étaient significativement plus faibles en 2020 qu'en 2011 (respectivement 38% vs 52% et 5% vs 13%,  $p < 0,05$ ), **Fig.17-B**.

A noter que l'évaluation de la sensibilité aux antifongiques des souches d'*A. fumigatus* n'était disponible que pour les isolats de 2020. Parmi les 71 patients dont la souche a bénéficié d'un antifongogramme, 18 (25%) ont présenté au moins un isolat d'*A. fumigatus* résistant à l'itraconazole (CMI > 2mg/L) (donnée non montrée).



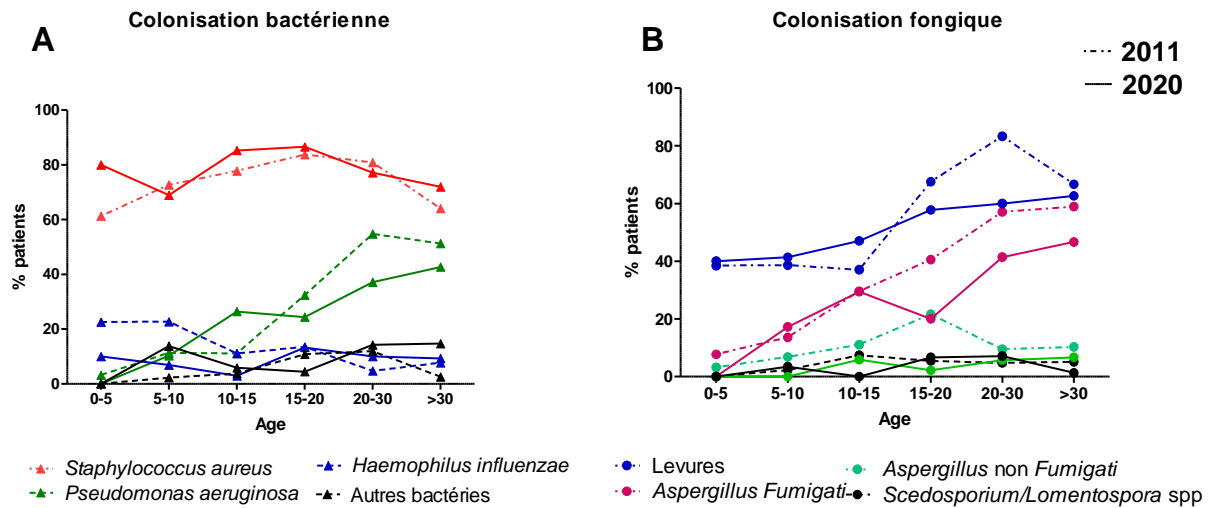
**Figure 16 : Prévalence des colonisations respiratoires bactériennes (A) et fongiques (B) chez les patients atteints de mucoviscidose aux CRCM de Rennes et d'Angers (2011, 2020).**

Données issues de la culture mycologique d'expectorations ou écouvillons de gorge. Pourcentage de patients ayant eu au moins un isolat du champignon ou de la bactérie considérée au cours de l'année. Les chiffres au-dessus des barres indiquent les pourcentages moyens entre 2011 et 2020.

En 2020, les patients colonisés par *A. Fumigati* étaient significativement plus âgés que les patients non colonisés, 25,4 ans versus 18,8 ans ( $p < 0,001$ ). Le VEMS médian des patients colonisés était significativement plus bas que celui des patients non colonisés, 71,9% versus 86,5% ( $p = 0,016$ ), témoignant d'une fonction respiratoire dégradée. Aucun lien de causalité ne peut être affirmé ici.

L'âge et le VEMS des patients colonisés par d'autres champignons filamenteux qu'*Aspergillus* n'étaient pas différents des patients colonisés par *A. Fumigati*. Les colonisations multiples à champignons filamenteux

n'étaient pas rares, puisque 6/10 patients colonisés par *Scedosporium/Lomentospora*, 3/7 patients colonisés par *Exophiala* et 2/4 patients colonisés par *Rasamsonia* étaient concomitairement colonisés par *Aspergillus*.

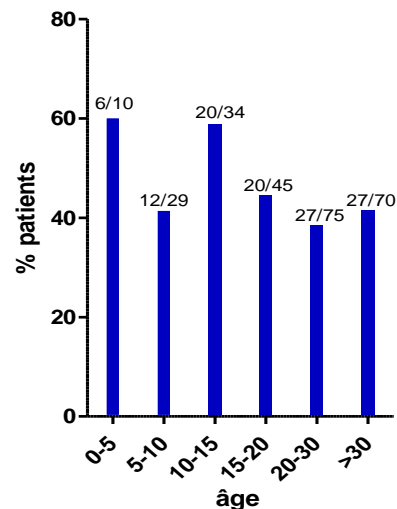


**Figure 17 : Prévalence des colonisations bactériennes (A) et fongiques (B) par classe d'âge, chez les patients atteints de mucoviscidose suivis aux CRCM de Rennes et d'Angers, en 2011 et 2020.**

Enfin, du point de vue thérapeutique, si les taux de prévalence de colonisation fongique (tous âges confondus) étaient globalement stables entre les deux périodes, la part de patients exposés aux antifongiques a drastiquement diminué, de 22,9% en 2011 à 9,1% en 2020 ( $p < 0,0001$ ), **Tableau 7**.

### 3. Impact de la prise de modulateurs de CFTR sur l'épidémiologie fongique

En 2020, 112 patients (42,6%) bénéficiaient d'une thérapie de modulateurs de CFTR, parmi lesquels la plupart était sous bithérapie ivacaftor-lumacaftor (89/112, 79,5%). La moyenne d'âge des patients traités était plus basse que celle des patients non traités, en lien avec la part significative d'enfants de moins de 15 ans traités (plus de 50% en moyenne), **Fig.18**. De façon attendue, la grande majorité des patients sous modulateurs de CFTR étaient porteuse d'une mutation  $\Delta F508$  à l'état homozygote ( $n=90$ ) ou hétérozygote ( $n=16$ ), ce qui répond aux indications de ces molécules, **Tableau 8**.



**Figure 18 : Pourcentage de patients recevant un modulateur de CFTR par classe d'âge.**

Le VEMS médian des patients sous modulateurs de CFTR n'était pas différent de celui des patients qui n'en bénéficiaient pas. Dans la sous-catégorie des patients portant la mutation  $\Delta F508$  à l'état homozygote, la prise d'un modulateur n'avait pas d'impact sur le VEMS médian.

Les taux de colonisation par les bactéries et champignons étaient globalement similaires chez les patients avec et sans modulateur de CFTR, **Tableau 8**.

Enfin, la proportion de patients exposés aux antifongiques n'était pas plus faible dans le groupe traité par modulateurs de CFTR. Parmi les 12 patients sous antifongique et modulateurs de CFTR, 9 étaient sous molécules de 1<sup>ère</sup> génération (Ivacaftor ± Lumacaftor) introduits entre 2 et 8 ans auparavant ; molécules qui n'induisent pas d'interaction avec les antifongiques. Les 3 autres patients avaient débuté la nouvelle trithérapie Elexacaftor + Ivacaftor + Tezacaftor en cours d'année 2020, et avaient arrêté la thérapie antifongique de façon concomitante.

**Tableau 8 : Recueil épidémiologique-clinique des patients sous modulateurs de CFTR ou non, en 2020.**

Paramètre	Modulateurs de CFTR (N=112) <sup>a</sup>		Absence de modulateur (N=151)		p-value
	Nombre de patients N (%)				
<b>Démographie</b>					
Age (moy±SD)	21,4±11,2		26,1±14,7		<b>0.0194</b>
Sex ratio (M/F)	1,43 (66/46)		0,86 (70/81)		<b>0.0468</b>
<b>Génotypage CFTR</b>					
ΔF508/ΔF508	90	(80,3)	30	(19,9)	
ΔF508/autre	16	(14,3)	92	(60,9)	
Autre	6	(5,4)	29	(19,2)	
<b>Données cliniques</b>					
VEMS (% théorique) médiane [25 ; 75]	78 [57,5 ; 98] (n=109)		84 [61 ; 101] (n=147)		ns
Diabète	19 (17,0)		15 (9,9)		0.098
<b>Colonisation bactérienne (≥1/an)</b>					
<i>Staphylococcus aureus</i>	90	(80,3)	114	(75,5)	ns
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	35	(31,2)	46	(30,5)	ns
<i>Haemophilus influenzae</i>	11	(9,8)	13	(8,6)	ns
Autres bactéries d'intérêt	13	(11,6)	18	(11,9)	ns
<b>Colonisation fongique (≥1/an)</b>					
Toutes levures	63	(56,2)	84	(55,6)	ns
<i>Candida albicans</i>	57	(50,9)	75	(49,7)	ns
<i>Candida glabrata</i>	1	(0,9)	3	(2,0)	ns
<i>Candida parapsilosis</i>	9	(8,0)	6	(6,0)	ns
<b>Champignons filamenteux, total (≥1/an)</b>					
<i>Aspergillus</i> section <i>Fumigati</i>	39	(34,8)	49	(32,4)	ns
≥3 isolats/an	12/39	(30,8)	18/49	(36,7)	ns
<i>Aspergillus</i> non <i>Fumigati</i>	5	(4,5)	7	(4,6)	ns
<i>Scedosporium</i> spp	4	(3,6)	4	(2,6)	ns
<i>Lomentospora</i> spp	2	(1,8)	2	(1,8)	ns
<i>Exophiala</i> spp	5	(4,5)	2	(1,3)	ns
<i>Rasamsonia</i> spp	2	(1,8)	2	(1,8)	ns
<b>Marqueurs de sensibilisation fongique</b>					
Sérologie <i>Aspergillus</i> positive <sup>f</sup>	33/107	(30,8)	45/141	(31,9)	ns
IgE anti- <i>Aspergillus</i> >0,1 kA/L	42/96	(43,8)	53/128	(41,4)	ns
Sérologie <i>Scedosporium</i> positive	4/15	(26,7)	6/35	(17,1)	ns
IgE totales >1 000 UI/mL	5/108	(4,6)	12/138	(8,7)	ns
Eosinophilie >0,5G/L	12/108	(11,1)	12/138	(8,7)	ns
<b>Traitements</b>					
Traitement antifongique (triazolés)	12	(10,7)	12	(7,9)	ns
Corticoïdes inhalés	59	(52,7)	80	(53,0)	ns

<sup>a</sup> ivacaftor (n=11) ; ivacaftor+lumacaftor (n=89) ; ivacaftor+tezacaftor (n=1) ; elexacaftor+tezacaftor+ivacaftor (n=11).

## Discussion

Cette analyse rétrospective nous a permis de confirmer des prévalences de colonisations/infections fongiques élevées dans les cohortes de patients atteints de mucoviscidose, suivies à Rennes et Angers, en 2011 et 2020. En particulier, l'épidémiologie des champignons filamenteux reste largement dominée par le genre *Aspergillus* (environ 40%), suivi par *Scedosporium/Lomentospora* (3,5%) puis *Exophiala* (2%). La comparaison des périodes 2010 et 2020 a cependant mis en évidence une diminution des taux de colonisation par *Aspergillus* et *Candida*, dans la population âgée de plus de 15 ans.

La prise en charge des patients colonisés/infectés par des champignons connaît depuis quelques années des modifications notables, expliquées par deux phénomènes : i) les efforts d'épargne antifongique au vu des résistances émergentes chez *A. fumigatus*, et ii) la disponibilité récente de nouvelles associations de molécules modulatrices de CFTR (trithérapie elexacaftor- tezacaftor- ivacaftor), qui promet une amélioration significative de l'état général des patients (245) tout en induisant une réduction de l'impact des colonisations bactériennes et fongiques (244,246). En particulier, cette stratégie thérapeutique exercerait une action immunomodulatrice bénéfique en atténuant, notamment, la réponse inflammatoire de macrophages et polynucléaires neutrophiles suscitée par l'infection aspergillaire (247).

Dans cette analyse préliminaire, nous n'avons pas mis en évidence de différence significative en termes de colonisations bactériennes et fongiques chez les patients bénéficiant d'un modulateur de CFTR ou non. Il faut souligner que, si l'administration de ces traitements chez les enfants tend à être systématique, l'initiation est parfois différée chez les patients adultes dont l'état général est excellent. Il peut donc exister un biais dans cette analyse, si les patients dans le groupe traité présentent, au départ, une forme de mucoviscidose plus sévère. Il sera donc pertinent de considérer l'évolution individuelle de chaque patient, en comparant les marqueurs de colonisation et de VEMS obtenus dans les mois précédant et suivant l'initiation du traitement. Il conviendra aussi de prendre en compte la durée pendant laquelle les patients ont reçu les modulateurs, puisque dans notre cohorte, le traitement n'a été initié que début 2020 chez 37 patients (33%), laissant suspecter un manque de recul sur l'évolution clinique de ces patients. De plus, 80% des patients traités recevaient des molécules de première génération, et ne bénéficiaient pas encore de la trithérapie elexacaftor- tezacaftor- ivacaftor, arrivée sur le marché européen en 2020. Il sera probablement pertinent d'envisager le recueil de ces mêmes données dans quelques années, afin d'appréhender l'effet de ces nouvelles thérapies à long terme.

## 2. Surveillance de la résistance aux azolés (2015-2020)

### Contexte

Depuis la première description de la résistance vis-à-vis des triazolés chez *A. fumigatus* en 1997 (248), ce phénomène s'est progressivement répandu en Europe. L'origine de cette émergence est liée à la pression de sélection exercée sur les écosystèmes fongiques, i) *via* l'utilisation massive dans l'environnement de fongicides azolés en agriculture, générant des isolats d'*A. fumigatus* d'emblée résistants observés chez des patients naïfs de tout antifongique, et ii) chez les individus recevant au long cours ces antifongiques, comme observé chez les patients atteints de mucoviscidose. Dans le cadre d'une précédente étude menée au CHU de Rennes (249), nous avons constaté l'existence d'*A. fumigatus* résistants particulièrement chez les patients atteints de mucoviscidose. Du fait du risque d'échec thérapeutique des azolés, qui constituent la première ligne de traitement des aspergilloses au sens large, l'objectif de cette étude était d'élargir la surveillance de la résistance aux azolés, sur une période de 5 ans, à l'ensemble des souches d'*A. fumigatus* isolées à l'hôpital, en distinguant notamment les patients atteints de mucoviscidose, des autres patients notamment admis en réanimation.

### Article

**Azole resistance in *Aspergillus fumigatus* : A five-year follow-up experience in a tertiary hospital with a special focus on cystic fibrosis.**

Hélène Guegan, Emilie Prat, Florence Robert-Gangneux et Jean-Pierre Gangneux.

Publié dans *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* en 2021.



# Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus*: A Five-Year Follow Up Experience in a Tertiary Hospital With a Special Focus on Cystic Fibrosis

## OPEN ACCESS

Hélène Guegan<sup>1,2†</sup>, Emilie Prat<sup>1†</sup>, Florence Robert-Gangneux<sup>1,2</sup> and Jean-Pierre Gangneux<sup>1,2\*</sup>

### Edited by:

Andy Mark Borman,  
Public Health England,  
United Kingdom

### Reviewed by:

Alexandre Alanio,  
Université Paris Diderot, France  
Adilia Warris,  
University of Exeter, United Kingdom

### \*Correspondence:

Jean-Pierre Gangneux  
jean-pierre.gangneux@univ-rennes1.fr

<sup>†</sup>These authors have contributed  
equally to this work

### Specialty section:

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

**Received:** 03 October 2020

**Accepted:** 24 December 2020

**Published:** 18 February 2021

### Citation:

Guegan H, Prat E, Robert-Gangneux F  
and Gangneux J-P (2021) Azole  
Resistance in *Aspergillus fumigatus*: A  
Five-Year Follow Up Experience in a  
Tertiary Hospital With a Special Focus  
on Cystic Fibrosis.  
Front. Cell. Infect. Microbiol. 10:613774.  
doi: 10.3389/fcimb.2020.613774

<sup>1</sup> Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Centre Hospitalier Universitaire de Rennes, Rennes, France, <sup>2</sup> Univ Rennes, CHU, Inserm, Irset (Institut de Recherche en santé, environnement et travail) – UMR\_S 1085, Rennes, France

Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* (ARAf) has emerged worldwide during the last decades. Drug pressure after long term treatments of chronically infected patients and the propagation of environmental clones selected under the pressure of imidazoles fungicides used in agriculture and farming both account for this emergence. The objectives of this study were to determine the rate of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* during a 5-year period, taking into account (i) differences between underlying diseases of the patients treated, (ii) cross-resistance between azoles, and (iii) focusing on the 5-year evolution of our center's cystic fibrosis cohort. Overall, the rates of voriconazole (VRC)-resistant and itraconazole (ITC)-resistant *A. fumigatus* isolates were 4.1% (38/927) and 14.5% (95/656), respectively, corresponding to 21/426 (4.9%) and 44/308 (14.3%) patients, respectively. Regarding cross-resistance, among VRC-R isolates tested for ITC, nearly all were R (20/21;95%), compared to only 27% (20/74) of VRC-R among ITC-R isolates. The level of azole resistance remained somewhat stable over years but greatly varied according to the azole drug, patient origin, and clinical setting. Whereas azole resistance during invasive aspergillosis was very scarce, patients with cystic fibrosis were infected with multiple strains and presented the highest rate of resistance: 5% (27/539) isolates were VRC-R and 17.9% (78/436) were ITC-R. These results underline that the interpretation of the azole resistance level in *Aspergillus fumigatus* in a routine setting may consider the huge variability depending on the azole drug, the clinical setting, the patient background and the type of infection.

**Keywords:** azole resistance, *cyp51A*, *Aspergillus fumigatus*, cystic fibrosis, invasive aspergillosis, hematology, intensive care unit

## INTRODUCTION

*Aspergillus fumigatus*, a ubiquitously distributed opportunistic pathogen, is the leading agent of aspergillosis, ranking first among fungal killers. In profoundly immunocompromised patients, the clinical picture rapidly evolves towards an acute angio-invasive form or invasive aspergillosis (IA) that accounts for one of the major severe invasive fungal diseases (Ullmann et al., 2018). In the immunocompetent individual, the infection is generally limited to cavitating, chronically evolving forms (such as aspergilloma), chronic fibrotic or immuno-allergic forms (allergic bronchopulmonary aspergillosis and severe asthma with *Aspergillus* sensitization) (Denning et al., 2016). During cystic fibrosis, abnormally viscous bronchial secretions prevent mucociliary clearance and promote the trapping and the proliferation of inhaled bacteria and fungal spores (Prigitano et al., 2017). *A. fumigatus* is the most frequent filamentous fungus colonizing the airways of patients with cystic fibrosis (CF) followed by *Scedosporium* sp. (Pihet et al., 2009; Felton and Simmonds, 2014; Hamprecht et al., 2018). Recent publications underlined that patients with *Aspergillus* in the airway have greater abnormalities on CT imaging, particularly in children, at the time of infection and in the following years, as shown in longitudinal studies (Breuer et al., 2019).

Voriconazole (VRC), isavuconazole (ISA), itraconazole (ITC), and posaconazole (POS) are four triazole antifungals recommended as first-line drugs in the treatment or prophylaxis of aspergillosis. They inhibit the lanosterol 14- $\alpha$ -demethylase enzyme (Cyp51A) encoded by the *cyp51A* gene, thereby inhibiting the ergosterol synthesis. Voriconazole and isavuconazole are highly recommended for the treatment of IA (Ullmann et al., 2018). Posaconazole shows a very wide spectrum of activity and its primary clinical indications are i) salvage therapy for patients with IA and ii) prophylaxis in patients with neutropenia and hematopoietic cell transplantation (Ullmann et al., 2018). It has also been reported as an alternative treatment for ABPA in CF patients (Periselneris et al., 2019). Itraconazole is the oldest but still robust triazole drug used in chronic and immuno-allergic aspergillosis and allows minimizing the use of corticosteroids (Denning et al., 2016). Azole resistance in *A. fumigatus* isolates is increasingly reported with variable prevalence in the six continents (Chowdhary et al., 2013; Meis et al., 2016; Wiederhold and Verweij, 2020). Two main origins of the emergence of azole resistant *A. fumigatus* (ARAF) are recognized: (i) long-term use of triazoles in patients with chronic *Aspergillus* infections and (ii) increased use of agricultural fungicides against plant-pathogenic moulds, such as *Fusarium*, *Mycosphaerella* and *A. flavus*, with cross-activity against *A. fumigatus* (Meis et al., 2016).

A global rate of resistance of *A. fumigatus* is however a metric with little significance, especially if we do not take into account variability between patients and drugs. During CF, particularly-high rates of ARAF have been reported (Stevens et al., 2003; Mortensen et al., 2011; Burgel et al., 2012; Morio et al., 2012; Meis et al., 2016; Prigitano et al., 2017; Risum et al., 2020; Wiederhold and Verweij, 2020) while azoles are recommended

in the guidelines for the management of allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA) (Stevens et al., 2003).

The aim of this prospective study was to estimate the frequency of azole resistance in *A. fumigatus* isolated from patients in our tertiary care University hospital, over a 5-year period. In particular, we analyzed the prevalence of ARAF according to patient background and azole drug, the cross resistance between azoles, and the characteristics of the longitudinal carriage of *Aspergillus* in CF patients, and more particularly of ARAF.

## METHODS

### Patients

Data of antifungal susceptibility testing performed on *A. fumigatus* clinical isolates as a part of the routine lab procedure between January 2015 and December 2019 were retrospectively collected. A total of 929 *A. fumigatus* isolates from 426 patients were tested for susceptibility to at least one azole. Among them, 595 isolates were obtained from sputum samples or throat swabs from 123 CF patients included in the cohorts of adult (N = 87) and pediatric (N = 36) "Centres de Ressources et de Compétences de la Mucoviscidose" at Rennes University Hospital (France). The remaining strains were isolated from patients hospitalized in ICU (N = 57), Pulmonology (N = 159), Hematology (N = 13) or other clinical wards (N = 105), and used for comparison to isolates from CF patients.

### Mycological Examination

- (i) Culture and identification. All isolates of *Aspergillus fumigatus* were obtained after a culture of respiratory samples, using two Sabouraud dextrose agar slants supplemented with 0.5% chloramphenicol incubated at 30°C and 37°C for up to 7 days. Depending on the date of isolation, identification was performed using macroscopic and microscopic examinations of cultures, combined to MALDI-TOF mass spectrometry (MALDI Biotyper, Bruker France, Marne-la-Vallée) or molecular sequencing since 2018.
- (ii) *In vitro* susceptibility to azoles. Itraconazole (ITC), voriconazole (VRC) and posaconazole (POS) minimum inhibitory concentrations (MICs) were determined using Etest<sup>®</sup> strips and RPMI medium (Biomérieux, Marcy-L'Étoile, France) according to the manufacturer recommendations. MICs were determined following a 48 h incubation at 37°C. Strains with MIC  $\geq 2$  mg/L for ITC and VRC, and  $\geq 0.25$  mg/L for POS, were considered resistant (R), according to recent EUCAST breakpoints for fungi (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), 2020). Of note, isolates with MICs at 2 mg/L for ITC and VRC and 0.25 mg/L for POS (graded in ATU group, Area of Technical Uncertainty) remain suitable drugs for treatment depending on the clinical setting,

following latest EUCAST recommendations (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), 2020). All other MICs classified isolates as susceptible (S), and therapeutic advice was given with the recommendation to use the tested drug.

- (iii) Molecular characterization of *cyp51A* gene. While not performed routinely, the promoter and the whole *cyp51A* gene were sequenced in both strands from *A. fumigatus* isolates in some patients with repeated high MICs and/or clinical failure, using five sets of primers: PA5 and PA7 (Mellado et al., 2001), AF306F and AF855R, AF766F and AF1330R, AF1179F and AF1709R, and AF1426F and AF2025R (Alanio et al., 2011).

The PCR mixture contained 5 µl of DNA extract and 20 µl of a mix composed of 0.625 U of GoTaq<sup>®</sup> Hot Start Polymerase (Promega, Charbonnières-les-Bains), 1x Colorless GoTaq<sup>®</sup> Flexi Buffer (Promega), 2mM of MgCl<sub>2</sub> (Promega), 0.8mM of dNTP mix (Eurobio, Les Ulis), and 0.2 µM of each primer. The amplification program consisted of 5 min at 94°C, 30 cycles of 30 s at 94°C, 30 s at 58°C, and 1 min at 72°C, followed by a final step of 10 min at 72°C. Sequences of resistant strains were compared to the wild-type *A. fumigatus* sequence CM 237 (GenBank accession number AF338659), at <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

## Ethics and Statistics

According to the French Public Health Laws (Code de la Santé Publique, 2017), protocols of this type do not require approval from an ethics committee and are exempt from the requirement of formal informed consent. MIC values were expressed as median and interquartile range. Data analysis was performed

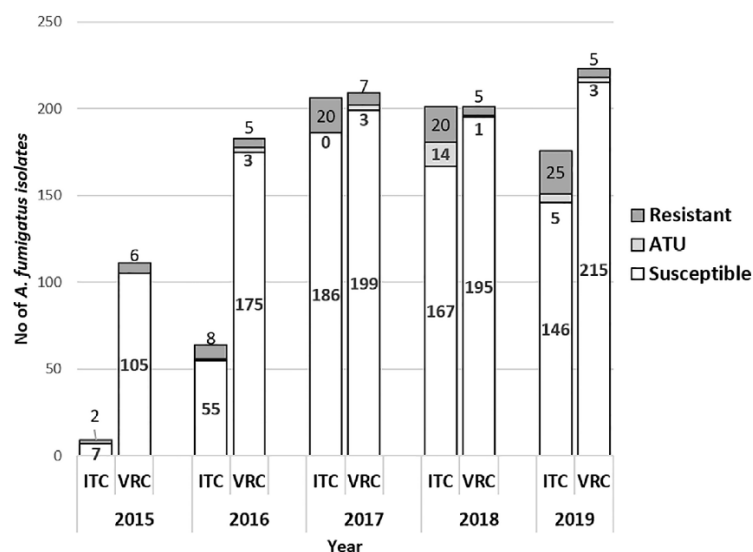
using the GraphPad PRISM<sup>®</sup> v.5.02 software. For comparison of proportion, the Fisher's test was used. A p-value of 0.05 was considered statistically significant.

## RESULTS

### Global Prevalence of Resistance in Azoles

Before 2015, *A. fumigatus* isolated in our center were considered as *a priori* susceptible to azoles and resistance monitoring with MICs was only performed in case of treatment failure. The growing number of treatment failures stressed the need to perform a systematic MIC determination to VRC and/or ITC, for each *A. fumigatus* isolated from 01/2015 to 01/2020. A total of 927 and 656 strains were evaluated for VRC and ITC susceptibility, respectively. Susceptibility to POS was tested in case of MIC  $\geq$  2 mg/L for VRC and ITC, or when the patient had a history of ARAf carriage.

From 2015 to 2019, the rates of VRC-resistant and ITC-resistant *A. fumigatus* isolates were 4.1% (38/927) and 14.5% (95/656), respectively; they were recovered from 21/426 (4.9%) and 44/308 (14.3%) patients, respectively. During the last 4 years with an exhaustive dataset of VRC MIC determination (2016–2019), the rate of VRC-resistant *A. fumigatus* remained stable, with 3.8% (8/183), 4.8% (10/209), 3.0% (6/201), and 3.6% (8/223) (ns), with an overall median MIC at 4 [2; 8] mg/L (**Figure 1**). An exhaustive dataset was obtained during the last 3 years for ITC and showed a consistent rate at 9.7% (20/206) in 2017, increasing to 16.8% (34/201), and 17% (30/176) in 2018 and 2019, respectively (ns). The median MIC of ITC-resistant isolates was 14 [3; 32] mg/L. Among these resistant strains, 20/95 (21%) isolates and 10/38 (26.3%) had ITC MICs and VRC



**FIGURE 1** | Number of *A. fumigatus* strains susceptible, ATU and resistant to ITC and VRC per year (2015–2019, N = 929) (VRC, n = 927); (ITC, n = 656). White bars indicate susceptible isolates; dark grey bars indicate resistant isolates with MIC >2mg/L and light grey bars represent isolates resistant isolates in ATU group (MIC = 2 mg/L). ITC, itraconazole; VRC, voriconazole; ATU, Area of Technical Uncertainty.



MICs in the ATU range, respectively, corresponding to 20/656 (3.0%) and 10/927 (1.1%) of all tested isolates for ITC and VRC, respectively (Figure 1).

## 2. Prevalence of Azole Resistance According to the Clinical Setting Patients From the Cystic Fibrosis Cohort

CF patients are managed in special units. They are sometimes hospitalized in other Pulmonology units, but we have reclassified them as “CF patients” because this cohort of patients is followed individually. A total of 595 *A. fumigatus* isolates were collected from respiratory samples of 123 CF patients and screened for VRC and/or ITC and/or POS *in vitro* susceptibility, of whom 34 patients presented with at least one isolate resistant to one drug. The rate of isolates resistant to at least one azole reached 90/595 (15.1%) over the period 2015–2019, among which three isolates were only POS-R. Regarding VRC, the global frequency of resistant *A. fumigatus* strains from 2016 to 2019 was 5% (27/539), recovered from 13 out of 119 patients (10.9%). The rate of VRC-R isolates was relatively steady from 2016 to 2019 (Figure 2). Over the same period (2016–2019), the rate of ITC-R isolates was higher than that of VRC-R, with 78/436 (17.9%) resistant isolates, recovered from 29/111 (26.1%) patients. A tendency to increase was noticed, with rates of ARAf detection from 14 to 24% from 2017 to 2019, respectively.

### Pulmonology

A total of 159 isolates from 143 patients hospitalized in pulmonology, excluding CF patients, were screened for azole susceptibility between 2015 and 2019. Only four isolates from four patients were resistant to ITC (including one ATU isolate),

of which one was also resistant to VRC (Table 1). Another isolate was ATU to VRC only.

### Intensive Care Units

Fifty-seven isolates from 50 patients were screened for azole resistance from 2015 to 2019. Six patients harbored an ITC-R isolate (of which 4 were ATU) and two isolates from one patient were VRC-R, none of them with azole cross resistance (Table 1). None of these patients were CF. A few patients with

**TABLE 1 |** Itraconazole (ITC) and voriconazole (VRC) resistance of *A. fumigatus* isolates from patients from pulmonology (excluding CF), intensive care unit, and other units.

Year	Number of <i>A. fumigatus</i> isolates resistant to antifungals* (n/N)					
	Pulmonology		ICU		Other	
	ITC	VRC	ITC	VRC	ITC	VRC
2015	0/1	0/30	nd	0/9	0/4	1/18
2016	0/2	0/21	0/2	0/6	0/5	0/21
2017	0/35	0/35	1/9	0/10	0/25	0/27
2018	4/31	1/31	4/15	0/15	1/15	0/15
2019	0/35	1/42	1/11	2/17	4/26	1/37
Total	4 <sup>1</sup> /104	2 <sup>2</sup> /159	6 <sup>3</sup> /37	2/57	5 <sup>4</sup> /75	2 <sup>2</sup> /118 <sup>5</sup>
%	3.8%	1.3%	16.2%	3.5%	6.6%	1.7%

ICU, intensive care unit; ITC, itraconazole; VRC, voriconazole; nd, not determined

\*MIC  $\geq$  2 mg/L.

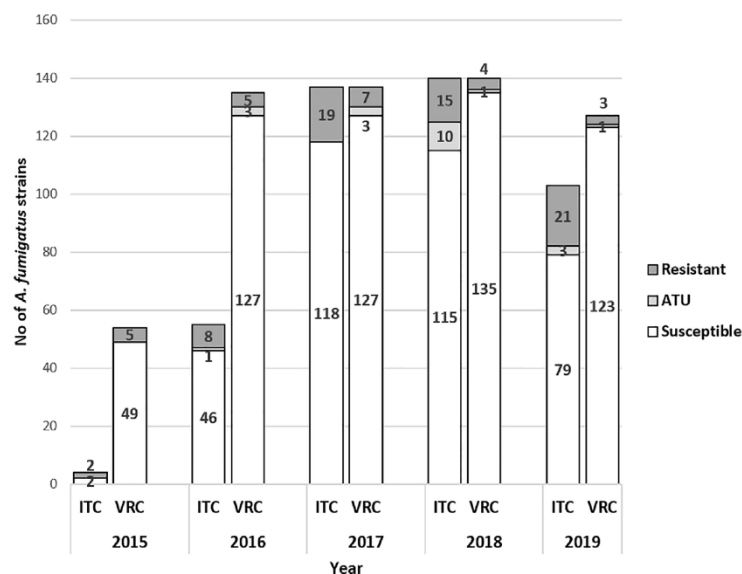
<sup>1</sup>Among them, 13 isolates were from hematology patients; 0/13 were resistant.

<sup>2</sup>Among them, 1/4 was ATU.

<sup>3</sup>Among them, 1/2 was ATU.

<sup>4</sup>Among them, 4/6 were ATU.

<sup>5</sup>Among them, 1/5 was ATU.



**FIGURE 2 |** Number of *A. fumigatus* strains susceptible, ATU and resistant to itraconazole (ITC) and voriconazole (VRC) per year in CF patients (2015–2019, N = 595 (VRC, n = 593); (ITC, n = 440)). White bars indicate susceptible isolates; dark grey bars indicate resistant isolates with MIC >2mg/L and light grey bars represent isolates resistant isolates in ATU group (MIC = 2 mg/L). ITC, itraconazole; VRC, voriconazole; ATU, Area of Technical Uncertainty.

hematological malignancies have been occasionally hospitalized in ICU. We keep them as “ICU patients” as the specific patient management in ICU (mechanical ventilation for example) is different and can contribute to modify the epidemiology.

**TABLE 2 |** Prevalence of azole resistance in *A. fumigatus* isolates tested simultaneously for the three azole antifungals (N = 56).

Susceptibility profile	Azole antifungal			Number
	ITC	VRC	POS	
No azole R	S	S	S	20
R to 1 azole	<b>R</b>	S	S	2
	S	<b>R</b>	S	1
	S	S	<b>R</b>	3
R to 2 azoles	<b>R</b>	S	<b>R</b>	14
	S	<b>R</b>	<b>R</b>	1
	<b>R</b>	<b>R</b>	S	1
R to 3 azoles	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	14

R, resistance; S, susceptibility.

### Other Wards

Cultural analysis in Hematology patients remains rare for the diagnosis of IA compared to galactomannan determination in the serum used for screening in high-risk patients. Only 13 *A. fumigatus* were isolated and tested in patients with hematological malignancies since 2015 and no azole resistance was detected. These patients are grouped with patients from other units in **Table 1**. In patients with miscellaneous clinical backgrounds (other units), five were infected with an ITC-R strain (co-resistant to VRC in one case), of which one was an ATU isolate.

### Cross-Resistance Between Azoles

We then analyzed whether there was cross-resistance between the main azole antifungals used routinely, in order to help for the decision of doctors excluding ATU isolates. Among the 83 *A. fumigatus* strains with high MIC for ITC and/or VRC (> 2 mg/L), 20 (24%) were resistant to both ITC and VRC. However, the proportions of ITC-R/VRC-S and ITC-S/VRC-R differed greatly. Among VRC-R isolates tested for ITC, nearly all were R to ITC (20/21;95%), while only 27% (20/74) of ITC-R isolates were VRC-R.

**TABLE 3 |** Characteristics of isolates obtained from CF patients with at least one resistance to VRC or ITC over the study period (2015–2019).

No	No of isolates	No of ITC-Risolates	MIC range of ITC-R isolates	No of VRC-R isolates	MIC range of VRC-R isolates	Mean time between isolates (days)	Preexposure to azole
1	1	ND	ND	1	4	NA	ND
2	18	11*	2;>32	10**#	2;>32	84	yes
3	16	4*	2;>32	1	16	101	yes
4	3	1	2	0	NA	458	yes
5	6	4	4;16	0	NA	74	yes
6	4	1	4	0	NA	86	no
7	14	1	2	1#	2	73	no
8	13	1	3	0	NA	104	yes
9	3	1	>32	1	>32	89	yes
10	9	1	2	0	NA	185	no
11	3	2	>32	1	3	77	yes
12	11	1	2	0	NA	135	no
13	1	1	>32	0	NA	NA	no
14	6	1	24	0	NA	115	ND
15	7	3*	2;12	0	NA	160	yes
16	2	1	16	0	NA	730	ND
17	10	3	3;>32	3*	2;>32	146	yes
18	2	1	8	0	NA	1267	yes
19	3	1	8	0	NA	109	no
20	3	1	16	2	3;12	119	no
21	13	1	2	0	AN	125	ND
22	5	1	8	0	NA	195	yes
23	5	5	8;32	1	4	210	yes
24	14	9	2;>32	0	NA	114	yes
25	1	1	16	1	3	128	yes
26	9	5	6;>32	2*	2;8	169	yes
27	4	2*	2;3	0	NA	54	no
28	8	0		1	2	169	no
29	3	1	2	0	NA	476	no
30	12	4*	2;16	0	NA	123	no
31	13	9*	2;>32	4**	2;3	111	yes
32	12	0		1	3	138	no
33	2	1	32	1	32	1320	no
34	7	1*	2	0	NA	187	no

\*Indicates the presence of 1 ATU among R isolates.

\*\*Indicates the presence of 2 ATU among R isolates.

#ATU differed from the ITC-ATU isolate.

NA, not applicable; ND, not determined; MIC, minimal inhibitory concentration (mg/L).

In our routine setting, POS is only tested in case of azole-resistance history or clinical failure after VRC or ITC treatment. Of the 56 isolates tested simultaneously for ITC, VRC and POS, 20 (36%) were susceptible to all of them (Table 2). A cross-resistance was observed in 54% (30/56) (Table 2). Two isolates had a decreased susceptibility to ITC only (MIC at 2 and 3 mg/L, respectively), and one isolate had an increased MIC for VRC only (at 2 mg/L). Among the 31 ITC-R isolates, 28 (90.3%) were POS-R whereas only 15 isolates (48.4%) were VRC-R. Overall, 76 isolates benefited from MIC evaluation to POS, of which 37 (48.7%) were POS-R. Thirty-four of the 37 (91.9%) isolates POS-R were also resistant to ITC and/or VRC, of which 32 were observed in CF patients.

### Phenotypic and Genotypic Characterization of Isolates from CF Patients

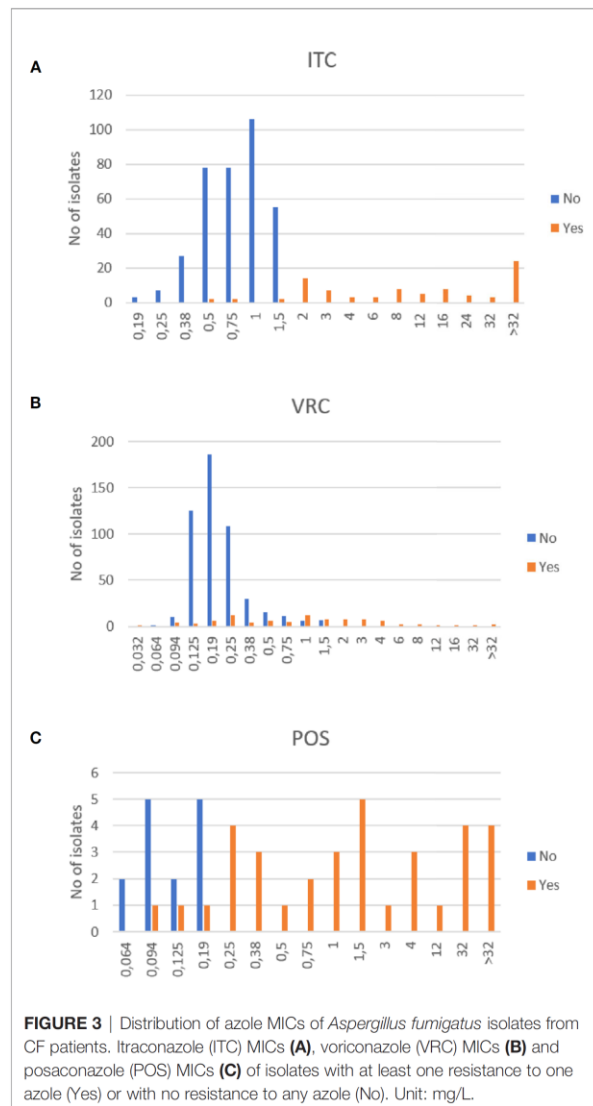
During the five-year follow-up, 34 out of 123 patients (27.6%) (90/595 isolates, 15.1%) presented at least once with an ARAf in induced sputum samples. About half of them (18/34) harbored a single ARAf among several *Aspergillus* isolates (2 to 18 consecutive isolates), of which seven were ATU (Table 3), whereas three patients had a single positive sputum with ARAf and no further positive *Aspergillus* cultures (patients #1, #13, and #25, Table 3). As seen in Table 3, the range of ITC and VRC MIC for different ARAf from a same patient was sometimes huge, suggesting that some patients are colonized with a multiplicity of strains over time. The MIC distribution of all isolates collected from patients with at least one ARAf is shown in Figure 3.

As an example of the multiplicity of strains, distribution of MICs of consecutive isolates from four CF patients with >10 isolates were recorded over time. Figure 4 shows that for a given patient, MIC values fluctuated over time, with cultures of susceptible and resistant phenotypes, underlining the diversity of *A. fumigatus* strains colonizing the airways of CF patients.

*Cyp51A* genotyping of ARAf was performed in strains isolated from six CF patients, reflecting the diversity of genetic alterations related to triazole resistance (Table 4). Interestingly, *cyp51A* polymorphism were found in 4/6 isolates. While the multi-azole resistant isolate harbored the L98H mutation together with the tandem repeat TR34 (patient 9), the two ITC-R and POS-R ARAf displayed the substitutions M220K and G54R respectively (patients 2 and 24). Finally, the combined F46Y, M172V, and E427K amino acid changes were simultaneously found in the ITC-R isolate. Triazole resistance of isolates from patients #3 and #26 was not linked to *cyp51A* polymorphism (wild type genotype) supporting the existence of other biological mechanisms responsible for triazole resistance.

## DISCUSSION

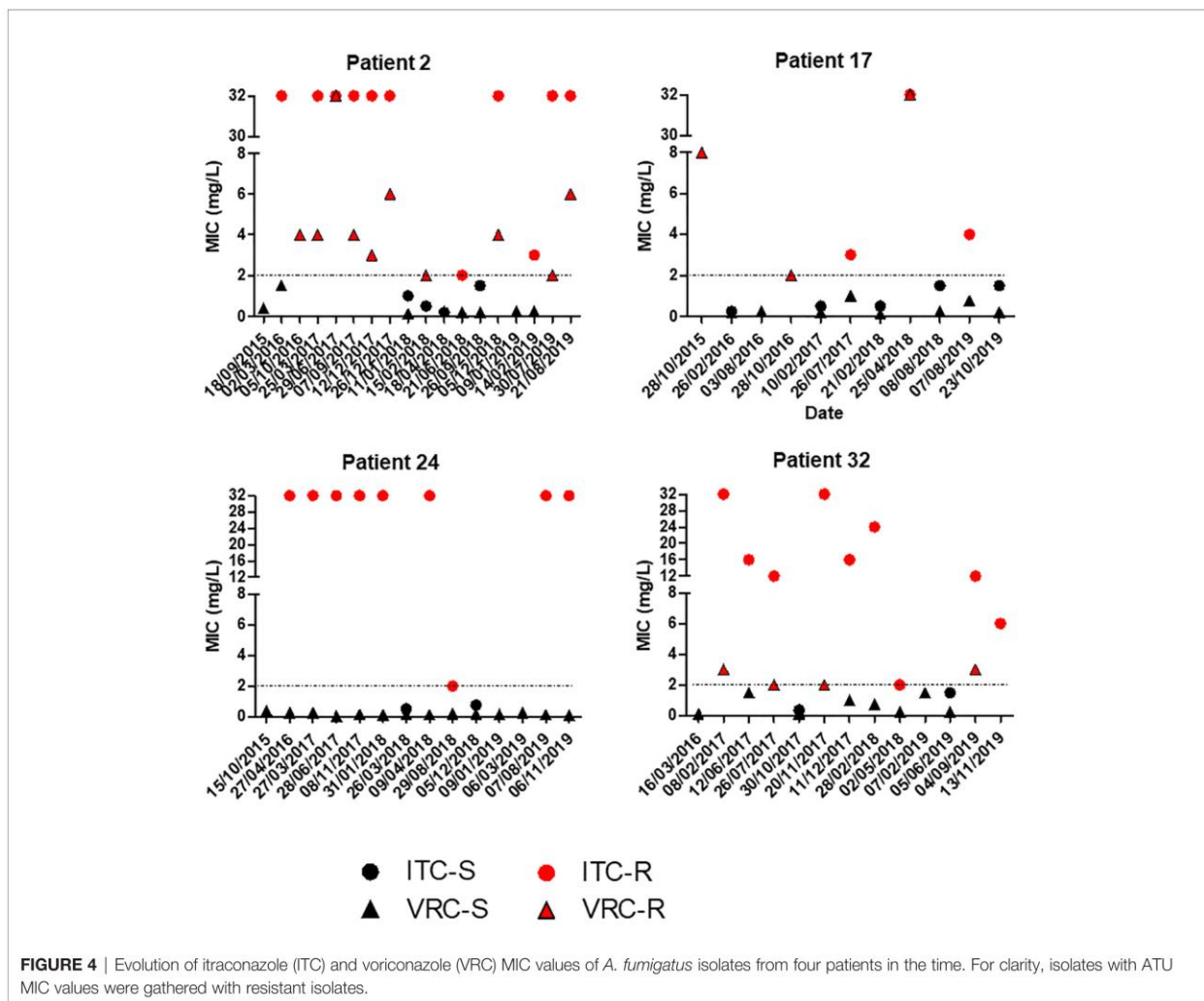
The burden of fungal diseases due to *Aspergillus* remains high in France, with multiple forms, from chronic or allergic to invasive aspergillosis (Gangneux et al., 2016). Furthermore, the emergence *Aspergillus fumigatus* isolates resistant to azoles led international experts to recommend the *in vitro* susceptibility screening of isolates and to shift from azole to amphotericin B as



**FIGURE 3** | Distribution of azole MICs of *Aspergillus fumigatus* isolates from CF patients. Itraconazole (ITC) MICs (A), voriconazole (VRC) MICs (B) and posaconazole (POS) MICs (C) of isolates with at least one resistance to one azole (Yes) or with no resistance to any azole (No). Unit: mg/L.

first-line treatment of IA when resistance is higher than 10% (Verweij et al., 2015; Ullmann et al., 2018).

Here we analyzed the results of *in vitro* susceptibility of *A. fumigatus* during a 5-year survey in a routine practice. Because the micro-dilution method recommended by EUCAST is difficult to use in routine when numerous isolates are tested per day, we use Etest® strips and RPMI medium in our routine practice as in many hospitals. The global level of resistance of isolates to voriconazole and itraconazole was 4.1 and 14.5%, respectively. This level remained somewhat stable over years. Interestingly, a recent publication from the Netherlands showed that the VRC-resistance frequency was 34% lower in 2018 than in 2013 ( $p = 0.0001$ ) (Lestrade et al., 2020). However, our results show that the level of resistance greatly varied according to azole drug, patient origin and clinical setting. Chronic respiratory diseases and particularly cystic fibrosis are favorable to ARAf emergence because of recurrent treatment with azoles. Besides,



**TABLE 4 |** Profile of azole resistance in CF patients with *cyp51A*-genotyped ARAf.

No of patient	ITC MIC	VRC MIC	POS MIC	<i>cyp51A</i> mutations
2	>32	1.5	>32	M220K
3	32	16	0.094	none
9	>32	>32	>32	TR34/L98H
24	>32	0.25	>32	G54R
26	32	8	4	none
30	2	0.75	ND	F46Y, M172V, E427K

ND, not determined; MIC, minimal inhibitory concentration (mg/L).

we detected only a very low number of ARAf during invasive pulmonary aspergillosis.

Regarding the management of IPA, a few other French papers from Paris area reported similar low levels of ARAf detection (Alanio et al., 2011; Alanio et al., 2016). At the time of hospitalization in Hematology, none of the patients had an ARAf isolated, probably linked to the short course of chemoprophylaxis with posaconazole. These results comfort us

in the use of azoles as first-line curative drugs (VRC and ISA) or prophylaxis (POS).

Regarding CF patients during 2015–2019, we observed a higher frequency of ARAf (11%) than in other French studies. Our center is one of the two tertiary hospitals of the Brittany region which is mainly rural with an intense agricultural and farming activity that could account for high azole resistance rate, and furthermore 16/30 patients with ARAf had a pre-exposure to azoles. In the West of France near Brittany, Morio et al., (2012) reported a 8% prevalence of azole resistance in 2010–2011, while this rate was 6.8% four years later, mainly due to a genotypic mutation TR34/L98H (Lavergne et al., 2019). In a cohort from Paris, 4.8% of resistant isolates were detected (Burgel et al., 2012), whereas in a mixed cohort of CF and immunocompromised patients from the North of Paris, only 1.8% of ARAf were detected (Choukri et al., 2015). European studies showed that 5.3% (101/2888) of *A. fumigatus* isolates were azole-resistant in a prospective multicenter study in Germany (Seufert et al., 2018). The frequency was 7.1% in the

Netherlands, with TR34/L98H being the dominant resistance mechanism (Engel et al., 2019). In a bicentric Italian study, no resistance was detected in one center, while the frequency of resistance was 8.2% in the other (Prigitano et al., 2017). In Denmark, Risum et al. recently reported the occurrence of ARAf strains in 7.3% (10/137) CF patients (Risum et al., 2020).

The issue of cross-resistance remains moderate in our center even if azole exposure is frequent, as VRC remains usable for 73% of ITC-R isolates, and a triple-resistance to azole was very scarce. Importantly, isolates that were both ITC-R and VRC-R were POS-R except in one case. Thus, we decided to stop POS *in vitro* susceptibility testing to the benefit of ISA susceptibility testing. Data obtained during this survey incited us to adopt new rules for *in vitro* testing strategy:

- (i) When VRC is considered as the first-line treatment: we perform VRC and ISA susceptibility testing and recommend to switch for liposomal amphotericin B when VRC-R and ISA-R. Such situation is possible during invasive, allergic and chronic aspergillosis.
- (ii) When ITC is considered as the first-line treatment: we perform ITC, VRC and ISA susceptibility testing and first recommend to change for VRC or ISA in case of ITC-R, and to consider liposomal amphotericin B in case of pan-azole-R. Such situation is possible mainly during allergic and chronic aspergillosis.

Finally, during CF, we confirmed the high diversity of *Aspergillus* isolates. Indeed, CF patients may be colonized with a wide succession of different phenotypes, either susceptible or resistant. This finding could be confirmed by a genotypic characterization of isolates, since it has been described that different genotype, until 5 to 10, could be isolated in a same patients (Neuvéglise et al., 1997; Amorim et al., 2010). Here again, this result made us change our routine procedure to a systematic antifungal susceptibility testing on various colonies from the same samples, as recommended by international guidelines (Ullmann et al., 2018). And as shown by Lestrade et al. (2020), the monitoring of genotypes may also be combined to *in vitro* susceptibility determination since they reported that

the mean VRC MIC of TR34/L98H isolates decreased from 8 mg/L (2013) to 2 mg/L (2018) in the Dutch experience.

Overall, this survey underlines a huge variability of azole resistance level depending on the azole drug, the patient origin and the clinical setting, and also variability within a patient. In addition to epidemiological data, this study made us changing our routine procedure of azole *in vitro* testing. The limits of this field and practical study are its monocentric design, some incomplete data for some patients, and the absence of *in vitro* data on isavuconazole that was only recently introduced in our centre.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

## ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by Comité d'éthique de Rennes, France. Written informed consent from the participants' legal guardian/next of kin was not required to participate in this study in accordance with the national legislation and the institutional requirements.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors listed have made a substantial, direct and intellectual contribution to the work, and approved it for publication.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Docteur C. Belleguic and E. Deneville that are responsible for the adult and pediatric "Centres de Ressources et de Compétences de la Mucoviscidose". We thank LGgx for English editing service.

## REFERENCES

- Alanio, A., Sitterle, E., Liance, M., Farrugia, C., Foulet, F., Botterel, F., et al. (2011). Low prevalence of resistance to azoles in *Aspergillus fumigatus* in a French cohort of patients treated for haematological malignancies. *J. Antimicrob. Chemother.* 66, 371–374. doi: 10.1093/jac/dkq450
- Alanio, A., Denis, B., Hamane, S., Raffoux, E., Peffault de Latour, R., Menotti, J., et al. (2016). Azole Resistance of *Aspergillus fumigatus* in Immunocompromised Patients with Invasive Aspergillosis. *Emerg. Infect. Dis.* 22, 157–158. doi: 10.3201/eid2201.150848
- Amorim, A., Guedes-Vaz, L., and Araujo, R. (2010). Susceptibility to five antifungals of *Aspergillus fumigatus* strains isolated from chronically colonised cystic fibrosis patients receiving azole therapy. *Int. J. Antimicrob. Agents* 35, 396–399. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2009.12.007
- Breuer, O., Schultz, A., Garratt, L. W., Turkovic, L., Rosenow, T., Murray, C. P., et al. (2019). Aspergillus Infections and Progression of Structural Lung Disease in Children with Cystic Fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 201, 688–696. doi: 10.1164/rccm.201908-1585OC
- Burgel, P.-R., Baixench, M.-T., Amsellem, M., Audureau, E., Chapron, J., Kanaan, R., et al. (2012). High Prevalence of Azole-Resistant *Aspergillus fumigatus* in Adults with Cystic Fibrosis Exposed to Itraconazole. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 869–874. doi: 10.1128/AAC.05077-11
- Choukri, F., Botterel, F., Sitterle, E., Bassinet, L., Foulet, F., Guillot, J., et al. (2015). Prospective evaluation of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* clinical isolates in France. *Med. Mycol.* 53, 593–596. doi: 10.1093/mmy/myv029
- Chowdhary, A., Kathuria, S., Xu, J., and Meis, J. F. (2013). Emergence of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* strains due to agricultural azole use creates an increasing threat to human health. *PLoS Pathog.* 9, e1003633. doi: 10.1371/journal.ppat.1003633
- Code de la Santé Publique (2017). Décret n° 2017-884 du 9 mai 2017 modifiant certaines dispositions réglementaires relatives aux recherches impliquant la personne humaine | *Legifrance*. Article R.1121-1-1. Available at: <https://www.legifrance.gouv.fr/eli/decret/2017/5/9/AFSP1706303D/jo/texte>.

