

Faculté de Médecine

Année 2019

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Médecine

Présentée et soutenue publiquement

le 25 septembre 2019

par

Marie-Fleur DURIEUX

née le 15 mars 1989 à Limoges

**Contribution du modèle *Galleria mellonella*
à l'étude des interactions entre
Aspergillus fumigatus et *Stenotrophomonas maltophilia* :
étude de souches humaines, animales et environnementales**

Thèse dirigée par le Pr. Françoise BOTTEREL et le Pr. Marie-Laure DARDÉ

Examineurs de la thèse :

Madame le Professeur Marie-Laure DARDÉ

Présidente du jury et directrice de thèse

Madame le Professeur Françoise BOTTEREL

Directrice de thèse

Madame le Professeur Sylvie ROGEZ

Juge

Monsieur le Docteur Bernard BOUTEILLE

Juge

Monsieur le Professeur Boris MELLONI

Juge



Professeurs des Universités - praticiens hospitaliers

Le 1^{er} septembre 2017

ABOYANS Victor	CARDIOLOGIE
ACHARD Jean-Michel	PHYSIOLOGIE
ALAIN Sophie	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
ARCHAMBEAUD Françoise	MEDECINE INTERNE (Surnombre jusqu'au 31-08-2020)
AUBARD Yves	GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE
AUBRY Karine	O.R.L.
BEDANE Christophe	DERMATO-VENERELOGIE
BERTIN Philippe	THERAPEUTIQUE
BESSEDE Jean-Pierre	O.R.L. (Surnombre jusqu'au 31-08-2018)
BORDESSOULE Dominique	HEMATOLOGIE (Surnombre jusqu'au 31-08-2018)
CAIRE François	NEUROCHIRURGIE
CHARISSOUX Jean-Louis	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE et TRAUMATOLOGIQUE
CLAVERE Pierre	RADIODTHERAPIE
CLEMENT Jean-Pierre	PSYCHIATRIE d'ADULTES
COGNE Michel	IMMUNOLOGIE
CORNU Élisabeth	CHIRURGIE THORACIQUE et CARDIOVASCULAIRE
COURATIER Philippe	NEUROLOGIE
DANTOINE Thierry	GERIATRIE et BIOLOGIE du VIEILLISSEMENT
DARDE Marie-Laure	PARASITOLOGIE et MYCOLOGIE
DAVIET Jean-Christophe	MEDECINE PHYSIQUE et de READAPTATION
DESCAZEAUD Aurélien	UROLOGIE
DES GUETZ Gaëtan	CANCEROLOGIE
DESSPORT Jean-Claude	NUTRITION
DRUET-CABANAC Michel	MEDECINE et SANTE au TRAVAIL
DUMAS Jean-Philippe	UROLOGIE (Surnombre jusqu'au 31-08-2018)
DURAND-FONTANIER Sylvaine	ANATOMIE (CHIRURGIE DIGESTIVE)

ESSIG Marie	NEPHROLOGIE
FAUCHAIS Anne-Laure	MEDECINE INTERNE
FAUCHER Jean-François	MALADIES INFECTIEUSES
FAVREAU Frédéric	BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE
FEUILLARD Jean	HEMATOLOGIE
FOURCADE Laurent	CHIRURGIE INFANTILE
GAUTHIER Tristan	GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE
GUIGONIS Vincent	PEDIATRIE
JACCARD Arnaud	HEMATOLOGIE
JAUBERTEAU-MARCHAN M. Odile	IMMUNOLOGIE
LABROUSSE François	ANATOMIE et CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES
LACROIX Philippe	MEDECINE VASCULAIRE
LAROCHE Marie-Laure	PHARMACOLOGIE CLINIQUE
LIENHARDT-ROUSSIE Anne	PEDIATRIE
LOUSTAUD-RATTI Véronique	HEPATOLOGIE
LY Kim	MEDECINE INTERNE
MABIT Christian	ANATOMIE
MAGY Laurent	NEUROLOGIE
MARIN Benoît	EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE de la SANTE et PREVENTION
MARQUET Pierre	PHARMACOLOGIE FONDAMENTALE
MATHONNET Muriel	CHIRURGIE DIGESTIVE
MELLONI Boris	PNEUMOLOGIE
MOHTY Dania	CARDIOLOGIE
MONTEIL Jacques	BIOPHYSIQUE et MEDECINE NUCLEAIRE
MOREAU Jean-Jacques	NEUROCHIRURGIE
MOUNAYER Charbel	RADIOLOGIE et IMAGERIE MEDICALE
NATHAN-DENIZOT Nathalie	ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION
NUBUKPO Philippe	ADDICTOLOGIE
PARAF François	MEDECINE LEGALE et DROIT de la SANTE

PLOY Marie-Cécile	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
PREUX Pierre-Marie	EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE de la SANTE et PREVENTION
ROBERT Pierre-Yves	OPHTALMOLOGIE
SALLE Jean-Yves	MEDECINE PHYSIQUE et de READAPTATION
SAUTEREAU Denis	GASTRO-ENTEROLOGIE ; HEPATOLOGIE
STURTZ Franck	BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE
TEISSIER-CLEMENT Marie-Pierre	ENDOCRINOLOGIE, DIABETE et MALADIES METABOLIQUES
TREVES Richard	RHUMATOLOGIE
TUBIANA-MATHIEU Nicole	CANCEROLOGIE
VALLEIX Denis	ANATOMIE
VERGNENEGRE Alain	EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE de la SANTE et PREVENTION
VERGNE-SALLE Pascale	THERAPEUTIQUE
VIGNON Philippe	REANIMATION
VINCENT François	PHYSIOLOGIE
WEINBRECK Pierre	MALADIES INFECTIEUSES
YARDIN Catherine	CYTOLOGIE et HISTOLOGIE

Professeur associé des universités à mi-temps des disciplines médicales

BRIE Joël	CHIRURGIE MAXILLO-FACIALE ET STOMATOLOGIE
------------------	---

Maitres de conférences des universités - praticiens hospitaliers

AJZENBERG Daniel	PARASITOLOGIE et MYCOLOGIE
BARRAUD Olivier	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
BOURTHOUMIEU Sylvie	CYTOLOGIE et HISTOLOGIE
BOUTEILLE Bernard	PARASITOLOGIE et MYCOLOGIE
DURAND Karine	BIOLOGIE CELLULAIRE
ESCLAIRE Françoise	BIOLOGIE CELLULAIRE
HANTZ Sébastien	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
JACQUES Jérémie	GASTRO-ENTEROLOGIE ; HEPATOLOGIE
JESUS Pierre	NUTRITION

LE GUYADER Alexandre	CHIRURGIE THORACIQUE et CARDIOVASCULAIRE
LIA Anne-Sophie	BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE
MURAT Jean-Benjamin	PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE
QUELVEN-BERTIN Isabelle	BIOPHYSIQUE et MEDECINE NUCLEAIRE
RIZZO David	HEMATOLOGIE
TCHALLA Achille	GERIATRIE et BIOLOGIE du VIEILLISSEMENT
TERRO Faraj	BIOLOGIE CELLULAIRE
WOILLARD Jean-Baptiste	PHARMACOLOGIE FONDAMENTALE

P.R.A.G.

GAUTIER Sylvie	ANGLAIS
-----------------------	---------

Professeur des universités de médecine générale

BUCHON Daniel	(Maintenu en fonction jusqu'au 31.08.2019)
DUMOITIER Nathalie	(Responsable du département de Médecine Générale)

Professeurs associés à mi-temps de médecine générale

MENARD Dominique	(du 1 ^{er} septembre 2016 au 12 janvier 2018)
PREVOST Martine	(du 1 ^{er} septembre 2015 au 31 août 2018)

Maitre de conférences associé à mi-temps de médecine générale

HOUDARD Gaëtan	(du 1 ^{er} septembre 2016 au 31 août 2019)
LAUCHET Nadège	(du 1 ^{er} septembre 2017 au 31 août 2020)
PAUTOUT-GUILLAUME Marie-Paule	(du 1 ^{er} septembre 2015 au 31 août 2018)

Professeurs émérites

ADENIS Jean-Paul	du 01.09.2017 au 31.08.2019
BONNAUD François	du 01.09.2017 au 31.08.2019
DE LUMLEY WOODYEAR Lionel	du 01.09.2017 au 31.08.2019
DENIS François	du 01.09.2017 au 31.08.2019
GAINANT Alain	du 01.09.2017 au 31.08.2019
MERLE Louis	du 01.09.2017 au 31.08.2019

Assistants Hospitaliers Universitaires – Chefs de Clinique

Le 1^{er} janvier 2018

Assistants hospitaliers universitaires

BASTIEN Frédéric	BIOPHYSIQUE et MEDECINE NUCLEAIRE
BAUDRIER Fabien	ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION
CHARISSOUX Aurélie	ANATOMIE et CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES
CHARPENTIER Mathieu	ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION
DUCHESNE Mathilde	ANATOMIE et CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES
FAYE Pierre-Antoine	BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE
GAUTHIER François	ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION
KONG Mélody	ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION
LARRADET Matthieu	BIOPHYSIQUE et MEDECINE NUCLEAIRE (Démission à compter du 1 ^{er} janvier 2018)
LEGRAS Claire	ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION (Surnombre du 1 ^{er} novembre 2017 au 20 février 2018 inclus)
MARQUET Valentine	HISTOLOGIE, EMBRYOLOGIE et CYTOGENETIQUE

Chefs de clinique - assistants des hôpitaux

AZAÏS Julie	MEDECINE INTERNE A
BAUDONNET Romain	OPHTALMOLOGIE
BIDAUT-GARNIER Mélanie	OPHTALMOLOGIE (A compter du 11 mai 2016)
BLOSSIER Jean-David	CHIRURGIE THORACIQUE et CARDIOVASCULAIRE
BOSETTI Anaïs	GERIATRIE et BIOLOGIE du VIEILLISSEMENT
BOUKEFFA Nejma	GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE
BOUSQUET Pauline	PEDIATRIE (A compter du 09 janvier 2017)
CHAMPIGNY Marie-Alexandrine	PEDIATRIE
CHRISTOU Niki	CHIRURGIE DIGESTIVE
COLOMBIÉ Stéphanie	MEDECINE INTERNE A (A compter du 02 mai 2017)
COMPAGNAT Maxence	MEDECINE PHYSIQUE et de READAPTATION
CROSSE Julien	PEDIATRIE

DANTHU Clément	NEPHROLOGIE
DARNIS Natacha	PEDOPSYCHIATRIE
DELUCHE Elise	CANCEROLOGIE
DE POUILLY-LACHATRE Anaïs	RHUMATOLOGIE (A compter du 02 mai 2017)
DIDOT Valérian	CARDIOLOGIE
DUSSAULT-JARLAN Lucile	CARDIOLOGIE
EVARD Bruno	REANIMATION
FAURE Bertrand	PSYCHIATRIE d'ADULTES
FAYEMENDY Charlotte	RADIOLOGIE et IMAGERIE MEDICALE
GARDIC Solène	UROLOGIE
GORDIENCO Alen	CHIRURGIE THORACIQUE et CARDIOVASCULAIRE MEDECINE VASCULAIRE
GOUDELIN Marine	REANIMATION
HARDY Jérémy	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE
JASMIN Michèle	GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE (à compter du 1er janvier 2018)
KRETZSCHMAR Tristan	PSYCHIATRE d'ADULTES
LACHATRE Denis	RADIOLOGIE et IMAGERIE MEDICALE
LACOSTE Marie	MALADIES INFECTIEUSES
LAFON Thomas	MEDECINE d'URGENCE
LAHMADI Sanae	NEUROLOGIE
LATHIERE Thomas	OPHTALMOLOGIE
LEHMAN Lauriane	GASTROENTEROLOGIE
LEPETIT Hugo	GASTROENTEROLOGIE
MARGUERITTE François	GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE
MARTINS Elie	CARDIOLOGIE
PRUD'HOMME Romain	DERMATOLOGIE-VENEREOLOGIE
RAMIN Lionel	ORL
ROUCHAUD Aymeric	RADIOLOGIE et IMAGERIE MEDICALE (NRI)
ROUSSELLET Olivier	NEUROLOGIE
SALLE Henri	NEUROCHIRURGIE

SANGLIER Florian	RADIOLOGIE et IMAGERIE MEDICALE
TAÏBI Abdelkader	ANATOMIE
USSEGLIO-GROSSO Julie	CHIRURGIE MAXILLO-FACIALE et STOMATOLOGIE
VAYSSE VIC Mathieu	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE
VITAL Pauline	MEDECINE INTERNE B
VITALE Gaetano	CHIRURGIE THORACIQUE et CARDIOVASCULAIRE MEDECINE VASCULAIRE

Chef de clinique – médecine générale

DOIN Corinne
RUDELLE Karen
SEVE Léa

Praticien hospitalier universitaire

BALLOUHEY Quentin	CHIRURGIE INFANTILE (du 1 ^{er} mai 2015 au 30 avril 2019)
CROS Jérôme	ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION (du 1 ^{er} mai 2014 au 31 octobre 2018)
LERAT Justine	O.R.L. (du 1 ^{er} mai 2016 au 31 octobre 2020)
MATHIEU Pierre-Alain	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE et TRAUMATOLOGIQUE (du 1 ^{er} mai 2016 au 31 octobre 2020)

Remerciements

À Madame le Professeur Marie-Laure Dardé, de me faire l'honneur de présider ce jury et d'avoir codirigé cette thèse. Merci pour votre disponibilité, votre implication et votre soutien au quotidien, pour m'avoir guidée tout au long de mon internat. Veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements et de mon profond respect pour vos connaissances en parasitologie et mycologie.

À Madame le Professeur Françoise Botterel, de me faire l'honneur d'avoir accepté d'être ma directrice de thèse. Merci de m'avoir accueillie au sein de votre équipe, de m'avoir fait confiance et de m'avoir aidée à valoriser les résultats de ces travaux. Un chaleureux merci pour vos encouragements, votre disponibilité, vos qualités humaines : c'était un plaisir de travailler avec vous.

À Monsieur le Docteur Bernard Bouteille, d'avoir accepté de faire partie de ce jury. Veuillez trouver ici ma gratitude et mes sincères remerciements pour m'avoir initiée à la mycologie ainsi que pour tous vos conseils avisés. C'est un plaisir d'apprendre à vos côtés toutes les subtilités microscopiques de la mycologie.

À Madame le Professeur Sylvie Rogez, de me faire l'honneur d'apporter votre expertise sur ce travail. Je vous prie de bien vouloir accepter ma respectueuse considération.

À Monsieur le Professeur Boris Melloni, pour l'intérêt que vous avez porté à mon sujet et d'avoir accepté de juger ce travail. Croyez-en mes plus sincères remerciements.

Merci à l'équipe Dynamyc :

Au Professeur Jacques Guillot de m'avoir intégrée dans son équipe ainsi qu'à l'ensemble des personnes de l'équipe pour leurs critiques pertinentes et constructives (Dr Eric Dannaoui, Dr Cécile Angebault, Dr Nawel Ait-Ammar, Dr Véronica Risco-Castillo, Dr Pascal Arné, Dr Paul-Louis Woerther, Dr Jean-Winoc Decousser).

Tout particulièrement au Dr Élise Melloul pour son encadrement scientifique, sa disponibilité ainsi que pour ses idées et qualités artistiques pour les images et figures.

À toutes les personnes présentes au laboratoire pour leur aide : Lolita Roisin, Sana Jemel, Tobias Vashen, Delphine Jenot, Imene Atek, Anne-Sophie Galbrun, ainsi que toutes les personnes qui m'ont apporté leur aide durant ces travaux.

À Xavier Decrouy pour sa patience et son aide afin d'acquérir les meilleures images en microscopie, ainsi qu'à Christelle Gandolphe et Wilfried Verbecq-Morlot pour leur aide et leurs conseils pour toutes nos demandes de fixation et de découpe de lames, toujours avec sourire et gentillesse.

À l'équipe d'anatomopathologie du CHU Henry Mondor pour les colorations de lame.

Aux centaines de larves de *G. mellonella* qui ont donné leur corps à la science, et sans qui ce travail n'aurait pas été possible.

Merci à l'équipe de parasitologie-mycologie du CHU de Limoges :

Au Docteur Daniel Ajzenberg, à Hélène, Annabelle, Valérie, Jimmy, Mike, Mickaël et Vicky pour votre soutien. C'est vraiment un plaisir de venir travailler à vos côtés tous les jours.

Merci à l'équipe de parasitologie-mycologie du CHU Henri Mondor :

Aux Dr Françoise Foulet, Dr Cécile Angebault, Dr Nawel Ait Ammar, Dr Soulaf Albouz, Dr Rym Chouk Turki, ainsi qu'à mes co-internes parisiens de DU, de master et de l'hôpital.

Merci à l'équipe du centre de prélèvement du CHU de Limoges

A toute l'équipe. Un merci tout particulier au Docteur Jérôme Darreye, pour ton soutien et ton écoute, tes conseils et surtout ta bienveillance au quotidien.

Merci à toutes les équipes de laboratoire où mes stages m'ont menée, et particulièrement à l'équipe de Bactériologie-Virologie-Hygiène de Limoges et l'équipe du Centre Hospitalier de Brive. À tous les biologistes et techniciens qui chacun à leur manière m'ont formée et permis d'aiguiser ma curiosité et d'apprécier la biologie médicale.

Merci à tous mes co-internes pour ces semestres d'internat dans la bonne humeur, principalement à ma « Team Rex » (Marine, Mylène, Charly, Claudia, Thibaut), ma « Dream Team » (Guillaume, Maher, Théo) et notre petit groupe de travail de thèse « j'habite au labo, et toi ? » (Marine et Josselin).

Merci à tous mes amis internes ou d'autres horizons : Audrey, Marine, Mylène, Sylvain, Marc, Guillaume, Yohan, Clémence, JG, Yohann, Axel, Sophie, Anne.

Merci à mes parents, mon frère, ma belle-sœur, mes grands-mères ainsi qu'à l'ensemble de ma famille et belle-famille pour votre affection, votre soutien et vos encouragements de chaque instant. À mes deux grands-pères. Pour vous tous, seulement quelques mots sur le papier, mais tellement plus en pensées.

Merci mon Aurélien, pour ces années passées et à venir, avec tout mon amour.

Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES.....	13
VALORISATION DE CE TRAVAIL	18
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	19
PARTIE I - Intérêts du modèle <i>Galleria mellonella</i> pour l'étude d' <i>Aspergillus fumigatus</i> ou de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	20
I. Pathogènes étudiés	21
I.1. <i>Aspergillus fumigatus</i>	21
I.2. <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	24
II. Utilisation du modèle <i>G. mellonella</i> pour l'étude d' <i>A. fumigatus in vivo</i>	28
III. Utilisation du modèle <i>G. mellonella</i> pour l'étude de <i>S. maltophilia in vivo</i>	51
PARTIE II - Exemple d'utilisation du modèle <i>G. mellonella</i> pour l'étude d' <i>A. fumigatus</i> : mise au point d'un modèle <i>in vivo</i> mixte <i>A. fumigatus</i> – <i>S. maltophilia</i> dans <i>G. mellonella</i>	53
I. Introduction	54
II. Matériels et méthodes	56
II.1. Description des souches utilisées.....	56
II.1.1. Analyse <i>in vitro</i> des souches d' <i>A. fumigatus</i> et de <i>S. maltophilia</i>	56
II.1.1.1. Test de germination des souches d' <i>A. fumigatus</i>	56
II.1.1.2. Étude de la croissance des souches de <i>S. maltophilia</i> sous forme planctonique	57
II.1.2. Analyse <i>in vitro</i> de biofilms simples d' <i>A. fumigatus</i> et de <i>S. maltophilia</i>	57
II.1.2.1. Réalisation des inocula d' <i>A. fumigatus</i>	57
II.1.2.2. Réalisation des inocula de <i>S. maltophilia</i>	58
II.1.2.3. Formation des biofilms simples.....	58
II.1.2.4. Analyse des biofilms par la coloration au cristal violet.....	58
II.1.3. Modèle <i>in vivo</i> <i>Galleria mellonella</i>	59
II.1.3.1. Cadre réglementaire et éthique	59
II.1.3.2. Préparation des larves	59
II.1.3.3. Cycle de vie et élevage de <i>Galleria mellonella</i>	59
II.1.4. Analyse <i>in vivo</i> de la pathogénicité des souches	61
II.1.4.1. Préparation des inocula d' <i>A. fumigatus</i>	61
II.1.4.2. Préparation des inocula de <i>S. maltophilia</i>	62
II.1.4.3. Préparation de la co-inoculation de <i>S. maltophilia</i> et d' <i>A. fumigatus</i>	62
II.1.4.4. Infection des larves	62
II.1.4.5. Suivi de la survie des larves.....	62
II.1.5. Analyse des micro-organismes au sein des larves	63
II.1.5.1. Recherche de la présence des micro-organismes au sein de la larve en microscopie optique et confocale.....	63
II.1.5.2. Mise en évidence de l'infection fongique et bactérienne au sein de la larve par histologie	64
II.1.6. Analyses statistiques	64
III. Résultats	65
III.1. Caractérisation <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> des souches d' <i>A. fumigatus</i>	65

III.1.1. Analyse <i>in vitro</i> des souches d' <i>A. fumigatus</i> de différentes origines	65
III.1.2. Analyse <i>in vivo</i> des souches d' <i>A. fumigatus</i>	66
III.1.3. Détermination de la concentration d'intérêt d' <i>A. fumigatus</i>	66
III.1.4. Analyse du pouvoir pathogène des différentes souches d' <i>A. fumigatus</i>	67
III.1.5. Caractérisation <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> des souches de <i>S. maltophilia</i>	68
III.1.5.1. Analyse <i>in vitro</i> des souches de <i>S. maltophilia</i> de différentes origines	68
III.1.5.2. Analyse <i>in vivo</i> des souches de <i>S. maltophilia</i>	69
III.1.5.2.1. Détermination de la concentration d'intérêt de <i>S. maltophilia</i>	69
III.1.5.2.2. Analyse <i>in vivo</i> des souches de <i>S. maltophilia</i> de différentes origines	70
III.1.6. Effet de la co-inoculation <i>A. fumigatus</i> – <i>S. maltophilia in vivo</i>	71
III.1.7. Recherche de la présence des micro-organismes au sein de la larve	74
III.1.7.1. Mise en évidence des pathogènes dans l'hémocèle.....	74
III.1.7.2. Mise en évidence de l'infection fongique et bactérienne sur des coupes de larves	75
IV. DISCUSSION	76
V. CONCLUSION GÉNÉRALE	80
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	95
Serment d'Hippocrate.....	104

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Aspects macroscopique et microscopique d'*A. fumigatus*

Figure 2 : Aspects morphologiques et culturels de *S. maltophilia*

Figure 3 : Publications mentionnant *A. fumigatus* et *G. mellonella* sur Pubmed

Figure 4 : Anatomie d'une larve de *Galleria mellonella* (adaptée de Singkum *et al.*, 2018 et Engel and Moran, 2013)

Figure 5 : Analyse histologique de *G. mellonella* lors d'une infection par *A. fumigatus*

Figure 6 : Métabolisme du fer d'*A. fumigatus* étudié dans le modèle *G. mellonella* (adaptée de Haas *et al.*, 2012)

Figure 7 : Pathogènes impliqués dans les infections des patients atteints de mucoviscidose - Registre français de la mucoviscidose - Bilan des données 2017

Figure 8 : Différents stades de germination des conidies d'*A. fumigatus* observées au microscope

Figure 9 : Plaque 96 puits pour analyse au cristal violet des souches de *S. maltophilia*

Figure 10 : Élevage de *G. mellonella* au laboratoire Dynamyc

Figure 11 : Cycle de vie et élevage de *G. mellonella*

Figure 12 : Analyse de la survie des larves

Figure 13 : Taux de germination (A) et formation de biofilm (B) des souches d'*A. fumigatus*

Figure 14 : Courbes de survie (A) et courbe dose-réponse (B) des larves en fonction de la concentration inoculée d'*A. fumigatus* 13073-GFP

Figure 15 : Courbes de survie des larves inoculées avec des souches d'*A. fumigatus*

Figure 16 : Croissance des souches de *S. maltophilia* sous forme planctonique (A) ou biofilm (B) après 24 h à 37°C

Figure 17 : Courbes de survie (A) et courbe dose-réponse (B) des larves en fonction de la concentration de la souche de *S. maltophilia* 13637

Figure 18 : Courbes de survie des larves infectées par des souches de *S. maltophilia*

Figure 19 : Taux de morbidité des larves en fonction des souches et des concentrations de *S. maltophilia*

Figure 20 : Courbes de survie des larves co-infectées avec des souches de *S. maltophilia* et avec la souche *A. fumigatus* 13073-GFP

Figure 21 : Morbidité des larves co-infectées avec *A. fumigatus* et *S. maltophilia*

Figure 22 : Frottis d'hémocèle de larve de *G. mellonella* infectée par *S. maltophilia* (A) ou *A. fumigatus* (B)

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Comparaison des protocoles pour l'analyse d'*A. fumigatus* dans le modèle *G. mellonella*

Tableau 2 : Exemples de scores de suivi de la pathogénicité

Tableau 3 : Liste des mutants *A. fumigatus* testés dans le modèle *G. mellonella*

Tableau 4 : Comparaison des protocoles utilisés pour l'étude de *S. maltophilia* dans le modèle *G. mellonella*

Tableau 5 : Nom et origine des souches d'*A. fumigatus* et de *S. maltophilia*

Tableau 6 : Score de vitalité des larves de *G. mellonella*

LISTE DES ABREVIATIONS

ABPA : Aspergillose Broncho-Pulmonaire Allergique

Af : *Aspergillus fumigatus*

AMPs : Antimicrobial Peptides

ATCC : American Type Culture Collection

BPCO : Broncho-Pneumopathie Chronique obstructive

CV : Cristal Violet

DDB : Dilatation Des Bronches

DO : Densité Optique

GFP : Green Fluorescent Protein

Gm : *Galleria mellonella*

IMRB : Institut Mondor de Recherche Biomédicale

LB : Lysogeny Broth

MEC : Matrice Extracellulaire

MO : Microorganisme

PBS : Phosphate Buffered Saline

PBST : Phosphate Buffered Saline + Tween 20

rpm : revolution per minute (tours par minute)

RPMI : Roswell Park Memorial Institute medium

SFMM : Société Française de Mycologie Médicale

Sm : *Stenotrophomonas maltophilia*

SVF : Sérum de Veau Foetal

VALORISATION DE CE TRAVAIL

La première partie de cette thèse sera publiée sous forme de revue que nous proposerons au journal *Virulence*.

La deuxième partie de cette thèse a été réalisée durant le travail d'un Master 2, grâce à l'obtention d'une bourse « Année Recherche », permettant son financement pendant un an (2017-2018). Les résultats de ce travail ont été intégrés aux travaux en cours de l'équipe DYNAMYC 7380 (Université Paris-Est Créteil, École nationale Vétérinaire d'Alfort, ANSES ou Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail) et ont pu faire l'objet d'une publication (3^{ème} auteur) en novembre 2018 dans *Frontiers in Microbiology*, revue de microbiologie la plus citée (IF 4,019) (1).

Le mémoire de Master 2, présenté au **Prix de l'Université Val-de-Marne**, a reçu le **Premier prix des Master 2** en juin 2019, lors d'une cérémonie avec une vulgarisation des résultats sous forme d'une présentation en 180 secondes.

Une présentation orale de ce travail de Master 2 a reçu le **Prix de la meilleure communication orale** durant le **Congrès de la Société Française de Mycologie Médicale** (SFMM) en Mai 2019 à Tours.

Ce travail fera par ailleurs l'objet d'une **communication affichée au TIMM** (*Trends in Medical Mycology*), congrès international, en octobre 2019 à Nice.

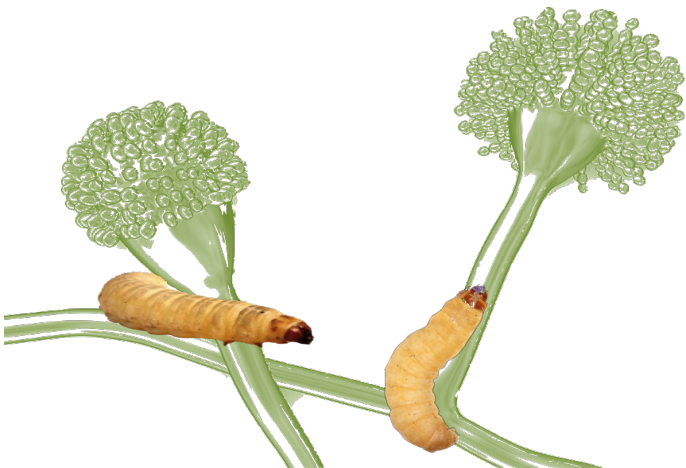
INTRODUCTION GÉNÉRALE

Aspergillus fumigatus, champignon filamenteux, et *Stenotrophomonas maltophilia*, bactérie bacille gram négatif, tous deux saprophytes de l'environnement, sont impliqués dans des phénomènes de colonisation pulmonaire prolongée. Agents pathogènes opportunistes, ils peuvent être isolés, séparément ou ensemble, lors d'infections aiguës chez l'immunodéprimé ou dans des affections respiratoires chroniques comme la mucoviscidose, la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) et les dilatations de bronches (DDB) (2). Des études ont pu montrer qu'isoler ces pathogènes ensemble chez ces patients insuffisants respiratoires chroniques aurait un retentissement clinique plus important que lorsque ces infections sont mono-microbiennes (3). Les infections poly-microbiennes bactérie - champignon filamenteux sont encore mal connues et il est donc nécessaire d'approfondir nos connaissances sur les interactions de ces microorganismes de règne différent, leur physiopathologie et leur pathogénicité lorsqu'ils sont ensemble.

La pathogénicité est traditionnellement déterminée par l'utilisation de modèle souris ou rat, considérés comme le gold standard. Ces modèles sont coûteux, requièrent des équipements lourds et le nombre d'individus utilisés dans ces expérimentations est souvent limité. De ce fait, depuis quelques années, des modèles *in vivo* alternatifs se sont développés, utilisant des insectes ou des invertébrés comme *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* ou encore *Bombyx mori*. Ces modèles sont utilisés comme outil de screening pour étudier la pathogénicité des microorganismes d'intérêt médical (4). Parmi eux, celui utilisant des larves de *Galleria mellonella*, de l'ordre des Lépidoptères (papillons vivant en Europe) est de plus en plus utilisé. Les avantages de ce modèle de laboratoire sont nombreux, et sa facilité d'utilisation permet de comparer la virulence de différentes souches de pathogènes.

A notre connaissance, il existe peu de littérature sur l'étude de la virulence d'*A. fumigatus* dans le modèle *G. mellonella*, ni d'article analysant l'interaction entre *A. fumigatus* et *S. maltophilia* chez les larves de *G. mellonella*. Le premier objectif de cette thèse était de réaliser une revue de la littérature sur l'étude d'*A. fumigatus* dans le modèle *G. mellonella*. Le deuxième objectif était d'illustrer l'utilisation de ce modèle en proposant la mise au point d'un mini-modèle d'infection mixte entre *A. fumigatus* et *S. maltophilia* dans le modèle *G. mellonella*. Je commencerai la première partie en présentant les deux microorganismes d'intérêt avant de présenter la revue sur l'étude d'*A. fumigatus* dans le modèle *G. mellonella*, telle que nous allons la soumettre.

PARTIE I
Intérêts du modèle *Galleria mellonella*
pour l'étude d'*Aspergillus fumigatus*
et/ou de *Stenotrophomonas maltophilia*



I. Pathogènes étudiés

I.1. *Aspergillus fumigatus*

Le genre *Aspergillus* appartient au règne des Fungi. L'utilisation assez récente des techniques de biologie moléculaire, notamment le séquençage multilocus de gènes conservés (calmoduline, β -tubuline, actine, ARN polymérase 2 et ARN ribosomique) a permis de réviser totalement la classification des *Aspergillus* : actuellement, plus de 300 espèces sont décrites (5). Longtemps classés parmi les Deuteromycota (champignon sans reproduction sexuée), les analyses moléculaires ont permis de les classer dans le phylum des Ascomycota, regroupant des champignons avec une reproduction sexuée (formation d'asques contenant des ascospores) (6). Il est ensuite inclus dans la classe des Eurotiomycètes, ordre des Eurotiales, caractérisées par une reproduction sous forme asexuée.

Les *Aspergillus* sp. sont des moisissures microscopiques cosmopolites caractérisées par un thalle végétatif formé de filaments mycéliens hyalins, de diamètre fin et régulier, septés et ramifiés. Ils se trouvent principalement dans l'environnement où ils se développent sur la végétation en décomposition, jouant un rôle important dans la transformation des matières organiques. Dans l'environnement, la plupart des *Aspergillus* se multiplient presque exclusivement sur un mode asexué, via un cycle de développement divisé en deux étapes : croissance végétative et reproduction asexuée. Dans les conditions optimales de développement et de multiplication, la phase de croissance végétative commence par la germination d'une conidie, suivie par la formation du mycélium (6). Sur le mycélium prennent naissance des filaments non cloisonnés, les conidiophores, se terminant par une vésicule de forme variable sur laquelle sont disposées les phialides, le tout formant la tête aspergillaire (Figure 1A). La conidiogenèse s'effectue sur le mode blastique phialidique, par bourgeonnement d'une série de spores ou conidies à l'apex des phialides qui restent accolées les unes aux autres en chaînes non ramifiées, basipètes, la plus jeune étant à la base de la chaîne. Des milliers de conidies microscopiques de 2,5 à 3 μm de diamètre sont alors formées. Ces conidies sont dites « dormantes », c'est-à-dire métaboliquement inactives, et peuvent rester viables pendant une longue période. Dans des conditions favorables, elles se mettent à gonfler avant d'émettre un tube germinatif qui va s'allonger pour former des hyphes et permettre ainsi la création d'un réseau en trois dimensions de filaments mycéliens.

Par ses caractéristiques culturales, *Aspergillus fumigatus* est un champignon aérobie, thermotolérant et thermophile qui peut se développer dans une large gamme de températures allant de 12 à 65°C (optimum à 37°C). Ses colonies ont un aspect velouté devenant vert-gris à maturité (Figure 1B), sombre comme de la fumée (d'où son nom *fumigatus* qui provient du verbe latin *fumigare*, « faire de la fumée »). Ce sont les conidies qui donnent au champignon sa couleur verte foncée, due à la présence d'un pigment, la mélanine. Les conidies sont très résistantes et peuvent survivre à différents stress environnementaux, tels que la dessiccation, les températures extrêmes et les stress osmotiques et oxydatifs.

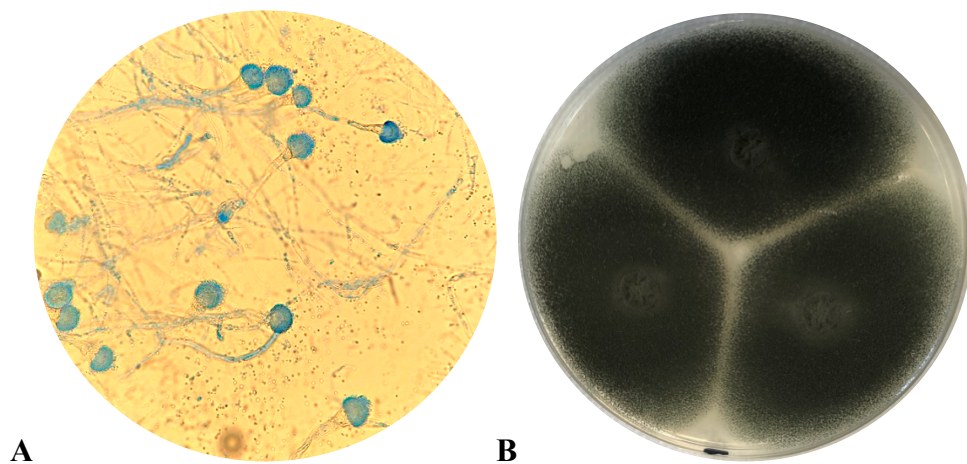


Figure 1 : Aspects macroscopique et microscopique d'*A. fumigatus*

(A) aspect microscopique grossissement x100, coloration au bleu lactique ; (B) aspect macroscopique sur milieu Sabouraud après 4 jours de culture (photographies personnelles)

Aspergillus fumigatus est l'espèce la plus fréquemment isolée en pathologie humaine. Ses conidies étant en suspension dans l'air, l'Homme est constamment exposé à ce champignon et inhale quotidiennement ses conidies, qui grâce à leur petite taille, pénètrent dans les voies respiratoires profondes et les alvéoles pulmonaires. Cette inhalation par un individu immunocompétent n'entraîne que rarement des effets indésirables, les conidies étant éliminées de façon efficace par les mécanismes d'immunité innée.

La colonisation est définie par l'isolement répété d'*A. fumigatus* à partir de prélèvements des voies respiratoires, sans preuve d'infection. Elle correspond à une atteinte saprophyte sans invasion tissulaire. La distinction entre colonisation et infection repose sur la clinique. Les patients atteints de pathologies pulmonaires chroniques, telles que la mucoviscidose, la BPCO, ou encore la DDB sont des populations à risque de colonisation par *Aspergillus* (7)(8). Ainsi, *A. fumigatus* est le principal champignon filamenteux trouvé dans le tractus respiratoire de ces

patients avec une prévalence comprise entre 6 et 60% (9). En effet, ces patients sont plus vulnérables à *Aspergillus* au vu des modifications structurales broncho-pulmonaires entraînées par ces maladies, les hospitalisations fréquentes associées à des cures d'antibiothérapie sélectionnant l'écologie fongique mais aussi bactérienne (7). *Aspergillus fumigatus* peut donc devenir un agent opportuniste redoutable, accélérant l'insuffisance respiratoire de ces patients. Néanmoins, l'impact d'*A. fumigatus* sur la fonction respiratoire des patients atteints de mucoviscidose par exemple n'est pas totalement élucidé. Chez ces patients, *A. fumigatus* est le plus souvent considéré comme un colonisateur, mais lorsqu'ils développent une aspergillose broncho-pulmonaire allergique (ABPA), les azolés représentent le traitement de choix (*A. fumigatus* étant naturellement sensible aux antifongiques azolés). L'émergence de souches d'*A. fumigatus* résistantes aux azolés constitue depuis quelques années un problème de santé publique. Ces souches proviennent essentiellement de l'environnement mais également de patients traités au long cours par des azolés (10). Dans des études récentes, la prévalence de patients avec des souches résistantes aux azolés va jusqu'à 8% (9). À l'heure actuelle, il n'existe aucune donnée clinique démontrant que la résistance aux azolés serait corrélée à l'échec du traitement.