- Denning, D. W., Cadranel, J., Beigelman-Aubry, C., Ader, F., Chakrabarti, A., Blot, S., et al. (2016). Chronic pulmonary aspergillosis: rationale and clinical guidelines for diagnosis and management. *Eur. Respir. J.* 47, 45–68. doi: 10.1183/13993003.00583-2015
- Engel, T. G. P., Slabbers, L., de Jong, C., Melchers, W. J. G., Hagen, F., Verweij, P. E., et al. (2019). Prevalence and diversity of filamentous fungi in the airways of cystic fibrosis patients - A Dutch, multicentre study. *J. Cyst. Fibros.* 18, 221–226. doi: 10.1016/j.jcf.2018.11.012
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (2020). *Antifungal Agents-Breakpoint tables for interpretation of MICs, version 10.0*. Available at: [https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/AFST/Clinical\\_breakpoints/AFST\\_BP\\_v10.0\\_200204.pdf](https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/AFST/Clinical_breakpoints/AFST_BP_v10.0_200204.pdf) (Accessed September 21, 2020).
- Felton, I. C., and Simmonds, N. J. (2014). Aspergillus and cystic fibrosis: old disease - new classifications. *Curr. Opin. Pulm. Med.* 20, 632–638. doi: 10.1097/MCP.0000000000000106
- Gangneux, J.-P., Bougnoux, M.-E., Hennequin, C., Godet, C., Chandenier, J., Denning, D. W., et al. (2016). An estimation of burden of serious fungal infections in France. *J. Med. Mycol.* 26, 385–390. doi: 10.1016/j.mycmed.2016.11.001
- Hamprecht, A., Morio, F., Bader, O., Le Pape, P., Steinmann, J., and Dannaoui, E. (2018). Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus* in Patients with Cystic Fibrosis: A Matter of Concern? *Mycopathologia* 183, 151–160. doi: 10.1007/s11046-017-0162-4
- Lavergne, R.-A., Morio, F., Danner-Boucher, I., Horeau-Langlard, D., David, V., Hagen, F., et al. (2019). One year prospective survey of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* at a French cystic fibrosis reference centre: prevalence and mechanisms of resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* 74, 1884–1889. doi: 10.1093/jac/dkz144
- Lestrade, P. P. A., Buil, J. B., van der Beek, M. T., Kuijper, E. J., van Dijk, K., Kampinga, G. A., et al. (2020). Paradoxical Trends in Azole-Resistant *Aspergillus fumigatus* in a National Multicenter Surveillance Program, the Netherlands 2018. *Emerg. Infect. Dis.* 26 (7), 1447–1455. doi: 10.3201/eid2607.200088
- Meis, J. F., Chowdhary, A., Rhodes, J. L., Fisher, M. C., and Verweij, P. E. (2016). Clinical implications of globally emerging azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Philos. Trans. R. Soc B Biol. Sci.* 371, 20150460. doi: 10.1098/rstb.2015.0460
- Mellado, E., Diaz-Guerra, T. M., Cuenca-Estrella, M., and Rodriguez-Tudela, J. L. (2001). Identification of Two Different 14- Sterol Demethylase-Related Genes (*cyp51A* and *cyp51B*) in *Aspergillus fumigatus* and Other *Aspergillus* species. *J. Clin. Microbiol.* 39, 2431–2438. doi: 10.1128/JCM.39.7.2431-2438.2001
- Morio, F., Aubin, G. G., Danner-Boucher, I., Haloun, A., Sacchetto, E., Garcia-Hermoso, D., et al. (2012). High prevalence of triazole resistance in *Aspergillus fumigatus*, especially mediated by TR/L98H, in a French cohort of patients with cystic fibrosis. *J. Antimicrob. Chemother.* 67, 1870–1873. doi: 10.1093/jac/dks160
- Mortensen, K. L., Jensen, R. H., Johansen, H. K., Skov, M., Pressler, T., Howard, S. J., et al. (2011). *Aspergillus* Species and Other Molds in Respiratory Samples from Patients with Cystic Fibrosis: a Laboratory-Based Study with Focus on *Aspergillus fumigatus* Azole Resistance. *J. Clin. Microbiol.* 49, 2243–2251. doi: 10.1128/JCM.00213-11
- Neuvéglise, C., Sarfati, J., Debeauvais, J. P., Vu Thien, H., Just, J., Tournier, G., et al. (1997). Longitudinal study of *Aspergillus fumigatus* strains isolated from cystic fibrosis patients. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 16, 747–750. doi: 10.1007/BF01709257
- Periselneris, J., Nwankwo, L., Schelenz, S., Shah, A., and Armstrong-James, D. (2019). Posaconazole for the treatment of allergic bronchopulmonary aspergillosis in patients with cystic fibrosis. *J. Antimicrob. Chemother.* 74, 1701–1703. doi: 10.1093/jac/dkz075
- Pihet, M., Carrere, J., Cimon, B., Chabasse, D., Delhaes, L., Symoens, F., et al. (2009). Occurrence and relevance of filamentous fungi in respiratory secretions of patients with cystic fibrosis—a review. *Med. Mycol.* 47, 387–397. doi: 10.1080/13693780802609604
- Prigitano, A., Esposto, M. C., Biffi, A., Lorenzis, G. D., Favuzzi, V., Koncan, R., et al. (2017). Triazole resistance in *Aspergillus fumigatus* isolates from patients with cystic fibrosis in Italy. *J. Cyst. Fibros.* 16, 64–69. doi: 10.1016/j.jcf.2016.06.006
- Risum, M., Hare, R. K., Gertsen, J. B., Kristensen, L., Johansen, H. K., Helweg-Larsen, J., et al. (2020). Azole-Resistant *Aspergillus fumigatus* Among Danish Cystic Fibrosis Patients: Increasing Prevalence and Dominance of TR34/L98H. *Front. Microbiol.* 11, 1850. doi: 10.3389/fmicb.2020.01850
- Seufert, R., Sedlacek, L., Kahl, B., Hogardt, M., Hamprecht, A., Haase, G., et al. (2018). Prevalence and characterization of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* in patients with cystic fibrosis: a prospective multicentre study in Germany. *J. Antimicrob. Chemother.* 73, 2047–2053. doi: 10.1093/jac/dky147
- Stevens, D. A., Moss, R. B., Kurup, V. P., Knutsen, A. P., Greenberger, P., Judson, M. A., et al. (2003). Allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis—state of the art: Cystic Fibrosis Foundation Consensus Conference. *Clin. Infect. Dis.* 37, S225–S264. doi: 10.1086/376525
- Ullmann, A. J., Aguado, J. M., Arikan-Akdagli, S., Denning, D. W., Groll, A. H., Lagrou, K., et al. (2018). Diagnosis and management of *Aspergillus* diseases: executive summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline. *Clin. Microbiol. Infect.* 24, e1–e38. doi: 10.1016/j.cmi.2018.01.002
- Verweij, P. E., Ananda-Rajah, M., Andes, D., Arendrup, M. C., Brüggemann, R. J., Chowdhary, A., et al. (2015). International expert opinion on the management of infection caused by azole-resistant *Aspergillus fumigatus*. *Drug Resist. Updat.* 21–22, 30–40. doi: 10.1016/j.drug.2015.08.001
- Wiederhold, N. P., and Verweij, P. E. (2020). *Aspergillus fumigatus* and pan-azole resistance: who should be concerned? *Curr. Opin. Infect. Dis.* 33, 290–297. doi: 10.1097/QCO.0000000000000662

**Conflict of Interest:** J-PG received research grants from Gilead, MSD, and Pfizer.

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

Copyright © 2021 Guegan, Prat, Robert-Gangneux and Gangneux. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

## Discussion

Cette étude illustre la prévalence significative d'isolats d'*Aspergillus* résistants chez les patients atteints de mucoviscidose (proche de 15%), associée à une résistance croisée fréquente qui rend inefficace l'ensemble des azolés disponibles (250). La prise en charge des patients colonisés par des souches d'*A. fumigatus* pan-résistantes devient alors un véritable défi, du fait des alternatives antifongiques très limitées. L'amphotéricine B (AmB) nébulisée a été proposée dans le traitement des asthmes sévères avec sensibilisation fongique (ASSF) et dans les aspergilloses broncho-pulmonaires allergiques (ABPA). Les premières études conduites - hors contexte de mucoviscidose - sur des cohortes limitées rapportaient des résultats variables en termes d'efficacité et de tolérance (251,252). En revanche, l'efficacité de l'AmB nébulisée utilisée en traitement d'entretien était plus prometteuse dans une récente étude multicentrique française, incluant 174 patients atteints d'ABPA stabilisée. Le traitement par AmB nébulisée était associé à un allongement du délai de survenue d'exacerbation clinique et une amélioration des marqueurs sérologiques de sensibilisation fongique, par rapport au groupe traité par placebo (253).

Des nouveaux antifongiques comme l'olorofim (famille des orotomides) ou le fosmanogepix (famille des gepix) actuellement en cours d'évaluation clinique devraient offrir d'intéressantes alternatives pour éradiquer les souches d'*A. fumigatus* résistantes aux azolés (254). L'article met également en évidence que les taux de résistance sont variables selon la molécule azolée mais aussi selon le profil patient.





## II. Réponse macrophagique à l'infection par *Scedosporium apiospermum* comparativement à l'infection par *Aspergillus fumigatus*

Le pouvoir pathogène d'un champignon dépend de ses facteurs de virulence intrinsèques, mais aussi de la qualité de la réponse immune de l'hôte suscitée par l'infection. Parmi les cellules de l'immunité innée, les macrophages et les polynucléaires neutrophiles constituent les premières lignes de défense antifongique. L'objectif de cette deuxième partie est d'explorer la réponse inflammatoire de macrophages humains exposés à *S. apiospermum*, en la comparant à l'infection par *A. fumigatus*.

### Contexte

*A. fumigatus* et *S. apiospermum* sont deux champignons filamenteux opportunistes qui présentent des disparités de prévalence et de pathogénicité. Si *S. apiospermum* semble être rencontré dans l'environnement de façon plus anecdotique qu'*A. fumigatus* - ce qui pourrait concourir à expliquer une prévalence réduite des scedosporioses par rapport aux aspergilloses - nous avons questionné dans ce travail la capacité intrinsèque de *S. apiospermum* à s'établir au long cours chez l'hôte. Comme introduit dans la revue bibliographique, nous avons rappelé que la paroi des conidies de ces deux champignons présente des différences notables, en termes de taille et de composition, ce qui laisse supposer une interaction hôte-pathogène différente. Compte tenu des connaissances restreintes sur la réponse macrophagique générée par *S. apiospermum*, l'objectif de cette partie expérimentale était d'établir pour la première fois une vision globale du transcriptome du macrophage humain en réponse à *S. apiospermum*, en choisissant *A. fumigatus* comme référence. Cette analyse a également évalué les variations temporelles du transcriptome, en ciblant deux temps d'infection (4h et 12h), afin de prendre en considération la transition conidie-hyphes susceptible de moduler la reconnaissance et la réponse macrophagique.

### Article

**Differential transcriptomic response dynamics of primary human macrophages to *Scedosporium apiospermum* infection compared to *Aspergillus fumigatus*.**

Hélène Guegan, Florence Robert-Gangneux, Sarah Dion, Aymeric Delabarre, et Jean-Pierre Gangneux.

Manuscrit en préparation

1

1 **Differential transcriptomic response dynamics of primary human**  
2 **macrophages to *Scedosporium apiospermum* infection compared to**  
3 ***Aspergillus fumigatus***

4 Hélène GUEGAN<sup>1,2</sup>, Florence Robert-Gangneux<sup>1,2</sup>, Sarah Dion<sup>1</sup>, Aymeric Delabarre<sup>1</sup> and Jean-Pierre  
5 Gangneux<sup>1,2</sup>

6 <sup>1</sup>Univ Rennes, Inserm, EHESP, IRSET (Institut de Recherche en Santé Environnement et Travail) - UMR\_S  
7 1085, Rennes, France.

8 <sup>2</sup> Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Centre Hospitalier Universitaire de Rennes, Rennes, France

9 **Abstract**

10 In cystic fibrosis, *Scedosporium* is the second most prevalent airway colonization fungal agent after  
11 *Aspergillus*. Long-term bacterial and fungal airway colonization in CF patients contribute to maintain a  
12 chronic inflammation, through the release of various damage- associated molecular patterns, which  
13 may be involved in lung injury. We hypothesized that disparities in terms of cell wall structure and  
14 conidia morphology between both fungi, may affect interactions with host innate cells, that may  
15 ultimately affect fungal survival within the host. The objective of this study was to perform the first  
16 comparative transcriptomic analysis of human macrophages challenged with *S. apiospermum* (Sap)  
17 conidia or *A. fumigatus* (Afu) conidia, at two distinct time points, *i.e.* 4 h and 12h. First, we showed  
18 that Sap tailored the activation of several pro-inflammatory pathways, which were similar to the  
19 pathways activated by Afu. At 4h pi, a total of 15 pathways involved in inflammatory processes were  
20 differentially expressed in Sap-infected macrophages (FDR of  $4.10^{-2}$  to  $7.10^{-13}$ ), of which 12 were  
21 concomitantly enriched in Afu-infected macrophages (FDR of  $4.10^{-2}$  to 0), independently of the sense  
22 of variation. The four more strongly dysregulated pathways were signaling pathways associated with  
23 TNF, IL-17, NF-kappa B, and actors of cytokine-cytokine receptor interactions, commonly described  
24 during antifungal response. Interestingly, Sap triggered a stronger and earlier activation of pro-  
25 inflammatory pathways, as revealed by the three-fold higher number of over-expressed DEGs at 4h by  
26 Sap, compared to Afu (671 vs 200). Sap infection also triggered a higher release of IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ,  
27 IL-23, IL-10 ( $p < 0.001$ ) and IFN- $\alpha 2$  ( $p < 0.05$ ) in culture supernatants, which supported transcriptomic  
28 data. If the rate of infected macrophages was similar at 4h between both fungi, the killing of Sap  
29 conidia was higher than Afu conidia after 6h co-incubation (46.6% vs 34.5%,  $p < 0.05$ ), reflecting a lower  
30 ability of Sap to survive macrophage antifungal mechanisms.

31 *S. apiospermum* tailored a stronger and quicker inflammatory macrophage response, which could  
32 mediate a facilitated clearance, compared to *A. fumigatus*. An excessive inflammatory response could  
33 be deleterious for the host in the long term, especially in the specific context of cystic fibrosis.

34 Key-words : *Aspergillus fumigatus* ; *Scedosporium apioispermum* ; macrophage ; transcriptomic  
35 profile ; inflammation

36

## 38 Introduction

39 *Scedosporium apiospermum* is an opportunistic filamentous fungus responsible for a large panel of  
40 human infections, ranging from colonization or localized infection in immunocompetent host to  
41 disseminated infections in immunocompromised patients (1). In the specific context of cystic fibrosis,  
42 *Scedosporium* spp is the second most prevalent airway colonization agent after *Aspergillus*, since it is  
43 found in 3 to 17 % of patients depending on the geographical area (2–4). Long-term bacterial and  
44 fungal airway colonization in CF patients contribute to maintain a chronic inflammation, through the  
45 release of various damage-associated molecular patterns (DAMPs) and alarmins, which may be  
46 involved in lung injury. Regarding invasive infections, although much less frequent than *Aspergillus*  
47 *fumigatus*, *Scedosporium* spp are implicated in both localized (lung, osteoarticular and skin infections)  
48 and disseminated infections (5). A recent French report collecting 76 *Scedosporium*-related cases over  
49 a 13 year-period, underlined that only 26% of infections progressed toward disseminated forms. The  
50 global mortality of *S. apiospermum* infections was 9% at day 30, which appears lower than the  
51 mortality rate associated with invasive aspergillosis, up to 70% (6).

52 However, the outcome of fungal infections is also highly dependent on the host, the comorbidities,  
53 and the efficacy of the immune system. The quality of the innate immune response is crucial for fungal  
54 clearance, as reflected by the high predisposition to invasive mold infections, of patients with immune  
55 defect involving the myeloid lineage, especially polymorphonuclear cells (PMN) and monocytes. Of  
56 note, a large part of knowledge on the immune determinants that govern the antifungal response rely  
57 on *A. fumigatus* infection models. In lung infections, after crossing the epithelial barrier (7), inhaled  
58 fungal conidia quickly encounter first-line cells, consisting in resident macrophages and PMN (8,9).  
59 Macrophages are critical effector cells contributing to innate immune response against fungal conidia,  
60 as they are the most efficient pathogen scavengers and the predominant source of inflammatory  
61 cytokines. The recognition of the fungal conidia surface is the first step that mediates subsequent  
62 antifungal response, consisting in internalization, phago-lysosomal acidification, oxidative burst and  
63 fungal killing (8,10). This early fungal-host interaction involves the binding of pathogen-associated  
64 molecular patterns (PAMPs) on various recognition receptors such as Toll-like receptors (TLR) and C-  
65 type lectin receptors on phagocytic cell surface (11).

66 The availability of PAMPs to the surface highly depends on the cell wall composition and on the fungal  
67 state interacting with host cells, *i.e.* dormant conidia or hyphal form. *A. fumigatus* and *S. apiospermum*  
68 conidia cell wall share common components, such as chitin, and various polysaccharides such as alpha-  
69 and beta-glucans, which are covered by a layer of melanin, often considered as a fungal “armor”  
70 against external aggressions (12–14). In appropriate condition, both *A. fumigatus* and *S. apiospermum*

71 conidia germinate in approximatively 4h (15,16). Specifically, during *A. fumigatus* maturation, conidia  
72 rapidly undergo a morphological change to intermediate swollen state before the germ tube appears  
73 (15). *A. fumigatus* conidia is also covered by an outer proteinaceous hydrophobin cell wall layer that  
74 disappear with swelling (17), which is not present in *Scedosporium* spp (18). Conidia germination is  
75 also accompanied with progressive disappearance of melanin, which is not observed in hyphae.  
76 Consequently, immunogenic polysaccharides are unmasked in fungal filaments, allowing their  
77 recognition and the activation of immune cells toward pro-inflammatory responses, as described in *A.*  
78 *fumigatus* (19). In *Scedosporium* spp, some modifications of cell wall surface properties during conidia  
79 germination have been scarcely evidenced (20), and even less is known about their interaction with  
80 host phagocyte cells (21).

81 We hypothesized that disparities in terms of cell wall structure and conidia morphology between both  
82 fungi, may affect interactions with host innate cells, triggering distinct inflammatory responses, that  
83 may ultimately affect fungal survival within the host. Thus, the objective of the present study was to  
84 depict the transcriptomic response of human macrophages toward *S. apiospermum* conidia, compared  
85 to *A. fumigatus* infection.

## 86 **Materials and methods**

### 87 **Fungal strains and conidia preparation**

88 The strains used for macrophage infection were both isolated from clinical settings : i) the *Aspergillus*  
89 *fumigatus* wild-type reference strain Af 293 (Afu), deposited at the National Collection of Pathogenic  
90 Fungi (Bristol, UK), under the accession number NCPF7367 (22), and ii) the *Scedosporium apiospermum*  
91 wild-type strain (Sap) deposited at the BCCM/IHEM culture collection (Brussels, Belgium) under the  
92 accession number IHEM 14462 (WT 14462) (23).

93 All experiments were performed with conidia harvested from 9 day-cultures by scraping, filtered  
94 through sterilized Miracloth (pore size 22-25µm) for hyphae removal and washed once in sterile water.  
95 Conidia were counted using a LUNA™ automated particule counter (Logos Biosystems).

96 For cytometry and microscopy experiments, conidia were stained with 0.1 mg/mL fluorescein  
97 isothiocyanate (FITC, Sigma-Aldrich) in carbonate buffer (0.1 M, pH = 9) at room temperature (RT) for  
98 30min protected from light, washed three times with carbonate buffer and suspended in phosphate  
99 buffered saline (PBS).

100

## 101 **Generation of macrophages**

102 Human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from blood buffy coats obtained  
103 from health donors supplied by Etablissement Français du sang, Rennes, France. PBMCs were isolated  
104 using Ficoll-Paque density gradient centrifugation. CD14<sup>+</sup> cells (monocytes) were then isolated by  
105 positive magnetic cell-sorting (Miltenyi Biotec, Paris, France). A total of  $2 \times 10^6$  monocytes was plated  
106 in 12-well Nunc UpCell plates (ThermoFisher Scientific) and differentiated into M1-polarized  
107 macrophages in complete medium (RPMI 1640 Gibco, Life Technologies, 10% decompemented fetal  
108 calf serum (FCS), 100 IU/mL penicillin, 100µg/mL streptomycin) supplemented with 10ng/mL  
109 granulocyte-macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) (Miltenyi, Biotec, Paris, France) for 5  
110 days, at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>.

111

## 112 **RNA sequencing and bioinformatics analysis**

113 Differentiated macrophages ( $10^6$ /well in 24-well plates) were incubated for 4h and 12h at 37°C in  
114 5%CO<sub>2</sub> with *A. fumigatus* or *S. apiospermum* conidia at a 1:10 effector-to-target ratio. Replicates were  
115 pooled from two different individuals and four technical replicates each. Uninfected macrophages  
116 were cultured in parallel as control. Supernatants were then removed and cells were washed twice  
117 with PBS to remove extracellular conidia. Macrophages were lysed using the lysis buffer from  
118 Macherey-Nagel supplemented with β-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich) and lysates were  
119 immediately frozen at -80°C.

120 Sample processing, sequencing and bioinformatics analysis were performed by Helixio company (Saint-  
121 Beauzire, France). The extraction of total RNA was performed using NucleoSpin RNA kit (Macherey-  
122 Nagel). Total RNA purity was checked on a NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific) and  
123 quantification was performed with the fluorescent-based quantitation « RNA BR Assay» (Thermo  
124 Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). RNA integrity was checked on the Bioanalyzer system using the  
125 « RNA 6000 Nano » kit (Agilent Technologies).

126 Messenger RNA were purified using NEBNext® Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module » (New  
127 England Biolabs). From rRNA depleted RNA, libraries were prepared using NEBNext® Ultra™ II  
128 Directional RNA Library Prep Kit for Illumina » (New England Biolabs). Libraries were checked for quality  
129 on Bioanalyzer using « DNA 1000 Assay » (Agilent, Santa Clara, CA, USA). Quantification was performed  
130 with the fluorescent-based quantitation Qubit DNA BR Assay Kit (Thermo Fisher Scientific). Single-read  
131 75bp-sequencing was performed on a Next-Seq500 Illumina sequencer.

132 Reads were trimmed from adapters using Trimmomatic software, then mapped to the human  
133 reference (Homo sapiens GRCh38, release 106) using STAR 2.7.10. The STAR software was also used to  
134 produce the count matrix, assigning reads to features using annotation from Ensembl GTF file release

135 106. Quality control statistics were summarized using MultiQC software. Statistical analysis on the  
136 count matrix was performed to identify differentially regulated genes, comparing Sap-infected vs  
137 uninfected cells, Afu-infected vs uninfected cells and Sap-infected vs Afu-infected cells, at 4h and 12h.  
138 Differential expression testing was conducted using edgeR library indicating the significance  
139 (Benjamini-Hochberg adjusted p-values, false discovery rate FDR < 0.05) and the effect size ( $\log_2$ fold-  
140 change (FC)) for each comparison. A  $\log_2$ FC value >1 or <1 meant that gene expression in a given  
141 condition was at least twice as up-regulated (>1) or down-regulated (<1) as the control.

142 Venn diagrams were built on [https://www.bioinformatics.com.cn/static/others/jvenn\\_en/  
143 example.html](https://www.bioinformatics.com.cn/static/others/jvenn_en/example.html). Heatmaps were created for the most significantly represented genes of a specific  
144 functional class using the Morpheus tool at <https://software.broadinstitute.org/morpheus>.  
145 Representation of enriched KEGG pathways was built using SRplot available at [www.  
146 bioinformatics.com.cn](http://www.bioinformatics.com.cn).

#### 147 **Quantitative PCR (qPCR)**

148 RNA seq results were validated by quantitative real-time PCR analysis in a selected panel of genes  
149 found differentially expressed in the comparison of Sap- vs Afu-infected cells. RNA was reverse  
150 transcribed to cDNA using high-capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Villebon-  
151 sur-Yvette, France) according to the manufacturer's instructions. Quantitative PCR amplifications were  
152 carried out in duplicate using PowerUp SYBR® green PCR master mix (Applied Biosystems), 0.3  $\mu$ M  
153 primers, and 2  $\mu$ l of cDNA in a final volume of 10  $\mu$ l, in 384-well optical plates, using a CFX384 OPUS  
154 real-time PCR detection system (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). Gene-specific primers are  
155 listed in **Table S1**. Amplification efficiencies were validated, and the expression levels of the transcripts  
156 were normalized by comparison to expression of human GAPDH and actin housekeeping genes. Results  
157 were expressed as  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  referring to the fold induction in macrophages infected with *S. apiospermum*,  
158 in relation to the mean quantification cycle obtained with *A. fumigatus*-infected macrophages.

#### 159 **Phagocytosis assay**

160 Macrophages were plated in 8-well borosilicate Lab-Tek™ at a final density of  $10^5$  cells/well and  
161 infected with FITC-labelled conidia with a MOI of 5:1. Phagocytosis was synchronized as described  
162 above, and plates were incubated for 1h and 4h at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. After incubation, cells were put on  
163 ice to block macrophage activity, supernatants were removed, and cells were washed twice with cold  
164 DPBS to remove extracellular non-adherent conidia. Extracellular adherent conidia were then stained  
165 using calcofluor white (CFW) at 25 $\mu$ M for 15 min at 4°C. Cells were washed with PBS, fixed with 4%  
166 PFA, and let in PDB until microscopy acquisition. Plates were observed under a widefield inverted

167 fluorescence microscope (Olympus IX71), by using a 20× magnification lens, using filters for FITC (461-  
168 489nm) and CFW (381-399nm) detections. Images were digitally recorded using SoftWorx software.  
169 The rate of infected macrophages, *i.e.* containing FITC+ but no CFW stained conidia in their cytoplasm  
170 was manually determined, by counting at least 1000 cells per condition. The phagocytic index was  
171 determined as followed: total number of engulfed conidia/total number of infected macrophages)  
172 × (number of macrophages containing engulfed conidia/total number of counted macrophages) × 100.  
173

#### 174 **Killing assay**

175 Macrophages were plated at  $5 \times 10^5$ /well in 24-well plates and infected with FITC-labelled conidia with  
176 a MOI of 1:1. Plates were centrifugated at  $500 \times g$  for 5 min at RT to synchronize phagocytosis and  
177 incubated at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>, protected from light, for 6 h. Plates were then put on ice to block  
178 macrophage activity, the supernatants removed, and the cells washed three times with cold DPBS to  
179 remove extracellular non-adherent conidia.

180 Cells were immediately lysed using cold sterile water and put at 4°C for at least 1h or overnight. The  
181 well content was then transferred into Eppendorf tubes, centrifugated at 10,000g for 5 min. Pellets  
182 from conidia exposed to macrophages and unexposed control conidia were stained with 25µg/mL  
183 propidium iodide (PI, Sigma-Aldrich) for 30 min at RT and protected from light. Conidia were washed  
184 with sterile water, fixed with 4% PFA and analyzed with a LSRFortessa™ cytometer (BD Biosciences,  
185 Le-Pont-de-Claix, France). Each replicate included a negative control, reflecting the live conidia  
186 (unexposed FITC+ conidia), and a positive control referring to heat-killed conidia (85 °C, 20 min). Both  
187 controls were used to set gates for the positivity of each marker. Live conidia were FITC<sup>+</sup> PI<sup>-</sup> and the  
188 dead conidia were double-positive (FITC<sup>+</sup> PI<sup>+</sup>). The percentage of live conidia was determined as the  
189 percentage of PI<sup>-</sup> conidia among FITC<sup>+</sup> conidia. The reduction in conidia survival was calculated relative  
190 to control conidia not exposed to macrophages (viability control) as:  $100 \times ((\% \text{ of live conidia among}$   
191  $\text{unexposed conidia} - \% \text{ of live conidia among cell-exposed conidia}) / \% \text{ of live conidia among unexposed}$   
192  $\text{conidia})$ .

193

#### 194 **Cytokine assays**

195 Macrophages were plated in 24 well-plates at  $10^6$ cells/well, and incubated with  $10^7$  (MOI 10:1) live  
196 conidia in complete RPMI for 12h at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. Supernatants were then collected and  
197 immediately stored at -80°C. Pro-inflammatory cytokines were measured using a 13 plex-bead-based  
198 immunoassay LEGENDplex® multi-analyte flow assay (BioLegend, Paris, France), according to  
199 manufacturer instructions. Cytokine concentration was determined using standard curves obtained  
200 using recombinant cytokine standards provided in the kit. Samples were analyzed on a LSRFortessa™

201 cytometer (BD Biosciences, Le-Pont-de-Claix, France) and data were processed using the online  
202 platform provided by the kit manufacturer.

203

#### 204 **Oxidative stress (ROS) assay**

205 Macrophages were plated at  $2 \cdot 10^5$  cells per well in 96 well-plates and incubated with  $2 \cdot 10^6$  (MOI 10:1)  
206 live *S. apiospermum* or *A. fumigatus* conidia in complete RPMI for 2h at 37°C+ 5% CO<sub>2</sub>. A stimulated  
207 control with 10µM Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) and a negative untreated control were  
208 added. After supernatant removal, cells were washed with PBS and 10µM CM-H<sub>2</sub>DCFDA probe  
209 (Invitrogen) reconstituted in DMSO and diluted in PBS was added. Plates were incubated at 37°C in 5%  
210 CO<sub>2</sub> for 3h and oxidation of the probe was detected by increased of the fluorescence at 485-520nm,  
211 using a CLARIOstar Plus (BMG LABTECH) microplate reader. Results were expressed as the ratio  
212 between the fluorescence of infected or treated macrophages and the fluorescence of untreated  
213 macrophages.

214

#### 215 **Statistical analysis**

216 All experiments were performed in triplicate or quadruplicate, in at least three independent  
217 experiments, excepted RNA sequencing (two experiments) and RT-qPCR (additional experiments  
218 remain to be performed). Data were expressed as mean ± standard error of the mean (SEM). Statistical  
219 analysis was performed using GraphPad Prism software (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). A  
220 one-way analysis of variance Kruskal-Wallis test or a Mann-Whitney test were run to evaluate  
221 differences between Sap- and Afu-infected macrophages, and between infected and uninfected  
222 macrophages. In all analyses, p-values of less than 0.05 were considered statistically significant.

## 223 **Results**

224 RNA sequencing was performed in human macrophages infected with either *S. apiospermum* (Sap) or  
225 *A. fumigatus* (Afu) conidia. Gene expression changes were investigated at early (4h) and later (12h)  
226 infection times.

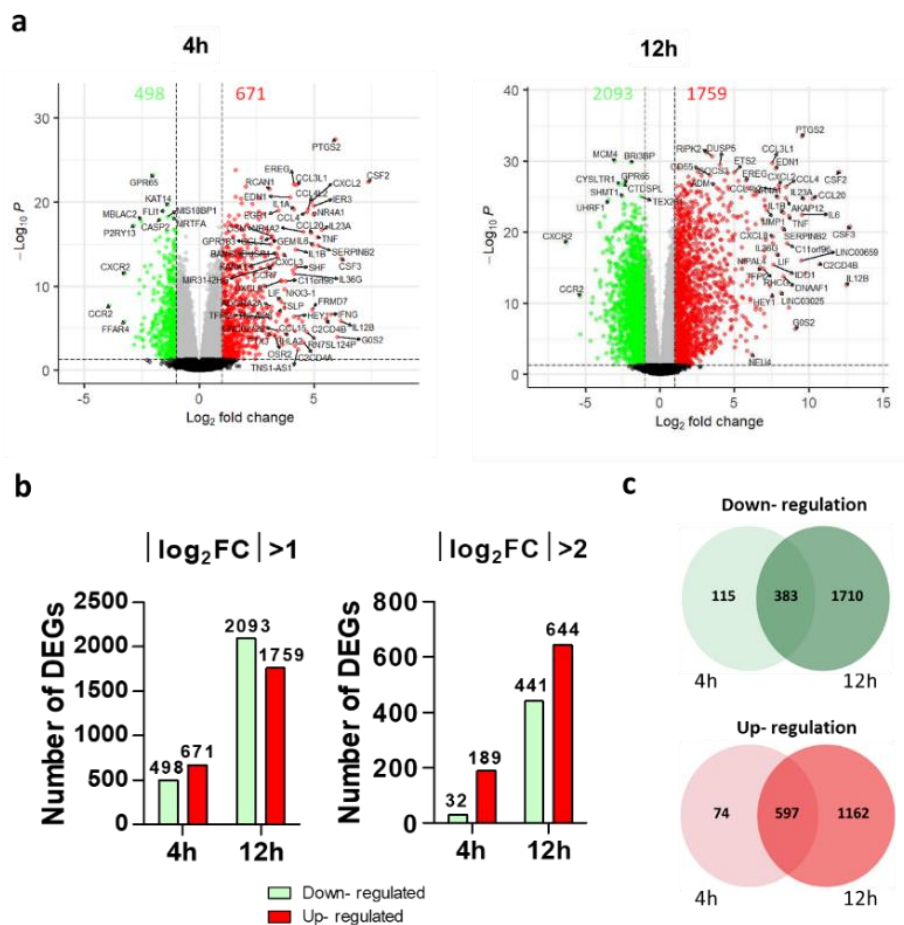
### 227 **1. *S. apiospermum* and *A. fumigatus* triggered the activation of similar inflammatory 228 pathways in human macrophage.**

229 The transcriptomic macrophage profile was first assessed in response i) to *S. apiospermum* (Sap) and  
230 ii) to *A. fumigatus* (Afu), considering uninfected cells as control. Following Sap infection, a total of 1,169  
231 and 3,852 differentially expressed genes (DEGs) were observed, respectively at 4h and 12h post-  
232 infection (pi), considering DEGs with FDR<0.05 and absolute log<sub>2</sub>Fold Change (FC) values >1, **Figure**



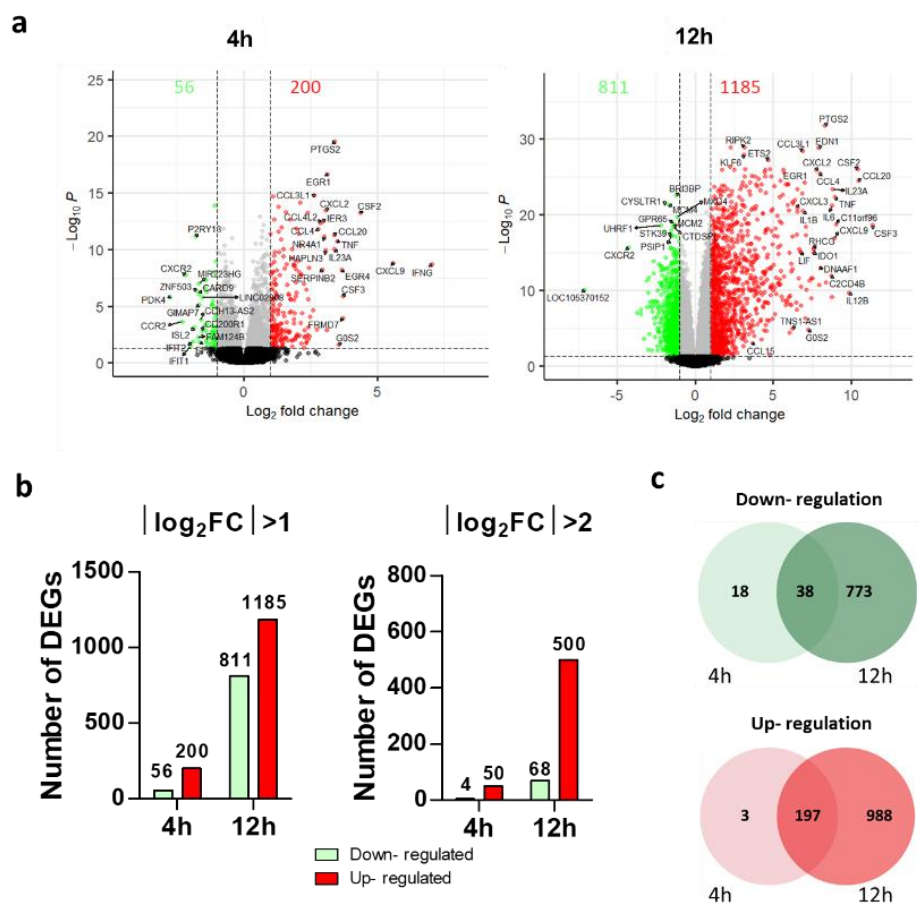
233 **1a,b, left.** The proportion of up-regulated genes was 57.4% (671/1,169) after 4h, and decreased to  
 234 45.7% (1,759/3,852) 12h pi. A similar trend was observed, when considering only genes  
 235 with  $|\log_2FC| > 2$ , as the rate of up-regulated genes was 85.5% (189/221) and 59.3% (644/1,085) at 4h  
 236 and 12h, respectively (**Figure 1b, right**). Interestingly, only 32.6% (597/1,833) and 17.3% (383/2208) of  
 237 genes remained differentially up- and down regulated at both time points, respectively, (**Figure 1c**).

238 By contrast with Sap, Afu infection triggered the differential expression of only 256 genes at 4h, but  
 239 drastically increased to 1996 at 12h (**Figure 2a,b, left**). The proportion of up-regulated genes was 78.1%  
 240 and 59.4%, respectively at 4h and 12h. The most differentially expressed genes ( $|\log_2FC| > 2$ ) were  
 241 predominantly up-regulated, representing 92.6% (50/54) and 88.0% (500/568) at 4h and 12h,  
 242 respectively (**Figure 2b, right**). Only 4.6% (38/829) and 16.6% (197/1,188) of DEGs were common to 4h  
 243 and 12h time points, respectively in down- and up-regulated genes (**Figure 2c**).



244 **Figure 1. Differentially expressed genes (DEGs) in Sap-infected macrophages compared to**  
 245 **uninfected macrophages.** (a) Volcanoplots of DEGs at 4h and 12h pi. Green and red dots represent  
 246 significantly DEGs ( $FDR < 0.05$ ), respectively down-regulated ( $\log_2FC < -1$ ) and up-regulated ( $\log_2FC > 1$ ). Light grey  
 247 and black dots are genes with  $|\log_2FC| < 1$  or  $FDR > 0.05$ . Gene ID from some of the most dysregulated genes are  
 248 shown (b) Histograms showing the number of DEGs at 4h and 12h, when considering the threshold for  $|\log_2FC|$   
 249  $> 1$  (left) or  $> 2$  (right). (c) Venn diagrams showing the number of genes which are down-regulated (left) or up-  
 250 regulated (right) specifically at 4h or 12h, or found at both times of infection.

251 Based on KEGG database, the various DEGs observed during Sap and Afu infections were gathered into  
 252 functional categories, presented in **Table 1**. At 4h pi, a total of 15 pathways involved in inflammatory  
 253 processes were differentially expressed in Sap-infected macrophages (FDR of  $4.10^{-2}$  to  $7.10^{-13}$ ), of which  
 254 12 were concomitantly enriched in Afu-infected macrophages (FDR of  $4.10^{-2}$  to 0), independently of  
 255 the sense of variation (down or up-regulated). The four more strongly dysregulated pathways were  
 256 signaling pathways associated with TNF, IL-17, NF-kappa B, and actors of cytokine-cytokine receptor  
 257 interactions, commonly described during antifungal response. At 4h pi, four additional pathways  
 258 involved in cell cycle regulation or programmed cell death were enriched in Sap-infected macrophages,  
 259 but not in Afu-infected cells. In Sap-infected macrophages, the significantly modified pathways were  
 260 globally similar at 12h as at 4h, excepted RIG-I-like receptor pathway, and Th1, Th17 and Th17 cell  
 261 differentiation, which were not enriched at 12h. Besides, pathways related to phagosome, PI3K-Akt  
 262 and ferroptosis were found significantly enriched at 12h in Sap- but not Afu-infected macrophages.



263 **Figure 2. Differentially expressed genes (DEGs) in Afu- infected macrophages compared to**  
 264 **uninfected macrophages.** (a) Volcanoplots of DEGs at 4h and 12h pi. Green and red dots represent significantly  
 265 DEGs (FDR<0.05), respectively down- regulated ( $\log_2 FC < -1$ ) and up- regulated ( $\log_2 FC > 1$ ). Light grey and black  
 266 dots are genes with  $|\log_2 FC| < 1$  or FDR>0.05. Gene ID from some of the most dysregulated genes were shown  
 267 (b) Histograms showing the number of DEGs at 4h and 12h, when considering the threshold for  $|\log_2 FC| > 1$  (left)  
 268 or  $> 2$  (right). (c) Venn diagrams showing the number of genes which are down-regulated (left) or up-regulated  
 269 (right) specifically at 4h or 12h, or found at both duration of infection.

270 To further get insight into these pathways, fold change values of DEGs significantly modified in Sap- or  
 271 Afu- infected macrophages were depicted in heatmaps (**Figure 3**). Five major pathways involved in  
 272 antifungal immunity were selected. Interestingly, most genes involved in inflammation, encoding  
 273 cytokines and chemokines for the majority, were up-regulated in response to Sap or Afu infection. For  
 274 instance, in the TNF signaling pathway, 87.2% (35/40) and 87.2% (41/47) of DEGs were up-regulated  
 275 in Sap-infected macrophages compared to uninfected macrophages, at 4h and 12h, respectively.  
 276 Similarly, in Afu-infected macrophages, 90.6% (29/32) and 91.1% (41/45) of DEGs were up-regulated  
 277 at 4h and 12h, respectively. Regarding the kinetics, the sense of variation was conserved between 4h  
 278 and 12h. The fold change of up-regulated DEGs was generally higher at 12h than at 4h, except for IFN-  
 279  $\gamma$ - encoding gene (IL-17 signaling), which FC induction tended to decrease from 5.7 to 5.4 in Sap-  
 280 infected vs uninfected macrophages, and from 7.0 to 6.8, in Afu-infected vs uninfected macrophages.

281 **Table 1. Summary of enriched pathways in Sap-infected or in Afu-infected macrophages**  
 282 **compared to uninfected macrophages, at 4h and 12h post-infection.**

KEGG Pathway		FDR			
		Sap vs uninfected		Afu vs uninfected	
Identifier	Description	4h	12h	4h	12h
hsa04668	TNF signaling pathway	1E-12	5E-05	4E-12	1E-11
hsa04657	IL-17 signaling pathway	1E-06	3E-04	3E-11	2E-04
hsa04060	Cytokine-cytokine receptor interaction	7E-13	8E-08	0	3E-12
hsa04062	Chemokine signaling pathway	2E-05	6E-06	4E-06	9E-07
hsa04620	Toll-like receptor signaling pathway	1E-06	1E-03	1E-07	2E-08
hsa04625	C-type lectin receptor signaling pathway	8E-05	6E-04	8E-05	1E-05
hsa04621	NOD-like receptor signaling pathway	8E-07	8E-03	3E-05	3E-06
hsa04630	JAK-STAT signaling pathway	3E-04	7E-03	1E-04	1E-04
hsa04010	MAPK signaling pathway	1E-03	8E-04	5E-03	3E-04
hsa04064	NF-kappa B signaling pathway	3E-09	2E-06	4E-10	4E-08
hsa04066	HIF-1 signaling pathway	2E-03	2E-03	X	6E-03
hsa04622	RIG-I-like receptor signaling pathway	2E-02	X	3E-02	X
hsa04657	Th17 cell differentiation	2E-02	X	4E-02	1E-02
hsa04660	T cell receptor signaling pathway	4E-03	4E-02	X	X
hsa04658	Th1 and Th2 cell differentiation	4E-02	X	X	6E-03
hsa04145	Phagosome	X	4E-02	X	X
hsa04110	Cell cycle	4E-03	4E-07	X	3E-03
hsa04218	Cellular senescence	4E-03	7E-06	X	5E-03
hsa04210	Apoptosis	7E-04	7E-03	X	2E-03
hsa04068	FoxO signaling pathway	2E-02	6E-04	X	X
hsa04151	PI3K-Akt signaling pathway	X	4E-02	X	X
hsa04216	Ferroptosis	X	6E-03	X	X

283 FDR: significance of the pathway enrichment. Intensity of blue color reflects the level of significance. "X" means  
 284 that the pathway is not significantly represented in the given condition. Pathways referring to specific diseases,  
 285 e.g. "Influenza A", "Legionellosis" or "Rheumatoid arthritis" were not shown.

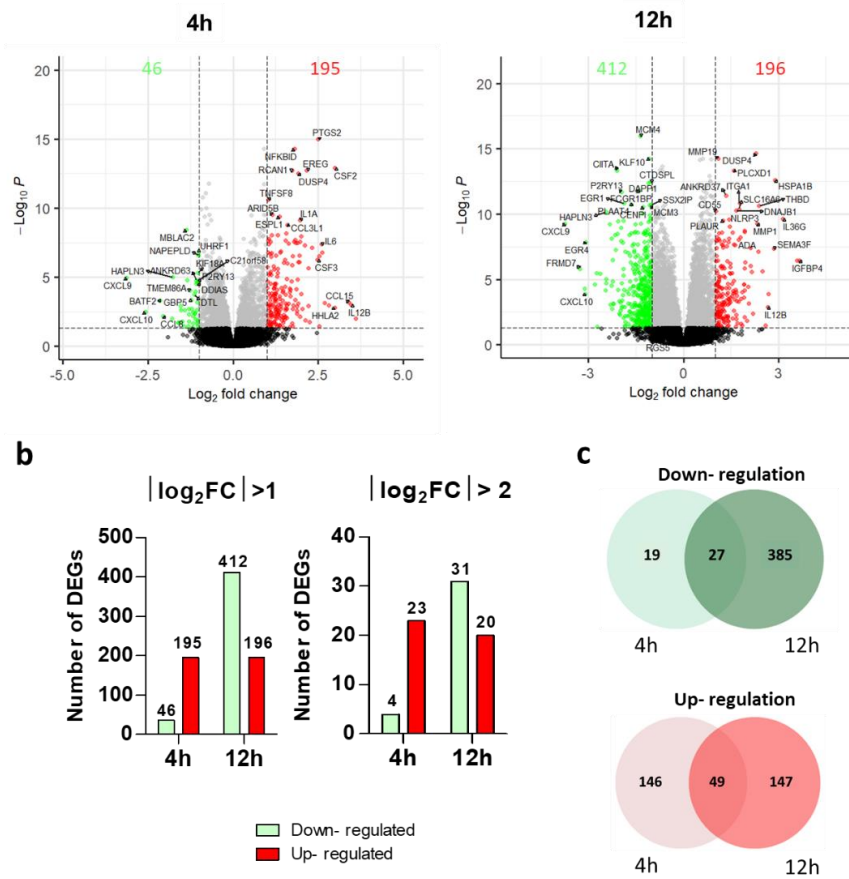


286

287 **Figure 3. Heatmaps of five significant pathways found enriched in Sap- and Afu-infected macrophages, in comparison to uninfected macrophages 4h and**  
 288 **12h post-infection.** Color scale represents log<sub>2</sub>FC values, from dark green (negative values, down-regulated genes) to dark red (positive values, up-regulated genes). The  
 289 color intensity reflects the importance of gene expression variation. Genes are indicated if their expression was significantly changed (FDR<0.05) in at least one of the four  
 290 comparisons, and « X » indicates that the FDR was not significant (>0.05). DEGs common to the represented pathways were not removed.

291 **2. *S. apiospermum* tailored an earlier and stronger pro-inflammatory transcriptomic response**  
 292 **compared to *A. fumigatus*.**

293 As Sap and Afu appeared to stimulate similar pathways, we further compared the intensity and the kinetics of  
 294 macrophage response triggered by these fungi. In this aim, data were re-analyzed to assess the differential  
 295 expression profile of Sap- infected macrophages, compared to Afu-infected macrophages, rather than  
 296 compared to uninfected macrophages. As shown in **Figure 4a**, there were 241 DEGs and 608 DEGs at 4h and  
 297 12h pi. Interestingly, at 4h p, up-regulated genes were predominant in Sap vs Afu- infected macrophages,  
 298 consisting of 80.9% (195/241). By contrast down-regulated genes predominated at 12h, corresponding to 67.8%  
 299 (412/608) (**Figure 4a,b, left**). When considering the most differentially regulated genes ( $|\log_2FC| > 2$ ), a similar  
 300 trend was observed, with a quite constant number of up-regulated genes (23 at 4h and 20 at 12h) and a number  
 301 of repressed genes which increased from 4 at 4h to 31 at 12h (**Figure 4b, right**). Gene ID,  $\log_2FC$  and FDR of  
 302 these most strongly DEGs are presented in Table S2. Only 27/431 (6.3%) down-regulated DEGs and 49/342  
 303 (14.3%) up-regulated DEGs were common to both time points (**Figure 4c**).

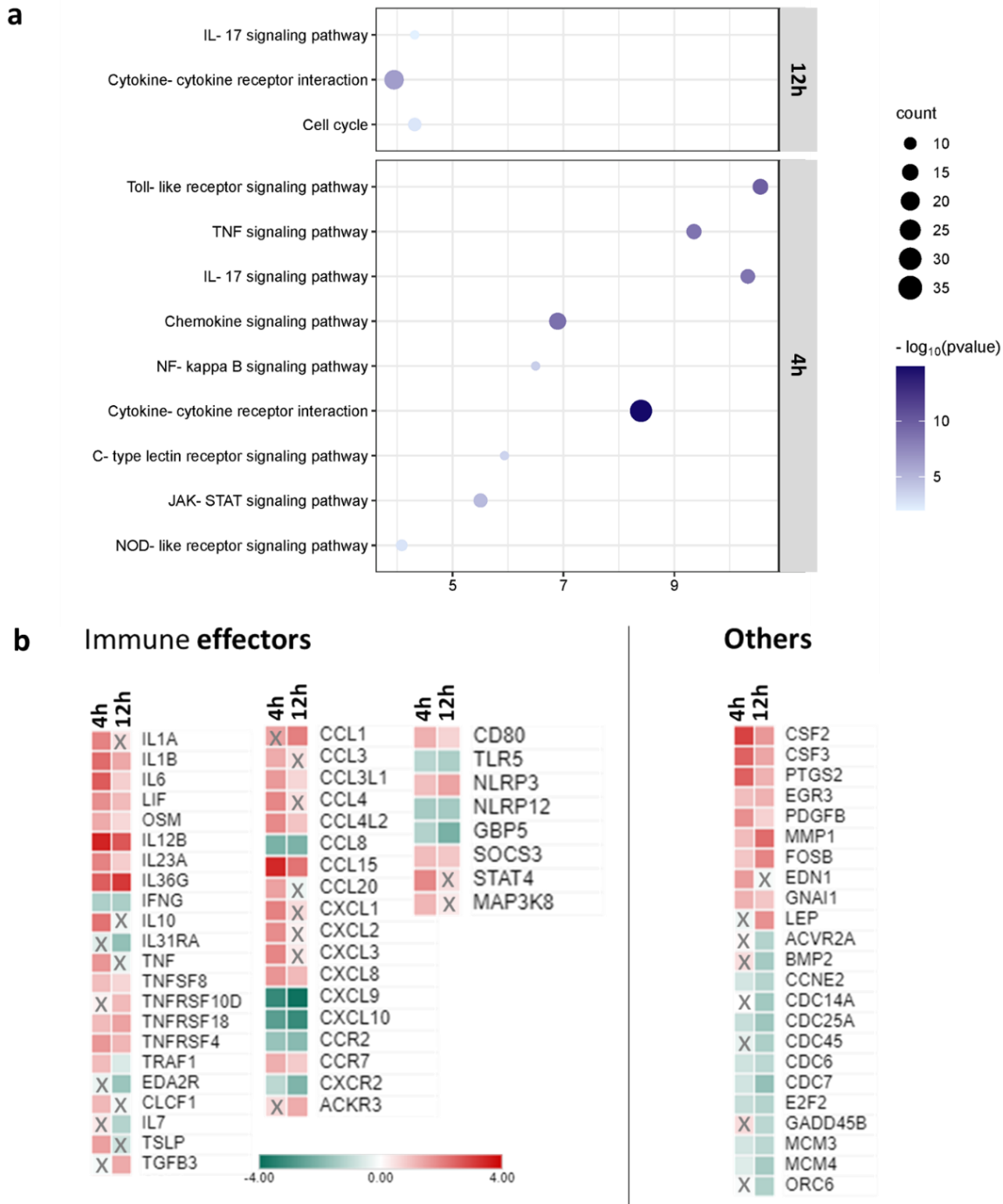


304  
 305 **Figure 4. Differentially expressed genes (DEGs) in *S. apiospermum*-infected macrophages compared to *A.***  
 306 ***fumigatus*-infected macrophages.**  
 307 (a) Volcanoplots of DEGs at 4h and 12h pi. Green and red dots represent significantly DEGs (FDR<0.05), respectively down-  
 308 regulated ( $\log_2FC < -1$ ) and up- regulated ( $\log_2FC > 1$ ). Light grey and black dots are genes with  $|\log_2FC| < 1$  or FDR>0.05.  
 309 Gene ID from some of the most dysregulated genes are shown (b) Histograms showing the number of DEGs at 4h and 12h,  
 310 when considering the threshold for  $|\log_2FC| > 1$  (left) or  $> 2$  (right). (c) Venn diagrams showing the number of genes which  
 311 are down-regulated (left) or up-regulated (right) specifically at 4h or 12h, or found at both duration of infection.

312 There were quantitatively less DEGs in Sap- infected macrophages compared to afu-infected macrophages at  
313 4h than at 12h, but the number of significantly enriched pathways at 4h exceeded the number of enriched  
314 pathways at a later time (9 vs 3) (**Figure 5a**). The most represented DEGs belonged to inflammatory process  
315 pathways (Toll-like receptors, TNF and IL-17) and in cytokine-cytokine receptor interaction. Other represented  
316 pathways included various PRRs (C-type lectin and NOD-like receptors) and NF- $\kappa$ B and JAK-STAT signaling  
317 members, also known to be associated to antifungal immunity. All DEGs belonging to the 10 enriched pathways  
318 at any time (**Figure 5a**) are represented in heatmaps showing the level of gene expression changes (**Figure 5b**).  
319 Of the 72 (63.9%) non-redundant genes which were differentially expressed at 4h and/or 12h, 48 were involved  
320 in antifungal immunity, including cytokines (n=15) and cytokine receptors (n=7), chemokines (n=15) and  
321 chemokine receptors (n=4), inflammasome proteins (n=2), signaling proteins (n=3), TLR (n=1) and the  
322 differentiation cluster CD80. Thirty-two out of 41 and 22 out of 30 genes were significantly up-regulated at 4h  
323 and 12h respectively, in Sap- infected macrophages. Most pro-inflammatory cytokines and chemokines were  
324 up-regulated at both times, globally with higher fold change values at 4h than at 12h. Specifically, a panel of  
325 genes encoding crucial pro-inflammatory cytokines from the IL-1 family (IL1- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-36 $\gamma$ ) and the IL-6 family  
326 (IL-6, LIF, OSM), as well as IL-12 p40 subunit (*IL12B*) and IL-23 p19 subunit (*IL23A*) were strongly up-regulated  
327 in Sap vs Afu infected cells, predominantly at 4h pi. In addition, genes encoding PMN chemoattractants CCL15,  
328 CXCL1, CXCL2, CXCL3 and CXCL8 ( $\log_2$ FC from 1.68 to 3.40, FDR  $7.10^{-3}$  to  $2.7.10^{-8}$ ) were significantly  
329 overexpressed in Sap-infected macrophages, compared to Afu-infected macrophages. By contrast, the  
330 pleiotropic chemokine CCL8, as well as CXCL9 and CXCL10 acting on activated T cells and NK cells were down-  
331 regulated following Sap infection, compared to Afu infection, both at 4h and 12h. Other down-regulated genes  
332 in Sap-infected macrophages encoded various receptors such as IL-1RA, CCR2, CXCR2 and TLR5 and the  
333 inflammasome regulatory protein NLRP12.

334 The other DEGs in Sap- infected cells were mainly growth factor-encoding genes such as *CSF2*, *CSF3* and *PTGS2*  
335 (overexpressed), and various cell cycle regulators (mostly down-regulated).

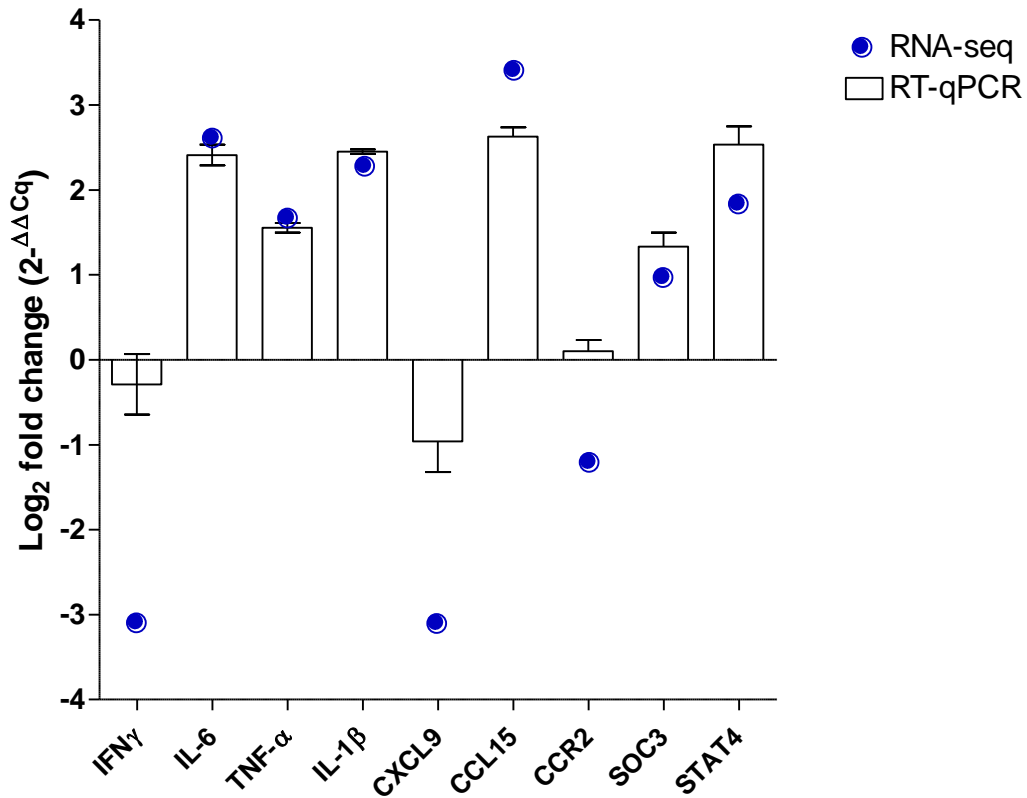
336 A panel of genes were selected for RT-qPCR to validate RNA-seq data, supporting the strong induction of genes  
337 encoding the pro-inflammatory effectors such as IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF and CCL15 (**Figure 6**).



338

339 **Figure 5. Differential gene expression profile from macrophages infected with *S. apiospermum* conidia in**  
 340 **comparison with *A. fumigatus*, at 4h and 12h post-infection. (a)** Enriched KEGG pathways in Sap-infected cells vs  
 341 Afu-infected cells. Only enrichments with FDR<0.05 were shown. **(b)** Heatmaps of DEGs from the 10 enriched pathways  
 342 (72 genes) at 4h and/or shown 12h shown in (a). Color scale represents log<sub>2</sub>FC values, from dark green (negative values,  
 343 down-regulated genes) to dark red (positive values, up-regulated genes). The color intensity reflected the importance of  
 344 gene expression variations. Genes were indicated if their expression was significantly changed (FDR<0.05),  
 345 and « X » indicates that the FDR was not significant (>0.05).

346



347

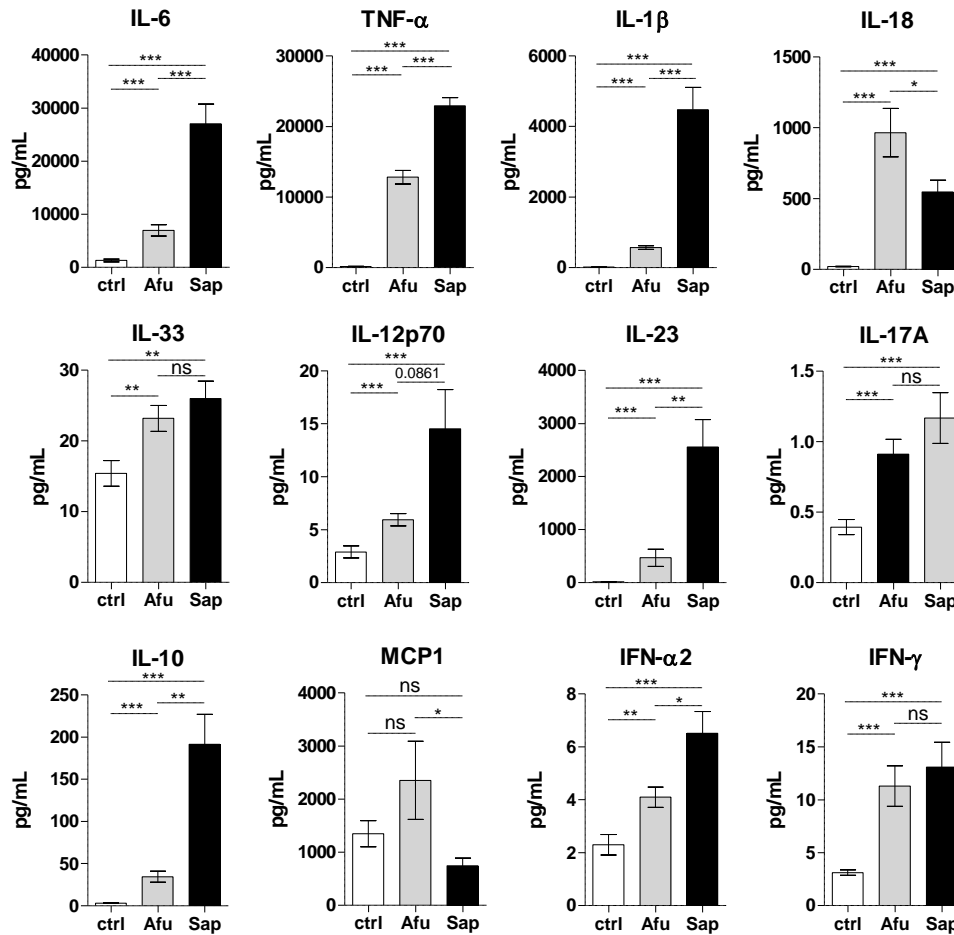
348 **Figure 6. Fold-change values of selected genes using RT-qPCR and RNA-seq.** Data represent gene expression ratio  
349 in Sap- infected macrophages compared to Afu- infected macrophages at 4h post-infection on a selection of DEGs  
350 according to RNA-seq. Non-definitive data from one experiment.

351

352 **3. The amount of inflammatory cytokines released by Sap-infected macrophages was higher than by**  
353 **Afu-infected macrophages.**

354 We further validated the apparent exacerbated inflammatory profile of Sap vs Afu- challenged macrophages,  
355 by cytokine and chemokine dosages in 12h-culture supernatants (**Figure 7**). Interestingly, Sap infection triggered  
356 a higher release of IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-23, IL-10 ( $p < 0.001$ ) and IFN- $\alpha 2$  ( $p < 0.05$ ), compared to Afu infection,  
357 supporting transcriptomic results. By contrast, the levels of IL-18 and MCP1 (CCL2) were higher in supernatants  
358 from Afu-infected than from Sap-infected macrophages.



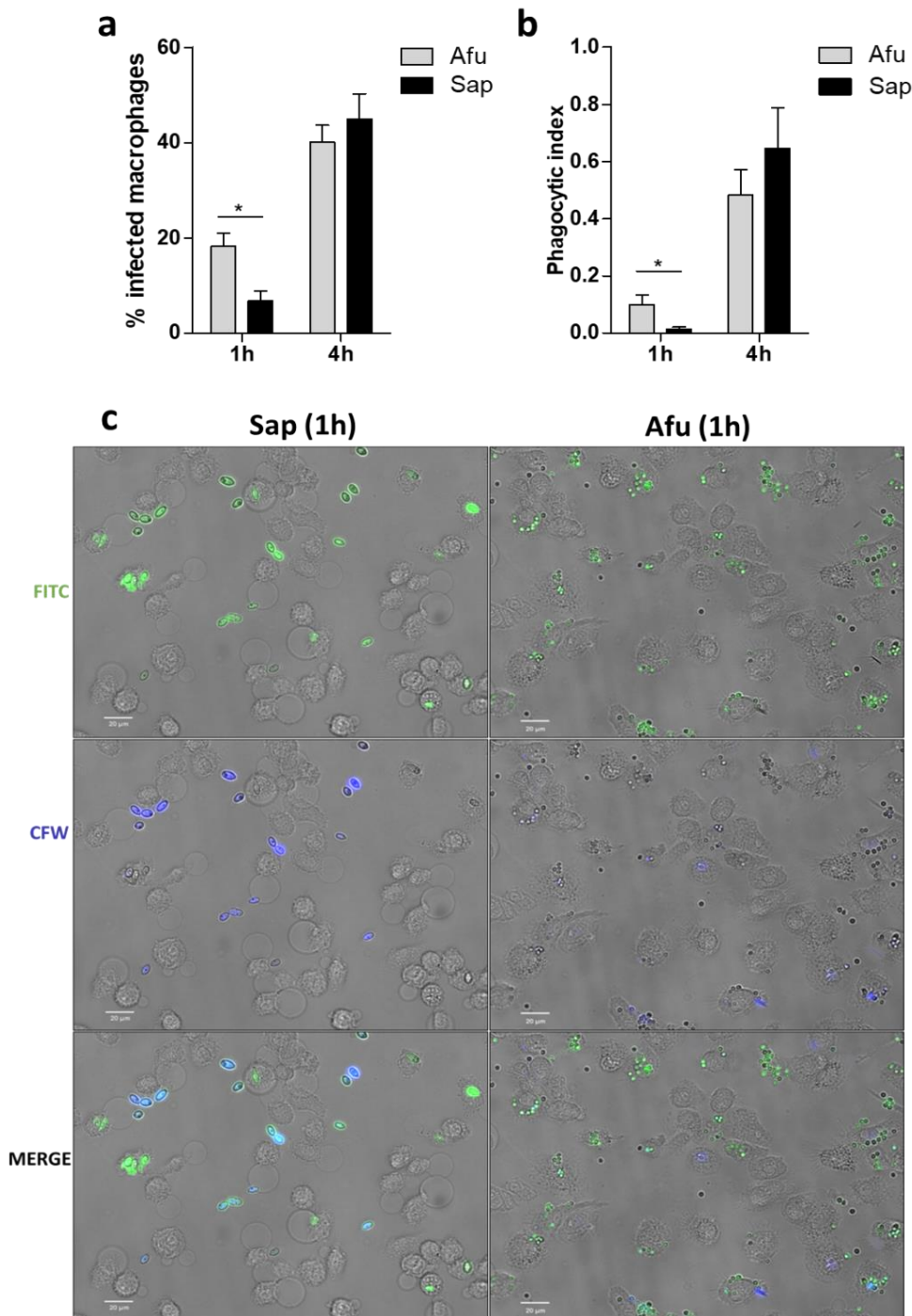


359  
 360 **Figure 7. Concentration of cytokines and chemokines in supernatants of macrophages infected with *S.***  
 361 ***apiospermum* or *A. fumigatus*, 12h post-infection.** Uninfected macrophages were included as controls. Dosages  
 362 performed using a 13 plex-bead-based immunoassay LEGENDplex® multi-analyte flow assay (BioLegend). Data from 4  
 363 independant experiments conducted in quadruplicates. \* p-value<0.05 ; \*\* p-value<0.01 ; \*\*\* p-value<0.001, Mann-  
 364 Whitney test.

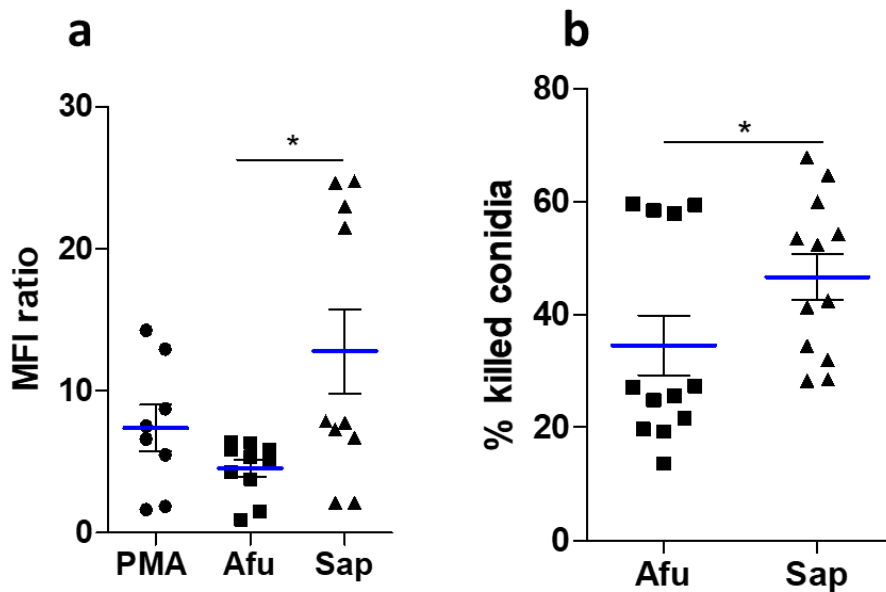
365 **4. Efficacy of macrophage effector functions against Sap and Afu conidia**

366 The recognition of extracellular fungal spores and subsequent activation of inflammation pathways in  
 367 phagocytes are thought to contribute to the successful engulfment and killing of pathogens. Thus, the  
 368 phagocytosis of Sap and Afu conidia by macrophages was compared at 1h and 4h pi. The internalization of Afu  
 369 conidia was slightly faster, compared Sap conidia, as shown by the higher rate of infected macrophages  
 370 (29.2±15.4% vs 25.8±19.1%, p=0.010), and the higher phagocytic index (0.1 vs 0.01, p=0.010) after 1h incubation  
 371 (Figure 8a,b,c). At 4h, the proportion of Sap- and Afu-infected macrophages was similar (Figure 8a).  
 372 The internalization of conidia was accompanied by the activation of ROS production, following both Afu and  
 373 Sap infection (Figure 9a). However, Sap triggered a higher emission of fluorescence by infected macrophages  
 374 when incubated with the detection probe, reflecting the enhanced ROS production compared to Afu.

375 Finally, the killing of Sap and Afu conidia by macrophages after 6h co-incubation was evaluated, revealing a  
 376 lower ability of Sap to survive macrophage antifungal mechanisms, as 46.6% and 34.5% of Sap and Afu conidia  
 377 were killed, respectively (Figure 9b,  $p < 0.05$ ).



378  
 379 **Figure 8. Phagocytosis of *S. apiospermum* (Sap) and *A. fumigatus* (Afu) conidia by macrophages.** (a) Percentage  
 380 of infected macrophages following incubation at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> for 1h or 4h, (MOI 5 :1). Microscopic counting after slide  
 381 scanning. Graphs show merged data obtained from 3 independent experiments. (b) Phagocytic index at 1h and 4h pi. Data  
 382 obtained from 3 independent experiments. (c) Example of microscopic acquisition from macrophage cultures infected with  
 383 FITC-pre-stained Sap and Afu conidia for 1h at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. Counterstaining with calcofluor white (CFW) was used to  
 384 stain extracellular conidia. \* $p$ -value<0.05, Mann-Whitney test.



385

386 **Figure 9. Evaluation of phagocytic functions** (a) Reactive oxygen species (ROS) assay. Macrophages were incubated  
 387 with *S. apiospermum* or *A. fumigatus* conidia at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> for 2h (MOI 10:1). After PBS washing, cells were incubated  
 388 for 3h with CM-H<sub>2</sub>DCFDA probe. The fluorescence emitted by CM-H<sub>2</sub>DCFDA probe after hydrolysis by intracellular oxidative  
 389 metabolism in macrophage was measured at 485-520nm. Data are presented as the ratio between the raw fluorescence  
 390 of infected and uninfected macrophages. Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA)-treated cells were used as positive  
 391 control. Data show results from 3 independent experiments. (b) Conidia killing after ingestion by macrophages. After a 6h-  
 392 incubation (MOI 1:1), extracellular conidia were removed by 3 washes with PBS, and internalized conidia were released by  
 393 macrophages lysis (cold water) for viability assay. The killing was determined relative to control conidia not exposed  
 394 to macrophages (viability control) as: 100\*((% of live conidia among unexposed conidia - % of live conidia among  
 395 cell-exposed conidia) / % of live conidia among unexposed conidia). \*p-value<0.05, Mann-Whitney test.  
 396

## 397 Discussion

398 The macrophage response to *S. apiospermum* conidia still remains poorly explored. Knowledge about  
 399 determinants of antifungal immune response are usually extrapolated from studies focusing on a couple of  
 400 human fungal pathogens, of which *A. fumigatus* is by far one of the most studied, together with *Candida*  
 401 *albicans* and *Cryptococcus neoformans* (8,24–26). Here, we performed the first comparative transcriptomic  
 402 analysis of human macrophages challenged with *S. apiospermum* conidia or *A. fumigatus* conidia, at two distinct  
 403 time points, *i.e.* 4 h and 12h.

404 First, we showed that *S. apiospermum* tailored the activation of several pro-inflammatory pathways, which  
 405 were similar to the pathways activated by *A. fumigatus*. Following the recognition of fungal patterns by CLRs  
 406 and TLRs, the activation of NFκB pathway is the mainstay of innate immunity and crucial for infection clearance,  
 407 as widely evidenced both in *A. fumigatus* (27) and also *Scedosporium* (28). This inflammatory avalanche  
 408 supported by the high release of IL-6 and TNF in culture supernatants was expected, as these cytokines play an  
 409 important role in antifungal immunity, stimulating neutrophil migration, and inducing oxidative burst by  
 410 phagocytic cells (29). Another crucial inflammatory pathway involves the activation of inflammasomes,  
 411 consisting of multiprotein platforms that activate caspase-1, which is ultimately essential for the cleavage of

412 pro-IL-1 $\beta$  and pro-IL-18 into their mature and biologically active forms (30,31). Here the up-regulation of *NLRP3*  
413 gene, together with the down-regulation of the negative regulator *NLRP12* in *S. apiospermum*-infected cells  
414 may be associated with the high level of IL-1 $\beta$  released in cell supernatants. By contrast, the higher level of IL-  
415 18 released by *A. fumigatus* infected cells remains to be elucidated, as the activation of this cytokine is  
416 concomitant with IL-1 $\beta$  processing. Both IL-1 $\beta$  and IL-18 are known to initiate Th1 and Th17 adaptative immune  
417 responses (32). Both *S. apiospermum* and *A. fumigatus* were found to tailor the activation IL-17 pathway, which  
418 is globally seen as beneficial for fungal clearance, in spite of some contradictory reports (33).

419 Strikingly, we observed that the activation of pro-inflammatory pathways by *S. apiospermum* occurred in a  
420 stronger and earlier way, as revealed by the three-fold higher number of over-expressed DEGs at 4h, by *S.*  
421 *apiospermum*, compared to *A. fumigatus* (671 vs 200), after independent normalization on uninfected cells.  
422 These findings were further supported by the expression analysis of *S. apiospermum*-infected cells using *A.*  
423 *fumigatus*-infected cells as comparator, showing that 80 % of differentially expressed genes were up-regulated  
424 in Sap-infected cells at 4h. At 12h, *A. fumigatus* infection triggered a roughly similar inflammatory  
425 transcriptomic profile as *S. apiospermum*, although a number of pro-inflammatory cytokine-related genes  
426 remained down-regulated compared to *S. apiospermum*-infected macrophages. These observations suggest  
427 that the recognition of *A. fumigatus* conidia was delayed, compared to *S. apiospermum*. Concomitantly, ROS  
428 induction and Afu conidia survival were lower and higher, respectively, compared to those observed in *S.*  
429 *apiospermum*-infected cells.

430 However, some discrepancies were highlighted regarding *CXCL9* and *CXCL10*, which were unexpectedly down-  
431 regulated in *S. apiospermum*-compared to Afu-infected macrophages, and even repressed, compared to  
432 uninfected cells. This observation needs confirmation experiments and further investigation given the  
433 importance of these chemokines in the antifungal clearance. Indeed, the protective role of this CXCR3- binding  
434 chemokines against fungal infections is no longer to be evidenced, as polymorphisms of *CXCL10* have been  
435 implicated in the susceptibility of hematopoietic stem cell transplant patients to invasive aspergillosis (34).

436 At first glance, this finding contrasts with a previous report on a *S. boydii* model, showing the strong release of  
437 CXCL10 along with TNF, IL-6 and IL-10, by mouse peritoneal macrophage, which was supported by the binding  
438 of conidial peptidorhamnomannan to TLR4 (28). However, the macrophage response may also vary according  
439 to the model used, *i.e.* human vs murine macrophage cells, and according to the fungal species studied.  
440 Although not fully elucidated, some differences in cell wall composition and diverse ability to form biofilm, have  
441 been described among *Scedosporium* species (13,35,36).

442 While this is the first study comparing the macrophage response to *Scedosporium apiospermum* with that to *A.*  
443 *fumigatus*, other authors compared *Lomentospora prolificans*, which was previously a member of the

444 *Scedosporium* genus, to *Aspergillus* species. Interestingly, *L. prolificans* was also shown to induce higher  
445 synthesis of TNF- $\alpha$  and IL-6 by human monocytes *in vitro* (37).

446 Several hypotheses related to the cell wall composition can be advanced to understand and explain the  
447 exacerbated inflammatory macrophage response triggered by *S. apiospermum*, compared to *A. fumigatus*. The  
448 preliminary step of fungal-host cell interaction resides in the attachment of conidia to host cell, which is highly  
449 dependent on adhesive properties of fungal conidia (38). Here, adherence was not specifically explored, but we  
450 showed that the entry of *Scedosporium* conidia into the macrophage was comparable to *A. fumigatus*  
451 internalization, although slightly delayed. Of note, *Scedosporium* conidia cell wall displays a smooth surface,  
452 devoid of any particular organization, conversely to that of *A. fumigatus* which is totally covered by rodlets (39).  
453 This feature confers to dormant conidia a high hydrophobicity and a high electronegative surface charge,  
454 accounting for conidia ability to bind host extracellular matrix, such as laminin and fibronectin (40–42).  
455 Consequently, although not null, the hydrophobic adhesion forces recorded on the conidial surface of *S. boydii*  
456 were shown to be lower than those reported in *A. fumigatus* (18,39). This surface differences might explain the  
457 lower phagocytosis rate of *S. apiospermum* compared to *A. fumigatus*, in the very early interaction, before  
458 conidia-hyphae transition occurs.

459 Secondly, *Scedosporium* and *Aspergillus* cell wall display some noticeable differences in terms of polysaccharide  
460 cell wall composition. Although not deeply elucidated, the few studies focusing on *Scedosporium* cell wall  
461 determinants involved in the recognition by innate cells, revealed the role of specific components, which are  
462 not described in *A. fumigatus* (17). In particular, peptidorhamnomannans are involved in the adhesion of  
463 various *Scedosporium* species to epithelial cells, and in the phagocytosis and TNF production by macrophage  
464 through TLR4 activation (28,43). In addition, there is a lot of interest in the study of *Scedosporium*  
465 glucosylceramides, considered as important PAMPs interacting with macrophages (44,45). The pathways  
466 highlighted in our study pave the way for future work aiming at elucidating *Scedosporium* cell wall components  
467 responsible for such an intense inflammatory response.

468 Lastly, it is tricky to associate the high inflammatory macrophage response triggered by *S. apiospermum*, to  
469 pathophysiology during human infection. On one hand, we can hypothesize that this immune response is  
470 associated with enhanced fungicide mechanisms against *S. apiospermum*, as shown by its lower resistance to  
471 macrophage killing, compared to *A. fumigatus*. This *a priori* facilitated clearance suggests that it may contribute  
472 to a lower ability of *S. apiospermum* to persist within immunocompetent hosts and could explain the low  
473 prevalence of *Scedosporium* infections. On the other hand, such an excessive inflammatory response could be  
474 deleterious for the host in the long term, especially in the specific context of cystic fibrosis, where chronic  
475 microbe-related inflammation contributes to lung damages (46).

476 To conclude, through transcriptomic and phenotypic approaches, we showed that *S. apiospermum* tailored a  
477 stronger and quicker inflammatory macrophage response, which could mediate a facilitated clearance,  
478 compared to *A. fumigatus*.

479

480

481 **Acknowledgement:** The ATCF research grant of Prof. J-P Gangneux (DRCI CHU de Rennes) was the financial  
482 support of the transcriptomic analysis. We also thank the Institut de Parasitologie de l'Ouest (IPO, Rennes) for  
483 the grant to Dr H Guegan.

484

## 485 **Supplementary data**

486 **Table S1. Nucleotide sequence primers used for RT-qPCR in human macrophages.**

Gene target	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
ACTB	CGAGATCATGTTTGAGACCT	GGCATACCCCTCGTAGAT
GAPDH	ATGACATCAAGAAGGTGGTG	CATACCAGGAAATGAGCTTG
IFN- $\gamma$	TGTCCAACGCAAAGCAATAC	ATATTGCAGGCAGGACAACC
TN-F $\alpha$	AACCTCCTCTCTGCCATCAA	ATGTTTCGTCCTCCTCACAGG
IL-6	AGTACCCCCAGGAGAAGAT	ATCTTTGGAAGGTTTCAGGTT
IL-1 $\beta$	TCATGCTCTGTTCTTGGGAAT	GCTTGTCTGCTTTTCTGTTC
STAT4	GGATTGAAAATCAAGACTGG	GAAATAACCACAGCTACATGC
CXCL9	TGTCTAAACCCAGATTCAGC	GTCTTCTTTTGACGAGAACG
CCL15	CCAGTTCATAAATGATGCAG	GCTGCTCGTTTCAAATAAC
CCR2	GGCCTGAGTAACTGTGAAAG	CGAGGAGTCCTTGTGTAGTC
SOC3	GCTCCAAGAGCGAGTACC	CTGAGCGTGAAGAAGTGG

487

488

489 **Table S2. List of genes differentially expressed with  $|\log_2FC| > 2$  in Sap-infected macrophages compared to**  
 490 **Afu-infected macrophages, 4h and 12h post-infection.**

Gene symbol	EntrezID	Gene name	Log <sub>2</sub> FC	FDR
<b>4h</b>				
NA	NA	NA	3,615979772	9,7713E-03
IL12B	3593	interleukin 12B	3,474519546	1,0081E-03
CCL15	6359	C-C motif chemokine ligand 15	3,397041087	6,7596E-04
CSF2	1437	colony stimulating factor 2	2,995533821	1,2607E-13
HHLA2	11148	HERV-H LTR-associating 2	2,982991889	1,5564E-03
C2CD4B	388125	C2 calcium dependent domain containing 4B	2,822515759	1,0374E-03
NA	NA	NA	2,696077301	7,1240E-04
SHF	90525	Src homology 2 domain containing F	2,621231596	1,5683E-07
IL6	3569	interleukin 6	2,597115641	4,0563E-08
IL36G	56300	interleukin 36 gamma	2,539323017	3,1051E-07
C2CD4A	145741	C2 calcium dependent domain containing 4A	2,536819841	3,6509E-02
PTGS2	5743	prostaglandin-endoperoxide synthase 2	2,50294111	1,0730E-15
CSF3	1440	colony stimulating factor 3	2,486916793	5,4509E-07
IL1B	3553	interleukin 1 beta	2,319588337	7,3563E-08
RN7SL124P	106480955	RNA, 7SL, cytoplasmic 124, pseudogene	2,255663769	1,8383E-02
IL10	3586	interleukin 10	2,220330931	1,1588E-03
SERPINB2	5055	serpin family B member 2	2,217195465	2,1187E-06
EREG	2069	epiregulin	2,161912859	1,8966E-13
MACC1-DT	100506098	MACC1 divergent transcript	2,123239493	1,3793E-02
NR4A2	4929	nuclear receptor subfamily 4 group A member 2	2,101521576	5,0988E-08
UPB1	51733	beta-ureidopropionase 1	2,045897752	2,0125E-03
ADORA2A	135	adenosine A2a receptor	2,005383369	1,5570E-04
IER3	8870	immediate early response 3	2,001262757	1,0511E-08
CXCL9	4283	C-X-C motif chemokine ligand 9	-3,130474419	1,1010E-05
CXCL10	3627	C-X-C motif chemokine ligand 10	-2,573159468	3,3086E-03
BATF2	116071	basic leucine zipper ATF-like transcription factor 2	-2,139447643	4,9695E-04
CCL8	6355	C-C motif chemokine ligand 8	-2,062748476	6,7030E-03
<b>12h</b>				
IGFBP4	3487	insulin like growth factor binding protein 4	3,659827772	3,6783E-07
NA	NA	NA	3,597599163	3,4890E-07
IL36G	56300	interleukin 36 gamma	3,14324156	2,2402E-10
HSPA1B	3304	heat shock protein family A (Hsp70) member 1B	2,894631431	2,5359E-13
SEMA3F	6405	semaphorin 3F	2,850735327	4,2856E-08
TM4SF1	4071	transmembrane 4 L six family member 1	2,682821042	1,3260E-04
IL12B	3593	interleukin 12B	2,661134722	1,2666E-03
PDCD1	5133	programmed cell death 1	2,58773484	3,4976E-02
ATP1B2	482	ATPase Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> transporting subunit beta 2	2,48605068	2,2755E-06
THBD	7056	thrombomodulin	2,390763262	2,3561E-11
CD300E	342510	CD300e molecule	2,360336557	7,6056E-08
MMP1	4312	matrix metalloproteinase 1	2,32499619	5,4831E-10
DUSP4	1846	dual specificity phosphatase 4	2,28399713	2,3371E-15
CCL15	6359	C-C motif chemokine ligand 15	2,201899119	4,0701E-03
LINC00659	100652730	long intergenic non-protein coding RNA 659	2,157625659	2,5506E-06
ADA	100	adenosine deaminase	2,120694609	3,8291E-08
LOXL2	4017	lysyl oxidase like 2	2,111804062	9,7290E-07
DUSP15	128853	dual specificity phosphatase 15	2,060833669	7,1566E-04
C2CD4B	388125	C2 calcium dependent domain containing 4B	2,044172222	3,8374E-05
CCL1	6346	C-C motif chemokine ligand 1	2,010707968	1,4541E-02
CXCL9	4283	C-X-C motif chemokine ligand 9	-3,745486246	5,4935E-10
FRMD7	90167	FERM domain containing 7	-3,272028896	1,5127E-06
NA	NA	NA	-3,12075105	4,7662E-05
CXCL10	3627	C-X-C motif chemokine ligand 10	-3,097327477	1,2410E-04

492 Continuation of Table S2

EGR4	1961	early growth response 4	-3,083346969	1,3330E-08
LINC02015	102724550	long intergenic non-protein coding RNA 2015	-2,803877347	2,3861E-05
ARHGAP31-AS1	100874246	ARHGAP31 antisense RNA 1	-2,742747557	3,2490E-06
NA	NA	NA	-2,72531489	4,1850E-02
H1-4	3008	H1.4 linker histone, cluster member	-2,627323954	3,6442E-06
NA	NA	NA	-2,456860766	6,6611E-05
HAPLN3	145864	hyaluronan and proteoglycan link protein 3	-2,452625313	6,7369E-11
C12orf50	160419	chromosome 12 open reading frame 50	-2,444439477	9,0801E-06
GBP1P1	400759	guanylate binding protein 1 pseudogene 1	-2,434542798	1,8971E-05
SECTM1	6398	secreted and transmembrane 1	-2,331069684	5,7361E-10
GRIN3A	116443	glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 3A	-2,305839672	8,1639E-04
NA	NA	NA	-2,27991136	2,9183E-05
ETV7	51513	ETS variant transcription factor 7	-2,277199573	7,7379E-09
CAMK1G	57172	calcium/calmodulin dependent protein kinase IG	-2,261408635	1,8550E-03
CSPG4BP	727930	chondroitin sulfate proteoglycan family member 4B, pseudogene	-2,24328696	3,2014E-07
NA	NA	NA	-2,239271345	1,4739E-05
LINC02528	105378020	long intergenic non-protein coding RNA 2528	-2,22357937	7,4276E-04
KIF25-AS1	100505879	KIF25 antisense RNA 1	-2,218271315	7,1181E-04
GBP5	115362	guanylate binding protein 5	-2,165170262	3,8867E-09
PRECSIT	283487	p53 regulated carcinoma associated Stat3 activating long intergenic non-protein coding transcript	-2,136557379	5,4308E-08
CIITA	4261	class II major histocompatibility complex transactivator	-2,098592007	4,6876E-14
FCGR1CP	100132417	Fc gamma receptor 1c, pseudogene	-2,088519681	3,0509E-09
NA	NA	NA	-2,075685623	6,3551E-05
LINC01215	101929623	long intergenic non-protein coding RNA 1215	-2,070214262	3,4398E-10
CCL8	6355	C-C motif chemokine ligand 8	-2,036568423	4,0944E-03
ISL2	64843	ISL LIM homeobox 2	-2,024151969	4,7719E-04
LOC124908063	124908063	uncharacterized LOC124908063	-2,013316866	4,9205E-03

493

494



## 495 References

- 496 1. Ramirez-Garcia A, Pellon A, Rementeria A, Buldain I, Barreto-Bergter E, Rollin-Pinheiro R, et al.  
497 *Scedosporium* and *Lomentospora*: an updated overview of underrated opportunists. *Med Mycol.*  
498 2018;56(1):S102-25.
- 499 2. Sedlacek L, Graf B, Schwarz C, Albert F, Peter S, Würstl B, et al. Prevalence of *Scedosporium* species and  
500 *Lomentospora prolificans* in patients with cystic fibrosis in a multicenter trial by use of a selective medium.  
501 *J Cyst Fibros Off J Eur Cyst Fibros Soc.* 2015;14(2):237-41.
- 502 3. Cimon B, Carrère J, Vinatier JF, Chazalette JP, Chabasse D, Bouchara JP. Clinical Significance of  
503 *Scedosporium apiospermum* in Patients with Cystic Fibrosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*  
504 2000;19(1):53-6.
- 505 4. Blyth CC, Middleton PG, Harun A, Sorrell TC, Meyer W, Chen SCA. Clinical associations and prevalence of  
506 *Scedosporium* spp. in Australian cystic fibrosis patients: identification of novel risk factors? *Med Mycol.*  
507 2010;48(Suppl 1):S37-44.
- 508 5. Cortez KJ, Roilides E, Quiroz-Telles F, Meletiadiis J, Antachopoulos C, Knudsen T, et al. Infections caused by  
509 *Scedosporium* spp. *Clin Microbiol Rev.* 2008;21(1):157-97.
- 510 6. Cornillet A, Camus C, Nimubona S, Gandemer V, Tattevin P, Belleguic C, et al. Comparison of  
511 Epidemiological, Clinical, and Biological Features of Invasive Aspergillosis in Neutropenic and Non  
512 neutropenic Patients : A 6-Year Survey. *Clin Infect Dis.* 2006;43(5):577-84.
- 513 7. Bertuzzi M, Hayes GE, Icheoku UJ, van Rhijn N, Denning DW, Osherov N, et al. Anti-*Aspergillus* Activities  
514 of the Respiratory Epithelium in Health and Disease. *J Fungi.* 2018;4(1).
- 515 8. Latgé JP, Chamilos G. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis in 2019. *Clin Microbiol Rev.*  
516 2019;33(1):e00140-18.
- 517 9. Romani L. Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(4):275-88.
- 518 10. Ibrahim-Granet O, Philippe B, Boleti H, Boisvieux-Ulrich E, Grenet D, Stern M, et al. Phagocytosis and  
519 Intracellular Fate of *Aspergillus fumigatus* Conidia in Alveolar Macrophages. *Infect Immun.*  
520 2003;71(2):891-903.
- 521 11. Goyal S, Castrillón-Betancur JC, Klaile E, Slevogt H. The Interaction of Human Pathogenic Fungi With C-  
522 Type Lectin Receptors. *Front Immunol.* 2018;9:1261.
- 523 12. Beauvais A, Latgé JP. Special Issue: Fungal Cell Wall. *J Fungi.* 2018;4(3):91.
- 524 13. Rollin-Pinheiro R, Xisto MID da S, Rochetti VP, Barreto-Bergter E. *Scedosporium* Cell Wall: From  
525 Carbohydrate-Containing Structures to Host-Pathogen Interactions. *Mycopathologia.*  
526 2020;185(6):931-46.
- 527 14. Nosanchuk JD, Casadevall A. The contribution of melanin to microbial pathogenesis. *Cell Microbiol.*  
528 2003;5(4):203-23.
- 529 15. van de Veerdonk FL, Gresnigt MS, Romani L, Netea MG, Latgé JP. *Aspergillus fumigatus* morphology and  
530 dynamic host interactions. *Nat Rev Microbiol.* 2017;15(11):661-74.
- 531 16. Mello TP de, Aor AC, Oliveira SSC de, Branquinha MH, Santos ALS. Conidial germination in *Scedosporium*  
532 *apiospermum*, *S. aurantiacum*, *S. minutisporum* and *Lomentospora prolificans*: influence of growth  
533 conditions and antifungal susceptibility profiles. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2016;0(7):0.
- 534 17. Latgé JP, Beauvais A, Chamilos G. The Cell Wall of the Human Fungal Pathogen *Aspergillus fumigatus*:  
535 Biosynthesis, Organization, Immune Response, and Virulence. *Annu Rev Microbiol.* 2017;71:99-116.
- 536 18. Ghamrawi S, Gastebois A, Zykwincka A, Vandeputte P, Marot A, Mabileau G, et al. A Multifaceted Study  
537 of *Scedosporium boydii* Cell Wall Changes during Germination and Identification of GPI-Anchored Proteins.  
538 *PLoS One.* 2015;10(6):e0128680.

- 539 19. Gersuk GM, Underhill DM, Zhu L, Marr KA. Dectin-1 and TLRs permit macrophages to distinguish between  
540 different *Aspergillus fumigatus* cellular states. *J Immunol.* 2006;176(6):3717-24.
- 541 20. Ghamrawi S, Rénier G, Saulnier P, Cuenot S, Zykwinska A, Dutilh BE, et al. Cell Wall Modifications during  
542 Conidial Maturation of the Human Pathogenic Fungus *Pseudallescheria boydii*. *PLoS One.*  
543 2014;9(6):e100290.
- 544 21. Buldain I, Martin-Souto L, Antoran A, Areitio M, Aparicio-Fernandez L, Rementeria A, et al. The Host  
545 Immune Response to *Scedosporium/Lomentospora*. *J Fungi.* 2021;7(2):75.
- 546 22. Nierman WC, Pain A, Anderson MJ, Wortman JR, Kim HS, Arroyo J, et al. Genomic sequence of the  
547 pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *Nature.* 2005;438(7071):1151-6.
- 548 23. Vandeputte P, Ghamrawi S, Rechenmann M, Iltis A, Giraud S, Fleury M, et al. Draft Genome Sequence of  
549 the Pathogenic Fungus *Scedosporium apiospermum*. *Genome Announc.* 2014;2(5):e00988-14.
- 550 24. Gibson JF, Johnston SA. Immunity to *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* during cryptococcosis. *Fungal*  
551 *Genet Biol.* 2015;78:76-86.
- 552 25. Richardson JP, Moyes DL. Adaptive immune responses to *Candida albicans* infection. *Virulence.*  
553 2015;6(4):327-37.
- 554 26. Bojang E, Ghuman H, Kumwenda P, Hall RA. Immune Sensing of *Candida albicans*. *J Fungi.* 2021;7(2):119.
- 555 27. Briard B, Karki R, Malireddi RKS, Bhattacharya A, Place DE, Mavuluri J, et al. Fungal ligands released by  
556 innate immune effectors promote inflammasome activation during *Aspergillus fumigatus* infection. *Nat*  
557 *Microbiol.* 2019;4(2):316-27.
- 558 28. Figueiredo RT, Fernandez PL, Dutra FF, González Y, Lopes LC, Bittencourt VCB, et al. TLR4 recognizes  
559 *Pseudallescheria boydii* conidia and purified rhamnomannans. *J Biol Chem.* 2010;285(52):40714-23.
- 560 29. Figari I, Mori N, Palladino MJ. Regulation of neutrophil migration and superoxide production by  
561 recombinant tumor necrosis factors- $\alpha$  and - $\beta$ : comparison to recombinant interferon- $\gamma$  and  
562 interleukin-1  $\alpha$ . *Blood.* 1987;70(4):979-84.
- 563 30. Saïd-Sadier N, Padilla E, Langsley G, Ojcius DM. *Aspergillus fumigatus* stimulates the NLRP3 inflammasome  
564 through a pathway requiring ROS production and the Syk tyrosine kinase. *PLoS One.* 2010;5(4):e10008.
- 565 31. Ketelut-Carneiro N, Silva GK, Rocha FA, Milanezi CM, Cavalcanti-Neto FF, Zamboni DS, et al. IL-18 Triggered  
566 by the Nlrp3 Inflammasome Induces Host Innate Resistance in a Pulmonary Model of Fungal Infection. *J*  
567 *Immunol.* 2015;194(9):4507-17.
- 568 32. van de Veerdonk FL, Netea MG, Dinarello CA, Joosten LAB. Inflammasome activation and IL-1 $\beta$  and IL-18  
569 processing during infection. *Trends Immunol.* 2011;32(3):110-6.
- 570 33. Zelante T, De Luca A, D' Angelo C, Moretti S, Romani L. IL-17/Th17 in anti-fungal immunity: What's new?  
571 *Eur J Immunol.* 2009;39(3):645-8.
- 572 34. Mezger M, Steffens M, Beyer M, Manger C, Eberle J, Toliat MR, et al. Polymorphisms in the chemokine (C-  
573 X-C motif) ligand 10 are associated with invasive aspergillosis after allogeneic stem-cell transplantation  
574 and influence CXCL10 expression in monocyte-derived dendritic cells. *Blood.* 2008;111(2):534-6.
- 575 35. Mello TP, Oliveira SSC, Frases S, Branquinha MH, Santos ALS. Surface properties, adhesion and biofilm  
576 formation on different surfaces by *Scedosporium* spp. and *Lomentospora prolificans*. *Biofouling.*  
577 2018;34(7):800-14.
- 578 36. Canepa A, de Meirelles JV, Rollin-Pinheiro R, Xisto MID da S, Liporagi-Lopes LC, de Souza L, et al.  
579 Structural Differences Influence Biological Properties of Glucosylceramides from Clinical and  
580 Environmental Isolates of *Scedosporium aurantiacum* and *Pseudallescheria minutispora*. *J Fungi.*  
581 2019;5(3):62.
- 582 37. Warris A, Netea MG, Verweij PE, Gaustad P, Kullberg BJ, Weemaes CMR, et al. Cytokine responses and  
583 regulation of interferon- $\gamma$  release by human mononuclear cells to *Aspergillus fumigatus* and other  
584 filamentous fungi. *Med Mycol.* 2005;43(7):613-21.

- 585 38. Tronchin G, Pihet M, Lopes-Bezerra LM, Bouchara JP. Adherence mechanisms in human pathogenic fungi.  
586 Med Mycol. 2008;46(8):749-72.
- 587 39. Dague E, Alsteens D, Latgé JP, Dufrêne YF. High-Resolution Cell Surface Dynamics of Germinating  
588 *Aspergillus fumigatus* Conidia. Biophys J. 2008;94(2):656-60.
- 589 40. Thau N, Monod M, Crestani B, Rolland C, Tronchin G, Latgé JP, et al. Rodletless mutants of *Aspergillus*  
590 *fumigatus*. Infect Immun. 1994;62(10):4380-8.
- 591 41. Bouchara JP, Sanchez M, Esnault K, Tronchin G. Interactions between *Aspergillus fumigatus* and host  
592 matrix proteins. Contrib Microbiol. 1999;2:167-81.
- 593 42. Tronchin G, Esnault K, Renier G, Filmon R, Chabasse D, Bouchara JP. Expression and identification of a  
594 laminin-binding protein in *Aspergillus fumigatus* conidia. Infect Immun. janv 1997;65(1):9-15.
- 595 43. de Meirelles JV, Xisto MID da S, Rollin-Pinheiro R, Serrato RV, Haido RMT, Barreto-Bergter E.  
596 Peptidorhamanomannan: A surface fungal glycoconjugate from *Scedosporium aurantiacum* and  
597 *Scedosporium minutisporum* and its recognition by macrophages. Med Mycol. 2021;59(5):441-52.
- 598 44. Rochetti VP, Rollin-Pinheiro R, de Oliveira EB, Xisto MID da S, Barreto-Bergter E. Glucosylceramide Plays a  
599 Role in Fungal Germination, Lipid Raft Organization and Biofilm Adhesion of the Pathogenic Fungus  
600 *Scedosporium aurantiacum*. J Fungi. 2020;6(4):E345.
- 601 45. Rollin-Pinheiro R, Liporagi-Lopes LC, de Meirelles JV, Souza LM de, Barreto-Bergter E. Characterization of  
602 *Scedosporium apiospermum* glucosylceramides and their involvement in fungal development and  
603 macrophage functions. PloS One. 2014;9(5):e98149.
- 604 46. Poore TS, Hong G, Zemanick ET. Fungal Infection and Inflammation in Cystic Fibrosis. Pathogens.  
605 2021;10(5):618.

606

607

## Discussion

Cette étude originale nous ont permis de montrer que la réponse macrophagique est plus intense et plus rapide en réponse à *S. apiospermum*, comparativement à *A. fumigatus*, via une approche transcriptomique et cytokinique. Ces données seront confortées par des analyses protéiques par western-blot pour confirmer la suractivation des voies de l'inflammation, en ciblant notamment la voie du NF- $\kappa$ B. Par ailleurs, la prudence reste nécessaire quant à l'extrapolation de ces données générées *in vitro*, à la physiopathologie de l'infection fongique *in vivo*, et encore davantage dans le contexte de mucoviscidose, où les cellules de l'immunité innée présentent à l'état basal une réponse inflammatoire exacerbée (109,112). Ainsi, l'étude de la réponse de lignées épithéliales bronchiques  $\Delta$ F508/ $\Delta$ F508 (CFBE410-) à l'infection par *A. fumigatus* révèle des taux d'IL-6 et d'IL-8 plus élevés que les taux produits par des cellules épithéliales sauvages (255). En parallèle, l'internalisation et la destruction de conidies d'*A. fumigatus* est affectée dans une étude menée sur la lignée épithéliale  $\Delta$ F508/W1282X comparativement à la lignée sauvage (256). De même, les macrophages humains de patients atteints de mucoviscidose présentent un état inflammatoire exacerbé en cas de stimulation par *A. fumigatus* ou *P. aeruginosa* (257) et le CD14 soluble serait un acteur majeur de la réponse pro-inflammatoire via le complexe membranaire TLR4/CD14, NF- $\kappa$ B et l'inflamasome (258) Sur ce même modèle de macrophages humains de patients atteints de mucoviscidose, l'état inflammatoire exacerbé affecte également la phagocytose et donc la clairance des microorganismes (259).

Il existe d'autre part des facteurs de variabilité propres au champignon qui influencent la réponse inflammatoire suscitée. Tout d'abord, les champignons filamenteux pathogènes présentent différentes phases de développement, dont les conidies et les hyphes, et la transition morphologique promeut une réponse distincte à ces différentes structures. Dans le processus de filamentation et d'invasion, la germination des conidies s'accompagne de changements majeurs de la structure pariétale, intéressant des molécules de surfaces et des constituants internes. Cela explique que le potentiel pro-inflammatoire rapporté pour les hyphes diffère de celui des conidies. Bien décrit chez *A. fumigatus*, le gonflement et la germination des conidies s'accompagnent de la disparition de la couche d'hydrophobines et de mélanine, à l'origine d'une réduction de l'hydrophobicité des conidies et une d'augmentation des propriétés d'adhérence des hyphes. Ce changement est initialement dû à une exposition accrue des  $\alpha$ -glucanes à la surface des conidies et à l'apparition progressive de galactosaminogalactane dans la paroi (260,261). La formation des hyphes est donc associée à une diminution de la reconnaissance et un « switch » vers une réponse anti-inflammatoire voire des mécanismes d'évasion. De façon similaire, chez *S. boydii*, Figueiredo et coll. ont montré la reconnaissance différentielle des conidies et des hyphes préalablement inactivés par des macrophages murins dérivés de moelle osseuse. En particulier, les conidies de *S. boydii* stimulaient la production d'IL-10 et de CXCL10 de façon dépendante de l'activation du TLR4, alors que les hyphes induisaient davantage la production d'IL-6 et de TNF, et de façon indépendante des TLR2 et TLR4 (72). Les données de la littérature associées à celles obtenues dans notre travail ouvrent ainsi des perspectives passionnantes sur l'interprétation des différentes réponses transcriptomiques, protéiques voire

métabolomiques des macrophages en regard i) des cinétiques de germination d'*A. fumigatus* et *S. apiospermum*, conditionnées par des paramètres nutritionnels environnementaux pouvant conduire jusqu'à un asynchronisme, comme récemment suggéré chez *A. fumigatus* (262), et ii) des modifications de la composition pariétale qui s'opèrent durant la germination de *S. apiospermum*.

Par ailleurs, s'il est bien reconnu que certaines souches au sein d'une espèce bactérienne sont dotées de propriétés de virulence variable, ce phénomène est, en revanche, bien moins connu chez les champignons. Or, certains travaux menés sur *A. fumigatus*, ont souligné une variabilité significative de la réponse inflammatoire induite par différentes souches. En particulier, Rizzetto et coll. ont identifié, au sein d'une collection de souches d'*A. fumigatus* sauvages, des souches « inflammatoires » et « hyperinflammatoires » sur la base de la réponse inflammatoire observée *in vitro* sur cellules dendritiques et macrophages issus de PBMCs (production d'IL-1 $\beta$  et d'IL-10 notamment), et *in vivo* sur modèle murin (263). De même, dans un modèle murin, les différences de virulence mises en évidence entre 8 isolats de *S. aurantiacum* ont été associées une importante variabilité génétique inter-souche (264). Il serait donc pertinent d'évaluer la réponse de macrophages en utilisant d'autres souches de *S. apiospermum* afin de déterminer si l'inflammation intense suscitée par *S. apiospermum*, est conservée quelle que soit la souche étudiée.

Enfin, l'analyse transcriptomique de cellules en réponse à l'infection par *S. apiospermum* par rapport aux macrophages non infectés a mis en évidence un enrichissement de *pathways* relatives à des voies régulatrices du cycle cellulaire, en particulier de sénescence et de mort cellulaire (apoptose et ferroptose), et cela de façon précoce, dès 4h. Ce phénomène n'était alors pas retrouvé en réponse à l'infection par *A. fumigatus*. De plus, l'analyse différentielle des gènes exprimés par les macrophages infectés par *S. apiospermum* par rapport à *A. fumigatus* a montré la sous-expression d'un panel de gènes impliqués notamment dans la réplication d'ADN et la prolifération cellulaire à 4h et à 12h. Cette observation suggère une orientation préférentielle du métabolisme vers la mort cellulaire, une hypothèse à démontrer à l'avenir. L'activation de voies de mort qui est désormais reconnue comme partie intégrante de la réponse immune innée de l'hôte, contribue à l'élimination de la niche infectée, à l'initiation de la réponse inflammatoire et au recrutement de cellules immunes effectrices (265). Chez *A. fumigatus* spécifiquement, un type de mort cellulaire programmée est déclenché par la germination de conidies intracellulaires, qui s'accompagne du transfert latéral de conidies entre macrophages et constitue un moyen de contenir l'infection (266). Il est donc probable que l'impact de l'infection par *S. apiospermum* sur les voies de mort cellulaire qu'il conviendrait d'explorer, soit un phénomène concomitant de l'intense et précoce réponse inflammatoire macrophagique.

A noter que l'internalisation des conidies de *S. apiospermum* pourrait aussi induire un stress mécanique, délétère à la cellule. Les conidies intracellulaires de *Lomentospora/Scedosporium* auraient une propension à échapper aux mécanismes fongicides de cellules immunitaires, en « perçant » la membrane plasmique de ces cellules (60). Ce phénomène a notamment été soulevé par Aor et coll. qui ont étudié l'interaction de conidies

de *S. apiospermum* avec différentes lignées cellulaires en microscopie électronique à balayage (64). Et même si les conidies sont phagocytées par les macrophages murins (RAW), certaines seraient capable de germer, en formant des projections semblables à des tubes germinatifs, susceptibles de lyser la membrane plasmique. En revanche, les auteurs n'ont pu exclure que cet évènement résulte de l'endocytose de conidies préalablement germées. De plus, les cavités et trous observés dans les régions membranaires en contact de la conidie suggèrent un processus de cavitation actif affectant la surface cellulaire, qui interviendrait précocement, dès 4h d'infection. Les mécanismes exacts d'internalisation des conidies de *S. apiospermum*, ainsi que l'impact de l'infection sur la viabilité de la cellule-hôte sont encore inconnus et justifieraient davantage d'investigations.

### III. Etude du rôle de PIG1 et de la DHN-mélanine chez *Scedosporium apiospermum*

L'objectif de cette troisième partie expérimentale est d'étudier le rôle du facteur de transcription PIG1 et de la DHN-mélanine dans la paroi de *S. apiospermum*, comme potentiels facteurs de virulence.

#### Contexte

*Scedosporium apiospermum* est un champignon filamenteux environnemental responsable d'infections opportunistes, qui surviennent aussi bien chez les individus immunocompétents - notamment dans le contexte de la mucoviscidose- que chez les individus immunodéprimés. La capacité des champignons à s'adapter, se développer chez l'Homme en échappant à la vigilance des acteurs immunitaires, implique des propriétés intrinsèques de virulence. Très étudié chez *A. fumigatus*, le rôle de la paroi, l'enveloppe externe des spores et filaments fongiques, est essentiel dans l'interaction étroite et précoce avec les cellules de l'hôte.

La composition pariétale des spores de *Scedosporium* n'est que plus partiellement élucidée, et inclut un maillage polysaccharidique surmonté d'une couche de mélanine (119). Depuis plusieurs décennies, le rôle de ce pigment hydrophobe dans la virulence des champignons a été exploré chez des phytopathogènes, comme *Magnaporthe* spp, responsable de la destruction de cultures de riz et de blé. Par analogie à la mélanine présente chez les mammifères, la présence de mélanine, dont la forme la plus répandue est la dihydroxynaphtalène (DHN)-mélanine, confère à ces champignons une capacité à résister à différentes agressions environnementales et milieux défavorables : rayonnements ultraviolets, températures extrêmes, etc... Ces champignons ont également la particularité de produire des organes d'invasion spécifiques, les appressoria, dont la rigidité est associée à la mélanisation de leur paroi. Les enzymes assurant la biosynthèse de la DHN-mélanine ainsi que certains facteurs de transcription intervenant dans leur régulation ont été identifiés, comme par exemple PIG1 (Pigment of *Magnaporthe* 1) initialement décrit chez *Magnaporthe oryzae* (175). Des gènes orthologues comme *CMR1* chez *Colletotrichum* (175,178), et *AMR1* chez *Alternaria* (179) sont également connus. Différentes études ont révélé que si la délétion de ce facteur de transcription n'avait généralement pas d'impact sur la croissance fongique, la capacité des champignons transformés à survivre en présence de stress abiotiques était inconstamment affectée. Par exemple, la croissance de mutants  $\Delta$ *CMR1* *Colletotrichum gloeosporioides* en présence d' $H_2O_2$  était réduite par rapport à la souche parentale, alors que celle d'*Alternaria brassicola*  $\Delta$ *AMR1* restait inchangée (173,176). Le rôle de ce facteur de transcription dans la virulence des champignons est variable, en fonction du champignon étudié et des caractéristiques morphologiques.

Grâce au séquençage complet et à l'annotation du génome de *Scedosporium apiospermum* par l'équipe IRF (179), un gène orthologue à PIG1 de *Magnaporthe oryzae* a pu être identifié à proximité de gènes prédits pour être impliqués dans la synthèse de mélanine.

Par ailleurs, un précédent travail de thèse mené au sein de l'équipe d'Angers s'est intéressé à la mise au point de la technologie CRISPR-CAS9 pour l'édition du génome de *S. apiospermum*, en ciblant la délétion du gène *PIG1*, aboutissant à l'obtention de 3 transformants non pigmentés.

Dans ce contexte, mon travail a porté sur la caractérisation phénotypique et transcriptomique des mutants  $\Delta$ *PIG1*, afin d'appréhender le rôle de ce facteur de transcription et de la DHN-mélanine chez *S. apiospermum*.

*Ce travail a fait l'objet d'un poster présenté lors du congrès international de Mycologie Médicale (TIMM) à Aberdeen en 2021, et d'une communication orale en anglais dans le cadre des groupes de travail ECMM-SHAM « Scedosporium/Lomentospora infections » et « Fungal respiratory infections in Cystic Fibrosis » en Juin 2022, et du manuscrit ci-dessous.*

## Article

### **Deciphering the role of PIG1 and DHN-melanin in *Scedosporium apiospermum* conidia**

Hélène Guegan, Wilfried Poirier, Kevin Ravenel, Sarah Dion, Aymeric Delabarre, Dimitri Desvillechabrol, Xavier Pinson, Odile Sergent, Isabelle Gallais, Jean-Pierre Gangneux, Sandrine Giraud et Amandine Gastebois.

Manuscrit soumis pour publication dans *Journal of Fungi*



1 Article

## 2 Deciphering the role of PIG1 and DHN-melanin in 3 *Scedosporium apiospermum* conidia

4 Hélène Guegan<sup>1\*</sup>, Wilfried Poirier<sup>2</sup>, Kevin Ravenel<sup>2</sup>, Sarah Dion<sup>3</sup>, Aymeric Delabarre<sup>3</sup>, Dimitri  
5 Desvillechabrol<sup>4</sup>, Xavier Pinson<sup>5</sup>, Odile Sergent<sup>3</sup>, Isabelle Gallais<sup>3</sup>, Jean-Pierre Gangneux<sup>1</sup>, Sandrine  
6 Giraud<sup>2</sup> and Amandine Gastebois<sup>2</sup>.

7 <sup>1</sup> Univ Rennes, CHU Rennes, Inserm, EHESP, IRSET (Institut de Recherche en Santé Environnement et Travail) - UMR\_S  
8 1085, Rennes, France

9 <sup>2</sup> Univ Angers, Univ Brest, IRF, SFR ICAT, 49000, Angers, France

10 <sup>3</sup> Univ Rennes, Inserm, EHESP, IRSET (Institut de Recherche en Santé Environnement et Travail) - UMR\_S 1085,  
11 Rennes, France

12 <sup>4</sup> Plate-forme Technologique Biomix – Centre de Ressources et Recherches Technologiques  
13 (C2RT), Institut Pasteur, F-75015 Paris, France

14 <sup>5</sup> Univ Rennes, CNRS, Inserm, Biosit UAR 3480 US\_S 018, MRic Core Facility, F-35000 Rennes, France

15  
16 \* Correspondence: helene.guegan@univ-rennes1.fr; Tel.: +33223233496

17 **Abstract:** *Scedosporium apiospermum* is a saprophytic filamentous fungus involved in human infections,  
18 of which the virulence factors that contribute to pathogenesis are still poorly characterized. In particular,  
19 little is known about the specific role of dihydroxynaphtalene (DHN)-melanin, located on the external layer  
20 of the conidia cell wall. We previously identified a transcription factor, PIG1, which may be involved in  
21 DHN-melanin biosynthesis. To elucidate the role of PIG1 and DHN-melanin in *S. apiospermum*, a CRISPR-  
22 Cas9-mediated *PIG1* deletion was carried out from two parental strains to evaluate its impact on melanin  
23 biosynthesis, conidia cell-wall assembly, and resistance to stress, including the ability to survive  
24 macrophage engulfment. Albino mutants showed a disorganized cell wall, resulting in a lower survival rate  
25 when exposed to oxidizing conditions, ultraviolet light, or high temperature. The absence of melanin  
26 increased the exposure of antigenic patterns on the conidia surface, facilitating recognition and killing by  
27 macrophages. PIG1 regulates *S. apiospermum* cell-wall melanization, which is involved in the survival to  
28 environmental injuries, the host immune response and might participate in virulence. Moreover, a  
29 transcriptomic analysis was performed to explain the observed aberrant septate conidia morphology and  
30 found differentially expressed genes, underlining the pleiotropic function of PIG1.

31 **Keywords:** *Scedosporium apiospermum*; DHN-melanin; cell wall; PIG1; CRISPR-Cas9; RNA-seq  
32

## 34 1. Introduction

35 *Scedosporium* species are filamentous fungi widely distributed throughout the environment,  
36 especially in soil, where they live as saprophytes. However, they can also behave as opportunistic  
37 pathogens. *Scedosporium* sp. are involved in a large range of human diseases, from chronic localized  
38 infections to immuno-allergic diseases in immunocompetent hosts and severe invasive infections in  
39 immunocompromised patients (1). *Scedosporium* is also the second most prevalent mold after *Aspergillus*  
40 involved in airway colonization of cystic fibrosis (CF) patients, with a prevalence ranging from 3 to 25%  
41 depending on the geographical area and technical procedures used for mycological culture (2–4). In  
42 addition, there has been an increasing number of reports on the involvement of  
43 *Scedosporium/Lomentospora* in invasive life-threatening infections in individuals with underlying immune-  
44 system impairment, including those with hematological malignancies and bone marrow or solid organ  
45 transplants. (5,6). The observed poor outcome is also related to the frequent resistance to systemic mold-  
46 active antifungals available to treat such infections (7).