Le développement des *Aspergillus* au sein d'un organisme vivant nécessite une capacité d'adaptation importante. Cette capacité est la clé de sa virulence, c'est-à-dire sa faculté à se multiplier dans l'organisme et à résister aux défenses de l'hôte. Des conditions optimales telles qu'une température appropriée, le pH des tissus de l'hôte, la petite taille de conidies, et l'état immunitaire du patient jouent un rôle majeur dans la pathogénicité engendrée par *A. fumigatus*. Après inhalation des conidies, les premiers moyens de défense normalement mis en jeu sont le tapis muco-ciliaire des cellules épithéliales, les macrophages alvéolaires et les polynucléaires neutrophiles. L'état général altéré ou l'immunodépression de l'hôte ne suffit pas à expliquer la pathogénicité d'*A. fumigatus* qui possède par ailleurs des propriétés physiques et une machinerie métabolique qui le prédispose à coloniser et à dégrader toute sorte de matière organique. Plusieurs types de facteurs de virulence ont été décrits chez *A. fumigatus* :

- **Des adhésines** : les conidies peuvent se lier à des protéines circulantes ou à des protéines de la matrice extracellulaire (MEC) de l'hôte via un large éventail de protéines exprimées à la surface de leur paroi (11).

- **Les pigments** des conidies : les souches sauvages d'*A. fumigatus* blanches avec des conidies non pigmentées sont moins pathogènes que les souches produisant des conidies bleues-vertes (11).
- **Des enzymes** : des protéases et des phospholipases permettent dans un premier temps au champignon d'envahir les tissus de l'hôte ; des catalases et des superoxydes dismutases permettent, quant à elles, de neutraliser les radicaux libres du métabolisme oxydatif des phagocytes (11).

La petite taille des conidies d'*A. fumigatus* est un élément essentiel de la virulence de ce champignon puisqu'elle permet aux conidies de pénétrer profondément dans les voies respiratoires et de gagner les territoires alvéolaires. Par ailleurs, la thermotolérance des *Aspergillus* facilite leur implantation dans l'organisme (11). L'aptitude des conidies à filamenter constitue aussi un moyen d'échappement aux macrophages. Enfin, la composition de la paroi cellulaire d'*A. fumigatus* a été très étudiée ces dernières années et semble jouer un rôle clé dans la relation avec l'hôte (12). Les premières études ont ciblé préférentiellement l'identification de protéines comme molécules d'adhésion mais plus récemment il est apparu que les glycanes jouaient un rôle primordial dans l'adhérence du champignon aux cellules de l'hôte (12). Le pouvoir pathogène d'*A. fumigatus* semble donc être multifactoriel.

L'équipe de Raksah *et al.*, a étudié la différence de facteurs de virulence entre les souches d'*Aspergillus* d'origine humaine et environnementale (13). Il s'avère que les *Aspergillus* isolés à partir d'échantillons environnementaux produisent un grand nombre de facteurs de virulence, mais en plus faible proportion que les souches d'origine humaine. Lorsqu'ils pénètrent dans l'organisme humain, ces *Aspergillus* d'origine environnementale se mettent à produire beaucoup plus de facteurs de virulence pour échapper aux défenses de l'hôte, pouvant alors eux aussi créer des dommages tissulaires.

1.2. *Stenotrophomonas maltophilia*

La taxonomie de *S. maltophilia* a beaucoup évolué depuis sa découverte. D'abord rattaché au genre *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* est ensuite inclus dans le genre *Xanthomonas* dans les années 1980. Ce rattachement était controversé en raison de différences notables sur le plan phénotypique (type de flagellation, production de pigment, température de

croissance) et génotypique. Il est définitivement nommé *Stenotrophomonas maltophilia* en 1993 (14). Il existe aujourd'hui plus d'une dizaine d'espèces de *Stenotrophomonas*, mais seule *S. maltophilia* est considérée comme pathogène pour l'Homme.

Il s'agit d'un bacille de 0,5 à 1,5 µm, de coloration Gram négatif (Figure 2A), aérobic strict. Il est mobile grâce à une ciliature multitrèche polaire à trois (ou plus de trois) flagelles (Figure 2B). Il possède aussi des fimbriae (ou pili), structures fibrillaires rigides, situées à la surface de la bactérie, et essentielles pour leur pouvoir pathogène (rôle dans l'adhérence bactérienne). En culture, les colonies sont rondes, lisses, brillantes à bords réguliers et de couleur blanche à jaune sur gélose au sang (Figure 2C). Sur gélose ordinaire, *S. maltophilia* produit un pigment brun aisément reconnaissable (15). De croissance rapide, sa température optimale de multiplication est de 35°C. Incapable de fermenter le glucose, il croît sur de nombreux milieux de culture car il est sans exigence nutritive particulière (16).

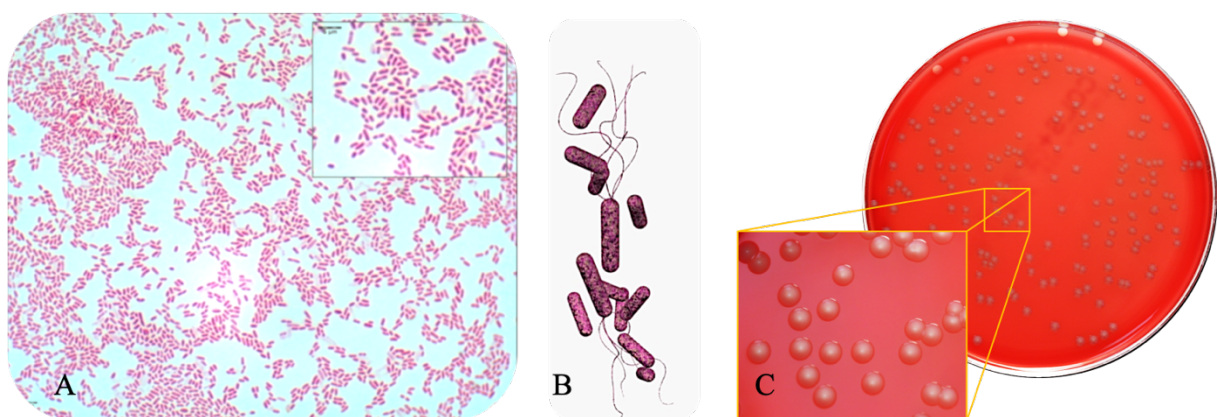


Figure 2 : Aspects morphologiques et culturels de *S. maltophilia*

- (A) *S. maltophilia* à la coloration de Gram : bacille Gram négatif (x100) ; (B) morphologie de *S. maltophilia* et ses flagelles ; (C) aspect des colonies de *S. maltophilia* en culture sur gélose au sang (source www.microbiologypicture.com)

Stenotrophomonas maltophilia est une bactérie ubiquitaire, saprophyte de l'environnement qui peut être retrouvée dans une grande diversité de niches écologiques, que ce soit dans un environnement chaud et humide (eau de rivière, eaux usées, plantes ou encore produits alimentaires) ainsi que chez différentes espèces animales (mammifères et invertébrés marins) (17). On peut donc la trouver dans différentes sources en milieu hospitalier comme dans les cathéters veineux centraux (18), les endoscopes (19), les robinets ou pommeaux de douche. L'Homme n'est pas considéré comme un réservoir pour cette bactérie. Il peut cependant être

porteur sain au niveau cutané ou au niveau de ses cavités muqueuses : ce portage chez les professionnels de santé, associé à sa présence dans les équipements hospitaliers peut conduire à des transmissions nosocomiales (20).

Longtemps considéré comme simple colonisateur ou faiblement virulent, *S. maltophilia* est maintenant reconnu comme agent pathogène opportuniste, associé à des infections d'expressions cliniques variées. Ces infections touchent les patients immunodéprimés (pathologies hématologiques, pathologies hépatiques sévères ou cancers), ou encore les patients présentant des affections pulmonaires chroniques (mucoviscidose). Présente dans de nombreux prélèvements respiratoires sans manifestation clinique spécifique, *S. maltophilia* est une des bactéries les plus fréquemment isolées dans les expectorations des patients atteints de mucoviscidose (21). La colonisation surviendrait tardivement au cours de la maladie, suite à des cures multiples d'antibiothérapie. Les conséquences sur la fonction respiratoire ne sont pas encore bien définies, liées au fait que la distinction entre colonisation, infection aiguë ou persistante n'est pas toujours facile à établir. La présence de *S. maltophilia* dans les poumons entraînerait une réponse inflammatoire et l'apparition de symptômes cliniques, notamment sous forme d'exacerbations pulmonaires.

Le tractus respiratoire est le principal lieu d'infection, mais d'autres localisations sont possibles comme le tractus urinaire ou les tissus mous. Il peut aussi être à l'origine de bactériémies, d'endocardites ou de méningites (16)(22).

Ces infections sont potentiellement graves et difficiles à traiter du fait d'une résistance intrinsèque importante de *S. maltophilia* aux antimicrobiens qui présente une sensibilité limitée aux antibiotiques les plus couramment utilisés (16). La faible perméabilité de l'enveloppe bactérienne ainsi que la présence de nombreuses pompes d'efflux à sa surface sont les premières barrières s'opposant à l'action des antibiotiques. La présence de deux β -lactamases, responsable de l'hydrolyse et de l'inactivation des β -lactamines, rendent la bactérie résistante aux β -lactamines de large spectre (carbapénèmes et céphalosporine de troisième génération). La résistance intrinsèque aux aminosides et aux quinolones s'explique par la présence de pompes d'efflux et d'enzymes hydrolysant les aminosides ou par une faible perméabilité de la membrane externe pour la résistance aux fluoroquinolones (16). Tous ces mécanismes participent à la résistance de *S. maltophilia* et compliquent la prise en charge, réel problème thérapeutique à l'heure actuelle.

Plusieurs facteurs de virulence des *S. maltophilia* peuvent être à l'origine de ces infections. Ils peuvent être divisés en deux groupes : (i) les facteurs de virulence extracellulaires

(protéases, estérases, lipases, nucléases, hémolysine, cytotoxines, sidérophores...) pouvant produire un effet cytotoxique direct sur les cellules, notamment pour des souches d'origine clinique (23), et (ii) les facteurs de virulence cellulaire (lipopolysaccharides, pili, adhésines, flagelles) (24). Un des facteurs de virulence important est sa grande capacité d'adhésion aux plastiques et à la formation de biofilms à la surface des cellules épithéliales bronchiques (21). Des biofilms de *S. maltophilia* ont aussi été identifiés à la surface des matériaux utilisés pour l'administration intraveineuse, sur des dispositifs prothétiques et des canules, ainsi que sur des nébuliseurs (16).

Plusieurs méthodes ont permis de mettre en évidence une grande diversité des souches cliniques et environnementales de *S. maltophilia* et une étude a permis de clustériser des souches de *S. maltophilia* en 10 génogroupes (25). Ces génogroupes peuvent contenir des souches cliniques (génogroupes 1 et 7), environnementales (génogroupes 4, 8, 9) ou les deux (génogroupes 2, 3, 5, 6, 10). Cinq nouveaux génogroupes ont été décrits (de A à E) en 2009 (26). Il existerait une association entre le génogroupe 6 et les patients atteints de mucoviscidose ou admis en unité de soins intensifs. L'hypothèse principale serait que les souches de ce génogroupe possèderaient un tropisme préférentiel pour les voies respiratoires et/ou qu'elles seraient plus adaptées à l'environnement respiratoire (27).

La pathogénicité des différentes souches cliniques et environnementales de *S. maltophilia* a été étudiée par Adamek *et al.* *in vivo* dans deux modèles amibes libres. Il apparaît que la majorité des souches virulentes appartiendraient au cluster E, tandis que les clusters A, B et D seraient moins virulents (28). La virulence des souches de *S. maltophilia* serait donc plus reliée au cluster qu'à l'origine de la souche. Par ailleurs, la comparaison du génome de différentes souches (avirulentes et virulentes) (29) a par ailleurs montré que toutes les souches possèdent la plupart des gènes de virulence, suggérant que toutes les souches peuvent être pathogènes opportunistes. Nicoletti *et al.* ont aussi étudié les différences de virulence entre souches cliniques et environnementales de *S. maltophilia* chez *G. mellonella* mais leurs résultats montrent que ces souches ont un pouvoir pathogène différent (30). Les souches cliniques semblent entraîner un taux de mortalité plus élevé que les souches environnementales, alors que les souches cliniques montrent des taux de mortalité variables. Finalement chaque souche pourrait exprimer des facteurs de virulence différents. Ces modèles expérimentaux amibes libres et larves de *G. mellonella* mettent en évidence un potentiel pathogène différent entre les souches de *S. maltophilia* mais les facteurs influençant cette virulence ne sont encore pas tous élucidés.

II. Utilisation du modèle *G. mellonella* pour l'étude d'*A. fumigatus* in vivo

Galleria mellonella* as a screening tool to study virulence factors of *Aspergillus fumigatus

Marie-Fleur Durieux^{1,2}, Élise Melloul², Sana Jemel², Lolita Roisin², Marie-Laure Dardé¹, Jacques Guillot^{1,3}, Éric Dannaoui^{1,4}, Françoise Botterel^{2, 5*}

¹ *Laboratoire de Parasitologie – Mycologie, Limoges, France*

² *EA 7380 Dynamyc, Université Paris-Est Créteil, École nationale vétérinaire d'Alfort, IMRB Créteil, France*

³ *École nationale vétérinaire de Maisons-Alfort, Maisons-Alfort, France*

⁴ *Faculté de Médecine, Université Paris Descartes, Unité de Parasitologie-mycologie, Service de Microbiologie, Hôpital Européen Georges Pompidou, AP-HP, Paris, France*

⁵ *Unité de Mycologie, Département de Microbiologie, Groupe hospitalier Henri Mondor - Albert Chenevier, APHP, DHU VIC Université Paris-Est- Créteil, France*

Short title: *Aspergillus fumigatus* in *Galleria mellonella*

Words count: 5369, Number of figures: 4, number of tables: 3

* Corresponding author: Pr Françoise Botterel, *Laboratoire de Parasitologie Mycologie, Département de Virologie, Bactériologie-hygiène et Mycologie Parasitologie, Groupe hospitalier Henri Mondor, 51, avenue du Maréchal De Lattre de Tassigny, 94010 Créteil, France. Phone: + 33 1 49 81 28 91 Fax: + 33 1 49 81 46 05 E-mail: francoise.botterel@aphp.fr*

ABSTRACT

Alternative host models have been developed to overcome the limitations of the conventional murine models. For instance, invertebrate *Galleria mellonella* model has increasingly and widely been used in the last few years to study the complex host-microbe interactions in microbiology, for bacteria, toxins, or fungi. *Aspergillus fumigatus* is one of the most pathogenic fungi causing life-threatening diseases. It can colonize the respiratory tract of patients with chronic lung diseases such as cystic fibrosis and give rise to invasive fungal infections in immunocompromised patients. In host-fungus interaction, e.g. *Aspergillus fumigatus*, *Galleria mellonella* has been proved as a reliable model for analysis of pathogenesis, virulence factors, and research of new antifungal targets, allowing to screen at the same time a large number of strains. This review describes the different uses of *G. mellonella* to study *A. fumigatus* and provides a comparison of the different protocols employed by authors to trace fungal pathogenicity (inoculation, morbidity index, histopathology). A summary of the diverse *A. fumigatus* mutants' strains tested in *G. mellonella*, and their roles and contribution to virulence, is listed. All data suggest that this alternative model is an interesting screening tool to study virulence factors of *A. fumigatus*. However, mammalian models are still needed to confirm the data.

Keywords: *Galleria mellonella*, *Aspergillus fumigatus*, screening, virulence factors

INTRODUCTION

Rodent models are the gold standard in clinical studies and *in vivo* experiments. International fundamental regulation 3Rs rules (Replacement, Reduction, and Refinement) guarantee welfare of animals and incite researchers to replace traditional rodent models with alternative, non-mammalian models (31). Since the early 2000s, and particularly over the last few years, many articles on invertebrate and mini-host models have been published in the literature. Until now, the ethical rules have never been applied on insects and nematodes (32). For instance, fruit fly *Drosophila melanogaster* has been the best-known invertebrate model used in genetic and developmental biology studies for over 100 years (33). Other invertebrates such as *Tribolium castaneum*, *Caenorhabditis elegans*, *Bombyx mori*, *Galleria mellonella*, or vertebrate model *Danio rerio* (4, 34–37) are also concerned. Their genome, immunity, and physiology were analyzed through many environmental and medical studies. In microbiology, *C. elegans*, *D. melanogaster*, and *G. mellonella* have recently been demonstrated as interesting tools to evaluate the virulence and the pathogenesis of human health-related microorganisms e.g. fungi. Different kinds of analyses are possible thanks to these models, such as virulence assay, immunity tests, histopathology analysis, or new antimicrobial drugs testing (37).

One of these alternative models, *G. mellonella*, has attracted increasing attention in recent years because of the many advantages it provides to study microorganisms. *G. mellonella* belongs to the Lepidoptera order and is present worldwide as a ubiquitous pest of honeybees that destroys honeycombs by feeding on bee wax, honey and bee pollen (38) In research, its last larval stage is used, just before transformation into a pupa. Many recent reviews (36, 39–45), describe very well all the advantages and disadvantages of this model, and some benefits deserve a focus on. Larvae, which are naturally exposed to pathogens, have developed immune defense systems, which have many similarities with the innate immune system of mammals. The moth innate immune system, mediated by hemocytes, can fight against a large spectrum of pathogens via phagocytosis, melanization, and secretion of antimicrobial peptides (46). Other intriguing points are their fast and high reproduction rate at low cost and the easy maintenance in laboratory without the need for expensive equipment (47, 48). In comparison with other invertebrate models, larvae can survive within a wide temperature range (18°C to 37°C) (34, 35), an essential point to mimic mammals physiology and facilitate the study of human-related pathogens. Furthermore, the genome of *G. mellonella* was entirely sequenced in 2018 (49), which makes it easy to have well-defined population of larvae, and perhaps opens the door to create a biobank with database like with other invertebrate models, Flybase and WormBase (41). In our experience and according to Amorim-Vaz *et al.*, Eisenman *et al.*, and more recently

Champion *et al.*, the main limitation of this model is sometimes the reproducibility of results, which is more difficult to obtain compared with the mice models (50–52). The reason for this is probably the origin of larvae, the different rearing conditions, temperature of storage, nutrition, genetic, and age of larvae used in the experiments (53–56). This limitation highlighted the need for standardization of the methods used to make *G. mellonella* an even more reliable model (45, 53).

Galleria mellonella has been used for the complex study of host-microbe interactions, especially host-fungi interactions (1, 55, 57, 58). The model is used in mycology in order to study many opportunistic fungal pathogens like *Candida albicans*, *A. fumigatus*, *Cryptococcus neoformans*, or other fungi of medical importance (36, 40). Some studies investigated *Aspergillus fumigatus*, one of the most common pathogenic fungi known to colonize the respiratory tract of patients with chronic lung diseases (e.g. cystic fibrosis), and to cause invasive fungal infections in immunocompromised patients. In these studies, *G. mellonella* is employed to evaluate the virulence of mutants of *A. fumigatus*, and eventually to try to find a target for novel antifungal therapies.

In this review, we focused on this wax moth model, which is one of the most popular invertebrate models with more than 1,900 scientific articles published (search terms “*Galleria mellonella*” on Pubmed) (Figure 3). The aim of this article is to compare the different protocols published in the literature to study *A. fumigatus* in *G. mellonella*, and to presents the virulence studies already made in this mini-host model. We present also our results with the virulence of several clinical and environmental strains of *S. maltophilia* in a *G. mellonella* model in association with *A. fumigatus*.

***Galleria mellonella* model**

Galleria mellonella, also known as the wax moth, belongs to the *Pyralidæ* family of the Lepidopteran order. Morphology and characteristics of every stage of its lifecycle are very well described in Kwadha *et al.* and Ellis *et al.* (48, 60). Briefly, the larva has six legs on the thorax, eight prolegs on the abdominal segment, a digestive tube, vessels, silk glands, and a nervous system (Figure 4). Duration of life cycle can vary from weeks to month depending on several factors, especially food, temperature, and humidity. An artificial food composed of a blend of honey and various cereals (59–61) can be used, but the need for food diminishes with the successive metamorphosis. However, food composition could have an impact on pupation, larval stage duration, volume of hemolymph, and density of hemocytes. Larvae are able to spin a silken thread in all stages, but they surround themselves with a cocoon only during their last stage. Now it is well known that food (59–61) and environmental conditions (temperature, humidity, darkness) (48, 49) could play a role in the susceptibility to infection. That is why the scientific community endeavors to uniform breeding procedure in order to limit this source of bias. Jorjao *et al.* propose an ideal method to rear *G. mellonella* for microbiological studies (dietary components, description of environmental conditions and a detailed protocol for all life stages of *G. mellonella*) (59).

Immune response of *G. mellonella* to *A. fumigatus*

In insects, only the innate immune system is effective and can protect against a large spectrum of pathogens like fungi, bacteria, parasites, and viruses (64, 65). *Galleria mellonella* immune system is an open circulating system of which hemolymph is the key element. This innate immune system comprises three parts: (i) physical barrier, (ii) humoral and (iii) cellular immune systems (42). The cuticle, composed of chitin and a lot of protein with antimicrobial properties, represents the first protection line, which acts as a barrier to prevent the entry of pathogens. The cellular component consists of several types of cells, called hemocytes (47, 66), circulating in the hemolymph, and can be able of phagocytosis (67, 68), encapsulation, and clotting activities (42). The humoral component, released by the hemolymph and body fat, consists of soluble effector molecules including opsonins, e.g. ApoLp-III, a pattern recognition molecule which can bind to β -1,3 glucan of numerous fungi cell wall (67). Another element of the humoral system is lytic enzymes which harbor several antimicrobial peptides (AMPs), thus can directly fight against pathogens. The process of melanization, a fundamental role of the humoral system, is activated upon the penetration of a foreign particle into larva (42). Melanin synthesis, catalyzed by phenoloxidase, limits the spread of microorganisms through the formation of

nodules visible on histological sections. Once inside the larva, filamentous fungi stimulate hemocytes to increase in density at early stages of infection (2 h). Several fungal toxins, like fumagillin, can inhibit the action of hemocytes in association with gliotoxin (70, 71). After several hours, *A. fumigatus* is able to invade larva with hyphae. These results in the formation of nodules disseminated all over the body of larva and not only near the site of inoculation (Figure 5).

Effect of stress, temperature, diet, and primary infection on immunity

Much work was made to understand the physiology of larva and to standardize methods used in laboratories. Browne *et al.* demonstrated that if *G. mellonella* larva suffers from physical or thermal stress, its resistance to *A. fumigatus* infection increases within 24 h after stress by increasing hemocytes density as well as AMPs production, and this effect quickly wears off after 48 h (70). Stressed larvae can stimulate and modulate their immune system against yeasts, e.g. *C. albicans* (71) and filamentous fungi (70). The same authors specified that pre-incubation at 4°C or 37°C, but not at 30°C, increases hemocytes density and genes expression coding for AMPs (72). Therefore, *G. mellonella* larvae must be utilized within 3 weeks of conservation at 15°C. Metabolic changes may occur in larvae after 3 weeks, i.e. decrease of hemocytes density and metabolic proteins, thus, reduced their resistance to infection (73).

In addition, some other variations during larval development change its susceptibility to infections, including exposure to fungal cell or cell wall components, and nutritional stress. Fallon *et al.* showed that infection could be controlled by a primary inoculation with a sublethal dose of *A. fumigatus* to trigger the immune response and protect the larva from a more severe infection (74). Banville *et al.* reported a link between starvation of larva and its susceptibility to *Candida* infection: higher mortality rate in starved larvae (61). Lack of food is an important source of stress affecting the metabolism of larvae and consequently the results of experiments.

Experimental design for virulence assay

Infection with filamentous fungi

Homogenous groups of 10 to 20 larvae with cream-color cuticle, of about 200-300 mg weight, 1-3 cm length and spontaneous mobility, are generally used. The larvae had to be manipulated delicately to avoid physical stress. After infection, larvae are maintained up to 37°C without feeding. Control groups are also essential to ensure that the trauma of inoculation or the use of buffer do not affect the larvae survival. Three methods are used to infect the larvae: topical application, ingestion, and injection.

Topical application of fungi causes penetration into the exoskeleton, which is close to natural fungal contamination. Some authors utilized this trauma-free method to inoculate larvae by immersion in a conidial suspension of *Beauveria bassiana* for about 10 seconds (77, 78). Another article describes applying 5 μ L of *Aspergillus flavus* directly on the dorsal surface of larvae (77). Overall, this method is rarely used because of reproducibility issues and the difficulty to have a precise inoculum delivery into the larvae.

Forced-feeding (ingestion) consists in inserting 10 μ L of fungal suspension into the larval mouthpart using a micro-injector and a needle (80, 81).

The preferred and the most commonly used method to study interaction between filamentous fungi and *G. mellonella* is the injection of fungi into larval hemocoel by pricking the cuticle with a needle at the last proleg (56). The last left proleg is the preferred site for injection but other sites are possible, if necessary (57). The main upside of this method is the better delivery of a precise inoculum (5 to 20 μ L per larva) using either an insulin or a Hamilton syringe. The latter is more precise to inoculate small volumes. An insulin syringe with an automatic applicator could be used for larger quantities and faster inoculations (57, 82, 83). The injection is almost scarless for the larva but there is some risk for the operator (especially for BSL-3 microorganisms) that could be avoided with proper restraint and handling techniques (82, 84). Differences between the employed protocols in terms of inoculum preparation, technique of inoculation, and experimental conditions are described in Table 1.

Follow-up of *A. fumigatus* infection

Mortality monitoring: for the analysis of strains virulence, larval survival is monitored over time after inoculation, most often every 24 h for 5 days. Larvae movement gradually decreases, reflecting the progression of fungal infection, but to a variable extent depending on fungal species and strains. Determining the best concentration of fungal inoculum is crucial to achieve a substantial killing rate (57). Inoculum-finding experiments allows to calculate the median and 90 % lethal doses (LD50 and LD90), and to compare the survival after wild-type and mutant strains inoculation in order to assess different virulence factors (83, 85).

Morbidity monitoring: another method can be used to assess the morbidity of larvae, based on several criteria of follow-up to calculate a morbidity score. The evaluation of morbidity gives more precise details on the progression of infection within the larva. Some teams used this scoring system which comprises four main criteria: melanization, mobility, capacity to form silk cocoon, and survival (45, 53). Melanization is an immune process visible to the naked eye

and deemed completed when the larva is dead, and the immune response is overtaken. Thus, the degree of melanization is correlated with morbidity and a key element to assess the general condition of the larva. Larval mobility is evaluated individually on spontaneous and stimulated movements. The capacities of larva to turn around, to wiggle and to form a silk cocoon are strong indicators of good health. Survival is the last criterion for the scoring system of morbidity (Table 2).

Histological analyses: to examine the pathogenesis and the host-pathogen interactions, histological analysis is recommended, especially to see tissue damage caused by fungal infection. A research team developed a procedure to analyze *C. albicans* virulence and assess morphological changes in larva body (84). This procedure can also be used with other fungal species as well as to highlight the differences between them. It consists in injecting formalin into the larva which is then stored at 4°C for a few days. Later, researchers proceed with their routine laboratory protocol by carefully dissecting the larva from sagittal or transversal lines and staining it with Gomorri-Grocott or Hematoxylin and Eosin (HE) staining. Recently, Sheehan *et al.* have provided histological data on invasive *A. fumigatus* infection, and highlighted the usefulness of *G. mellonella* larvae, albeit they have no respiratory system (85). The team utilized a technique that does not require the use of formalin: larvae are embedded in Bioinvision Cryo-Imaging Embedding Compound, and flash-frozen in liquid nitrogen. Then, slides are made with Cryoviz for a specific cryo-imaging.

Infected larvae melanized with time by forming melanized capsules surrounding pathogens, and their internal organs were disorganized by the infection. Many authors use this particularity (melanization/tissue damage) to better understand the progress of infection and the effect of fungal mutants on larvae as visualized by histological analysis and Gomori-Grocott staining (89, 90). For example, Figure 5 shows the progress of *A. fumigatus* infection after 3 days (A) and 7 days (B) with melanized nodules and granulomas containing both conidia and hyphae. Number and size of these granulomas, which are distributed in all over the larva, increased over time after infection (personal data).

Galleria mellonella*-based screening to study virulence factors of *Aspergillus fumigatus

Origin of strains

There is a wide range of genetic variability between *A. fumigatus* strains, but the relationship between virulence and the origin of the strains has insufficiently been studied. Cheema and

Christians (88) showed a significant difference of virulence between clinical (8 strains) and environmental (8 strains) isolates in *G. mellonella*, with a lower survival rate of larvae inoculated with environmental strains. Another study showed opposite results; the clinical strains (n=10) appeared to be significantly more virulent than the environmental strains (n=20) (89). However, high variability was also observed between strains of the same origin. These discordant results preclude any conclusion of strain origin effect on virulence of *A. fumigatus* in *G. mellonella* model. A study conducted on a mixed infection of *A. fumigatus* (clinical and environmental) strains in a mouse model showed that environmental strains were less virulent than clinical strains (90).

Up to now, no animal strains have been tested in *G. mellonella* model. We have tested for the first-time pathogenicity of two different animal *A. fumigatus* strains, from wild fauna *A. fumigatus* A1 and from a duck *A. fumigatus* A2. Ten larvae have been infected into the hemocel with 10 μ L of 10^6 conidia/larva of the two strains. After 7 days of infection, the strain A1 had a 10% survival rate compared to a 30% survival rate for Af A2, with no statistical difference (log-rang test). In our experiments, strains of animal origin have the same profile as human and environmental strains. These results are consistent with other studies: we cannot make a link between origin and pathogenicity of *A. fumigatus* strains (89)(94).

Cell wall: growth, sporulation and septation

Relationship between virulence and fungal development (growth, germination, sporulation, cell wall modification) involves several mechanisms that are not completely elucidated. Understanding these mechanisms is essential mainly to find new therapeutic targets against *A. fumigatus*. A large number of *A. fumigatus* mutants involved in these signaling pathways have been tested in *G. mellonella* model. Cofilin, a regulator of actin cytoskeleton dynamics of the actin depolymerizing factor (ADF)/cofilin family, plays a critical role in the regulation of oxidative stress responses and cell wall polysaccharide synthesis in *A. fumigatus* (91). Overexpression of cofilin in a given *A. fumigatus* strain had no effect on the fungal virulence in *G. mellonella* or murine model (91), whereas downregulation of cofilin lowered the virulence in *G. mellonella* (92).

In fungi, six regulators of G protein signaling (RGS) domain proteins (flbA, gprK, rgsA, rax1, rgsC, and rgsD) are involved in fungal growth, sporulation, stress response, secondary metabolites, and virulence. Some of them negatively or positively regulate asexual development, gliotoxin or melanin production, and virulence of *A. fumigatus* in *G. mellonella*.

The Δ rgsD mutant displayed increased gliotoxin production and elevated virulence (86), while the Δ rgsC (94) and Δ gprK (87) mutants showed defective gliotoxin production and decreased virulence in the larvae.

The calcium-calcineurin signaling pathway has an important role in fungal physiological processes, stress responses, and virulence (98, 99). The *cnaA* null mutant, deficient in calcineurin, is hypovirulent in *G. mellonella* and murine models and has an effect on growth rate, sporulation and filamentation (95). Dinamarco *et al.* tested nucleoside diphosphate kinase (SwoH) that interacts with the catalytic subunit of calcineurin in *A. fumigatus* (96). The Δ SwoH mutant reduced fungal growth and virulence in larvae maintained at 37°C, but not at 30°C.

Kin1 is a protein kinase that plays a role in polarized growth, cell division, and septation through coordinated activity with the calcineurin (97). Kin1 and calcineurin interact together when fungal cell wall is exposed to stress. Unlike in other fungi, this protein does not seem indispensable for *A. fumigatus* growth and septation. Moreover, the Δ kin1 mutant strain remained as virulent as wild type strain in *G. mellonella* model (97).

Septins, a conserved family of GTPases, are involved in a variety of critical cellular functions, including cell wall integrity and septation in *A. nidulans* (102, 103). *A. fumigatus* has five septins (*aspA*, *aspB*, *aspC*, *aspD*, and *aspE*) that seem necessary for septation but not for fungal growth (100). The Δ aspA, Δ aspB, and Δ aspC mutant strains are hypervirulent in *G. mellonella*. However, the virulence of Δ aspB strain is similar to that of the wild type strain in murine model (100).

Other proteins are involved in cytoskeleton mechanism of *A. fumigatus*, as myosin (family of actin-based motor proteins). The Δ myoE and Δ myoB mutant strains have distinct effect on fungal development but are both hypovirulent in larvae (101). Myosin seems to have an important role in regulating virulence of *A. fumigatus*.

Rho1, a small GTPase regulatory subunit of β -1, 3-glucan synthase, is indispensable for *A. fumigatus* viability and virulence (102). Downregulating Rho1 expression in mutant strain decreases virulence in larvae, whereas its overexpression has no such effect.

The Rab (Ras-related in brain) family of small GTPases (*srgA A*, *srgA B*, *srgA C*) have been evaluated in *G. mellonella* model and showed their involvement in fungal development and filamentation. Only the Δ srgA C strain showed lower fungal virulence in *G. mellonella* larvae (103).

The recently discovered ER-mitochondria encounter structure (ERMES), which links mitochondria and endoplasmic reticulum, plays a role in *A. fumigatus* growth and virulence (104).

Secondary metabolites

Aspergillus fumigatus produces a wide range of secondary metabolites that can be harmful or beneficial. These small molecules of low molecular weight often have complex biosynthesis. For instance, Non-Ribosomal Peptide Synthetases (NRPS), key-enzymes involved in the biosynthesis of secondary metabolites in fungi (105), have many metabolic functions not yet elucidated. All secondary metabolites are necessary components since they enable the fungus to adapt to the host and grow inside it by escaping the immune response mechanisms. Other functions of these secondary metabolites are to facilitate tissue colonization and help the fungus tolerate external aggressions such as UV, desiccation, or competition with other pathogens (106). Sequencing of the *A. fumigatus* genome showed the presence of 14 genes encoding for NRPS. *Galleria mellonella* model allowed researchers to study some NRPS functions, including toxins production (gliotoxin), as well as other molecules involved in acquisition of nutrients essential for fungal survival, such as iron (siderophores) (Table 3).

Secondary metabolites involved in the struggle against the immune response

One of the best known secondary metabolites of *A. fumigatus* is **gliotoxin**, a virulence factor which inhibits macrophage phagocytosis and oxydative response to stress, decreases cytotoxic activity of T cells, and hinders induction of apoptosis of host cells (8). Of note, there was a decrease in *G. mellonella* larval mortality with the Δ mtfA strain (107). The mtfA transcription factor acts to regulate gliotoxin biosynthesis (via genes gliZ and gliP), in addition to its involvement in fungal growth and conidiation. On the same line, Reeves *et al.* showed a positive correlation between gliotoxin production and pathogenicity of selected *A. fumigatus* strains (69) which originally differed in gliotoxin production. Thus, the high rate of gliotoxin produced by ATCC 26933 strain caused high mortality in larvae, unlike ATCC 16424, ATCC 13073, and ATCC 14109, which produced less gliotoxin and caused less mortality in larvae.

Melanin is another secondary metabolite and virulence factor of *A. fumigatus*. Melanin is a polymer of dihydroxynaphthalene (DHN) present on the surface of conidia to provide protection against UV and desiccation, in addition to its capacity to neutralize free radicals. Unlike mammals, melanin-deficient mutants caused an increase of virulence in *G. mellonella* (108). Perhaps the absence of melanin led to a modification of the fungal cell wall which in turn triggered a greater immune response in the larvae.

Among the other mycotoxins of *A. fumigatus* analyzed in *G. mellonella* as a virulence factor is **fumagillin** which inhibits the action of neutrophils, a central element of the immune response

to microbial infections. Fumagillin is produced during the development of *A. fumigatus* hyphae. A study reported that fumagillin inhibited the phagocytosis function of hemocytes, thus facilitating the growth of the fungus in the larva (68). Therefore, pre-administration of fumagillin to larvae would increase susceptibility to *A. fumigatus* infection (109).

Fungi produce other metabolites, some of them from the **ergot alkaloids** pathway. The role of these alkaloids in the pathogenicity of *A. fumigatus* has been well studied *in vivo* in *G. mellonella*. *A. fumigatus* strains with ergot alkaloids mutations (**fumigaclavine C** deficiency) showed a decrease in virulence. Fumigaclavine C is an inhibitor of TNF-alpha in human macrophages and could decrease expression of inflammatory cytokines in mice. *PesL* and *pes1*, involved in the final step of fumigaclavine C biosynthesis, have a role in the pathogenicity of *A. fumigatus* since $\Delta pesL$ was hypovirulent in *G. mellonella* (110). As for $\Delta pes1$ gene, the virulence in *G. mellonella* was correlated to that of the reference strain. O'Hanlon *et al.* (110) found no difference in mortality compared with the reference strain ATCC46645, whereas Reeves *et al.* (111) observed a decrease in virulence upon using the wild-type strain Af293.1. Another gene, *dmaW*, implicated in the biosynthesis of fumigaclavine C, also had an effect on virulence of *A. fumigatus* in *G. mellonella* (112). The mutant $\Delta dmaW$ inhibited the synthesis of final product fumigaclavine C, and consequently lowered the virulence in *G. mellonella*.

Secondary metabolites of A. fumigatus involved in iron metabolism

In *A. fumigatus*, almost twenty-four genes are involved in iron homeostasis to a certain degree. This regulation is divided into two broad categories: "low affinity ferrous iron acquisition" and "high affinity iron uptake system". *Aspergillus fumigatus* does not have a system for direct uptake of iron from heme, transferrin, or ferritin, like other pathogens (113). Resulting siderophores production represents a great part of homeostasis and iron metabolism. The siderophore biosynthesis pathway bifurcates, after hydroxylation of ornithine, into extracellular and intracellular siderophores. Both kinds of siderophores are present in *A. fumigatus*: extracellular hypha-secreted siderophores [fusarinin C (FSC) and triacetylfusarinin C (TAFC)], and intracellular siderophores for iron storage and distribution in hyphae (Ferricrocin (FC)) or in conidia (hydroxyferricrocin (HFC)). In *G. mellonella* model, it is possible to study several stages of biosynthesis of *A. fumigatus* siderophores, which are specific chelators for iron absorption, storage, and distribution in iron-deficient environment. The first stage of extra- and intra-cellular siderophores biosynthesis consists in hydroxylation of ornithine catalyzed by SidA. Ornithine can be formed from glutamate in the mitochondria or from arginine in the

cytoplasm. Beckmann *et al.* studied two key enzymes of ornithine biosynthesis in the *in vivo* model of *G. mellonella*: *argEF*, involved in the transformation of glutamate into ornithine, and *argB*, involved in the arginine synthesis pathway (114). Only the Δ *argEF* mutant causes attenuation of the *A. fumigatus* virulence in larvae incurred by the decrease of siderophores production. *AmcA*, a putative mitochondrial ornithine carrier protein, allows to use and to export ornithine from mitochondria to cytosol in order to use it as a nitrogen source for siderophores biosynthesis. The virulence of Δ *amcA* (114) is similar to that of the wild-type strain, though this mutant induces a significant decrease of intra- and extra-cellular siderophores production when cultured with glutamine as a nitrogen source. The fungus probably uses the alternative pathway of arginine for siderophores biosynthesis, which explains the absence of effect of Δ *amcA* on virulence. Schrettl *et al.* showed that Δ *sidA* led to avirulence of the strain in mice (119, 120). Slater *et al.* found concordant results in *G. mellonella*, regardless of the mutant inoculated dose (117). Other genes implicated in both pathways of siderophores biosynthesis, like *sidC* (intracellular siderophore) and *sidD* or *sidF* (extracellular siderophores), have also been tested in rodent or *G. mellonella* models. The Δ *sidF*, Δ *sidD*, and Δ *sidC* mutants induce lower mortality rate in mice than wild-type strain of *A. fumigatus* (92).

Slater *et al.* reported similar results in *G. mellonella* model, except for Δ *sidF* which was completely avirulent (89). In mice as in *G. mellonella* model, deletion of genes coding for the first steps of the siderophore biosynthesis pathway could have a big effect on the virulence of *A. fumigatus*. However, deleting genes encoding for late-stages mechanisms had no such effect due to the presence of alternative pathways.

PptA, a putative 4'-phosphopantetheinyl transferase (4'-PPTase), has a role in lysine biosynthesis and primes the putative Non-Ribosomal Peptide Synthetase (NRPS) *Pes1*, which plays a role in ergot alkaloid biosynthesis. Johns *et al.* showed that *PptA* has a non-redundant role in production of different secondary metabolites, like gliotoxin, DHN-melanin, and siderophores (TAFC and FC) (118). The *PptA* null mutant (Δ *PptA*) is avirulent on *G. mellonella* larvae and in both bronchopulmonary and disseminated murine infection models. In fungi, siderophores are absorbed by siderophore-specific transmembrane transporters, siderophore iron transporter (SIT), a subgroup within the major facilitating superfamily (MFS) (119). Of those SITs, two have been distinguished for their role in mediating TAFC uptake (*MirB*) or in intracellular siderophore biosynthesis (*MirA*). *MirB* is necessary for uptake of extracellular iron-loaded siderophore (TAFC) and is located at the tip of hyphae. *MirC* is involved in the biosynthesis of intracellular siderophores and located in intracellular microsomal compartments (113). When Δ *mirC* mutant is inoculated in *G. mellonella* in an iron-

poor environment, production of ferricrocin (intracellular siderophore) and virulence are decreased. These results confirm the involvement of MirC in the regulation of iron metabolism and its implication in the pathogenicity in *G. mellonella*.

A study has recently demonstrated the involvement of the leucine regulatory transcription factor (LeuB) in the biosynthesis of siderophores (120). The mutant Δ leuB is less resistant to iron starvation and is hypovirulent in larvae. Similarly, another study has reported the involvement of the AcuM transcription factor in the production of siderophores, hence hypovirulence of Δ acuM in *G. mellonella* larvae (121).

Given that most of the key steps of siderophore biosynthesis were studied in *G. mellonella* model, highlighting its importance and its implication in the fungal pathogenicity, lots of these metal transporters in *A. fumigatus* have not been characterized yet. Other genes involved in the homeostasis of nutrients have been studied and shown their importance in *A. fumigatus* virulence, such as PIB-type cation ATPase (PcaA) which helps export metal ions (e.g. Cu²⁺, Ag⁺, Zn²⁺, and Cd²⁺) (Figure 6). The essential function of PcaA in the virulence of *A. fumigatus* was confirmed since Δ pcaA mutant was hypovirulent in *G. mellonella* (122).

Comparison between *G. mellonella* and murine models

To validate the *G. mellonella* model, several authors had compared the results on *G. mellonella* with those on the murine model, with, in most cases, a good correlation. For fungal analysis, studies of virulence factors of *Mucor circinelloides* (83), *Fusarium species* (81), and *Candida albicans* (123) are compared in both *G. mellonella* and mice, showing that genes activated to yield full virulence in larvae and in immunodepleted mice are the same. The results are comparable. On the other hand, Amorim-Vaz *et al.* worked to identify transcription factors involved in virulence of *C. albicans* by comparison of the two models (50). In their opinions, they consider *G. mellonella* as a useful model even though conclusion noticed only 50% concordance between mice and larva. Interestingly, another publication found discrepancy in the level of pathogenicity of strains of *C. albicans* (101). In our review and by analyzing mutants from *A. fumigatus* in *G. mellonella*, it is important to note that in consistency with Amorim-Vaz *et al.* about half of the comparisons show good correlation. All these results support the presence of similitudes in the mechanisms of fungal infection between the two models, but the discrepancies suggest that the lack of adaptive immune system in the larvae disrupts the perfect alignment between the two hosts. Although most data are well correlated between the two models, in mammals, results can be different because of the interaction with a more complex immune system than in insect.

CONCLUSION

Larvae of *G. mellonella* present several interesting criteria which seduce researchers to use it as an *in vivo* model, hence the increased number of publications on molecules or pathogens that have been tested on larvae over these last years. The possibility of conducting large-scale studies using this model makes it a powerful tool; however, many teams have noticed that different outstanding parameters may modify the larval immune response and thus influence the response to infection. Therefore, it is important to remedy these issues with standardization of study design, which has started to develop recently. Additionally, complete sequencing of the larval genome will open the door wide for further research using it.

Thanks to similarities between mammal and insect innate immune systems, *G. mellonella* could be used to understand infection mechanisms and to assess virulence of different pathogens, including fungi, especially *A. fumigatus*. The latter is one of the most pathogenic fungi against which researchers endeavor to identify new therapeutic targets, as this is becoming one of the public health issues of particular concern. Studying their pathogenicity is necessary by analyzing the production of their arsenal of secondary metabolites or say virulence factors via the strategy of gene disruption. In the last five years, several studies have explored the impact of metals like iron, and the production of mycotoxin or proteins on their virulence in *G. mellonella* model. In this review, we have demonstrated that *A. fumigatus* could produce a vast array of active biomolecules and virulence factors that could enhance its pathogenicity. Some signaling pathways were almost entirely studied in the larvae, which proves the high interest of utilizing them to initiate large-scale pre-screening protocols, conducted in mammals, for the identification of potential therapeutic drugs, in compliance with the 3Rs. It seems evident that *A. fumigatus* pathogenicity is multifactorial, involving host and fungi factors. Thus, improving our knowledge on host-fungus relationship is important.

To conclude, this lepidoptera larva has, by all its advantageous characteristics, proven its utility to study host pathogen interactions, particularly for *A. fumigatus*. It can serve as a fast, simple, and low-cost pre-screening model to complete data before using a mammalian model, in a medical field where a great part of progress is necessary to optimize patient management.

Acknowledgement

We thank Dr Suhad Assad for her critical linguistic reviewing.

Conflicts of interest

ED has received grants from Gilead, Ferrer, and Biorad, and payment for lectures from Gilead, MSD, and Schering. ED has also been a consultant for Astellas and Innothera. FB received grants from Astellas, and payment for lectures from Merck. MFD, MLD, EM, SJ, LR, JG declare no conflict of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

Table 1: Comparison between protocols to analysis *A. fumigatus* in *G. mellonella*

Ref.	Larva selection criteria	Number of larva /group	Inoculation (in hemocoel)	Inoculum conidia/larva	Maintenance of larva		Monitoring (during of experiment)
					Before inoculation	After inoculation	
(95, 96, 106)	0.3-0.5g No gray marking	16	10 µL	5x10 ⁵	/	In Petri dishes, in the dark, at 37°C	Every 12 h (8 days)
(101)	/	20	5 µL	5x10 ⁶	/	At 37°C	Daily (5 days)
(99, 101, 104)	Sixth-instar larvae	15	5 µL	2x10 ⁵	/	At 37°C	Daily (5 days)
(69)	Sixth instar larvae 0.2-0.4g	20	20µL Myjector U-100 Insulin needle	1x10 ⁴	In wood shavings, in the dark, at 15°C	In Petri dishes, in the dark, at 30°C	Daily (5 days)
(117)	/	10	10 µL Hamilton syringe	~ 3x10 ⁶ to 3x10 ³	/	At 37°C	Daily (7 days)
(124)	/	30	20 µL	1x10 ⁶ or 1x10 ⁷	/	/	Daily (7 days)
	Sixth-instar larvae 0.3-0.4 g	20	20µL	1x10 ⁷	In the dark, at 18°C	In the dark, at 30°C	Daily (6 days)
(107)	0.275 and 0.300 g No gray marking	30	Hamilton syringe	1x10 ⁶	/	In Petri dish, in the dark, at 37°C	After 16 h, every 2 h (30 h)
(125)	Sixth instar larvae	/	20 µL	1x10 ⁷	In the dark, at 18°C	In the dark, at 30°C	Daily (6 days)
(74)	Sixth instar larvae 0.2–0.4 g	/	Myjector U-100 insulin syringe	1x10 ⁴ to 1x10 ⁷	In the dark, at 15°C	At 30°C	/
(103)	Sixth instar larvae 0.25–0.35 g	12	5 µL Hamilton syringe	5x10 ⁵	/	In Petri dishes, in the dark, at 37°C	Daily, (5 days)
(126)	/	30	5 µL	5x10 ⁷	/	/	Every 12 h (5 days)
(112)	No gray marking 0.2 g	10 to 15	20 µL Disposable 29.5-gauge hypodermic needle	5x10 ⁵ 2x10 ⁵	/	/	Daily (7 days)
(127)	Final-instar larvae 0.275-0.300 g	10	5 µL	1x10 ⁶	Without food, at 37°C, in the dark for 24 h	In Petri dishes, in the dark, at 37°C	Daily (10 days)
(93)	Sixth instar larvae	/	/	1x10 ⁵	/	In the dark, at 37°C	Daily (10 days)
(87)	Sixth instar larvae 0.3 g	/	5 µL	1x10 ⁵	/	In the dark, at 37°C	Daily (10 days)
(121)	Sixth instar larvae	30 to 35	5 µL Hamilton syringe	5x10 ⁶	In wood shavings, in the dark, at room temperature	In Petri dishes, in a dark humidified incubator at 37°	Daily (8 days)
(94)	0.30–0.35 g	16	10 µL	5x10 ⁵	/	In the dark, at 37°C	Every 12 h (5 days)
(128)	/	30	20 µL	5x10 ⁶	/	/	Daily (3 days)
(130)	0.275-0.300 g	30	10 µL	1x 10 ⁵ or 1x10 ⁶	/	In Petri dishes, in the dark, at 37°C	After 16 h, every 2 h
(110)	Sixth-instar larvae 0.2-0.4 g	20 or 30	20 µL	1x10 ⁶ or 1x10 ⁷	In wood shavings, in the dark, at 15°C	/	Daily (4 days)
(122)	/	12–28	20 µL	8x10 ⁴	/	At 37°C	Daily (7 days)
(104)	0.3-0.5g	10	10 µL	5x10 ⁵	At 8°C	In the dark, at 37°C	Every 8 h (6 days)
(96)	0.275-0.300 g	10	5 µL	1x10 ⁶ (37°C) 5x10 ⁶ (30°C)	/	At 37°C or 30°C	Every 12 h (6 days)
(130)	/	30	10 µL Hamilton 1 mL gas-tight syringe	1x10 ⁸ to 1x10 ³	In wood shavings, in the dark, at 4°C for up to 10 days	In Petri dishes, in the dark, at 37°C	Daily (7 days)
(88)	0.25 – 0.30 g	10	5 µL Hamilton syringe 25 µL	500 CFU/µL	/	In Petri dishes, in the dark, at 37°C, with pine wood chips	Daily (8 days)
(118)	Sixth instar larvae 15-25 mm length	30	10 µL Braun Omnican 50-U 100 0.5 mL insulin syringe	1x10 ⁶	/	In the dark, at 37°C	Daily (7 days)

Table 2: Examples of scores for monitoring pathogenicity

Category	Loh <i>et al.</i> (131) health index scoring system		Melloul <i>et al.</i> , 2018 (1)	
	Description	Score	Description	Score
Activity	No movement	0	No movement	0
	Minimal movement on stimulation	1	No turn around and minimal movement on stimulation	1
	Move when stimulated	2	Difficult turn around and weak spontaneous mobility	2
	Move without stimulation	3	Normal, able to turn around and move	3
Cocoon formation	No cocoon	0	No cocoon	0
	Partial cocoon	0,5	Full cocoon	1
	Full cocoon	1		
Melanization	Black larvae	0	Melanized larvae	0
	Black spots on brown larvae	1	No melanized larva	1
	≥3 spots on beige larvae	2		
	<3 spots on beige larvae	3		
	No melanization	4		
Survival	Dead	0	Dead	0
	Alive	2	Alive	1

Table 3: List of *A. fumigatus* mutants tested in *G. mellonella*

Function	Mutant	Reference strain	<i>In vitro</i> effects on development, stress response and metabolism	Virulence in <i>G. mellonella</i>	Virulence in mice	Ref.	
SECONDARY METABOLITES							
mtfA gene encodes a putative C2H2 zinc finger domain-type transcription factor (fungal development and secondary metabolism)	<i>ΔmtfA</i>	Af CEA10	Role on growth rate & gliotoxin production	Decreased	/	(107)	
	<i>OEmtfA</i>		Role on growth rate & conidiation, stress response, gliotoxin production	No change	/		
rtfA : gene encoding a RNA polymerase II transcription elongation factor-like protein	<i>ΔrtfA</i>	Af CEA17	Reduce growth rate, increase conidiation, oxidative stress and metabolites metabolism	Decreased	No change (Schrettl, 2004)	(129)	
	<i>rtfA OE</i>		No difference on growth, conidiation, stress response or metabolites metabolism. Minor effect on cell wall.	No change	/		
Gene cluster involved in melanin pathway	Alb1: encodes polyketide synthase	Af 293	/	Increased	Decreased	(132)	
	Ayg1: encodes heptaketide hydrolyase			Color mutant ayg1	Increased		/
	Arp2: encodes hydroxynaphthalene reductases			Color mutant arp2	Increased		/
	Arp1: encodes scytalone dehydratases			Color mutant arp1	Increased		Decreased
	Abr1: encodes multicopper oxidase			Color mutant abr1	Increased		/
	Abr2: encodes laccase			Color mutant abr2	Increased		/
dmaW, easM, A, G : genes involved in ergot alkaloid pathway	<i>ΔdmaW</i>	Af FGSC A1141	/	Decreased	/	(112)	
	<i>ΔeasM</i>	Af293		Decreased	/		
	<i>ΔeasA/G</i>			Decreased	/		
Pes1, PesL : nonribosomal peptide (NRP) synthetases involved in fumigaclavine C biosynthesis	<i>ΔpesL</i>	<i>ΔakuB</i> mutant background	Reduce tolerance to H ₂ O ₂ but increase tolerance to menadione, essential for fumagaclavine C biosynthesis	Decreased	/	(110)	
	<i>Δpes1</i>	in <i>ΔakuB</i> mutant and ATCC 46645 backgrounds		No change	/		
	<i>Δpes1</i>	Af293.1	Altere conidial morphology & hydrophobicity. More susceptible to oxidative stress	Decreased	/	(111)	
DEVELOPMENT							
Rgs (RgsC , RgsD & GprK): regulator of G protein signaling, crucial roles in upstream regulation of vegetative growth, development, secondary metabolism, and virulence	<i>ΔrgsD</i>	Af293	Increase conidiation, stress response, gliotoxin and melanin production	Increased	/	(86)	
	<i>ΔrgsC</i>	Af293.6	Increase germination, reduce conidiation, growth, tolerance to H ₂ O ₂ and gliotoxin production, modify cell wall	Decreased	/	(93)	
	<i>ΔgprK</i>	Af293.1	Increase germination & reduce conidiation, tolerance to H ₂ O ₂ and gliotoxin production	No change	/	(87)	
NosA : number of sexual spores, transcription factor	<i>ΔnosA</i>	Af CEA17 <i>ΔakuB</i>	Slightly reduce germination & increase growth and conidiation			(133)	
Cofilin : actin depolymerizing factor, role in actin cytoskeleton dynamic	<i>cofilin^{tecon}/cofilin^{SSE}</i>	Af CEA17 <i>Δku80</i>	Impaire growth rate, regulate cell wall & modify resistance to H ₂ O ₂	Decreased	No change	(92)	
	<i>Cofilin OE</i>		Role on growth rate & cell wall, increase resistance to H ₂ O ₂	No change	No change	(91)	
	<i>D19A R21A</i>		?	Increased	/	(94)	
	<i>K36A</i>		?	Increased	/		
Myosin : cytoskeleton component, family of actin-based motor proteins	<i>ΔmyoB</i> (class II)	Af akuBKU80 pyrG ⁻	Delayed germination, increase of conidiation & modification of cell wall	Decreased	Decreased	(101)	
	<i>ΔmyoE</i> (class V)	<i>ΔmyoBΔmyoE</i>	Delayed germination, reduction of growth rate & conidiation, modification of cell wall	Decreased	No change		
	<i>ΔmyoBΔmyoE</i>		/	/			
Septins : family of GTPases regulates cellular processes (cell wall integrity, septation)	<i>ΔaspA</i>	Af <i>akuB^{KU80}</i>	No difference on growth rate, reduce conidiation	Increased	/	(100)	
	<i>ΔaspB</i>		Reduce growth rate, reduce conidiation	Increased	No change		
	<i>ΔaspC</i>			Increased	/		
	<i>ΔaspD</i>			No change	/		
	<i>ΔaspE</i>			No change	/		
	<i>ΔaspEΔaspD</i>		No difference on growth rate, reduce conidiation	No change	/		
	<i>ΔaspEΔaspB</i>			Increased	/		
	<i>ΔaspEΔaspDΔaspB</i>			Increased	/		
				Increased	/		
Rho1 : small GTPase, a potential regulatory subunit of β-1,3-glucan synthase	<i>Rho1^{tecon}</i>	Af CEA17 <i>Δku80</i>	No growth & increase H ₂ O ₂	Avirulent	/	(102)	
	<i>Rho1 OE</i>		No difference on growth rate or on stress response	No change	No change		

Kin1 : protein kinase is a member of the eukaryotic PAR-1/MARK/MELK family	<i>Δkin1</i>	Af akuB ^{KU80}	No difference on growth rate, conidiation & cell wall. Role on stress response	No change	/	(97)	
srgA : (secretion related GTPase A) encoding a Rab GTPase of the Rab family, master regulators of membrane trafficking	<i>ΔsrgA A</i>	AfS28	Reduce growth rate & aberrant conidiation, role in stress response	No change	/	(103)	
	<i>ΔsrgA B</i>			No change	/		
	<i>ΔsrgA C</i>			Decreased	/		
ERMES : Endoplasmic-Reticulum mitochondria encounter structure, tether between mitochondria and endoplasmic reticulum	<i>mmm1_{erOn}</i>	AfS35	Reduce growth rate	Decreased	/	(104)	
Calcineurine	swoH : nucleoside diphosphate kinase, interaction with the catalytic subunit of calcineurin (CaIa)	SwoH ^{V83F}	Af CEA17-80	Reduce growth rate and and increased sensitivity to elevated temperatures	Decreased	/	(96)
	cnaA : calcineurin A (cnaA) catalytic subunit	<i>ΔcnaA</i>	Af293.1	Reduce germination, growth rate & conidiation	Decreased	Decreased	(95)
METABOLISM							
mirC : Siderophore iron transporter involved in synthesis of siderophores in intracellular microsomal compartment	<i>ΔmirC</i> (Iron-deplete condition)	Af ATCC 46645	Reduce growth rate and conidiation	No change	/	(128)	
Sid : siderophore CpcA : cross pathway control (transcriptional activator) Paba : gene encodes para aminobenzoic acid synthetase PABA, in folate biosynthesis pathway	<i>ΔsidA</i>	Af ATCC 46645	/	Avirulent	Avirulent	(120)	
	<i>ΔsidC</i>	Af ATCC 46645		Decreased	Decreased		
	<i>ΔsidF</i>	Af ATCC 46645		Avirulent	Decreased		
	<i>ΔsidD</i>	Af ATCC 46645		Decreased	Avirulent		
	<i>cpcA</i>	Af D141		Avirulent	Decreased		
	<i>paba</i>	Af 237		Avirulent	Avirulent		
ArgEF : encodes for 3 enzymes acetylglutamate synthase & kinase, acetylglutamyl-phosphate reductase ArgB : encodes for ornithine transcarbamoyl transferase	<i>ΔargEF</i>	<i>ΔakuB</i> derivated from Af CEA17	Reduce growth rate & iron metabolism	Decreased	/	(114)	
	<i>ΔargB</i>	Af293	No difference of growth & iron metabolism	No change	/		
AmcA : mitochondrial transporter	<i>ΔamcA</i> (Iron-deplete condition + Nitrogen source)	Af S77 (ATCC 46645 <i>ΔKuA</i>)	Reduce conidiation, growth rate & iron metabolism in presence of Glutamate or Ornithine	No change	/	(134)	
			No difference in fungal development & slight reduction of iron metabolism in presence of Arginine or Arginine + Ornithine		/		
AcuM : zinc cluster transcription factor	<i>ΔacuM</i> (Iron deplete condition)	Af293	Reduced growth rate and iron metabolism	Decreased	Decreased	(121)	
LeuB : transcription factor	<i>ΔleuB</i> (Normal or Iron deplete condition)		Reduce growth rate in normal condition	Decreased	/	(120)	
			Increase or reduce growth rate in iron deplete condition		/		
PptA : a phosphopantetheinyl transferase (P-pant)	<i>ΔpptA</i>	Af A1160 <i>ΔKu80</i> pyrG ⁺	No production of secondary metabolites	Avirulent	Avirulent	(118)	
PcaA : PIB-type cation ATPase which links metal homeostasis and heavy metal tolerance	<i>ΔpcaA</i>	Af293	Reduce growth rate in presence of cadmium sulfate	Decreased	/	(122)	
			No difference in growth rate in presence of copper, iron, silver & zinc sulfate				
	<i>OEpcA</i>	Af293	Increase growth rate in presence of cadmium sulfate	No change	/		
Siroheme : heme-like group used for sulfate and nitrate assimilation; met8 : gene encoding the bifunctional dehydrogenase/ferrochelataze enzyme Met8	<i>Δmet8</i>	AfS77	Role on growth rate & stress response	Decreased	/	(125)	

The analysis of the effect of virulence factors is based on the comparison of virulence of a wild strain with that of mutants obtained by gene deletion.

Increased: increased pathogenicity relative to wild strain; Decreased: decreased pathogenicity relative to wild strain;

No change: no change in the pathogenicity relative to wild strain; Avirulent: no pathogenicity with the mutant

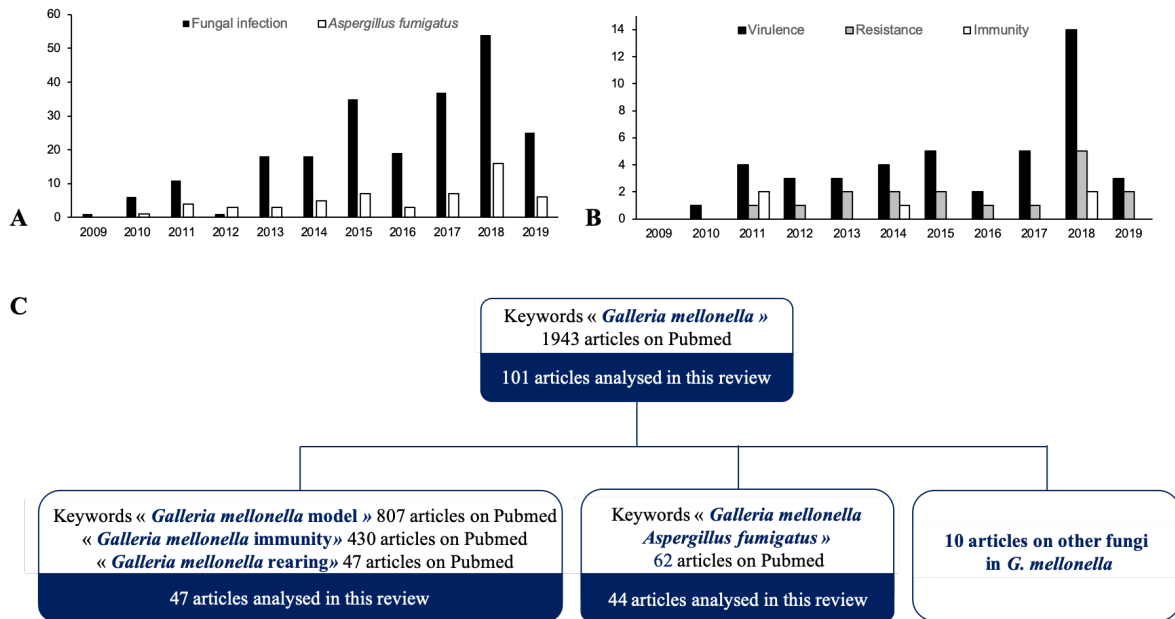


Figure 3: Publications mentioning *A. fumigatus* and *G. mellonella* on Pubmed (A) Evolution of the number of publications on *A. fumigatus* and *G. mellonella* over the period 2009-2019; (B) Details of the publication on *A. fumigatus*'s studies with virulence, resistance to antifungal in *G. mellonella*; (C) number of articles in the literature (Pubmed) and in the review on the *G. mellonella* model

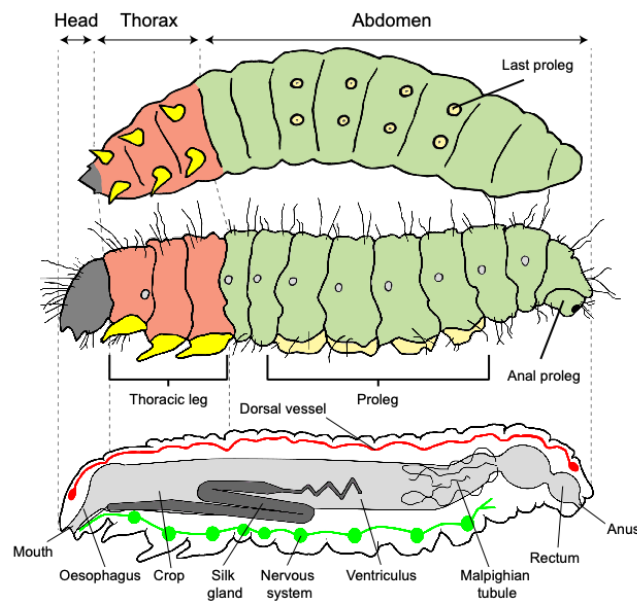


Figure 4: Anatomy of a larva of *Galleria mellonella* (adapted from Singkum *et al.*, 2018 (135) and Engel and Moran, 2013 (136))

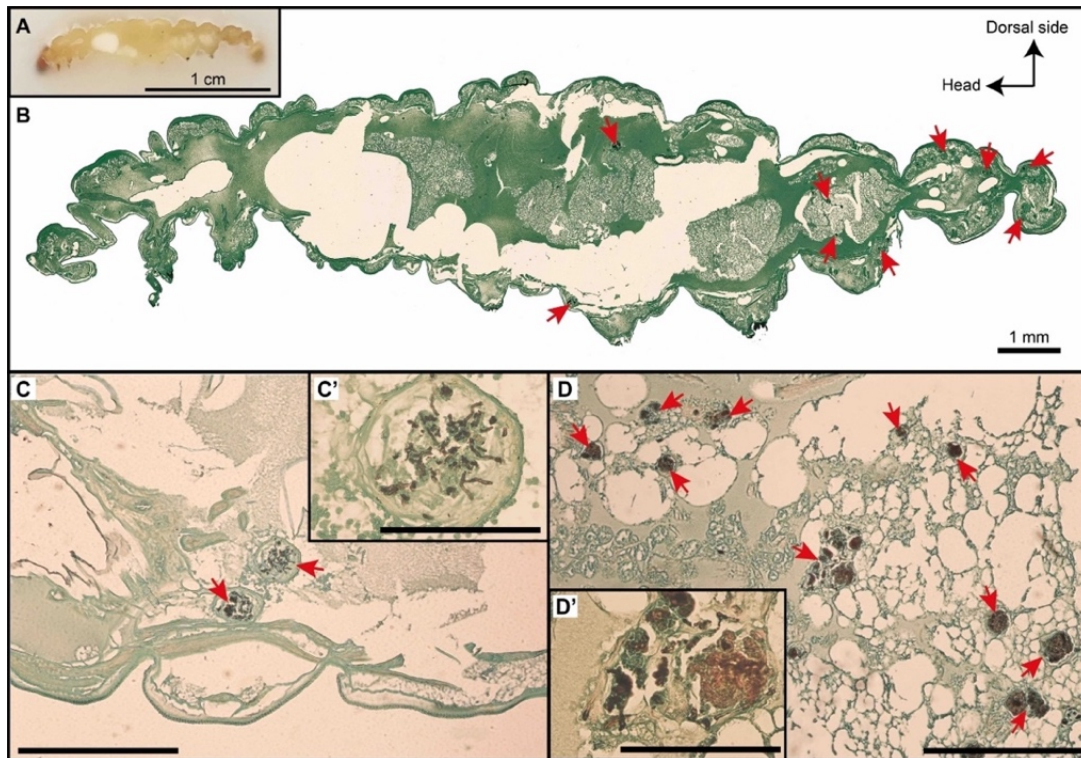


Figure 5: Histological analysis of *A. fumigatus* infection in *G. mellonella*

Sagittal section of *G. mellonella* infected with *A. fumigatus*. (A) Larvae fixed in paraffin; (B) Gomori Grocott stain; (C) *A. fumigatus* nodules after 3 days of infection (10^5 conidia/larva); (D) *A. fumigatus* nodules after 7 days of infection (10^6 conidia/larva)

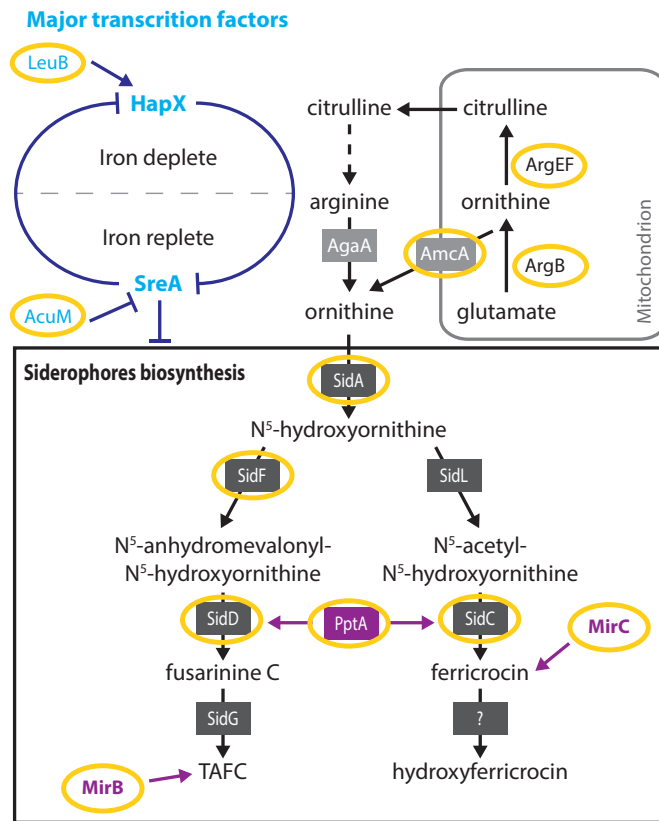


Figure 6: Iron metabolism of *A. fumigatus* studied in *G. mellonella* (adapted from Haas *et al.*, 2012)
 Yellow circles: steps of iron metabolism of *A. fumigatus* studied in *G. mellonella*

III. Utilisation du modèle *G. mellonella* pour l'étude de *S. maltophilia* *in vivo*

La présence en augmentation de *S. maltophilia* dans les infections respiratoires, associée à sa multi-résistance aux antimicrobiens est un défi pour les cliniciens et microbiologistes. Pourtant connu pour avoir une faible virulence, *S. maltophilia* prend largement part aux infections nosocomiales des services de réanimation et aux infections des patients, notamment atteints de mucoviscidose (Figure 5). Elle est devenue l'une des bactéries isolées le plus couramment dans leurs voies respiratoires de ces patients avec un pronostic souvent défavorable et une mortalité élevée (137). Dans ces cas, le pronostic est souvent défavorable avec une mortalité élevée. Avec la découverte de nouvelles molécules pouvant être impliquées dans la virulence de *S. maltophilia*, les mécanismes de pathogénicité sont aujourd'hui mieux connus et permettent ainsi d'imaginer de nouvelles cibles thérapeutiques.

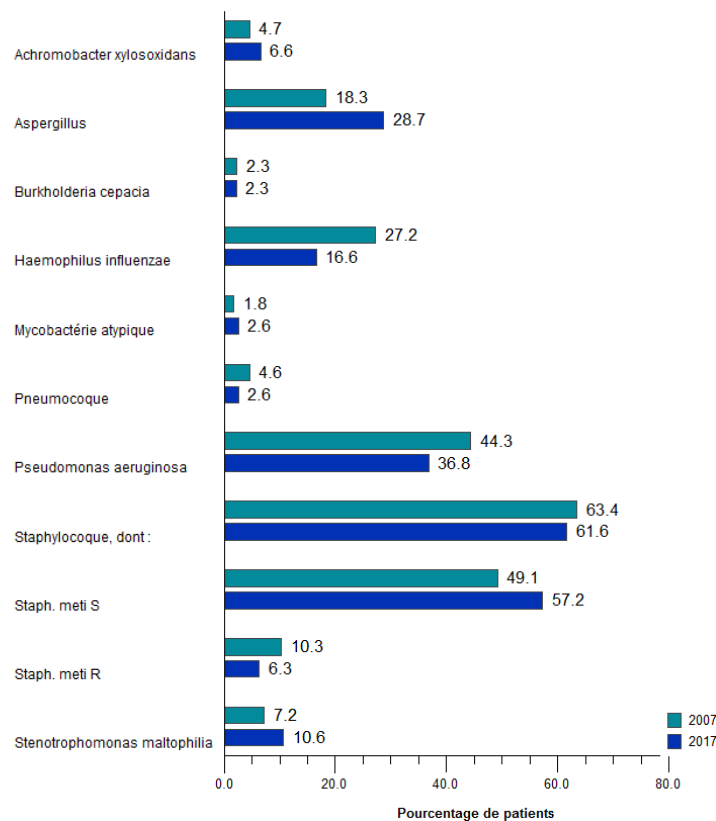


Figure 7 : Pathogènes impliqués dans les infections des patients atteints de mucoviscidose - Registre français de la mucoviscidose - Bilan des données 2017

Dans ce contexte, le modèle *G. mellonella* a été utilisé pour mieux comprendre les interactions hôte-bactéries à Gram négatif (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Francisella tularensis*, *Acinetobacter baumannii*...) (44). Concernant l'étude de *S. maltophilia* dans *G. mellonella*, moins d'une dizaine d'articles sont à

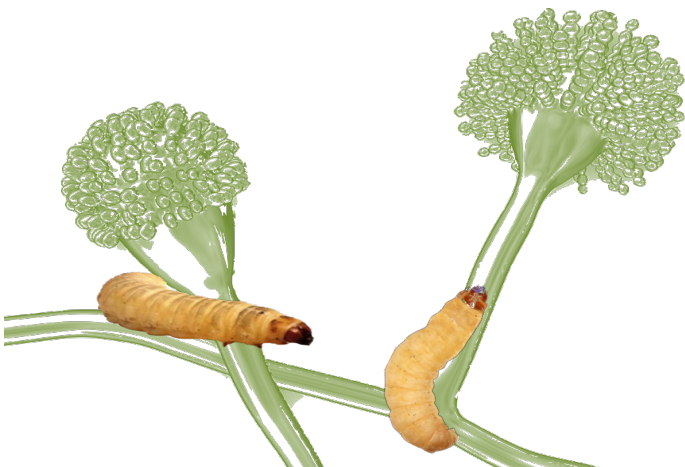
ce jour disponibles dans la littérature. Elles concernent principalement la recherche de l'efficacité de combinaisons d'antibactériens (138), de la recherche de déterminants de la pathogénicité (31, 141–143) ou encore l'étude du fer dans la virulence et la formation du biofilm (142). Par exemple, An et Tang ont démontré que la disruption du gène *rpfF* entraîne une perte de virulence de la souche mutée de *S. maltophilia*, montrant ainsi son effet sur plusieurs fonctions de la bactérie (formation du biofilm, virulence, motilité de la bactérie) (143). Ces quelques données ont permis d'analyser plusieurs facteurs de virulence de la bactérie, mais tous les mécanismes ne sont pas encore élucidés. Les principaux facteurs de virulence seraient des exo polysaccharides et des lipopolysaccharides, des sidérophores, des lipases et protéases (30) mais aussi le biofilm (137) avec un rôle majeur dans la résistance aux antimicrobiens (21, 139). Les protocoles utilisés pour l'étude de *S. maltophilia* dans le modèle *G. mellonella* sont résumés dans la Table 4.

Tableau 4 : Comparaison des protocoles utilisés pour l'étude de *S. maltophilia* dans le modèle *G. mellonella*

Ref.	Critères de sélection des larves	Nombre de larves/groupe	Infection dans l'hémocèle	Inoculum UFC/larve	Maintenance des larves		Monitoring (durée de l'expérience)
					Avant infection	Après infection	
(141, 142, 144)	250–350mg cuticule de couleur crème	12	10µL Utilisation d'une seringue Hamilton de 20µl	10 ⁴ , 10 ⁵ , et 10 ⁶	/	30°C	96h Quotidienne
(143, 145)	/	10	10µL	1x10 ⁶	Conservation à 4°C dans des copeaux de bois	37°C	24h
(30)	/	10	/	Jusqu'à 1x10 ⁷	30 °C à l'obscurité	37°C	72h Quotidienne
(1)	200-300mg cuticule de couleur crème	10	10µL	1x10 ⁷ -1x10 ⁹	24H 37°C à l'obscurité	37°C à l'obscurité	7 days Quotidienne

A notre connaissance, il n'existe pas d'autres d'articles analysant la virulence entre souches cliniques et environnementales de *S. maltophilia*, comme nous l'avons vu pour *A. fumigatus*. Seul l'article de Melloul *et al.* provenant de l'équipe de mon master 2 a étudié la virulence de *S. maltophilia* en association avec *A. fumigatus*, démontrant pour la première fois que la co-inoculation entre souches de référence d'origine clinique (SmATCC 13637 et Af13073) avait un effet synergique sur la mortalité des larves, contrairement à une co-inoculation avec des souches d'origine animale et environnementale (1).