47 Disseminated infections result from fungal escape from the early innate immune response, *i.e.*, the  
48 resistance of infectious propagules (conidia) against oxidative killing by macrophages and neutrophils (8,9).  
49 There is a growing interest in deciphering the structural properties of the fungal cell wall, which confers  
50 high resistance against exogenous injuries. The conidia cell wall of most fungal pathogens has been shown  
51 to be covered with a dark pigment, consisting of melanins, such as those particularly well-described in  
52 *Aspergillus fumigatus* (10) and *Cryptococcus neoformans*. Among filamentous fungi, the most highly  
53 conserved structure is dihydroxynaphtalene (DHN)-melanin, biosynthesized through the pentaketide  
54 pathway, initiating from endogenous AcetylCoA/malonylCoA, which is converted into 1,3,6,8-  
55 tetrahydroxynaphtalene (THN) by polyketide synthase (PKS). Then, 1,3,6,8- THN is reduced by a specific  
56 reductase to produce scytalone, which is, in turn, enzymatically dehydrated to 1,3,8-trihydroxynaphtalene.  
57 Vermelone is produced through a second reduction step and finally dehydrated to form 1,8-  
58 dihydroxynaphtalene, which is dimerized and polymerized to form DHN-melanin (11).

59 DHN-melanin is often mentioned as 'fungal armor', due to the ability of the polymer to protect  
60 microorganisms against a broad range of toxic insults. This highly hydrophobic and stable structure has  
61 been shown to provide conidia with various biological properties, including paramagnetism, the absorption  
62 of radiation, and protection against high temperatures and oxidative stress. Concerning the interaction  
63 with host cells, a growing number of reports have attributed a crucial role of melanins in fungal virulence  
64 both in plant and human pathogen models. In particular, DHN-melanin has been extensively studied in *A.*  
65 *fumigatus* (10,12) and several phaeohyphomycetes involved in chronic infections, such as *Exophiala* (13)  
66 and *Fonsecaea* (14), using various melanin-deficient mutant-based approaches. For example, the removal  
67 of the melanin layer through the deletion of *PKS* was shown to enhance the inflammatory response of *A.*  
68 *fumigatus* conidia-infected human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), highlighting the melanin  
69 property of masking surface pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) (15). The killing of  
70 internalized melanized *A. fumigatus* conidia was also delayed relative to killing of melanin-deficient conidia  
71 *via* the inhibition of phagolysosomal fusion in a macrophage model, supporting the protective role of DHN-  
72 melanin during the host-conidia interaction (16). *In vivo*, the virulence of albino *A. fumigatus* strains in a  
73 murine model was also attenuated (17). In addition, the melanin conidial coating has been shown to

74 hamper the *in-vitro* efficacy of certain antifungal drugs, such as amphotericin B, as shown, for example, in  
75 *C. neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, and *Exophiala dermatitidis* (18–20).

76 The structure of the *Scedosporium* conidia cell wall has only been superficially explored. As discussed  
77 in the recent review by Rollin-Pinheiro et al. (21), a few reports have recently emerged that highlight the  
78 relevance of certain specific cell-wall components in our understanding of host-pathogen interactions,  
79 especially carbohydrates. For example, peptidoramnomannans,  $\alpha$ -glucans, and glycosylsphingolipids have  
80 been shown to play a crucial role in triggering innate immune responses and are key-elements for fungal  
81 growth and virulence (22–24)

82 Although a very small number of reports have focused on the related genus *Lomentospora* (25,26),  
83 there is still no data on the role of DHN-melanin in *S. apiospermum* conidia. By analogy with other  
84 filamentous fungi, especially *A. fumigatus*, the biosynthesis of DHN-melanin in *S. apiospermum* may result  
85 from the activation of a complex enzyme cascade involving four genes identified in the *S. apiospermum*  
86 genome (**Figure 1**), fully sequenced by our group (27). Interestingly, three of these genes are organized in  
87 a cluster that is thought to be under the control of the upstream transcription factor PIG1, first described  
88 in *Magnaporthe grisea*, responsible for rice blast (28). Many studies dealing with phytopathogenic fungi  
89 have supported the importance of genes orthologous to PIG1 as key regulators of melanin biosynthesis, as  
90 demonstrated, for example, in the  $\Delta$ CMR1 mutant of *Cochliobolus heterostrophus* (29) and *Colletotrichum*  
91 *gleosporioides* (30) and the  $\Delta$ AMR1 mutant of *Alternaria brassicola* (31). However, different conclusions  
92 were drawn concerning the role of these transcription factors in the melanin-related virulence of these  
93 fungi, probably because of the diversity of fungal structures involved in plant invasion (*i.e.*, appressoria,  
94 microsclerotia, conidia) and differences between the plant models. To date, the contribution of PIG1  
95 orthologs in melanin biosynthesis and virulence in a human fungal pathogen has never been explored.

96 In this context, we aimed to assess the functions of PIG1 and DHN-melanin in *S. apiospermum* conidia  
97 using three complementary approaches applied to PIG1-deleted albino strains *versus* parental *S.*  
98 *apiospermum* strains.: i) phenotypic characterization, ii) transcriptomic analysis, and iii) evaluation of the  
99 macrophage response.

## 100 2. Materials and Methods

### 101 1. Strains and culture conditions

102 Two different parental strains were used in this study:

103 - The *Scedosporium apiospermum* wildtype strain deposited at the BCCM/IHEM culture collection  
104 (Brussels, Belgium) under the accession number IHEM 14462 (WT 14462) was isolated in 1998 from a  
105 sputum sample of a CF patient. The genome of this strain has been sequenced and annotated (27)

106 - A non-homologous end joining deficient strain ( $\Delta$ KU70) previously obtained from the WT 14462  
107 strain (32).

108 All strains were conserved frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  and cultured at  $37^{\circ}\text{C}$ . Fungi were routinely maintained by  
109 passage on supplemented potato dextrose agar plus 0.5 % chloramphenicol supplemented with  
110 phleomycin (20  $\mu\text{g}$  / mL) for the culture of the  $\Delta$ KU70 strains. Hygromycin B (50  $\mu\text{g}$  / mL) was also added  
111 to the culture medium of the PIG1-disrupted strains to maintain the selection pressure. Moreover, , the  
112 WT 14462 strain was cultured in PDA supplemented with 50  $\mu\text{g}$  / mL tricyclazole (TRC, PESTANAL<sup>®</sup>, Sigma-  
113 Aldrich) to obtain a melanin-deficient control (WT-TRC).

114 All experiments were performed with conidia harvested from nine-day cultures by scraping. The  
115 conidia were then filtered through sterilized Mira cloth (pore size 22-25  $\mu\text{m}$ ) for hyphae removal and  
116 washed once in sterile water. Conidia were counted using a LUNA™ automated particle counter (Logos  
117 Biosystems).

## 118 2. Disruption of the *PIG1* gene

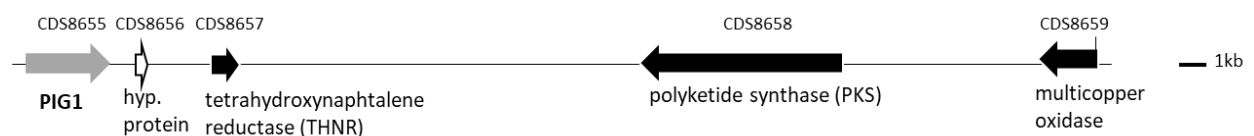
119 Alignment of *S. apiospermum* PIG1 protein sequence with homologous sequences of phytopathogen  
120 fungi (28) led to adjust the nucleotide sequence of PIG1- encoding gene (*SAPIO\_CDS8655*), previously  
121 annotated (27). The 2793bp gene encoding PIG1 was disrupted using CRISPR-Cas9 technology to induce a  
122 double-strand break at the 5' end of the *PIG1* gene using a specific crRNA protospacer (sequence in **Table**  
123 **S1**). After preparation of the gRNA by mixing crRNA and the universal tracrRNA (**Table S1**) in equimolar  
124 amounts at a final concentration of 33  $\mu\text{M}$  (95°C for 5 min and then RT for 15 min), RNP complex formation  
125 was performed according to the method developed by Abdallah *et al.* for *A. fumigatus* (33).

126 The repair cassette was obtained by amplification of the hygromycin-resistance gene (hygromycin B  
127 transferase - HYGR) from the plasmid pCB1636 using M13 primers flanked by a 80-bp sequence  
128 homologous to that of the extremities of the target gene. PCR amplification was performed using Q5® high-  
129 fidelity DNA polymerase.

130 Transformation was performed as described previously (34) on  $10^7$  protoplasts from the two strains  
131 of *S. apiospermum* (WT14462 and  $\Delta KU70$ ) with 5  $\mu\text{g}$  of repair cassette and 13.25  $\mu\text{L}$  of the RNP complex  
132 (Ravenel *et al.* in preparation). Cultures incubated at 37°C were checked daily for disrupted upward growth  
133 in the selection marker layer. Monosporic isolates of disruptants were then subcultured on YPDA  
134 supplemented with 20  $\mu\text{g}$  / mL phleomycin and / or 50  $\mu\text{g}$  / mL hygromycin B. Genomic DNA was extracted  
135 using phenol/chloroform.

136 The genotype was analyzed and validated using two different methods: (i) PCR amplification with  
137 primers designed against the upstream and downstream regions of the insertion and sequencing of the  
138 amplicons and (ii) Southern blotting, as previously described (34).

139



140

141 **Figure 1. Gene cluster of melanin biosynthesis in *S. apiospermum* (36.1kb) (27).** The scytalone  
142 deshydratase encoding gene is located out of the cluster. Hyp: hypothetical.

143

144

## 145 3. Melanin detection by electronic paramagnetic resonance (EPR)

146 A  $5.10^7$  / mL conidial suspension was prepared in sterile water and 300  $\mu\text{L}$  transferred to a quartz EPR  
147 tube. EPR examination was performed at 100K using a Bruker Elexsys EPR spectrometer with a 3330 G  
148 center field, 2 mW microwave power, 9.377 GHz microwave frequency, 10 G modulation amplitude, and

149 100 kHz modulation frequency. Synthetic melanin (ref M8631, Sigma Aldrich) was used as a standard for  
150 melanin quantification. Experiments were performed at least three times.

#### 151 **4. Transmission Electronic Microscopy**

152 Conidia were washed twice in 0.1 M cacodylate buffer and then incubated in a fixative solution (2.5 %  
153 (w / v) glutaraldehyde, 2 % (w/v) paraformaldehyde, 0.1 M cacodylate buffer) for 24 h at room temperature  
154 (RT) under vacuum. After washing with cacodylate buffer, samples were post-fixed for 2 h at RT in 2 %  
155 osmium tetroxide. Finally, samples were dehydrated through a series of ethanol-water solutions (50, 70,  
156 95 % ethanol, 2 × 30 min each) and then 100 % ethanol (3 × 20 min).

157 For transmission electron microscopy (TEM), ethanol was replaced by propylene oxide (3 × 20 min)  
158 and samples were impregnated overnight in a propylene oxide-Epon mixture (1:1 v / v) and then in pure  
159 Epon for 16 h and 8 h. After polymerization (24 h at 37°C, 24 h at 45°C, and then 48 h at 60°C), thin sections  
160 were directly examined on a JEM-1400 transmission electron microscope (Jeol, Paris, France; 120 kV).

#### 161 **5. Quantification of polysaccharide exposure of the conidia cell wall**

162 The exposure of cell-wall polysaccharides was assessed using wheat germ agglutinin Alexa Fluor™ 633  
163 (WGA) and concanavalin A Alexa Fluor™ 488 (ConA) conjugates (ThermoFisher Scientific), which bind to N-  
164 acetylglucosamine oligomers, and  $\alpha$ -d-mannosyl and  $\alpha$ -d-glucosyl residues, respectively. Briefly,  $5.10^6$   
165 conidia in HBSS were incubated with WGA or ConA at 100  $\mu$ g / mL under orbital shaking, protected from  
166 light, for 30 min at 37°C. Conidia were washed twice in HBSS and fixed with 1% PFA in HBSS before storage  
167 at 4°C until microscopic observation. Stained conidia (20  $\mu$ L) were observed under a widefield inverted  
168 fluorescence microscope (Olympus IX71) using a 20× magnification lens. Images were digitally recorded  
169 using SoftWorx software. Analysis and fluorescence quantification were performed using ImageJ (Fiji)  
170 software.

#### 171 **6. Germination and biofilm assays**

##### 172 *Conidial germination assay*

173 A standardized inoculum of  $2.10^3$  conidia in YPD was added to each well of a 96-well microplate, which  
174 was incubated at 37°C in 5 % CO<sub>2</sub> in an IncuCyte® Live Cell Imaging System (Sartorius). Each well was  
175 automatically imaged every hour for 7 h. Acquisitions were then manually analyzed by counting at least  
176 200 cells per strain at each time point.

##### 177 *Biofilm formation*

178  $2.10^6$  conidia (200  $\mu$ L) were transferred to YPD medium in flat-bottom 96-well polystyrene microtiter  
179 plates, centrifugated at 200 g for 2 min, and then incubated at 37°C in 5 % CO<sub>2</sub> for 2 h for adhesion (35).  
180 Supernatants were discarded to remove non-adherent conidia and 200  $\mu$ L RPMI supplemented with 2 %  
181 glucose and 20 % fetal calf serum (FCS) was added; plates were then incubated without agitation at 37°C  
182 in 5% CO<sub>2</sub> for 24 h, 48 h, or 72 h. In parallel, blanks were prepared containing medium only. Subsequently,  
183 the supernatants were carefully discarded and the wells washed twice with PBS to remove non-adherent  
184 cells. The biofilm biomass was measured according to Mello *et al.* (36). Biofilms were fixed with 200  $\mu$ L 99  
185 % methanol for 15 min. After removal of the supernatant, plates were air-dried for 5 min. Then, 200  $\mu$ L of  
186 0.3 % crystal violet in PBS (Sigma Aldrich) were added to each well before an incubation at RT for 20 min.  
187 The wells were washed twice with PBS to remove excess stain and the biomass then decolorized with 200

188  $\mu$ l glacial acetic acid for 5 min. One hundred microliters of the acetic acid solution were transferred to a  
189 new 96-well plate and the absorbance measured at 590 nm using a microplate reader (SPECTROstar Nano,  
190 BMG Labtech).

191

## 192 **7. Resistance to environmental stresses**

### 193 *Resistance to ultraviolet light*

194 Conidia were stained with 0.1 mg / mL fluorescein isothiocyanate (FITC, Sigma-Aldrich) in carbonate  
195 buffer (0.1 M, pH = 9) at RT for 30 min, washed three times with carbonate buffer, and suspended in  
196 phosphate buffered saline (PBS). Suspensions of FITC-labelled conidia were adjusted to  $5.10^5$  / mL in  
197 uncovered sterile Petri dishes (53 mm in diameter, 6 mL) and exposed to UV-C radiation ( $\lambda = 254$  nm) using  
198 a UV Stratalinker 2400 (Stratagene, La Jolla, CA, USA) at a dose of 30 mJ / cm<sup>2</sup>, according to the results of  
199 preliminary assays. Pellets from exposed and unexposed conidia were stained with 25  $\mu$ g / mL propidium  
200 iodide (PI, Sigma-Aldrich) for 30 min at RT and protected from light. Conidia were washed with sterile  
201 water, fixed with 4% PFA, and analyzed using a LSRFortessa™ cytometer (BD Biosciences, Le-Pont-de-Claix,  
202 France). Each replicate included a negative control, reflecting live conidia (unexposed FITC<sup>+</sup> conidia), and a  
203 positive control consisting of heat-killed conidia (85°C, 20 min). Both controls were used to set the gates  
204 for the positivity of each marker. Live conidia were FITC<sup>+</sup> PI<sup>-</sup> and the dead conidia were double-positive  
205 (FITC<sup>+</sup> PI<sup>+</sup>). The percentage of live conidia was determined as the percentage of PI<sup>-</sup> conidia among FITC<sup>+</sup>  
206 conidia. The reduction in conidia survival was calculated relative to control conidia not exposed to UV  
207 (viability control) as:  $100 * ((\% \text{ of live conidia among unexposed conidia} - \% \text{ of live conidia among exposed}$   
208  $\text{conidia}) / \% \text{ of live conidia among unexposed conidia})$ .

### 209 *Resistance to heat shock*

210 Conidial suspensions adjusted to  $10^3$  cells / mL were incubated at 40°C or 50°C for 15 min. After  
211 homogenization, 200  $\mu$ L conidia suspension were inoculated in triplicate onto PDA plates. The survival rate  
212 was calculated by counting the number of colonies after incubation at 37°C for 72 h and defined as the  
213 ratio of the colony number between exposed and control (unexposed) conditions.

### 214 *Growth under oxidative conditions*

215 The ability to grow in the presence of oxidizing compounds, *i.e.*, menadione (Sigma Aldrich, stock  
216 solution prepared in DMSO) or cumene hydroperoxide (CHP, Sigma Aldrich), was studied by nephelometry  
217 (37). To study hyphal growth in liquid media,  $10^5$  conidia were inoculated into microplate wells containing  
218 40  $\mu$ M menadione or 200  $\mu$ M cumene hydroperoxide in potato dextrose broth (PDB). Fungal growth was  
219 monitored automatically for 40 h at 37°C using a laser-based microplate nephelometer (NEPHELOstar,  
220 BMG Labtech). For each condition, the area under the growth curve representative of the lag phase was  
221 used to calculate the percentage of growth under the oxidative condition relative to the standard growth  
222 condition (PDB medium). At least three replicates were conducted per treatment.

## 223 **8. Cell wall integrity assay**

224 The growth phenotypes of the parental strains (WT and  $\Delta KU70$ ) and their disruptants were assessed  
225 on PDA supplemented with 1 mg / mL Congo red or 0.0064 % sodium dodecyl sulfate (SDS, purchased from  
226 Sigma Aldrich). Concentrations were chosen according to the results of preliminary assays. A growth

control on PDA was added in each experiment. Plates were incubated at 30°C for seven days. The colony diameter, reflecting the growth rate, was expressed relative to the growth on control PDA as follows:  $(100 \cdot (\text{diameter on PDA} - \text{diameter on PDA} + \text{stressor}) / \text{Diameter on PDA})$ . Each test was repeated three times, with four replicates each time.

### 231 9. Antifungal susceptibility testing

232 *In vitro* susceptibility testing was performed using broth microdilution for filamentous fungi according  
233 to EUCAST guidelines with concentrations ranging from 0.016 µg / mL to 8 µg / mL. The antifungals used  
234 were amphotericin B (AmB), voriconazole (VRC), itraconazole (ITC), posaconazole (POS), and anidulafungin  
235 (ANI), all purchased from Sigma-Aldrich, reconstituted in DMSO and stored frozen at -80°C until use. The  
236 MICs were determined in flat-bottomed 96-well plates with conidial suspensions prepared in RPMI 1640  
237 supplemented with 2 % glucose, buffered with MOPS, and adjusted to a final concentration of  $5 \cdot 10^5$  CFU /  
238 mL, as previously described (38). Inoculated plates were incubated for 72 h at 35°C. MICs were  
239 spectroscopically determined at 405 nm using a spectrophotometer (NEPHELOstar, BMG Labtech) as the  
240 antifungal concentration that resulted in 90 % (AmB) or 50 % growth inhibition (VRC, ITC, POS, ISA).

### 241 10. Transcriptome analysis

242 For transcriptome sequencing,  $10^8$  *S. apiospermum* conidia from the  $\Delta KU70$  strain and its M1 mutant  
243 were incubated in yeast potato dextrose (YPD) medium under continuous agitation (300 rpm) at 37°C for  
244 30 h. Mycelia were harvested, immediately frozen in liquid nitrogen, and stored at -80° until RNA  
245 extraction. Four biological replicates were performed. Fifty milligrams of mycelium sprayed with liquid  
246 nitrogen were then subjected to total RNA extraction using the Plant / Fungi Total RNA Purification kit  
247 (Norgen Biotek), with additional DNase treatment with TURBO DNase (Thermo Fisher Scientific) to remove  
248 residual genomic DNA. Total RNA was checked for integrity using a Bioanalyzer system (Agilent) and  
249 quantified using the fluorescent-based quantification Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific).

250 Directional libraries were prepared from rRNA-depleted RNA using the TruSeq Stranded mRNA sample  
251 Preparation Kit following the manufacturer's instructions (Illumina). Libraries were checked for quality on  
252 Bioanalyser DNA chips (Agilent) and quantified using the fluorescent-based quantification Qubit dsDNA HS  
253 Assay Kit. RNA sequencing was performed on the Illumina NextSeq 500 platform using a High Output Kit  
254 (75 cycles).

255 RNA-seq analysis was performed using Sequana 0.12.7 (39). In particular, we used the RNA-seq  
256 pipeline 0.15.0 ([https://github.com/sequana/sequana\\_rnaseq](https://github.com/sequana/sequana_rnaseq)) built on top of Snakemake 6.7.0 (40). Reads  
257 were trimmed from adapters using fastp 0.20.1 (41) and mapped to the *S. apiospermum* reference genome  
258 (GCF\_000732125.1) using STAR 2.7.8a (42). FeatureCounts 2.0.1 (43) was used to produce the count matrix  
259 and assign reads to features using annotation from NCBI GCF\_000732125.1 with strand-specificity  
260 information. Pseudogenes were considered to be genes. Quality control statistics were performed using  
261 MultiQC 1.11 (44). Statistical analysis of the count matrix was performed to identify differentially regulated  
262 genes, comparing M1 to  $\Delta KU70$ . Transcriptomic profiles were clustered using principal component analysis  
263 (PCA). Differential expression was determined using DESeq2 library 1.30.0 (45), indicating the significance  
264 (Benjamini-Hochberg adjusted p-values, false discovery rate FDR < 0.05) and effect size (fold-change).

265 Gene annotation was performed to analyze the functions of the DEGs using Blast2GO for gene  
266 ontology (GO) annotation and GO for functional classification.

267 Additionally, Interproscan (<https://www.ebi.ac.uk/>) was used for the functional analysis of proteins,  
268 classifying them into families and predicting domains based on several databases, including the Pfam, CDD,  
269 and Panther databases.

270 For quantitative real-time PCR analysis, RNA was reverse transcribed to cDNA using a high-capacity  
271 cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions.  
272 Quantitative PCR amplifications were carried out in duplicate using PowerUp SYBR® green PCR master mix  
273 (Applied Biosystems), 0.3 µM primers, and 2 µl of cDNA in a final volume of 10 µl, in 384-well optical plates,  
274 using a CFX384 OPUS™ real-time PCR detection system (Bio-Rad). Gene-specific primers (**Table S1**) were  
275 synthesized by Eurogentec. Expression levels of target genes were normalized by comparison to the  
276 expression of the *S. apiospermum* *UBC6* and *FIS1* housekeeping genes. Results are expressed as  $2^{-\Delta\Delta C_q}$ ,  
277 referring to the fold induction in the T, M1, and M2 strains relative to the mean quantification cycle  
278 obtained with the parental strains.

## 279 **11. *In-vitro* macrophage infection assays**

### 280 *Macrophage preparation*

281 Human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from blood buffy coats obtained  
282 from healthy donors supplied by the Etablissement Français du Sang, Rennes, France. PBMCs were isolated  
283 by density gradient centrifugation and CD14<sup>+</sup> cells (monocytes) were isolated by positive magnetic cell-  
284 sorting (Miltenyi Biotec). Monocytes ( $2 \cdot 10^6$ ) were plated in 12-well Nunc UpCell plates (ThermoFisher  
285 Scientific) and differentiated into macrophages in complete medium (RPMI 1640, Gibco, Life Technologies),  
286 10 % decompartmented (FCS), 100 IU / mL penicillin, and 100 µg / mL streptomycin) supplemented with 10  
287 ng / mL granulocyte-macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) (Miltenyi, Biotec) for five days, at  
288 37°C in 5 % CO<sub>2</sub>.

### 289 *Phagocytosis and killing assays*

290 After differentiation, macrophages were plated at  $5 \cdot 10^5$  cells per well in 24-well plates and infected  
291 with FITC-labelled conidia with a MOI of 5:1 for the ingestion assay and 1:1 for killing experiments. Plates  
292 were centrifugated at 500 g for 5 min at RT to synchronize phagocytosis and incubated at 37°C in 5,% CO<sub>2</sub>,  
293 protected from light, for 2 h (phagocytosis) or 6 h (phagocytosis and killing). Plates were then put on ice to  
294 block macrophage activity, the supernatants removed, and the cells washed three times with cold DPBS to  
295 remove extracellular non-adherent conidia.

#### 296 - Phagocytosis assay:

297 Cells were removed from the wells by gentle mixing and transferred to Eppendorf tubes, washed once with  
298 DPBS, and centrifuged at 500 g for 5 min. Macrophages were then transferred into 96-well U-bottom plates  
299 for labelling. Cells were stained for viability using the LIVE/DEAD™ Fixable Yellow Dead Cell Stain Kit  
300 (ThermoFisher Scientific) for 30 min at RT, protected from light. After washing, Fc receptors were blocked  
301 with Fc-R Blocking Reagent (Miltenyi) for 10 min at 4°C and marked with anti-CD11b / Mac1 (Mouse anti-  
302 human, BD horizon) for 15 min at 4°C, washed twice with PBS-2 % SVF, fixed with 4 % PFA, and analyzed  
303 on a LSRFortessa™ cytometer (BD Biosciences) to quantify the percentage of macrophages with ingested  
304 conidia. Data were analyzed using Flowlogic software according to the gating process previously designed  
305 to remove dead macrophages and distinguish between the CD11b<sup>+</sup>/FITC<sup>-</sup> population (non-infected



306 macrophages) and the double-positive CD11b<sup>+</sup>/FITC<sup>+</sup> population (macrophages with adherent and/or  
307 ingested conidia) (46).

308 - Killing assay

309 After 6 h of incubation, cells were immediately lysed using cold sterile water and incubated at 4°C for at  
310 least 1 h or overnight. The well contents were then transferred into Eppendorf tubes and centrifuged at  
311 10,000 g for 5 min. Pellets were then stained with PI and analyzed as described above (see Resistance to  
312 ultraviolet light).

313 *Cytokine assays*

314 Primary macrophages were plated in 24-well plates at 10<sup>6</sup> cells / mL and incubated with 10<sup>7</sup> (MOI 10:1)  
315 live conidia in complete RPMI for 12 h at 37°C in 5 % CO<sub>2</sub>. Supernatants were then collected and  
316 immediately stored at -80°C. Pro-inflammatory cytokines were measured using a 13 plex-bead-based  
317 immunoassay LEGENDplex<sup>®</sup> multi-analyte flow assay (BioLegend) according to the manufacturer's  
318 instructions. Cytokine concentrations were determined using standard curves obtained using recombinant  
319 cytokine standards provided in the kit. Samples were analyzed on a LSRFortessa<sup>™</sup> cytometer (BD  
320 Biosciences) and the data processed using the online platform provided by the kit manufacturer.

321

## 322 **12. Statistical analysis**

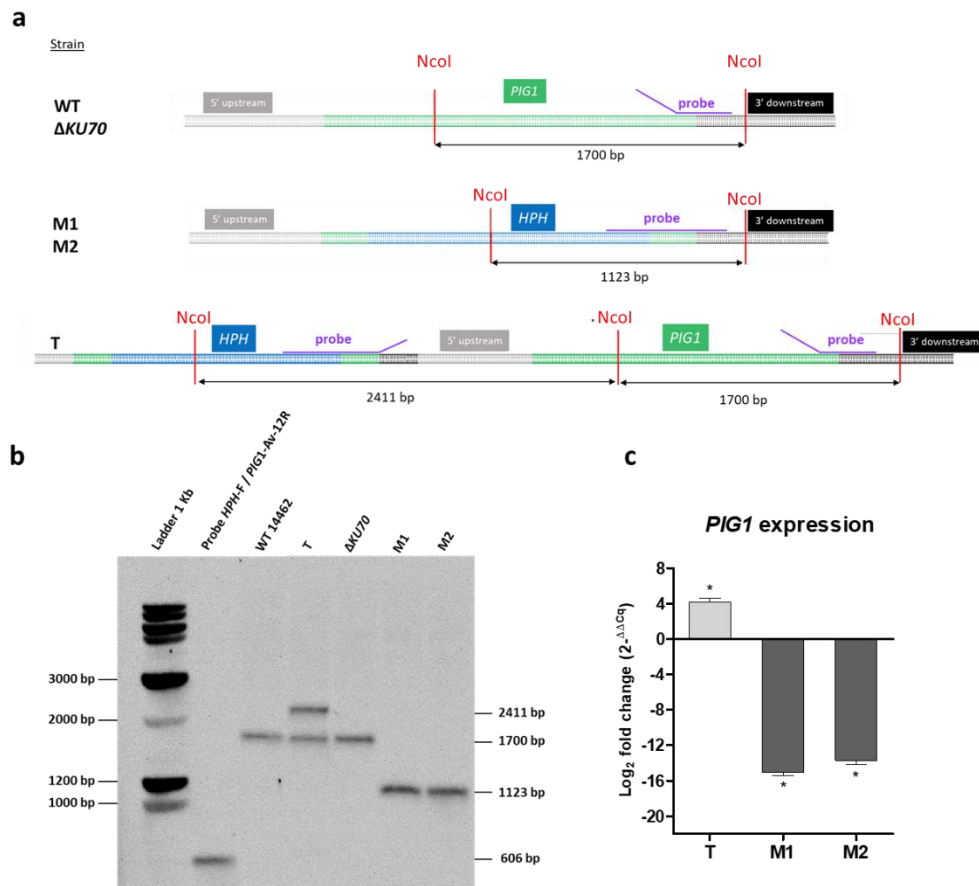
323 All experiments were performed in triplicate or quadruplicate at least three times independently. Data  
324 are expressed as the mean ± standard error of the mean (SEM). Statistical analysis was performed using  
325 GraphPad Prism software (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). A one-way analysis of variance  
326 Kruskal-Wallis test or a Mann-Whitney test were used to evaluate differences between strains. In all  
327 analyses, p-values ≤ 0.05 were considered statistically significant.

## 328 **3. Results**

### 329 *3.1. Disruption of the PIG1 gene in S. apiospermum*

330 The CRISPR/Cas9 technology recently adapted to *S. apiospermum* was used to disrupt the *PIG1* gene.  
331 Because of the high frequency of non-homologous recombination, we performed the experiment in the  
332 wildtype strain (WT 14462), as well as in the previously developed non-homologous end joining-deficient  
333 strain  $\Delta KU70$  (32). Three hygromycin-resistant strains corresponding to three putative *PIG1* disruptants  
334 were obtained, one derived from the WT strain (T strain) and two derived from the  $\Delta KU70$  strain  
335 ( $\Delta KU70/\Delta PIG1-1$  (M1) and  $\Delta KU70/\Delta PIG1-2$  (M2)). The genotype of the monosporic isolates was verified by  
336 Southern blotting. A band of expected size (1,123 bp) was visualized for M1 and M2 after probe  
337 hybridization, instead of the 1,700-bp band observed for the parental strain (**Figure 2a, b**). Replacement  
338 of the *PIG1* gene by the repair cassette (data not shown) was confirmed by DNA sequencing and *PIG1*  
339 mRNA expression was completely repressed (**Figure 2c**). By contrast, two bands (2,411 bp and 1,700 bp)  
340 were observed in the T strain. This result, associated with DNA sequencing, showed integration of the  
341 repair cassette 782 bp upstream of the *PIG1* gene. No mutation was found in the *PIG1* coding sequence,  
342 which could have possibly resulted in a reading-frame shift. Moreover, *PIG1* mRNA was overexpressed in  
343 the T strain relative to the parental WT strain (**Figure 2c**).

344



345

346 **Figure 2. Generation of *S. apiospermum*  $\Delta PIG1$  mutants.** (a) Restriction map of the *S. apiospermum* *PIG1* locus  
 347 and strategy for the construction of the disruption cassette. *NcoI* restriction sites are identified and the purple line  
 348 indicates the hybridization site of the probe. The size of the expected fragments is indicated by the arrows. (b)  
 349 Southern-blot analysis of *PIG1* transformant strains. Genomic DNA of all strains (parental and mutant derivatives)  
 350 were digested by *NcoI* and probed with a hybridization probe corresponding to a 600-bp fragment including the *PIG1*  
 351 3' flanking region and 3' end of the *HPH* gene. The expected signals were 1,700 bp for the parental strains and 1,123  
 352 bp for the M1 and M2 mutants. Two unexpected bands were observed for the T strain (2,411 bp and 1,700 bp),  
 353 suggesting integration of the repair cassette upstream of the *PIG1* gene. (c) Expression of *PIG1* mRNA by the three  
 354 *HPH*-resistant transformants relative to their respective parental strain (*i.e.*, T vs WT, M1 vs  $\Delta KU70$ , and M2 vs  $\Delta KU70$ ).  
 355 After reverse transcription, mRNA expression was quantified by quantitative PCR. Data were normalized to the  
 356 expression of the *UBC6* and *FIS1* housekeeping genes and are representative of four independent experiments.  
 357 Significant differences are indicated by asterisks: \* $p \leq 0.05$  (Mann-Whitney test). T: transformant derived from the  
 358 WT strain; M1 and M2: transformants derived from the  $\Delta KU70$  strain.

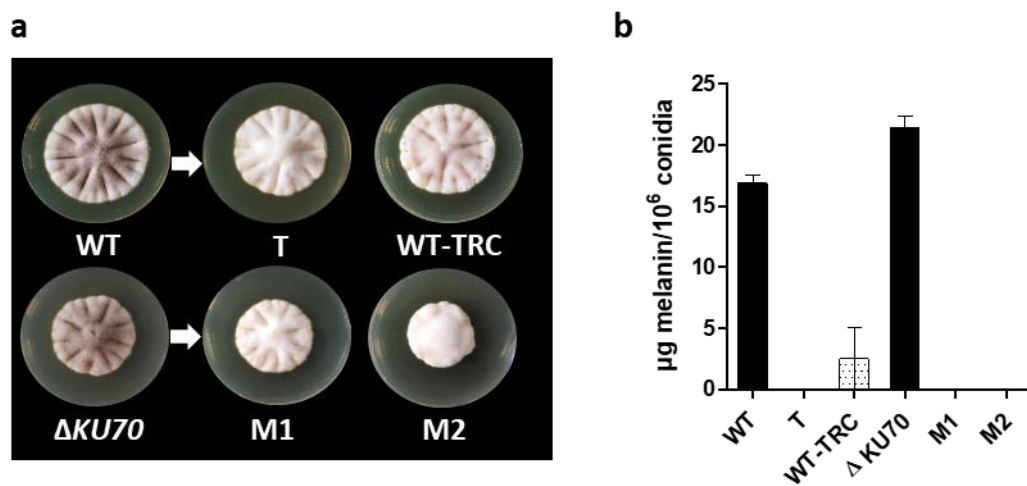
359

360 *3.2. Melanin content and cell-wall structure*

361 In contrast to the dark brown pigment observed in the parental strains (**Figure 3a**), colonies from the  
 362 three transformants showed a similar non-melanized white phenotype. The color defect did not result  
 363 from an inability to sporulate, as supported by the presence of conidia by microscopic observation.  
 364 Moreover, based on the paramagnetic structure of DHN-melanin, the quantification of conidia melanin  
 365 could be assessed by electronic paramagnetic resonance (EPR), and confirmed the absence of a melanin-  
 366 related EPR signal in conidia from the T, M1, and M2 strains (**Figure 3b**). These results show that the

367 transcription factor PIG1 regulates the expression of (a) gene(s) of the DHN-melanin cluster. Thus, the *PIG1*  
368 mRNA overexpression observed in the T strain did not correlate with a functional transcription factor. This  
369 mutant was included in the subsequent experiments to decipher the role of DHN-melanin in *S.*  
370 *apiospermum* as the Southern blot confirmed that there was no ectopic integration elsewhere in the  
371 genome and as EPR confirmed the absence of DHN-melanin in the T strain.

372 Of note, tricyclazole (TRC) was previously shown to be a specific fungicide that specifically inhibits  
373 both 1,3,6-trihydroxynaphtalene and 1,3,6,8-tetrahydroxynaphtalene reductases at nontoxic  
374 concentrations (47,48). TRC is thus commonly used as a melanin biosynthesis inhibitor in studies focusing  
375 on DHN-melanin function. Here, the light reddish-brown pigment of the WT strain grown in the presence  
376 of TRC, similar to previous descriptions, reflects the accumulation of melanin shunt intermediates,  
377 confirming the inhibitory effect of TRC on DHN-melanin biosynthesis in *S. apiospermum* (Figure 3a).

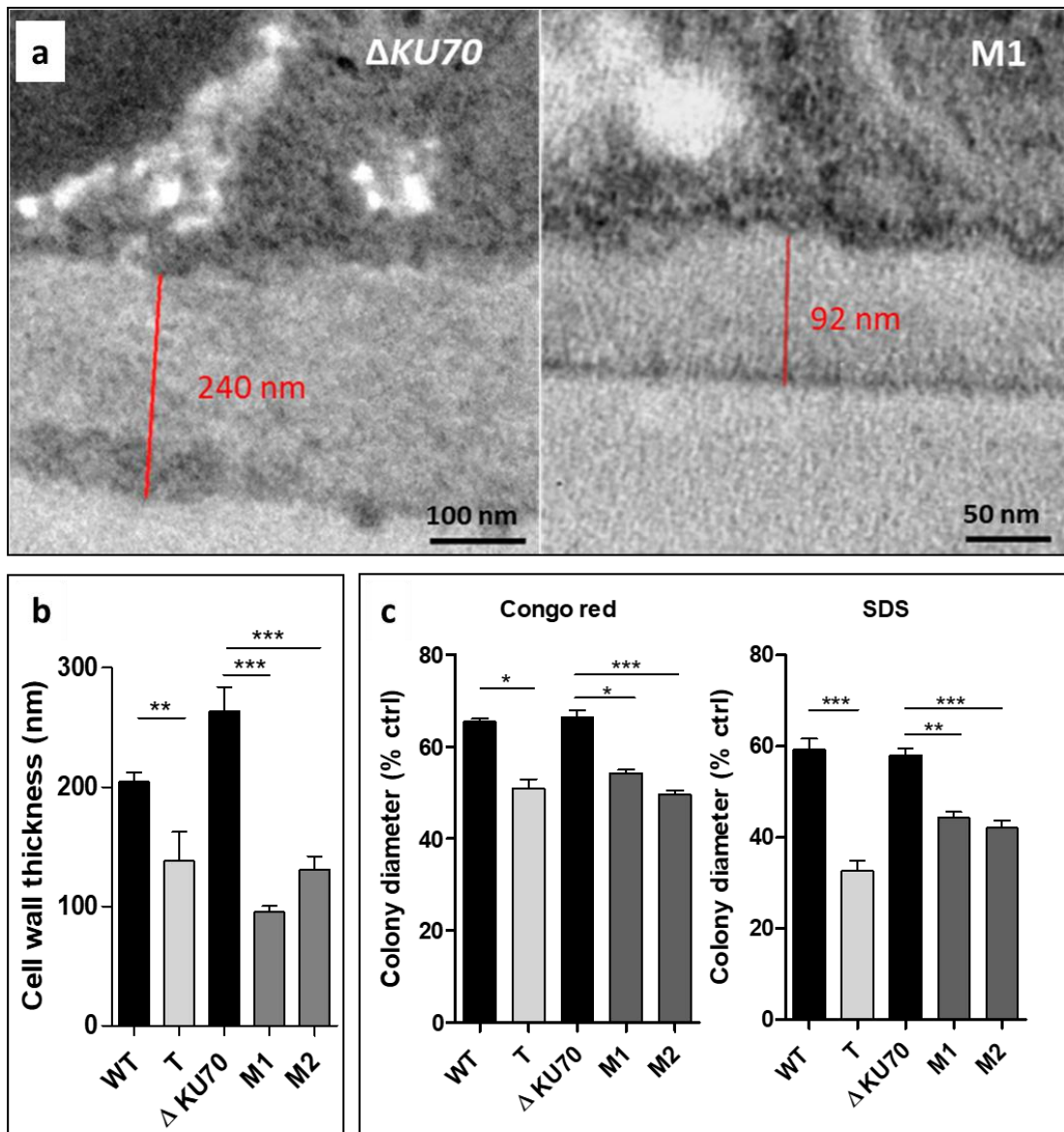


378

379 **Figure 3. Detection of melanin in parental and mutant *S. apiospermum* strains.** (a) Macroscopic aspect of  
380 parental and mutant strains after nine days at 37°C on PDA medium. WT-TRC indicates the WT strain grown on a PDA  
381 plate supplemented with 50 µg/mL tricyclazole as a specific inhibitor of melanin biosynthesis. (b) Melanin quantity  
382 per million conidia, extrapolated from a standard curve of synthetic melanin, determined by EPR (Graph  
383 representative of at least three independent measurements). T: transformant derived from the WT strain; M1 and  
384 M2: transformants derived from the ΔKU70 strain.

385 In the absence of the external melanin layer in the T, M1, and M2 conidia, the cell wall content was  
386 expected to be different, or at least disorganized. TEM examination showed the mean cell wall thickness  
387 to be significantly less for the three disruptants (T, M1, and M2) than that of the parental strains by a factor  
388 of 1.5 ( $p < 0.01$ ), 2.7 ( $p < 0.001$ ), and 2.0 ( $p < 0.001$ ), respectively (Figure 4a, b).

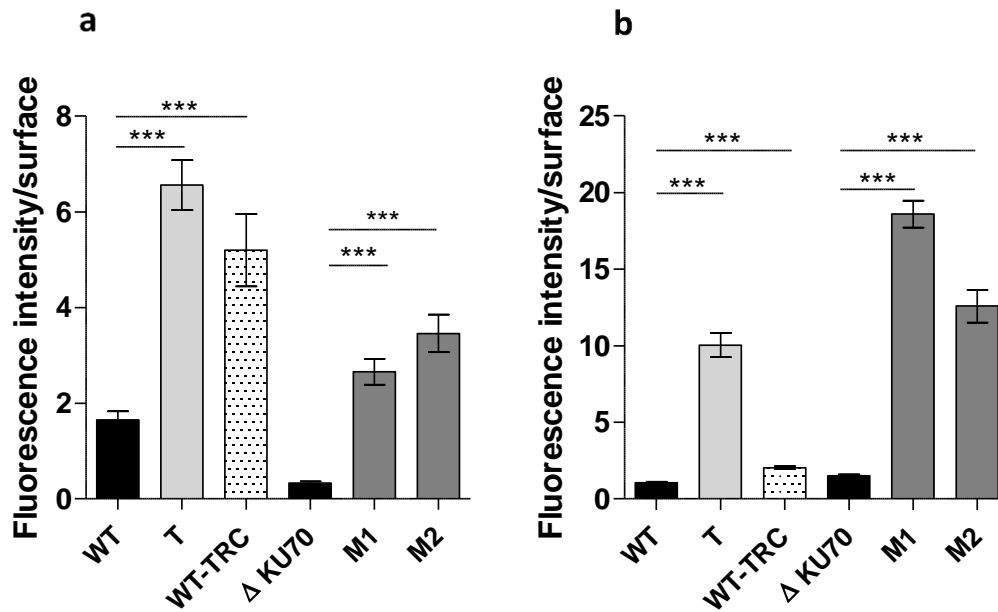
389 We examined the cell wall integrity of melanin-deficient transformants by assessing the effect of cell-  
390 wall perturbing agents through the measurement of mycelial growth on PDA plates (49). Growth of the T,  
391 M1, and M2 strains in contact with Congo red and SDS was significantly less than that of the WT and ΔKU70  
392 strains (Figure 4c, d), supporting the role of the outer melanin layer in cell-wall structure and integrity.



393

394 **Figure 4. Evaluation of cell-wall thickness and integrity.** (a) TEM of  $\Delta KU70$  and M1 conidia cell walls. The image  
 395 is representative of the three transformants. (b) Thickness determined from transmission electron microscopy (TEM)  
 396 acquisition for 20 acquisitions. (c) Growth in contact with the cell-wall chemical stressors Congo Red and SDS. After  
 397 an incubation of seven days at 30°C, the colony diameter was measured and is expressed according to the control  
 398 growth on stress-free PDA. All graphs include results obtained from three independent experiments. Significant  
 399 differences are indicated: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  (Kruskall-Wallis test). T: transformant derived from the  
 400 WT strain; M1 and M2: transformants derived from the  $\Delta KU70$  strain.

401 Moreover, we investigated the accessibility of the cell wall carbohydrates to mannose-binding and N-  
 402 acetylglucosamine-binding lectins (ConA and WGA, respectively) and observed similar patterns. Most of  
 403 the parental cells were not labeled, whereas almost all conidia from the mutant strains were intensely  
 404 labeled, suggesting polysaccharide unmasking by the removal of the melanized outer layer (Figure 5 and  
 405 Figure S1).

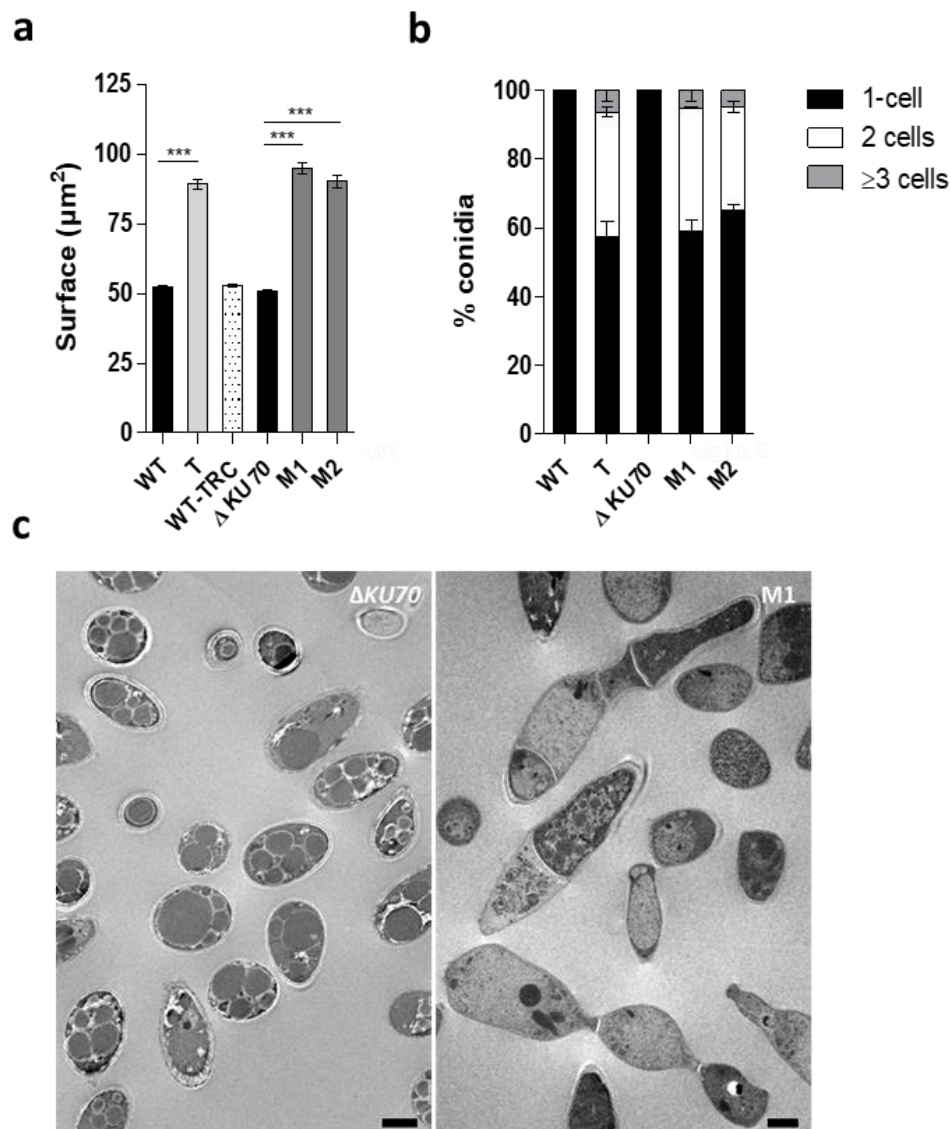


406

407 **Figure 5. Analysis of the fluorescence labelling of conidia surface carbohydrates with FITC-conjugated**  
 408 **lectins. (a, b)** Fluorescence intensity of ConA binding to mannosyl and glucosyl residues (a) and WGA binding to N-  
 409 acetylglucosamine (NAG) residues (b) on the surface of the conidia. Fluorescence analysis was performed using  
 410 ImageJ (Fiji) software from at least 200 conidia. The graph is representative of three independent experiments.  
 411 Significant differences are indicated: \*\*\*p < 0.001 (Kruskall-Wallis test). T: transformant derived from the WT strain;  
 412 M1 and M2: transformants derived from the ΔKU70 strain.

413 *3.3. Cell morphology, germination and biofilm formation*

414 In addition to the loss of the external melanin coating, conidia from the T and M1 and M2  
 415 recombinants showed significant changes in terms of shape and structure. First, the mean size of the  
 416 conidia increased markedly from  $52.3 \pm 0.5 \mu\text{m}^2$  in the WT strain to  $89.1 \pm 1.7 \mu\text{m}^2$  in the T strain and from  
 417  $50.6 \pm 0.5 \mu\text{m}^2$  in the ΔKU70 conidia to  $94.9 \pm 2.0$  and  $90.1 \pm 2.0 \mu\text{m}^2$  in the M1 and M2 conidia, respectively  
 418 (Figure 6a). Unexpectedly, the recombinant strains produced multicellular cross-sectioned spores with one  
 419 or two septa, accounting for approximately one third of the total conidia (Figure 6b, c). The remaining  
 420 spores were similar, although a portion appeared to be more elongated than those of the parental strain.  
 421 The results suggest that the transcription factor PIG1 not only regulates genes of the DHN-melanin cluster  
 422 but also regulates the expression of other genes.

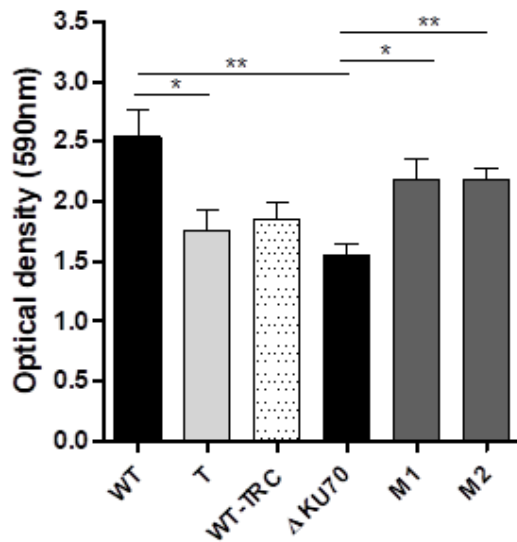


423

424 **Figure 6. Morphology of conidia.** (a) Conidia size. At least 200 conidia were measured from images of conidia  
 425 suspensions acquired with a widefield inverted fluorescence microscope (Olympus IX71) at 20 $\times$  magnification and  
 426 analyzed using ImageJ (Fiji) software. (b) Distribution of conidia morphotypes. At least 200 conidia were measured.  
 427 (c) Transmission electron microscopy (TEM) of  $\Delta KU70$  and M1 conidia. Images are representative of the three  
 428 transformants. Scale bar: 2  $\mu\text{m}$ . Significant differences are indicated: \*\*\* $p < 0.001$  (Kruskall-Wallis test). T:  
 429 transformant derived from the WT strain; M1 and M2: transformants derived from the  $\Delta KU70$  strain.

430 We also investigated germination and biofilm formation. Although the kinetics of germ-tube formation  
 431 were slightly slower in the T strain, it was not hampered in the two  $\Delta KU70$ -derived transformants relative  
 432 to their parental strain (data not shown). Similarly, the ability of both M1 and M2 to adhere and grow on  
 433 inert material appeared to be significantly enhanced with respect to the  $\Delta KU70$  strain (+40 %,  $p < 0.05$ ), as  
 434 shown by the amount of biomass after 24 h of incubation on a polystyrene plate (**Figure 7**). By contrast,  
 435 the growth of the T strain appeared to be less than that of the WT strain. The metabolic activity within the  
 436 biofilms remained unchanged (data not shown). Of note, however, the mutant strains exhibited a similar  
 437 ability to form biofilms and the differences observed upon comparing each mutant to its parental strain  
 438 appeared to be mainly based on different characteristics of the two parental strains.

439



**Figure 7. Biofilm formation.** The total biomass was monitored using a crystal violet assay. Results from three independent experiments are shown. Significant differences are indicated as follows: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  (Kruskall-Wallis test). T: transformant derived from the WT strain; M1 and M2: transformants derived from the  $\Delta KU70$  strain.

440

### 3.4. Resistance to exogenous stress

441

Many studies have shown that melanized fungi are more resistant to stressful conditions than non-melanized species, enabling them to survive under extreme environmental conditions. Thus, we exposed the mutant and parental strains to deleterious conditions to determine whether unpigmented mutant conidia were more vulnerable to environmental stress. First, exposure of the strains to UV-C light showed the survival rate of M1 and M2 conidia to be only 35.6 % and 39.4 % that of unexposed conidia, respectively, whereas survival of the parental  $\Delta KU70$  strain was 73.6 % relative to the unexposed controls (Figure 8a). By contrast, there was no significant difference in the survival of the WT-derived T strain nor the TRC-treated WT strain relative to that of the parental WT strain. This may be related to the difference in susceptibility of the parental strains, as suggested by the three-fold lower viability of the WT strain relative to that of  $\Delta KU70$ .

442

Moreover, although incubation at 40°C for 15 min had no significant effect on conidia viability, the survival rate of the three mutants markedly dropped after exposure to 50°C to 4.1 % ( $p < 0.05$ ), 9.1 % ( $p < 0.01$ ), and 5.9 % ( $p < 0.001$ ), respectively, whereas 47.5 % to 62.8 % of the parental strain conidia survived (Figure 8b). Similarly, we also evaluated the ability of the T, M1, and M2 strains to grow in oxidizing medium by nephelometry. The three mutant strains showed a large reduction in growth in cumene hydroperoxide relative to growth in PDB (control medium): a reduction of 88.0 % for the T ( $p < 0.001$ ), 72.5 % for the M1 ( $p < 0.01$ ), and 56.8 % for the T ( $p < 0.01$ ) strains. By contrast, the parental strains were able to maintain more than 70 % of their growth in the reference medium (Figure 8c). When exposed to menadione, the relative growth of the T strain was lower than that of the WT strain, which contrasted with the growth of both the M1 and M2 strains, which was slightly enhanced relative to that of the  $\Delta KU70$  strain ( $p < 0.05$ ) (Figure 8d).

443

444

445

446

447

448

449

450

451

452

453

454

455

456

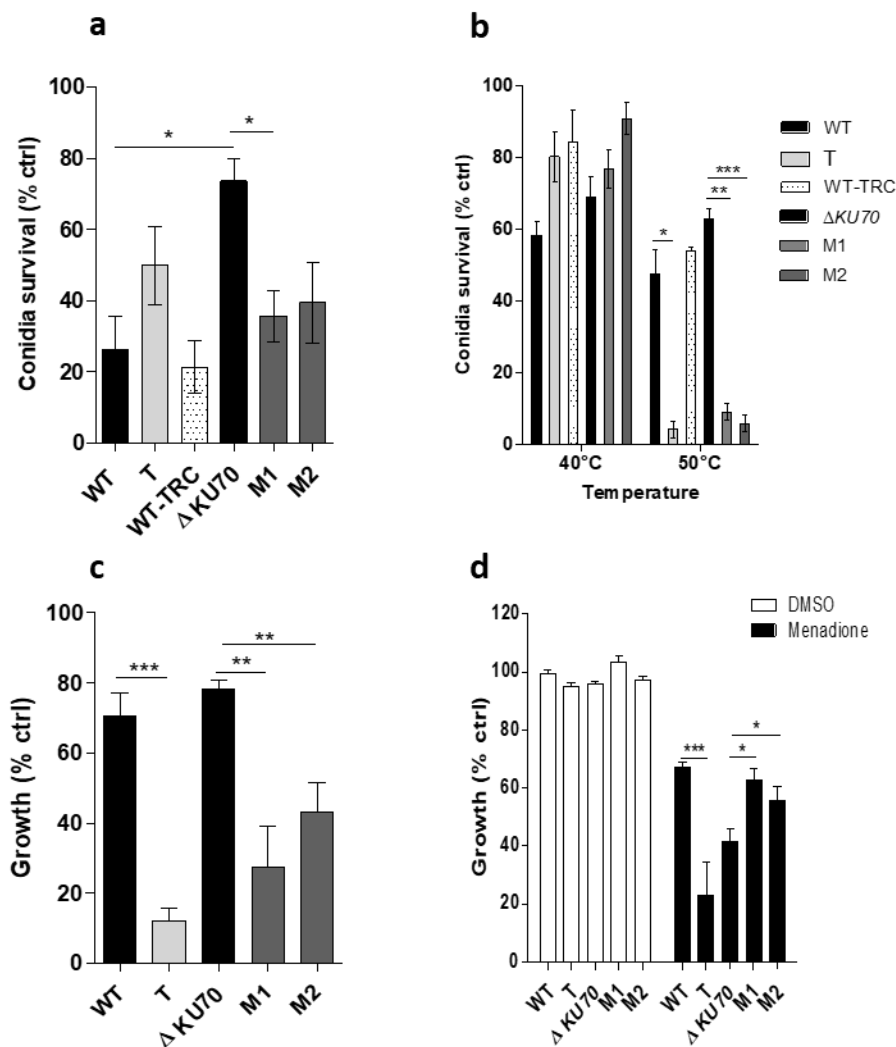
457

458

459

460

461



**Figure 8. Susceptibility of the T and the M1 and M2 deleted strains exposed to exogenous stresses.** (a) Conidia survival after exposure to UV-C light. After exposure to a dose of 30 mJ / cm<sup>2</sup> at 254 nm, conidia were stained with 25 μM propidium iodide (PI) before being analyzed on a LSRFortessa™ cytometer. The graph presents the percentage survival among exposed FITC<sup>+</sup> conidia expressed relative to that of unexposed FITC<sup>+</sup> conidia (live control), as follows: 100x ((% PI<sup>-</sup> FITC<sup>+</sup> conidia among unexposed control conidia - % PI<sup>-</sup> FITC<sup>+</sup> conidia among exposed conidia) / (% PI<sup>-</sup> FITC<sup>+</sup> conidia among unexposed control conidia)). (b) Conidia survival after exposure to high temperature. After incubation at 40°C or 50°C for 15 min, 200 conidia were incubated on PDA plates at 37°C for 72 h. The number of colonies reflect the number of live conidia. The graph presents the ratio between the number of colonies recovered after exposure of the conidia to heat and the number of colonies recovered after no heat exposure on PDA plates. (c, d) Growth under oxidative conditions. Mycelial growth in PDB medium supplemented with 200 μM cumene hydroperoxide (c) or 40 μM menadione (d) was monitored when incubated for 40 h at 37°C by nephelometry. Results are expressed in relative nephelometric units resulting from the measurement of the intensity of scattered light through the wall as an indication of the increasing turbidity due to the mycelia. DMSO was used to dissolve the menadione powder. Graphs present the relative growth calculated as the ratio between the nephelometric signal obtained in the presence of an oxidizing compound and in oxidant-free PDB (growth control). All graphs include results obtained from three independent experiments: \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001 (Kruskall-Wallis test). T: transformant derived from the WT strain; M1 and M2: transformants derived from the ΔKU70 strain.