PARTIE II - Exemple d'utilisation du modèle *G. mellonella* pour l'étude d'*A. fumigatus* : mise au point d'un modèle *in vivo* mixte *A. fumigatus* – *S. maltophilia* dans *G. mellonella*



I. Introduction

Avec ses avantages, *G. mellonella* s'est imposé comme modèle alternatif pour l'étude d'agents pathogènes et a déjà permis d'approfondir nos connaissances sur les bactéries et champignons fréquemment impliqués en pathologie humaine. En tout, plus d'une trentaine de champignons et de bactéries d'intérêt médical ont été étudiés au sein de ce modèle (40). Avec la revue des différentes utilisations de *G. mellonella* pour *A. fumigatus* (cf. Chapitre 1), il apparaît que ce modèle est un outil de screening intéressant et avantageux. Il a largement contribué à explorer les facteurs de virulence et les voies métaboliques de ce champignon opportuniste. Pour *S. maltophilia*, sa participation semble plus modeste mais tout aussi pertinente, malgré le peu d'articles disponibles dans la littérature (31, 141–145).

Comme vu précédemment, *A. fumigatus* et *S. maltophilia* colonisent le plus souvent les voies respiratoires de l'Homme sous forme de biofilm, et non sous forme planctonique (libres dans leur environnement). Le biofilm correspond à une organisation particulière des microorganismes (seuls ou en association) adhérant à une surface biotique ou abiotique. Ces microorganismes sont enchâssés dans une MEC autoproduite qui les protègent des agressions extérieures, telles que les défenses immunitaires de l'hôte ou les antimicrobiens (144). Depuis quelques années, ces biofilms dans le milieu médical sont devenus une entité importante (145) et ils représentent actuellement la forme privilégiée du mode de vie des microorganismes chez l'homme. Nos deux microorganismes d'intérêt, *A. fumigatus* et *S. maltophilia*, sont capables de former des biofilms seuls *in vitro* et *in vivo* mais très peu d'études les analysent sous forme de biofilm ensemble (146) (147). Finalement peu d'équipes ont élaboré des modèles *in vivo* d'interaction entre pathogène de règnes différents. Seuls deux exemples sont trouvés dans la littérature : (i) le modèle alternatif *C. elegans* utilisé pour tester une co-inoculation entre la bactérie *Acinetobacter baumannii* et la levure *C. albicans* (148), ou encore (ii) une co-inoculation entre la bactérie *P. aeruginosa* et la levure *C. albicans* dans un modèle poisson zèbre (*Danio rerio*) (149). De la même façon, les biofilms poly-espèces sont encore peu étudiés et encore moins des biofilms mélangeant des microorganismes de règnes différents comme les biofilms champignon-bactérie. Les publications sur des biofilms poly-espèces de règne différent avec *A. fumigatus* font surtout état de biofilms *in vitro* entre *A. fumigatus* et des bactéries Gram négatif (150) (151) (152).

Au sein du laboratoire de l'EA 7380 à la faculté de médecine de Créteil, un modèle de biofilm mixte *in vitro* d'*A. fumigatus* et de *S. maltophilia* a été développé sur support abiotique (153) avec deux souches cliniques de référence (Af ATCC 13073 et Sm ATCC 13637). Il a été

montré, grâce à ce modèle, que la bactérie avait un effet d'antibiose sur le champignon empêchant la pousse normale d'*A. fumigatus*. Par ailleurs, l'effet de différentes souches cliniques, animales et environnementales d'*A. fumigatus* et de *S. maltophilia* sur la formation du biofilm mixte a été évalué *in vitro*. *In vivo*, la faisabilité de produire un biofilm mono- ou poly-espèces est encore rarement étudiée (21) et la pathogénicité de ces agents infectieux en association *in vivo*, soit en biofilm, soit en planctonique, n'a pas encore été démontrée. Dans ce contexte, il semblait pertinent de mettre en place des expérimentations rassemblant ces deux pathogènes *in vivo* pour la première fois dans le modèle *G. mellonella*.

L'objectif de la deuxième partie de mon travail était donc de proposer la mise au point d'un mini-modèle d'infection mixte entre *A. fumigatus* et *S. maltophilia*. Tous les éléments nécessaires au développement d'un élevage de l'invertébré *G. mellonella* ont été mis en place au laboratoire Dynamyc. Les protocoles d'inoculation de *S. maltophilia* à *G. mellonella* décrits par différents auteurs ne présentaient que peu de variations. Notre équipe a donc utilisé le protocole le plus utilisé dans la littérature (141). Pour l'inoculation d'*A. fumigatus*, les protocoles étaient beaucoup plus nombreux et présentaient parfois des variations majeures. L'équipe a donc choisi le protocole le plus utilisé, modifiant quelques données pour s'adapter aux conditions locales du laboratoire et de l'élevage mis en place. Nous avons choisi d'utiliser 6 souches d'*A. fumigatus* et de *S. maltophilia* d'origines différentes (humaine, animale, environnementale) pour cette étude.

Pour arriver à notre objectif, nous avons d'abord caractérisé (i) la croissance et la capacité des 6 souches de *S. maltophilia* et d'*A. fumigatus* *in vitro* à former du biofilm (ii) leur pathogénicité *in vivo* dans le mini-modèle *G. mellonella*. Cette caractérisation a permis de choisir dans un second temps les meilleures associations de *S. maltophilia* et d'*A. fumigatus* pour les tester en co-inoculation *in vivo*. Pour valider le modèle, nous avons choisi de mettre en évidence *A. fumigatus* et *S. maltophilia* au sein de la larve grâce à l'histologie et la microscopie confocale.

II. Matériels et méthodes

II.1. Description des souches utilisées

Différentes souches d'*A. fumigatus* et de *S. maltophilia*, disponibles au laboratoire, ont été testées. Elles sont parfaitement caractérisées, tant sur le plan de leur sensibilité *in vitro* aux antimicrobiens, que sur le plan moléculaire. La souche de référence d'*A. fumigatus* utilisée est la souche ATCC 13073 (Af 13073) génétiquement modifiée pour exprimer la Green Fluorescent Protein (GFP). La souche de référence de *S. maltophilia* utilisée est la souche ATCC 13637 (Sm 13637). Il s'agit de souches cliniques issues de prélèvements pulmonaires de patients atteints de mucoviscidose. Les origines des autres souches utilisées sont résumées dans le Tableau 5. Les souches fongiques sont repiquées sur un milieu malt gélosé pendant 5 jours et les souches bactériennes sur un milieu LB gélosé pendant 48 h puis dans un milieu LB liquide pendant 14 h sous agitation (180-200 rpm) avant les expérimentations.

Tableau 5 : Nom et origine des souches d'*A. fumigatus* et de *S. maltophilia*

ESPECES	IDENTIFIANT	CULTURE	ORIGINE	EXPERIMENTATION
	ATCC 13073 GFP	37°C	Clinique (souche de référence modifiée GFP)	Humaine
<i>Aspergillus fumigatus</i>	H1	37°C	Hôpital intercommunal de Créteil (poumon)	Humaine
	A1	37°C	Clinique faune sauvage (EnvA) RADAR-VET	Animale
	A3	37°C	Canard musqué (poumon) (RADAR-VET)	Animale
	E1	37°C	Sol, compost (terreau "la Florentine" du magasin Laurent)	Environnement
	E2	37°C	Sol, parterre de fleurs (Hautes-Alpes)	Environnement
	CBS144.89 DsRed	37°C	Clinique (souche de référence modifié DsRed)	Humaine
	ATCC 13637	37°C	Clinique (souche de référence)	Humaine
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	H3	37°C	Expectoration mucoviscidose	Humaine
	E1	25°C	Endoscope	Environnement
	E2	25°C	Gastroscope	Environnement
	A2	25°C	Cheval (trachée)	Animale
	A6	37°C	Cheval (trachée)	Animale

Les souches soulignées en gris sont les souches de référence utilisées pour la mise au point du modèle (Melloul *et al.*, 2016). Elles ont servi de référence également dans notre étude.

II.1.1. Analyse *in vitro* des souches d'*A. fumigatus* et de *S. maltophilia*

II.1.1.1. Test de germination des souches d'*A. fumigatus*

Les conidies d'*A. fumigatus* sont récupérées par lavage avec du PBS + Tween 0,1 % (PBST) puis centrifugées pendant 15 min à 2500 rpm. Elles sont ensuite remises en suspension dans 1 mL de PBST et comptées au microscope à l'aide d'une cellule de Kova. La solution est ajustée à une concentration finale de 10^6 conidies/mL. Un volume de 3 μ L est ensuite inoculé au centre d'une lame de microscopie (Thermo Scientific SuperFrost Plus) sur laquelle 3 mL de malt agar

sont déposés au préalable. Les lames sont ensuite incubées à 37°C dans une chambre humide pendant 4 h, puis les conidies sont analysées toutes les heures (jusqu'à 9 h post-inoculation) au microscope (objectif x 40) pour déterminer le nombre de conidies germées par rapport au nombre de conidies totales (Figure 8). Cette expérience a été réalisée 3 fois de façon indépendante.

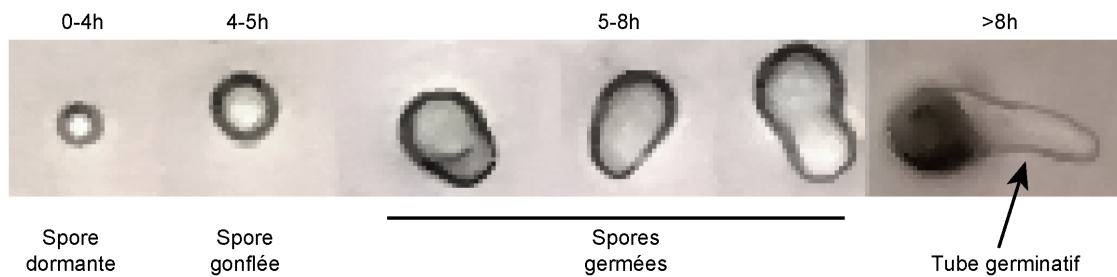


Figure 8 : Différents stades de germination des conidies d'*A. fumigatus* observées au microscope (objectif x40)

II.1.1.2. Étude de la croissance des souches de *S. maltophilia* sous forme planctonique

Une colonie des différentes souches de *S. maltophilia* est mise en pré-culture dans 10 mL de LB liquide sous agitation à 37°C pendant 14 h, puis centrifugés 15 min à 2500 rpm. Le culot est remis en suspension dans une goutte d'eau stérile et la solution est ajustée à l'aide d'un densitomètre (Densimat®, bioMérieux, France) à 0,5 McFarland soit environ 10^8 UFC/mL. Un millilitre de cette solution est ensuite ensemencé dans 14 mL de LB liquide pendant 24 h sous agitation à 37°C. Une partie de cette culture est prélevée puis analysée au spectrophotomètre afin de lire la densité optique à 600 nm et d'évaluer la croissance bactérienne. Cette expérience a été réalisée 3 fois de façon indépendante.

II.1.2. Analyse *in vitro* de biofilms simples d'*A. fumigatus* et de *S. maltophilia*

II.1.2.1. Réalisation des inocula d'*A. fumigatus*

Une suspension d'*A. fumigatus* est réalisée comme précédemment (cf II.1.1.1.). L'*inoculum* obtenu dans du PBS après comptage sur cellule de Kova est ajusté à la concentration finale de 10^5 conidies/mL par dilutions sérielles dans du RPMI 1X + 10 % de Sérum de Veau Fœtal (SVF, Sigma-Aldrich, France).

II.1.2.2. Réalisation des inocula de *S. maltophilia*

Une suspension de *S. maltophilia* est réalisée comme précédemment (cf II.1.1.2.). L'inoculum obtenu à 0,5 McFarland dans de l'eau est dilué dans du RPMI + 10 % de SVF pour obtenir une concentration finale d'environ 10^6 UFC/mL.

II.1.2.3. Formation des biofilms simples

Les biofilms simples sont réalisés sur un support en polystyrène en plaque 96 puits à fond plat stériles (Thermo Fisher Scientific, France). Cent microlitres de la suspension bactérienne ou fongique sont inoculés dans 100 μ L de RPMI + 10 % SVF. Les plaques sont ensuite incubées à 37°C en condition statique pendant 24 h. Les cellules non adhérentes sont éliminées par deux lavages successifs avec du PBS avant analyse.

II.1.2.4. Analyse des biofilms par la coloration au cristal violet

La formation de biofilm est analysée après coloration au cristal violet (CV). Après lavages des biofilms, 250 μ L de CV à 0,01 % (*A. fumigatus*) ou 0,1 % (*S. maltophilia*) sont ajoutés dans les puits (Figure 9). Le CV va se fixer aux micro-organismes (MO) et à la MEC. Les puits sont ensuite lavés 3 à 4 fois avec du PBS pour enlever le CV résiduel. Puis le CV qui correspond à la biomasse de notre biofilm (piégé dans les MO et la MEC) est dissout avec l'ajout de 250 μ L d'acide acétique pendant 10 min avec une faible agitation (80 rpm). L'absorbance (densité optique) est déterminée par lecture au spectrophotomètre à 550 nm afin d'estimer la biomasse des biofilms. La moyenne des valeurs de densités optiques (DO) obtenues pour le contrôle négatif (puits avec RPMI + SVF uniquement) est soustraite aux valeurs de DO obtenues pour les puits contenant les biofilms.

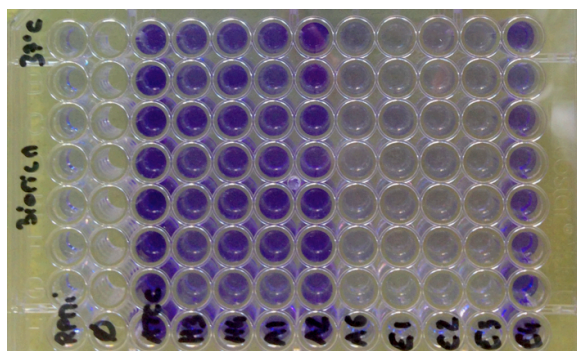


Figure 9 : Plaque 96 puits pour analyse au cristal violet des biofilms des souches de *S. maltophilia*

II.1.3. Modèle *in vivo* *Galleria mellonella*

II.1.3.1. Cadre réglementaire et éthique

Ce modèle animal invertébré n'est pas soumis à réglementation.

II.1.3.2. Préparation des larves

Les larves de *G. mellonella* sont achetées en animalerie (La ferme tropicale, 75013 Paris) et proviennent du fournisseur KRECA (Proti-Farm®, Pays-Bas). Elles sont triées et extraites du milieu de conditionnement du fournisseur. La sélection des larves pour les expérimentations se fait selon les critères suivants : mobilité spontanée avec capacité de retournement immédiate, poids compris entre 200 et 300 mg, et couleur homogène sur l'ensemble de la cuticule. Des groupes de dix larves sont préparés à l'avance et mis à 37°C pendant 24 h sans nourriture avant le début de l'expérience. Les larves ne respectant pas ces critères sont mises en bocaux avec de la nourriture pour atteindre le stade nécessaire, ou utilisées pour l'élevage et la reproduction.

II.1.3.3. Cycle de vie et élevage de *Galleria mellonella*

Afin de pallier les désavantages de l'achat de larve venant d'un fournisseur extérieur, une méthode d'élevage de larve au laboratoire a été adaptée du protocole décrit par Jorjão *et al.* (59). Pour mettre en place l'élevage, des boîtes de larves sont achetées en animalerie (La Ferme Tropicale, 75013 Paris). Elles se composent de larves de taille et d'âge différents dans un « support nutritif » dont la composition fournisseur n'est pas connue (Figure 10A). Le premier travail consiste à séparer les larves de ce support nutritif, parfois sec et abimé, et à les trier en fonction de leur poids ou stade (poids < 0,100 g, poids entre 0,100 g et 0,200 g, poids entre 0,200 et 0,300g et groupe stade chrysalide). Les larves comprises entre 0,200 g et 0,300 g sont mises de côté pour être utilisées lors des expérimentations (Figure 10B, 10C, et 10D). Une fois triées, les larves sont séparées dans des bocaux en verre préalablement stérilisés pour éviter les contaminations, dans un milieu leur servant à la fois de litière et de nourriture. Celui-ci est préparé directement au laboratoire à partir d'ingrédients achetés en supermarché (pain d'épice, miel liquide, levure maltée, son d'avoine, lait en poudre, farine de blé et semoule de maïs), qui sont mélangés afin de former une mixture qui s'émiette facilement. Les bocaux sont fermés par un grillage en fibre de verre doublé pour éviter l'évasion de larve. Le milieu est changé en totalité une fois par semaine, et les larves triées à nouveau par poids et stade. Les larves se transformant progressivement en chrysalide dans leur cocon, il n'est pas rare de trouver alors différents stades dans le même bocal (Figure 10E). Les chrysalides (Figure 10F) sont mises

dans des bocaux séparés sans nourriture pour leur transformation en papillons et leur accouplement. Une fois transformées en papillon, une coupelle remplie d'eau sucrée est mise dans le bocal, et celui-ci est fermé par un carré de voile de coton où les femelles vont pondre leurs œufs en très grande quantité (Figures 10G et 10H). Ils sont ensuite récupérés très délicatement à l'aide d'une lame de scalpel sur le voile de coton et placé dans du milieu nutritif dans un nouveau bocal. L'éclosion des œufs se fait en quelques jours avec des larves d'à peine 1 ou 2 millimètres. Du milieu frais est ajouté en petite quantité toutes les semaines sans le renouveler complètement pour éviter d'enlever des petites larves par inadvertance jusqu'à ce qu'elles atteignent une taille suffisante pour être triées. Toutes les étapes de développement de *G. mellonella* se font dans l'obscurité, sur une étagère à température ambiante fermée par un rideau noir (Figure 10I), et sont résumées dans la Figure 11.



Figure 10 : Élevage de *G. mellonella* au laboratoire Dynamyc

(A) Boîte de larve de la marque Kreca dans leur support nutritif lors de l'achat (source <https://www.lftshop.com/teignes-de-ruche,fr,4,TEI.cfm>) ; (B) Tête de larve au dernier stade de développement observée au stéréomicroscope ; (C) Larves triées par groupe de poids dans leur nouveau milieu de conservation ; (D) Larves au dernier stade de développement et cocons ; (E) Bocal avec des larves en cocon en cours de transformation en chrysalides ; (F) Chrysalides ; (G) Papillons ; (H) Œufs sur leur voile de coton ; (I) Étagère servant à l'élevage ; (J) Exemple de pesée de larve (Photographies B à J personnelles).



Figure 11 : Cycle de vie et d'élevage de *G. mellonella*
(Photographies personnelles)

II.1.4. Analyse *in vivo* de la pathogénicité des souches

Chaque souche d'*A. fumigatus* et de *S. maltophilia* a été testée deux fois *in vivo* dans *G. mellonella* lors d'expérimentations indépendantes. Les co-inoculations ont été réalisées trois fois pour les souches Af 13073 + Sm 13637/A2/E1 et une seule fois pour les souches Af 13073 + Sm H3/A6/E2.

II.1.4.1. Préparation des inocula d'*A. fumigatus*

Les suspensions d'*A. fumigatus* sont réalisées comme précédemment (cf. II.1.1.1.). La concentration est ajustée aux concentrations désirées par dilutions sérielles dans du PBST 0,01 % (10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 conidies/mL).

II.1.4.2. Préparation des inocula de *S. maltophilia*

Pour réaliser les *inocula* des différentes souches de *S. maltophilia*, la culture de nuit en milieu liquide est incubée aux températures optimales de croissance de chaque souche (25 ou 37°C), puis centrifugée 20 min à 3000 rpm. Le culot est lavé dans du PBS avant comptage au densitomètre, puis la suspension bactérienne est ajustée à différentes concentrations dans du PBS (10^9 , 10^8 , 10^7 , 10^6 UFC/mL).

II.1.4.3. Préparation de la co-inoculation de *S. maltophilia* et d'*A. fumigatus*

Des suspensions de *S. maltophilia* et d'*A. fumigatus* sont réalisées selon les protocoles décrits précédemment (II.1.4.1, II.1.4.2). Une solution contenant un mélange racémique de *S. maltophilia* et d'*A. fumigatus* (1vol/1vol) est réalisée pour constituer l'inoculum à injecter aux larves.

II.1.4.4. Infection des larves

Les larves sont facilement infectées par injection des pathogènes dans l'hémocèle au niveau de la dernière pseudo-patte gauche. Celle-ci est maintenue ouverte en imprimant une légère pression latérale, ouverture qui se referme après retrait de l'aiguille sans traumatisme. L'injection se fait grâce à une seringue à insuline de 0,5 mL (BD Micro-Fine®, 0,30 mm x 8 mm). Dix microlitres d'*inoculum* d'*A. fumigatus* (cf. II.1.4.1) ou *S. maltophilia* (cf. II.1.4.2) à la concentration désirée sont inoculés aux larves ou 20 µL pour la co-inoculation Af + Sm (cf. II.1.4.3). Les larves sont ensuite incubées à 37°C dans une boîte de Pétri sans nourriture pendant 7 jours. Pour chaque série d'expérience, deux groupes contrôles sont utilisés : un groupe de larves non inoculées et un groupe de larves injectées avec du PBS stérile ou du PBST 0,01 % pour s'assurer de l'innocuité de l'injection.

II.1.4.5. Suivi de la survie des larves

La survie des larves est évaluée sur une période de sept jours, selon un score de vitalité des larves (Tableau 6 et Figure 12) mis au point au laboratoire. Ce score est établi sur l'ensemble des critères suivants : mélanisation, présence d'un cocon, et mobilité de la larve qui prend en compte deux composantes : le retournement instantané de la larve une fois mise sur le dos et

un déplacement franc et rapide. Pour l'analyse des résultats, l'inverse de ce score a été utilisé pour déterminer un taux de morbidité.

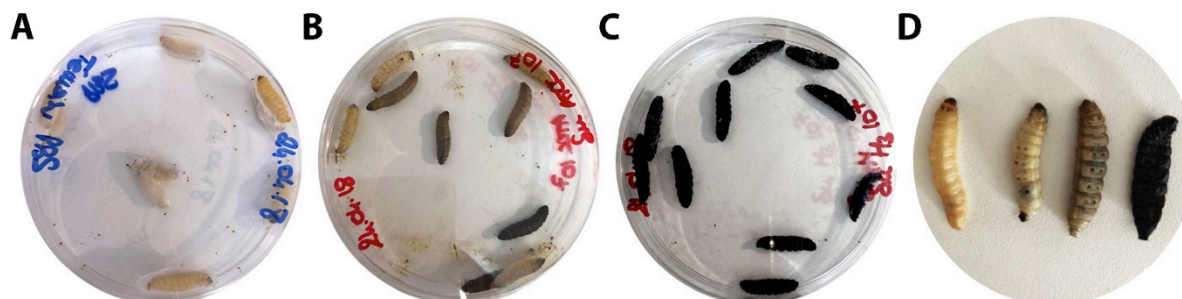


Figure 12 : Analyse de la survie des larves

(A) Groupe de larves vivantes ; (B) Groupe de larves alliant index de vitalité haut et bas ; (C) Groupe de larves mortes ; (D) Différents stades de mélanisation durant l'infection (Source : photographies personnelles)

Tableau 6 : Score de vitalité des larves de *G. mellonella*
modifié d'après Loh *et al.* (131)

CATEGORIES	DESCRIPTION	SCORE
Mobilité de la larve	Absence de retournement	0
	Absence de mouvement spontané	1
	Absence de retournement	
	Mouvement spontané faible	2
	Retournement spontanée plus lent ou difficile	
	Déplacement lent et difficile	
	Retournement spontané immédiat	3
Larve avec déplacement normal		
Cocon	Absence de cocon	0
	Présence de cocon	1
Mélanisation	Présence de mélanisation	0
	Absence de mélanisation	1
Survie	Larve morte	0
	Larve vivante	1
Score de vitalité maximum		6
Indice de morbidité = score maximum - score de vitalité		

II.1.5. Analyse des micro-organismes au sein des larves

II.1.5.1. Recherche de la présence des micro-organismes au sein de la larve en microscopie optique et confocale

Pour rechercher *S. maltophilia* et *A. fumigatus* dans les larves après infection, l'hémocèle des larves est récupérée selon le protocole suivant (84) : les larves euthanasiées à -20°C sont découpées au niveau de leur partie supérieure et l'hémocèle est étalée en frottis épais sur une

lame. Une coloration de Gram (microscopie optique) ou une fixation au Mowiol (microscopie confocale) est ensuite réalisée sur les lames. Les structures fongiques de la souche Af CBS 144.89 sont visualisées en microscopie confocale directement grâce à l'expression de la protéine DsRed (visualisée en rouge) au grossissement x 400 et x 630. L'observation des *S. maltophilia* a été recherchée en contraste de phase en microscopie confocale ou après une coloration de Gram au microscope optique à un grossissement x1000. Toutes les observations ont été faites avec un microscope Zeiss LSM 510 META de la plate-forme de l'IMRB. Les images obtenues ont ensuite été traitées avec le logiciel ImageJ (version 1.47).

II.1.5.2. Mise en évidence de l'infection fongique et bactérienne au sein de la larve par histologie

Des larves ont été infectées avec des concentrations de 10^6 UFC/larve pour *S. maltophilia* et de 10^5 conidies/larve pour *A. fumigatus* et incubées à 37°C, puis euthanasiées de J1 à J7 post-inoculation. La fixation des larves a été réalisée par injection de formol 4 % en différents endroits de la larve (entre 100-200 μ L selon la taille de la larve) et conservées à 4°C jusqu'à l'inclusion en paraffine, selon la technique du laboratoire (37). Des coupes sagittales sont ensuite réalisées et colorées au Gomori-Grocott dans le service d'anatomopathologie du Centre Hospitalier Universitaire Henry Mondor. Les lames sont observées en microscopie optique et l'assemblage des images obtenues grâce aux logiciels ImageJ (version 1.47) et Adobe Photoshop CS6.

II.1.6. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont toutes été réalisées grâce au logiciel JMP® version 13.0. Une valeur $p < 0,05$ était considérée comme significative. Les courbes de survie ont été réalisées par la méthode de Kaplan-Meier et comparées entre elles par le test de log-rang. Pour les comparaisons de moyennes entre groupes (entre souches, entre origines), des tests non paramétriques ont été utilisés (Wilcoxon). Le test MANOVA a été utilisé pour l'analyse et la comparaison des taux de germination au cours du temps.

III. Résultats

III.1. Caractérisation *in vitro* et *in vivo* des souches d'*A. fumigatus*

III.1.1. Analyse *in vitro* des souches d'*A. fumigatus* de différentes origines

Afin de caractériser nos différentes souches d'*A. fumigatus*, nous avons mesuré le taux de germination des conidies sur un milieu standard malt (Figure 13A). Celui-ci croît avec le temps (entre 4 et 9 h). Une souche d'origine animale, Af A1, germe un peu plus lentement que les autres souches (70 % de germination à 9 h post-inoculation pour Af A1 contre 95 % pour Af A3). La souche de référence modifiée (Af 13073-GFP) a un taux de germination légèrement plus lent que les souches animales et humaines Af H1, Af H2, et Af A3 (85 % de germination à 9 h post-inoculation). Les deux souches environnementales Af E1 et Af E2 sont semblables (85-90 % de germination à 9 h). On ne distingue pas de lien significatif entre le taux de germination et l'origine des souches (Manova, $p > 0,05$).

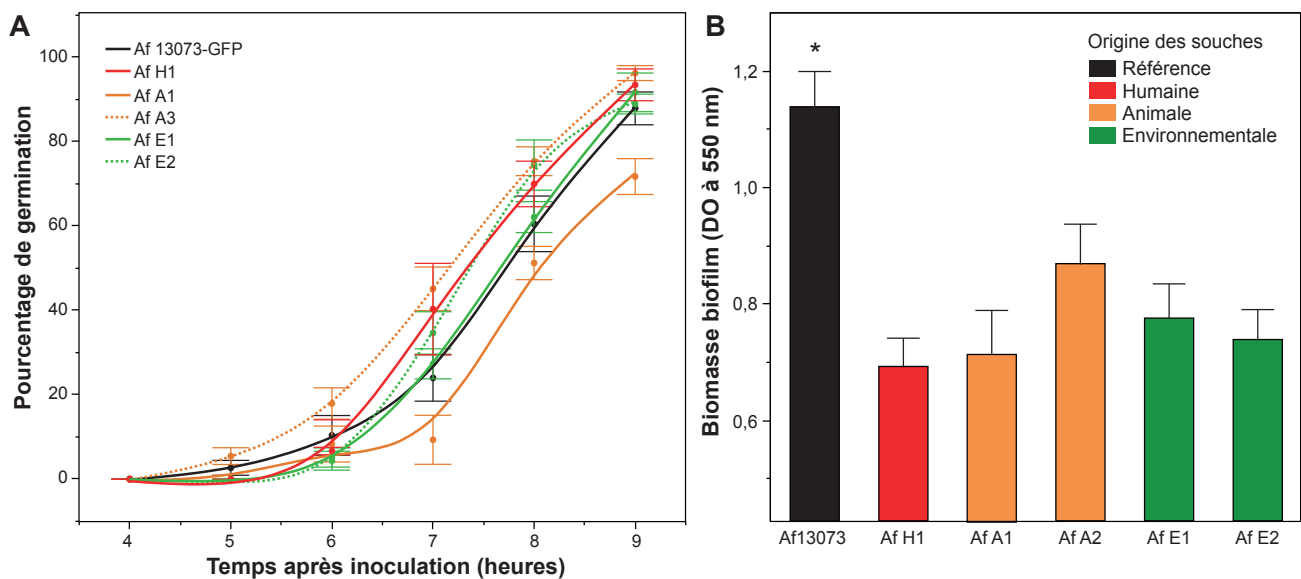


Figure 10 : Taux de germination des souches d'*A. fumigatus* d'origine humaine, animale et environnementale (A), et formation de biofilm après 24 h à 37°C (B).

* représente une valeur de $p < 0,05$

Le deuxième graphique (Figure 13B) montre l'évaluation de la formation de biofilm par ces différentes souches. Après 24 h de culture dans une plaque 96 puits incubée à 37°C en condition statique, celui-ci va adhérer aux parois des micro-organismes ainsi qu'à la MEC. Il existe une variabilité non significative dans la capacité à former du biofilm au sein d'une même

origine, ainsi qu'entre les souches animales, humaines et environnementales. Seule la souche clinique de référence modifiée Af 13073-GFP forme plus de biofilm que toutes les autres souches testées, de façon significative, après 24 h (Wilcoxon pour chaque paire avec $p < 0,05$).

III.1.2. Analyse *in vivo* des souches d'*A. fumigatus*

III.1.3. Détermination de la concentration d'intérêt d'*A. fumigatus*

Une expérience préliminaire a été réalisée pour déterminer la concentration optimale pour analyser par la suite la pathogénicité des différentes souches. Pour cela, différentes concentrations d'Af 13073-GFP ont été inoculées à des larves, puis la survie a été suivie sur 7 jours. Cette expérience a été répliquée 2 fois.

A la fin des 7 jours post-inoculation, les deux groupes témoins (non-infecté et inoculé PBST) présentent une survie de 100 %. En revanche, les larves infectées avec Af 13073-GFP présentent une morbidité et une mortalité variable en fonction des *inocula* (Figure 14A). A la concentration la plus faible (10^4 conidies/larve), le taux de survie avoisine les 100 %, puis l'augmentation progressive de la concentration en conidies d'*A. fumigatus* induit une augmentation progressive de la mortalité, jusqu'à 100 % pour 10^7 conidies/larve injectées. La pathogénicité d'Af 13073-GFP est dose-dépendante. L'effet dose-réponse a été calculé à l'aide d'une courbe de régression non linéaire, selon le modèle dose-réponse sigmoïde (Figure 14B). La dose létale 90 % (DL90), correspondant à 90 % de mortalité à J7 post-inoculation est d'environ 10^6 conidies/larve et la DL10 de 10^4 conidies/larve.

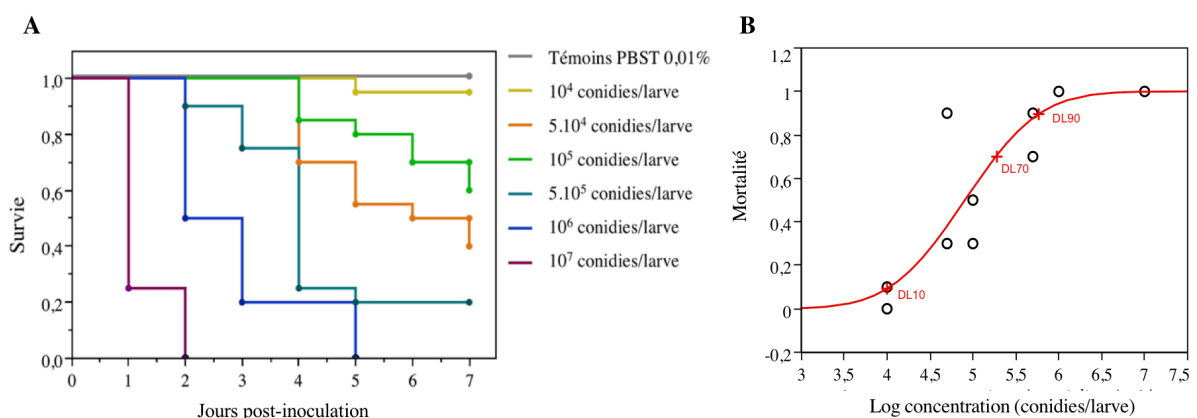


Figure 14 : Courbes de survie (A) et courbe dose-réponse (B) des larves en fonction de la concentration inoculée d'*A. fumigatus* 13073-GFP

En rouge sont représentées les doses létales calculées

A partir de cette conclusion, nous avons décidé d'utiliser la DL90 pour comparer la pathogénicité des souches d'*A. fumigatus* de différentes origines. Pour l'étude de l'effet des co-inoculations sur la mortalité, nous avons décidé d'utiliser une concentration inférieure (DL70 : 10^5 conidies/larve) afin de ne pas induire une mortalité trop importante et trop rapide pour distinguer un potentiel effet supérieur de la co-inoculation. De plus, cette concentration est celle utilisée *in vitro* pour l'étude des biofilms mixtes et l'analyse des interactions entre *A. fumigatus* et *S. maltophilia*.

III.1.4. Analyse du pouvoir pathogène des différentes souches d'*A. fumigatus*

Pour toutes les expériences, les témoins non-infectés et inoculés PBST ont une survie de 100 % à la fin des 7 jours de suivi post-inoculation. Pour les souches d'origine humaine, la tendance des courbes de survie semble la même pour Af H1 et pour Af 13073-GFP (Figure 15). La survie des larves au 7^{ème} jour varie de 15 à 25 %. Pour les souches d'origine environnementale (Af E1 et Af E2), on n'observe pas de différences significatives ($p > 0,05$), avec une survie à J7 allant de 10 à 20 %. Les souches animales se comportent légèrement différemment entre elles avec une survie de 35 % pour Af A1 et de 10 % pour Af A3, mais sans différence significative. Entre les souches de différentes origines, aucune différence significative n'a été observée. La pathogénicité de ces 6 souches d'*A. fumigatus* ne semble donc pas liée à l'origine de la souche. Tout comme aucune différence entre les taux de germination n'avait pu être mise en évidence entre les différentes origines. En revanche, on peut constater que la souche Af A1, qui a un taux de germination plus faible que les autres souches, est également la souche avec le taux de mortalité le plus faible.

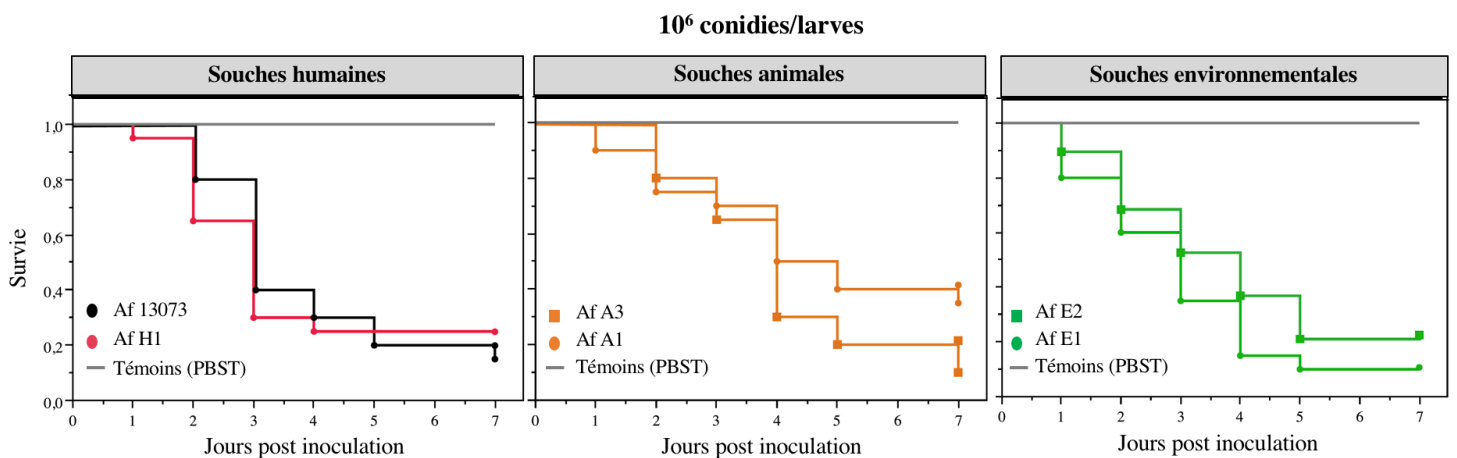


Figure 15 : Courbes de survie des larves inoculées avec des souches d'*A. fumigatus*

III.1.5. Caractérisation *in vitro* et *in vivo* des souches de *S. maltophilia*

III.1.5.1. Analyse *in vitro* des souches de *S. maltophilia* de différentes origines

Nous avons voulu étudier la capacité de croissance de nos souches de *S. maltophilia* de différentes origines sous forme planctonique, ainsi que leur capacité à former du biofilm à 24 h (Figure 16).