462

463

464

465

466

467

468

469

470

471

472

473

474

475

476

477

478

479

480

481

482



483 3.5. Antifungal susceptibility

484 The fungi cell wall, composed of molecules not present in humans, constitute an ideal target for the  
 485 development of clinical antifungal compounds. Therefore, modifications of the cell wall may influence  
 486 responses to antifungal drugs. The susceptibility of mutants to various antifungals was assessed by the  
 487 broth microdilution method according to EUCAST recommendations (**Table 1**). Amphotericin B had a  
 488 deleterious impact on the growth of both the M1 and M2 recombinants, shown by the lower mean MICs  
 489 of  $0.58 \pm 0.38$  and  $0.83 \pm 0.29$   $\mu\text{g/mL}$ , respectively, relative to that of for  $\Delta KU70$ , which was resistant to  
 490 AmB (MIC > 8  $\mu\text{g/mL}$ ). By contrast, both the T and WT strains showed similar MICs of approximately 0.5  
 491  $\mu\text{g/mL}$ . These results were further supported by E-test susceptibility testing (not shown). The susceptibility  
 492 to triazole compounds and anidulafungin were unchanged between the parental strains and their  
 493 transformants (**Table 1**).

494 **Table 1. Minimum inhibitory concentration (MIC) determined by the broth microdilution method.**

	Minimum Inhibitory Concentration (mean $\pm$ SD, $\mu\text{g/mL}$ )				
	WT	T	$\Delta KU70$	M1	M2
<b>Amphotericin B</b>	0.58 $\pm$ 0.38	0.50 $\pm$ 0.43	>8	<b>0.58<math>\pm</math>0.38</b>	<b>0.83<math>\pm</math>0.29</b>
<b>Voriconazole</b>	0.34 $\pm$ 0.19	1.37 $\pm$ 0.75	1.37 $\pm$ 0.75	0.87 $\pm$ 0.25	0.87 $\pm$ 0.25
<b>Itraconazole</b>	0.75 $\pm$ 0.43	0.83 $\pm$ 0.29	1.33 $\pm$ 0.58	0.83 $\pm$ 0.29	1.33 $\pm$ 0.58
<b>Posaconazole</b>	0.42 $\pm$ 0.14	1.33 $\pm$ 0.58	0.83 $\pm$ 0.29	1.33 $\pm$ 0.58	1.0 $\pm$ 0
<b>Isavuconazole</b>	6.67 $\pm$ 2.3	8 $\pm$ 0	8 $\pm$ 0	4 $\pm$ 0	5.3 $\pm$ 2.3
<b>Anidulafungin</b>	>8	>8	>8	>8	>8

495 MICs determined after incubation for 72 h at 37°C as the lowest concentration of antifungal to result in a growth  
 496 reduction of 90% (amphotericin B) or 50% (triazoles) relative to the growth control in antifungal-free RPMI. Growth  
 497 was assessed by measuring the optical density at 405 nm. Significant differences in the MIC are shown in bold. T:  
 498 transformant derived from the WT strain; M1 and M2: transformants derived from the  $\Delta KU70$  strain.

499  
 500 3.6. Transcriptomic analysis of M1 transformant

501 We next conducted a comparative transcriptomic analysis between the MI strain and its parental  
 502  $\Delta KU70$  strain to understand the involvement of the transcription factor *PIG1* in melanin biosynthesis and  
 503 the phenotypic characteristics described above, especially relative to the morphogenesis of the *S.*  
 504 *apiospermum* cell wall. Mycelia were harvested from YPDA medium after 30 h of incubation and RNA  
 505 extracted and purified for transcriptome sequencing. In total, eight biological samples (four biological  
 506 replicates) were thus sequenced by next-generation sequencing. After a stringent quality check and data  
 507 cleaning, 9.4 to 15 million assigned reads were obtained for each sample (**Table S2**), which were further  
 508 spliced into 10,919 assembled unigenes.

509 In addition to biostatistical quality controls, RNA-seq based differential gene expression data were  
 510 further validated by RT-qPCR for eight selected representative genes, resulting in an excellent agreement  
 511 between the fold change values determined by global sequencing and specific qPCR (**Table 2**).

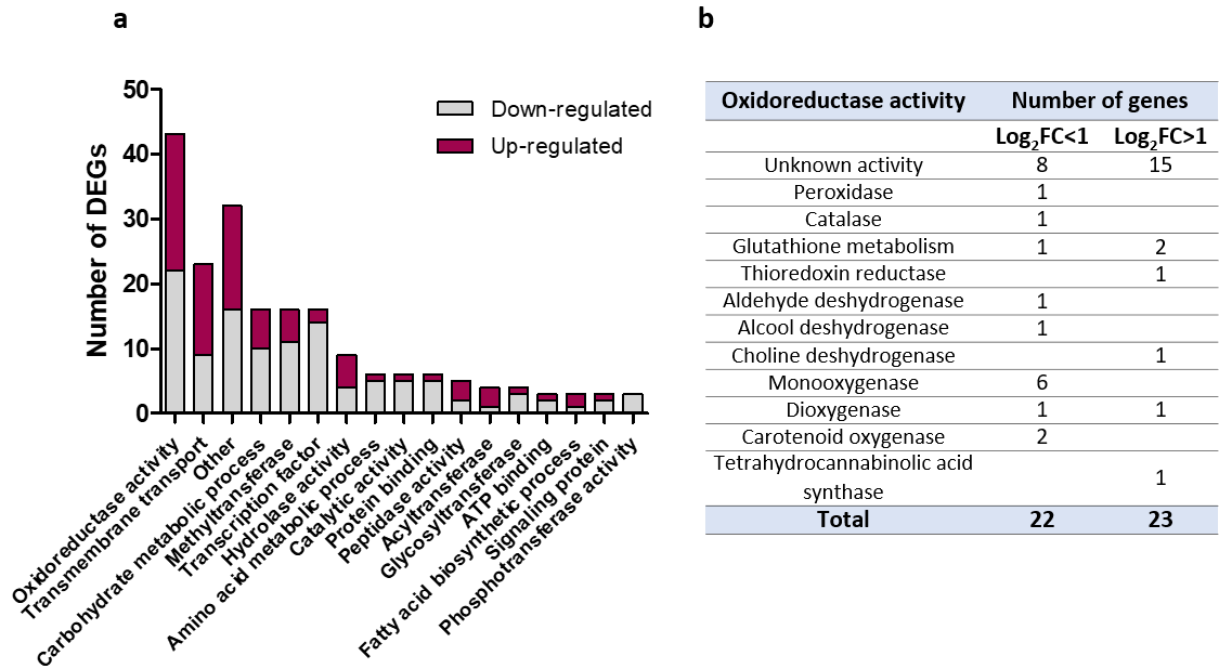
In total, 416 differentially expressed genes (DEGs) were obtained for M1 relative to  $\Delta KU70$ , regardless of the fold change value (FC). Considering only DEGs with a  $|\log_2FC| > 1$  (adjusted p-value < 0.05) resulted in 278 DEGs, including 78 pseudogenes, of which 115 were upregulated and 163 downregulated. Only 110 genes (39.6 %) were assigned with GO terms, including biological processes (n = 67), molecular functions (n = 107), and cellular components (n = 41). In addition, we performed a functional analysis of the resulting proteins using Interproscan, making it possible to associate a function or metabolic pathway with 198 DEGs (71.2 %), of which 83 were upregulated and 115 downregulated (**Figure 9a**).

**Table 2. qPCR validation of RNA-seq results on selected genes.**

Gene CDS ID	Description	M1		
		RNA-seq	qPCR	
		Log <sub>2</sub> FC	p	Log <sub>2</sub> FC
SAPIO_CDS8655	<i>PIG1</i>	<b>-3.7890</b>	4.62E-12	-15.09
SAPIO_CDS5047	Scytalone deshydratase ( <i>SCD</i> )	<b>-6.1180</b>	1.08E-36	-4.825
SAPIO_CDS8657	Tetrahydroxynaphthalene reductase ( <i>THNR</i> )	-1.7735	0.2442	-2.533
SAPIO_CDS8658	Conidial yellow pigment biosynthesis polyketide synthase ( <i>PKS</i> )	<b>-1.7835</b>	0.0011	-2.133
SAPIO_CDS8659	iron transport multicopper oxidase FET3 ( <i>ABR1</i> )	-0.8088	0.1608	-0.881
SAPIO_CDS6958	Conidiation specific protein-6 ( <i>CON6</i> )	<b>-3.1829</b>	0.0298	-3.343
SAPIO_CDS1830	Thioredoxin reductase	1.5835	0.2752	0.5800
SAPIO_CDS8079	Peptidase C2, calpain family	<b>-5.2099</b>	1.60E-10	-5.305

Log<sub>2</sub>FC: mean values from four independent biological replicates. Statistically significant differential gene expression values (log<sub>2</sub>FC) are shown in bold. M1: transformant derived from the  $\Delta KU70$  strain.

Among DEGs with a known function found in M1, the five most represented functions were associated with oxidoreduction processes (N = 43), transmembrane transport (N = 23), carbohydrate metabolic processes (N = 16), transcription factors (N = 16), and methyltransferases (N = 16) (**Figure 9a**). The significant representation of oxidoreduction enzymes among DEGs in the M1 transformants could at least partially explain some of the phenotypic observations with the recombinant. For example, a number of key proteins involved in conidial protection against oxidative injuries, such as peroxidases, catalases, or glutathione enzymes, appeared to be differentially expressed (**Figure 9b**). Dysregulated enzymes were also involved in cell-wall metabolism included, for example, various glycosidases, a polysaccharide synthase (log<sub>2</sub>FC = -1.2, p = 9.6.10<sup>-5</sup>) and a neutral/alkaline non-lysosomal ceramidase (log<sub>2</sub>FC = -1.45, p = 0.038). Other DEGs potentially related to conidiogenesis were also identified in M1, such as the genes encoding the membrane protein SUR7/RIM9-like (log<sub>2</sub>FC = 2.09, p = 0.0024) and conidiation-specific protein-6 (log<sub>2</sub>FC = -3.18, p = 0.030) (data not shown).



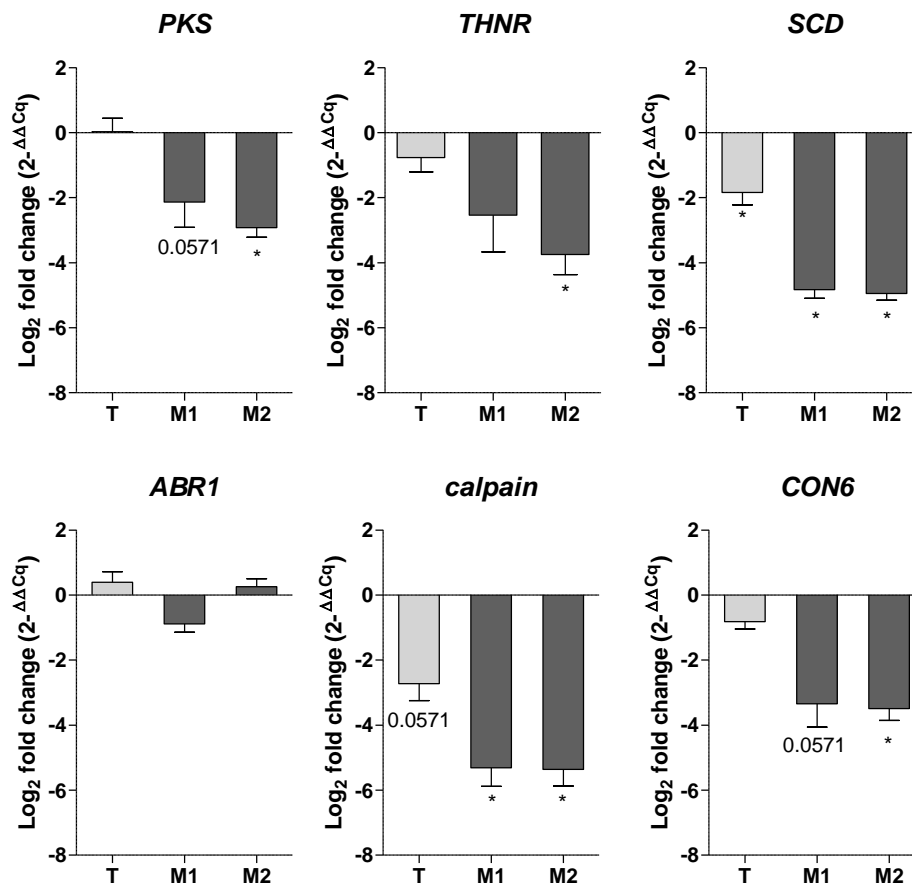
535

536 **Figure 9. Functions of differentially expressed genes (DEGs) in M1 relative to  $\Delta KU70$ .** (a) Distribution of  
 537 functions or metabolic pathways in DEGs with a known function (N = 198). The 80 DEGs with unknown  
 538 function are not included. (b) Detailed functions of DEGs involved in an oxidoreduction process.

539

540 The expression of genes selected for the qPCRs performed to validate the M1 RNA-seq data was also  
 541 explored in the M2 and T strains (**Figure 10**). Interestingly, the scytalone dehydratase-encoding gene was  
 542 the only melanin biosynthesis-related gene found to be downregulated in all three transformants. The  
 543 repression of this key-enzyme from the melanin biosynthesis cascade supports the melanin-deficient  
 544 phenotype observed for the three recombinants.

545



546

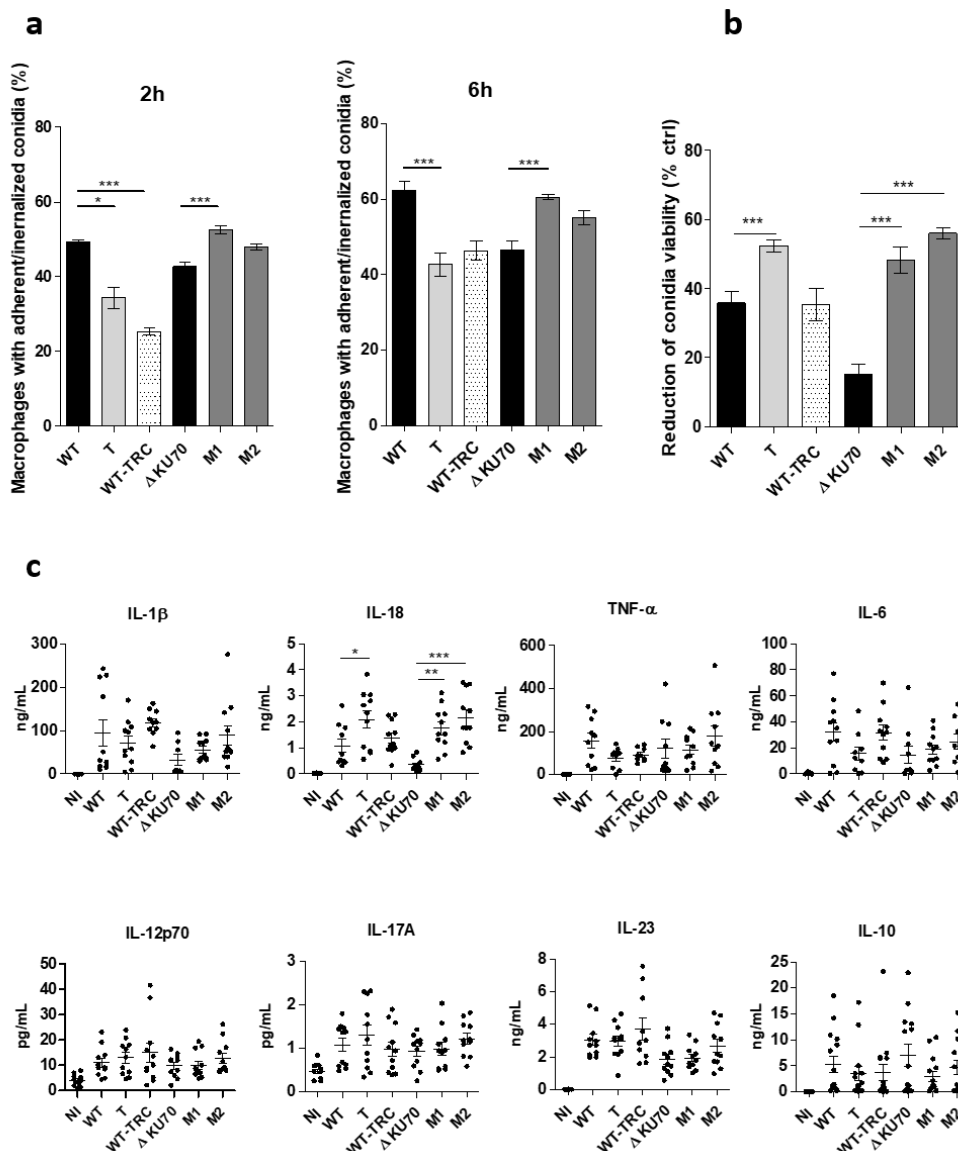
547 **Figure 10. Fold-induction mRNA values for a selected panel of genes in the T, M1, and M2 strains relative**  
 548 **to their parental  $\Delta KU70$  strain.** Expression levels of target genes were normalized against the expression of the *S.*  
 549 *apiospermum* *UBC6* and *FIS1* housekeeping genes. Results are expressed as  $2^{-\Delta\Delta Cq}$ , referring to the fold induction  
 550 in the T, M1, and M2 strains relative to the mean quantification cycle obtained with the parental strains. Data are from  
 551 four biological replicates: \* $p \leq 0.05$  (Mann-Whitney test). T: transformant derived from the WT strain; M1 and M2:  
 552 transformants derived from the  $\Delta KU70$  strain.

### 553 3.7. In-vitro macrophage infection assays

554 The first step of the host immune response to fungal conidia has been shown to be highly dependent  
 555 on the early recognition of cell-wall specific patterns by phagocytic cells. Thus, the objective of these  
 556 experiments was to assess the response of human macrophages exposed to conidia from the three  
 557 melanin-deficient transformants. In particular, a phagocytosis assay was conducted to determine whether  
 558 cell-wall sugar unmasking was associated with easier recognition, binding, and subsequent conidia  
 559 internalization by macrophages. Both M1 and M2 recombinants showed a higher ability to adhere to and  
 560 be internalized by macrophages, as at 6 h post-infection, the percentage of FITC<sup>+</sup> macrophages infected  
 561 with M1 and M2 reached 60.5 % ( $p < 0.001$ ) and 55.1 % (ns), respectively, vs only 46.5 % of  $\Delta KU70$  infected  
 562 cells (**Figure 11a**). Different results were obtained with the WT-derived strains, as the percentages of  
 563 infected macrophages were significantly lower at 2 and 6 h when challenged with the T transformant and  
 564 the TRC-treated WT strain than with the WT strain: 34.3 % ( $p < 0.05$ ) and 25.4 % ( $p < 0.001$ ) vs 49.3 % 2 h  
 565 post-infection. Although the phagocytosis assay resulted in contrasting conclusions between the WT and

566  $\Delta KU70$ -derived strains, the ability of recombinant conidia to survive macrophage killing was equally  
 567 impeded, as shown by the decrease in conidia viability of approximately 50 % for the three transformants  
 568 (48.2-56 %,  $p < 0.001$  versus 35.7 % and 15.2 % for WT and  $\Delta KU70$ ) (**Figure 11b**). By contrast, conidia survival  
 569 of the TRC-grown WT strain grown in TRC was unchanged.

570 The inflammatory macrophage response to the *PIG1*-deficient strains was also indirectly evaluated by  
 571 measuring the level of various pro-inflammatory cytokines released within 12 h post-infection. Although  
 572 there was a trend toward increasing IL-1 $\beta$  release by M1- and M2-infected macrophages, the IL-18  
 573 concentration increased by a factor of 1.9 ( $p < 0.05$ ), 5.0 ( $p < 0.001$ ), and 6.1 ( $p < 0.001$ ) for macrophages  
 574 infected with the T, M1, and M2 transformants, respectively, relative to the parental strain, (**Figure 11c**).  
 575 However, there was no significant change in the level of IL-6, TNF $\alpha$ , IL-12p70, IL-17A, IL-23, or IL-10 released  
 576 by macrophages infected by any of the mutants (**Figure 11c**).



577  
 578 **Figure 11.** Phagocytosis, killing, and cytokine release from human macrophages infected with T, M1 and M2  
 579 conidia. (a) Percentage of macrophages with adherent or ingested conidia after 2 or 6 h of incubation with FITC-  
 580 stained conidia (MOI 5:1) at 37°C in 5 % CO $_2$ . Graphs present the percentage of FITC $^+$  CD11b $^+$  events among CD11b $^+$   
 581 cells (macrophages). (b) Conidia killing after ingestion by macrophages. After 6 h of incubation (MOI 1:1), extracellular  
 582 conidia were removed by three PBS washes and internalized conidia were released by macrophage lysis (cold water).  
 583 The graph presents the decrease in conidia viability among ingested conidia relative to the viability of conidia not

584 (Continuation legend Figure 11)

585 exposed to macrophages (live control). Conidia viability was determined as the percentage of FITC<sup>+</sup> PI<sup>-</sup> events among  
586 FITC<sup>+</sup> events (total conidia). The reduction in conidia survival was calculated relative to control conidia as:  $100 * ((\% \text{ of}$   
587  $\text{live conidia among control conidia} - \% \text{ of live conidia among cell-exposed conidia}) / \% \text{ of live conidia among control}$   
588  $\text{conidia})$ . (c) Cytokine release in culture supernatants from macrophages incubated with conidia for 12 h (MOI 10:1).  
589 Concentrations were determined using a 13 plex-bead-based LEGENDplex<sup>®</sup> multianalyte flow assay. A non-infected  
590 (NI) condition was included in each experiment. Data are from three independent experiments. T: transformant  
591 derived from the WT strain; M1 and M2: transformants derived from the  $\Delta KU70$  strain.

592

#### 593 4. Discussion

594 The relevance of DHN-melanin in fungal virulence has been increasingly assessed in recent decades  
595 for both plant and human pathogens. In addition to protecting fungal structures from environmental  
596 stresses, the melanin layer of the conidia cell wall has been recognized in certain genera to be an effective  
597 camouflage against the host immune system. In certain phytopathogens in which DHN-melanin has been  
598 extensively explored as a key-component of invasion organs, called appressoria (47), melanin biosynthesis  
599 involves several enzymes under the regulation of conserved and mostly clustered genes. In particular, in  
600 *Magnaporthe oryzae* (28), *Colletotrichum gloeosporioides* (50), *Cochliobolus heterostrophus* (29), and  
601 *Alternaria brassicicola* (31), a transcription factor has been identified within the cluster and numerous  
602 studies have shown its activating role in melanization, which is subsequently related to virulence.

603 As there are only limited data on the intrinsic factors related to *S. apiospermum* pathogenicity, we  
604 aimed to assess the role of the transcription factor *PIG1* in the biosynthesis of DHN-melanin in *S.*  
605 *apiospermum* conidia. As an ortholog gene encoding the *PIG1* transcription factor was identified in the *S.*  
606 *apiospermum* genome, a CRISPR-Cas9-mediated *PIG1* deletion was conducted on two melanized *S.*  
607 *apiospermum* strains, the WT reference 14462 strain and a  $\Delta KU70$  deleted strain derived from the  
608 reference strain. Three melanin-deficient recombinants displaying white colonies were obtained, although  
609 the complete *PIG1* deletion was obtained only in the two  $\Delta KU70$ -derived mutants. Unexpectedly, the  
610 14462 WT-derived T strain integrated the repair template upstream of *PIG1*, probably resulting from  
611 ectopic insertion in this area rather than from homologous recombination. This phenomenon may have  
612 been favored by the double-strand break induced by Cas9. Thus, the *HPH*-encoded phosphotransferase  
613 responsible for hygromycin resistance may have merged with *PIG1*. However, the mutant T strain was  
614 indeed able to grow similarly in the presence of hygromycin as the  $\Delta KU70$ -derived mutants, and the  
615 function of *PIG1* was apparently hampered, as shown by the absence of melanin in the conidia. Such  
616 protein dysfunction contrasts with the increased production of *PIG1* mRNA that was observed, probably  
617 resulting from a compensatory feedback loop.

618 For the first time, the phenotype of melanin-lacking spores of *S. apiospermum* was deeply explored,  
619 emphasizing the major structural role of DHN-melanin in the conidia cell wall. It is commonly thought that  
620 DHN-melanin plays an essential role in the protection of pathogenic fungi in various complex natural  
621 stressful environments, and such a role was extensively assessed in this study. The reduced susceptibility  
622 of melanized strains to heat relative to their  $\Delta PIG1$  melanin-deficient disruptants probably reflects the  
623 capacity of melanin to absorb and dissipate heat energy and shield against heat damage (47,51). Similar

624 observations were previously made in  $\Delta PKS$  *E. dermatitidis* mutants and in *Verticillium dahliae* with a  
625 deletion of *CMR1*, an ortholog of *PIG1*, when exposed to heat stress (20,52). Similarly, DHN-melanin has  
626 been commonly associated with fungal protection against stress that triggers cell damage, such as  
627 electromagnetic radiation and oxidants (53–55,11). This is what we observed in the  $\Delta KU70$  strain exposed  
628 to UV-C light relative to both the  $\Delta KU70$ -derived M1 and M2 recombinants. By contrast, the WT strain  
629 showed much lower UV resistance than its derived  $\Delta KU70$  strain and paradoxically, its melanin-deficient  
630 derived recombinant tended to be more resistant to UV light. Indeed, there are contradictory reports about  
631 the role of DHN melanin in protecting fungi against UV. On the one hand, several reports have shown lower  
632 survival of melanin-lacking conidia upon UV exposure, as observed in  $\Delta PKS$  mutants of *Lomentospora*  
633 *prolificans* (26), and  $\Delta AMR1$  mutants of *Alternaria brassicicola*, in which the germination rate was  
634 significantly reduced after UV exposure. On the other hand, melanin has appeared to be dispensable for  
635 the response to UV irradiation, for example in  $\Delta CMR1$  and  $\Delta PKS$  mutants of *Colletotrichum gloeosporioides*  
636 (50) or  $\Delta ALB1$  mutants of *Talaromyces marneffeii*. Interestingly, in *A. fumigatus*, Blachowicz *et al.* showed  
637 that the UV-C-protective property of DHN-melanin was strain-dependent and that other secondary  
638 metabolites with an aromatic structure, such as fumiquinazoline C, could be protective against UV damage  
639 (56). Therefore, given the transcriptional activity of *PIG1*, the loss of this function in the three recombinants  
640 could induce multiple changes in gene expression, especially for genes related to the synthesis of  
641 secondary metabolites, which might also affect the response to UV-C and explain the discrepant results.  
642 Of note, the heterogeneous phenotype between the two melanized parental strains observed for some  
643 assays, in particular those dedicated to evaluating UV resistance and biofilm formation, could be possibly  
644 related to the higher melanin content in  $\Delta KU70$  conidia, as well as the absence of the *KU70* protein itself.  
645 Indeed, although the benefit of *KU70* deletion is widely recognized to facilitate genetic transformation in  
646 fungi, the loss of this component of the nonhomologous end-joining pathway involved in DNA double-  
647 strand break repair could also have an impact on other physiological processes, which has never been  
648 specifically explored.

649 In addition, we highlight a reduced ability of *PIG1* recombinants to grow in contact with oxidative  
650 chemicals, in particular, cumene. Such increased vulnerability may result from a combination of several  
651 mechanisms. First, the radical structure of DHN-melanin provides free radical scavenging properties, which  
652 could explain why, in addition to the loss of cell-wall integrity, the three melanin-deficient mutants were  
653 less resistant to oxidizing molecules. Another important point is that fungi, *Scedosporium* in particular,  
654 possess a considerable enzymatic arsenal capable of detoxifying numerous toxic compounds, especially  
655 those that induce oxidative stress (57,58). Thus, in the M1 recombinant we highlight the dysregulation of  
656 various enzymes that play a role in oxidoreduction processes, such as the protection against oxidative  
657 stress, for example, through glutathione metabolism. It is therefore likely that certain overexpressed  
658 enzymes, such as thioredoxin reductase, shown in the M1 disruptant, play a role in the detoxification of  
659 menadione-generated superoxides. Interestingly, contrary to what had been previously published in *A.*  
660 *fumigatus*, Keizer *et al.* recently demonstrated that DHN-melanin is not involved in the protection of  
661 conidia against hydrogen peroxide and superoxide and that the vulnerability of *PKS* mutants exposed to  
662  $H_2O_2$  was not due to the *PKS* deletion but was rather the consequence of an additional mutation that  
663 occurred in a catalase-encoding gene (59). In *Hortaea werneckii*, melanin was also shown to not play a role  
664 in survival under oxidative stress (60). Indeed, these studies emphasize the complex and variable role of

665 melanin in protection against various stresses among fungi, showing that conclusions should be carefully  
666 drawn.

667 Consistent with the resistance to chemical stress, melanization of the fungal cell wall has also been  
668 linked to antifungal resistance, especially for *C. neoformans*, *Histoplasma capsulatum* (18), and *Exophiala*  
669 *dermatitidis* against AmB (20) or *Madurella mycetomatis* against azoles (61). However, this association  
670 appears to be inconsistent, as no clear correlation between melanin and antifungal resistance was shown  
671 in other studies on *Exophiala dermatitidis* or *Paracoccidioides* (62,63). Contrasting results were obtained  
672 by Al-Laaiby *et al.* with the naturally AmB-resistant *L. prolificans*, who showed that  $\Delta$ PKS albino mutants  
673 paradoxically displayed increased growth in the presence of AmB (26). Although the susceptibility to  
674 triazoles and anidulafungin was unchanged by *PIG1* deletion in *S. apiospermum*, the M1 and M2  
675 disruptants recovered AmB susceptibility relative to the parental  $\Delta$ KU70. Of note, the mechanism  
676 explaining the lower susceptibility of the  $\Delta$ KU70 strain to AmB than the 14462 WT strain is still unclear.  
677 Nonetheless, independently of DHN-melanin, the restored susceptibility of the  $\Delta$ KU70-derived  
678 recombinants to AmB may be linked to the downregulation of certain key-antioxidative enzymes, such as  
679 catalases, as shown by the transcriptomic analysis. Indeed, the AmB resistance of *Scedosporium* /  
680 *Lomentospora* has been recently shown to be associated with the ability to thwart the cellular redox  
681 imbalance triggered by AmB through potent activity of antioxidative enzymes (64).

682 Moreover, several unexpected phenotypes were observed in the *PIG1* recombinants that cannot be  
683 directly linked to melanin-deficiency. The conidia morphology of the three recombinants appeared to be  
684 equally affected, showing aberrant septate and large conidia, contrasting with the regular and ovoid  
685 unicellular spores released by the parental strains and tricyclazole-treated conidia. However, no change in  
686 conidia shape has previously been shown to be associated with melanin deficiency due to the specific  
687 disruption of genes encoding biosynthetic enzymes, such as polyketide synthase or scytalone dehydratase.  
688 This observation has also never been reported for mutants with the deletion of *PIG1* orthologs from fungi  
689 producing monocellular conidia (50,65). By contrast, in some genera that normally produce pluricellular  
690 conidia, a reduced number of conidia septations has previously been reported, such as for conidia from  
691 CMRA-deleted *Alternaria alternata* (66) or tricyclazole-exposed *Bipolaris* (67).

692 Thus, the aberrant conidial morphology led us to hypothesize that changes occurred in the regulation  
693 of enzymes involved in cell-wall construction, *i.e.*, glucanases and others, that were due more to other  
694 regulatory functions of *PIG1* than being directly related to the absence of melanin. Thus, we analyzed the  
695 global transcriptome of M1 relative to its parental strain  $\Delta$ KU70 to identify differentially expressed genes  
696 (DEGs) that could explain the observed phenotype. Interestingly, a significant number of genes encoding  
697 hydrolases, glycosyltransferases, and other enzymes involved in carbohydrate metabolic processes were  
698 differentially regulated in the M1 recombinant. The complexity of the cell-wall architecture, which is still  
699 partially unresolved, did not allow us to definitively identify the differentially expressed gene(s) responsible  
700 for the presence of compartmentalized conidia.

701 However, although the process or functions could not be determined for all DEGs, several important  
702 enzymes dedicated to processes associated with cell-wall metabolism were overexpressed in M1 relative  
703 to WT, such as a neutral/alkaline ceramidase and a homolog of the Sur7/pal I-like protein. The fungal cell  
704 wall is a dynamic and complex structure in which polysaccharides, oligosaccharides, lipids, and proteins



705 are intertwined (21). In *Scedosporium*, glycosphingolipids are components of the plasma membrane, the  
706 cell wall, and extracellular vesicles involved in fungal growth and virulence (23,68). In particular,  
707 glucosylceramides (GlcCer) are major neutral sphingolipids bound to the fungal cell surface, characterized  
708 by a fatty-acid chain bound to a sphingosine and a sugar unit (69) and highly conserved among pathogenic  
709 fungi, such as *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, and *Aspergillus nidulans* (70–72). The crucial role  
710 of GlcCer in fungal physiology, *i.e.*, in cell division, growth, alkaline tolerance, the promotion of virulence,  
711 and modulation of the host immune response (73), and their unique structure compared to the  
712 components of mammalian cells, make them interesting targets for new antifungal strategies (74,75). Such  
713 strategies could combine, for example, an anti-GlcCer Mab to a conventional antifungal (22). In addition,  
714 in *Fusarium graminearum*,  $\Delta$ FGMT2 mutants lacking sphingolipid C-9 methyltransferase were shown to  
715 produce aberrant conidia of altered size and morphology (76). Although there are some data on the  
716 essential role of GlcCer in fungal homeostasis, there is no data on the specific role of the neutral and  
717 alkaline ceramidases that regulate ceramide and sphingosine levels, *a fortiori* in *S. apiospermum*. Thus, the  
718 overexpression of a neutral/alkaline ceramidase resulting from *PIG1* inactivation in the  $\Delta$ *PIG1* recombinant  
719 may hinder normal physiology, but this hypothesis is yet to be specifically addressed.

720 In addition, the SUR7-PALI-encoding gene was overexpressed in the M1 recombinant. Almost  
721 exclusively studied in yeast, SUR7 has been described as a crucial transmembrane protein that acts as an  
722 anchoring protein for eisosomes to the plasma membrane and might play a role in membrane pH sensors  
723 and hyphal formation. In *Candida albicans*,  $\Delta$ SUR7 mutants showed alterations of cell wall (1,3)- $\beta$ -D-glucan  
724 and increased chitin synthesis (77), increased sensitivity to cell-wall perturbing chemicals, and impaired  
725 invasive growth and virulence (78,79). Similar observations have been made for the insect-pathogenic  
726 filamentous fungus *Beauveria bassiana*, in which the deletion of Sur7 also resulted in reduced and impaired  
727 conidiation *i.e.*, increased size and density, a lag in germination, and a reduction in the number of  
728 carbohydrate epitopes (80). Given the significant role of SUR7 in cell-wall assembly and integrity, the  
729 overexpression of SUR7 observed in the  $\Delta$ *PIG1* recombinant of *S. apiospermum* could be part of a  
730 compensatory mechanism triggered by the removal of the melanin layer and subsequent cell-wall  
731 disorganization. Finally, little is known about the function of conidiation specific protein 6 (CON6), which  
732 was downregulated in the two  $\Delta$ *PIG1* recombinants. Initially described in *Neurospora crassa*, a filamentous  
733 fungus used as a model for studies on developmental processes, the transcription of this regulatory gene  
734 increases during conidiation and following exposure of vegetative mycelia to light (81,82). However, its  
735 exact function and association with the phenotype of the *PIG1* mutants are still unknown.

736 In recent years, our understanding of host-fungi interactions has led to a great interest in deciphering  
737 the role of surface cell-wall components in fungal virulence, with specific attention on DHN-melanin. In  
738 *Scedosporium* species, polysaccharides and peptidopolysaccharides are especially relevant for the  
739 architecture of the conidia cell wall and several are immunologically active, with great potential as  
740 regulators of pathogenesis and the host immune response. For example, a significant reduction in both  
741 phagocytosis and killing of *S. apiospermum* conidia was demonstrated using anti-peptidoramnomannan  
742 mAbs in murine macrophage-like cells relative to control conidia (83). Here, the removal of DHN-melanin  
743 resulted in equally higher exposure of underlying cell-wall polysaccharides in the three mutants, potentially  
744 increasing the availability of surface antigenic patterns and conidia recognition by phagocytic cells. Thus,

we assessed the *in-vitro* response of human macrophages to infection by *PIG1* recombinants relative to their parental strains. The uptake (adherence) of M1 and M2 conidia by macrophages was facilitated relative to that of the  $\Delta KU70$  strain, consistent with the results of previous studies conducted on melanin-deficient fungi showing that the internalization of albino conidia by macrophages was either unchanged or facilitated (84–86). Although contradictory results were obtained with the WT-derived recombinant, which led to decreased phagocytosis/adherence, conidial killing of the three melanin-deficient recombinants was equally enhanced. The mechanism to explain why the T recombinant was less adherent / internalized than the WT strain is unclear, but modifications of the conidia surface in this latter mutant could have lowered its adherence, as supported by the biomass assay, which showed its decreased ability to form biofilms on inert material.

## 5. Conclusions

Overall, we demonstrate that the transcription factor *PIG1* regulates the DHN-melanin biosynthetic pathway in *S. apiospermum* through the construction of *PIG1*-deleted strains, which displayed phenotypic features similar to previously described *PKS*-disrupted fungi. Supported by the transcriptomic analysis, this study highlights the pleiotropic action of *PIG1* in *S. apiospermum* beyond melanin regulation, including on the cell-wall architecture and enzymatic pathways. This is the first study to decipher the role of DHN-melanin in *S. apiospermum*, supporting its crucial importance in the maintenance of cell-wall integrity and protection of conidia against environmental damage and macrophage killing. Although, we were unable to determine whether certain phenotypic observations were attributed directly to the loss of the melanin layer or due to a collateral effect of *PIG1* loss of function, we provide evidence for the involvement of *PIG1* / melanin in the pathogenicity of *Scedosporium*.

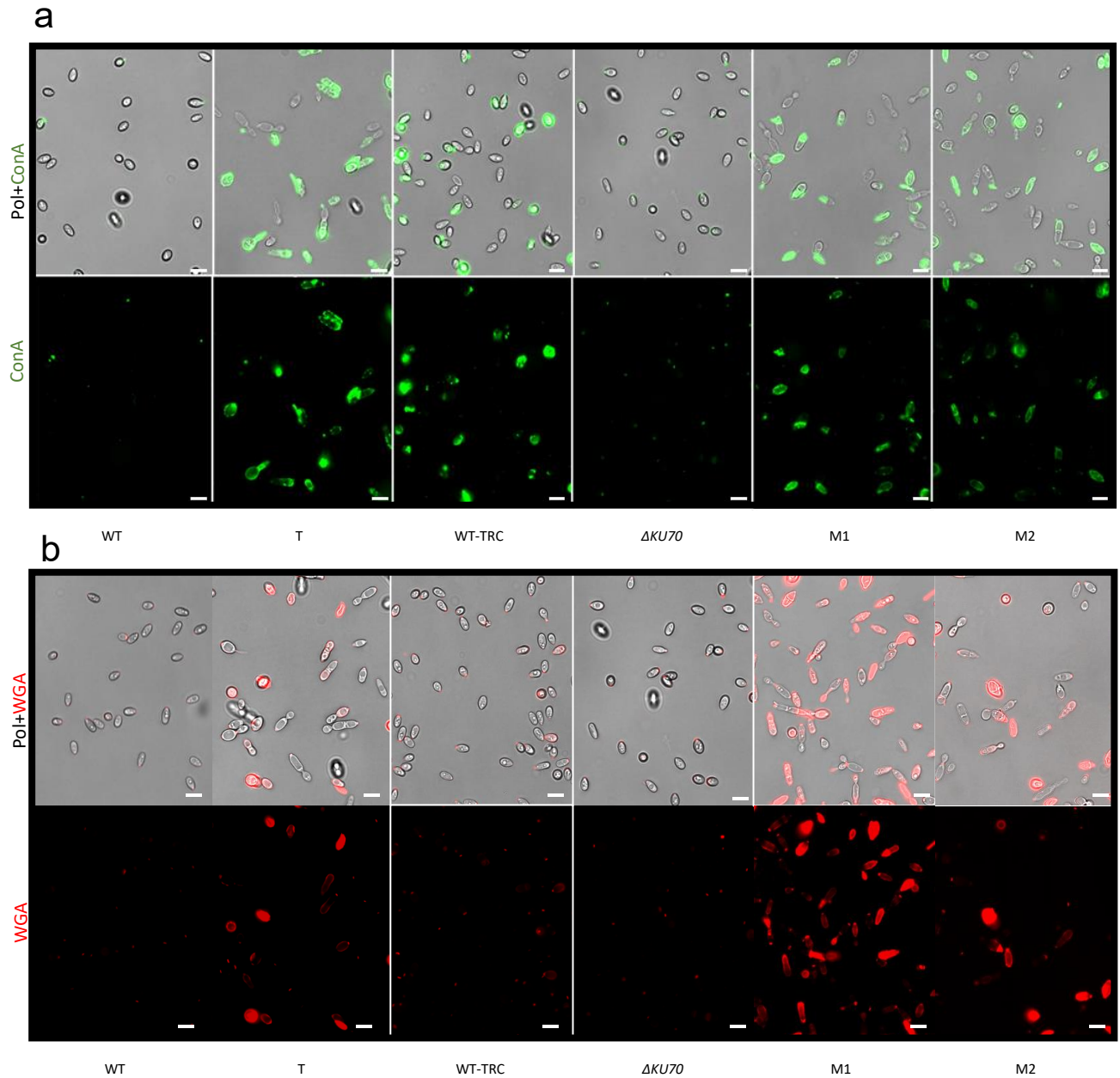
This study provides new insights on the melanization process of *S. apiospermum* and paves the way for further research on DHN-melanin as a potential therapeutic target in a fungus with low susceptibility to most current antifungal options.

### Supplementary Materials:

**Figure S1.** Fluorescence labelling of conidia surface carbohydrates with FITC-conjugated lectins.

**Table S1.** Nucleotide sequence of constructs and primers used in the study.

**Table S2.** Summary of RNA-Seq quality data of M1 and its  $\Delta KU70$  parental strain. Four biological repeats were performed for each isolate.



778 **Figure S1. Fluorescence labelling of conidia surface carbohydrates with FITC-conjugated lectins.**  
779 Representative images from fluorescence acquisition of conidia stained with Concanavalin A (a) or WGA  
780 (b), which bind to mannosyl and glucosyl residues and N-acetylglucosamine residues, respectively. Image  
781 acquired using an Olympus IX71 widefield inverted fluorescence microscope using a 20× magnification  
782 lens. Scale bar: 10 $\mu$ m.

783  
784

785

**Table S1. Nucleotide sequence of constructs and primers used in the study**

Gene target	Sequence (5'-3')	Application
crRNA protospacer ( <i>PIG1</i> )	GACGGCCAAGCAACTTGTGG	Crispr-Cas9 construction
tracrRNA	GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT AAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAAC TTGAAAAGTGGCA CCGAGTCGGTGCT	
Up-stream and down-stream region of <i>PIG1</i> (SAPIO_CDS8655)	F- TGTGACACAAGGCTTATACC R- TACGAGCGAGCCTTTTGTCT	PCR (verification of <i>PIG1</i> deletion)
<i>FIS1</i> (SAPIO_CDS7496)	F-GATCAGTTCGAGAAGGAGGG R- GGAAGATGTCGGAGAGGAGA	RT-qPCR (RNA-seq validation)
<i>UBC6</i> Ubiquitin-conjugating enzyme E2 J2 (SAPIO_CDS4581)	F-GAGAACCCGCCACCATACA R-CAATACTGGCCGCATGGTA	
<i>PIG1</i> (SAPIO_CDS8655)	F-TTTGGGTGCTTGAGTGGGGATAA R-GCCGTATCGTGGAAACAAGCTCAAT	
Tetrahydroxynaphthalene reductase (SAPIO_CDS8657)	F-GGGCAAGGTCGCTGTAGTCA R-TGGGGTTGGTGCCGAAAGAC	
Polyketide synthase (SAPIO_CDS8658)	F- AGAAGTCGATGGCTTGACGAGG R- GGCAGTCCAATCTTCAGGCTCT	
Iron transport multicopper oxidase (ABR1, SAPIO_CDS8659)	F-CCACCGGGCGAAAGTATTGTGT R-CGTCGGGGTATTGTGCCATGTT	
Scytalone deshydratase (SAPIO_CDS5047)	F- CACCCTCAAGACGCAGCACT R- CCCGTCCACCCTCTATACCAA	
Peptidase C2, calpain family (SAPIO_CDS8079)	F-AGGTTTGCCTCGTGTGCAT R-ATCATGCGCCTTTTCATGCCCT	
Conidiation specific protein-6 (SAPIO_CDS6958)	F-AGATTGACACCTCTCCTAGCGCC R-TGCTTCCCGTTTGGCCTCCT	
Thioredoxin reductase (SAPIO_CDS1830)	F-GACGTGAATCCTGCCACTTT R-ACCGAGAATGTCACCCTGTA	

786

F: forward primer, R: reverse primer.

787

788

**Table S2. Summary of RNA-Seq quality data of M1 and its  $\Delta KU70$  parental strain.** Four biological repeats were performed for each isolate.

789

Index	$\Delta KU70$				M1			
	1	2	3	4	1	2	3	4
Total reads (millions)	17.6	20.6	20.8	20.7	19.8	12.7	20.6	17.3
Total assigned reads (millions)	11.7	12.3	15.0	14.6	10.4	9.4	14.6	11.2
% assigned reads	66.2	59.8	71.8	70.3	70.7	74.1	70.4	64.7
Q30%	95.7	95.6	95.4	95.5	95.8	95.5	95.7	95.7
GC%	53.0	52.0	53.7	53.5	53.3	55.0	53.5	52.9

790

Q30%: proportion of reads with a quality value > 30 after filtering; GC%: proportion of guanidine and cytosine nucleotides among total nucleotides after filtering.

791

792

793  
794  
795  
796  
797  
798  
799  
  
800  
801  
802  
803  
804  
  
805  
  
806  
  
807  
808  
  
809  
810  
811  
812  
  
813  
  
814  
  
815

**Author Contributions:** Conceptualization: H.G., S.G., and A.G.; methodology: H.G., K.R., W.P., O.S., and S.G.; software: D.D. and X.P.; validation: H.G.; formal analysis: H.G.; investigation: H.G., K.R., W.P., A.D., I.G., and S.D.; resources: H.G.; writing—original draft preparation: H.G. and K.R.; writing—review and editing: H.G., S.G., A.G., and J-P.G.; visualization: H.G. and K.R.; supervision: S.G., J-P.G., and A.G.; project administration: S.G.; funding acquisition: J-P.G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by CHU de Rennes/Prof. J-P Gangneux, grant ATCF 2018-2022, and by the Institut de Parasitologie de l'Ouest (IPO, Rennes), grant to Dr H Guegan (#IPO-2019). During this work, Wilfried Poirier and Kevin Ravenel benefited from a doctoral contract funded respectively by the University of Angers (France), and the University of Angers and Angers Loire Metropole, which are gratefully acknowledged.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

**Acknowledgments:** The authors thank the University of Angers, SCIAM Microscopy Core Facility, SFR ICAT, F-49000 Angers, France, where the TEM images were produced with the help of Florence, the Biomics platform at Pasteur institute (Paris, France), and Alex Edelman's Company for English-language revision.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

816 **References**

- 817 1. Cortez KJ, Roilides E, Quiroz-Telles F, Meletiadis J, Antachopoulos C, Knudsen T, et al. Infections caused  
818 by *Scedosporium* spp. Clin Microbiol Rev. 2008;21(1):157-97.
- 819 2. Cimon B, Carrère J, Vinatier JF, Chazalette JP, Chabasse D, Bouchara JP. Clinical Significance of  
820 *Scedosporium apiospermum* in Patients with Cystic Fibrosis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis.  
821 2000;19(1):53-6.
- 822 3. Sedlacek L, Graf B, Schwarz C, Albert F, Peter S, Würstl B, et al. Prevalence of *Scedosporium* species  
823 and *Lomentospora prolificans* in patients with cystic fibrosis in a multicenter trial by use of a selective  
824 medium. J Cyst Fibros. 2015;14(2):237-41.
- 825 4. Blyth CC, Middleton PG, Harun A, Sorrell TC, Meyer W, Chen SCA. Clinical associations and prevalence  
826 of *Scedosporium* spp. in Australian cystic fibrosis patients: identification of novel risk factors? Med Mycol.  
827 2010;48(Suppl 1):S37-44.
- 828 5. Seidel D, Hassler A, Salmanton-García J, Koehler P, Mellinghoff SC, Carlesse F, et al. Invasive  
829 *Scedosporium* spp. and *Lomentospora prolificans* infections in pediatric patients: Analysis of 55 cases from  
830 FungiScope® and the literature. Int J Infect Dis. 2020;92:114-22.
- 831 6. Bronnimann D, Garcia-Hermoso D, Dromer F, Lanternier F, French Mycoses Study Group,  
832 Characterization of the isolates at the NRCMA. Scedosporiosis/lomentosporiosis observational study  
833 (SOS): Clinical significance of *Scedosporium* species identification. Med Mycol. 2021;59(5):486-97.
- 834 7. Cornely OA, Alastruey-Izquierdo A, Arenz D, Chen SCA, Dannaoui E, Hochhegger B, et al. Global  
835 guideline for the diagnosis and management of mucormycosis: an initiative of the European  
836 Confederation of Medical Mycology in cooperation with the Mycoses Study Group Education and  
837 Research Consortium. Lancet Infect Dis. 2019;19(12):e405-21.
- 838 8. Latgé JP. The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. Trends Microbiol. 2001;9(8):382-9.
- 839 9. Cunha C, Kurzai O, Löffler J, Aversa F, Romani L, Carvalho A. Neutrophil responses to aspergillosis: new  
840 roles for old players. Mycopathologia. 2014;178(5-6):387-93.
- 841 10. Chamilos G, Carvalho A. *Aspergillus fumigatus* DHN-Melanin. Curr Top Microbiol Immunol.  
842 2020;425:17-28.
- 843 11. Langfelder K, Streibel M, Jahn B, Haase G, Brakhage AA. Biosynthesis of fungal melanins and their  
844 importance for human pathogenic fungi. Fungal Genetics and Biology. 2003;38:143-58.
- 845 12. van de Veerdonk FL, Gresnigt MS, Romani L, Netea MG, Latgé JP. *Aspergillus fumigatus* morphology  
846 and dynamic host interactions. Nat Rev Microbiol. 2017;15(11):661-74.
- 847 13. Feng B, Wang X, Hauser M, Kaufmann S, Jentsch S, Haase G, et al. Molecular cloning and  
848 characterization of WdPKS1, a gene involved in dihydroxynaphthalene melanin biosynthesis and virulence  
849 in *Wangiella (Exophiala) dermatitidis*. Infect Immun. 2001;69(3):1781-94.
- 850 14. Xiao X, Li Y, Lan Y, Zhang J, He Y, Cai W, et al. Deletion of pksA attenuates the melanogenesis, growth  
851 and sporulation ability and causes increased sensitivity to stress response and antifungal drugs in the  
852 human pathogenic fungus *Fonsecaea monophora*. Microbiological Research. 2021;244:126668.
- 853 15. Chai LYA, Netea MG, Sugui J, Vonk AG, van de Sande WWJ, Warris A, et al. *Aspergillus fumigatus*  
854 Conidial Melanin Modulates Host Cytokine Response. Immunobiology. 2010;215(11):915-20.

- 855 16. Heinekamp T, Thywißen A, Macheleidt J, Keller S, Valiante V, Brakhage AA. *Aspergillus fumigatus*  
856 melanins: interference with the host endocytosis pathway and impact on virulence. *Front Microbiol.*  
857 2012;3:440.
- 858 17. Jahn B, Koch A, Schmidt A, Wanner G, Gehringer H, Bhakdi S, et al. Isolation and characterization of a  
859 pigmentless-conidium mutant of *Aspergillus fumigatus* with altered conidial surface and reduced  
860 virulence. *Infect Immun.* 1997;65(12):5110-7.
- 861 18. van Duin D, Casadevall A, Nosanchuk JD. Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma*  
862 *capsulatum* Reduces Their Susceptibilities to Amphotericin B and Caspofungin. *Antimicrob Agents*  
863 *Chemother.* 2002;46(11):3394-400.
- 864 19. Wang Y, Casadevall A. Growth of *Cryptococcus neoformans* in presence of L-dopa decreases its  
865 susceptibility to amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994;38(11):2648-50.
- 866 20. Paolo WF, Dadachova E, Mandal P, Casadevall A, Szaniszló PJ, Nosanchuk JD. Effects of disrupting the  
867 polyketide synthase gene *WdPKS1* in *Wangiella [Exophiala] dermatitidis* on melanin production and  
868 resistance to killing by antifungal compounds, enzymatic degradation, and extremes in temperature. *BMC*  
869 *Microbiol.* 2006;6:55.
- 870 21. Rollin-Pinheiro R, Xisto MID da S, Rochetti VP, Barreto-Bergter E. *Scedosporium* Cell Wall: From  
871 Carbohydrate-Containing Structures to Host-Pathogen Interactions. *Mycopathologia.*  
872 2020;185(6):931-46.
- 873 22. Rollin-Pinheiro R, Liporagi-Lopes LC, de Meirelles JV, Souza LM de, Barreto-Bergter E. Characterization  
874 of *Scedosporium apiospermum* glucosylceramides and their involvement in fungal development and  
875 macrophage functions. *PLoS One.* 2014;9(5):e98149.
- 876 23. Rochetti VP, Rollin-Pinheiro R, de Oliveira EB, Xisto MID da S, Barreto-Bergter E. Glucosylceramide  
877 Plays a Role in Fungal Germination, Lipid Raft Organization and Biofilm Adhesion of the Pathogenic Fungus  
878 *Scedosporium aurantiacum*. *J Fungi (Basel).* 2020;6(4):E345.
- 879 24. de Meirelles JV, Xisto MID da S, Rollin-Pinheiro R, Serrato RV, Haido RMT, Barreto-Bergter E.  
880 Peptidorhamanomanan: A surface fungal glycoconjugate from *Scedosporium aurantiacum* and  
881 *Scedosporium minutisporum* and its recognition by macrophages. *Med Mycol.* 2021;59(5):441-52.
- 882 25. Ruiz-Díez B, Martínez-Suárez JV. Isolation, characterization, and antifungal susceptibility of melanin-  
883 deficient mutants of *Scedosporium prolificans*. *Curr Microbiol.* 2003;46(3):228-32.
- 884 26. Al-Laeiby A, Kershaw MJ, Penn TJ, Thornton CR. Targeted Disruption of Melanin Biosynthesis Genes  
885 in the Human Pathogenic Fungus *Lomentospora prolificans* and Its Consequences for Pathogen Survival.  
886 *Int J Mol Sci.* 2016;17(4):444.
- 887 27. Vandeputte P, Ghamrawi S, Rechenmann M, Iltis A, Giraud S, Fleury M, et al. Draft Genome Sequence  
888 of the Pathogenic Fungus *Scedosporium apiospermum*. *Genome Announc.* 2014;2(5):e00988-14.
- 889 28. Tsuji G, Kenmochi Y, Takano Y, Sweigard J, Farrall L, Furusawa I, et al. Novel fungal transcriptional  
890 activators, *Cmr1p* of *Colletotrichum lagenarium* and *pig1p* of *Magnaporthe grisea*, contain Cys2His2 zinc  
891 finger and Zn(II)2Cys6 binuclear cluster DNA-binding motifs and regulate transcription of melanin  
892 biosynthesis genes in a developmentally specific manner. *Mol Microbiol.* 2000;38(5):940-54.
- 893 29. Eliahu N, Igbaria A, Rose MS, Horwitz BA, Lev S. Melanin biosynthesis in the maize pathogen  
894 *Cochliobolus heterostrophus* depends on two mitogen-activated protein kinases, Chk1 and Mps1, and the  
895 transcription factor *Cmr1*. *Eukaryot Cell.* 2007;6(3):421-9.