Sous forme planctonique (Figure 16A), il ressort qu'à 37°C les souches humaines Sm 13637 et Sm H3 ont une croissance significativement plus importante que les souches d'origine animale et environnementale, qui présentent des taux de croissance similaires (test Wilcoxon pour chaque paire avec $p < 0,05$). En comparaison, la capacité à former du biofilm (Figure 16B) est retrouvée pour les deux souches humaines, mais aussi chez les souches animales de façon significative. Les souches cliniques semblent avoir la capacité de croître et de former du biofilm à 37°C contrairement aux souches environnementales. Étonnamment, la souche Sm A2 est capable de former beaucoup de biofilm à 37°C alors qu'elle ne pousse que très faiblement en planctonique (Figure 16). La capacité à former du biofilm n'est donc pas liée uniquement au fitness des souches, c'est-à-dire à sa capacité à se reproduire, mais aussi aux conditions environnementales ou à l'état de la bactérie (planctonique ou biofilm).

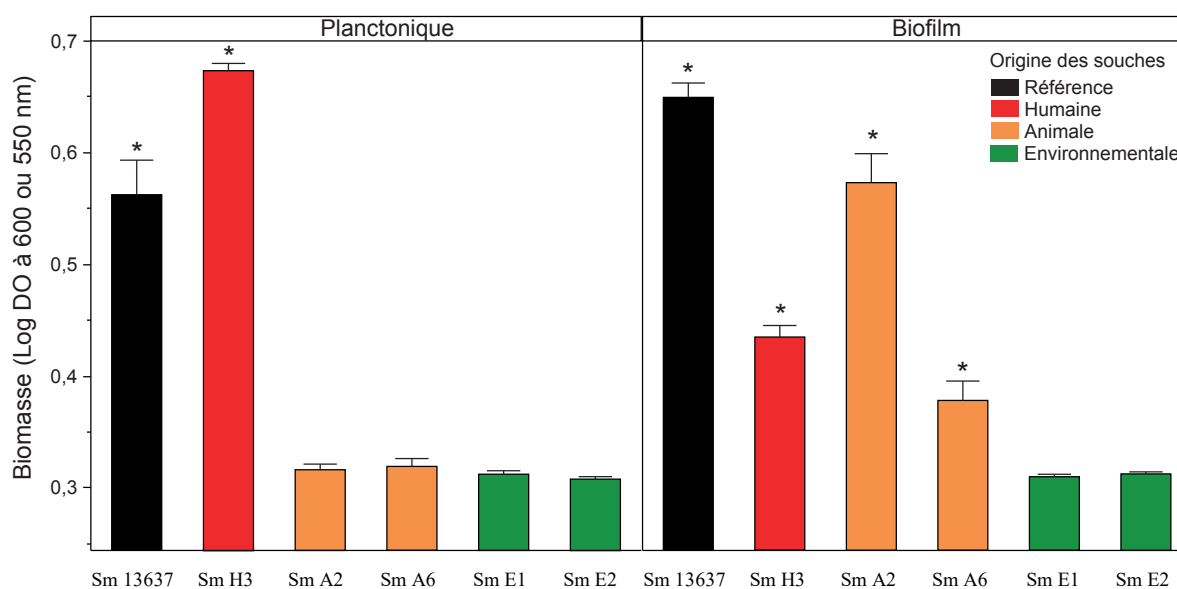


Figure 16 : Croissance des souches de *S. maltophilia* sous forme planctonique (A) ou biofilm (B) après 24 h à 37°C.

* représente une valeur de $p < 0,05$

III.1.5.2. Analyse *in vivo* des souches de *S. maltophilia*

III.1.5.2.1. Détermination de la concentration d'intérêt de *S. maltophilia*

Une expérience préliminaire a été réalisée pour déterminer la concentration optimale pour analyser par la suite la pathogénicité des différentes souches. Pour cela, différentes concentrations de Sm 13637 ont été inoculées à des larves, puis la survie a été suivie sur 7 jours. Cette expérience a été répliquée 2 fois.

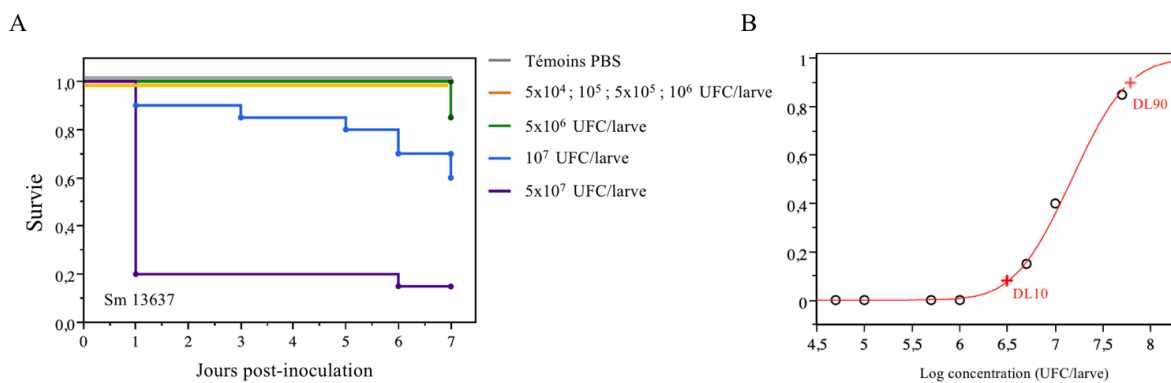


Figure 17 : Courbes de survie (A) et courbe dose-réponse (B) des larves en fonction de la concentration de la souche de *S. maltophilia* 13637

(B) courbe de régression logistique de la mortalité en fonction du log dose de *S. maltophilia* (UFC/mL). En rouge sont représentées les doses létales calculées.

A la fin des 7 jours post-inoculation, les deux groupes témoins (non-infectés et inoculés PBS) présentent une survie de 100 %. En revanche, les larves infectées avec Sm 13637 présentent une mortalité variable en fonction des *inocula* (Figure 17A). Aux concentrations les plus faibles (5x10⁴ ; 10⁵ ; 5x10⁵ ; 10⁶ UFC/larve), le taux de survie est de 100 % pour les différentes concentrations. Seules les deux concentrations les plus élevées (10⁷ et 5x10⁷ UFC/larve) entraînent une différence de mortalité avec respectivement 40 % de mortalité pour 10⁷ UFC/larve et 85 % pour 5x10⁷ UFC/larve. La pathogénicité de la bactérie est bien dose dépendante, cependant la mortalité n'est pas progressive sur plusieurs jours mais plutôt brutale à partir d'une concentration de 5x10⁷ UFC/larve. Nous avons donc utilisé deux concentrations pour comparer la pathogénicité des souches : 10⁷ UFC/larve car elle présente un taux de mortalité intéressant pour voir un éventuel « effet souche », et 10⁶ UFC/larve afin de ne pas induire une mortalité trop importante et trop rapide pour distinguer un potentiel effet supérieur

de la co-inoculation. De plus, cette concentration est celle utilisée *in vitro* pour l'étude des biofilms mixtes et l'analyse des interactions entre *A. fumigatus* et *S. maltophilia*.

III.1.5.2.2. Analyse *in vivo* des souches de *S. maltophilia* de différentes origines

Pour toutes les expériences, les témoins non-infectés et inoculés PBS ont une survie entre 90 % et 100 % à J7. À la concentration de 10^7 UFC/larve (Figure 18A), il existe des différences significatives entre les souches d'une même origine (entre Sm 13637 et Sm H3 : $p=0,0078$; entre Sm A2 et Sm A6 : $p=0,0005$; entre Sm E1 et Sm E2 : $p<0,0001$) et entre les souches d'origines différentes. Cependant, les différences de pathogénicité ne sont pas dues à l'origine des souches. De la même façon, avec 10^6 UFC/larve (Figure 18B), des différences significatives peuvent être mise en évidence entre les souches d'une même origine, notamment entre Sm H3 (100 % mortalité) et Sm 13637 (10 % mortalité) ($p < 0,0001$), et entre Sm E2 (30 % mortalité) et Sm E1 (0 % mortalité) ($p = 0,0086$). La souche Sm H3 est significativement différente de toutes les autres souches ($p<0,05$), cependant on ne peut pas dire que la pathogénicité est due à l'origine des souches, mais simplement qu'elle est souche-dépendante.

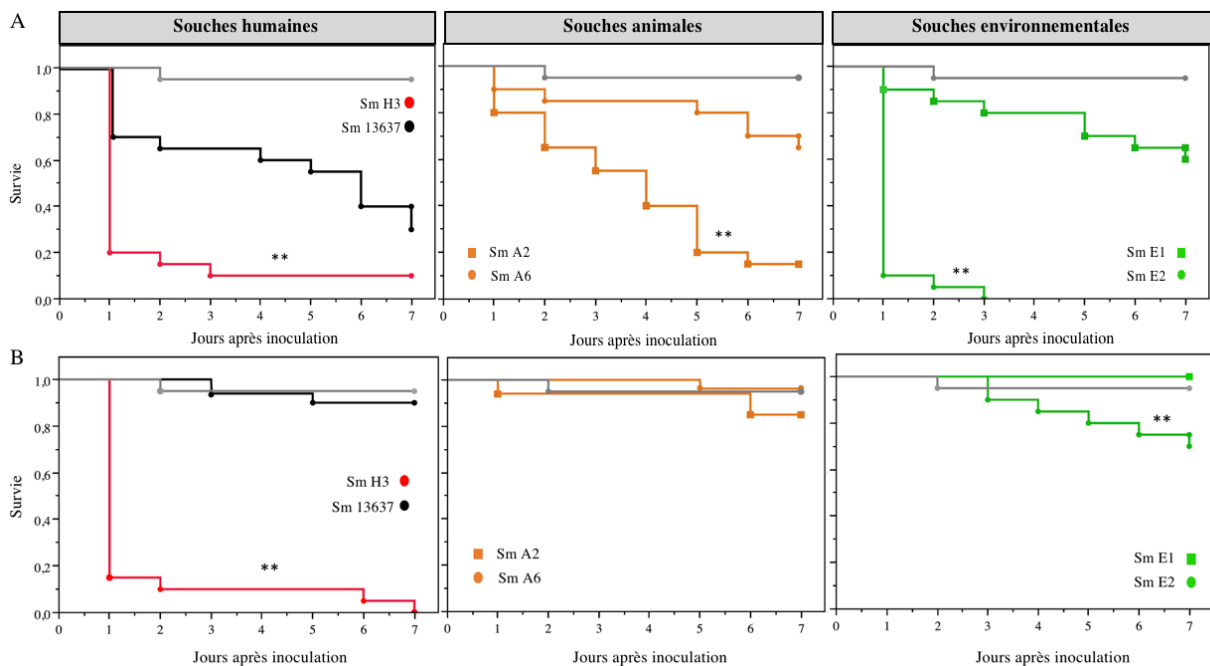


Figure 18 : Courbes de survie des larves infectées par des souches de *S. maltophilia* (A) inoculation avec Sm à 10^7 UFC/larve ; (B) inoculation avec Sm à 10^6 UFC/larve. La courbe grise représente les témoins négatifs (non-inoculés et inoculés PBS). * représente une valeur de $p<0,05$

En conclusion, il existe à toutes les concentrations une variabilité entre les souches mais on ne peut pas attribuer une pathogénicité particulière à une origine de souche. De plus, le taux

de morbidité observé pour chacun des groupes à 10^6 et 10^7 UFC/mL (Figure 19) permet de voir un effet significatif dose-dépendant (Wilcoxon, $p < 0,05$). La différence entre les groupes infectés avec les deux concentrations de Sm H3 n'est pas visible à cause de la très forte mortalité (95-100 %) observée dès 10^6 UFC/mL.

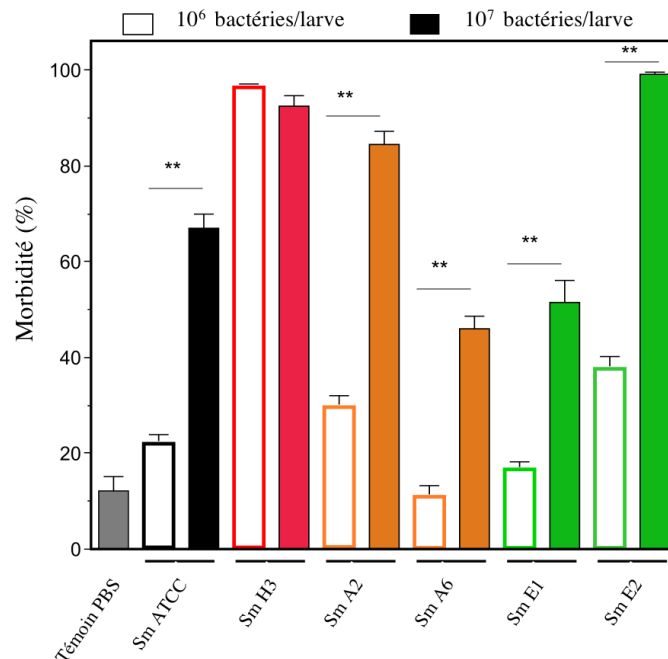


Figure 19 : Taux de morbidité des larves en fonction des souches et des concentrations de *S. maltophilia*

* représente une valeur de $p < 0,05$

III.1.6. Effet de la co-inoculation *A. fumigatus* – *S. maltophilia* *in vivo*

L'association *A. fumigatus* – *S. maltophilia* a été testée *in vivo* en comparaison avec les inoculations simples d'*A. fumigatus* et de *S. maltophilia*. Les concentrations utilisées pour les inoculations étaient de 10^6 UFC/larve pour *S. maltophilia* et 10^5 conidies/larve pour *A. fumigatus*. L'expression de la pathogénicité des souches d'*A. fumigatus* est semblable en fonction des souches et de l'origine. C'est pourquoi, nous avons décidé de tester les co-inoculations en fonction des différentes souches de *S. maltophilia*. Toutes les souches de *S. maltophilia* ont ainsi été testées en co-inoculation avec Af 13073-GFP.

Tous les témoins PBS et non infectés ont une survie proche de 100 %. La Figure 20 permet de voir une survie entre 70 et 80 % pour Af 13073. Les différentes souches de

S. maltophilia en inoculation simple montrent une variabilité de mortalité comme précédemment décrit (Figure 18B).

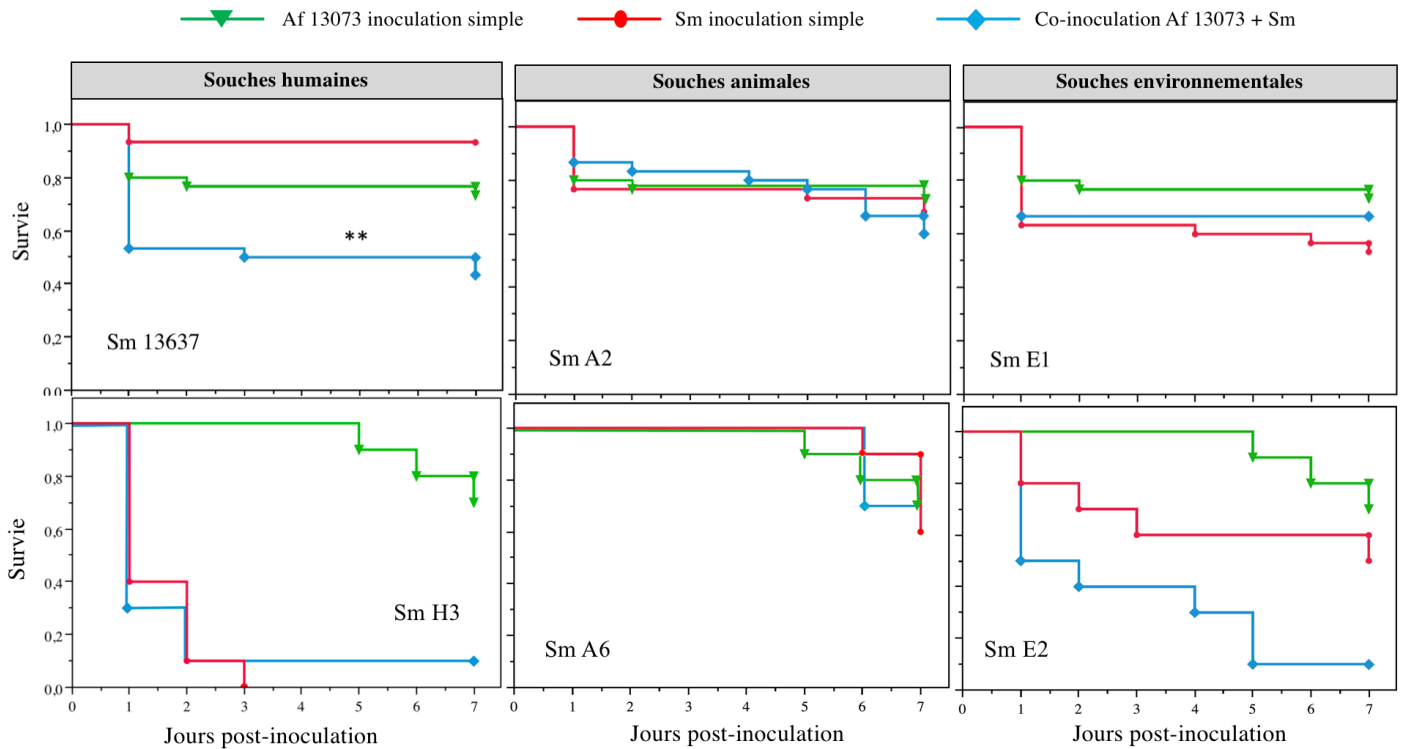


Figure 20 : Courbes de survie des larves co-infectées avec des souches de *S. maltophilia* et avec la souche *A. fumigatus* 13073-GFP

Pour les souches humaines, une différence significative entre la courbe de survie du groupe co-infecté avec Af 13073 et Sm 13637 (en bleu, Figure 20) et celles des groupes infectés avec *A. fumigatus* (en vert) ou *S. maltophilia* (en rouge) est observée ($p=0,0189$ entre Af 13073 et la co-inoculation ; $p<0,0001$ entre Sm 13637 et la co-inoculation). De plus, la co-inoculation d’Af 13073 et de Sm 13637 induit une mortalité d’environ 60 %, soit plus que la somme des mortalités observées pour chacun des deux pathogènes (environ 40 %). Il semblerait donc qu’il y ait un effet additionnel des deux souches ensemble sur la mortalité dans *G. mellonella*. Pour la souche Sm H3, la pathogénicité de la bactérie seule est trop importante pour pouvoir distinguer des différences avec la co-inoculation. Cependant, on peut voir que les 2 courbes de survie (Sm H3 et Sm H3 + Af 13073) sont similaires.

Pour les deux souches d’origine animale, aucune différence significative n’est observée entre les courbes de survie des groupes infectés avec *A. fumigatus* ou *S. maltophilia* et le groupe

co-infecté. La mortalité ne semble pas augmenter ni même s'additionner avec l'inoculation simultanée d'Af 13073 et Sm A2 ou Sm A6 (Figure 20).

Pour les souches environnementales, en fonction de la souche on peut voir une différence entre le groupe co-infecté et les groupes infectés avec *A. fumigatus* ou *S. maltophilia* (Sm E2, Figure 20), ou au contraire aucune différence, comme pour les souches animales (Sm E1, Figure 20). Cependant, cette expérience n'ayant été réalisée qu'une seule fois pour la souche Sm E2, aucune conclusion ne peut être faite. Ces premiers résultats laissent penser que la pathogénicité due à la co-infection n'est pas liée exclusivement à l'origine des souches. En revanche, il semble clair que pour certaines souches, la pathogénicité est augmentée voire potentialisée par la co-inoculation d'*A. fumigatus* et de *S. maltophilia* dans la larve.

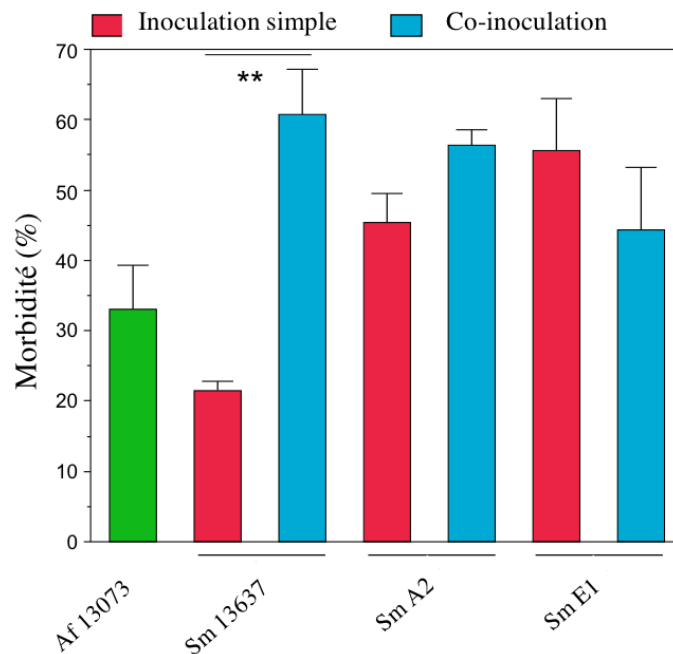


Figure 21 : Morbidité des larves co-infectées avec *A. fumigatus* et *S. maltophilia*

L'analyse des taux de morbidité des larves aux différents temps post-inoculation a permis de voir que les résultats à J1 étaient prédictifs des scores obtenus les jours suivants. L'interaction entre l'hôte et le pathogène est donc précoce et déterminante dès 24 h post-inoculation.

C'est pourquoi, nous avons comparé la moyenne des taux de morbidité obtenus à J1 pour chaque groupe (Figure 17). On retrouve l'effet potentialisateur de la co-inoculation Sm 13637 - Af 13073 ($p < 0,001$ entre le Sm seul et la co-inoculation ; $p = 0,0027$ entre l'Af 13073

et la co-inoculation) dès J1. Cet effet n'est pas observé pour les souches Sm A2 et Sm E1, pour lesquelles aucune différence significative n'est observée entre co-inoculation et inoculation simple de *S. maltophilia*. De façon surprenante, on peut voir que la souche *S. maltophilia* Sm 13637 d'origine clinique est celle entraînant le moins de morbidité seule dans les larves à J1 comparée aux souches animale et environnementale ($p < 0,0001$ entre Sm 13637 et Sm A2, $p = 0,0002$ entre Sm 13637 et Sm E1). Autre résultat surprenant, la co-inoculation entre Sm 13637 et Af 13073 entraîne plus de morbidité (alors Sm 13637 est peu pathogène seul) que la co-inoculation avec la souche Sm E1 (qui a un taux de pathogénicité élevé seule à J1) de façon significative ($p = 0,0124$) (Figure 17).

III.1.7. Recherche de la présence des micro-organismes au sein de la larve

III.1.7.1. Mise en évidence des pathogènes dans l'hémocèle

Au cours de nos inoculations, des larves supplémentaires ont été infectées par des suspensions de champignons, de bactéries ou des deux pathogènes, aux concentrations utilisées pour les manipulations précédentes. Elles ont ensuite été sacrifiées à différents temps afin d'étudier l'invasion des tissus de la larve par ces micro-organismes. L'hémocèle a été étalé en frottis épais sur lame et observée en microscopie confocale. Notre souche de référence Af 13073-GFP n'a pas pu être utilisée car une auto-fluorescence verte de la larve et de ses structures internes ne nous permettait pas de mettre en évidence l'infection fongique. Les structures fongiques ont pu être visualisées directement grâce à la souche CBS 144.89 exprimant la protéine DsRed (Figure 22B). Des conidies germées, ainsi que des hyphes, ont pu être identifiées en plusieurs endroits au sein des tissus internes de la larve sans que nous puissions préciser la localisation. La mise en évidence de la bactérie en inoculation simple ou mixte n'a pas été possible sur des coupes de larves, seule une coloration de Gram de frottis d'hémocèle nous a permis de la mettre en évidence (Figure 22A).

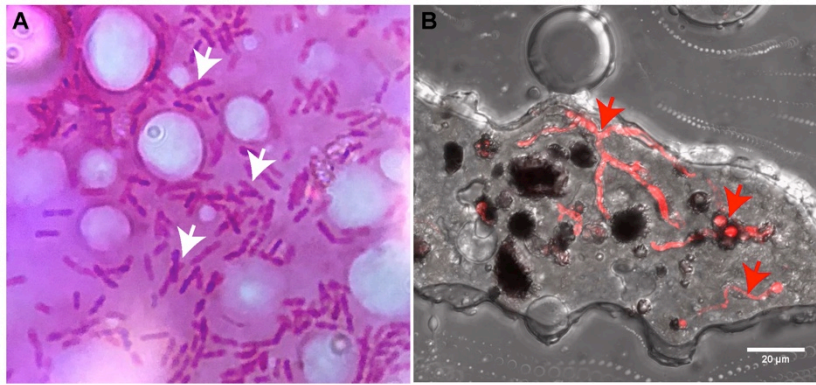


Figure 22 : Frottis d'hémocèle de larve de *G. mellonella* infectée par *S. maltophilia* (A) ou *A. fumigatus* (B).

Les flèches blanches indiquent les bactéries Sm13637 (coloration Gram, microscope optique, grossissement x1000) et les flèches rouges représentent le champignon Af CBS 144.89-DsRed (microscopie confocale).

III.1.7.2. Mise en évidence de l'infection fongique et bactérienne sur des coupes de larves

A partir de larves infectées en inoculation simple ou mixte, et sacrifiées à différents temps post-inoculation, des coupes histologiques en paraffine (Figure 5A et 5B, page 50) ont été colorées au HES, Gram ou Gomori-Grocott (Figure 5C et 5D, page 50). L'ensemble des colorations n'a pas permis la mise en évidence de la bactérie au sein de la larve. Cependant, les trois types de coloration montraient des foyers d'infection fongique avec des filaments mycéliens septés et des conidies prenant la coloration. Ces filaments envahissent les structures internes et témoignent de l'activité du champignon. Ces foyers d'infection sont visualisables dans la partie caudale du corps de la larve (Figure 5B, page 50).

IV. DISCUSSION

Notre objectif principal était de proposer la mise au point d'un mini-modèle d'infection pour deux pathogènes de règnes différents, *A. fumigatus*, champignon filamenteux et *S. maltophilia*, bactérie gram négatif, dans le modèle *G. mellonella*. Pour cela, nous avons tout d'abord caractérisé plusieurs souches de *S. maltophilia* et d'*A. fumigatus* d'origine humaine, animale ou environnementale *in vitro* pour évaluer leur taux de germination, de croissance planctonique et leur capacité à former du biofilm.

L'analyse des taux de germination à 37°C sur milieu malt des *A. fumigatus* a montré une homogénéité entre les souches avec un taux de germination de 50 % atteint entre 7 et 8 h. La capacité à former du biofilm à 37°C a été évaluée par la méthode de coloration au cristal violet. Elle permet de mettre en évidence la biomasse totale des micro-organismes et de la MEC qui a adhéré à la surface. Cette étude n'a pas permis de mettre en évidence un lien significatif entre formation de biofilm et l'origine des souches. La souche de référence Af 13073-GFP forme plus de biofilm que les autres ($p < 0,0001$) sans pouvoir relier cette particularité au taux de germination. La modification de la souche de référence Af 13073 couplée à la GFP pourrait expliquer cette différence observée dans la formation de biofilm, mais cela devra être vérifié par comparaison avec la souche d'origine (Af13073).

Plusieurs concentrations de conidies de la souche de référence Af 13073-GFP ont été inoculées dans les larves, induisant une infection fongique invasive avec une morbi-mortalité des larves. Ainsi nous avons pu établir une concentration adéquate pour tester la pathogénicité des souches d'*A. fumigatus* humaines, animales et environnementales. La concentration de 10^6 conidies/larve correspondant à la DL90 a été finalement choisie pour la suite des expérimentations. Nous avons utilisé des souches d'*A. fumigatus* de trois origines (humaine, animale et environnementale) et les avons comparées à notre souche de référence Af 13073-GFP. L'objectif était de savoir si la pathogénicité était souche-dépendante. Dans la littérature, des études ont montré des différences de virulence entre isolats environnementaux et cliniques humains (44, 45). Cependant, à notre connaissance, aucune donnée comparative n'a encore été publiée sur la pathogénicité des souches provenant de l'animal. Nos résultats ne montrent aucun lien entre la pathogénicité et l'origine des souches d'*A. fumigatus*. La mortalité des larves varie entre 10 et 30 % à J7 pour 5 des souches d'*A. fumigatus* testées. Seule la souche Af A1 d'origine animale présente une mortalité légèrement inférieure (40 %).

Dans la littérature, seule une étude (154) a pu montrer un lien entre les caractéristiques *in vitro* (taux de germination, diamètre des colonies et diamètre des hyphes) et *in vivo* (pathogénicité des souches dans un modèle murin). Cependant, cette étude portait seulement sur deux souches cliniques et deux souches environnementales dont l'une d'elles avait un taux de croissance et une pathogénicité moins élevés que les autres. Dans notre étude, nous pouvons observer que la souche Af A1 a le taux de germination et la pathogénicité les plus faibles, même si cette différence n'est pas significative.

Pour *S. maltophilia*, les souches d'origine humaine poussent plus rapidement que les autres à 37°C en planctonique. De la même façon, les souches d'origine humaine et animale forment plus de biofilm à 37°C après 24 h que les souches environnementales. Ces souches cliniques semblent plus adaptées à cette température. En revanche, la souche animale Sm A2, provenant du tractus respiratoire d'un cheval forme beaucoup de biofilm, alors que son taux de croissance sous forme planctonique est très faible. Les souches environnementales ne possèdent ni une rapidité de croissance, ni une capacité de formation de biofilm élevée à 37°C. D'autres expériences, réalisées au laboratoire, ont montré que ces souches poussent de façon identique à 25-30°C. *S. maltophilia* étant une bactérie au réservoir environnemental, il est probable que ces souches adaptées à l'environnement poussent à une température plus basse. Un lien peut donc être fait entre croissance et formation de biofilm : les souches humaines poussent rapidement et forment beaucoup de biofilm à 37°C, alors que les souches environnementales poussent peu et ne forment pas de biofilm.

Nous avons testé plusieurs concentrations de *S. maltophilia* (entre 5×10^4 et 5×10^7 UFC/larve) dans *G. mellonella*. Alors que la mortalité est de 80 % dès le premier jour post-inoculation pour la concentration la plus haute (5×10^7 UFC/larve), elle est seulement de 40 % pour la concentration 10^7 UFC/larve à J7. La pathogénicité de la bactérie est donc dose dépendante, mais nous n'avons pas réussi à avoir une mortalité progressive sur plusieurs jours. La comparaison entre nos souches de *S. maltophilia* montre une grande hétérogénéité de pathogénicité, quelle que soit l'origine de la souche. Nous n'avons finalement pas pu établir un lien entre pathogénicité et origine de la souche. Néanmoins, la souche Sm H3 d'origine humaine semblait beaucoup plus virulente que les autres souches. En effet, à la concentration de 10^6 UFC/mL, une mortalité de 80 % est observée dès J1, contre 0 % pour les autres souches. Cette différence de pathogénicité pourrait être due au fait que cette souche provient d'un isolat

clinique humain (un patient atteint de mucoviscidose), mieux adapté à cet environnement. Le score de morbidité calculé à J1 dans le modèle *G. mellonella*, quelle que soit la souche de *S. maltophilia*, permet de prédire la tendance observée à J7 et est corrélé au taux de mortalité.

Le modèle *G. mellonella* est très utilisé dans la littérature pour étudier les infections fongiques et bactériennes (40). Cependant, nous avons été confrontés à des difficultés de répétabilité pour les souches de *S. maltophilia* dans les larves de *G. mellonella*. Une partie de nos expérimentations ne nous permettaient pas de trouver les mêmes taux de pathogénicité des souches. La température joue un rôle très important dans la croissance de ces bactéries et ce facteur peut largement participer à la variabilité de nos résultats. Pour les souches environnementales cultivées à température ambiante, les gros écarts de température du printemps ont induit des différences de pathogénicité entre ces souches. Il aurait fallu utiliser des souches en phase de croissance exponentielle (différente pour chacune des souches) pour l'inoculation dans *G. mellonella*.

Pour les tests de co-inoculation, nous ne discuterons que des résultats obtenus pour les souches Sm 13637 (souche de référence), Sm A2 (souche animale) et Sm E1 (souche environnementale) avec l'inoculation d' Af 13073 (souche de référence) qui ont pu être répliqués.. Nous avons réalisé des groupes témoins infectés avec les pathogènes seuls afin de nous affranchir des problèmes de répétabilité. L'objectif était de pouvoir comparer la survie des groupes infectés avec les pathogènes seuls (*A. fumigatus* ou *S. maltophilia*) avec celle du groupe co-infectés avec *A. fumigatus* et *S. maltophilia*. Seule l'inoculation d' Af 13073 et de Sm 13637 de façon concomitante met en évidence une différence significative comparée aux témoins *A. fumigatus* et *S. maltophilia*. Cette la co-infection entraîne une mortalité supérieure à la somme des mortalités observées pour chacun des deux pathogènes inoculés seuls. Dans le même ordre d'idée, Bergeron *et al.* ont montré un effet synergique de la pathogénicité de *C. albicans* en présence de *P. aeruginosa* dans le modèle poisson *D. rerio* (149). En revanche, un effet antagoniste d'une association *A. baumannii* et *C. albicans* a été montré sur la pathogénicité dans le modèle *C. elegans* (148). Pour les souches Sm A2 et Sm E1, la mortalité observée pour les groupes co-infectés (*A. fumigatus* et *S. maltophilia*) et infectés simples (*A. fumigatus* ou *S. maltophilia*) est similaire. En effet, la somme des mortalités obtenues avec les inoculations d'*A. fumigatus* ou de *S. maltophilia* est supérieure à la mortalité observée dans les groupes co-infectés.

Ce modèle nous a permis de mettre en évidence des différences entre les pathogènes inoculés, seuls ou en association, dans *G. mellonella*. Ce modèle semble être un bon outil pour évaluer la pathogénicité des souches, comme cela avait déjà été décrit dans la littérature. Cependant cette étude présente des limites, notamment en termes de répétabilité pour le criblage des souches bactériennes. Au-delà des problèmes de croissance des souches bactériennes, il est décrit dans la littérature l'influence de la température est également très importante sur le cycle de vie de *G. mellonella*, mais aussi sur sa réponse aux infections. En effet, tout stress (thermique, physique, nutritionnel) peut faire varier la réponse à l'infection (73). De plus, les larves achetées en animalerie peut donner lieu à de petites variations de sensibilité aux infections, probablement à cause de facteurs tels que l'âge (non contrôlé) ou les conditions de transport (53). Ces facteurs vont pouvoir être en partie contrôlés grâce à l'élevage mis en place au laboratoire : les larves auront le même patrimoine génétique, et leurs conditions de vie seront standardisées. Cependant, la rentabilité de celui-ci à l'heure actuelle ne nous permet pas une autonomie complète en quantité de larves disponibles.

Pour finaliser notre modèle, il faudrait tester la pathogénicité de notre souche d'*A. fumigatus* de référence (Af13073) non modifiée génétiquement pour la rendre fluorescente avec la GFP, ainsi que ses différentes caractéristiques *in vitro* (taux de germination, capacité à former du biofilm et pathogénicité). En ce qui concerne *S. maltophilia*, un contrôle rigoureux des températures des étuves et du laboratoire devrait permettre de nous affranchir d'une partie des variabilités de résultats obtenus *in vivo*. La standardisation des méthodes d'élevage, ainsi que le recours exclusif à des larves issues de notre laboratoire, pourraient aussi éviter certains biais. De plus, il nous faudrait réussir à localiser *S. maltophilia* au sein de la larve de façon plus évidente, par exemple par l'utilisation d'une bactérie fluorescente que nous pourrions co-visualiser en microscopie confocale avec la souche de référence Af CBS 144.89 DsRed.

V. CONCLUSION GÉNÉRALE

A l'heure où les résistances aux antimicrobiens sont un sujet de préoccupation majeur, la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques sont au cœur des études scientifiques actuelles. L'interaction entre la bactérie multi-résistante *S. maltophilia* et le champignon opportuniste *A. fumigatus* chez les patients atteints de mucoviscidose ou de pathologies pulmonaires chroniques en est un bon exemple. A l'origine d'exacerbations parfois mortelles, la prise en charge et le traitement de ces exacerbations reste encore à améliorer. L'utilisation de modèles *in vivo* alternatifs s'est donc largement développée ces dernières années afin de multiplier les chances de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques. Ces modèles, dont l'insecte *G. mellonella*, séduisent de plus en plus les chercheurs par leurs avantages et leur facilité d'utilisation. L'étude d'*A. fumigatus* et de *S. maltophilia* en infection mono-espèce existe déjà depuis plusieurs années dans ce modèle, et nous avons pu apporter l'infection multi espèces. Avant de nous affranchir du modèle murin, il faudrait pouvoir les comparer avec notre modèle et il est probable que les différences dans le système immunitaire feront ressortir des variations qui ne nous permettront pas de nous affranchir totalement des modèles classiques mammifères.

Dans ce contexte, l'amélioration de nos connaissances sur les relations hôte-microorganismes, notamment de règne différent, semble pertinente. Compétition et coopération entre ces organismes sont nécessaires pour leur espace de développement ou leurs sources de nutriments, médiées par des mécanismes nombreux et complexes. Afin d'analyser les interactions entre *A. fumigatus* et *S. maltophilia* sous forme de biofilm *in vitro*, la mise en place au laboratoire d'un modèle de biofilm mixte entre ces deux pathogènes a permis de démontrer un effet d'antibiose (défini par une interaction biologique entre plusieurs organismes, qui porte préjudice à au moins l'un d'entre eux) de la bactérie sur le champignon (153). En présence de la bactérie, les hyphes du champignon sont plus ramifiés, avec une paroi fongique plus épaisse et une inhibition de sa croissance. Ces résultats ont été démontrés avec les souches de référence Sm 13637 et Af 13073. Peu de données sont disponibles sur les effets et la pathogénicité d'autres souches de *S. maltophilia* et d'*A. fumigatus*, notamment sur une éventuelle corrélation entre formation de ce biofilm mixte et pathogénicité. Pour cela, les données *in vivo* obtenues durant mon master 2 ont pu être colligées avec les données *in vitro* obtenues au laboratoire. Le but de cette étude était d'évaluer l'effet d'association entre souches de différentes origines de *S. maltophilia* et d'*A. fumigatus* sur l'effet d'antibiose et la pathogénicité (1). Le modèle *G. mellonella* ayant démontré son intérêt pour l'étude d'*A. fumigatus* et *S. maltophilia*, il a donc

été mis en place au laboratoire pour analyser la pathogénicité de ces deux pathogènes ensembles, jamais décrite à ce jour. Cette étude a permis de mettre en évidence que l'effet d'antibiose était présent, quelle que soit la souche d'*A. fumigatus* testée avec la souche de référence Sm 13637. Cet effet d'antibiose ne semble pas souche d'*Aspergillus* dépendant. Les résultats étaient différents pour les souches de *S. maltophilia*, qui n'étaient pas toutes capables d'induire un effet d'antibiose sur la souche de référence Af 13073. *In vivo*, une augmentation de la mortalité des larves a été observée lors de l'infection simultanée par les deux pathogènes de référence. Ces résultats ont été observés sur des souches humaines mais pas avec les souches environnementales et animales, décrivant ainsi une aptitude particulière entre souches humaines. Les effets sur la mortalité des larves étaient donc dépendants des souches de *S. maltophilia*.

Le modèle *G. mellonella* a donc démontré sa pertinence pour l'étude d'infections mixtes mais reste à améliorer. En effet, des problèmes de répétabilité d'expérimentation restent à résoudre. De plus, la matrice extracellulaire n'a pas pu être identifiée au sein des larves, ce qui aurait pu valider la présence d'un biofilm mixte *in vivo*. Ce travail pourrait être un axe à développer en élaborant par exemple une bactérie *S. maltophilia* fluorescente qui, associée à un *A. fumigatus*-DSRed déjà présent au laboratoire, seraient visible tous deux en microscopie confocale. Associé à la mise en évidence des éléments de la matrice extracellulaire, cela permettrait de montrer ou non la présence de ce biofilm *in vivo* et de tester des antimicrobiens ou association d'antimicrobiens.



Interactions of *Aspergillus fumigatus* and *Stenotrophomonas maltophilia* in an *in vitro* Mixed Biofilm Model: Does the Strain Matter?

Elise Melloul¹, Lolita Roisin¹, Marie-Fleur Durieux^{1,2}, Paul-Louis Woerther^{1,3}, Delphine Jenot^{1,4}, Veronica Risco^{1,4}, Jacques Guillot^{1,4}, Eric Dannaoui^{1,5}, Jean-Winoc Decousser^{1,3} and Françoise Botterel^{1,6*}

¹ EA 7380 Dynamyc, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Université Paris-Est Créteil, Créteil, France, ² Service de Parasitologie-Mycologie, Limoges, France, ³ Unité de Bactériologie-Hygiène, Département de Microbiologie, Assistance Publique – Hôpitaux de Paris, Hôpital Henri Mondor, Créteil, France, ⁴ Unité de Parasitologie-Mycologie, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Maisons-Alfort, France, ⁵ Unité de Parasitologie-Mycologie, Service de Microbiologie, Hôpital Européen Georges Pompidou, Assistance Publique – Hôpitaux de Paris, Faculté de Médecine, Université Paris-Descartes, Paris, France, ⁶ Unité de Parasitologie-Mycologie, Département de Microbiologie, Groupe Hospitalier Henri Mondor – Albert Chenevier, Assistance Publique – Hôpitaux de Paris, Université Paris-Est Créteil, Créteil, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Hector Mora Montes,
Universidad de Guanajuato, Mexico

Reviewed by:

Dinesh Sriramulu,
Shres Consultancy (Life Sciences),
Chennai, India
Sonia Rozental,
Universidade Federal do Rio
de Janeiro, Brazil

*Correspondence:

Françoise Botterel
francoise.botterel@aphp.fr

Specialty section:

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

Received: 27 August 2018

Accepted: 06 November 2018

Published: 27 November 2018

Citation:

Melloul E, Roisin L, Durieux M-F, Woerther P-L, Jenot D, Risco V, Guillot J, Dannaoui E, Decousser J-W and Botterel F (2018) Interactions of *Aspergillus fumigatus* and *Stenotrophomonas maltophilia* in an *in vitro* Mixed Biofilm Model: Does the Strain Matter? *Front. Microbiol.* 9:2850. doi: 10.3389/fmicb.2018.02850

Introduction: *Aspergillus fumigatus* (Af) and *Stenotrophomonas maltophilia* (Sm) are pathogenic microorganisms, which coexist in the respiratory tract of cystic fibrosis (CF) patients. We recently developed an *in vitro* model of mixed biofilm associating Af ATCC 13073-GFP (Af13073) and Sm ATCC 13637 (Sm13637) and described an antibiosis effect. The present study aim was to assess the antibiosis of Sm on Af using different strains and to analyze the potential synergistic virulence of these strains in an *in vivo* *Galleria mellonella* model.

Methods: The effect of Sm13637 was evaluated on eight Af strains and the effect of nine Sm strains was evaluated on Af13073. The strains originated from clinical cases (human and animal) and from environment. Fungal and bacterial inocula were simultaneously inoculated to initiate mixed biofilm formation. Fungal growth inhibition was analyzed by qPCR and CLSM and the fungal cell wall modifications by TEM analysis. The virulence of different Sm strains was assessed in association with Af in *G. mellonella* larvae.

Results: All strains of Af and Sm were able to produce single and mixed biofilms. The antibiosis effect of Sm13637 was similar whatever the Af strain tested. On the other hand, the antibiosis effect of Sm strains was bacterial-fitness and strain dependent. One strain (1/9) originated from animal clinical case was never able to induce an antibiosis, even with high bacterial concentration. In the *G. mellonella* model, co-inoculation with Sm13637 and Af13073 showed synergism since the mortality was 50%, i.e., more than the summed virulence of both.

Conclusion: Human clinical strains of Sm yielded in higher antibiosis effect on Af and in a thinner mixed biofilm, probably due to an adaptive effect of these strains. Further research covering Af increased wall thickness in the presence of Sm strains, and its correlation with modified antifungal susceptibility is encouraged in patients with chronic respiratory infections by these 2 microorganisms.

Keywords: bacterial-fungal interactions, *Aspergillus fumigatus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, mixed biofilm, antibiosis, *Galleria mellonella*

INTRODUCTION

Polymicrobial biofilm communities are commonly found in lungs of cystic fibrosis (CF) patients or in the respiratory tract of patients with chronic lung diseases (Frey-Klett et al., 2011). In biofilms, microorganisms are enclosed in an extracellular matrix (ECM) of self-produced extracellular polymeric substance that confers a protective and antimicrobial-resistant environment (Donlan and Costerton, 2002; Frey-Klett et al., 2011). From the progressive understanding of the complexities of polymicrobial biofilm, it is becoming all the more evident that interactions between bacterial and fungal pathogens can influence pathogenesis and antimicrobial resistance (Peters et al., 2012; Baldan et al., 2014; Beaume et al., 2015). However, it is often difficult to elucidate whether these clinical changes are a cause or a consequence of these interactions (O'Brien and Fothergill, 2017). Among microorganisms described in mixed biofilms of the respiratory tract of CF patients, *Aspergillus fumigatus* (Af) (Fischer et al., 2014; Williams et al., 2016), a filamentous fungus, and *Pseudomonas aeruginosa* (Baxter et al., 2013; Reece et al., 2017), a Gram-negative bacillus are the most frequently documented. Several studies have reported *A. fumigatus* colonization in patients with chronic lung disease, especially chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and CF, probably due to the lung structural changes and the heavy courses of antibiotics (Bafadhel et al., 2014; Sabino et al., 2015). *Stenotrophomonas maltophilia* (Sm) is an emergent ubiquitous Gram-negative bacillus (Chotirmall and McElvaney, 2014) whose antibiotic resistance and biofilm formation capacity promote opportunistic pathogenicity in CF or in immunocompromised patients (Calza et al., 2003; Jacquier et al., 2011; Cabaret et al., 2016). Recently, *S. maltophilia* was positively associated with *Aspergillus* species infections in patients with CF suggesting that such co-infections are common and may alter therapeutic responses in these patients (Granchelli et al., 2018). Many studies have examined the interactions between pathogens isolated in CF patients: Pompilio et al. (2015) showed that *P. aeruginosa* and *S. maltophilia* have reciprocal interferences and *S. maltophilia* could modulate the *P. aeruginosa* virulence in CF patients. In the same way, some studies revealed antagonism or synergism effects of *P. aeruginosa* on *A. fumigatus* (Briard et al., 2015, 2016, 2017; Anand et al., 2017). For our work and in order to better understand the interactions between *A. fumigatus* and *S. maltophilia* and to evaluate the feasibility of developing their mixed biofilm in the respiratory tract, we previously developed an *in vitro* model of such mixed biofilm (Melloul et al., 2016). Analytical and quantitative methods revealed typical structures

of biofilm with production of an ECM enclosing fungal hyphae and bacteria. We also demonstrated the antibiosis effect of *S. maltophilia* on *A. fumigatus*, i.e., the fungal hyphae were highly branched and abortive, the fungal cell wall was thicker and its growth was inhibited (Melloul et al., 2016). Similar antibiosis effect has already been reported on different *A. fumigatus* strains in contact with *P. aeruginosa* or *S. aureus* (Briard et al., 2015; Ramirez Granillo et al., 2015). In our previous study, two clinical strains were chosen: *S. maltophilia* ATCC 13637 (Sm13637), isolated from mouth-cancer patient, and *A. fumigatus* ATCC 13073 (Af13073) isolated from an invasive aspergillosis case.

However, the mechanisms underlying the pathogenesis and the virulence of different strains of *A. fumigatus* and of *S. maltophilia*, remain poorly investigated. No information is available regarding the correlation between the formation of these mixed biofilms and pathogenicity. The aim of the present study was to assess the effect of associating different fungal and bacterial strains on the antibiosis effect and the virulence of these associations *in vivo* in *Galleria mellonella* model. *A. fumigatus* and *S. maltophilia* are ubiquitous species and some environmental strains could colonize the respiratory tract and be in contact with clinical strains (Loeffert et al., 2018). Thus, it seems interesting to evaluate the antibiosis phenomenon in presence of strains from diverse origins. Different fungal strains originated from diverse origins (human or animal clinical cases or environment) have been tested in association with a bacterial reference strain (human clinical case) and vice versa.

MATERIALS AND METHODS

Ethics Statement

The authors testify that all procedures contributing to this work are in compliance with the ethical standards of the "Réglementation et éthique de l'expérimentation animale" and with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 2008. Since the study was retrospectively conducted on isolates collected through routine clinical work and patient's identifiable information had already been anonymized, no written or verbal informed consent was necessary for patients to participate in this study. Additionally, the authors had no contact or interaction with the patients.

Microbial Strains and Inocula

A. fumigatus ATCC 13073-GFP (Af13073), provided by Wasylnka and Moore (2002), and *S. maltophilia* ATCC 13637

TABLE 1 | Origin of the *A. fumigatus* and *S. maltophilia* strains tested.

Species	Strain name	Origin	Samples	Genogroups
<i>S. maltophilia</i>	Sm13637 (ATCC)	Human	Mouth (oral carcinoma)	6
<i>S. maltophilia</i>	Sm_6-1	Human	Sputum (CF)	6
<i>S. maltophilia</i>	Sm_6-2	Human	Deep Catheter	6
<i>S. maltophilia</i>	Sm_6-3	Animal (Dog)	Transtracheal aspiration	6
<i>S. maltophilia</i>	Sm_2-1	Animal (Horse)	Transtracheal aspiration	2
<i>S. maltophilia</i>	Sm_2-2	Animal (Horse)	Transtracheal aspiration	2
<i>S. maltophilia</i>	Sm_D-1	Hospital environment	Endoscope	D
<i>S. maltophilia</i>	Sm_D-2	Hospital environment	Endoscope	D
<i>S. maltophilia</i>	Sm_D-3	Hospital environment	Gastroscope	D
<i>A. fumigatus</i>	Af13073 (ATCC)	Human	Bronchoalveolar lavage	NA
<i>A. fumigatus</i>	Af_H1	Human	Bronchoalveolar lavage	NA
<i>A. fumigatus</i>	Af_H2	Human	Bronchoalveolar lavage	NA
<i>A. fumigatus</i>	Af_A1	Animal (Horse)	Guttural pouch	NA
<i>A. fumigatus</i>	Af_A2	Animal (Duck)	Bronchoalveolar lavage	NA
<i>A. fumigatus</i>	Af_E1	Environment	Soil	NA
<i>A. fumigatus</i>	Af_E2	Environment	Soil	NA
<i>A. fumigatus</i>	Af_E3	Environment	Soil	NA

NA, not available.

(Sm13637) strains were used in the previous study to develop the model of mixed biofilm (Melloul et al., 2016). In this work, nine strains of *S. maltophilia* (including Sm13637) were selected to create mixed biofilm with Af13073, and eight *A. fumigatus* strains (including Af13073) were used with Sm13637 (**Table 1**). The *A. fumigatus* and *S. maltophilia* strains originated from human, animal and environment were stored at -20°C in glycerol and, respectively, streaked out on 2% malt agar (+ 0.05% chloramphenicol) for 7 days at 37°C and on CHO-plate (Columbia agar + 5% horse blood) (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) for 24 h at 37°C .

All *A. fumigatus* strains were confirmed by molecular identification, which was performed by sequencing part of beta-tubulin and calmodulin genes. DNA sequences were analyzed using Seqscape v2.5 (Applied Biosystems, Villebon Sur Yvette, France) and were compared using Genbank and Mycobank databases sequences of strains belonging to *Aspergillus* section *Fumigati* (Loeffert et al., 2017). All of the eight fungal strains were identified as *A. fumigatus sensu stricto*.

All of the *S. maltophilia* strains were identified using MALDI-TOF mass spectrometry (Andromas, Beckmann Coulter, Villepinte, France). A genogrouping affiliation using MLST (MultiLocus Sequence Typing) profiles was performed. After DNA extraction using QIAAsymphony DSP Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France), the MLST profile was determined using Kaiser Scheme. Briefly, seven housekeeping genes were amplified and sequenced according to PubMLST website recommendations¹. For each strain, the seven allelic sequences of the seven housekeeping genes were concatenated and aligned using Seaview 4.0² (Corlouer et al., 2017).

¹<http://pubmlst.org/smaltophilia/>

²<http://doua.prabi.fr/software/seaview>

The inocula were prepared as described in our previous study protocol (Melloul et al., 2016) and adjusted in MOPS [3 (N-morpholino) – propanesulphonic acid – buffered RPMI (Roswell Park Memorial institute) 1640 [pH 7.0] (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) + 10% of FBS (foetal bovine serum) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) to obtain the final working concentrations for each experiment.

Single and Mixed Biofilm Formation

The preparation steps for mixed biofilm formation were prepared as previously described (Melloul et al., 2016). Briefly, equal volumes of microbial suspensions (10^5 conidia/mL for *A. fumigatus* and 10^6 cells/mL for *S. maltophilia*) were simultaneously added on polystyrene supports, 96-well microtiter plates (Thermo Fisher Scientific Inc., Villebon sur Yvette, France) or Lab-Tek™ slides (Nunc™, Thermo Fisher Scientific Inc.). For single biofilms (Af or Sm), a volume of RPMI + FBS medium was added to microbial suspension. Biofilms were incubated at 37°C in static condition. Then, cultures were washed twice with phosphate buffer saline (PBS) to eliminate planktonic cells. To evaluate the strain-specific antibiosis effect of bacteria on fungal growth, DNA quantification of bacteria or fungi was performed on the fungal and the mixed biofilms after 16 h of culture, the time at which the fungal inhibition reached its maximum in our reference model (Melloul et al., 2016). To observe the *A. fumigatus* hyphal phenotype in the presence or absence of bacteria strains, biofilms were incubated for 24 h (Melloul et al., 2016).

Assessment of Conidial and Bacterial Equivalent by Real Time PCR

The biofilms were washed twice before incubation for 2 h at 56°C with 250 μL of tissue lysis buffer (Buffer ATL, Qiagen). They were then scraped to recover all adherent organisms, and

washed with 250 μ L of PBS. The samples were then homogenized as previously described (Melloul et al., 2014) and extracted with the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Quantification of the amount of *A. fumigatus* and *S. maltophilia* DNA was performed by multiplex qPCR targeting 28S rRNA and 23S rRNA genes, respectively, following the protocol already described in our previous study (Melloul et al., 2016). Fluorescence curves were analyzed using LightCycler software V3.5 and results were expressed in conidial equivalent (CE) or bacterial equivalent (BE) in comparison with a standard curve plotted on DNA samples extracted from co-inoculated solutions with different doses of *A. fumigatus* conidia ($1-10^8$ conidia) and *S. maltophilia* ($10-10^9$ cells). This experiment was performed in duplicate using three samples per biofilm.

Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)

Investigations of *A. fumigatus* phenotypic modifications in mixed biofilm, as compared with those seen in fungal biofilm, were carried out by CLSM after 24 h of culture at 37°C. Af13073-GFP was visualized with FITC filter. The others *A. fumigatus* strains were visualized after Calcofluor-white (Invitrogen, Villebon sur Yvette, France) coloration with DAPI filter. The biofilms were examined under Zeiss LSM 510 META microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany). CLSM was used to measure biofilm thicknesses, via Z stack analyses, using ImageJ program³.

Transmission Electron Microscopy (TEM)

The biofilm preparation for TEM analyses was performed as previously described (Melloul et al., 2016). Briefly, samples were fixed with 2.5% glutaraldehyde-cacodylate buffer (pH 6.5) and then post-fixed with osmium tetroxide and dehydrated with different dilutions of alcohol (50–100%). The samples were then embedded into EPON resin and left to polymerize. Ultra-fine sections were obtained using a Leica UC7-RT ultramicrotome, and contrasted with lead-citrate and uranyl-acetate solutions. Specimens were mounted on grids to be examined under the microscope (JEOL 100 CX II instrument, Japan). TEM was used to measure the cell wall thickness of *A. fumigatus* in single and mixed biofilms using ImageJ program.³ For both biofilms, between 10 and 20 measurements of cell wall thickness were performed on 15 different hyphae.

Growth Phenotype of *S. maltophilia* Strains

S. maltophilia inocula at 10^8 cells/mL were incubated at 25 or 37°C with shaking (200 rpm: planktonic phase) for 24 h or under static condition (biofilm phase) for 4 h (adhesion assay) or 24 h (biofilm formation assay). The analysis of planktonic bacterial growth was performed by spectrophotometry. The absorbance was measured relative to medium alone at 600 nm by optical density. The adhesion and biofilm formation assays were assessed by crystal violet staining method, as previously

described (Melloul et al., 2016). After 4 or 24 h of culture in static condition, the samples were washed twice with PBS. Then, a solution of 200 μ L of crystal violet 0.1% was added to wells and samples were incubated for 20 min at room temperature and washed three times with PBS before adding 200 μ L of acetic acid (30%). These analyses were performed on the spectrophotometer at 550 nm (Multiskan™ FC, Thermo Fisher Scientific Inc.).

Co-infection of *A. fumigatus* and *S. maltophilia* in *Galleria mellonella* Model

An *in vivo* infection model with *A. fumigatus* and *S. maltophilia* was constructed using larvae of *G. mellonella* to determine the virulence of these two pathogens separated and together. The reference strain Af13073 was tested alone and in co-inoculation with six different *S. maltophilia* strains (Sm13637, Sm_6-1, Sm_2-1, Sm_2-2, Sm_D-1, and Sm_D-2). *A. fumigatus* inoculum of 10^7 conidia/mL and *S. maltophilia* inocula of 10^8 CFU/mL each were prepared in PBT-Tween (PBST). Survival curves were drawn after single inoculation of 10 μ L of bacterial or conidial solution in the last left pro-leg using a Hamilton syringe. For co-inoculation, 20 μ L of mixed solution of *A. fumigatus* and *S. maltophilia* was injected. A group of non-inoculated larvae and a group of larvae inoculated with 20 μ L PBST were used as controls. The larvae were incubated in Petri dishes at 37°C for 7 days and their mortality, defined by absence of movement after touch, was daily checked. The results from three separate experiments were combined.

Statistical Analysis

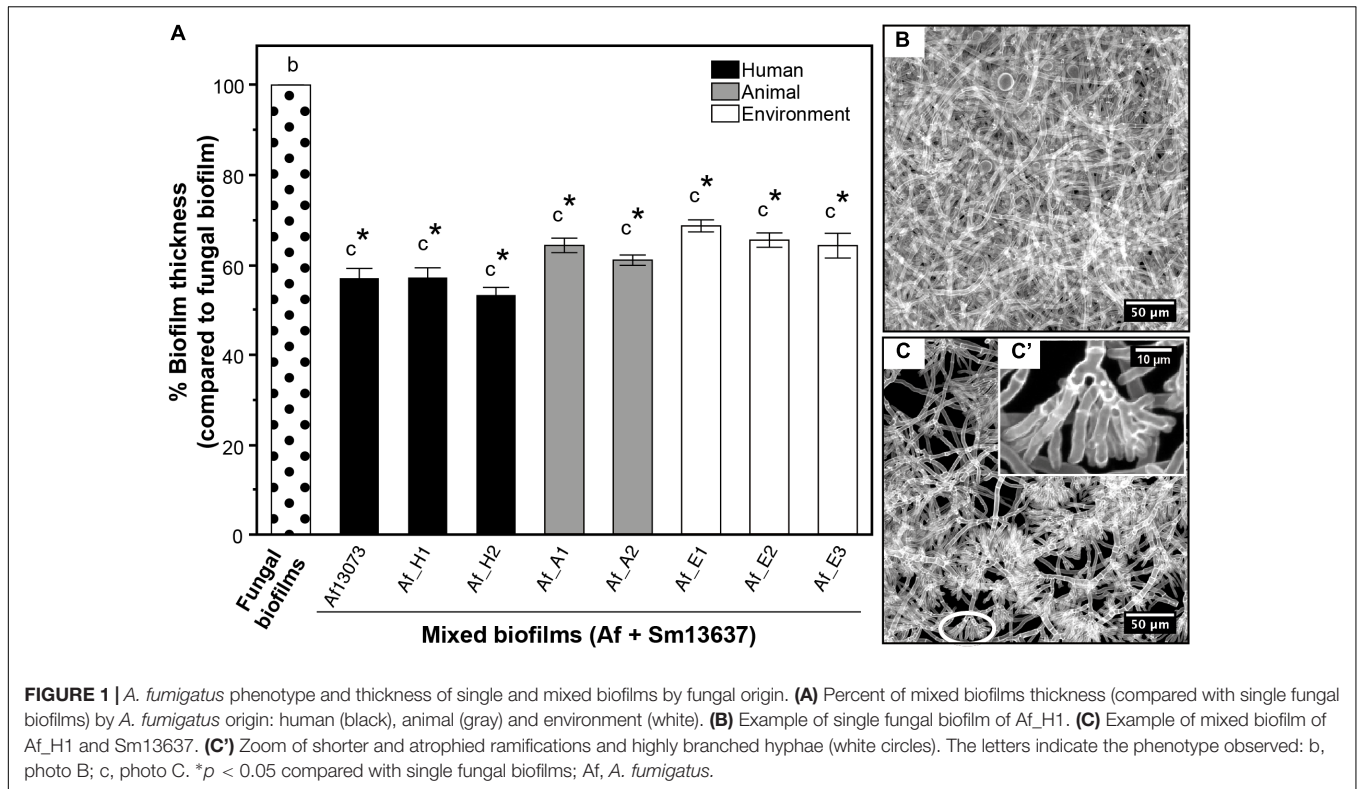
Statistical analyses were performed using JMP 13.0 software. Data of continuous variables are presented in means \pm standard errors of the mean. *P*-value was significant if <0.05 . Data were analyzed by Kruskal-Wallis (one-way variance analysis) test in order to compare the concentrations of *A. fumigatus* and/or *S. maltophilia* in single and mixed biofilms. Linear regression and correlation (Spearman rank correlation) were conducted to assess the relationship between the concentration of bacteria and fungi in mixed biofilms. Microscopy data (TEM and CLSM) were subjected to Wilcoxon and Kruskal-Wallis tests to compare the means of biofilm and fungal cell wall thicknesses in the single and mixed biofilms. The virulence data were analyzed by Kaplan-Meier survival curves using JMP 13.0 software. The different groups were compared to negative control and between them using log-rank test (JMP 13.0).

RESULTS

Genotyping of *S. maltophilia* Strains

The analysis and the comparison of genome sequencing of the nine *S. maltophilia* strains showed three different genogroups (6, 2, and D) (Table 1). The two clinical strains isolated from humans and the one isolated from a dog were of genogroup 6 and named Sm_6-1, Sm_6-2, and Sm_6-3, respectively. The reference

³<http://imagej.nih.gov/ij/>



strain Sm13637 also belonged to genogroup 6. The strains isolated from horse trachea belonged to genogroup 2 and named Sm_2-1 and Sm_2-2. The strains originated from hospital environment belonged to genogroup D and named Sm_D-1, Sm_D-2, and Sm_D-3. These isolates were not genetically related.

Phenotype Modifications of Different *A. fumigatus* Strains in the Presence of Sm13637

Seven combinations of *S. maltophilia* and *A. fumigatus* strains were tested *in vitro* according to the mixed biofilm model protocol and in comparison with our reference model (Af13073 + Sm13637). Each of the different *A. fumigatus* strains was co-inoculated at a concentration of 10^5 conidia/mL with Sm13637 at 10^6 cells/mL. Upon comparison with the single fungal biofilms, the morphological aspect of the seven *A. fumigatus* strains in the mixed biofilms was modified in the presence of Sm13637 (Figure 1), i.e., exhibiting atrophied structures and highly branched patterns with shorter ramifications at the tip, as previously described with Af13073 and Sm13637. The CLSM analysis showed a significant decrease of mixed biofilms thicknesses compared with fungal biofilms, irrespective of *A. fumigatus* strains origin ($p < 0.0001$) (Figure 1A). The mean thicknesses of single fungal biofilms were 48.1 ± 1.1 , 38.9 ± 1.0 , and 30.3 ± 0.8 μm for *A. fumigatus* strains originated from human, animal and environment, respectively, with no significant difference between these strains and Af13073. The thickness of mixed biofilms was divided by 1.8, 1.6, or

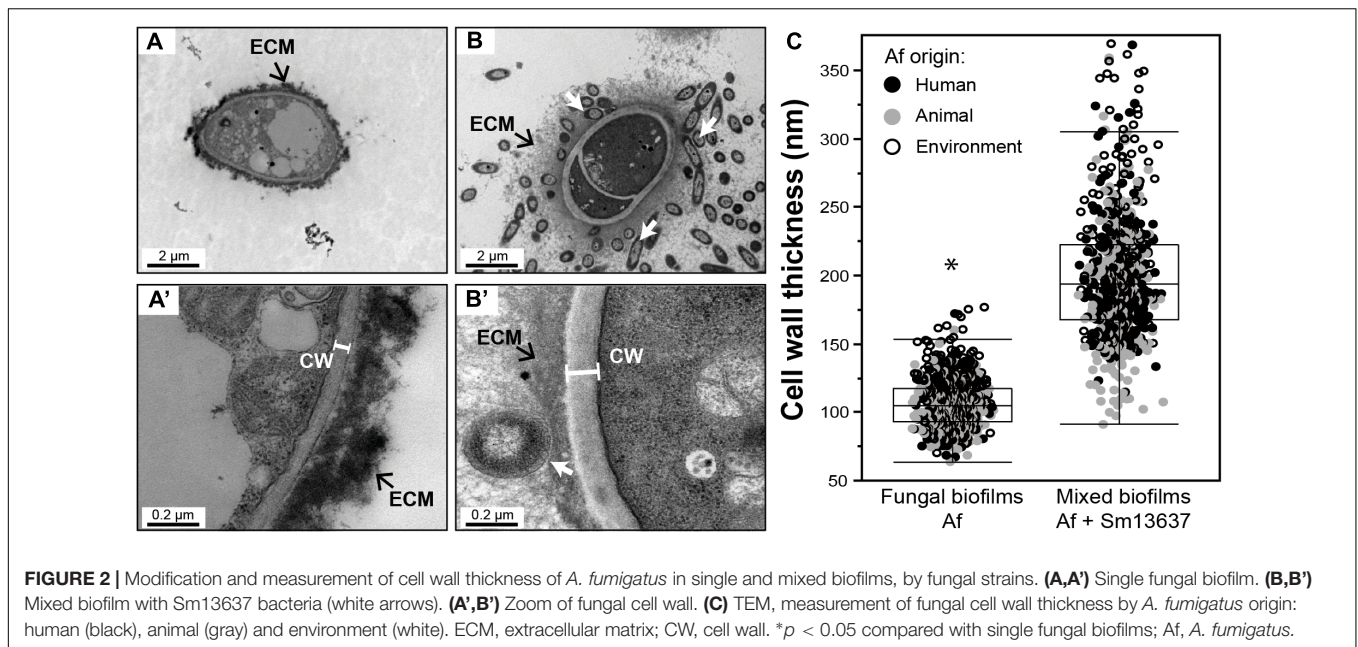
TABLE 2 | Quantification of fungal DNA in single and mixed biofilms by Af strains.

Strains	Log CE/mL \pm SE		
	Fungal biofilm	Mixed biofilm (with Sm13637)	<i>P</i> -value
Af13073	7.10 ± 0.02	5.97 ± 0.06	<0.0001 *
Af_H1	7.59 ± 0.05	6.69 ± 0.21	0.0051 *
Af_H2	7.62 ± 0.02	6.78 ± 0.16	0.0051 *
Af_A1	7.63 ± 0.02	6.49 ± 0.12	0.0051 *
Af_A2	7.17 ± 0.06	5.91 ± 0.19	0.0003 *
Af_E1	7.15 ± 0.03	6.23 ± 0.03	0.0051 *
Af_E2	6.80 ± 0.03	5.62 ± 0.13	0.0051 *
Af_E3	6.76 ± 0.06	5.84 ± 0.08	0.0051 *

Log CE (fungi)/mL \pm standard error, **p*-value is significant if <0.05, Af, *A. fumigatus*; Sm, *S. maltophilia*.

1.5 (mean of 27.3 ± 0.7 , 24.5 ± 0.7 , and 20.5 ± 0.6 μm) for *A. fumigatus* strains originated from humans, animals and environment, respectively, compared with single fungal biofilms with no difference between the strains themselves (Figure 1A).

The quantification of fungal DNA (log CE/mL) was run for the seven *A. fumigatus* strains in the single and mixed biofilms with Sm13637, and compared with the reference strain Af13073. Sm13637 strain significantly reduced the fungal growth in all mixed biofilms tested with the eight *A. fumigatus* strains ($p < 0.0001$) (Table 2). The difference of fungal DNA concentrations between fungal and mixed biofilms, for each tested *A. fumigatus* strain was comprised between 0.8 and 1.2 log.



There was no significant difference between the strains and the reference Af13073 in this concern.

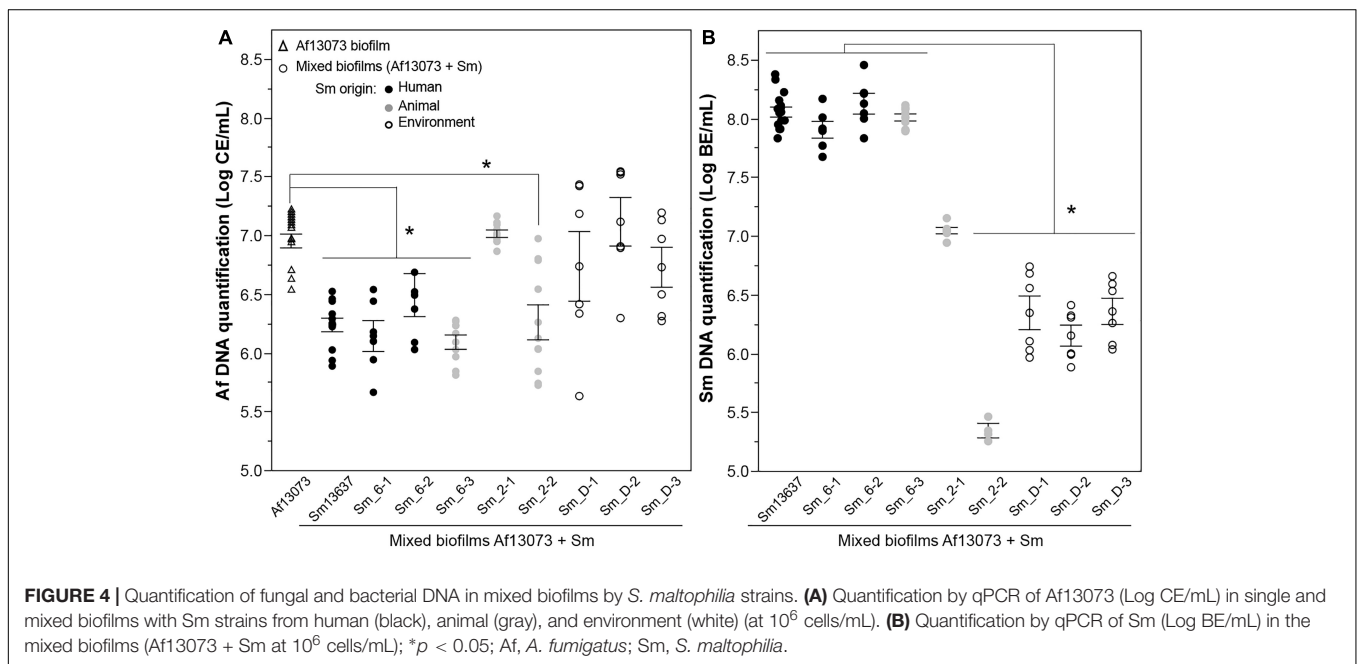
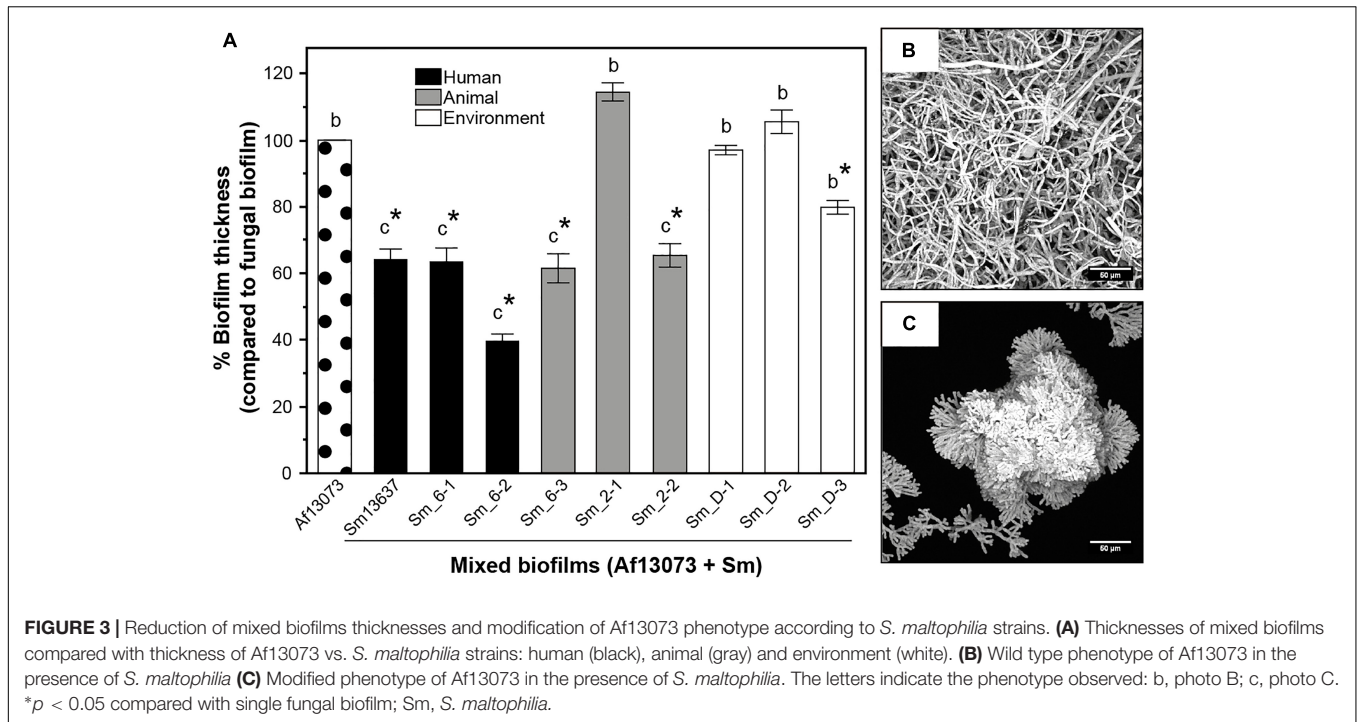
As already observed with Af13073 in our previous study, a mixed biofilm was created with each of the *A. fumigatus* strains, as evidenced by the presence of the extracellular matrix (ECM) (Figure 2). The cell wall thickness of *A. fumigatus* hyphae of strains originated from humans, animals and environment was modified in the presence of Sm13637, in a similar way to what was observed with Af13073 (Figures 2A,B), i.e., the fungal cell wall thickness significantly increased ($p < 0.0001$). This result was supported by the highly branched phenotype observed via CLSM analysis (Figure 1).

Antibiosis Effect of *S. maltophilia* Strains on Af13073

Eight combinations of Af13073 with different *S. maltophilia* strains were tested *in vitro* and compared with the reference model (Sm13637 + Af13073). As previously observed with Sm13637, a mixed biofilm was created with all *S. maltophilia* strains, as evidenced by the presence of the extracellular matrix surrounding pathogens (data not shown). However, at 37°C, the bacterial antibiosis effect on Af13073 was not observed with all of the *S. maltophilia* strains. After 24 h of culture, the thickness of mixed biofilms was less than that of fungal biofilm when Af13073 was in co-culture with *S. maltophilia* strains of genogroup 6 (Sm13637, Sm_6-1, Sm_6-2, Sm_6-3), of genogroup 2 (only one, Sm_2-2) and of the environmental strain Sm_D-3 (Figure 3A). Compared with Sm_D-3 that presented wild type phenotype (Figures 3A,B), strains of genogroup 6 (Sm13637, Sm_6-1, Sm_6-2, Sm_6-3) and Sm_2-2 induced shorter ramifications, highly branched patterns and a decrease of biofilm thickness (Figures 3A,C). In contrast, no hyphae modification or biofilm thickness decrease was induced by strain Sm_2-1 and other strains of genogroups D (Figure 3).