- 896 30. Wang T, Ren D, Guo H, Chen X, Zhu P, Nie H, et al. CgSCD1 Is Essential for Melanin Biosynthesis and  
897 Pathogenicity of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Pathogens*. 2020;9(2):E141.
- 898 31. Cho Y, Srivastava A, Ohm RA, Lawrence CB, Wang KH, Grigoriev IV, et al. Transcription factor Amr1  
899 induces melanin biosynthesis and suppresses virulence in *Alternaria brassicicola*. *PLoS Pathog*.  
900 2012;8(10):e1002974.
- 901 32. Le Govic Y, Havlíček V, Capilla J, Luptáková D, Dumas D, Papon N, et al. Synthesis of the Hydroxamate  
902 Siderophore N  $\alpha$ -Methylcoprogen B in *Scedosporium apiospermum* Is Mediated by sidD Ortholog and Is  
903 Required for Virulence. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020;10:587909.
- 904 33. Al Abdallah Q, Ge W, Fortwendel JR. A Simple and Universal System for Gene Manipulation in  
905 *Aspergillus fumigatus*: In Vitro-Assembled Cas9-Guide RNA Ribonucleoproteins Coupled with  
906 Microhomology Repair Templates. *mSphere*. 2017;2(6):e00446-17.
- 907 34. Pateau V, Razafimandimby B, Vandeputte P, Thornton CR, Guillemette T, Bouchara JP, et al. Gene  
908 Disruption in *Scedosporium aurantiacum*: Proof of Concept with the Disruption of SODC Gene Encoding a  
909 Cytosolic Cu,Zn-Superoxide Dismutase. *Mycopathologia*. 2018;183(1):241-9.
- 910 35. Rollin-Pinheiro R, de Meirelles JV, Vila TVM, Fonseca BB, Alves V, Frases S, et al. Biofilm Formation by  
911 *Pseudallescheria/Scedosporium* Species: A Comparative Study. *Front Microbiol*. 2017;8:1568.
- 912 36. Mello TP, Aor AC, Gonçalves DS, Seabra SH, Branquinha MH, Santos ALS. Assessment of biofilm  
913 formation by *Scedosporium apiospermum*, *S. aurantiacum*, *S. minutisporum* and *Lomentospora*  
914 *prolificans*. *Biofouling*. 2016;32(7):737-49.
- 915 37. Joubert A, Calmes B, Berruyer R, Pihet M, Bouchara JP, Simoneau P, et al. Laser nephelometry applied  
916 in an automated microplate system to study filamentous fungus growth. *Biotechniques*.  
917 2010;48(5):399-404.
- 918 38. Guinea J, ESCMID E, Antimicrobial S. EUCAST: New version of Broth microdilution of moulds (vs. 9.4)  
919 [Internet]. 2022. Disponible sur: <https://www.eucast.org/>
- 920 39. Cokelaer T, Desvillechabrol D, Legendre R, Cardon M. « Sequana »: a Set of Snakemake NGS pipelines.  
921 *Journal of Open Source Software*. 2017;2(16):352.
- 922 40. Köster J, Rahmann S. Snakemake—a scalable bioinformatics workflow engine. *Bioinformatics*.  
923 2012;28(19):2520-2.
- 924 41. Chen S, Zhou Y, Chen Y, Gu J. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics*.  
925 2018;34(17):i884-90.
- 926 42. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq  
927 aligner. *Bioinformatics*. 2013;29(1):15-21.
- 928 43. Liao Y, Smyth GK, Shi W. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence  
929 reads to genomic features. *Bioinformatics*. 2014;30(7):923-30.
- 930 44. Ewels P, Magnusson M, Lundin S, Käller M. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and  
931 samples in a single report. *Bioinformatics*. 2016;32(19):3047-8.
- 932 45. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data  
933 with DESeq2. *Genome Biology*. 2014;15(12):550.
- 934 46. Staerck C, Yaakoub H, Vandeputte P, Tabiasco J, Godon C, Gastebois A, et al. The  
935 Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Superoxide Dismutase of *Scedosporium apiospermum* Protects  
936 the Conidia from Oxidative Stress. *J Fungi (Basel)*. 2021;7(7):575.



- 937 47. Butler MJ, Day AW. Fungal melanins: a review. Canadian Journal of Microbiology [Internet].  
938 1998;44(12). Disponible sur: <https://cdnsiencepub.com/doi/abs/10.1139/w98-119>
- 939 48. Cunha MML, Franzen AJ, Alviano DS, Zanardi E, Alviano CS, De Souza W, et al. Inhibition of melanin  
940 synthesis pathway by tricyclazole increases susceptibility of *Fonsecaea pedrosoi* against mouse  
941 macrophages. Microsc Res Tech. 2005;68(6):377-84.
- 942 49. Liu XH, Ning GA, Huang LY, Zhao YH, Dong B, Lu JP, et al. Calpains are involved in asexual and sexual  
943 development, cell wall integrity and pathogenicity of the rice blast fungus. Sci Rep. 2016;6(1):31204.
- 944 50. Wang X, Lu D, Tian C. Analysis of melanin biosynthesis in the plant pathogenic fungus *Colletotrichum*  
945 *gloeosporioides*. Fungal Biol. 2021;125(9):679-92.
- 946 51. Rosas AL, Casadevall A. Melanization affects susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to heat and  
947 cold. FEMS Microbiol Lett. 1997;153(2):265-72.
- 948 52. Wang Y, Hu X, Fang Y, Anchieta A, Goldman PH, Hernandez G, et al. Transcription factor VdCmr1 is  
949 required for pigment production, protection from UV irradiation, and regulates expression of melanin  
950 biosynthetic genes in *Verticillium dahliae*. Microbiology (Reading). 2018;164(4):685-96.
- 951 53. Wang Y, Casadevall A. Decreased susceptibility of melanized *Cryptococcus neoformans* to UV light.  
952 Appl Environ Microbiol. 1994;60(10):3864-6.
- 953 54. Dadachova E, Bryan RA, Howell RC, Schweitzer AD, Aisen P, Nosanchuk JD, et al. The radioprotective  
954 properties of fungal melanin are a function of its chemical composition, stable radical presence and spatial  
955 arrangement. Pigment Cell & Melanoma Research. 2008;21(2):192-9.
- 956 55. Casadevall A, Cordero RJB, Bryan R, Nosanchuk J, Dadachova E. Melanin, Radiation, and Energy  
957 Transduction in Fungi. Microbiol Spectr. mars 2017;5(2).
- 958 56. Blachowicz A, Raffa N, Bok JW, Choera T, Knox B, Lim FY, et al. Contributions of Spore Secondary  
959 Metabolites to UV-C Protection and Virulence Vary in Different *Aspergillus fumigatus* Strains. mBio.  
960 2020;11(1):e03415-19.
- 961 57. Staerck C, Vandeputte P, Gastebois A, Calenda A, Giraud S, Papon N, et al. Enzymatic Mechanisms  
962 Involved in Evasion of Fungi to the Oxidative Stress: Focus on *Scedosporium apiospermum*.  
963 Mycopathologia. 2018;183(1):227-39.
- 964 58. Staerck C, Tabiasco J, Godon C, Delneste Y, Bouchara JP, Fleury MJJ. Transcriptional profiling of  
965 *Scedosporium apiospermum* enzymatic antioxidant gene battery unravels the involvement of thioredoxin  
966 reductases against chemical and phagocytic cells oxidative stress. Med Mycol. 2019;57(3):363-73.
- 967 59. Keizer EM, Valdes ID, McCann BL, Bignell EM, Wösten H a. B, de Cock H. The Protective Role of 1,8-  
968 Dihydroxynaphthalene-Melanin on Conidia of the Opportunistic Human Pathogen *Aspergillus fumigatus*  
969 Revisited: No Role in Protection against Hydrogen Peroxide and Superoxides. mSphere.  
970 2022;7(1):e0087421.
- 971 60. Kejžar A, Gobec S, Plemenitaš A, Lenassi M. Melanin is crucial for growth of the black yeast *Hortaea*  
972 *werneckii* in its natural hypersaline environment. Fungal Biology. 2013;117(5):368-79.
- 973 61. van de Sande WWJ, de Kat J, Coppens J, Ahmed AOA, Fahal A, Verbrugh H, et al. Melanin biosynthesis  
974 in *Madurella mycetomatis* and its effect on susceptibility to itraconazole and ketoconazole. Microbes  
975 Infect. 2007;9(9):1114-23.
- 976 62. Polak A, Dixon DM. Loss of melanin in *Wangiella dermatitidis* does not result in greater susceptibility  
977 to antifungal agents. Antimicrob Agents Chemother. 1989;33(9):1639-40.

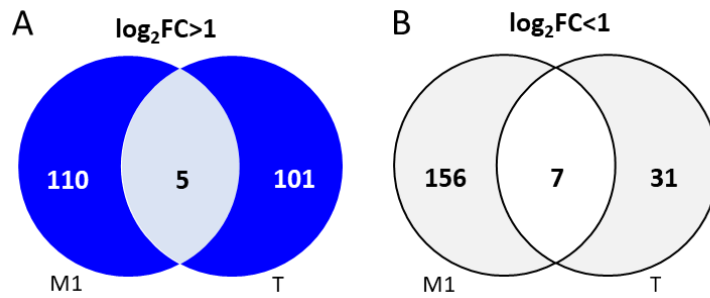
- 978 63. da Silva MB, Marques AF, Nosanchuk JD, Casadevall A, Travassos LR, Taborda CP. Melanin in the  
979 dimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*: effects on phagocytosis, intracellular resistance  
980 and drug susceptibility. *Microbes Infect.* 2006;8(1):197-205.
- 981 64. Mello TP, Oliveira SSC, Branquinha MH, Santos ALS. Decoding the antifungal resistance mechanisms  
982 in biofilms of emerging, ubiquitous and multidrug-resistant species belonging to the  
983 *Scedosporium/Lomentospora* genera. *Med Mycol.* 2022;60(6):myac036.
- 984 65. Huang P, Cao H, Li Y, Zhu S, Wang J, Wang Q, et al. Melanin Promotes Spore Production in the Rice  
985 Blast Fungus *Magnaporthe oryzae*. *Front Microbiol.* 2022;13:843838.
- 986 66. Fetzner R, Seither K, Wenderoth M, Herr A, Correspondence RF, Fischer R. *Alternaria alternata*  
987 transcription factor CmrA controls melanization and spore development. *Microbiology.*  
988 2014;160:1845-54.
- 989 67. Chattopadhyay A, Kushwaha C, Chand R, Srivastava JS. Differential mode of action of tricyclazole in  
990 vitro and in planta on *Bipolaris sorokiniana* causing spot blotch in barley. *Indian Phytopath.* 2012;65(4).
- 991 68. Pinto M, Rodrigues M, Travassos LR, Haido R, Wait R, Barreto-Bergter E. Characterization of  
992 glucosylceramides in *Pseudallescheria boydii* and their involvement in fungal differentiation. *Glycobiology.*  
993 2002;12(4):251-60.
- 994 69. Fernandes CM, Goldman GH, Del Poeta M. Biological Roles Played by Sphingolipids in Dimorphic and  
995 Filamentous Fungi. *mBio.* 2018;9(3):e00642-18.
- 996 70. Oura T, Kajiwara S. Disruption of the sphingolipid Delta8-desaturase gene causes a delay in  
997 morphological changes in *Candida albicans*. *Microbiology (Reading).* 2008;154(Pt 12):3795-803.
- 998 71. Rittershaus PC, Kechichian TB, Allegood JC, Merrill AH, Hennig M, Luberto C, et al. Glucosylceramide  
999 synthase is an essential regulator of pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Invest.*  
1000 2006;116(6):1651-9.
- 1001 72. Fernandes CM, de Castro PA, Singh A, Fonseca FL, Pereira MD, Vila TVM, et al. Functional  
1002 characterization of the *Aspergillus nidulans* glucosylceramide pathway reveals that LCB  $\Delta 8$ -desaturation  
1003 and C9-methylation are relevant to filamentous growth, lipid raft localization and Psd1 defensin activity.  
1004 *Molecular Microbiology.* 2016;102(3):488-505.
- 1005 73. Del Poeta M, Nimrichter L, Rodrigues ML, Luberto C. Synthesis and Biological Properties of Fungal  
1006 Glucosylceramide. *PLoS Pathog.* 2014;10(1):e1003832.
- 1007 74. Mor V, Rella A, Farnoud AM, Singh A, Munshi M, Bryan A, et al. Identification of a New Class of  
1008 Antifungals Targeting the Synthesis of Fungal Sphingolipids. *mBio.* 2015;6(3):e00647.
- 1009 75. McEvoy K, Normile TG, Poeta MD. Antifungal Drug Development: Targeting the Fungal Sphingolipid  
1010 Pathway. *J Fungi (Basel).* 2020;6(3):142.
- 1011 76. Ramamoorthy V, Cahoon EB, Thokala M, Kaur J, Li J, Shah DM. Sphingolipid C-9 Methyltransferases  
1012 Are Important for Growth and Virulence but Not for Sensitivity to Antifungal Plant Defensins in *Fusarium*  
1013 *graminearum*. *Eukaryot Cell.* 2009;8(2):217-29.
- 1014 77. Alvarez FJ, Douglas LM, Konopka JB. The Sur7 protein resides in punctate membrane subdomains and  
1015 mediates spatial regulation of cell wall synthesis in *Candida albicans*. *Commun Integr Biol.* 2009;2(2):76-7.
- 1016 78. Douglas LM, Wang HX, Keppler-Ross S, Dean N, Konopka JB. Sur7 promotes plasma membrane  
1017 organization and is needed for resistance to stressful conditions and to the invasive growth and virulence  
1018 of *Candida albicans*. *mBio.* 2012;3(1):e00254-11.

- 1019 79. Lanze CE, Zhou S, Konopka JB. The Sur7 cytoplasmic C terminus regulates morphogenesis and stress  
1020 responses in *Candida albicans*. *Molecular Microbiology*. 2021;116(4):1201-15.
- 1021 80. Zhang LB, Tang L, Guan Y, Feng MG. Subcellular localization of Sur7 and its pleiotropic effect on cell  
1022 wall integrity, multiple stress responses, and virulence of *Beauveria bassiana*. *Appl Microbiol Biotechnol*.  
1023 2020;104(15):6669-78.
- 1024 81. Ruger-Herreros C, Corrochano LM. Conidiation in *Neurospora crassa*: vegetative reproduction by a  
1025 model fungus. *Int Microbiol*. 2020;23(1):97-105.
- 1026 82. Olmedo M, Ruger-Herreros C, Luque EM, Corrochano LM. A complex photoreceptor system mediates  
1027 the regulation by light of the conidiation genes con-10 and con-6 in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol*.  
1028 2010;47(4):352-63.
- 1029 83. Lopes LCL, da Silva MID, Bittencourt VCB, Figueiredo RT, Rollin-Pinheiro R, Sasaki GL, et al.  
1030 Glycoconjugates and polysaccharides from the *Scedosporium/Pseudallescheria boydii* complex: structural  
1031 characterisation, involvement in cell differentiation, cell recognition and virulence. *Mycoses*.  
1032 2011;54(Suppl 3):28-36.
- 1033 84. Thywißen A, Heinekamp T, Dahse HM, Schmalder-Ripcke J, Nietsche S, Zipfel PF, et al. Conidial  
1034 Dihydroxynaphthalene Melanin of the Human Pathogenic Fungus *Aspergillus fumigatus* Interferes with  
1035 the Host Endocytosis Pathway. *Front Microbiol*. 2011;2(2):96.
- 1036 85. Akoumianaki T, Kyrmizi I, Valsecchi I, Gresnigt MS, Samonis G, Drakos E, et al. *Aspergillus* Cell Wall  
1037 Melanin Blocks LC3-Associated Phagocytosis to Promote Pathogenicity. *Cell Host & Microbe*.  
1038 2016;19(1):79-90.
- 1039 86. Liu D, Wei L, Guo T, Tan W. Detection of DOPA-melanin in the dimorphic fungal pathogen *Penicillium*  
1040 *marneffe* and its effect on macrophage phagocytosis in vitro. *PLoS One*. 2014;9(3):e92610.

## Discussion

Le rôle du facteur de transcription *PIG1* dans la régulation de la biosynthèse de la mélanine dans les conidies de *S. apiospermum* a été appréhendé grâce à l'obtention de transformants albinos, dépourvus de *PIG1* fonctionnel. Nous avons donc pu confirmer que ce facteur de transcription était impliqué dans la régulation du cluster de biosynthèse de la mélanine chez *S. apiospermum*.

Les trois mutants utilisés ont été obtenus par technologie CRISPR-Cas9 : le mutant T dérivait de la souche de référence 14462 sauvage, tandis que les mutants M1 et M2 étaient issus de la souche 14462 préalablement délétée pour le gène *KU70* ( $\Delta KU70$ ). Si la complète délétion du gène a été obtenue dans les mutants M1 et M2 issus de la souche  $\Delta KU70$ , en revanche l'intégration ectopique de la cassette de délétion portant la résistance à l'hygromycine dans le transformant T a quelque peu compliqué l'interprétation des données. En effet, la présence du gène intact et la surexpression des ARNm de *PIG1* dans le mutant T sont apparues, à première vue en contradiction avec le phénotype non mélanisé confirmé en résonance paramagnétique électronique. Même s'il ne s'agit pas d'un mutant  $\Delta PIG1$  à proprement parler, nous avons choisi de le conserver, du fait du phénotype « blanc » et de la morphologie septée des spores, identiques aux mutants  $\Delta KU70/\Delta PIG1$ . Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer cette observation paradoxale. Compte tenu de la production d'ARNm, le blocage semble intervenir au niveau de la traduction de *PIG1*, résultant en l'absence de protéine. Ce phénomène aurait pu être recherché par une analyse protéique en western-blot, mais qui aurait nécessité de disposer d'anticorps spécifiques de *PIG1*. L'autre hypothèse, plus plausible, serait que du fait de l'insertion de la cassette de transformation en amont du gène *PIG1*, soit généré un transcrite de fusion entre le gène *HPH* (hygromycine phosphotransferase, responsable de la résistance à l'hygromycine) et le gène *PIG1*, en lien avec la forte activité du promoteur de *HPH*. Dans les deux cas, l'absence de protéine *PIG1* fonctionnelle dans le mutant T induirait des boucles de rétrocontrôle positif sur la transcription du gène *PIG1* et de nombreux autres gènes. Cela n'a d'ailleurs pas été présenté dans l'article, mais l'analyse transcriptomique du mutant T a également été réalisée, afin d'identifier les gènes différentiellement régulés commun aux trois mutants. L'objectif était d'expliquer les anomalies morphologiques des spores, que l'on ne pouvait directement imputer à l'absence de mélanine. L'analyse différentielle du mutant T par rapport à la souche parentale sauvage a mis en évidence 144 gènes différentiellement exprimés, et majoritairement surexprimés (106/144). De façon intéressante, seuls 12 étaient communs au mutant M1 comparé à la souche  $\Delta KU70$ , **Fig.19**.



**Figure 19 : Représentation de Venn des gènes différentiellement exprimés entre le mutant M1 et le mutant T, respectivement comparés à leur souche parentale : (A) Gènes surexprimés ; (B) Gènes réprimés, par rapport à la souche parentale**

Comme présenté dans le **Tableau 9**, la fonction de ces gènes n'a pu être déterminée que pour 6/12 gènes, ne permettant pas d'identifier le ou les gènes différentiellement régulés responsables des modifications morphologiques observées.

**Tableau 9 : Gènes différentiellement exprimés communs aux mutants M1 et T, comparativement à leur souche parentale respective.**

Gène	Description	T		M1	
		Log <sub>2</sub> (FC)	p	Log <sub>2</sub> (FC)	p
<b>Gènes surexprimés</b>					
SAPIO_CDS5047	Scytalone déshydratase, mélanine métabolisme	-2,927516	3,63E-07	-6,118001	1,08E-36
SAPIO_CDS8079	Peptidase C2, calpain family	-2,334225	0,02302	-5,209865	1,60E-10
SAPIO_CDS1658	ND	-1,95836	0,01336	-5,634866	2,50E-22
SAPIO_CDS3790	ND	-4,73061	0,00766	-6,843815	2,07E-06
SAPIO_CDS2281	ND	-4,56992	0,02707	-9,496139	1,79E-08
SAPIO_CDS6692	ND	-1,937865	0,00512	-2,132726	0,00111
SAPIO_CDS6694	ND	-1,763112	0,04564	-2,346149	0,00111
<b>Gènes sous exprimés</b>					
SAPIO_CDS7812	Gélatinase B, activité peptidase	4,340379	4,33E-11	1,94909	0,02260
SAPIO_CDS8210	Neutre/alkaline non-lysosomal céramidase	1,918935	0,00588	1,448603	0,03809
SAPIO_CDS3758	ND	2,07686	0,03699	2,095465	0,00238
SAPIO_CDS10668	Protéine membranaire SUR7/Rim9-like	2,361301	0,00106	2,09153	0,00238
SAPIO_CDS6589	Activité acyltransférase	1,278779	7,22E-05	1,029431	0,00131

p: p-value ajustée; NC: non connu

D'autre part, les différents tests phénotypiques réalisés simultanément sur les deux souches parentales 14462 sauvage et 14462  $\Delta KU70$  ont mis en évidence des différences phénotypiques notables et inattendues, intéressant notamment la résistance aux UVs, la capacité à former du biofilm, ou encore le profil de sensibilité aux antifongiques. Pour rappel, la protéine ku70 intervient dans le mécanisme de réparation des cassures double-brin de l'ADN, par jonction des extrémités non homologues NHEJ (*Non-homologous end-joining*), mécanisme conservé chez les eucaryotes. Le blocage de cette voie non conservatrice naturellement prédominante chez les champignons, force le mécanisme de recombinaison homologue requis pour l'intégration de la cassette de transformation au locus attendu (267). L'utilisation de mutants  $\Delta KU70$  a grandement favorisé les études de génomique fonctionnelle chez les champignons filamenteux (268). Notre étude en est encore une illustration, puisqu'aucun transformant au locus n'a été obtenu à partir de la souche parentale sauvage. Parmi les inconvénients avancés à l'utilisation de ces souches  $\Delta KU70$ , notons la potentielle instabilité génétique, en lien direct avec l'inhibition de la réparation NHEJ, qui rend généralement les souches plus vulnérables aux conditions favorisant les dommages à l'ADN. Ainsi, à première vue, il était surprenant de constater que la survie des conidies de la souche  $\Delta KU70$  exposées aux UVs était supérieure à celle des conidies de la souche sauvage. Finalement, le dosage de mélanine a mis en évidence une teneur en mélanine supérieure dans les spores  $\Delta KU70$ , qui pourrait expliquer cette résistance accrue aux UVs. Les autres différences phénotypiques entre les deux souches ne sont pas élucidées, mais, finalement, peu surprenantes, si l'on considère le nombre important de gènes différentiellement exprimés entre les deux souches (données non montrées). En effet, il est intéressant de préciser, que dans les conditions expérimentales décrites dans l'article, plus de 700 gènes étaient différentiellement exprimés entre la souche sauvage et la souche  $\Delta KU70$ .

Une limite de notre étude est l'absence de complémentation des mutants  $\Delta KU70/\Delta PIG1$  obtenus, qui n'était pas réalisable, compte tenu de la construction choisie pour la délétion de *PIG1*. Le problème réside en l'absence de marqueur de sélection disponible, du fait de l'intégration du gène *BLE* conférant la résistance à la phléomycine, utilisée pour sélectionner la souche  $\Delta KU70$ , ainsi que du gène *HPH* utilisé pour sélectionner le mutant  $\Delta PIG1$ . *Scedosporium apiospermum* est par ailleurs naturellement résistant à de nombreux antifongiques classiquement utilisés en biologie moléculaire comme la pyrithiamine, la généticine, le chlorimuron, etc... ce qui limite les options disponibles. Une alternative pourrait être l'utilisation de systèmes permettant le recyclage du marqueur de sélection, comme par exemple l'ajout dans la cassette d'une enzyme, la flippase, capable d'exciser le gène de résistance. Cet outil est actuellement testé au laboratoire. Il est également envisagé de tester le système utilisant la Beta-recombinase (beta-rec).

Grâce à l'inactivation de *PIG1* et à l'obtention de mutants dépourvus de mélanine, nous avons pu appréhender le rôle de la mélanine dans les spores de *S. apiospermum*. Si notre étude a montré que les mutants  $\Delta PIG1$  étaient plus vulnérables que les souches parentales à l'effet de différents stress, en particulier oxydatif et thermique, il aurait été pertinent d'associer un mutant directement délété dans la voie de biosynthèse de la mélanine, par exemple  $\Delta PKS$ , afin de pouvoir dissocier le rôle de *PIG1* de celui de la mélanine dans les phénotypes observés.

Ce travail s'est principalement concentré sur la fonction régulatrice de PIG1 dans la synthèse de la mélanine, notre facteur de virulence d'intérêt. Toutefois, les données de transcriptomique du mutant  $\Delta$ PIG1 ont révélé le rôle pléiotrope de ce facteur de transcription qu'il serait intéressant d'approfondir. En particulier, nous avons mis en évidence la représentation importante de gènes impliqués dans le métabolisme des carbohydrates, qui pourrait ouvrir la voie à l'identification d'enzymes clés impliquées dans la synthèse de la paroi, susceptibles d'intervenir dans l'homéostasie ou la virulence de *S. apiospermum*.

Enfin, ce travail a mis en évidence l'implication de PIG1 et de la mélanine dans la protection des spores de *S. apiospermum* contre les mécanismes fongicides mis en œuvre *in vitro* par des macrophages humains. La survie réduite des spores  $\Delta$ PIG1 par rapport à celle des souches mélanisées laisse présager le rôle potentiel de la mélanisation dépendante de PIG1 dans la virulence du champignon. L'exploration de la virulence *in vivo* de nos mutants dans un modèle murin a été concrètement considérée par le biais d'une collaboration mise en place avec le Pr. Javier Capilla (Universitat Rogira i Virgil, Microbiology unit, Reus, Espagne). Cette démarche n'a cependant pu aboutir dans le temps imparti, du fait des contraintes réglementaires relatives à l'expérimentation animale.





## DISCUSSION GENERALE

---



La pathogénicité et la virulence sont des termes souvent utilisés de façon interchangeable pour désigner la capacité d'un microorganisme à causer des dommages à son hôte, de façon suffisante pour en affecter l'homéostasie (269). Il faut souligner que cette atteinte peut résulter de l'action directement délétère ou toxique du microorganisme sur les tissus (toxines, invasion mécanique) et/ou de la réponse immune nuisible suscitée par l'infection chez l'hôte (hyperinflammation, hypersensibilité). Prendre en considération les deux acteurs de l'interaction hôte-champignon est donc indispensable à la compréhension des mécanismes physiopathologiques des infections fongiques.

*Aspergillus fumigatus* et *Scedosporium apiospermum* sont des champignons filamenteux environnementaux opportunistes, capables de provoquer diverses formes d'infection chez l'Homme, à l'occasion d'une défaillance de l'hôte (43,66). L'immunodépression est un facteur majeur de prédisposition au développement d'infections fongiques, le plus souvent invasives dans ce contexte. La mucoviscidose est un autre terrain propice au développement de colonisations voire d'infections fongiques localisées, mais aussi de réactions d'hypersensibilité. Nous avons analysé dans le temps (à 10 ans d'intervalle), l'évolution épidémiologique des colonisations/infections fongiques dans le contexte spécifique de mucoviscidose (**1<sup>ère</sup> partie expérimentale**). Les données clinico-biologiques des cohortes de patients suivis à Rennes et Angers comparant les années 2011 et 2020 illustrent, une nouvelle fois, la fréquence stable mais élevée de ces colonisations/infections fongiques. Elles atteignent 35 % pour *Aspergillus fumigatus*, soit un taux superposable à la prévalence constatée dans une étude multicentrique française en 2018 (270), et en baisse légère par rapport à la prévalence de 46% rapportée lors d'une surveillance publiée par l'équipe angevine en 2000 (271). Cette évolution reflète possiblement les modalités diagnostiques et thérapeutiques nouvelles. La prévalence de *Scedosporium/Lomentospora* est plus faible et stable également, puisque que 3,5% des patients étaient colonisés, au cours des deux années étudiées.

L'inclusion des données de colonisation bactérienne dans ce recueil souligne la prépondérance majeure de ces microorganismes au sein des voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose, puisque 75% et 30% des patients étaient colonisés par *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*, respectivement. Ce constat rappelle qu'il est important de considérer l'ensemble des communautés microbiennes co-existant au cours de la mucoviscidose et susceptible de moduler la virulence intrinsèque d'un pathogène donné. A titre d'exemple, d'actives recherches existent sur le dialogue bactérie-champignon, et en particulier sur l'inhibition de la croissance fongique par des métabolites bactériens (272). Ces interactions sont particulièrement bien décrites entre *A. fumigatus* et *P. aeruginosa*, ce dernier sécrétant des petites molécules diffusibles comme la phénazine ou la pyoverdine et d'autres molécules du *quorum sensing* qui inhibent la formation du biofilm aspergillaire (273,274). En retour, *A. fumigatus* met en place des stratégies de survie, qui consistent notamment grâce à ses sidérophores à épargner le fer indispensable à sa survie dans des conditions pauvres en fer, comme en cas de pathologie pulmonaire avancée. Des relations antagonistes ou coopératives existeraient également entre *P. aeruginosa* et *Scedosporium* (275,276).

Enfin, il faut noter que les progrès thérapeutiques majeurs constitués par les nouvelles associations de modulateurs de CFTR sur le marché depuis 2020 améliorent significativement la qualité de vie de ces patients, mais l'impact sur l'écologie microbiologique et fongique des poumons de ces patients reste encore peu connu. Il est donc indispensable de poursuivre la surveillance de ces colonisations sur le long terme, et, à ce titre, une étude impliquant plusieurs centres européens, prendra également en compte les disparités épidémiologiques éventuelles entre les différents pays.

A ce jour, il n'existe pas de consensus sur la prise en charge thérapeutique des patients atteints de mucoviscidose colonisés/infectés par ces champignons filamenteux, et la décision d'instaurer un traitement antifongique est généralement guidée par un faisceau d'arguments cliniques et biologiques (cultures mycologiques, marqueurs sérologiques de sensibilisation fongiques). De plus, les options thérapeutiques peuvent être restreintes i) par l'existence de résistances intrinsèques aux antifongiques, chez certains champignons comme *Scedosporium/Lomentospora*, ii) par les résistances aux triazolés émergentes comme décrites chez *A. fumigatus* depuis le début des années 2000. Pour rappel, ce phénomène résulte majoritairement de l'apparition de mutations dans le gène *CYP51A* codant la cible des antifongiques, via deux routes : d'une part, la pression de sélection exercée par l'usage intensif de dérivés azolés comme fongicides sur les cultures agricoles ou dans les élevages et, d'autre part, l'imprégnation antifongique parfois au très long cours de patients atteints d'infection chronique, particulièrement dans le cas des aspergilloses pulmonaires chroniques et de la mucoviscidose (23,277,278). Cette observation nous a conduit à mener une étude rétrospective visant à surveiller l'émergence de ce phénomène au sein des souches d'*A. fumigatus* isolées au CHU de Rennes, sur la période 2015-2019. Nous avons montré que, dans le groupe de patients atteints de mucoviscidose, la prévalence des isolats résistants à l'itraconazole était la plus élevée, et atteignait des taux considérables (18% des souches, correspondant à 26% des patients). Une tendance inquiétante à l'augmentation durant les dernières années du recueil était également soulignée. La prévalence des isolats résistants au voriconazole était de 5%, correspondant à 11% des patients (250). Ces taux sont similaires à ceux rapportés dans la littérature (279,280). La résistance croisée à tous les antifongiques azolés, concernant plus de la moitié des isolats, est susceptible d'accroître l'impact potentiel sur la décision thérapeutique. Ces résultats incitent fortement à rationaliser la prescription des antifongiques au cours de la mucoviscidose et soulignent la pertinence de continuer à analyser l'évolution de la biodiversité et de la sensibilité aux antifongiques de la flore fongique.

L'émergence de ce phénomène est une illustration des remarquables capacités d'adaptation des champignons à leur environnement. Au-delà d'agir sur la pression de sélection, la récurrente question de la virulence de ces souches devenues résistantes ouvre d'intéressantes perspectives de recherche. Le « *fitness cost* » ou coût énergétique du mécanisme de résistance sur la capacité à survivre et à se multiplier dans un environnement compétitif est bien décrit chez les bactéries, et se traduit généralement par une moindre virulence des souches ayant une mutation de résistance (281,282). Ce phénomène est plus controversé chez les champignons (283),

mais il a été notamment décrit chez certaines levures, comme chez *Candida albicans* dont la résistance aux échinocandines est associée à un phénotype « hypovirulent » dans un modèle murin de candidose (284). Chez *A. fumigatus* en revanche, les mutations TR<sub>34</sub>/L98H et TR<sub>46</sub>/Y121F/T289A d'origine environnementale, ne seraient *a priori* pas associées à une diminution du fitness (285). En fait, des souches d'*A. fumigatus* devenues résistantes aux azolés par pression de sélection sont capables, lorsqu'elles sont remises dans un environnement dépourvu d'azolés, d'accumuler des mutations compensatrices qui restaurent la perte de fitness associée au développement de la résistance, et leur permettent de s'adapter à ce nouvel environnement. Cette évolution *via* les mutations, favorisée par l'importance de la reproduction asexuée dans le cycle de vie d'*A. fumigatus*, pourrait cependant avoir un impact sur la pathogénicité de la souche, et *in fine*, avoir des implications cliniques qui restent à ce jour inconnues (286).

La prévalence significative de champignons particuliers - comme *Scedosporium* - dans le contexte spécifique de la mucoviscidose est également un reflet de leur remarquables propriétés d'adaptation et de survie en condition hostile. Le microenvironnement hypoxique et très acide caractérisant l'arbre bronchique des patients atteints de mucoviscidose ne semble pas être un frein à leur développement. Une récente étude transcriptomique menée au sein de l'équipe d'Angers (UR Infection Fongique respiratoire) a étayé la reprogrammation transcriptionnelle accompagnant l'adaptation de *S. apiospermum* incubé dans un milieu synthétique, mimant la composition nutritionnelle d'expectoration de patients atteints de mucoviscidose (287). L'importante induction de gènes codant des enzymes impliquées dans la dégradation de composés aromatiques par rapport au milieu standard, suggère un potentiel rôle de ces propriétés cataboliques dans la pathogénicité de ce champignon.

Un autre élément majeur à considérer dans la virulence d'un champignon est son enveloppe externe constituant la paroi fongique, élément autour duquel ont été construites **les parties expérimentales II et III** de ce travail.

Lors de la pénétration des conidies fongiques dans l'organisme, la paroi est en effet la première structure fongique interagissant avec les cellules de l'immunité innée incluant les cellules épithéliales, les macrophages alvéolaires et les polynucléaires neutrophiles. La composition pariétale est globalement conservée au sein des champignons filamenteux, consistant en un maillage polysaccharidique complexe ( $\alpha$ -glucanes,  $\beta$ -glucanes, chitine, etc.), surmonté d'un pigment hydrophobe, la mélanine (119,139,288). Comme développé dans la revue bibliographique, la structure pariétale de *Scedosporium* n'est que partiellement élucidée, mais la comparaison à celle d'*A. fumigatus* a mis en évidence quelques disparités : les conidies de *S. apiospermum* ovoïdes et de grande taille (4-6x5-7 $\mu$ m) contrastent avec les conidies sphériques et de petite taille d'*A. fumigatus* (2-3 $\mu$ m), qui sont, de surcroît recouvertes d'une couche protéique d'hydrophobines, absentes chez *Scedosporium*. De plus, l'implication des peptidorhamnomannanes et glucosylcéramides dans l'interaction des conidies avec les cellules innées a été rapportée chez *Scedosporium* et *Lomentospora*, mais n'est *a priori* pas connue chez *A. fumigatus* (72,120,150,276). Ces constats nous ont fait poser l'hypothèse que ces différences structurales

pouvaient impacter la reconnaissance et la réponse de cellules phagocytaires suscitée par ces deux champignons. L'étude comparative du profil transcriptomique de macrophages humains en culture primaire incubés en présence de conidies de *S. apiospermum* comparativement à *A. fumigatus* a fait l'objet de la **deuxième partie expérimentale**. Nous avons montré que la réponse macrophagique suscitée par les deux champignons faisait intervenir l'activation des voies pro-inflammatoires classiquement décrites dans l'immunité antifongique. En particulier, étaient induites les voies de signalisation dépendantes de l'activation des TLRs et CLR par liaison des motifs de surface : voie NFκB, voie du TNF, et voie de l'IL-17, de façon globalement analogue dans les macrophages infectés par *S. apiospermum* et *A. fumigatus*. Nous montrons dans ce travail que la différence notable entre les deux types d'infection réside dans la précocité et l'intensité de la réponse pro-inflammatoire générée par *S. apiospermum* par rapport à *A. fumigatus*. A 4h post-infection, l'analyse transcriptomique des macrophages infectés par *S. apiospermum* a révélé près de 5 fois plus de gènes différentiellement exprimés que lors de l'infection par *A. fumigatus* (1169 vs 256), avec une prédominance de gènes up-régulés, par rapport aux cellules non infectées. L'avalanche inflammatoire observée s'accompagnait d'une réduction majorée de la survie des spores intracellulaires de *S. apiospermum* à 6h. L'approche dynamique de la transcription des gènes chez des champignons caractérisés par des phases de transition spore-filament est donc indispensable et devrait de plus mieux tenir compte des facteurs nutritionnels conditionnant la germination.

Cette analyse transcriptomique haut-débit a également mis en évidence dans les cellules infectées par *S. apiospermum*, l'activation précoce de voies de mort cellulaire (dès 4h), phénomène pouvant être relié à la précocité de la réponse inflammatoire suscitée (265). La ferroptose en particulier, représentée dans l'analyse des macrophages infectés par *S. apiospermum* à 12h, est une voie de mort cellulaire programmée nouvellement décrite qui suscite actuellement l'intérêt dans la physiopathologie de l'interaction hôte-champignon (289). Contrairement à l'apoptose ou à la pyroptose, ce mécanisme de mort cellulaire résulte d'une dysrégulation du métabolisme du fer et des voies de peroxydation lipidiques, augmente la libération d'alarmines, entretient l'inflammation et la mort cellulaire, et constitue *in fine* un avantage de survie pour les agents infectieux. En particulier, l'augmentation du taux de fer intracellulaire peut être mise à profit par les champignons, à l'image des taux de fer labile élevés, constatés dans le liquide cérébro-spinal de patients atteints de méningite à *C. neoformans* (290). L'inhibition thérapeutique de cette voie suscite également un champ de recherche prometteur, comme évalué dans un modèle de macrophages infectés par *Histoplasma capsulatum*, dont le traitement par ferrostatin-1 était non seulement associé à une réduction de la mort cellulaire, mais aussi à un effet antifongique inattendu (291). Enfin, ce mécanisme a également été mis en évidence dans des cellules épithéliales bronchiques humaines infectées par *P. aeruginosa*, renforçant encore la pertinence de considérer cette piste thérapeutique dans le contexte de mucoviscidose (292).

Ces données originales illustrent le potentiel inflammatoire propre à chaque microorganisme qui, s'il engendre une réponse tissulaire dérégulée pourrait contribuer à des sévérités d'infection différentes. La limite du modèle

*in vitro* incite à déterminer si le profil pro-inflammatoire exacerbé observé en réponse à *S. apiospermum* observé est transposable à l'infection *in vivo*, et *a fortiori* dans différents tissus dont dépend aussi l'inflammation générée. La puissance de l'étude *in vivo* pourrait être renforcée par l'utilisation de technologies très récentes comme l'analyse *Dual RNAseq* décryptant les changements transcriptomiques à la fois chez le champignon et la cellule hôte (293,294), ou encore une approche « Spatial transcriptomic » qui permet de différencier les événements dans les zones épithéliales et dans les zones inflammatoires (295).

Comment les champignons font-ils face à un microenvironnement si hostile ? Parmi les facteurs de virulence décrits chez *A. fumigatus* et *S. apiospermum*, certains constituants pariétaux sont particulièrement considérés dans les mécanismes d'échappement à la réponse de l'hôte. En particulier, la présence de mélanine recouvrant la face externe des conidies fongiques est une caractéristique conservée dans l'ensemble du règne fongique (163,198) leur conférant un avantage de survie notable dans l'environnement. Les propriétés intrinsèques de ce pigment hydrophobe participent à leur résistance contre diverses agressions (températures extrêmes, radiations ionisantes, stress oxydant, ...). Parmi les différents types de mélanine décrits, la DHN-mélanine est la forme majoritairement retrouvée au sein des champignons. Comme abordé dans la revue bibliographique, du point de vue de l'interaction avec l'hôte, le rôle de la DHN-mélanine dans l'échappement des spores d'*A. fumigatus* a été particulièrement étudié et a démontré, que cet élément constituait une « armure » fongique, qui participe au masquage des motifs antigéniques, limitant l'activation des mécanismes de « killing » macrophagique. Devant l'importance apparente de ce pigment dans l'interaction des conidies avec l'hôte, et l'absence de données chez *Scedosporium*, nous avons donc exploré le rôle de la mélanine chez *S. apiospermum*, objet de la **partie expérimentale III**. Nous avons pour cela employé une approche originale, en construisant des mutants non pas délétés dans un gène de la biosynthèse de mélanine (*PKS*, *SCD*), mais délétés du facteur de transcription *PIG1* situé en amont du cluster génique impliqué dans la biosynthèse de DHN-mélanine. L'hypothèse du rôle de *PIG1* dans la régulation de cette biosynthèse chez *S. apiospermum* a été formulée sur la base des études menées sur la mélanisation de champignons phytopathogènes, régulée par un facteur de transcription orthologue (*PIG1*, *CMR1*, *AMR1*). La mise au point récente de la technologie CRISPR-Cas9 chez *S. apiospermum* dans l'équipe angevine a été mise à profit pour élaborer les transformants  $\Delta$ *PIG1*, qui nous ont permis de confirmer le rôle régulateur de *PIG1* sur la biosynthèse de mélanine chez ce champignon. Nous avons montré que l'absence de cette enveloppe externe induisait une désorganisation de l'architecture pariétale, dont l'épaisseur était réduite et dont la résistance à un stress chimique (rouge congo, SDS) était altérée. La mélanine serait également impliquée dans la survie de conidies de *S. apiospermum* face à des agressions ionisantes (UV), mais aussi dans sa thermotolérance et la résistance à certains stress oxydants, qui sont des facteurs de résistance majeurs chez les champignons pathogènes humains. Le démasquage de motifs polysaccharidiques de paroi suggérant une reconnaissance favorisée par les récepteurs phagocytaires, nous a ensuite mené à étudier l'interaction de ces conidies albinos avec des macrophages humains, démontrant une vulnérabilité accrue des mutants  $\Delta$ *PIG1* comparativement aux souches parentales. Il s'agit d'ailleurs de la première étude s'intéressant au rôle de *PIG1* chez un champignon pathogène de l'Homme, en dehors des

orthologues AMR1 et CMRA, investigués chez différentes espèces d'*Alternaria*, mais dans des modèles d'infection végétale (176,296). En particulier, l'atténuation de la virulence de mutants  $\Delta$ CMRA d'*A. alternata* inoculés à des poires s'accompagnait d'une diminution de la formation des structures d'invasion (appressoria) et de la croissance du mycélium (296). Dans notre travail, les anomalies morphologiques inattendues, comme l'apparition de septa dans les spores des mutants  $\Delta$ PIG1, nous ont conduit à l'étude de leur transcriptome, en condition basale. Nous avons constaté le rôle pléiotrope de ce facteur de transcription, bien qu'il soit très probable que l'expression différentielle de nombreux gènes soit davantage la conséquence de l'absence de mélanine et des modifications pariétales associées, que de l'activation transcriptionnelle directe par PIG1. Ce travail ouvre une voie d'investigation sur la fonction plus large de PIG1 dans la paroi de *S. apiospermum*, et la régulation potentielle d'acteurs intervenant dans sa physiologie et sa pathogénicité. En particulier, quel est le rôle des enzymes impliquées dans la machinerie des carbohydrates dont les gènes étaient différentiellement exprimés en l'absence de PIG1 fonctionnel ?

Associés à l'émergence de résistances aux antifongiques, nos résultats sur le rôle de la mélanine incitent à envisager le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques, au-delà de l'approche préventive indispensable chez les patients atteints de mucoviscidose et autres maladies respiratoires chroniques, ou chez le patient immunodéprimé (voir annexe I). Le caractère conservé de la DHN-mélanine chez les champignons rencontrés en pathologie humaine implique, de façon rationnelle, de considérer le potentiel de ce pigment comme cible d'action antifongique. Du fait de la plus grande vulnérabilité de champignons déficients en mélanine, une première stratégie pourrait consister à interférer avec la biosynthèse de mélanine. Il est important de rappeler que si la structure précise de la mélanine fongique n'est pas définitivement élucidée, l'identification des molécules constituant le squelette de ce polymère a permis de distinguer deux principaux types de mélanine : la DHN-mélanine dont la synthèse est initiée à partir d'acetylcoA et de malonylcoA, et la DOPA-mélanine, synthétisée à partir de tyrosine et L-DOPA. Etant donné la grande proximité structurale de la DOPA-mélanine et des enzymes de synthèse avec celle de la mélanine humaine, il semblerait plus rationnel d'envisager l'inhibition de la biosynthèse de DHN-mélanine.

Comme évoqué précédemment, la sensibilité aux antifongiques a été explorée chez plusieurs espèces fongiques dont la synthèse de mélanine était inhibée *via* différentes approches. L'impact négatif de la présence de L-DOPA chez *C. neoformans* et *Paracoccidioides* sur la sensibilité à l'amphotéricine B ou à différents azolés a été montré. En revanche, la stratégie d'inhibition employée consistant à cultiver les champignons dans des milieux dépourvus des précurseurs (tyrosine ou L-DOPA)(297), n'est pas une approche transposable à l'Homme, d'autant plus que le champignon utilise ces acides aminés essentiels produits par son hôte (298). Des essais d'inhibition de la biosynthèse de DHN mélanine fongique ont été conduits *in vitro* sur différents phaeohyphomycètes dont *Fonsecaea* et *Phialophora* cultivés en présence de tricyclazole, ou encore *in vivo* sur *Madurella mycetomatis* infectant des larves de lépidoptères. Si la diminution des concentrations minimales inhibitrices (CMI) de l'itraconazole vis-à-vis de ces champignons dépourvus de mélanine est un constat



prometteur, l'appartenance des molécules utilisées à la classe des pesticides obère tout développement ultérieur, et impose de se tourner vers d'autres composés. Des criblages haut-débit moléculaires par le biais de chimiothèques existantes pourraient permettre d'identifier des molécules actives sur la synthèse de mélanine, idéalement dénuées de toxicité.

Enfin, une autre approche thérapeutique pourrait viser, non plus à cibler directement la mélanine fongique, mais à concevoir une stratégie d'immunomodulation, qui activerait le récepteur de la mélanine à la surface des cellules de l'hôte. Cibler le récepteur MelLec, dont l'activation spécifique par la DHN-mélanine déclenche une réponse pro-inflammatoire dans la cellule, pourrait donc servir à « booster » la réponse immune anti-aspergillaire dans un contexte d'immunodépression (299). Il n'existe encore à ce jour aucune étude concrétisant ce concept.

Plus largement, la mélanine fongique suscite un intérêt particulier dans d'autres domaines que la prise en charge des infections fongiques, et notamment en oncologie dans le traitement du mélanome. De par l'analogie structurale avec la mélanine humaine, des anticorps dirigés contre la DOPA-mélanine ont fait l'objet d'une évaluation de ciblage spécifique des cellules tumorales, dont le turn-over important libère de la mélanine extracellulaire accessible à ces anticorps, pouvant servir de vecteurs thérapeutiques (300).

## CONCLUSION

La prévalence des infections fongiques au cours de la mucoviscidose reste élevée et stable, malgré l'évolution majeure des modalités diagnostiques et thérapeutiques. Par ailleurs, la morbidité et la consommation d'antifongiques soutenue entretiennent l'émergence de résistances, comme rapporté chez *A. fumigatus* vis-à-vis des antifongiques triazolés. Les nouvelles stratégies thérapeutiques modulatrices de CFTR et les biothérapies offrent des perspectives prometteuses chez les patients atteints de mucoviscidose : de par leur action bénéfique sur la composante inflammatoire améliorant sensiblement les fonctions respiratoires, mais aussi *via* le contrôle des mécanismes immuno-allergiques.

L'utilisation de nouveaux outils analytiques permet d'identifier de nouveaux déterminants de l'interaction hôte-champignon. En parallèle des approches phénotypiques, les analyses haut-débit du transcriptome des champignons et des cellules-hôtes permettent d'identifier sous un angle nouveau les mécanismes et facteurs de virulence les plus fortement impliqués. De plus, les stratégies d'intervention moléculaire *via* CRISPR-Cas9 facilitent désormais l'étude de facteurs de virulence fongique bien identifiés. A l'image de la mélanine fongique que nous avons étudiée dans ce travail, l'ensemble des résultats obtenus ouvre de passionnantes pistes dans la compréhension de l'interaction hôte-pathogène et le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.



# BIBLIOGRAPHIE

1. Nnadi NE, Carter DA. Climate change and the emergence of fungal pathogens. *PLOS Pathog.* 2021;17(4):e1009503.
2. van Rhijn N, Bromley M. The Consequences of Our Changing Environment on Life Threatening and Debilitating Fungal Diseases in Humans. *J Fungi.* 2021;7(5):367.
3. Guo J, Garratt A, Hill A. Worldwide rates of diagnosis and effective treatment for cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.* 2022;21(3):456-62.
4. Scotet V, Gutierrez H, Farrell PM. Newborn Screening for CF across the Globe—Where Is It Worthwhile? *Int J Neonatal Screen.* 2020;6(1):18.
5. Vaincre la mucoviscidose. *Registre français de la mucoviscidose - Bilan des données 2021.* Paris; 2022.
6. Regard L, Martin C, Burnet E, Da Silva J, Burgel PR. CFTR Modulators in People with Cystic Fibrosis: Real-World Evidence in France. *Cells.* 2022;11(11):1769.
7. Stanke F, Tümmler B. Classification of CFTR mutation classes. *Lancet Respir Med.* 2016;4(8):e36.
8. De Boeck K, Amaral MD. Progress in therapies for cystic fibrosis. *Lancet Respir Med.* 2016;4(8):662-74.
9. Shteinberg M, Haq IJ, Polineni D, Davies JC. Cystic fibrosis. *The Lancet.* 2021;397(10290):2195-2111.
10. Hanssens LS, Duchateau J, Casimir GJ. CFTR Protein: Not Just a Chloride Channel? *Cells.* 2021;10(11):2844.
11. Almughem F, Aldossary A, Tawfik E, Alomary M, Alharbi W, Alshahrani M, et al. Cystic Fibrosis: Overview of the Current Development Trends and Innovative Therapeutic Strategies. *Pharmaceutics.* 2020;12(7):616.
12. Agarwal R, Sehgal IS, Dhooria S, Aggarwal AN. Developments in the diagnosis and treatment of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Expert Rev Respir Med.* 2016;10(12):1317-34.
13. Koutsokera A, Corriveau S, Sykes J, Coriati A, Cortes D, Vadas P, et al. Omalizumab for asthma and allergic bronchopulmonary aspergillosis in adults with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.* 2020;19(1):119-24.
14. Eraso IC, Sangiovanni S, Morales EI, Fernández-Trujillo L. Use of monoclonal antibodies for allergic bronchopulmonary aspergillosis in patients with asthma and cystic fibrosis: literature review. *Ther Adv Respir Dis.* 2020;14:1753466620961648.
15. Stevens DA, Schwartz HJ, Lee JY, Moskovitz BL, Jerome DC, Catanzaro A, et al. A randomized trial of itraconazole in allergic bronchopulmonary aspergillosis. *N Engl J Med.* 2000;342(11):756-62.
16. Wark PAB, Hensley MJ, Saltos N, Boyle MJ, Toneguzzi RC, Epid GDC, et al. Anti-inflammatory effect of itraconazole in stable allergic bronchopulmonary aspergillosis: a randomized controlled trial. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;111(5):952-7.
17. Moreira AS, Silva D, Ferreira AR, Delgado L. Antifungal treatment in allergic bronchopulmonary aspergillosis with and without cystic fibrosis: a systematic review. *Clin Exp Allergy.* 2014;44(10):1210-27.
18. Chishimba L, Niven RM, Cooley J, Denning DW. Voriconazole and posaconazole improve asthma severity in allergic bronchopulmonary aspergillosis and severe asthma with fungal sensitization. *J Asthma Off J Assoc Care Asthma.* 2012;49(4):423-33.

19. Patel D, Popple S, Claydon A, Modha DE, Gaillard EA. Posaconazole therapy in children with cystic fibrosis and *Aspergillus*-related lung disease. *Med Mycol.* 2020;58(1):11-21.
20. Schwarz C, Brandt C, Melichar V, Runge C, Heuer E, Sahly H, et al. Combined antifungal therapy is superior to monotherapy in pulmonary scedosporiosis in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros Off J Eur Cyst Fibros Soc.* 2019;18(2):227-32.
21. Hoenigl M, Salmanton-García J, Walsh TJ, Nucci M, Neoh CF, Jenks JD, et al. Global guideline for the diagnosis and management of rare mould infections: an initiative of the European Confederation of Medical Mycology in cooperation with the International Society for Human and Animal Mycology and the American Society for Microbiology. *Lancet Infect Dis.* 2021;21(8):e246-57.
22. Markantonis SL, Katelari A, Pappa E, Doudounakis S. Voriconazole pharmacokinetics and photosensitivity in children with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros Off J Eur Cyst Fibros Soc.* 2012;11(3):246-52.
23. Verweij PE, Snelders E, Kema GHJ, Mellado E, Melchers WJG. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: a side-effect of environmental fungicide use? *Lancet Infect Dis.* 2009;9(12):789-95.
24. Burks C, Darby A, Londoño LG, Momany M, Brewer MT. Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* in the environment: Identifying key reservoirs and hotspots of antifungal resistance. *PLOS Pathog.* 2021;17(7):e1009711.
25. Houbraken J, Kocsubé S, Visagie CM, Yilmaz N, Wang XC, Meijer M, et al. Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and related genera (Eurotiales): An overview of families, genera, subgenera, sections, series and species. *Stud Mycol.* 2020;95:5-169.
26. Raper KB, Fennell DI. The genus *Aspergillus*. Baltimore: Williams and Wilkins; 1965. 686 p.
27. Schauwvlieghe AFAD, Rijnders BJA, Philips N, Verwijs R, Vanderbeke L, Tienen CV, et al. Invasive aspergillosis in patients admitted to the intensive care unit with severe influenza: a retrospective cohort study. *Lancet Respir Med.* 2018;6(10):782-92.
28. Gangneux JP, Dannaoui E, Fekkar A, Luyt CE, Botterel F, De Prost N, et al. Fungal infections in mechanically ventilated patients with COVID-19 during the first wave: the French multicentre MYCOVID study. *Lancet Respir Med.* 2022;10(2):180-90.
29. Donnelly JP, Chen SC, Kauffman CA, Steinbach WJ, Baddley JW, Verweij PE, et al. Revision and Update of the Consensus Definitions of Invasive Fungal Disease From the European Organization for Research and Treatment of Cancer and the Mycoses Study Group Education and Research Consortium. *Clin Infect Dis.* 2019;pii: ciz1008.
30. Gangneux JP, Bougnoux ME, Hennequin C, Godet C, Chandenier J, Denning DW, et al. An estimation of burden of serious fungal infections in France. *J Med Mycol.* 2016;26(4):385-90.
31. Bitar D, Lortholary O, Le Strat Y, Nicolau J, Coignard B, Tattevin P, et al. Population-Based Analysis of Invasive Fungal Infections, France, 2001–2010. *Emerg Infect Dis.* 2014;20(7):1163-9.
32. Gangneux JP, Guegan H, Papon N, Bouchara JP. Biologie et diagnostic des infections à *Aspergillus*. *EMC Maladies infectieuses.* 2022;
33. Cortez KJ, Roilides E, Quiroz-Telles F, Meletiadis J, Antachopoulos C, Knudsen T, et al. Infections caused by *Scedosporium* spp. *Clin Microbiol Rev.* 2008;21(1):157-97.
34. Patterson K, Streck ME. Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis. *Proc Am Thorac Soc.* 2010;7(3):237-44.