The quantification of bacterial and fungal DNA (log BE or CE/mL, respectively) was also performed for the eight *S. maltophilia* strains Sm13637 and Af13073 in the mixed biofilms, and compared with the fungal DNA in the single biofilm (Af13073). In the mixed biofilms, the quantification of fungal DNA showed a significant inhibition of fungal growth in the presence of clinical *S. maltophilia* strains of genogroup 6 ($p < 0.0001$) (Figure 4A). The concentration of bacterial DNA in these biofilms was higher than 10^8 BE/mL (Figure 4B). Interestingly, Sm_2-2 strain (animal, genogroup 2) induced an inhibition of *A. fumigatus* growth ($p = 0.0104$), but the bacterial concentration in the mixed biofilm was low, below 10^5 BE/mL (Figure 4). In contrast, mixed biofilm associating Af13073 and *S. maltophilia* strains from genogroup D (environment) or Sm_2-1 (animal, genogroup 2) did not exhibit a significant inhibition of fungal DNA concentration ($p = 0.419$) compared with single biofilm of Af13073 (Figure 4A). The bacterial DNA concentration in mixed biofilm was low for the environmental strains of *S. maltophilia* (average of 10^6 BE/mL), but relatively high for the Sm_2-1 strain originated from animal (10^7 BE/mL) (Figure 4B). The concentration of *S. maltophilia*-genogroup 6 DNA in the mixed biofilm was higher than that of genogroup D ($p < 0.001$). The bacterial and fungal concentrations were inversely related (Spearman's $\rho = -0.4572$, $p = 0.0075$). When the concentration of bacteria was high, the concentration of *A. fumigatus* was low and vice versa. Sm_2-1 and Sm_2-2 strains of genogroup 2 did not behave in the same way. Sm_2-1 developed properly in the mixed biofilm but had no impact on the fungal DNA concentration. Conversely, Sm_2-2 strain induced a decrease of fungal biomass ($p < 0.0001$) despite its weaker bacterial growth compared with Sm13637 ($p < 0.0386$) (Figure 4).

The highly branched fungal phenotype observed in the presence of *S. maltophilia* strains of genogroup 6 was always

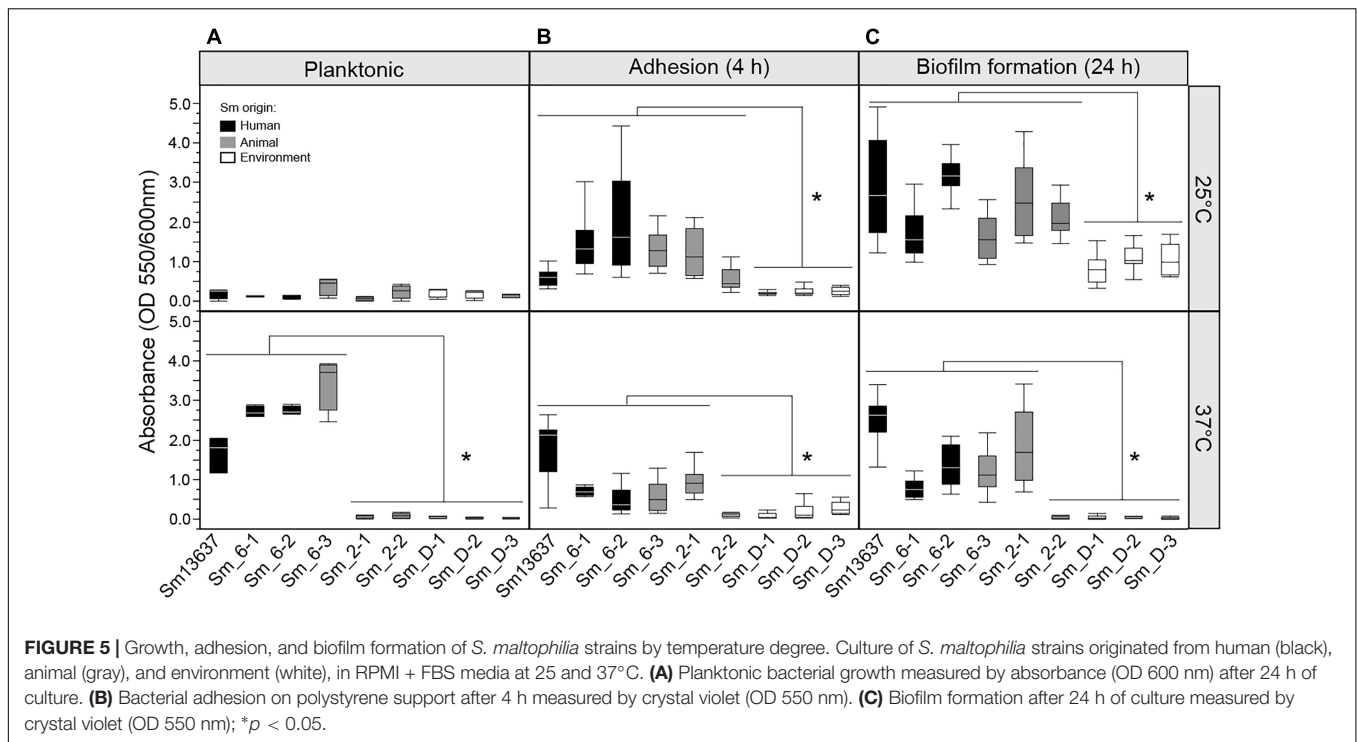


correlated with an increase of more than twofold in the fungal cell wall thickness (data not shown).

Growth of *S. maltophilia* Strains in Planktonic or Biofilm Conditions According to Temperature Level

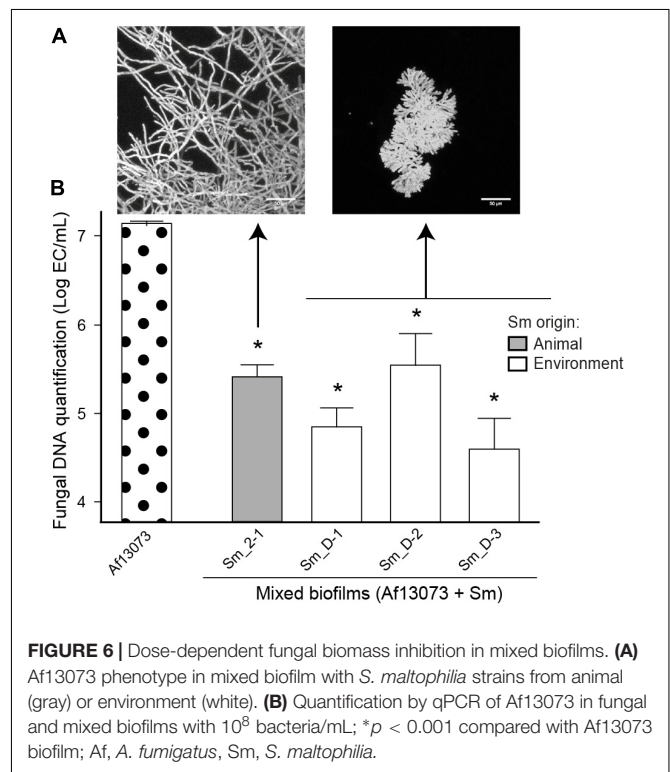
The growth and fitness of different *S. maltophilia* strains were evaluated at 25 and 37°C in RPMI + FBS media to

analyze the impact of the temperature factor on the mixed biofilm model. Temperature had a positive effect on planktonic growth of *S. maltophilia* strains of genogroup 6 ($p < 0.0001$) (Figure 5A). Indeed, these strains grew faster at 37°C than at 25°C. Conversely, the strains of genogroups 2 and D grew equally at 37 and 25°C (Figure 5A). All of the tested bacteria were able to adhere to polystyrene surface after 4 h of culture in static condition, regardless of temperature (Figure 5B). However, the adhesion was weaker for the three strains of genogroup D and one



strain of genogroup 2 (Sm_2-2) compared with the other strains. The results of adhesion were correlated with the formation of biofilm (after 24 h of culture). Thus, strains of genogroup 6 and Sm_2-1 of genogroup 2 were able to form the strongest biofilms ($p < 0.0001$) (Figure 5C).

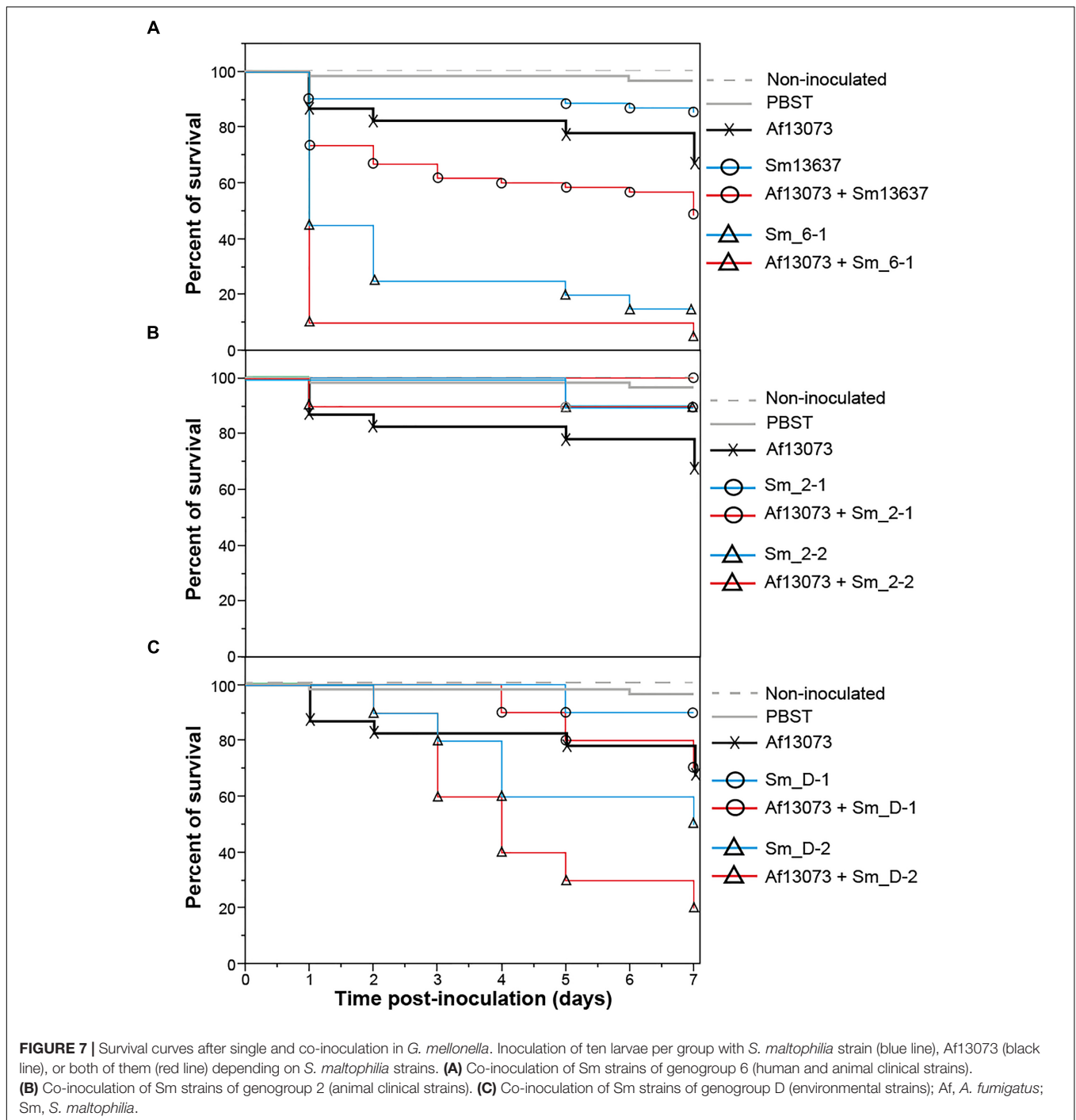
Bacterial strains of genogroup 6 were able to grow at 37°C and to induce a significant decrease of fungal growth ($p < 0.001$) and to modify the phenotype of *A. fumigatus* hyphae in the presence of 10^6 bacteria/mL. Strains of genogroup D had weaker growth at 37°C and did not modify the fungal phenotype. To the contrary to genogroup D strains, Sm_2-2 modified the fungal phenotype and decreased its biomass in spite of the low concentrations of the bacteria. Interestingly, Sm_2-1 from genogroup 2 grew at 37°C in biofilm condition but did not induce an inhibition of growth or a modification of *A. fumigatus* phenotype at this concentration of inoculum. Consequently and in order to assess the bacterial concentration effect on its antibiosis observed on *A. fumigatus*, the bacterial inoculum was increased 100-fold (10^8 cells/mL) for Sm_2-1, Sm_D-1, Sm_D-2, and Sm_D-3. At this bacterial concentration, the modified fungal phenotype (Figure 6A) and the reduction of the fungal growth (Figure 6B) were observed in the mixed biofilm of Af13073 and Sm_D-1, Sm_D-2, and Sm_D-3 ($p < 0.001$). In contrast, even with higher concentration (10^8 or 10^9 cells/mL), Sm_2-1 had no effect hyphal phenotype of Af13073, but only on the fungal growth ($p = 0.0018$) (Figure 6).



Virulence of *A. fumigatus* and *S. maltophilia* in vivo in *G. mellonella*

The pathogenicity of six different strains of *S. maltophilia* was evaluated both with the bacteria alone and in association with the

reference strain Af13073 in an *in vivo* model of *G. mellonella*. Two strains originated from human (Sm13637 and Sm_6-1), two from animal (Sm_2-1 and Sm_2-2) and two from the environment (Sm_D-1 and Sm_D-2) were tested *in vivo*. The control groups



of larvae presented mortality of less than 5%. Af13073 strain exhibited 30% mortality rate with a concentration of 10^5 of inoculated conidia per larvae (Figure 7). The mortality rate with *S. maltophilia* varied between the strains irrespective of the strain origin. The clinical strain isolated from a CF patient (Sm_6-1) showed more than 50% mortality in *G. mellonella* at D1 after inoculation, unlike other strains, ranging between 0 and 10% (Figure 7). Sm13637 in co-culture with Af13073 showed a synergistic effect in *G. mellonella*. Their co-inoculation

resulted in 50% mortality, which was more than the sum of Sm13637 virulence (10% mortality) and Af13073 (30% mortality) (Figure 7). Sm_6-1 showed also an increase of mortality of *G. mellonella* in the presence of Af13073, with a significant synergistic effect of co-inoculation observed at D1 (90% of mortality for co-inoculation vs. 50% for Sm_6-1 and 10% for Af13073), but this mortality rate was too high to observe potential synergistic effect at D7. For *S. maltophilia* strains of genogroup 2, the survival curves observed with the bacteria alone and

after co-inoculation of Af13073 and *S. maltophilia* were similar (Figure 7). Af13073 exhibited slightly higher mortality alone (30%) than in co-inoculation with Sm_2-1 or Sm_2-2 (0 and 10%) (Figure 7). For Sm_D-1, the virulence of the co-inoculation was similar to the Af13073 virulence and the presence of the bacteria did not seem to increase it. Sm_D-2, in co-inoculation with Af13073, induced a higher mortality rate (80%) at D7 compared to bacteria and fungi alone (50 and 30%, respectively) with no synergistic effect. Finally, a synergistic effect was observed with only one human clinical *S. maltophilia* strain in co-inoculation with Af13073.

DISCUSSION

The association of bacteria and fungi in biofilm is a common finding in lungs of CF patients or in the respiratory tract of patients with chronic lung diseases (Frey-Klett et al., 2011). In these biofilms, fungi, and bacteria have to compete or cooperate for space and nutrients and their interactions are mediated by different direct or indirect mechanisms with different degrees of specificity (spanning along the mutualism-antagonism continuum) (Hacquard, 2017). For the first time, our study demonstrated that human, animal and environmental strains of *A. fumigatus* were subjected to an antibiosis effect by *S. maltophilia*, i.e., highly branched hyphae, fungal growth inhibition, and modification of fungal cell wall (Melloul et al., 2016). This antibiosis effect was variable according to *S. maltophilia* strains and their fitness. Most of the clinical and environmental strains were able to induce an antibiosis effect but this effect was dependent on the bacterial growth. A higher bacterial concentration was needed for the environmental *S. maltophilia* strains to induce antibiosis because these strains grew weaker at 37°C compared with clinical strains. However, not all strains were able to induce antibiosis. A clinical strain originated from horse trachea (Sm_2-1) was not able to make Af13073 develop highly branched hyphae, but was able to form strong biofilm at 37°C. A bacterial inoculum of 1000-fold higher failed to modify the phenotype of *A. fumigatus*. A significant increase in mortality of *G. mellonella* larvae was seen upon co-inoculation with *A. fumigatus* and *S. maltophilia*, but this effect is bacterial strain-dependent. A synergistic effect on mortality was observed in co-inoculation of human clinical *S. maltophilia* strain (Sm13637) with Af13073.

In the present study, the antibiosis was evaluated with different strains of *S. maltophilia* and *A. fumigatus* originated from human, animal and environmental. All of the tested *A. fumigatus* strains were able to form single and mixed biofilms with the reference strain Sm13637, and to produce ECM enclosing the fungal hyphae with or without the bacteria. The antibiosis effect of Sm13637 on *A. fumigatus* was observed on all the tested *A. fumigatus* strains and it did not seem to be fungal strain-dependent. Previous studies have already evaluated the potential fungal strain-dependence of antagonism effect of bacteria such as *P. aeruginosa* (Mowat et al., 2010). The study of Mowat et al. conducted on different clinical strains of *A. fumigatus* showed no difference when the strains were co-inoculated with

P. aeruginosa. Ferreira et al. (2015) and Nazik et al. (2017) have assessed the inhibition of *A. fumigatus* strains (9 CF + 3 non-CF, and 12 CF + 12 non-CF strains, respectively), in the presence of *P. aeruginosa*. As in our study, the authors found that *P. aeruginosa* had a similar effect on the fungal morphology, irrespective of the studied *A. fumigatus* strains.

The different *S. maltophilia* strains used in the present study did not show the same effect on the tested fungi, i.e., *S. maltophilia* strains were not all able to induce highly branched fungal phenotype at 37°C after 24 h of culture and with a starter inoculum of 10⁶ bacteria/mL. The environmental strains (genogroup D) and the clinical strains originated from animals (genogroup 2) had weaker growth at 37°C in planktonic phase than the clinical strains of genogroup 6 (humans and animals). However, at the same temperature, Sm_2-1 of genogroup 2, isolated from horse, was able to form bulky biofilm (3 times bigger, similar to genogroup 6 strains) compared with other strains of genogroup 2 and D. The difference of *S. maltophilia* fitness at 37°C could explain the difference of their antibiosis effect which seems to be concentration-dependent. When a higher concentration of the bacteria (10⁸ cells/mL) from environmental strains was inoculated, fungal growth inhibition and modification of hyphal phenotype were observed in the mixed biofilm. A similar fungal growth inhibition was induced by Sm_2-1 at 10⁸ cells/mL in mixed biofilm with no modification of hyphal phenotype. Thus, the highly branched phenotype of *A. fumigatus* is attributed to bacterial growth (bacterial-concentration dependent) or to a deficiency in the putative production of the antifungal compound(s).

Several studies showed the effect of bacterial strain origins on fungal antagonisms, e.g., between *A. fumigatus* and *P. aeruginosa* (Ferreira et al., 2015; Shirazi et al., 2016). The authors observed a significant difference of fungal inhibition caused by *P. aeruginosa* isolates taken from CF-patients and non-CF patients; where the first had a stronger inhibition of *A. fumigatus* than the second. Some studies have demonstrated the antagonism interactions between *A. fumigatus* and *P. aeruginosa* via different kind of molecules, such as proteins, dirhamnolipids and phenazines (Yadav et al., 2005; Mowat et al., 2010; Briard et al., 2015, 2017; Shirazi et al., 2016; Sass et al., 2018), which the microorganisms secrete facing competition for the same nutrients and space. However, when the two microorganisms are separated by mass spectrometry. *P. aeruginosa* release volatile compounds that promote *A. fumigatus* growth and subsequently the invasion of the lung parenchyma (Briard et al., 2016).

Bacteria like *S. maltophilia* or *Lysobacter enzymogenes* produce antifungal metabolites such as maltophilin, dihydromaltophilin or heat-stable antifungal factor (HSAF), and polycyclic tetramate macrolactams (Jakobi et al., 1996; Yu et al., 2007; Su et al., 2017). Studies showed the antagonism triggered by the bacteria via those molecules on fungal species, such as *A. nidulans* (Li et al., 2006) or *Candida albicans* (Ding et al., 2016). Maltophilin, a macrocyclic lactam agent, was described as an antifungal agent several years ago and could be accounted for the antibiosis effect of *S. maltophilia* on *A. fumigatus* (Jakobi et al., 1996; Yu et al., 2007; Ding et al., 2016). Other factors, still not well characterized,

can affect the mixed biofilm formation. Under this account, *S. maltophilia* biofilm can strongly be affected by temperature, pH and even by trimethoprim-sulfamethoxazole, as observed on a collection of different strains of *S. maltophilia* (Biocanin et al., 2017). Corlouer et al. (2017) reported that the *S. maltophilia* genogroups 6 and 2 were the most common strains in a French hospitalized population and they represented 75% of the strains isolated from patients with CF. These *S. maltophilia* strains seem to be well adapted to human and animal hosts because of their fitness at 37°C. Moreover, according to the present study, the pathogenicity of these strains might increase by the presence of *A. fumigatus*, as described in a recent study (Granchelli et al., 2018).

In alignment with the previous reports on *P. aeruginosa* and *A. fumigatus* (Reece et al., 2018), we described a significant increased in larvae mortality rate when *A. fumigatus* and *S. maltophilia* were inoculated in the same time, except for *S. maltophilia* of genogroup 2. This effect is dependent on the *S. maltophilia* strain used in the combination. Two *S. maltophilia* strains isolated from human clinical cases contributed to the increase larvae mortality in co-infection with the *A. fumigatus* strain originated from invasive aspergillosis patient. This *in vivo* effect do not seem correlated with the antibiosis effect observed *in vitro* at 37°C. This could also be explained by, for instance, the strain-dependent variation of maltophilin biosynthesis (Jakobi et al., 1996). The virulence of the other *S. maltophilia* strains was not synergistically increased in the presence of Af13073, except for one environmental strain. Interestingly, the clinical strain Sm_6-1 originated from CF-patient is the most virulent strain in *G. mellonella* model and incurred high mortality, suggesting that these isolates could be more pathogenic. It might be interesting to inoculate 2 strains of *S. maltophilia* and *A. fumigatus* from the same CF patient to analyze their virulence in *G. mellonella*, as described recently for *P. aeruginosa* and *A. fumigatus* (Reece et al., 2018). We probably would not have an increase in larvae mortality due to adaptation of these isolates to co-exist in the same environment.

Overall, these findings show specific bacterial and fungal interactions that could modify their pathogenicity in the respiratory tract of patients.

In summary, this is the first study to demonstrate that human, animal, and environmental strains of *A. fumigatus* and *S. maltophilia* form single and mixed biofilms. The latter are Sm strain-dependent, thus are variable in terms of thickness and antibiosis on *A. fumigatus*. It seems that the production of molecules that can modify the fungal phenotype is *S. maltophilia* strain dependent, e.g., some strains do not produce such

molecules or produce very little. Moreover, bacterial clinical strains of genogroup 6 form a weaker mixed biofilm and a more highly branched *A. fumigatus* phenotype than the environmental strains, probably due to an adaptation to body temperature. In such conditions, *A. fumigatus* cell wall thickness increased which might be correlated with the modified antifungal susceptibility. However, it will be necessary to test a larger number of strains in order to assess the origin effect of *S. maltophilia* strains on mixed biofilm.

Further studies covering *A. fumigatus* resistance mechanisms, like efflux pumps modifications, in the presence of *S. maltophilia*, could be interesting in patients having respiratory tract chronic infections caused by these two microorganisms. Finally, the mixed biofilm model could be an interesting experimentation field to evaluate the susceptibility to relevant antimicrobial agents, alone and in combination.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

EM and FB coordinated the design of the study. EM and LR participated in standardization of biofilms, qPCR, and crystal violet quantification, carried out TEM, and fluorescent microscopy. VR and DJ participated in *in vitro* experiments. M-FD performed the *in vivo* experiments in *G. mellonella* model. EM performed the statistical analysis. J-WD and P-LW performed the genotyping of *S. maltophilia* and helped with the analysis of the bacteria. FB and EM draft writing of the manuscript. LR, ED, JG, J-WD, and P-LW participated in the analysis of the results and have completed the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

FUNDING

This work was supported in part by ASTELLAS Laboratory. This work was presented in part at the 8th Trends in Medical Mycology (TIMM) Congress (Serbia, October 2017). The funding had no role in designing the study or in collecting, analyzing, and interpreting the data or in writing the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

To Christelle Gandolphe, Xavier Decrouy, Patrick Ausset, and Michel Maillé for their work on the microscopy platforms. To Suhad Assad for her critical linguistic reviewing.

REFERENCES

- Anand, R., Clemons, K. V., and Stevens, D. A. (2017). Effect of anaerobiosis or hypoxia on *Pseudomonas aeruginosa* inhibition of *Aspergillus fumigatus* biofilm. *Arch. Microbiol.* 199, 881–890. doi: 10.1007/s00203-017-1362-5
- Bafadhel, M., McKenna, S., Agbetile, J., Fairs, A., Desai, D., Mistry, V., et al. (2014). *Aspergillus fumigatus* during stable state and exacerbations of COPD. *Eur. Respir. J.* 43, 64–71. doi: 10.1183/09031936.00162912
- Baldan, R., Cigana, C., Testa, F., Bianconi, I., De Simone, M., Pellin, D., et al. (2014). Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis airways influences virulence of *Staphylococcus aureus* in vitro and murine models of co-infection. *PLoS One* 9:e89614. doi: 10.1371/journal.pone.0089614
- Baxter, C. G., Rautemaa, R., Jones, A. M., Webb, A. K., Bull, M., Mahenthiralingam, E., et al. (2013). Intravenous antibiotics reduce the presence of *Aspergillus* in adult cystic fibrosis sputum. *Thorax* 68, 652–657. doi: 10.1136/thoraxjnl-2012-202412

- Beaume, M., Kohler, T., Fontana, T., Tognon, M., Renzoni, A., and van Delden, C. (2015). Metabolic pathways of *Pseudomonas aeruginosa* involved in competition with respiratory bacterial pathogens. *Front. Microbiol.* 6:321. doi: 10.3389/fmicb.2015.00321
- Biocanin, M., Madi, H., Vasiljevic, Z., Kojic, M., Jovic, B., and Lozo, J. (2017). Temperature, pH and trimethoprim-sulfamethoxazole are potent inhibitors of biofilm formation by *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates. *Pol. J. Microbiol.* 66, 433–438. doi: 10.5604/01.3001.0010.6996
- Briard, B., Bomme, P., Lechner, B. E., Mislin, G. L., Lair, V., Prevost, M. C., et al. (2015). *Pseudomonas aeruginosa* manipulates redox and iron homeostasis of its microbiota partner *Aspergillus fumigatus* via phenazines. *Sci. Rep.* 5:8220. doi: 10.1038/srep08220
- Briard, B., Heddergott, C., and Latge, J. P. (2016). Volatile compounds emitted by *Pseudomonas aeruginosa* stimulate growth of the fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *mBio* 7:e00219. doi: 10.1128/mBio.00219-16
- Briard, B., Rasoldier, V., Bomme, P., ElAouad, N., Guerreiro, C., Chassagne, P., et al. (2017). Dirhamnolipids secreted from *Pseudomonas aeruginosa* modify anjpeungal susceptibility of *Aspergillus fumigatus* by inhibiting beta1,3 glucan synthase activity. *ISME J.* 11, 1578–1591. doi: 10.1038/ismej.2017.32
- Cabaret, O., Bonnal, C., Canoui-Poitrine, F., Emirian, A., Bizouard, G., Levesque, E., et al. (2016). Concomitant presence of *Aspergillus fumigatus* and *Stenotrophomonas maltophilia* in the respiratory tract: a new risk for patients with liver disease? *J. Med. Microbiol.* 65, 414–419. doi: 10.1099/jmm.0.000233
- Calza, L., Manfredi, R., and Chiodo, F. (2003). *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia* as an emerging opportunistic pathogen in association with HIV infection: a 10-year surveillance study. *Infection* 31, 155–161. doi: 10.1007/s15010-003-3113-6
- Chotirmall, S. H., and McElvaney, N. G. (2014). Fungi in the cystic fibrosis lung: bystanders or pathogens? *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 52, 161–173. doi: 10.1016/j.biocel.2014.03.001
- Corlouer, C., Lamy, B., Desroches, M., Ramos-Vivas, J., Mehiri-Zghal, E., Lemenand, O., et al. (2017). *Stenotrophomonas maltophilia* healthcare-associated infections: identification of two main pathogenic genetic backgrounds. *J. Hosp. Infect.* 96, 183–188. doi: 10.1016/j.jhin.2017.02.003
- Ding, Y., Li, Z., Li, Y., Lu, C., Wang, H., Shen, Y., et al. (2016). HSAF-induced antifungal effects in *Candida albicans* through ROS-mediated apoptosis. *RSC Adv.* 6, 30895–30904. doi: 10.1039/C5RA26092B
- Donlan, R. M., and Costerton, J. W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 167–193. doi: 10.1128/CMR.15.2.167-193.2002
- Ferreira, J. A., Penner, J. C., Moss, R. B., Haagenen, J. A., Clemons, K. V., Spormann, A. M., et al. (2015). Inhibition of *Aspergillus fumigatus* and its biofilm by *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on the source, phenotype and growth conditions of the bacterium. *PLoS One* 10:e0134692. doi: 10.1371/journal.pone.0134692
- Fischer, J., van Koningsbruggen-Rietschel, S., Rietschel, E., Vehreschild, M. J., Wisplinghoff, H., Kronke, M., et al. (2014). Prevalence and molecular characterization of azole resistance in *Aspergillus* spp. isolates from German cystic fibrosis patients. *J. Antimicrob. Chemother.* 69, 1533–1536. doi: 10.1093/jac/dku009
- Frey-Klett, P., Burlinson, P., Deveau, A., Barret, M., Tarkka, M., and Sarniguet, A. (2011). Bacterial-fungal interactions: hyphens between agricultural, clinical, environmental, and food microbiologists. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 75, 583–609. doi: 10.1128/MMBR.0002011
- Granchelli, A. M., Adler, F. R., Keogh, R. H., Kartsonaki, C., Cox, D. R., and Liou, T. G. (2018). Microbial interactions in the cystic fibrosis airway. *J. Clin. Microbiol.* 56:e00354-18. doi: 10.1128/JCM.00354-18
- Hacquard, S. (2017). Commentary: microbial small talk: volatiles in fungal-bacterial interactions. *Front. Microbiol.* 8:1. doi: 10.3389/fmicb.2017.00001
- Jacquier, H., Carbonnelle, E., Corvec, S., Illiaquer, M., Le Monnier, A., Bille, E., et al. (2011). Revisited distribution of nonfermenting Gram-negative bacilli clinical isolates. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 30, 1579–1586. doi: 10.1007/s10096-011-1263-5
- Jakobi, M., Winkelmann, G., Kaiser, D., Kempler, C., Jung, G., Berg, G., et al. (1996). Maltophilin: a new antifungal compound produced by *Stenotrophomonas maltophilia* R3089. *J. Antibiot.* 49, 1101–1104. doi: 10.7164/antibiotics.49.1101
- Li, S., Du, L., Yuen, G., and Harris, S. D. (2006). Distinct ceramide synthases regulate polarized growth in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Mol. Biol. Cell* 17, 1218–1227. doi: 10.1091/mbc.E05-06-0533
- Loeffert, S. T., Melloul, E., Dananche, C., Henaff, L., Benet, T., Cassier, P., et al. (2017). Monitoring of clinical strains and environmental fungal aerocontamination to prevent invasive aspergillosis infections in hospital during large deconstruction work: a protocol study. *BMJ Open* 7:e018109. doi: 10.1136/bmjopen-2017-018109
- Loeffert, S. T., Melloul, E., Gustin, M. P., Henaff, L., Guillot, C., Dupont, D., et al. (2018). Investigation of the relationships between clinical and environmental isolates of *Aspergillus fumigatus* by multiple-locus variable number tandem repeat analysis during major demolition work in a french hospital. *Clin. Infect. Dis.* doi: 10.1093/cid/ciy498 [Epub ahead of print].
- Melloul, E., Luiggi, S., Anais, L., Arne, P., Costa, J. M., Fihman, V., et al. (2016). Characteristics of *Aspergillus fumigatus* in association with *Stenotrophomonas maltophilia* in an in vitro model of mixed biofilm. *PLoS One* 11:e0166325. doi: 10.1371/journal.pone.0166325
- Melloul, E., Thierry, S., Durand, B., Cordonnier, N., Desoubeaux, G., Chandenier, J., et al. (2014). Assessment of *Aspergillus fumigatus* burden in lungs of intratracheally-challenged turkeys (*Meleagris gallopavo*) by quantitative PCR, galactomannan enzyme immunoassay, and quantitative culture. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 37, 271–279. doi: 10.1016/j.cimid.2014.07.005
- Mowat, E., Rajendran, R., Williams, C., McCulloch, E., Jones, B., Lang, S., et al. (2010). *Pseudomonas aeruginosa* and their small diffusible extracellular molecules inhibit *Aspergillus fumigatus* biofilm formation. *FEMS Microbiol. Lett.* 313, 96–102. doi: 10.1111/j.1574-6968.2010.02130.x
- Nazik, H., Moss, R. B., Karna, V., Clemons, K. V., Banaei, N., Cohen, K., et al. (2017). Are cystic fibrosis *Aspergillus fumigatus* isolates different? intermicrobial interactions with *Pseudomonas*. *Mycopathologia* 182, 315–318. doi: 10.1007/s11046-016-0087-3
- O'Brien, S., and Fothergill, J. L. (2017). The role of multispecies social interactions in shaping *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity in the cystic fibrosis lung. *FEMS Microbiol. Lett.* 364:fnx128. doi: 10.1093/femsle/fnx128
- Peters, B. M., Jabra-Rizk, M. A., O'May, G. A., Costerton, J. W., and Shirtliff, M. E. (2012). Polymicrobial interactions: impact on pathogenesis and human disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 25, 193–213. doi: 10.1128/CMR.00013-11
- Pompilio, A., Crocetta, V., De Nicola, S., Verginelli, F., Fiscarelli, E., and Di Bonaventura, G. (2015). Cooperative pathogenicity in cystic fibrosis: *Stenotrophomonas maltophilia* modulates *Pseudomonas aeruginosa* virulence in mixed biofilm. *Front. Microbiol.* 6:951. doi: 10.3389/fmicb.2015.00951
- Ramirez Granillo, A., Canales, M. G., Espindola, M. E., Martinez Rivera, M. A., de Lucio, V. M., and Tovar, A. V. (2015). Antibiosis interaction of *Staphylococcus aureus* on *Aspergillus fumigatus* assessed in vitro by mixed biofilm formation. *BMC Microbiol.* 15:33. doi: 10.1186/s12866-015-0363-2
- Reece, E., Doyle, S., Grealley, P., Renwick, J., and McClean, S. (2018). *Aspergillus fumigatus* inhibits *Pseudomonas aeruginosa* in Co-culture: implications of a mutually antagonistic relationship on virulence and inflammation in the CF airway. *Front. Microbiol.* 9:1205. doi: 10.3389/fmicb.2018.01205
- Reece, E., Segurado, R., Jackson, A., McClean, S., Renwick, J., and Grealley, P. (2017). Co-colonisation with *Aspergillus fumigatus* and *Pseudomonas aeruginosa* is associated with poorer health in cystic fibrosis patients: an Irish registry analysis. *BMC Pulm. Med.* 17:70. doi: 10.1186/s12890-017-0416-4
- Sabino, R., Ferreira, J. A., Moss, R. B., Valente, J., Verissimo, C., Carolino, E., et al. (2015). Molecular epidemiology of *Aspergillus* collected from cystic fibrosis patients. *J. Cyst. Fibros* 14, 474–481. doi: 10.1016/j.jcf.2014.10.005
- Sass, G., Nazik, H., Penner, J., Shah, H., Ansari, S. R., Clemons, K. V., et al. (2018). Studies of *Pseudomonas aeruginosa* mutants indicate pyoverdine as the central factor in inhibition of *Aspergillus fumigatus* biofilm. *J. Bacteriol.* 200:e00345-17. doi: 10.1128/JB.00345-17
- Shirazi, F., Ferreira, J. A., Stevens, D. A., Clemons, K. V., and Kontoyiannis, D. P. (2016). Biofilm filtrates of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from cystic fibrosis patients inhibit preformed *Aspergillus fumigatus* biofilms via Apoptosis. *PLoS One* 11:e0150155. doi: 10.1371/journal.pone.0150155

- Su, Z., Chen, H., Wang, P., Tombosa, S., Du, L., Han, Y., et al. (2017). 4-Hydroxybenzoic acid is a diffusible factor that connects metabolic shikimate pathway to the biosynthesis of a unique antifungal metabolite in *Lysobacter enzymogenes*. *Mol. Microbiol.* 104, 163–178. doi: 10.1111/mmi.13619
- Wasylnka, J. A., and Moore, M. M. (2002). Uptake of *Aspergillus fumigatus* Conidia by phagocytic and nonphagocytic cells in vitro: quantitation using strains expressing green fluorescent protein. *Infect. Immun.* 70, 3156–3163. doi: 10.1128/IAI.70.6.3156-3163.2002
- Williams, C., Rajendran, R., and Ramage, G. (2016). *Aspergillus* biofilms in human disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* 931, 1–11. doi: 10.1007/5584-2016-4
- Yadav, V., Gupta, J., Mandhan, R., Chhillar, A. K., Dabur, R., Singh, D. D., et al. (2005). Investigations on anti-*Aspergillus* properties of bacterial products. *Lett. Appl. Microbiol.* 41, 309–314. doi: 10.1111/j.1472-765X.2005.01772.x
- Yu, F., Zaleta-Rivera, K., Zhu, X., Huffman, J., Millet, J. C., Harris, S. D., et al. (2007). Structure and biosynthesis of heat-stable antifungal factor (HSAF), a broad-spectrum antimycotic with a novel mode of action. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 64–72. doi: 10.1128/AAC.00931-06

Conflict of Interest Statement: Over the past 5 years, FB has received grants from Astellas, payments for lectures from MSD, and travel expenses from Pfizer, MSD and Astellas. ED has received money for board membership from Astellas and Innothra, grants from Gilead, Ferrer, and Biorad, payments for lectures from Gilead and MSD, and travel expenses from MSD and Astellas.