35. van Braeckel E, Page I, Davidsen JR, Laursen CB, Agarwal R, Alastruey-Izquierdo A, et al. Treatment outcome definitions in chronic pulmonary aspergillosis: a CPAnet consensus statement. *Eur Respir J*. 2022;59(6):2102950.
36. Denning DW, Cadranel J, Beigelman-Aubry C, Ader F, Chakrabarti A, Blot S, et al. Chronic pulmonary aspergillosis: rationale and clinical guidelines for diagnosis and management. *Eur Respir J*. 2016;47(1):45-68.
37. Agarwal R, Chakrabarti A, Shah A, Gupta D, Meis JF, Guleria R, et al. Allergic bronchopulmonary aspergillosis: review of literature and proposal of new diagnostic and classification criteria. *Clin Exp Allergy*. 2013;43(8):850-73.
38. Kraemer R, Deloséa N, Ballinari P, Gallati S, Cramer R. Effect of Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis on Lung Function in Children with Cystic Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;174(11):1211-20.
39. Agarwal R, Sehgal IS, Dhooria S, Muthu V, Prasad KT, Bal A, et al. Allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Indian J Med Res*. 2020;151(6):529-49.
40. Hong G, Psoter KJ, Jennings MT, Merlo CA, Boyle MP, Hadjiliadis D, et al. Risk factors for persistent *Aspergillus* respiratory isolation in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros Off J Eur Cyst Fibros Soc*. 2018;17(5):624-30.
41. Amin R, Dupuis A, Aaron SD, Ratjen F. The Effect of Chronic Infection With *Aspergillus fumigatus* on Lung Function and Hospitalization in Patients With Cystic Fibrosis. *Chest*. 2010;137(1):171-6.
42. Hughes DA, Archangelidi O, Coates M, Armstrong-James D, Elborn SJ, Carr SB, et al. Clinical characteristics of *Pseudomonas* and *Aspergillus* co-infected cystic fibrosis patients: A UK registry study. *J Cyst Fibros Off J Eur Cyst Fibros Soc*. 2022;21(1):129-35.
43. Ramirez-Garcia A, Pellon A, Rementeria A, Buldain I, Barreto-Bergter E, Rollin-Pinheiro R, et al. *Scedosporium* and *Lomentospora*: an updated overview of underrated opportunists. *Med Mycol*. 2018;56(1):S102-25.
44. Zouhair R, Rougeron A, Razafimandimby B, Kobi A, Bouchara JP, Giraud S. Distribution of the different species of the *Pseudallescheria boydii/Scedosporium apiospermum* complex in French patients with cystic fibrosis. *Med Mycol*. 2013;51(6):603-13.
45. Bronnimann D, Garcia-Hermoso D, Dromer F, Lanternier F, French Mycoses Study Group, Characterization of the isolates at the NRCMA. Scedosporiosis/lomentosporiosis observational study (SOS): Clinical significance of *Scedosporium* species identification. *Med Mycol*. 2021;59(5):486-97.
46. Han Y, Zheng H, Zhang Z, Chen W, Luo Y, Wang Y, et al. Two new *Scedosporium* species from Guangxi and Hainan. *Mycosystema*. 2017;36(2):145-53.
47. Abrantes RA, Refojo N, Hevia AI, Fernández J, Isla G, Córdoba S, et al. *Scedosporium* spp. from Clinical Setting in Argentina, with the Proposal of the New Pathogenic Species *Scedosporium americanum*. *J Fungi Basel Switz*. 2021;7(3):160.
48. Zhang ZY, Shao QY, Li X, Chen WH, Liang JD, Han YF, et al. Culturable Fungi from Urban Soils in China I: Description of 10 New Taxa. *Microbiol Spectr*. 2021;9(2):e00867-21.
49. Lackner M, de Hoog GS, Yang L, Ferreira Moreno L, Ahmed SA, Andreas F, et al. Proposed nomenclature for *Pseudallescheria*, *Scedosporium* and related genera. *Fungal Divers*. 2014;67(1):1-10.
50. Mouhajir A, Poirier W, Angebault C, Rahal E, Bouabid R, Bougnoux ME, et al. *Scedosporium* species in soils from various biomes in Northwestern Morocco. *PloS One*. 2020;15(2):e0228897.

51. Rougeron A, Giraud S, Alastruey-Izquierdo A, Cano-Lira J, Rainer J, Mouhajir A, et al. Ecology of *Scedosporium* Species: Present Knowledge and Future Research. *Mycopathologia*. 2018;183(1):185-200.
52. Kaltseis J, Rainer J, De Hoog GS. Ecology of *Pseudallescheria* and *Scedosporium* species in human-dominated and natural environments and their distribution in clinical samples. *Med Mycol*. 2009;47(4):398-405.
53. Harun A, Gilgado F, Chen SCA, Meyer W. Abundance of *Pseudallescheria/Scedosporium* species in the Australian urban environment suggests a possible source for scedosporiosis including the colonization of airways in cystic fibrosis. *Med Mycol*. 2010;48(Suppl 1):S70-6.
54. Tóth EJ, Nagy GR, Homa M, Ábrók M, Kiss IÉ, Nagy G. Recurrent *Scedosporium apiospermum* mycetoma successfully treated by surgical excision and terbinafine treatment: a case report and review of the literature. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2017;16(1):31.
55. Sedlacek L, Graf B, Schwarz C, Albert F, Peter S, Würstl B, et al. Prevalence of *Scedosporium* species and *Lomentospora prolificans* in patients with cystic fibrosis in a multicenter trial by use of a selective medium. *J Cyst Fibros Off J Eur Cyst Fibros Soc*. 2015;14(2):237-41.
56. Cimon B, Carrère J, Vinatier JF, Chazalette JP, Chabasse D, Bouchara JP. Clinical Significance of *Scedosporium apiospermum* in Patients with Cystic Fibrosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2000;19(1):53-6.
57. Blyth CC, Middleton PG, Harun A, Sorrell TC, Meyer W, Chen SCA. Clinical associations and prevalence of *Scedosporium* spp. in Australian cystic fibrosis patients: identification of novel risk factors? *Med Mycol*. 2010;48(Suppl 1):S37-44.
58. Bouchara JP, Le Govic Y, Kabbara S, Cimon B, Zouhair R, Hamze M, et al. Advances in understanding and managing *Scedosporium* respiratory infections in patients with cystic fibrosis. *Expert Rev Respir Med*. 2020;14(3):259-73.
59. Schwarz C, Brandt C, Antweiler E, Krannich A, Staab D, Schmitt-Grohé S, et al. Prospective multicenter German study on pulmonary colonization with *Scedosporium/Lomentospora* species in cystic fibrosis: Epidemiology and new association factors. *PLoS One*. 2017;12(2):e0171485.
60. Buldain I, Martin-Souto L, Antoran A, Areitio M, Aparicio-Fernandez L, Rementeria A, et al. The Host Immune Response to *Scedosporium/Lomentospora*. *J Fungi*. 2021;7(2):75.
61. Bertuzzi M, Hayes GE, Icheoku UJ, van Rhijn N, Denning DW, Osheroov N, et al. Anti-*Aspergillus* Activities of the Respiratory Epithelium in Health and Disease. *J Fungi*. 2018;4(1).
62. Croft CA, Culibrk L, Moore MM, Tebbutt SJ. Interactions of *Aspergillus fumigatus* Conidia with Airway Epithelial Cells: A Critical Review. *Front Microbiol*. 2016;7:472.
63. Kaur J, Kautto L, Penesyan A, Meyer W, Elbourne LDH, Paulsen IT, et al. Interactions of an Emerging Fungal Pathogen *Scedosporium aurantiacum* with Human Lung Epithelial Cells. *Sci Rep*. 2019;9(1):5035.
64. Aor AC, Mello TP, Sangenito LS, Fonseca BB, Rozental S, Lione VF, et al. Ultrastructural viewpoints on the interaction events of *Scedosporium apiospermum* conidia with lung and macrophage cells. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2018;113(10):e180311.
65. Romani L. Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(4):275-88.
66. Latgé JP, Chamilos G. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis in 2019. *Clin Microbiol Rev*. 2019;33(1):e00140-18.

67. Philippe B, Ibrahim-Granet O, Prévost MC, Gougerot-Pocidallo MA, Sanchez Perez M, Van der Meeren A, et al. Killing of *Aspergillus fumigatus* by alveolar macrophages is mediated by reactive oxidant intermediates. *Infect Immun*. 2003;71(6):3034-42.
68. Ibrahim-Granet O, Philippe B, Boleti H, Boisvieux-Ulrich E, Grenet D, Stern M, et al. Phagocytosis and Intracellular Fate of *Aspergillus fumigatus* Conidia in Alveolar Macrophages. *Infect Immun*. 2003;71(2):891-903.
69. Dellière S, Sze Wah Wong S, Amanianda V. Soluble mediators in anti-fungal immunity. *Curr Opin Microbiol*. 2020;58:24-31.
70. Höft MA, Hoving JC, Brown GD. Signaling C-Type Lectin Receptors in Antifungal Immunity. In: Yamasaki S, éditeur. *C-Type Lectins in Immune Homeostasis*. Cham: Springer International Publishing; 2020. p. 63-101. (Current Topics in Microbiology and Immunology; vol. 429).
71. Bittencourt VCB, Figueiredo RT, da Silva RB, Mourão-Sá DS, Fernandez PL, Sasaki GL, et al. An alpha-glucan of *Pseudallescheria boydii* is involved in fungal phagocytosis and Toll-like receptor activation. *J Biol Chem*. 2006;281(32):22614-23.
72. Figueiredo RT, Fernandez PL, Dutra FF, González Y, Lopes LC, Bittencourt VCB, et al. TLR4 recognizes *Pseudallescheria boydii* conidia and purified rhamnomannans. *J Biol Chem*. 2010;285(52):40714-23.
73. Bochud PY, Chien JW, Marr KA, Leisenring WM, Upton A, Janer M, et al. Toll-like receptor 4 polymorphisms and aspergillosis in stem-cell transplantation. *N Engl J Med*. 2008;359(17):1766-77.
74. Carvalho A, Pasqualotto AC, Pitzurra L, Romani L, Denning DW, Rodrigues F. Polymorphisms in Toll-Like Receptor Genes and Susceptibility to Pulmonary Aspergillosis. *J Infect Dis*. 2008;197(4):618-21.
75. Van der Graaf CAA, Netea MG, Morré SA, Den Heijer M, Verweij PE, Van der Meer JWM, et al. Toll-like receptor 4 Asp299Gly/Thr399Ile polymorphisms are a risk factor for *Candida* bloodstream infection. *Eur Cytokine Netw*. 2006;17(1):29-34.
76. Lazarus R, Klimecki WT, Raby BA, Vercelli D, Palmer LJ, Kwiatkowski DJ, et al. Single-nucleotide polymorphisms in the Toll-like receptor 9 gene (TLR9): frequencies, pairwise linkage disequilibrium, and haplotypes in three U.S. ethnic groups and exploratory case-control disease association studies. *Genomics*. 2003;81(1):85-91.
77. Hardison SE, Brown GD. C-type Lectin Receptors Orchestrate Anti-Fungal Immunity. *Nat Immunol*. 2012;13(9):817-22.
78. Bourgeois C, Majer O, Frohner IE, Tierney L, Kuchler K. Fungal attacks on mammalian hosts: pathogen elimination requires sensing and tasting. *Curr Opin Microbiol*. 2010;13(4):401-8.
79. Speakman EA, Dambuza IM, Salazar F, Brown GD. T Cell Antifungal Immunity and the Role of C-Type Lectin Receptors. *Trends Immunol*. 2020;41(1):61-76.
80. Cunha C, Di Ianni M, Bozza S, Giovannini G, Zagarella S, Zelante T, et al. Dectin-1 Y238X polymorphism associates with susceptibility to invasive aspergillosis in hematopoietic transplantation through impairment of both recipient- and donor-dependent mechanisms of antifungal immunity. *Blood*. 2010;116(24):5394-402.
81. Cunha C, Carvalho A. Genetic defects in fungal recognition and susceptibility to invasive pulmonary aspergillosis. *Med Mycol*. 2019;57(Supplement\_2):S211-8.
82. Lanternier F, Pathan S, Vincent QB, Liu L, Cypowj S, Prando C, et al. Deep dermatophytosis and inherited CARD9 deficiency. *N Engl J Med*. 2013;369(18):1704-14.

83. Segal BH, Romani LR. Invasive aspergillosis in chronic granulomatous disease. *Med Mycol.* 2009;47 Suppl 1:S282-290.
84. Beauté J, Obenga G, Le Mignot L, Mahlaoui N, Bougnoux ME, Mouy R, et al. Epidemiology and outcome of invasive fungal diseases in patients with chronic granulomatous disease: a multicenter study in France. *Pediatr Infect Dis J.* 2011;30(1):57-62.
85. Warris A, Netea MG, Verweij PE, Gaustad P, Kullberg BJ, Weemaes CMR, et al. Cytokine responses and regulation of interferon-gamma release by human mononuclear cells to *Aspergillus fumigatus* and other filamentous fungi. *Med Mycol.* 2005;43(7):613-21.
86. Urban CF, Nett JE. Neutrophil extracellular traps in fungal infection. *Semin Cell Dev Biol.* 2019;89:47-57.
87. Lamaris GA, Lewis RE, Chamilos G, May GS, Safdar A, Walsh TJ, et al. Caspofungin-mediated beta-glucan unmasking and enhancement of human polymorphonuclear neutrophil activity against *Aspergillus* and non-*Aspergillus* hyphae. *J Infect Dis.* 2008;198(2):186-92.
88. Luna-Rodríguez CE, González GM, Montoya AM, Treviño-Rangel R de J, Sánchez-González A. Production of neutrophil extracellular traps (NETs) in response to *Scedosporium apiospermum* in a murine model of pulmonary infection. *Microb Pathog.* 2020;149:104349.
89. Ramirez-Ortiz ZG, Lee CK, Wang JP, Boon L, Specht CA, Levitz SM. A nonredundant role for plasmacytoid dendritic cells in host defense against the human fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Cell Host Microbe.* 2011;9(5):415-24.
90. Bouzani M, Ok M, McCormick A, Ebel F, Kurzai O, Morton CO, et al. Human NK Cells Display Important Antifungal Activity against *Aspergillus fumigatus*, Which Is Directly Mediated by IFN- $\gamma$  Release. *J Immunol.* 2011;187(3):1369-76.
91. Guerra ES, Lee CK, Specht CA, Yadav B, Huang H, Akalin A, et al. Central Role of IL-23 and IL-17 Producing Eosinophils as Immunomodulatory Effector Cells in Acute Pulmonary Aspergillosis and Allergic Asthma. *PLOS Pathog.* 2017;13(1):e1006175.
92. Lilly LM, Scopel M, Nelson MP, Burg AR, Dunaway CW, Steele C. Eosinophil Deficiency Compromises Lung Defense against *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun.* 2014;82(3):1315-25.
93. Speth C, Löffler J, Krappmann S, Lass-Flörl C, Rambach G. Platelets as immune cells in infectious diseases. *Future Microbiol.* 2013;8(11):1431-51.
94. Wong SSW, Daniel I, Gangneux JP, Jayapal JM, Guegan H, Dellière S, et al. Differential interactions of serum and bronchoalveolar lavage complement proteins with conidia of airborne fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun.* 2020;88(9):e00212-20.
95. Moalli F, Doni A, Deban L, Zelante T, Zagarella S, Bottazzi B, et al. Role of complement and Fc{gamma} receptors in the protective activity of the long pentraxin PTX3 against *Aspergillus fumigatus*. *Blood.* 2010;116(24):5170-80.
96. Garlanda C, Hirsch E, Bozza S, Salustri A, De Acetis M, Nota R, et al. Non-redundant role of the long pentraxin PTX3 in anti-fungal innate immune response. *Nature.* 2002;420(6912):182-6.
97. He Q, Li H, Rui Y, Liu L, He B, Shi Y, et al. Pentraxin 3 Gene Polymorphisms and Pulmonary Aspergillosis in Chronic Obstructive Pulmonary Disease Patients. *Clin Infect Dis.* 2018;66(2):261-7.
98. Deo SS, Virassamy B, Halliday C, Clancy L, Chen S, Meyer W, et al. Stimulation with lysates of *Aspergillus terreus*, *Candida krusei* and *Rhizopus oryzae* maximizes cross-reactivity of anti-fungal T cells. *Cytotherapy.* 2016;18(1):65-79.



99. Hebart H, Bollinger C, Fisch P, Sarfati J, Meisner C, Baur M, et al. Analysis of T-cell responses to *Aspergillus fumigatus* antigens in healthy individuals and patients with hematologic malignancies. *Blood*. 2002;100(13):4521-8.
100. Conti HR, Gaffen SL. IL-17-mediated immunity to the opportunistic fungal pathogen *Candida albicans*. *J Immunol*. 2015;195(3):780-8.
101. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol*. 2009;27(1):485-517.
102. Souwer Y, Szegedi K, Kapsenberg ML, de Jong EC. IL-17 and IL-22 in atopic allergic disease. *Curr Opin Immunol*. 2010;22(6):821-6.
103. Moss RB. Pathophysiology and immunology of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Med Mycol*. 2005;43(Suppl 1):S203-6.
104. Li E, Rodriguez A, Luong AU, Allen D, Knight JM, Kheradmand F, et al. The Immune Response to Airway Mycosis. *Curr Opin Microbiol*. 2021;62:45-50.
105. Sehra S, Yao W, Nguyen ET, Glosson-Byers NL, Akhtar N, Zhou B, et al. TH9 cells are required for tissue mast cell accumulation during allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;136(2):433-440.e1.
106. Moretti S, Renga G, Oikonomou V, Galosi C, Pariano M, Iannitti RG, et al. A mast cell-ILC2-Th9 pathway promotes lung inflammation in cystic fibrosis. *Nat Commun*. 2017;8(1):14017.
107. Wine JJ, Hansson GC, König P, Joo NS, Ermund A, Pieper M. Progress in understanding mucus abnormalities in cystic fibrosis airways. *J Cyst Fibros Off J Eur Cyst Fibros Soc*. 2018;17(2S):S35-9.
108. Simonin J, Bille E, Crambert G, Noel S, Dreano E, Edwards A, et al. Airway surface liquid acidification initiates host defense abnormalities in Cystic Fibrosis. *Sci Rep*. 2019;9(1):6516.
109. Yonker LM, Marand A, Muldur S, Hopke A, Leung HM, De La Flor D, et al. Neutrophil dysfunction in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros Off J Eur Cyst Fibros Soc*. 2021;20(6):1062-71.
110. Wang G, Nauseef WM. Neutrophil dysfunction in the pathogenesis of cystic fibrosis. *Blood*. 2022;139(17):2622-31.
111. Hayes E, Murphy MP, Pohl K, Browne N, McQuillan K, Saw LE, et al. Altered Degranulation and pH of Neutrophil Phagosomes Impacts Antimicrobial Efficiency in Cystic Fibrosis. *Front Immunol*. 2020;11:600033.
112. Turton KB, Ingram RJ, Valvano MA. Macrophage dysfunction in cystic fibrosis: Nature or nurture? *J Leukoc Biol*. 2020;109(3):573-82.
113. Di A, Brown ME, Deriy LV, Li C, Szeto FL, Chen Y, et al. CFTR regulates phagosome acidification in macrophages and alters bactericidal activity. *Nat Cell Biol*. 2006;8(9):933-44.
114. Badr A, Eltobgy M, Krause K, Hamilton K, Estfanous S, Daily KP, et al. CFTR Modulators Restore Acidification of Autophago-Lysosomes and Bacterial Clearance in Cystic Fibrosis Macrophages. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022;12:819554.
115. Dague E, Alsteens D, Latgé JP, Dufrêne YF. High-Resolution Cell Surface Dynamics of Germinating *Aspergillus fumigatus* Conidia. *Biophys J*. 2008;94(2):656-60.
116. Ghamrawi S, Gastebois A, Zykwincka A, Vandeputte P, Marot A, Mabilieu G, et al. A Multifaceted Study of *Scedosporium boydii* Cell Wall Changes during Germination and Identification of GPI-Anchored Proteins. *PLoS One*. 2015;10(6):e0128680.

117. Mello TP, Oliveira SSC, Frases S, Branquinha MH, Santos ALS. Surface properties, adhesion and biofilm formation on different surfaces by *Scedosporium* spp. and *Lomentospora prolificans*. *Biofouling*. 2018;34(7):800-14.
118. Amanianda V, Bayry J, Bozza S, Kniemeyer O, Perruccio K, Elluru SR, et al. Surface hydrophobin prevents immune recognition of airborne fungal spores. *Nature*. 2009;460(7259):1117-21.
119. Rollin-Pinheiro R, Xisto MID da S, Rochetti VP, Barreto-Bergter E. *Scedosporium* Cell Wall: From Carbohydrate-Containing Structures to Host-Pathogen Interactions. *Mycopathologia*. 2020;185(6):931-46.
120. Rollin-Pinheiro R, Liporagi-Lopes LC, de Meirelles JV, Souza LM de, Barreto-Bergter E. Characterization of *Scedosporium apiospermum* glucosylceramides and their involvement in fungal development and macrophage functions. *PloS One*. 2014;9(5):e98149.
121. Abad A, Victoria Fernández-Molina J, Bikandi J, Ramírez A, Margareto J, Sendino J, et al. What makes *Aspergillus fumigatus* a successful pathogen? Genes and molecules involved in invasive aspergillosis. *Rev Iberoam Micol*. 2010;27(4):155-82.
122. Lima OC, Larcher G, Vandeputte P, Lebouil A, Chabasse D, Simoneau P, et al. Molecular cloning and biochemical characterization of a Cu,Zn-superoxide dismutase from *Scedosporium apiospermum*. *Microbes Infect*. 2007;9(5):558-65.
123. Mina S, Marot-Leblond A, Cimon B, Fleury MJJ, Larcher G, Bouchara JP, et al. Purification and characterization of a mycelial catalase from *Scedosporium boydii*, a useful tool for specific antibody detection in patients with cystic fibrosis. *Clin Vaccine Immunol*. 2015;22(1):37-45.
124. Staerck C, Yaakoub H, Vandeputte P, Tabiasco J, Godon C, Gastebois A, et al. The Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Superoxide Dismutase of *Scedosporium apiospermum* Protects the Conidia from Oxidative Stress. *J Fungi Basel Switz*. 2021;7(7):575.
125. Beauvais A, Latgé JP. *Aspergillus* Biofilm In Vitro and In Vivo. *Microbiol Spectr*. 2015;3(4):1-10.
126. Santos ALS, Bittencourt VCB, Pinto MR, Silva BA, Barreto-Bergter E. Biochemical characterization of potential virulence markers in the human fungal pathogen *Pseudallescheria boydii*. *Med Mycol*. 2009;47(4):375-86.
127. Rochetti VP, Rollin-Pinheiro R, de Oliveira EB, Xisto MID da S, Barreto-Bergter E. Glucosylceramide Plays a Role in Fungal Germination, Lipid Raft Organization and Biofilm Adhesion of the Pathogenic Fungus *Scedosporium aurantiacum*. *J Fungi*. 2020;6(4):E345.
128. Larcher G, Cimon B, Symoens F, Tronchin G, Chabasse D, Bouchara JP. A 33 kDa serine proteinase from *Scedosporium apiospermum*. *Biochem J*. 1996;315(Pt 1):119-26.
129. Silva BA, Pinto MR, Soares RMA, Barreto-Bergter E, Santos ALS. *Pseudallescheria boydii* releases metalloproteinases capable of cleaving several proteinaceous compounds. *Res Microbiol*. 2006;157(5):425-32.
130. Bhabhra R, Miley MD, Mylonakis E, Boettner D, Fortwendel J, Panepinto JC, et al. Disruption of the *Aspergillus fumigatus* gene encoding nucleolar protein CgrA impairs thermotolerant growth and reduces virulence. *Infect Immun*. 2004;72(8):4731-40.
131. Chang YC, Tsai HF, Karos M, Kwon-Chung KJ. THTA, a thermotolerance gene of *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genet Biol*. 2004;41(9):888-96.
132. Tomee, Kauffman. Putative virulence factors of *Aspergillus fumigatus*. *Clin Exp Allergy*. 2000;30(4):476-84.

133. Sugui JA, Pardo J, Chang YC, Zarembler KA, Nardone G, Galvez EM, et al. Gliotoxin Is a Virulence Factor of *Aspergillus fumigatus*: gliP Deletion Attenuates Virulence in Mice Immunosuppressed with Hydrocortisone. *Eukaryot Cell*. 2007;6(9):1562-9.
134. Le Govic Y, Papon N, Le Gal S, Bouchara JP, Vandeputte P. Non-ribosomal Peptide Synthetase Gene Clusters in the Human Pathogenic Fungus *Scedosporium apiospermum*. *Front Microbiol*. 2019;10(2062).
135. Staerck C, Landreau A, Herbette G, Roullier C, Bertrand S, Siegler B, et al. The secreted polyketide boydone A is responsible for the anti-*Staphylococcus aureus*: activity of *Scedosporium boydii*. *FEMS Microbiol Lett*. 2017;364(22).
136. Bertrand S, Larcher G, Landreau A, Richomme P, Duval O, Bouchara JP. Hydroxamate siderophores of *Scedosporium apiospermum*. *Biometals Int J Role Met Ions Biol Biochem Med*. 2009;22(6):1019-29.
137. Le Govic Y, Havlíček V, Capilla J, Luptáková D, Dumas D, Papon N, et al. Synthesis of the Hydroxamate Siderophore N  $\alpha$ -Methylcoprogen B in *Scedosporium apiospermum* Is Mediated by sidD Ortholog and Is Required for Virulence. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020;10:587909.
138. Hopke A, Brown AJP, Hall RA, Wheeler RT. Dynamic Fungal Cell Wall Architecture in Stress Adaptation and Immune Evasion. *Trends Microbiol*. 2018;26(4):284-95.
139. Latgé JP, Beauvais A, Chamilos G. The Cell Wall of the Human Fungal Pathogen *Aspergillus fumigatus*: Biosynthesis, Organization, Immune Response, and Virulence. *Annu Rev Microbiol*. 2017;71:99-116.
140. Beauvais A, Latgé JP. Special Issue: Fungal Cell Wall. *J Fungi*. 2018;4(3):91.
141. Valsecchi I, Dupres V, Michel J, Duchateau M, Matondo M, Chamilos G, et al. The puzzling construction of the conidial outer layer of *Aspergillus fumigatus*. *Cell Microbiol*. 2018;21(5):e12994.
142. Becker KL, Amanianda V, Wang X, Gresnigt MS, Ammerdorffer A, Jacobs CW, et al. *Aspergillus* Cell Wall Chitin Induces Anti- and Proinflammatory Cytokines in Human PBMCs via the Fc- $\gamma$  Receptor/Syk/PI3K Pathway. *mBio*. 2016;7(3):e01823-15.
143. van de Veerdonk FL, Gresnigt MS, Romani L, Netea MG, Latgé JP. *Aspergillus fumigatus* morphology and dynamic host interactions. *Nat Rev Microbiol*. 2017;15(11):661-74.
144. Ghamrawi S, Rénier G, Saulnier P, Cuenot S, Zykwinska A, Dutilh BE, et al. Cell Wall Modifications during Conidial Maturation of the Human Pathogenic Fungus *Pseudallescheria boydii*. *PloS One*. 2014;9(6):e100290.
145. de Meirelles JV, Xisto MID da S, Rollin-Pinheiro R, Serrato RV, Haido RMT, Barreto-Bergter E. Peptidorhamanomanan: A surface fungal glycoconjugate from *Scedosporium aurantiacum* and *Scedosporium minutisporum* and its recognition by macrophages. *Med Mycol*. 2021;59(5):441-52.
146. Xisto MIDS, Bittencourt VCB, Liporagi-Lopes LC, Haido RMT, Mendonça MSA, Sasaki G, et al. O-Glycosylation in Cell Wall Proteins in *Scedosporium prolificans* Is Critical for Phagocytosis and Inflammatory Cytokines Production by Macrophages. *PLOS ONE*. 2015;10(4):e0123189.
147. Xisto MIDS, Liporagi-Lopes LC, Muñoz JE, Bittencourt VCB, Santos GMP, Dias LS, et al. Peptidorhamanomanan negatively modulates the immune response in a scedosporiosis murine model. *Med Mycol*. 2016;54(8):846-55.
148. Pinto M, Rodrigues M, Travassos LR, Haido R, Wait R, Barreto-Bergter E. Characterization of glucosylceramides in *Pseudallescheria boydii* and their involvement in fungal differentiation. *Glycobiology*. 2002;12(4):251-60.

149. Caneppa A, de Meirelles JV, Rollin-Pinheiro R, Xisto MID da S, Liporagi-Lopes LC, de Souza L, et al. Structural Differences Influence Biological Properties of Glucosylceramides from Clinical and Environmental Isolates of *Scedosporium aurantiacum* and *Pseudallescheria minutispora*. *J Fungi*. 2019;5(3):62.
150. Xisto MID da S, Henao JEM, Dias LDS, Santos GMP, Calixto R de OR, Bernardino MC, et al. Glucosylceramides From *Lomentospora prolificans* Induce a Differential Production of Cytokines and Increases the Microbicidal Activity of Macrophages. *Front Microbiol*. 2019;10:554.
151. Odabasi Z, Paetznick VL, Rodriguez JR, Chen E, McGinnis MR, Ostrosky-Zeichner L. Differences in beta-glucan levels in culture supernatants of a variety of fungi. *Med Mycol*. 2006;44(3):267-72.
152. Steele C, Rapaka RR, Metz A, Pop SM, Williams DL, Gordon S, et al. The beta-glucan receptor dectin-1 recognizes specific morphologies of *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Pathog*. 2005;1(4):e42.
153. Nosanchuk JD, Casadevall A. The contribution of melanin to microbial pathogenesis. *Cell Microbiol*. 2003;5(4):203-23.
154. Enochs WS, Nilges MJ, Swartz HM. A standardized test for the identification and characterization of melanins using electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy. *Pigment Cell Res*. 1993;6(2):91-9.
155. Wakamatsu K, Ito S. Advanced chemical methods in melanin determination. *Pigment Cell Res*. 2002;15(3):174-83.
156. Eisenman HC, Casadevall A. Synthesis and assembly of fungal melanin. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2012;93(3):931-40.
157. Eisenman HC, Mues M, Weber SE, Frases S, Chaskes S, Gerfen G, et al. *Cryptococcus neoformans* laccase catalyses melanin synthesis from both d- and l-DOPA. *Microbiology*. 2007;153(12):3954-62.
158. Yabuuchi E, Ohyama A. Characterization of "pyomelanin"-producing strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Syst Bacteriol*. 1972;22:53-64.
159. Lehninger AL. Oxidative degradation of amino acids. In: *Biopolymers*. Worth Publishers; 1975. p. 568-70.
160. Fernandes C, Mota M, Barros L, Dias MI, Ferreira ICFR, Piedade AP, et al. Pyomelanin Synthesis in *Alternaria alternata* Inhibits DHN-Melanin Synthesis and Decreases Cell Wall Chitin Content and Thickness. *Front Microbiol*. 2021;12:691433.
161. Schmalzer-Ripcke J, Sugareva V, Gebhardt P, Winkler R, Kniemeyer O, Heinekamp T, et al. Production of pyomelanin, a second type of melanin, via the tyrosine degradation pathway in *Aspergillus fumigatus*. *Appl Environ Microbiol*. 2009;75(2):493-503.
162. Bell AA, Wheeler MH. Biosynthesis and Functions of Fungal Melanins. *Annu Rev Phytopathol*. 1986;24(1):411-51.
163. Langfelder K, Streibel M, Jahn B, Haase G, Brakhage AA. Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. *Fungal Genet Biol*. 2003;38:143-58.
164. Cao W, Zhou X, McCallum NC, Hu Z, Ni QZ, Kapoor U, et al. Unraveling the Structure and Function of Melanin through Synthesis. *J Am Chem Soc*. 2021;143(7):2622-37.
165. Mattoon ER, Cordero RJB, Casadevall A. Fungal Melanins and Applications in Healthcare, Bioremediation and Industry. *J Fungi*. 2021;7(6):488.

166. Wheeler MH, Klich MA. The Effects of Tricyclazole, Pyroquilon, Phthalide, and Related Fungicides on the Production of Conidial Wall Pigments by *Penicillium* and *Aspergillus* Species. *Pestic Biochem Physiol.* 1995;52(2):125-36.
167. Chang TS. An Updated Review of Tyrosinase Inhibitors. *Int J Mol Sci.* 2009;10(6):2440-75.
168. Heinekamp T, Thywißen A, Macheleidt J, Keller S, Valiante V, Brakhage AA. *Aspergillus fumigatus* melanins: interference with the host endocytosis pathway and impact on virulence. *Front Microbiol.* 2012;3:440.
169. Geib E, Gressler M, Viediarnikova I, Hillmann F, Jacobsen ID, Nietzsche S, et al. A Non-canonical Melanin Biosynthesis Pathway Protects *Aspergillus terreus* Conidia from Environmental Stress. *Cell Chem Biol.* 2016;23(5):587-97.
170. Smith DFQ, Casadevall A. The Role of Melanin in Fungal Pathogenesis for Animal Hosts. In: *Current Topics in Microbiology and Immunology.* Springer. 2019. p. 1-30.
171. Jia SL, Chi Z, Chen L, Liu GL, Hu Z, Chi ZM. Molecular evolution and regulation of DHN melanin-related gene clusters are closely related to adaptation of different melanin-producing fungi. *Genomics.* 2021;113(4):1962-75.
172. Eliahu N, Igbaria A, Rose MS, Horwitz BA, Lev S. Melanin biosynthesis in the maize pathogen *Cochliobolus heterostrophus* depends on two mitogen-activated protein kinases, Chk1 and Mps1, and the transcription factor Cmr1. *Eukaryot Cell.* 2007;6(3):421-9.
173. Wang X, Lu D, Tian C. Analysis of melanin biosynthesis in the plant pathogenic fungus *Colletotrichum gloeosporioides*. *Fungal Biol.* 2021;125(9):679-92.
174. Fetzner R, Seither K, Wenderoth M, Herr A, Correspondence RF, Fischer R. *Alternaria alternata* transcription factor CmrA controls melanization and spore development. *Microbiology.* 2014;160:1845-54.
175. Tsuji G, Kenmochi Y, Takano Y, Sweigard J, Farrall L, Furusawa I, et al. Novel fungal transcriptional activators, Cmr1p of *Colletotrichum lagenarium* and pig1p of *Magnaporthe grisea*, contain Cys2His2 zinc finger and Zn(II)2Cys6 binuclear cluster DNA-binding motifs and regulate transcription of melanin biosynthesis genes in a developmentally specific manner. *Mol Microbiol.* 2000;38(5):940-54.
176. Cho Y, Srivastava A, Ohm RA, Lawrence CB, Wang KH, Grigoriev IV, et al. Transcription factor Amr1 induces melanin biosynthesis and suppresses virulence in *Alternaria brassicicola*. *PLoS Pathog.* 2012;8(10):e1002974.
177. Huang P, Cao H, Li Y, Zhu S, Wang J, Wang Q, et al. Melanin Promotes Spore Production in the Rice Blast Fungus *Magnaporthe oryzae*. *Front Microbiol.* 2022;13:843838.
178. Luo X, Mao H, Wei Y, Cai J, Xie C, Sui A, et al. The fungal-specific transcription factor Vdvpf influences conidia production, melanized microsclerotia formation and pathogenicity in *Verticillium dahliae*. *Mol Plant Pathol.* 2016;17(9):1364-81.
179. Vandeputte P, Ghamrawi S, Rechenmann M, Iltis A, Giraud S, Fleury M, et al. Draft Genome Sequence of the Pathogenic Fungus *Scedosporium apiospermum*. *Genome Announc.* 2014;2(5):e00988-14.
180. Valiante V, Baldin C, Hortschansky P, Jain R, Thywißen A, Straßburger M, et al. The *Aspergillus fumigatus* conidial melanin production is regulated by the bifunctional bHLH DevR and MADS-box RImA transcription factors. *Mol Microbiol.* 2016;102(2):321-35.

181. Manfiolli AO, Siqueira FS, Dos Reis TF, Van Dijck P, Schrevels S, Hoefgen S, et al. Mitogen-Activated Protein Kinase Cross-Talk Interaction Modulates the Production of Melanins in *Aspergillus fumigatus*. *mBio*. 2019;10(2):e00215-19.
182. Takano Y, Kikuchi T, Kubo Y, Hamer JE, Mise K, Furusawa I. The *Colletotrichum lagenarium* MAP kinase gene CMK1 regulates diverse aspects of fungal pathogenesis. *Mol Plant-Microbe Interact* MPMI. 2000;13(4):374-83.
183. He P, Wang Y, Wang X, Zhang X, Tian C. The Mitogen-Activated Protein Kinase CgMK1 Governs Appressorium Formation, Melanin Synthesis, and Plant Infection of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Front Microbiol*. 2017;8:2216.
184. Li J, Zhou L, Yin C, Zhang D, Klosterman SJ, Wang B, et al. The *Verticillium dahliae* Sho1-MAPK pathway regulates melanin biosynthesis and is required for cotton infection. *Environ Microbiol*. 2019;21(12):4852-74.
185. Sun W, Yu Y, Chen J, Yu B, Chen T, Ying H, et al. Light Signaling Regulates *Aspergillus niger* Biofilm Formation by Affecting Melanin and Extracellular Polysaccharide Biosynthesis. *mBio*. 2021;12(1):e03434-20.
186. Seyedmousavi S, Netea MG, Mouton JW, Melchers WJG, Verweij PE, de Hoog GS. Black Yeasts and Their Filamentous Relatives: Principles of Pathogenesis and Host Defense. *Clin Microbiol Rev*. 2014;27(3):527-42.
187. Ludwig N, Löhner M, Hempel M, Mathea S, Schliebner I, Menzel M, et al. Melanin is not required for turgor generation but enhances cell-wall rigidity in appressoria of the corn pathogen *Colletotrichum graminicola*. *Mol Plant Microbe Interact*. 2014;27(4):315-27.
188. Morris-Jones R, Gomez BL, Diez S, Uran M, Morris-Jones SD, Casadevall A, et al. Synthesis of Melanin Pigment by *Candida albicans* In Vitro and during Infection. *Infect Immun*. 2005;73(9):6147-50.
189. Sheehan G, Garvey A, Croke M, Kavanagh K. Innate humoral immune defences in mammals and insects: The same, with differences ? *Virulence*. 2018;9(1):1625-39.
190. Franzen A, Cunha M, Miranda K, Hentschel J, Plattner H, Silva M, et al. Ultrastructural characterization of melanosomes of the human pathogenic fungus *Fonsecaea pedrosoi*. *J Struct Biol*. 2008;162(1):75-84.
191. Camacho E, Vij R, Chrissian C, Prados-Rosales R, Gil D, O'Meally RN, et al. The structural unit of melanin in the cell wall of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *J Biol Chem*. 2019;294(27):10471-89.
192. Upadhyay S, Xu X, Lowry D, Jackson JC, Roberson RW, Lin X. Subcellular Compartmentalization and Trafficking of the Biosynthetic Machinery for Fungal Melanin. *Cell Rep*. 2016;14(11):2511-8.
193. Carzaniga R, Fiocco D, Bowyer P, O'Connell RJ. Localization of melanin in conidia of *Alternaria alternata* using phage display antibodies. *Mol Plant Microbe Interact*. 2002;15(3):216-24.
194. Pihet M, Vandeputte P, Tronchin G, Renier G, Saulnier P, Georgeault S, et al. Melanin is an essential component for the integrity of the cell wall of *Aspergillus fumigatus* conidia. *BMC Microbiol*. 2009;9(1):1-11.
195. Baker LG, Specht CA, Donlin MJ, Lodge JK. Chitosan, the Deacetylated Form of Chitin, Is Necessary for Cell Wall Integrity in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell*. 2007;6(5):855-67.
196. Baker RP, Chrissian C, Stark RE, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* melanization incorporates multiple catecholamines to produce polytypic melanin. *J Biol Chem*. 2022;298(1).

197. Jahn B, Koch A, Schmidt A, Wanner G, Gehringer H, Bhakdi S, et al. Isolation and characterization of a pigmentless-conidium mutant of *Aspergillus fumigatus* with altered conidial surface and reduced virulence. *Infect Immun*. 1997;65(12):5110-7.
198. Cordero RJ, Casadevall A. Functions of fungal melanin beyond virulence. *Fungal Biol Rev*. 2017;31(2):99-112.
199. Casadevall A, Cordero RJB, Bryan R, Nosanchuk J, Dadachova E. Melanin, Radiation, and Energy Transduction in Fungi. *Microbiol Spectr*. 3 mars 2017;5(2):5.2.05.
200. Jacobson ES, Hove E, Emery HS. Antioxidant function of melanin in black fungi. *Infect Immun*. 1995;63(12):4944-5.
201. Rosas AL, Casadevall A. Melanization affects susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to heat and cold. *FEMS Microbiol Lett*. 1997;153(2):265-72.
202. Paolo WF, Dadachova E, Mandal P, Casadevall A, Szaniszló PJ, Nosanchuk JD. Effects of disrupting the polyketide synthase gene *WdPKS1* in *Wangiella [Exophiala] dermatitidis* on melanin production and resistance to killing by antifungal compounds, enzymatic degradation, and extremes in temperature. *BMC Microbiol*. 2006;6:55.
203. Fogarty RV, Tobin JM. Fungal melanins and their interactions with metals. *Enzyme Microb Technol*. 1996;19(4):311-7.
204. Braga GUL, Rangel DEN, Fernandes ÉKK, Flint SD, Roberts DW. Molecular and physiological effects of environmental UV radiation on fungal conidia. *Curr Genet*. 2015;61(3):405-25.
205. Jeon JR, Le TT, Chang YS. Dihydroxynaphthalene-based mimicry of fungal melanogenesis for multifunctional coatings. *Microb Biotechnol*. 2016;9(3):305-15.
206. Wang T, Ren D, Guo H, Chen X, Zhu P, Nie H, et al. *CgSCD1* Is Essential for Melanin Biosynthesis and Pathogenicity of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Pathog Basel Switz*. 2020;9(2):E141.
207. Liang Y, Xiong W, Steinkellner S, Feng J. Deficiency of the melanin biosynthesis genes *SCD1* and *THR1* affects sclerotial development and vegetative growth, but not pathogenicity, in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Mol Plant Pathol*. 2018;19(6):1444-53.
208. Chamilos G, Carvalho A. *Aspergillus fumigatus* DHN-Melanin. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2020;425:17-28.
209. Akoumianaki T, Kyrmizi I, Valsecchi I, Gresnigt MS, Samonis G, Drakos E, et al. *Aspergillus* Cell Wall Melanin Blocks LC3-Associated Phagocytosis to Promote Pathogenicity. *Cell Host Microbe*. 2016;19(1):79-90.
210. Chai LYA, Netea MG, Sugui J, Vonk AG, van de Sande WWJ, Warris A, et al. *Aspergillus fumigatus* Conidial Melanin Modulates Host Cytokine Response. *Immunobiology*. 2010;215(11):915-20.
211. Bayry J, Beaussart A, Dufrêne YF, Sharma M, Bansal K, Knemeyer O, et al. Surface Structure Characterization of *Aspergillus fumigatus* Conidia Mutated in the Melanin Synthesis Pathway and Their Human Cellular Immune Response. *Infect Immun*. 2014;82(8):3141-53.
212. Volling K, Thywissen A, Brakhage AA, Saluz HP. Phagocytosis of melanized *Aspergillus* conidia by macrophages exerts cytoprotective effects by sustained PI3K/Akt signalling. *Cell Microbiol*. 2011;13(8):1130-48.
213. Stappers MHT, Clark AE, Aïmanianda V, Bidula S, Reid DM, Asamaphan P, et al. Recognition of DHN-melanin by MelLec, is required for protective immunity to *Aspergillus*. *Nature*. 2018;555(7696):382-6.

214. van Duin D, Casadevall A, Nosanchuk JD. Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* Reduces Their Susceptibilities to Amphotericin B and Caspofungin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(11):3394-400.
215. Thywißen A, Heinekamp T, Dahse HM, Schmalder-Ripcke J, Nietsche S, Zipfel PF, et al. Conidial Dihydroxynaphthalene Melanin of the Human Pathogenic Fungus *Aspergillus fumigatus* Interferes with the Host Endocytosis Pathway. *Front Microbiol.* 2011;2(2):96.
216. Schmidt F, Thywißen A, Goldmann M, Cunha C, Cseresnyés Z, Schmidt H, et al. Flotillin-Dependent Membrane Microdomains Are Required for Functional Phagolysosomes against Fungal Infections. *Cell Rep.* 2020;32(7):108017.
217. Tsai HF, Washburn RG, Chang YC, Kwon-Chung KJ. *Aspergillus fumigatus* arp1 modulates conidial pigmentation and complement deposition. *Mol Microbiol.* 1997;26(1):175-83.
218. Doering TL, Nosanchuk JD, Roberts WK, Casadevall A. Melanin as a potential cryptococcal defence against microbicidal proteins. *Med Mycol.* 1999;37(3):175-81.
219. Romero-Martinez R, Wheeler M, Guerrero-Plata A, Rico G, Torres-Guerrero H. Biosynthesis and Functions of Melanin in *Sporothrix schenckii*. *Infect Immun.* 2000;68(6):3696-703.
220. Guan MQ, Yao L, Zhen Y, Song Y, Cui Y, Li SS. Melanin of *Sporothrix globosa* affects the function of THP-1 macrophages and modulates the expression of TLR2 and TLR4. *Microb Pathog.* 2021;159:105158.
221. Schnitzler N, Peltroche-Llacsahuanga H, Bestier N, Zündorf J, Lütticken R, Haase G. Effect of Melanin and Carotenoids of *Exophiala (Wangiella) dermatitidis* on Phagocytosis, Oxidative Burst, and Killing by Human Neutrophils. *Infect Immun.* 1999;67(1):94-101.
222. Feng B, Wang X, Hauser M, Kaufmann S, Jentsch S, Haase G, et al. Molecular cloning and characterization of WdPKS1, a gene involved in dihydroxynaphthalene melanin biosynthesis and virulence in *Wangiella (Exophiala) dermatitidis*. *Infect Immun.* 2001;69(3):1781-94.
223. Cunha MM, Franzen AJ, Seabra SH, Herbst MH, Vugman NV, Borba LP, et al. Melanin in *Fonsecaea pedrosoi*: a trap for oxidative radicals. *BMC Microbiol.* 2010;10:80.
224. Keizer EM, Valdes ID, McCann BL, Bignell EM, Wösten H a. B, de Cock H. The Protective Role of 1,8-Dihydroxynaphthalene-Melanin on Conidia of the Opportunistic Human Pathogen *Aspergillus fumigatus* Revisited: No Role in Protection against Hydrogen Peroxide and Superoxides. *mSphere.* 2022;7(1):e0087421.
225. Tsai HF, Chang YC, Washburn RG, Wheeler MH, Kwon-Chung KJ. The developmentally regulated alb1 gene of *Aspergillus fumigatus*: its role in modulation of conidial morphology and virulence. *J Bacteriol.* 1998;180(12):3031-8.
226. Buskirk AD, Templeton SP, Nayak AP, Hettick JM, Law BF, Green BJ, et al. Pulmonary immune responses to *Aspergillus fumigatus* in an immunocompetent mouse model of repeated exposures. *J Immunotoxicol.* 2014;11(2):180-9.
227. Xiao X, Li Y, Lan Y, Zhang J, He Y, Cai W, et al. Deletion of pksA attenuates the melanogenesis, growth and sporulation ability and causes increased sensitivity to stress response and antifungal drugs in the human pathogenic fungus *Fonsecaea monophora*. *Microbiol Res.* 2021;244:126668.
228. Alviano DS, Franzen AJ, Travassos LR, Holandino C, Rozental S, Ejzemberg R, et al. Melanin from *Fonsecaea pedrosoi* Induces Production of Human Antifungal Antibodies and Enhances the Antimicrobial Efficacy of Phagocytes. *Infect Immun.* 2004;72(1):229-37.



229. Lopez Robles MD, Pallier A, Huchet V, Le Texier L, Remy S, Braudeau C, et al. Cell-surface C-type lectin-like receptor CLEC-1 dampens dendritic cell activation and downstream Th17 responses. *Blood Adv.* 2017;1(9):557-68.
230. Rambach G, Blum G, Latgé JP, Fontaine T, Heinekamp T, Hagleitner M, et al. Identification of *Aspergillus fumigatus* Surface Components That Mediate Interaction of Conidia and Hyphae With Human Platelets. *J Infect Dis.* 2015;212(7):1140-9.
231. Wong SSW, Rani M, Dodagatta-Marri E, Ibrahim-Granet O, Kishore U, Bayry J, et al. Fungal melanin stimulates surfactant protein D-mediated opsonization of and host immune response to *Aspergillus fumigatus* spores. *J Biol Chem.* 2018;293(13):4901-12.
232. Madan T, Reid KBM, Clark H, Singh M, Nayak A, Sarma PU, et al. Susceptibility of mice genetically deficient in SP-A or SP-D gene to Invasive Pulmonary Aspergillosis. *Mol Immunol.* 2010;47(10):1923-30.
233. Gonçalves SM, Duarte-Oliveira C, Campos CF, Aïmanianda V, Ter Horst R, Leite L, et al. Phagosomal removal of fungal melanin reprograms macrophage metabolism to promote antifungal immunity. *Nat Commun.* 2020;11(1):2282.
234. Wang Y, Casadevall A. Growth of *Cryptococcus neoformans* in presence of L-dopa decreases its susceptibility to amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994;38(11):2648-50.
235. Fernandes C, Prados-Rosales R, Silva BMA, Nakouzi-Naranjo A, Zuzarte M, Chatterjee S, et al. Activation of Melanin Synthesis in *Alternaria infectoria* by Antifungal Drugs. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60(3):1646-55.
236. Kimura N, Fukuchi A. Management of melanin biosynthesis dehydratase inhibitor (MBI-D)-resistance in *Pyricularia oryzae* using a non-MBI-D fungicidal application program for nursery boxes and a diclocymet and ferimzone mixture for field foliar applications. *J Pestic Sci.* 2018;43(4):287-92.
237. Heidrich D, Pagani DM, Koehler A, Alves K de O, Scroferneker ML. Effect of melanin biosynthesis inhibition in the antifungal susceptibility of chromoblastomycosis agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 2021;65(8):e0054621.
238. Pereira JAL, Moraes LS de, Sena CBC de, Nascimento JLM do, Rodrigues APD, Silva SHM da, et al. Inhibition of Melanization by Kojic Acid Promotes Cell Wall Disruption of the Human Pathogenic Fungus *Fonsecaea* sp. *Pathog Basel Switz.* 2022;11(8):925.
239. Lim W, Konings M, Parel F, Eadie K, Strepis N, Fahal A, et al. Inhibiting DHN- and DOPA-melanin biosynthesis pathway increased the therapeutic value of itraconazole in *Madurella mycetomatis* infected *Galleria mellonella*. *Med Mycol.* 2022;60(2):myac003.
240. Ikeda R, Sugita T, Jacobson ES, Shinoda T. Effects of melanin upon susceptibility of *Cryptococcus* to antifungals. *Microbiol Immunol.* 2003;47(4):271-7.
241. da Silva MB, Marques AF, Nosanchuk JD, Casadevall A, Travassos LR, Taborda CP. Melanin in the dimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*: effects on phagocytosis, intracellular resistance and drug susceptibility. *Microbes Infect.* 2006;8(1):197-205.
242. van de Sande WWJ, de Kat J, Coppens J, Ahmed AOA, Fahal A, Verbrugh H, et al. Melanin biosynthesis in *Madurella mycetomatis* and its effect on susceptibility to itraconazole and ketoconazole. *Microbes Infect.* 2007;9(9):1114-23.
243. Polak A, Dixon DM. Loss of melanin in *Wangiella dermatitidis* does not result in greater susceptibility to antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 1989;33(9):1639-40.

244. Sheikh S, Britt RD, Ryan-Wenger NA, Khan AQ, Lewis BW, Gushue C, et al. Impact of Elexacaftor-Tezacaftor-Ivacaftor on Bacterial Colonization and Inflammatory Responses in Cystic Fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 2022;Epub ahead of print.
245. Middleton PG, Mall MA, Dřevínek P, Lands LC, McKone EF, Polineni D, et al. Elexacaftor-Tezacaftor-Ivacaftor for Cystic Fibrosis with a Single Phe508del Allele. *N Engl J Med*. 2019;381(19):1809-19.
246. Chesnay A, Bailly É, Cosson L, Flament T, Desoubeaux G. Advent of elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor for cystic fibrosis treatment: What consequences on *Aspergillus*-related diseases? Preliminary insights. *J Cyst Fibros Off J Eur Cyst Fibros Soc*. 2022;21(6):1084-5.
247. Currie AJ, Main ET, Wilson HM, Armstrong-James D, Warris A. CFTR Modulators Dampen *Aspergillus*-Induced Reactive Oxygen Species Production by Cystic Fibrosis Phagocytes. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020;10.
248. Denning DW, Venkateswarlu K, Oakley KL, Anderson MJ, Manning NJ, Stevens DA, et al. Itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997;41(6):1364–1368.
249. Guegan H, Chevrier S, Belleguic C, Deneuille E, Robert-Gangneux F, Gangneux JP. Performance of Molecular Approaches for *Aspergillus* Detection and Azole Resistance Surveillance in Cystic Fibrosis. *Front Microbiol*. 2018;9:531.
250. Guegan H, Prat E, Robert-Gangneux F, Gangneux JP. Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus*: A Five-Year Follow Up Experience in a Tertiary Hospital With a Special Focus on Cystic Fibrosis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021;10:613774.
251. Chishimba L, Langridge P, Powell G, Niven RM, Denning DW. Efficacy and safety of nebulised amphotericin B (NAB) in severe asthma with fungal sensitisation (SAFS) and allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA). *J Asthma Off J Assoc Care Asthma*. 2015;52(3):289-95.
252. Ram B, Aggarwal AN, Dhooria S, Sehgal IS, Garg M, Behera D, et al. A pilot randomized trial of nebulized amphotericin in patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis. *J Asthma*. 2016;53(5):517-24.
253. Godet C, Couturaud F, Marchand-Adam S, Pison C, Gagnadoux F, Blanchard E, et al. Nebulised liposomal amphotericin-B as maintenance therapy in allergic bronchopulmonary aspergillosis: a randomised, multicentre trial. *Eur Respir J*. 2022;59(6):2102218.
254. Hoenigl M, Sprute R, Egger M, Arastehfar A, Cornely OA, Krause R, et al. The Antifungal Pipeline: Fosmanogepix, Ibrexafungerp, Olorofim, Opelconazole, and Rezafungin. *Drugs*. 2021;81(15):1703-29.
255. Reihill JA, Moore JE, Elborn JS, Ennis M. Effect of *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans* on pro-inflammatory response in cystic fibrosis epithelium. *J Cyst Fibros*. 2011;10(6):401-6.
256. Chaudhary N, Datta K, Askin FB, Staab JF, Marr KA. Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Regulates Epithelial Cell Response to *Aspergillus* and Resultant Pulmonary Inflammation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;185(3):301-10.
257. Jouneau S, Bonizec M, Belleguic C, Desrues B, Brinchault G, Galaine J, et al. Anti-Inflammatory Effect of Fluvastatin on IL-8 Production Induced by *Pseudomonas aeruginosa* and *Aspergillus fumigatus* Antigens in Cystic Fibrosis. *PLoS ONE*. 2011;6(8):e22655.
258. Lévêque M, Simonin-Le Jeune K, Jouneau S, Moulis S, Desrues B, Belleguic C, et al. Soluble CD14 acts as a DAMP in human macrophages: origin and involvement in inflammatory cytokine/chemokine production. *FASEB J*. 2017;31(5):1891-902.

259. Simonin-Le Jeune K, Le Jeune A, Jouneau S, Belleguic C, Roux PF, Jaguin M, et al. Impaired functions of macrophage from cystic fibrosis patients: CD11b, TLR-5 decrease and sCD14, inflammatory cytokines increase. *PLoS One*. 2013;8(9):e75667.
260. Fontaine T, Beauvais A, Loussert C, Thevenard B, Fulgsang CC, Ohno N, et al. Cell wall alpha1-3glucans induce the aggregation of germinating conidia of *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genet Biol* FG B. 2010;47(8):707-12.
261. Gravelat FN, Beauvais A, Liu H, Lee MJ, Snarr BD, Chen D, et al. *Aspergillus* galactosaminogalactan mediates adherence to host constituents and conceals hyphal  $\beta$ -glucan from the immune system. *PLoS Pathog*. 2013;9(8):e1003575.
262. Danion F, van Rhijn N van, Dufour AC, Legendre R, Sismeiro O, Varet H, et al. *Aspergillus fumigatus*, One Uninucleate Species with Disparate Offspring. *J Fungi Basel Switz*. 2021;7(1):30.
263. Rizzetto L, Giovannini G, Bromley M, Bowyer P, Romani L, Cavalieri D. Strain Dependent Variation of Immune Responses to *A. fumigatus*: Definition of Pathogenic Species. *PLOS ONE*. 2013;8(2):e56651.
264. Harun A, Serena C, Gilgado F, Chen SCA, Meyer W. *Scedosporium aurantiacum* is as virulent as *S. prolificans*, and shows strain-specific virulence differences, in a mouse model. *Med Mycol*. 2010;48 Suppl 1:S45-51.
265. Demarco B, Chen KW, Broz P. Cross talk between intracellular pathogens and cell death. *Immunol Rev*. 2020;297(1):174-93.
266. Shah A, Kannambath S, Herbst S, Rogers A, Soresi S, Carby M, et al. Calcineurin Orchestrates Lateral Transfer of *Aspergillus fumigatus* during Macrophage Cell Death. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016;194(9):1127-39.
267. Arentshorst M, Ram AFJ, Meyer V. Using non-homologous end-joining-deficient strains for functional gene analyses in filamentous fungi. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2012;835:133-50.
268. Kück U, Hoff B. New tools for the genetic manipulation of filamentous fungi. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2010;86(1):51-62.
269. Casadevall A. Determinants of virulence in the pathogenic fungi. *Fungal Biol Rev*. 2007;21(4):130-2.
270. Coron N, Pihet M, Fréalle E, Lemeille Y, Pinel C, Pelloux H, et al. Toward the Standardization of Mycological Examination of Sputum Samples in Cystic Fibrosis: Results from a French Multicenter Prospective Study. *Mycopathologia*. 2018;183(1):101-17.
271. Cimon B, Carrere J, Chazalette JP. Bronchopulmonary mycoses in cystic fibrosis. Results of a five-year longitudinal study. *J Med Mycol*. 2000;10(3). Disponible sur: <https://www.em-consulte.com/article/108165/bronchopulmonary-mycoses-in-cystic-fibrosis-result>.
272. Armbruster CR, Coenye T, Touqui L, Bomberger JM. Interplay between host-microbe and microbe-microbe interactions in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2020;19:S47-53.
273. Mowat E, Rajendran R, Williams C, McCulloch E, Jones B, Lang S, et al. *Pseudomonas aeruginosa* and their small diffusible extracellular molecules inhibit *Aspergillus fumigatus* biofilm formation. *FEMS Microbiol Lett*. 2010;313(2):96-102.
274. Keown K, Reid A, Moore JE, Taggart CC, Downey DG. Coinfection with *Pseudomonas aeruginosa* and *Aspergillus fumigatus* in cystic fibrosis. *Eur Respir Rev Off J Eur Respir Soc*. 2020;29(158):200011.