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 © 2018 Melloul, Roisin, Durieux, Woerther, Jenot, Risco, Guillot, Dannaoui, Decusser and Botterel. 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.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Melloul E, Roisin L, Durieux MF, Woerther PL, Jenot D, Risco V, *et al.* Interactions of *Aspergillus fumigatus* and *Stenotrophomonas maltophilia* in an *in vitro* mixed biofilm model: does the strain matter? *Front Microbiol.* 2018;9:2850.
2. Cabaret O, Bonnal C, Canoui-Poitrine F, Emirian A, Bizouard G, Levesque E, *et al.* Concomitant presence of *Aspergillus fumigatus* and *Stenotrophomonas maltophilia* in the respiratory tract: a new risk for patients with liver disease? *J Med Microbiol.* 2016;65(5):414–9.
3. Leclair LW, Hogan DA. Mixed bacterial-fungal infections in the CF respiratory tract. *Med Mycol.* 2010;48(Suppl. 1):125–32.
4. Arvanitis M, Glavis-Bloom J, Mylonakis E. Invertebrate models of fungal infection. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1832(9):1378–83.
5. Samson RA, Visagie CM, Houbraeken J, Hong S-B, Hubka V, Klaassen CHW, *et al.* Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Stud Mycol.* 2014;78:141–73.
6. Fang W, Latgé J-P. Microbe Profile: *Aspergillus fumigatus*: a saprotrophic and opportunistic fungal pathogen. *Microbiology.* 2018;164(8):1009–11.
7. He H, Jiang S, Zhang L, Sun B, Li F, Zhan Q, *et al.* *Aspergillus* tracheobronchitis in critically ill patients with chronic obstructive pulmonary diseases. *Mycoses.* 2014;57(8):473–82.
8. Dagenais TRT, Keller NP. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in invasive Aspergillosis. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22(3):447–65.
9. Hamprecht A, Morio F, Bader O, Le Pape P, Steinmann J, Dannaoui E. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus* in patients with cystic fibrosis: a matter of concern? *Mycopathologia.* 2018;183(1):151–60.
10. 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.
11. Latgé J-P. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. *Clin Microbiol Rev.* 1999 Apr;12(2):310–50.
12. Sheppard DC. Molecular mechanism of *Aspergillus fumigatus* adherence to host constituents. *Curr Opin Microbiol.* 2011;14(4):375–9.
13. Raksha, Singh G, Urhekar AD. Virulence factors detection in *Aspergillus* isolates from clinical and environmental samples. *J Clin Diagn Res.* 2017;11(7):13–8.
14. Palleroni J, Bradbury JF. *Stenotrophomonas*, a new bacterial genus for *Xanthornonas maltophilia* (Hugh 1980) Swings *et al.* 1983. *Int J Syst Evol Microbiol.* 1993;43(3):606–9.
15. Denis, F, Ploy, MC, Martin, C, Cattoir, V. *Bactériologie médicale techniques usuelles* (Troisième Édition). Elsevier Masson. 2016.
16. Brooke JS. *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging global opportunistic pathogen. *Clin Microbiol Rev.* 2012;25(1):2–41.
17. Romanenko LA, Uchino M, Tanaka N, Frolova GM, Slinkina NN, Mikhailov VV. Occurrence and antagonistic potential of *Stenotrophomonas* strains isolated from deep-sea invertebrates. *Arch Microbiol.* 2008;189(4):337–44.
18. Lai CH, Wong WW, Chin C, Huang CK, Lin HH, Chen WF, *et al.* Central venous catheter-related *Stenotrophomonas maltophilia* bacteraemia and associated relapsing bacteraemia in haematology and oncology patients. *Clin Microbiol Infect.* 2006;12(10):986–91.
19. Kovaleva J, Degener JE, van der Mei HC. Mimicking disinfection and drying of

- biofilms in contaminated endoscopes. *J Hosp Infect.* 2010;76(4):345–50.
20. Senol E. *Stenotrophomonas maltophilia*: the significance and role as a nosocomial pathogen. *J Hosp Infect.* 2004;57(1):1–7.
 21. Pompilio A, Crocetta V, Confalone P, Nicoletti M, Petrucca A, Guarnieri S, *et al.* Adhesion to and biofilm formation on IB3-1 bronchial cells by *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from cystic fibrosis patients. *BMC Microbiol.* 2010;10:102.
 22. Denton M, Kerr KG. Microbiological and clinical aspects of infection associated with *Stenotrophomonas maltophilia*. *Clin Microbiol Rev.* 1998;11(1):57–80.
 23. Figueirêdo PMS, Furumura MT, Santos AM, Sousa ACT, Kota DJ, Levy CE, *et al.* Cytotoxic activity of clinical *Stenotrophomonas maltophilia*. *Lett Appl Microbiol.* 2006;43(4):443–9.
 24. Trifonova A, Strateva T. *Stenotrophomonas maltophilia* – a low-grade pathogen with numerous virulence factors. *Clin Infect Dis.* 2019;51(3):168–78.
 25. Hauben L, Vauterin L, Moore ERB, Hoste B, Swings J. Genomic diversity of the genus *Stenotrophomonas*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 1999;49(4):1749–60.
 26. Kaiser S, Biehler K, Jonas D. A *Stenotrophomonas maltophilia* multilocus sequence typing scheme for inferring population structure. *J Bacteriol.* 2009;191(9):2934–43.
 27. Corlouer C, Lamy B, Desroches M, Ramos-Vivas J, Mehiri-Zghal E, Lemenand O, *et al.* *Stenotrophomonas maltophilia* healthcare-associated infections: identification of two main pathogenic genetic backgrounds. *J Hosp Infect.* 2017;96(2):183–8.
 28. Adamek M, Linke B, Schwartz T. Virulence genes in clinical and environmental *Stenotrophomonas maltophilia* isolates: a genome sequencing and gene expression approach. *Microb Pathog.* 2014;67–68:20–30.
 29. Adamek M, Overhage J, Bathe S, Winter J, Fischer R, Schwartz T. Genotyping of environmental and clinical *Stenotrophomonas maltophilia* isolates and their pathogenic potential. *PLoS One.* 2011;6(11):e27615.
 30. Nicoletti M, Iacobino A, Prosseda G, Fiscarelli E, Zarrilli R, De Carolis E, *et al.* *Stenotrophomonas maltophilia* strains from cystic fibrosis patients: genomic variability and molecular characterization of some virulence determinants. *Int J Microbiol.* 2011;301(1):34–43.
 31. Scully LR, Bidochka MJ. Developing insect models for the study of current and emerging human pathogens. *FEMS Microbiol Lett.* 2006;263(1):1–9.
 32. Hardin-Pouzet H, Morosan S. Organismes-modèles et réglementation de la recherche animale. *Med Sci (Paris).* 2019;35(2):153–6.
 33. Lionakis MS. *Drosophila* and *Galleria* insect model hosts. *Virulence.* 2011;2(6):521–7.
 34. Mylonakis E, Casadevall A, Ausubel FM. Exploiting amoeboid and non-vertebrate animal model systems to study the virulence of human pathogenic fungi. *PLoS Pathog.* 2007;3(7):e101.
 35. Chamilos G, Lionakis MS, Lewis RE, Kontoyiannis DP. Role of mini-host models in the study of medically important fungi. *Lancet Infect Dis.* 2007;7(1):42–55.
 36. Fuchs BB, Mylonakis E. Using non-mammalian hosts to study fungal virulence and host defense. *Curr Opin Microbiol.* 2006;9(4):346–51.
 37. Jemel S, Julien V, Billaud E, Jenot D, Guillot J, Botterel F, *et al.* Apport du modèle invertébré *Galleria mellonella* pour évaluer l'efficacité des antifongiques dans l'aspergillose invasive. *Société Française de Mycologie Médicale*; 2018.
 38. Kwadha CA, Ong'amo GO, Ndegwa PN, Raina SK, Fombong AT. The biology and control of the greater wax moth, *Galleria mellonella*. *Insects.* 2017;8(2):61.
 39. Junqueira JC. *Galleria mellonella* as a model host for human pathogens. *Virulence.* 2012;3(6):474–6.

40. Champion OL, Wagley S, Titball RW. *Galleria mellonella* as a model host for microbiological and toxin research. *Virulence*. 2016;7(7):840–5.
41. Cook SM, McArthur JD. Developing *Galleria mellonella* as a model host for human pathogens. *Virulence*. 2013;4(5):350–3.
42. Kavanagh K, Reeves EP. Exploiting the potential of insects for *in vivo* pathogenicity testing of microbial pathogens. *FEMS Microbiol Lett*. 2004;28(1):101–12.
43. Mikulak E, Gliniewicz A, Przygodzka M, Solecka J. *Galleria mellonella* L. as model organism used in biomedical and other studies. *Przegl Epidemiol*. 2018;72(1):57–73.
44. Tsai CJY, Loh JMS, Proft T. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. *Virulence*. 2016;7(3):214–29.
45. Singkum P, Suwanmanee S, Pumeesat P, Luplertlop N. A powerful *in vivo* alternative model in scientific research: *Galleria mellonella*. 2019;66(1):31-55
46. Trevijano-Contador N, Zaragoza O. Immune response of *Galleria mellonella* against human fungal pathogens. *J Fungi (Basel)*. 2018;5(1).
47. Ellis JD, Graham JR, Mortensen A. Standard methods for wax moth research. *J Apic Res*. 2015;52(1):1–17.
48. Ramarao N, Nielsen-Leroux C, Lereclus D. The insect *Galleria mellonella* as a powerful infection model to investigate bacterial pathogenesis. *J Vis Exp*. 2012;(70):e4392.
49. Lange A, Beier S, Huson DH, Parusel R, Iglauer F, Frick JS. Genome sequence of *Galleria mellonella* (greater wax moth). *Genome Announc*. 2018;6(2):1220–17.
50. Amorim-Vaz S, Delarze E, Ischer F, Sanglard D, Coste AT. Examining the virulence of *Candida albicans* transcription factor mutants using *Galleria mellonella* and mouse infection models. *Front Microbiol*. 2015;6:367.
51. Eisenman HC, Duong R, Chan H, Tsue R, McClelland EE. Reduced virulence of melanized *Cryptococcus neoformans* in *Galleria mellonella*. *Virulence*. 2014;5(5):611–8.
52. Champion OL, Titball RW, Bates S. Standardization of *G. mellonella* larvae to provide reliable and reproducible results in the study of fungal pathogens. *J Fungi*. 2018;4(3):840–845.
53. Desbois AP, McMillan S. Paving the way to acceptance of *Galleria mellonella* as a new model insect. *Virulence*. 2015;6(5):410–1.
54. Borman AM. Of mice and men and larvae: *Galleria mellonella* to model the early host-pathogen interactions after fungal infection. *Virulence*. 2017;9(1):9–12.
55. Binder U, Maurer E, Lass-Flörl C. *Galleria mellonella*: an invertebrate model to study pathogenicity in correctly defined fungal species. *Fungal Biol*. 2016;120(2):288–95.
56. Fallon J, Kelly J, Kavanagh K. *Galleria mellonella* as a model for fungal pathogenicity testing. *Methods Mol Biol*. 2012;845:469–85.
57. Fuchs BB, O'Brien E, El Khoury JB, Mylonakis E. Methods for using *Galleria mellonella* as a model host to study fungal pathogenesis. *Virulence*. 2010;1(6):475–82.
58. Kavanagh K, Fallon JP. *Galleria mellonella* larvae as models for studying fungal virulence. *Fungal Biol Rev*. 2010;24(1–2):79–83.
59. Jorjão AL, Oliveira LD, Scorzoni L, Figueiredo-Godoi LMA, Prata MCA, Jorge AOC, *et al*. From moths to caterpillars: Ideal conditions for *Galleria mellonella* rearing for *in vivo* microbiological studies. *Virulence*. 2018;9(1):383–9.
60. Krams I, Kecko S, Kangassalo K, Moore FR, Jankevics E, Inashkina I, *et al*. Effects of food quality on trade-offs among growth, immunity and survival in the greater wax moth *Galleria mellonella*. *Insect Sci*. 2015;22(3):431–9.
61. Banville N, Browne N, Kavanagh K. Effect of nutrient deprivation on the susceptibility of *Galleria mellonella* larvae to infection. *Virulence*. 2012;3(6):497–503.
62. Bolouri Moghaddam MR, Tonk M, Schreiber C, Salzig D, Czermak P, Vilcinskis A, *et al*. The potential of the *Galleria mellonella* innate immune system is maximized by the co-presentation of diverse antimicrobial peptides. *Biol Chem*. 2016;397(9):939–45.

63. Brown SE, Howard A, Kasprzak AB, Gordon KH, East PD. A peptidomics study reveals the impressive antimicrobial peptide arsenal of the wax moth *Galleria mellonella*. *Insect Biochem Molec.* 2009;39(11):792–800.
64. Wojda I. Immunity of the greater wax moth *Galleria mellonella*: *Galleria mellonella* immunity. *Insect Sci.* 2017;24(3):342–57.
65. Tojo S, Naganuma F, Arakawa K, Yokoo S. Involvement of both granular cells and plasmatocytes in phagocytic reactions in the greater wax moth, *Galleria mellonella*. *J Insect Physiol.* 2000 Jul;46(7):1129–35.
66. Bergin D, Reeves EP, Renwick J, Wientjes FB, Kavanagh K. Superoxide production in *Galleria mellonella* hemocytes: Identification of proteins homologous to the NADPH oxidase complex of human neutrophils. *Infect Immun.* 2005;73(7):4161–70.
67. Whitten MMA, Tew IF, Lee BL, Ratcliffe NA. A novel role for an insect apolipoprotein (Apolipoprotein III) in α -1,3-glucan pattern recognition and cellular encapsulation reactions. *J Immunol.* 2004;172(4):2177–85.
68. Fallon JP, Reeves EP, Kavanagh K. The *Aspergillus fumigatus* toxin fumagillin suppresses the immune response of *Galleria mellonella* larvae by inhibiting the action of haemocytes. *Microbiology.* 2011;157(5):1481–8.
69. Reeves EP, Messina CGM, Doyle S, Kavanagh K. Correlation between gliotoxin production and virulence of *Aspergillus fumigatus* in *Galleria mellonella*. *Mycopathologia.* 2004;158(1):73–9.
70. Browne N, Surlis C, Kavanagh K. Thermal and physical stresses induce a short-term immune priming effect in *Galleria mellonella* larvae. *J Insect Physiol.* 2014;63:21–6.
71. Mowlds P, Barron A, Kavanagh K. Physical stress primes the immune response of *Galleria mellonella* larvae to infection by *Candida albicans*. *Microbes and Infection.* 2008 May;10(6):628–34.
72. Mowlds P, Kavanagh K. Effect of pre-incubation temperature on susceptibility of *Galleria mellonella* larvae to infection by *Candida albicans*. *Mycopathologia.* 2008;165(1):5–12.
73. Browne N, Surlis C, Maher A, Gallagher C, Carolan JC, Clynes M, *et al.* Prolonged pre-incubation increases the susceptibility of *Galleria mellonella* larvae to bacterial and fungal infection. *Virulence.* 2015;6(5):458–65.
74. Fallon JP, Troy N, Kavanagh K. Pre-exposure of *Galleria mellonella* larvae to different doses of *Aspergillus fumigatus* conidia causes differential activation of cellular and humoral immune responses. *Virulence.* 2011 Sep 1;2(5):413–21.
75. Wang J, Ying SH, Hu Y, Feng MG. Mas5, a homologue of bacterial DnaJ, is indispensable for the host infection and environmental adaptation of a filamentous fungal insect pathogen: Role of Mas5 in an insect pathogen. *Environ Microbiol.* 2016;18(3):1037–47.
76. Chertkova EA, Grizanov EV, Dubovskiy IM. Bacterial and fungal infections induce bursts of dopamine in the haemolymph of the Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* and greater wax moth *Galleria mellonella*. *J Invertebr Pathol.* 2018;153:203–6.
77. Scully LR, Bidochka MJ. Serial passage of the opportunistic pathogen *Aspergillus flavus* through an insect host yields decreased saprobic capacity. *Can J Microbiol.* 2005;51(2):185–9.
78. Salamiou S, Ramisse F, Brehélin M, Bourguet D, Gilois N, Gominet M, *et al.* The plcR regulon is involved in the opportunistic properties of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* in mice and insects. *Microbiology.* 2000;146(11):2825–32.
79. Fedhila S, Buisson C, Dussurget O, Serror P, Glomski IJ, Liehl P, *et al.* Comparative analysis of the virulence of invertebrate and mammalian pathogenic bacteria in the oral insect infection model *Galleria mellonella*. *J Invertebr Pathol.* 2010;103(1):24–9.
80. Dalton JP, Uy B, Swift S, Wiles S. A novel restraint device for injection of *Galleria*

mellonella larvae that minimizes the risk of accidental operator needle stick injury. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017;7:99.

81. Navarro-Velasco GY, Prados-Rosales RC, Ortíz-Urquiza A, Quesada-Moraga E, Di Pietro A. *Galleria mellonella* as model host for the trans-kingdom pathogen *Fusarium oxysporum*. *Fungal Genet Biol.* 2011;48(12):1124–9.

82. Harding CR, Schroeder GN, Collins JW, Frankel G. Use of *Galleria mellonella* as a model organism to study *Legionella pneumophila* infection. *J Vis Exp.* 2013;(81):e50964.

83. Trieu TA, Navarro-Mendoza MI, Pérez-Arques C, Sanchis M, Capilla J, Navarro-Rodriguez P, *et al.* RNAi-based functional genomics identifies new virulence determinants in mucormycosis. *PLoS Pathog.* 2017;13(1):e1006150.

84. Perdoni F, Falleni M, Tosi D, Cirasola D, Romagnoli S, Braidotti P, *et al.* A histological procedure to study fungal infection in the wax moth *Galleria mellonella*. *Eur J Histochem.* 2014;58(3):2428.

85. Sheehan G, Clarke G, Kavanagh K. Characterisation of the cellular and proteomic response of *Galleria mellonella* larvae to the development of invasive aspergillosis. *BMC Microbiol.* 2018;18:63.

86. Kim Y, Lee MW, Jun SC, Choi YH, Yu JH, Shin KS. RgsD negatively controls development, toxigenesis, stress response, and virulence in *Aspergillus fumigatus*. *Sci Rep.* 2019;9(811).

87. Jung MG, Kim SS, Yu JH, Shin KS. Characterization of gprK encoding a putative hybrid G-protein-coupled receptor in *Aspergillus fumigatus*. *PLoS One.* 2016;11(9):e0161312.

88. Cheema MS, Christians JK. Virulence in an insect model differs between mating types in *Aspergillus fumigatus*. *Med Mycol.* 2011;49(2):202–7.

89. Alshareef F, Robson GD. Genetic and virulence variation in an environmental population of the opportunistic pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Microbiology.* 2014;160(4):742–51.

90. Aufauvre-Brown A, Brown JS, Holden DW. Comparison of virulence between clinical and environmental isolates of *Aspergillus fumigatus*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1998;17(11):778–80.

91. Jia X, Zhang X, Hu Y, Hu M, Tian S, Han X, *et al.* Role of actin depolymerizing factor cofilin in *Aspergillus fumigatus* oxidative stress response and pathogenesis. *Current Genetics.* 2018;64(3):619–34.

92. Jia X, Zhang X, Hu Y, Hu M, Han X, Sun Y, *et al.* Role of downregulation and phosphorylation of cofilin in polarized growth, MpkA activation and stress response of *Aspergillus fumigatus*. *Front Microbiol.* 2018;9:2667.

93. Kim Y, Heo IB, Yu JH, Shin KS. Characteristics of a regulator of G-Protein Signaling (RGS) rgsC in *Aspergillus fumigatus*. *Front Microbiol.* 2017;8:2058.

94. Lu Z, Jia X, Chen Y, Han X, Chen F, Tian S, *et al.* Identification and characterization of key charged residues in the cofilin protein involved in azole susceptibility, apoptosis, and virulence of *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018;62(5):e01659-17.

95. Steinbach WJ, Cramer RA, Perfect BZ, Asfaw YG, Sauer TC, Najvar LK, *et al.* Calcineurin controls growth, morphology, and pathogenicity in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryotic Cell.* 2006;5(7):1091–103.

96. Magnani Dinamarco T, Brown NA, Couto de Almeida RS, Alves de Castro P, Savoldi M, de Souza Goldman MH, *et al.* *Aspergillus fumigatus* calcineurin interacts with a nucleoside diphosphate kinase. *Microbes Infect.* 2012;14(11):922–9.

97. Juvvadi PR, Cole DC, Falloon K, Waitt G, Soderblom EJ, Moseley MA, *et al.* Kin1 kinase localizes at the hyphal septum and is dephosphorylated by calcineurin but is dispensable for septation and virulence in the human pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018;505(3):740–6.

98. Lindsey R, Cowden S, Hernández-Rodríguez Y, Momany M. Septins AspA and AspC are important for normal development and limit the emergence of new growth foci in the multicellular fungus *Aspergillus nidulans*. *Eukaryotic Cell*. 2010;9(1):155–63.
99. Hernández-Rodríguez Y, Hastings S, Momany M. The septin AspB in *Aspergillus nidulans* forms bars and filaments and plays roles in growth emergence and conidiation. *Eukaryot Cell*. 2012;11(3):311–23.
100. Vargas-Muñiz JM, Renshaw H, Richards AD, Lamoth F, Soderblom EJ, Moseley MA, *et al*. The *Aspergillus fumigatus* septins play pleiotropic roles in septation, conidiation, and cell wall stress, but are dispensable for virulence. *Fungal Genet Biol*. 2015;81:41–51.
101. Renshaw H, Vargas-Muñiz JM, Richards AD, Asfaw YG, Juvvadi PR, Steinbach WJ. Distinct roles of myosins in *Aspergillus fumigatus* hyphal growth and pathogenesis. *Infect Immun*. 2016;84(5):1556–64.
102. Zhang X, Jia X, Tian S, Zhang C, Lu Z, Chen Y, *et al*. Role of the small GTPase Rho1 in cell wall integrity, stress response, and pathogenesis of *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genet Biol*. 2018;120:30–41.
103. Powers-Fletcher MV, Feng X, Krishnan K, Askew DS. Deletion of the sec4 homolog srgA from *Aspergillus fumigatus* is associated with an impaired stress response, attenuated virulence and phenotypic heterogeneity. *PLoS One*. 2013;8(6):e66741.
104. Geißel B, Penka M, Neubauer M, Wagener J. The ER-mitochondria encounter structure contributes to hyphal growth, mitochondrial morphology and virulence of the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. *Int J Med Microbiol*. 2017;307(1):37–43.
105. Gerhards N, Neubauer L, Tudzynski P, Li S-M. Biosynthetic pathways of ergot alkaloids. *Toxins*. 2014;6(12):3281–95.
106. Raffa N, Keller NP. A call to arms: Mustering secondary metabolites for success and survival of an opportunistic pathogen. *PLoS Pathog*. 2019;15(4):e1007606.
107. Smith TD, Calvo AM. The mtfA transcription factor gene controls morphogenesis, gliotoxin production, and virulence in the opportunistic human pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot Cell*. 2014;13(6):766–75.
108. Jackson JC, Higgins LA, Lin X. Conidiation color mutants of *Aspergillus fumigatus* are highly pathogenic to the heterologous insect host *Galleria mellonella*. *PLoS One*. 2009;4(1):e4224.
109. Fallon JP, Troy N, Kavanagh K. Pre-exposure of *Galleria mellonella* larvae to different doses of *Aspergillus fumigatus* conidia causes differential activation of cellular and humoral immune responses. *Virulence*. 2011;2(5):413–21.
110. O’Hanlon KA, Gallagher L, Schrettl M, Jöchl C, Kavanagh K, Larsen TO, *et al*. Nonribosomal peptide synthetase genes pesL and pes1 are essential for fumigaclavine C production in *Aspergillus fumigatus*. *Appl Environ Microbiol*. 2012;78(9):3166–76.
111. Reeves EP, Reiber K, Neville C, Scheibner O, Kavanagh K, Doyle S. A nonribosomal peptide synthetase (Pes1) confers protection against oxidative stress in *Aspergillus fumigatus*. *FEBS J*. 2006;273(13):3038–53.
112. Panaccione DG, Arnold SL. Ergot alkaloids contribute to virulence in an insect model of invasive aspergillosis. *Sci Rep*. 2017;7(1):8930.
113. Blatzer M, Latgé J-P. Metal-homeostasis in the pathobiology of the opportunistic human fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Current Opinion in Microbiology*. 2017;40:152–9.
114. Beckmann N, Schafferer L, Schrettl M, Binder U, Talasz H, Lindner H, *et al*. Characterization of the link between ornithine, arginine, polyamine and siderophore metabolism in *Aspergillus fumigatus*. *PLoS One*. 2013;8(6):e67426.
115. Schrettl M, Bignell E, Kragl C, Joechl C, Rogers T, Arst HN, *et al*. Siderophore biosynthesis but not reductive iron assimilation is essential for *Aspergillus fumigatus* virulence. *J Exp Med*. 2004;200(9):1213–9.

116. Schrettl M, Bignell E, Kragl C, Sabiha Y, Loss O, Eisendle M, *et al.* Distinct roles for intra- and extracellular siderophores during *Aspergillus fumigatus* infection. *PLoS Pathog.* 2007;3(9):e128.
117. Slater JL, Gregson L, Denning DW, Warn PA. Pathogenicity of *Aspergillus fumigatus* mutants assessed in *Galleria mellonella* matches that in mice. *Med Mycol.* 2011;49(S1):S107–13.
118. Johns A, Scharf DH, Gsaller F, Schmidt H, Heinekamp T, Straßburger M, *et al.* A nonredundant phosphopantetheinyl transferase, PptA, is a novel antifungal target that directs secondary metabolite, siderophore, and lysine biosynthesis in *Aspergillus fumigatus* and is critical for pathogenicity. *mBio.* 2017;8(4):1504–16.
119. Haas H. Iron – a key nexus in the virulence of *Aspergillus fumigatus*. *Front Microbiol.* 2012;3:28.
120. Long N, Orasch T, Zhang S, Gao L, Xu X, Hortschansky P, *et al.* The Zn2Cys6-type transcription factor LeuB cross-links regulation of leucine biosynthesis and iron acquisition in *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Genet.* 2018;14(10):e1007762.
121. Liu H, Gravelat FN, Chiang LY, Chen D, Vanier G, Ejzykowicz DE, *et al.* *Aspergillus fumigatus* AcuM regulates both iron acquisition and gluconeogenesis. *Mol Microbiol.* 2010;78(4):1038–54.
122. Bakti F, Sasse C, Heinekamp T, Pócsi I, Braus GH. Heavy metal-induced expression of PcaA provides cadmium tolerance to *Aspergillus fumigatus* and supports its virulence in the *Galleria mellonella* model. *Front Microbiol.* 2018;9:744.
123. Brennan M, Thomas DY, Whiteway M, Kavanagh K. Correlation between virulence of *Candida albicans* mutants in mice and *Galleria mellonella* larvae. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2002;34(2):153–7.
124. Reeves EP, Reiber K, Neville C, Scheibner O, Kavanagh K, Doyle S. A nonribosomal peptide synthetase (Pes1) confers protection against oxidative stress in *Aspergillus fumigatus*. *The FEBS Journal.* 2006 Jul 1;273(13):3038–53.
125. Dietl AM, Binder U, Shadkchan Y, Osherov N, Haas H. Siroheme is essential for assimilation of nitrate and sulfate as well as detoxification of nitric oxide but dispensable for murine virulence of *Aspergillus fumigatus*. *Front Microbiol.* 2018;9:2615.
126. Lapp K, Vödisch M, Kroll K, Strassburger M, Kniemeyer O, Heinekamp T, *et al.* Characterization of the *Aspergillus fumigatus* detoxification systems for reactive nitrogen intermediates and their impact on virulence. *Front Microbiol.* 2014;5:469.
127. Pereira Silva L, Alves de Castro P, Dos Reis TF, Paziani MH, Von Zeska Kress MR, Riaño-Pachón DM, *et al.* Genome-wide transcriptome analysis of *Aspergillus fumigatus* exposed to osmotic stress reveals regulators of osmotic and cell wall stresses that are SakAHOG1 and MpkC dependent. *Cell Microbiol.* 2017;19(4).
128. Mulvihill ED, Moloney NM, Owens RA, Dolan SK, Russell L, Doyle S. Functional investigation of iron-responsive microsomal proteins, including MirC, in *Aspergillus fumigatus*. *Front Microbiol.* 2017;8:418.
129. Myers RR, Smith TD, Elsawa SF, Puel O, Tadrict S, Calvo AM. rtfA controls development, secondary metabolism, and virulence in *Aspergillus fumigatus*. *PLoS One.* 2017;12(4):e0176702.
130. Alshareef F, Robson GD. Genetic and virulence variation in an environmental population of the opportunistic pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Microbiology.* 2014;160(4):742–51.
131. Loh JM, Adenwalla N, Wiles S, Proft T. *Galleria mellonella* larvae as an infection model for group A streptococcus. *Virulence.* 2013;4(5):419–28.
132. Jackson JC, Higgins LA, Lin X. Conidiation color mutants of *Aspergillus fumigatus* are highly pathogenic to the heterologous insect host *Galleria mellonella*. *PLoS One.*

2009;4(1):e4224.

133. Soukup AA, Farnoodian M, Berthier E, Keller NP. NosA, a transcription factor important in *Aspergillus fumigatus* stress and developmental response, rescues the germination defect of a *laeA* deletion. *Fungal Genet Biol.* 2012;49(11):857–65.
134. Schafferer L, Beckmann N, Binder U, Brosch G, Haas H. AmcA - a putative mitochondrial ornithine transporter supporting fungal siderophore biosynthesis. *Front Microbiol.* 2015;6:252.
135. Singkum P, Suwanmanee S, Pumeesat P, Luplertlop N. A powerful *in vivo* alternative model in scientific research: *Galleria mellonella*. *Acta Microbiol Immunol Hung.* 2019;66(1):31–55.
136. Engel P, Moran NA. The gut microbiota of insects - diversity in structure and function. *FEMS Microbiol Rev.* 2013;37(5):699–735.
137. Pompilio A, Pomponio S, Crocetta V, Gherardi G, Verginelli F, Fiscarelli E, *et al.* Phenotypic and genotypic characterization of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from patients with cystic fibrosis: Genome diversity, biofilm formation, and virulence. *BMC Microbiol.* 2011;11:159.
138. Betts JW, Phee LM, Woodford N, Wareham DW. Activity of colistin in combination with tigecycline or rifampicin against multidrug-resistant *Stenotrophomonas maltophilia*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2014;33(9):1565–72.
139. Alcaraz E, García C, Friedman L, de Rossi BP. The rpf/DSF signalling system of *Stenotrophomonas maltophilia* positively regulates biofilm formation, production of virulence-associated factors and β -lactamase induction. *FEMS Microbiol Lett.* 2019;366(6).
140. Alcaraz E, Garcia C, Papalia M, Vay C, Friedman L, Passerini de Rossi B. *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from patients exposed to invasive devices in a university hospital in Argentina: molecular typing, susceptibility and detection of potential virulence factors. *J Med Microbiol.* 2018;67(7):992–1002.
141. An S, Tang J. The Ax21 protein influences virulence and biofilm formation in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Arch Microbiol.* 2018;200(1):183–7.
142. García CA, Alcaraz ES, Franco MA, Passerini de Rossi BN. Iron is a signal for *Stenotrophomonas maltophilia* biofilm formation, oxidative stress response, OMPs expression, and virulence. *Front Microbiol.* 2015;6:926.
143. An S, Tang J. Diffusible signal factor signaling regulates multiple functions in the opportunistic pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. *BMC Res Notes.* 2018;11:569.
144. Hall-Stoodley L, Stoodley P. Evolving concepts in biofilm infections. *Cell Microbiol.* 2009;11(7):1034–43.
145. Percival SL, Suleman L, Vuotto C, Donelli G. Healthcare-associated infections, medical devices and biofilms: risk, tolerance and control. *J Med Microbiol.* 2015;64(4):323–34.
146. Beauvais A, Latgé JP. *Aspergillus* biofilm *in vitro* and *in vivo*. *Microbiol Spectr.* 2015;3(4).
147. Pompilio A, Piccolomini R, Picciani C, D'Antonio D, Savini V, Di Bonaventura G. Factors associated with adherence to and biofilm formation on polystyrene by *Stenotrophomonas maltophilia*: the role of cell surface hydrophobicity and motility. *FEMS Microbiol Lett.* 2008;287(1):41–7.
148. Peleg AY, Tampakakis E, Fuchs BB, Eliopoulos GM, Moellering RC, Mylonakis E. Prokaryote-eukaryote interactions identified by using *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA PNAS.* 2008;105(38):14585–90.
149. Bergeron AC, Seman BG, Hammond JH, Archambault LS, Hogan DA, Wheeler RT. *Candida albicans* and *Pseudomonas aeruginosa* interact to enhance virulence of mucosal infection in transparent zebrafish. *Infect Immun.* 2017;85(11):e00475-17.
150. Yadav MK, Chae SW, Go YY, Im GJ, Song JJ. *In vitro* multi-species biofilms of

methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* and their host interaction during *in vivo* colonization of an otitis media rat model. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017;7:127.

151. Manavathu EK, Vager DL, Vazquez JA. Development and antimicrobial susceptibility studies of *in vitro* monomicrobial and polymicrobial biofilm models with *Aspergillus fumigatus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Microbiol.* 2014;14:53.

152. Ramírez Granillo A, Canales MGM, Espindola MES, Martínez Rivera MA, de Lucio VMB, Tovar AVR. Antibiosis interaction of *Staphylococcus aureus* on *Aspergillus fumigatus* assessed *in vitro* by mixed biofilm formation. *BMC Microbiol.* 2015;15:33.

153. Melloul E, Luiggi S, Anaïs L, Arné P, Costa JM, Fihman V, *et al.* Characteristics of *Aspergillus fumigatus* in association with *Stenotrophomonas maltophilia* in an *in vitro* model of mixed biofilm. *PLoS One.* 2016;11(11):e0166325.

154. Amarsaikhan N, O’Dea EM, Tsoggerel A, Owegi H, Gillenwater J, Templeton SP. Isolate-dependent growth, virulence, and cell wall composition in the human pathogen *Aspergillus fumigatus*. *PLoS One.* 2014;9(6).

Serment d'Hippocrate

En présence des maîtres de cette école, de mes condisciples, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine.

Je dispenserai mes soins sans distinction de race, de religion, d'idéologie ou de situation sociale.

Admis à l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser les crimes.

Je serai reconnaissant envers mes maîtres, et solidaire moralement de mes confrères. Conscient de mes responsabilités envers les patients, je continuerai à perfectionner mon savoir.

Si je remplis ce serment sans l'enfreindre, qu'il me soit donné de jouir de l'estime des hommes et de mes condisciples, si je le viole et que je me parjure, puisse-je avoir un sort contraire.

Contribution du modèle *Galleria mellonella* à l'étude des interactions entre *Aspergillus fumigatus* et *Stenotrophomonas maltophilia* : étude de souches humaines, animales et environnementales

Des modèles alternatifs se sont développés ces dernières années pour pallier les limites des modèles murins conventionnels. Dans ce contexte, le modèle invertébré *Galleria mellonella* (Gm) permet l'étude des interactions complexes hôte-pathogènes, que ce soit pour les bactéries ou les champignons d'importance médicale. Une revue de la littérature de plus d'une centaine d'articles a permis de comparer les protocoles décrits dans la littérature et les différents usages de ce modèle pour l'étude d'*A. fumigatus* (Af). Elle a démontré qu'il s'agissait d'un outil de pré-screening simple, rapide et fiable, qui a permis de mieux comprendre certaines voies métaboliques et mécanismes de pathogénicité de ce champignon opportuniste. Associé à *Stenotrophomonas maltophilia* (Sm), ces deux pathogènes de règne différent peuvent interagir et entraîner un retentissement important sur la santé pulmonaire humaine. Ils peuvent coloniser le tractus respiratoire des patients atteints de pathologies pulmonaires chroniques comme la mucoviscidose. Leur interaction *in vitro* est en cours d'étude, mais aucune donnée *in vivo* sur l'association n'est actuellement disponible. L'objectif était donc de mettre au point un mini-modèle d'infection mixte Af - Sm dans Gm. Six souches de Sm et d'Af d'origine différentes ont été caractérisées *in vitro* et *in vivo* sur leur croissance, leur capacité de formation de biofilm et leur pathogénicité. L'étude a permis de mettre en évidence pour la première fois un effet synergique sur la mortalité d'une co-infection Sm-Af entre deux souches cliniques. Cet effet n'a pas été retrouvé pour les souches animales ou environnementales, démontrant un fitness particulier entre les souches humaines.

Mots-clés : *Galleria mellonella*, *Aspergillus fumigatus*, *Stenotrophomonas maltophilia* co-infection
Galleria mellonella, *Aspergillus fumigatus*, *Stenotrophomonas maltophilia* co-infection

Contribution of *Galleria mellonella* model to study interactions between *Aspergillus fumigatus* and *Stenotrophomonas maltophilia*: study of human, animal and environmental strains.

In recent years alternative host models have been developed to overcome the limitations of the conventional murine model. In this context, invertebrate model *Galleria mellonella* (Gm) allows the study of complex host-pathogens interaction, whether for bacteria or fungi of medical importance. A literature review of more than 100 papers compared the protocols described in the literature and the different uses of this model for the study of *A. fumigatus* (Af). It has been shown to be a simple, fast and reliable screening tool helpful to better understand metabolic pathways and pathogenicity mechanisms of this opportunistic fungus. Associated with *Stenotrophomonas maltophilia* (Sm), these two different kingdom pathogens can interact and have a significant impact on patient health. They can colonize the respiratory tract of patients with chronic lung diseases such as cystic fibrosis. *In vitro* interaction between them is being studied, but none *in vivo* data are currently available. The objective was therefore to develop a mini-model of mixed infection Af - Sm in Gm. Six strains of Sm and Af of different origin were characterized *in vitro* and *in vivo* on their growth, biofilm formation capacity and pathogenicity. The study revealed for the first time a synergistic effect on the mortality of a Sm-Af co-infection between two clinical strains. This effect was not found for animal or environmental strains, demonstrating a particular fitness between human strains.

Keywords: *Galleria mellonella*, *Aspergillus fumigatus*, *Stenotrophomonas maltophilia* co-infection
Galleria mellonella, *Aspergillus fumigatus*, *Stenotrophomonas maltophilia* co-infection