275. Marques A de J, Rollin-Pinheiro R, Xisto MID da S, Dos Santos ALS, Barreto-Bergter E, Liporagi-Lopes LC. Influence of relevant cystic fibrosis bacteria on *Scedosporium apiospermum* and *Scedosporium boydii* growth and viability. *Braz J Microbiol.* 2021;52(1):185-93.
276. de Oliveira EB, Xisto MID da S, Rollin-Pinheiro R, Rochetti VP, Barreto-Bergter E. Peptidorhamnomannans From *Scedosporium* and *Lomentospora* Species Display Microbicidal Activity Against Bacteria Commonly Present in Cystic Fibrosis Patients. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020;10:598823.
277. Camps SMT, van der Linden JWM, Li Y, Kuijper EJ, van Dissel JT, Verweij PE, et al. Rapid Induction of Multiple Resistance Mechanisms in *Aspergillus fumigatus* during Azole Therapy: a Case Study and Review of the Literature. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(1):10-6.
278. Snelders E, Karawajczyk A, Schaftenaar G, Verweij PE, Melchers WJG. Azole Resistance Profile of Amino Acid Changes in *Aspergillus fumigatus* CYP51A Based on Protein Homology Modeling. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(6):2425-30.
279. Howard SJ, Cerar D, Anderson MJ, Albarrag A, Fisher MC, Pasqualotto AC, et al. Frequency and Evolution of Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus* Associated with Treatment Failure. *Emerg Infect Dis.* 2009;15(7):1068-76.
280. Chowdhary A, Kathuria S, Xu J, Meis JF. Emergence of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* strains due to agricultural azole use creates an increasing threat to human health. *PLoS Pathog.* 2013;9(10):e1003633.
281. Rasouly A, Shamovsky Y, Epshtein V, Tam K, Vasilyev N, Hao Z, et al. Analysing the fitness cost of antibiotic resistance to identify targets for combination antimicrobials. *Nat Microbiol.* 2021;6(11):1410-23.
282. Touati A, Bellil Z, Barache D, Mairi A. Fitness Cost of Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus*: A Systematic Review. *Microb Drug Resist Larchmt N.* 2021;27(9):1218-31.
283. Otto G. Fitness cost of antifungal resistance. *Nat Rev Microbiol.* 2022;20(11):637-637.
284. Ben-Ami R, Garcia-Effron G, Lewis RE, Gamarra S, Leventakos K, Perlin DS, et al. Fitness and virulence costs of *Candida albicans* FKS1 hot spot mutations associated with echinocandin resistance. *J Infect Dis.* 2011;204(4):626-35.
285. Mavridou E, Meletiadis J, Jancura P, Abbas S, Arendrup MC, Melchers WJG, et al. Composite Survival Index to Compare Virulence Changes in Azole-Resistant *Aspergillus fumigatus* Clinical Isolates. *PLOS ONE.* 2013;8(8):e72280.
286. Verweij PE, Zhang J, Debets AJ, Meis JF, van de Veerdonk FL, Schoustra SE, et al. In-host adaptation and acquired triazole resistance in *Aspergillus fumigatus*: a dilemma for clinical management. *Lancet Infect Dis.* 2016;16(11):e251–e260.
287. Vandeputte P, Dugé de Bernonville T, Le Govic Y, Le Gal S, Nevez G, Papon N, et al. Comparative transcriptome analysis unveils the adaptative mechanisms of *Scedosporium apiospermum* to the microenvironment encountered in the lungs of patients with cystic fibrosis. *Comput Struct Biotechnol J.* 2020;18:3468-83.
288. Gow NAR, Latge JP, Munro CA. The Fungal Cell Wall: Structure, Biosynthesis, and Function. *Microbiol Spectr.* 2017;5(3).
289. Gao J, Wang Q, Tang YD, Zhai J, Hu W, Zheng C. When ferroptosis meets pathogenic infections. *Trends Microbiol.* 2022;0(0). Disponible sur: [https://www.cell.com/trends/microbiology/abstract/S0966-842X\(22\)00314-6](https://www.cell.com/trends/microbiology/abstract/S0966-842X(22)00314-6)

290. Xu X, Lin D, Tu S, Gao S, Shao A, Sheng J. Is Ferroptosis a Future Direction in Exploring Cryptococcal Meningitis? *Front Immunol.* 2021;12. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.598601>
291. Horwath MC, Bell-Horwath TR, Lescano V, Krishnan K, Merino EJ, Deepe Jr. GS. Antifungal Activity of the Lipophilic Antioxidant Ferrostatin-1. *ChemBioChem.* 2017;18(20):2069-78.
292. Dar HH, Tyurina YY, Mikulska-Ruminska K, Shrivastava I, Ting HC, Tyurin VA, et al. *Pseudomonas aeruginosa* utilizes host polyunsaturated phosphatidylethanolamines to trigger theft-ferroptosis in bronchial epithelium. *J Clin Invest.* 2018;128(10):4639-53.
293. Petrucelli MF, Peronni K, Sanches PR, Komoto TT, Matsuda JB, Silva Junior WA da, et al. Dual RNA-Seq Analysis of *Trichophyton rubrum* and HaCat Keratinocyte Co-Culture Highlights Important Genes for Fungal-Host Interaction. *Genes.* 2018;9(7):362.
294. Pekmezovic M, Hovhannisyan H, Gresnigt MS, Iracane E, Oliveira-Pacheco J, Siscar-Lewin S, et al. *Candida* pathogens induce protective mitochondria-associated type I interferon signalling and a damage-driven response in vaginal epithelial cells. *Nat Microbiol.* 2021;6(5):643-57.
295. Feys S, Gonçalves SM, Khan M, Choi S, Boeckx B, Chatelain D, et al. Lung epithelial and myeloid innate immunity in influenza-associated or COVID-19-associated pulmonary aspergillosis: an observational study. *Lancet Respir Med.* 2022;10(12):1147-59.
296. Li R, Li Y, Xu W, Zhang M, Jiang Q, Liu Y, et al. Transcription factor AacmR mediated melanin synthesis regulates the growth, appressorium formation, stress response and pathogenicity of pear fungal *Alternaria alternata*. *Fungal Biol.* 2022;126(10):687-95.
297. Eisenman HC, Chow SK, Tsé KK, McClelland EE, Casadevall A. The effect of L-DOPA on *Cryptococcus neoformans* growth and gene expression. *Virulence.* 2011;2(4):329-36.
298. Nosanchuk JD, Rosas AL, Lee SC, Casadevall A. Melanisation of *Cryptococcus neoformans* in human brain tissue. *Lancet Lond Engl.* 2000;355(9220):2049-50.
299. Casadevall A. Melanin triggers antifungal defences. *Nature.* 2018;555(7696):319-20.
300. Nosanchuk JD, Jeyakumar A, Ray A, Revskaya E, Jiang Z, Bryan RA, et al. Structure-function analysis and therapeutic efficacy of antibodies to fungal melanin for melanoma radioimmunotherapy. *Sci Rep.* 2018;8(1):5466.

## ANNEXE

### **Annexe 1 : Moisissures dans l'environnement et impacts sur la santé humaine.**

J-P Gangneux., Florian Harel et Hélène GUEGAN, Revue Française des Laboratoires, 2022. *Manuscrit accepté (Epreuves non définitives).*



# Dossier scientifique

## Moisissures dans l'environnement et impacts sur la santé humaine

Jean-Pierre Gangneux\*, Florian Harel, Hélène Guegan

**a** Service de parasitologie-mycologie, Centre hospitalier universitaire de Rennes, 2 rue Henri-le-Guilloux, 35033 Rennes Cedex 09, France

**b** faculté de Médecine de Rennes, Université Rennes I,

**c** Institut de recherche en santé environnement et travail, Inserm UMR U1085, Université Rennes I, Rennes, France

\* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : jean-pierre.gangneux@univ-rennes1.fr (J.-P. Gangneux).

### RÉSUMÉ

L'exposition aux moisissures qui sont ubiquitaires dans notre environnement est inévitable dans de nombreuses circonstances : à l'hôpital, sur le lieu du travail, au domicile... et peut induire un risque infectieux ou allergique en fonction de différents facteurs prédisposants. Ne seront pas abordés ici les risques liés à la production de mycotoxines qui sont également un réel problème en santé animale et dans les activités agro-alimentaires.

À l'hôpital, l'exposition de patients immunodéprimés aux micromycètes filamenteux tels qu'*Aspergillus* ou les mucorales peut se compliquer d'infections graves telles que les aspergilloses ou les mucormycoses invasives. Ces infections peuvent être transmises par l'air mais aussi à partir d'autres réservoirs environnementaux : surfaces, eau, aliments, pansements etc. La prévention de ces infections liées aux soins repose sur deux stratégies possibles : la chimioprophylaxie et la maîtrise du risque environnemental dans des secteurs « protégés » avec traitement de l'air et mesures annexes. Dans le cadre professionnel ou au domicile, l'exposition récurrente et prolongée aux moisissures de l'environnement peut induire des tableaux d'infections chroniques ou immunoallergiques, en fonction de différents facteurs de susceptibilité de l'hôte. Aux moisissures, s'ajoute généralement une exposition plus globale, microbiologique (avec les levures, *Pneumocystis*, les bactéries et les virus) et chimique, constituant l'exposome dans son ensemble avec des risques d'effets synergiques (ou effets cocktails). Des méthodes de remédiation peuvent être déployées en cas de forte exposition, au domicile ou sur le lieu du travail, ainsi que la déclaration de certaines maladies professionnelles.

La surveillance de la biocontamination fongique environnementale est un outil désormais indispensable dans les secteurs dits « protégés » des établissements de santé et peut se révéler pertinente, mais selon des modalités différentes, pour analyser le risque domiciliaire ou professionnel.

#### MOTS CLÉS

- ▶ aérocontamination
- ▶ aspergillose
- ▶ aspergillose bronchopulmonaire allergique
- ▶ aspergillose chronique
- ▶ aspergillose invasive
- ▶ *Aspergillus*
- ▶ contrôle de l'environnement hospitalier
- ▶ infection liées aux soins
- ▶ mucorales
- ▶ risque domiciliaire

#### KEYWORDS

#### ABSTRACT

##### Mould in the environment and impacts on human health

Exposure to ubiquitous molds in our environment is inevitable in many circumstances: at hospital, at work, at home... and can be responsible for infection and allergy depending on different underlying risk factors. Of note, on another risk linked to mycotoxin production by fungi that also represents a real threat for animals and plants will not be addressed here.

In hospitals, exposure of immunosuppressed patients to filamentous micromycetes such as *Aspergillus* and mucorales can result in lifethreatening invasive aspergillosis and mucormycosis. These infections can be transmitted via airborne conidia, that may also come from different environmental reservoirs: surfaces, water, food, or even plasters.... Prevention of these infections relies on two possible strategies: chemoprophylaxis and environmental prevention with air treatment and associated measures that allow a « protected area ». At work and at home, recurrent exposure to molds can result in chronic infection or immunoallergic disease. Beside molds, combination of exposure to other microorganisms (such as yeasts, *Pneumocystis*, bacteria and viruses) as well as to chemical compounds, what we call the exposome, can induce



## Dossier scientifique

### ► Réservoirs et voies de transmission des moisissures d'intérêt médical

Les moisissures sont pour la plupart des phytopathogènes qui se développent en saprophytes dans la terre, sur les plantes ou sur les débris végétaux en voie de putréfaction. Elles sont donc omniprésentes dans notre environnement et leur développement est favorisé par l'humidité. Parmi ces moisissures, certaines sont d'intérêt médical car opportunistes et responsables d'infections fongiques. Parmi elles, il y a essentiellement le genre *Aspergillus* mais aussi d'autres hyalophomycètes dont les Mucoromycètes (ou mucorales). De nombreuses moisissures sont également responsables de manifestations immunoallergiques en cas d'exposition chronique. On peut les retrouver dans l'air, sur le sol et dans les poussières, au niveau des surfaces, et parfois dans l'eau ou l'alimentation.

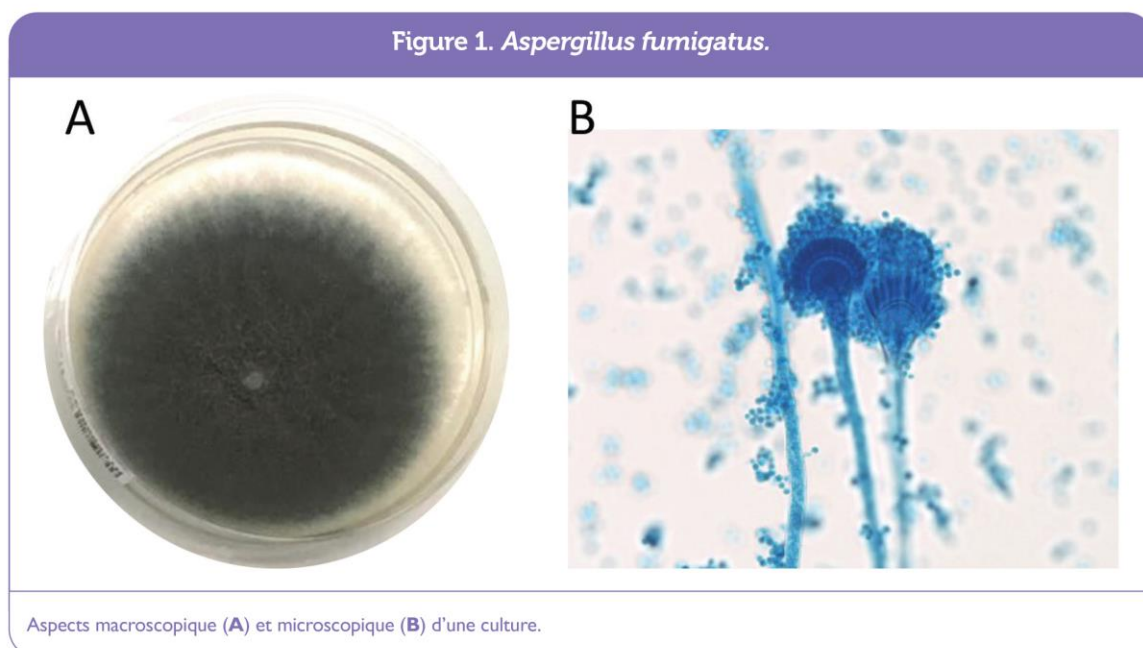
La porte d'entrée aérienne est la plus commune, notamment pour *Aspergillus* dont les conidies mesurant entre 2 et 5 micromètres de diamètre (pour l'espèce *fumigatus*) peuvent atteindre les alvéoles pulmonaires (**figure 1**) [1]. L'atteinte initiale est donc préférentiellement pulmonaire ou sinusienne, puis la capacité d'angio-invasion d'*Aspergillus* ou des mucorales peut aboutir à une dissémination systémique à d'autres organes en particulier chez les patients les plus à risque. Les réservoirs en milieu hospitalier sont multiples et des préconisations sur le risque environnemental fongique

sont émises depuis de nombreuses années [2]. L'air et les surfaces des chambres et des espaces communs d'un service représentent le réservoir principal. Les spores fongiques de moisissures potentiellement pathogènes telles qu'*Aspergillus* peuvent ainsi être retrouvées dans de nombreuses localisations détaillées dans le **tableau 1** : plantes et fleurs coupées, cartons et emballages, filtres et grilles d'aération, matériaux de protection contre le feu, téléviseurs et rampes électriques, climatiseurs, humidificateurs d'air et barboteurs à oxygène etc.

Certains champignons filamenteux comme le genre *Fusarium* peuvent être rencontrés préférentiellement dans des zones humides et les circuits d'eau : bodes de lavabo et de douche, becs et filtres de robinets, notamment. *Aspergillus* a également été retrouvé dans des prélèvements d'eau mais selon des charges très variables d'une région à l'autre. En France, la conjonction d'une eau fréquemment de puisage et de systèmes de filtration efficaces permet d'obtenir un pourcentage d'échantillons contaminés généralement très faible [3,4]. L'alimentation peut aussi représenter une source d'exposition aux moisissures, mais des procédés de décontamination sont proposés dans la littérature [5-7]. Enfin les travaux de démolition ou de construction, fréquents dans les établissements de santé, sont des activités à risque très élevé de remise en suspension de spores dans l'air et donc susceptible d'accroître momentanément l'exposition.

Au domicile et sur le lieu du travail, c'est l'exposition à une flore totale potentiellement allergisante qui mérite attention. Les moisissures environnementales les plus fréquentes sont *Cladosporium*, *Penicillium*, *Alternaria*,

Figure 1. *Aspergillus fumigatus*.





## Dossier scientifique Microbiologie de l'environnement

**Tableau 1. Principales moisissures responsables d'infections fongiques invasives, facteurs de risques majeurs de susceptibilité d'hôte et principaux réservoirs intérieurs en établissement de santé.**

<p><b>Principales moisissures responsables d'infections fongiques invasives</b></p>	<p><b>Moisissures les plus fréquentes</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Aspergillus</i> section <i>Fumigati</i> en majorité</li> <li>- <i>A. non fumigatus</i> (sections <i>Flavi</i>, <i>Nigri</i>, <i>Terrei</i>, <i>Nidulantes</i>, puis autres)</li> <li>- <i>Fusarium</i> sp., (<i>F. solani</i>, <i>F. oxysporum</i>, <i>F. moniliforme</i>)</li> <li>- Mucorales (<i>Rhizopus</i> sp., <i>Mucor</i> sp., <i>Lichtheimia</i> sp., <i>Cunninghamella</i> sp., puis autres)</li> </ul> <p><b>Moisissures les moins fréquentes</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Scedosporium</i> (<i>S. apiospermium</i>, <i>L. prolificans</i>)</li> <li>- Dematiées (moisissures « noires ») (<i>Alternaria</i> sp., <i>Exophiala</i> sp., <i>Ulocladium</i> sp., <i>Scopulariopsis</i> sp., <i>Curvularia</i> sp.)</li> <li>- <i>Acremonium</i> sp., <i>Paecilomyces</i> sp. et <i>Trichoderma</i> sp.</li> </ul>
<p><b>Facteurs de risque majeurs de susceptibilité d'hôte</b></p>	<p><b>Populations à très haut risque</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Allogreffe de cellules hématopoïétiques, notamment en cas d'âge avancé, de maladie en rechute, de seconde allogreffe, de greffe phéno- versus géno-identique, d'incompatibilité HLA, d'irradiation corporelle totale (ICT) dans le conditionnement, de la présence d'une maladie du greffon contre l'hôte, d'une maladie à cytomégalovirus (CMV), de surcharge en fer</li> <li>- Autogreffe de cellules souches hématopoïétiques d'origine médullaire</li> <li>- Déficits immunitaires combinés sévères</li> <li>- Neutropénie (avec polynucléaires neutrophiles [PNN] inférieurs à 500/mm<sup>3</sup>) post-chimiothérapie de durée supérieure à 14 jours ou neutropénie avec PNN inférieurs à 100/mm<sup>3</sup> quelle qu'en soit la durée</li> <li>- Aplasie médullaire sévère</li> </ul> <p><b>Populations à haut risque</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Corticothérapie haute dose ou certaines biothérapies (par exemple inhibiteur de Bruton tyrosine kinase) dans le cadre du traitement d'une hémopathie lymphoïde</li> <li>- Neutropénie (avec PNN inférieur à 500/mm<sup>3</sup>) post-chimiothérapie, durée inférieure à 14 jours</li> <li>- Transplantation d'organe solide : pulmonaire &gt; foie et rein &gt; coeur, pancréas, intestin</li> <li>- Maladies pulmonaires chroniques bénéficiant d'un traitement par corticostéroïdes ou autre immunosuppresseur : bronchopneumopathie obstructive, emphysème, dilatation des bronches, asthme non contrôlé, mucoviscidose</li> <li>- Granulomatose septique chronique (enfants et adultes)</li> <li>- Nouveau-nés en réanimation néonatale</li> <li>- Leucémie aiguë myéloblastique en rechute ou réfractaire</li> </ul> <p><b>Population à risque moindre</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Corticothérapie haute dose répétée et/ou prolongée</li> <li>- Patients sous ventilation mécanique, notamment pour grippe ou infection Covid-19 sévères</li> <li>- Patients dialysés</li> <li>- Brûlés (plus de 50 % de la surface corporelle)</li> <li>- Patients sous chimiothérapie anticancéreuse</li> <li>- Patients positifs pour le VIH au stade Sida avec lymphocytes T CD4+ inférieurs à 50/mm<sup>3</sup></li> <li>- Acidocétose diabétique</li> <li>- Maladies systémiques</li> </ul>
<p><b>Principaux réservoirs intérieurs en établissement de santé</b></p>	<p><b>Localisations classiques</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Plantes et fleurs coupées</li> <li>- Cartons et emballages</li> <li>- Filtres et bouches d'aération</li> <li>- Matériaux de protection contre le feu</li> <li>- Climatiseurs, humidificateurs, barboteurs à oxygène</li> <li>- Téléviseurs et rampes électriques</li> <li>- Poussière contenue dans les espaces situés au-dessus des faux plafonds</li> <li>- Murs et papiers peints, tapis</li> <li>- Alimentation</li> </ul> <p><b>Localisations spécifiques</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Circuits d'eau (essentiellement pour <i>Fusarium</i> sp.) : bondes de lavabo et de douche, becs et filtres de robinet</li> </ul> <p><b>Situations à risque majoré</b></p> <p>Les périodes de travaux sont associées à une augmentation majeure de la charge fongique environnementale :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- démolition/construction</li> <li>- travaux intérieurs (perçage de trou, empoussièremment, dépose de faux-plafonds etc...)</li> </ul>

D'après [13].





## Dossier scientifique

*Aspergillus* et reflètent la diversité fongique dans l'environnement que l'on retrouvera dans l'air, sur les surfaces ou les poussières [8,9]. Parfois, l'exposition récurrente à une flore plus restreinte est observée, par exemple secondaire à l'exposition à certains animaux (notamment les oiseaux), à la croissance anormale de micromycètes suite à des dégâts des eaux (plages de croissance visibles macroscopiquement sur les murs, le sol et le plafond, les bouches d'aération), ou encore à la manipulation/exposition à des matrices favorables à la croissance des moisissures dans le monde de l'agriculture et de l'élevage (foin, paille, etc.).

### Impacts sur la santé

#### À l'hôpital

L'exposition des moisissures en établissement de santé fait essentiellement craindre des infections fongiques invasives (IFI), en particulier les aspergilloses invasives, les mucormycoses et les fusarioses. Le pronostic de ces maladies reste péjoratif, en dépit des améliorations diagnostiques et thérapeutiques au cours des dernières années [10]. La mortalité globale des aspergilloses invasives était de 42,5 % pour la période 2012-2018 (1 661 cas colligés par le Centre national de référence pour les mycoses et antifongiques), celle des mucormycoses (314 cas) était de 59,3 % [10]. Plusieurs éléments semblent déterminants pour améliorer le pronostic de ces infections :

- la précocité diagnostique, à l'exemple du screening systématique proposé chez les patients d'hématologie les plus à risque et ne bénéficiant pas d'une chimioprophylaxie antifongique ;
- la maîtrise du risque fongique environnemental *via* le traitement de l'air associé à des pressions positives et un haut renouvellement d'air, à laquelle s'ajoutent différentes mesures annexes de décontamination des aliments et des biens dans un contexte de précaution « Air » ;
- la chimioprophylaxie antifongique, initialement à spectre étroit anti-levures (fluconazole) mais qui s'est progressivement étendue aux champignons filamenteux (posaconazole et voriconazole).

Plus récemment, les patients de réanimation bénéficiant d'une ventilation mécanique, en particulier pour grippe sévère ou infection Covid-19 grave, ont émergé comme une population à risque [11,12]. La prévention de la diffusion du virus Sars-CoV-2 reposant sur l'hébergement des patients dans des chambres

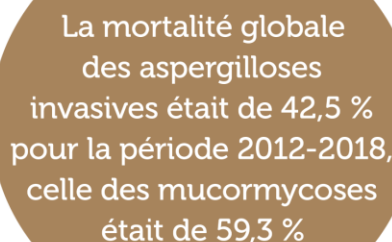
à pression négative préconisée dans les premiers temps de l'épidémie a probablement été un facteur de risque aspergillaire surajouté chez les patients de réanimation.

Le **tableau 1** récapitule les principales moisissures responsables d'IFI, les facteurs de risques majeurs de susceptibilité d'hôte et les principaux réservoirs intérieurs en établissement de santé. Notons qu'en parallèle de ces IFI à champignons filamenteux, le risque de pneumocystose et de candidose invasive/candidémie est également très élevé et peut également justifier la mise en place de stratégies de prévention.

#### Au travail

Les pneumopathies d'hypersensibilité, ou alvéolites allergiques extrinsèques (AAE), sont des pneumopathies inflammatoires de mécanisme immuno-allergique complexe parfois reconnues comme maladies professionnelles (INRS 2003) [14]. L'inhalation chronique d'une grande diversité d'antigènes organiques ou chimiques de faible poids moléculaire peut chez certains patients être responsables d'AAE [15]. Ces atteintes sont plus souvent rencontrées en milieu rural du fait d'expositions à des micro-organismes fongiques ou bactériens qui se développent dans des substrats organiques. La maladie du poumon de fermier est l'atteinte la plus fréquente [16], surtout en milieu rural, mais sont également décrites d'autres pathologies en lien avec des activités professionnelles spécifiques, comme les maladies des champignonnistes, des ouvriers du bois et des bûcherons, des fromagers, des trempes de saucissons, des vigneron, ou encore des mécaniciens et des plâtriers [17-19]. Chez les agriculteurs en milieu de production laitière, où le risque est beaucoup plus important qu'en zone de culture céréalière en particulier à cause de l'utilisation d'ensilage, la prévalence en France se situe entre 0,2 et 1,5 % [20]. Diverses espèces de moisissures seraient impliquées dans les pneumopathies d'hypersensibilité, dont le nombre d'agents étiologiques possibles ne cesse de s'accroître.

La broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) qui se définit comme une maladie chronique inflammatoire, lentement progressive atteignant les bronches, peut parfois être la conséquence d'exposition chronique à des champignons. Les atteintes respiratoires en milieu agricole seraient dominées, en termes de fréquence et de gravité, par les BPCO [21,22]. Dans le Doubs, en milieu agricole



La mortalité globale des aspergilloses invasives était de 42,5 % pour la période 2012-2018, celle des mucormycoses était de 59,3 %



## Dossier scientifique Microbiologie de l'environnement

Tableau 2. Principaux objectifs de la surveillance environnementale.

À l'hôpital	En milieu professionnel	Au domicile
<ul style="list-style-type: none"> <li>▸ Rechercher l'origine d'une infection fongique acquise en établissement de santé</li> <li>▸ Investiguer en cas de cas groupés/épidémies</li> <li>▸ Contrôler l'efficacité des moyens et des mesures adoptées pour supprimer la contamination fongique dans les locaux bénéficiant d'un air maîtrisé</li> <li>▸ Vérifier l'efficacité des mesures préventives mises en place à l'occasion de travaux</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▸ Évaluer la charge fongique globale dans un environnement professionnel</li> <li>▸ Identifier l'allergène responsable d'une maladie allergique liée au milieu professionnel, lorsque cela est possible</li> <li>▸ Proposer des mesures de remédiation et de protection du salarié et vérifier leur efficacité</li> <li>▸ Argumenter pour une éviction professionnelle</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▸ Évaluer la charge fongique globale dans l'environnement domiciliaire</li> <li>▸ Identifier l'allergène responsable d'une maladie allergique en cas de contamination mono/pauci-microbienne, lorsque cela est possible</li> <li>▸ Proposer des mesures de remédiation notamment via des conseillers en environnement intérieur et vérifier leur efficacité</li> </ul>

D'après [???].

fourrager, la prévalence de la bronchite chronique chez les actifs agricoles se situait en 1996 aux alentours de 10 %, et près de 6 % chez les non-fumeurs [23].

La surveillance par la médecine du travail, à la fois clinique et environnementale, permet d'envisager une éviction professionnelle, si besoin.

### Au domicile

Les troubles respiratoires chroniques constituent dans notre pays un enjeu de santé publique important : ils figurent parmi les maladies les plus fréquentes, et les conséquences peuvent être graves. L'asthme est encore à l'origine d'environ 1 000 décès par an, et 16 000 personnes meurent chaque année de BPCO, maladie encore largement sous-diagnostiquée [24,25]. Cette prévalence engendre une morbidité dont le coût est élevé pour la société (médicaments, hospitalisations). Elle souligne aussi l'intérêt de la mise en place de stratégies de prévention primaire (prévention de l'apparition des troubles) et secondaire (prévention des décompensations respiratoires). Des stratégies d'éviction globale des allergènes dont les allergènes fongiques via des conseillers en environnement intérieur (CEI) ont fait la preuve de leur efficacité [26,27]. Outre la mise en évidence d'une potentielle contamination par des moisissures (visible macroscopiquement ou détectée par des méthodes analytiques plus sophistiquées, voir ci-dessous), la visite du CEI généralement prescrite au patient par son médecin traitant, proposera des mesures de remédiation dont il faudra s'assurer de l'efficacité. Plus récemment, certaines biothérapies modulant les voies de l'allergie ont également montré l'intérêt d'une approche pharmacologique. L'utilisation de biothérapies anti-IgE et anti-Th2 (anti-IL4, anti-IL5, anti-IL13) est prometteuse, en particulier pour diminuer les exacerbations chez les patients présentant un asthme allergique [28,29].

### Objectifs de la surveillance fongique environnementale

Les principaux objectifs de la surveillance environnementale sont présentés dans le **tableau 2**.

À l'hôpital, cette surveillance s'inclut essentiellement dans la prévention des infections liées aux soins pour assurer au patient une bonne qualité de l'air dans les locaux bénéficiant d'un traitement de l'air [3]. Des prélèvements environnementaux peuvent également être fait dans le cadre d'investigations d'épidémies. En milieu professionnel ou au domicile, la surveillance sera plutôt un outil d'identification de potentiels allergènes chez les patients présentant des maladies respiratoires chroniques, et une modalité de vérification de l'efficacité de mesures de remédiation. La place des approches indirectes de mise en évidence des composés organiques volatiles ou des mycotoxines reste à positionner, mais la vision globale de l'exposome microbiologique et chimique représente sûrement l'indicateur le plus pertinent [30].

### Modalités de la surveillance fongique environnementale

Les méthodes analytiques adaptées à l'environnement à surveiller (hôpital, milieu professionnel ou domicile) et un choix pertinent du type d'échantillon, du milieu de culture, ou encore de la température et de la durée d'incubation sont déterminants pour la recherche de champignons [31]. Le **tableau 3** récapitule les différences de modalités selon le type d'environnement.

#### À l'hôpital

Des prélèvements d'air peuvent être effectués et interprétés lorsqu'ils sont réalisés en zone à environnement maîtrisé, c'est-à-dire bénéficiant d'un



## Dossier scientifique

Tableau 3. Différences de modalités de la surveillance fongique environnementale selon le type d'environnement.

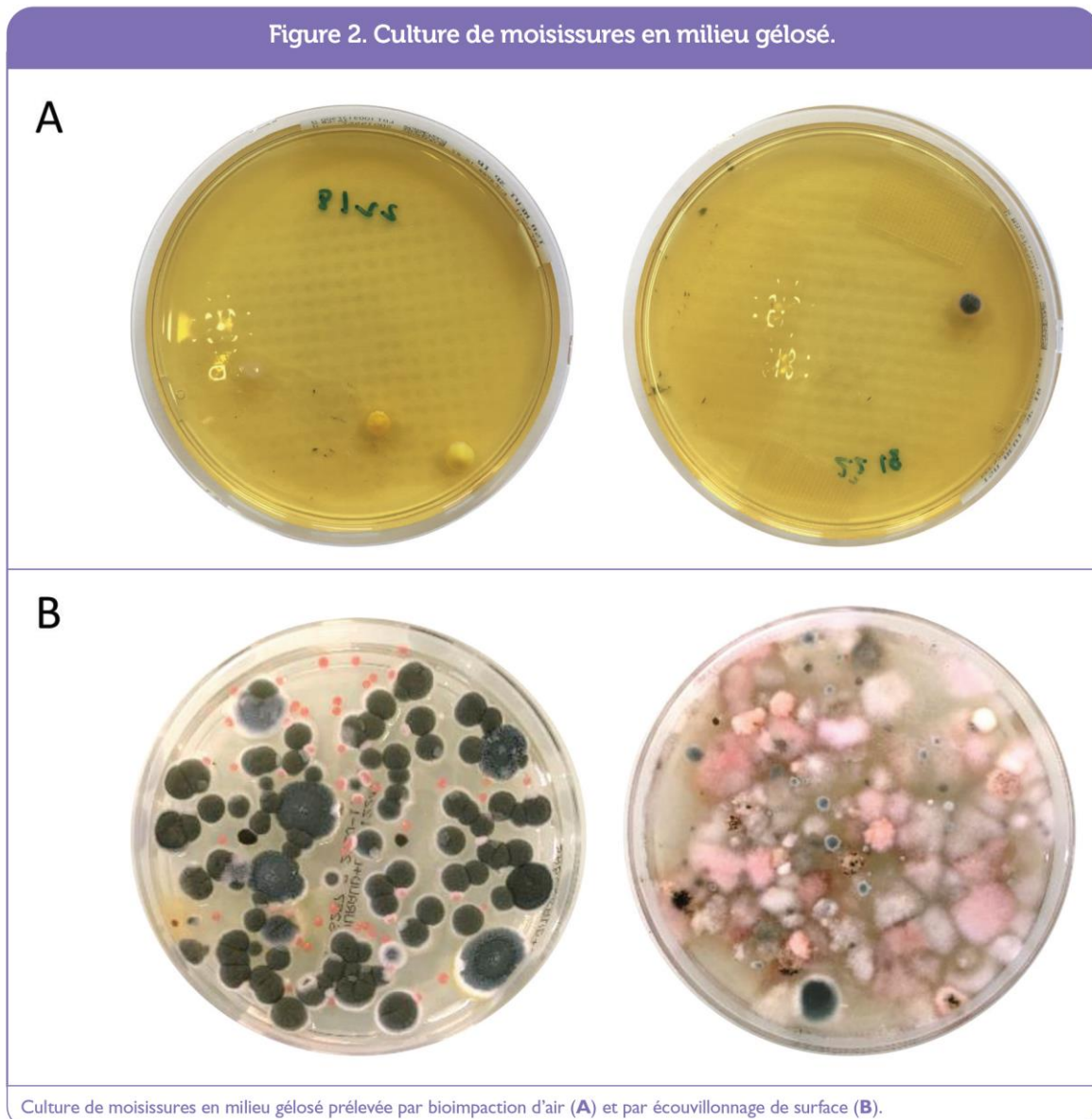
	À l'hôpital	En milieu professionnel	Au domicile	Commentaires
<b>Prélèvements à privilégier</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▸ Air</li> <li>▸ Surfaces</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▸ Surfaces</li> <li>▸ Poussières +/- Air</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▸ Poussières</li> <li>▸ Surfaces</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▸ Une mesure dans l'air analyse un risque instantané</li> <li>▸ Les surfaces et poussières sont davantage des marqueurs de l'historique de la contamination</li> </ul>
<b>Méthode de prélèvement d'air à privilégier</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▸ Impaction sur gélose pour analyse de la viabilité</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▸ Centrifugation</li> <li>▸ Filtration</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▸ Centrifugation</li> <li>▸ Filtration</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▸ L'impaction sur gélose apprécie la viabilité mais seule la technique culturale sera effectuée. Cependant, une saturation des boîtes est possible en cas de forte contamination (<b>figures 2A et 2B</b>)</li> <li>▸ La filtration et la centrifugation permettent de déployer d'autres méthodes sur le prélèvement (moléculaire, immuno-enzymatique...)</li> </ul>
<b>Méthodes de prélèvements de surfaces et de poussières</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▸ Surfaces par boîtes « contact » ou écouvillonnage humide</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▸ Poussières par aspirateur avec embout muni de filtre</li> <li>▸ Poussières sur lingettes électrostatiques</li> <li>▸ Prélèvements de surfaces par écouvillonnage humide</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▸ Poussières par aspirateur avec embout muni de filtre</li> <li>▸ Poussières sur lingettes électrostatiques</li> <li>▸ Prélèvements de surfaces par écouvillonnage humide</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▸ L'écouvillonnage humide est facile à déployer à l'hôpital et permet de prélever des surfaces non planes ou exiguës (rebords de fenêtre, bouche d'aération etc...).</li> <li>▸ Les poussières permettent une analyse non seulement culturale mais aussi par d'autres méthodes à la recherche de fragments fongiques ou d'allergènes (moléculaire, immuno-enzymatique...)</li> </ul>
<b>Modalités de détection directe des champignons</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▸ Culture : Sabouraud ou Sabouraud-chloramphenicol ou gélose au Malt Agar (MAE) essentiellement</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▸ Culture : gélose au Malt Agar (MEA) ou dichloran glycerol Agar (DG 18)</li> <li>▸ PCR multi-cibles</li> <li>▸ Métagénomique ciblée</li> <li>▸ Cytométrie en phase solide</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▸ Culture : gélose au Malt Agar (MEA) ou dichloran glycerol Agar (DG 18)</li> <li>▸ PCR multi-cibles</li> <li>▸ Métagénomique ciblée</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▸ Géloses Sabouraud, MEA ou DG 18 : Incubations à 25 °C et 37 °C (ou bien 30 °C si une seule température possible) ; dénombrement à J2-J3 et identification à J5-J7</li> <li>▸ Régions ciblées en métagénomique fongique : ITS ou 18S</li> <li>▸ Ne sont pas abordées ici les modalités indirectes : techniques chimiques de spectrométrie de masse ou autres pour la détection de composés organiques volatils, mycotoxines, etc.</li> </ul>

D'après [???].

système de traitement de l'air dont la conception, la performance et l'entretien permettent d'obtenir et de maintenir une classe particulière définie. En dehors de ces zones à air maîtrisé, l'interprétation sera difficile, car les résultats risquent fortement d'être positifs, ce qui sera le cas également en milieu professionnel ou au domicile. Toutefois, ces prélèvements peuvent être pertinents pour évaluer le risque dans une zone non protégée (zone « sentinelle ») ou en cas de travaux. Il s'agit d'une mesure instantanée puisqu'il est recommandé de prélever 1 m<sup>3</sup> d'air, soit une mesure sur quelques minutes (par exemple 10 minutes avec un biocollecteur dont le débit est de 100 L par minute).

Les biocollecteurs par impaction sur gélose (selon la norme NF EN ISO 14698) sont particulièrement bien adaptés pour la méthode culturale qui permet de détecter uniquement la flore viable, ce qui représente l'enjeu majeur de la surveillance de l'environnement en établissement de santé (**figure 2A**) [31]. Une telle approche culturale permet également d'envisager des études de sensibilités aux antifongiques de certains isolats, afin de détecter par exemple des clones d'*Aspergillus* d'origine environnementale résistants aux azolés [32]. Des prélèvements de surface peuvent y être associés. Les prélèvements peuvent se faire à l'aide de boîtes « contact » ou bien par écouvillonnage dans le

Figure 2. Culture de moisissures en milieu gélosé.



Culture de moisissures en milieu gélosé prélevée par bioimpaction d'air (A) et par écouvillonnage de surface (B).

cas des surfaces difficilement accessibles. Généralement, une cartographie de la contamination reposant sur un plan d'échantillonnage prédéfini par local permet de suivre l'évolution de l'exposition (par exemple dans une chambre à flux laminaire : table de chevet, lit, téléphone, rampe lumineuse et électrique, pousse seringue, sol, téléviseur, grille d'extraction d'air, rebords de fenêtre [33]).

Les prélèvements d'eau ne sont pas systématiques dans la surveillance environnementale fongique mais peuvent être effectués en cas d'épidémie (généralement un litre d'eau froide filtrée sur une membrane d'acétate de cellulose de 0,45 µm puis déposée sur gélose).

### En milieu professionnel et à domicile

Les problématiques sont similaires au travail et au domicile. À la différence de la situation hospitalière, l'enjeu est ici de détecter d'une part une exposition au long cours et d'autre part une exposition à la flore à la fois viable et non cultivable : spores, mais aussi fragments fongiques, composants de la paroi fongique, composés organiques volatils, voire mycotoxines. Dans ce contexte, les prélèvements d'air ne sont pas représentatifs d'une exposition chronique, sauf s'il s'agit de démontrer séquentiellement la récurrence de fortes



## Dossier scientifique

expositions de courtes durée. Seront donc privilégiés les prélèvements de surface et de poussières. Sur le plan analytique, les approches culturales ne permettent pas de mettre en évidence l'ensemble du risque d'exposition, microorganismes viables mais également non viables, ainsi que l'exposition moléculaire (molécules de paroi, allergènes, toxines...). Les techniques moléculaires permettent de détecter l'ensemble de la flore, y compris levures, *Pneumocystis*, bactéries et virus, cultivables ou non. Plusieurs approches ont montré leur efficacité pour les champignons : des PCR multi-cibles telle que l'approche Ermi (*Environmental relative mold index*) comprenant 36 cibles fongiques décrite par le *centre disease control d'Atlanta* mais également les nouvelles approches de séquençage haut-débit NGS (*Next generation sequencing*) [34-37]. La technique d'étude du microbiote environnemental la plus utilisée pour les champignons est la métagénomique ciblée sur la région ITS de l'ADN ribosomal.

La région 18S ciblant tous les eucaryotes est moins documentée au niveau des bases de données. Bien évidemment, les mêmes échantillons peuvent également être étudiés pour la région 16S (bactéries) ou pour la détection du virome. Dans ce contexte, le recueil de poussières ou de prélèvements de surface permet d'extraire une quantité suffisante d'ADN puis d'analyser les échantillons. Des approches de spectrométrie de masse ou immuno-enzymatiques permettent également de détecter sur ces matrices différents types de molécules allergènes ou potentiellement toxiques. Enfin, les techniques de cytométrie en phase solide sont essentiellement utilisées dans l'industrie pharmaceutique ou cosmétique pour analyser la conformité microbiologique des lots de produits.

Les nouveaux outils moléculaires ont incontestablement apporté des connaissances nouvelles dans la composition du microbiote environnemental

## Conclusion

L'exposition aux moisissures peut avoir des impacts négatifs sur la santé à type d'infection aiguë, d'infection chronique ou d'atteinte allergique. Les *Aspergillus*, mais également les mucorales ou encore les *Fusarium* sont à redouter sur le plan des infections invasives. *Aspergillus* est la moisissure particulièrement impliquée dans les maladies respiratoires chroniques.

Enfin, l'ensemble de la flore à moisissure peut être responsable de maladies allergiques.

La surveillance de la biocontamination fongique environnementale (air, surfaces, poussières) est donc un outil désormais à déployer dans plusieurs circonstances :

- en établissement de santé, dans les secteurs dits « protégés » pour la surveillance des infections nosocomiales ;
  - ainsi qu'au domicile ou en milieu professionnel, pour permettre de proposer des stratégies de remédiation voire des évictions professionnelles.
- Les modalités de la surveillance varient toutefois en fonction des objectifs et des lieux à surveiller. Il faut donc veiller à bien choisir la méthode adéquate, sur le bon prélèvement, et au bon moment. Les nouveaux outils moléculaires ont incontestablement apporté des connaissances nouvelles dans la composition du microbiote environnemental, qui, associées aux techniques chimiques, permettent d'appréhender l'exposome dans sa globalité. ■■

Déclaration de liens d'intérêts : les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts.

### Points à retenir

- *Aspergillus* et les moisissures filamenteuses au sens large sont ubiquitaires dans notre environnement et peuvent être responsables d'infections aiguës, chroniques ou de réactions immuno-allergiques
- À l'hôpital, l'exposition de patients immuno-déprimés aux moisissures peut induire des infections fongiques invasives rapidement mortelles. Leur prévention repose à la fois sur la chimioprophylaxie et sur la prévention du risque environnemental, en hospitalisant dans des chambres dites « protégées » les patients les plus à risque
- L'exposition chronique aux moisissures peut se voir au domicile ou sur le lieu du travail. Une surveillance environnementale est également possible selon des modalités différentes de celles utilisées à l'hôpital. Peuvent en découler des mesures de remédiation, et parfois de déclaration de maladie professionnelle.

### Références

- [1] Gangneux JP, Guegan H, Papon N, Bouchara JP. Biologie et diagnostic des infections à *Aspergillus*. EMC – Maladies infectieuses. 2022;1-14 [Article 8-600-A-10].
- [2] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). CDC Guidelines for prevention of nosocomial pneumonia. MMWR. 1997;39: 1192-236.
- [3] Gangneux JP, Bretagne S, Cordonnier C et al. Prevention of nosocomial fungal infection : The french approach. Clin Infect Dis. 2002;35:343-5.
- [4] Kauffmann-Lacroix C, Bousseau A, Dalle F et al. Prevention of fungal infections related to the water supply in French hospitals: proposal for standardization of methods. Presse Med. 2008;37:751-9.
- [5] Vermorel-Faure O, Lebeau B, Mallaret MR et al. Risque fongique alimentaire au cours de l'agranulocytose. Contrôle mycologique de 273 aliments proposés à des malades hospitalisés en secteur stérile. Presse Med. 1993;22:157-60.
- [6] Bouakline A, Lacroix C, Roux N et al. Fungal contamination of food in hematology units. J Clin Microbiol. 2000;38:4272-3.
- [7] Gangneux JP, Noussair L, Bouakline A et al. Experimental assessment of disinfection procedures for eradication of *Aspergillus fumigatus* in food. Food. 2004;104:2000-2.
- [8] Reboux G, Roussel S, Grenouillet F. Moisissures de l'environnement agricole. J Mycol Med. 2006;16:248-62.
- [9] Rocchi S, Reboux G, Frossard V et al. Microbiological characterization of 3193 French dwellings of Elfe cohort children. Sci Total Environ. 2015;505:1026-35.
- [10] Bretagne S, Sitbon K, Desnos-Ollivier M et al. Active Surveillance Program to Increase Awareness on Invasive Fungal Diseases: the French RESSIF Network (2012 to 2018). mBio. 2022;13:e0092022.
- [11] Gangneux JP, Dannaoui E, Fekkar A et al. Fungal infections in mechanically ventilated patients with COVID-19 during the first wave: the French multicentre MYCOVID study. Lancet Respir Med. 2022;10: 180-90.
- [12] Verweij PE, Rijnders BJA, Brüggemann RJM et al. Review of influenza-associated pulmonary aspergillosis in ICU patients and proposal for a case definition: an expert opinion. Intensive Care Med. 2020;46:1524-35.
- [13] Guide SF2H-SFMM Guide Risque infectieux fongique en établissement de santé : identification du risque et mise en place de mesures de gestion. Hygiène. 2011, volume XIX, n° 1 – mars 2011.
- [14] INRS, 2003. Tableaux des maladies professionnelles. Available at: [www.inrs.fr/accueil/produits/bdd/mp.html](http://www.inrs.fr/accueil/produits/bdd/mp.html)
- [15] Bourke SJ, Dalphin JC, Boyd G et al. Hypersensitivity pneumonitis: current concepts. Eur Respir J. 2001;18(S32):81-92.
- [16] Dalphin JC, Roussel S, Reboux G, Piarroux R. Les actualités sur les pneumopathies d'hypersensibilité en milieu rural. Revue française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique. 2005;45:183-8.
- [17] Bessot JC, Stenger R, Pauli G. Allergies respiratoires chez les vigneronnes. Revue française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique 1997; 37:732-40.
- [18] Massin N, Kolopp-Sarda MN. Pathologies pulmonaires d'origine immuno-allergique en milieu professionnel. Rev Fr Lab. 2004;361:39-46.
- [19] Bünger J, Schappler-Scheele B, Hilgers R, Hallier E. A 5-year follow-up study on respiratory disorders and lung function in workers exposed to organic dust from composting plants. Int Arch Occup. Environ. Health. 2007;80:306-12.
- [20] Roussel S, Reboux G, Dalphin JC, Piarroux R. Alvéolites allergiques extrinsèques et exposition aux moisissures. Rev Fr Lab. 2005;373:51-60.
- [21] Bailey KL, Meza JL, Smith LM et al. Agricultural exposures in patients with COPD in health systems serving rural areas. J Agromed. 2008;12:71-6.
- [22] Jouneau S, Boché A, Brinchault G et al. On-site screening of farming-induced chronic obstructive pulmonary disease with the use of an electronic mini-spirometer: results of a pilot study in Brittany, France. Int Arch Occup Environ Health. 2012;85:623-30.
- [23] Dalphin JC. La bronchite chronique obstructive (BCO) en milieu agricole fourrager. Rev Mal Resp. 1996;13:575-81.
- [24] DREES. L'état de santé de la population. Rapport 2009-2010, Objectif 74 Asthme 1 et 2, DREES.2011:274-9.
- [25] Com-Ruelle L, Da Poian MT, Le Guen N. Les dépenses médicales de ville des asthmatiques en 2006, Questions d'économie de la santé Irdes n° 152. 2010/03.
- [26] Gangneux JP, Bouvrais M, Frain S et al. Asthma and Indoor Environment: Usefulness of a Global Allergen Avoidance Method on Asthma Control and Exposure to Molds. Mycopathologia. 2020;185:367-71.
- [27] Le Cann P, Paulus H, Glorennec P et al. Home Environmental Interventions for the Prevention or Control of Allergic and Respiratory Diseases: What Really Works. J Allergy Clin Immunol Pract. 2017;5:66-79.
- [28] Gangneux JP, Godet C, Denning DW. Allergic diseases and fungal exposome: prevention is better than cure. Allergy. 2022;77(11):3182-4.
- [29] Agache I, Rocha C, Beltran J et al. Efficacy and safety of treatment with biologicals (benralizumab, dupilumab and omalizumab) for severe allergic asthma: A systematic review for the EAACI Guidelines - recommendations on the use of biologicals in severe asthma. Allergy. 2020;75(5):1043-57.
- [30] Baurès E, Blanchard O, Mercier F et al. Indoor air quality in two French hospitals: Measurement of chemical and microbiological contaminants. Sci Total Environ. 2018;642:168-79.
- [31] Méheust D, Le Cann P, Reboux G et al. Indoor fungal contamination: Health risks and measurement methods in hospitals, homes and workplaces. Crit Rev Microbiol. 2014;40:248-60.
- [32] Guegan H, Prat E, Robert-Gangneux F, Gangneux JP. Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus*: A Five-Year Follow Up Experience in a Tertiary Hospital With a Special Focus on Cystic Fibrosis. Front Cell Infect Microbiol. 2021;10:613774.
- [33] Gangneux JP, Poirot JL, Morin O et al. Surveillance mycologique de l'environnement pour la prévention de l'aspergillose invasive. Propositions de standardisation des méthodologies et des modalités d'application. Presse Med. 2002;31:841-8.
- [34] Vesper S, Wymer L, Cox D et al. Comparison of ERMI results for dust collected from homes by an electrostatic cloth and by the standard vacuum method. J Occup Environ Hyg. 2021;18:423-9.
- [35] Méheust D, Gangneux JP, Reponen T et al. Correlation between Environmental Relative Moldiness Index (Ermi) values in French dwellings and other measures of fungal contamination. Sci Total Environ. 2012;438:319-24.
- [36] Gangneux JP, Sassi M, Lemire P, Le Cann P. Metagenomic Characterization of Indoor Dust Bacterial and Fungal Microbiota in Homes of Asthma and Non-asthma Patients Using Next Generation Sequencing. Front Microbiol. 2020;11:1671.
- [37] Sharpe RA, Bearman N, Thornton CR et al. Indoor fungal diversity and asthma: a meta-analysis and systematic review of risk factors. J Allergy Clin Immunol. 2015;135(1):110-22.

**Titre :** Facteurs de virulence de champignons filamenteux au cours de la mucoviscidose : l'exemple de la mélanine.

**Mots clés :** Virulence, *Aspergillus fumigatus*, *Scedosporium apiospermum*, mélanine, PIG1, réponse immune

**Résumé :** La mucoviscidose est une maladie génétique héréditaire prédisposant aux colonisations et infections fongiques, dominées par les champignons filamenteux saprophytes *Aspergillus fumigatus* et *Scedosporium apiospermum* sans modification épidémiologique majeure au cours des 10 dernières années, comme nous le montrons dans ce travail. De plus, la prise en charge thérapeutique de ces infections peut être compliquée par l'émergence grandissante d'isolats d'*A. fumigatus* résistants aux antifongiques triazolés, dont la prévalence atteignait 18% dans la période étudiée (2015-2019). Par ailleurs, la capacité de ces champignons à s'établir chez l'homme repose sur un ensemble de propriétés intrinsèques ou facteurs de virulence qui restent encore peu élucidés, en particulier chez *S. apiospermum*. La paroi est un élément crucial de l'interaction avec l'hôte, via la reconnaissance de motifs antigéniques présents à sa surface, par les récepteurs phagocytaires, initiant des mécanismes fongicides. L'analyse de la réponse transcriptomique de macrophages humains à l'infection par *S. apiospermum* a révélé la mise en place d'un orage cytokinique pro-inflammatoire plus rapide et plus intense en comparaison à l'infection par *A. fumigatus*,

associée à une réduction de la survie des spores intra-macrophagiques. La DiHydroxyNaphthalène (DHN)-mélanine est un pigment pariétal conservé, qui interviendrait dans la virulence des champignons, comme initialement décrit chez les champignons phytopathogènes. Le rôle de la mélanine chez *S. apiospermum* a été exploré, à travers l'étude phénotypique et transcriptomique de mutants délétés du facteur de transcription PIG1, obtenus par technologie CRISPR-Cas9. Le phénotype albinos des mutants obtenus a démontré le rôle régulateur de PIG1 sur la cascade enzymatique de biosynthèse de la DHN-mélanine dans les spores de *S. apiospermum*. Enfin, ce travail a mis en évidence l'implication de la DHN-mélanine dans i) le masquage des polysaccharides de paroi, ii) la protection des conidies contre différents stress abiotiques (thermique, oxydative, ionisants), et iii) l'échappement des conidies aux mécanismes fongicides de macrophages humains. En résumé, la mélanine fongique est un facteur de virulence chez *S. apiospermum*, qui constitue une cible thérapeutique potentielle dans la prise en charge des infections fongiques.

**Title :** Virulence factors of filamentous fungi isolated during cystic fibrosis : the example of melanin.

**Keywords:** Virulence, *Aspergillus fumigatus*, *Scedosporium apiospermum*, melanin, PIG1, immune response

**Abstract:** Cystic fibrosis is an inherited genetic disorder predisposing to fungal colonization and infection, dominated by the saprophytic filamentous fungi *Aspergillus fumigatus* and *Scedosporium apiospermum* without major epidemiologic changes during the last 10 years as shown in this work. Moreover, the therapeutic management of these infections may be complicated by the increasing emergence of *A. fumigatus* strains resistant to triazole antifungals, the prevalence of which reached 18% in the study period (2015-2019). Besides, the ability of these fungi to establish in humans relies on a set of intrinsic properties or virulence factors that remain poorly elucidated, especially in *S. apiospermum*. The fungal cell wall is a crucial element in the interaction with the host, via the recognition of surface antigenic motifs, by phagocytic receptors, that initiate fungicidal mechanisms. We showed that the analysis of the transcriptomic response of human macrophages to *S. apiospermum* infection was a faster and more intense pro-inflammatory cytokinic storm compared to *A. fumi-*

*gatus*, associated to a reduction of the survival of intrama crophagic spores. DiHydroxyNaphthalene (DHN)-melanin is a conserved cell wall pigment, which is thought to be involved in fungal virulence, as initially described in phytopathogenic fungi. The role of melanin in *S. apiospermum* was explored through the phenotypic and transcriptomic characterization of mutants deleted from the PIG1 transcription factor, obtained by CRISPR-Cas9 technology. The albino phenotype of the mutants obtained demonstrated the regulatory role of PIG1 on the enzymatic cascade of DHN-melanin biosynthesis in the spores of *S. apiospermum*. Finally, this work highlighted the involvement of DHN-melanin in i) the masking of cell wall polysaccharides, ii) the protection of conidia against different abiotic stresses (thermal, oxidative, ionising) and iii) the role of this external envelope in the escape of conidia from fungicidal mechanisms of human macrophages. In summary, fungal melanin is a virulence factor in *S. apiospermum*, which represents a potential therapeutic target to cure fungal infections.