

Université de Lille2 - Droit et Santé
Ecole doctorale Biologie - Santé de Lille

THESE

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE LILLE 2

Discipline : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Spécialité : Biochimie et biologie moléculaire

Présentée et soutenue publiquement le 29 Janvier 2014

par Flavie Courjol

Impact de l'expression des β -1,2 mannosides
pariétaux de *Candida albicans* sur la virulence

Membres du jury

Président du jury : Pr. Daniel Poulain

Rapporteurs : Dr. Guilhem Janbon

Dr. Jérôme Nigou

Examineur : Pr. Thierry Noël

Directeur de thèse : Dr. Chantal Fradin

Je dédie cette thèse à mes parents, Grégory et ma famille.
Je les remercie pour leur soutien et écoute de tous les jours, leur patience et confiance.
Merci d'avoir cru en moi et mes capacités.

Remerciements

Je remercie vivement, Monsieur Daniel Poulain et Thierry Jouault de m'avoir accueillie au sein du laboratoire « Régulations de l'interface glycanique Candida-Hôte ». Pour cela, soyez assurés de ma reconnaissance.

Monsieur Daniel Poulain d'avoir accepté de présider mon jury de thèse.

Monsieur Nigou et Mr Janbon qui m'ont fait l'honneur d'être rapporteurs de cette thèse. Soyez assurés de ma reconnaissance et de mon profond respect.

Madame Chantal Fradin pour m'avoir permis d'effectuer ma thèse sous sa direction et offert la possibilité de travailler sur un sujet intéressant. Merci de m'avoir fait partager tes connaissances sur Candida, ta rigueur scientifique et ton esprit critique. Enfin, merci pour tes nombreux conseils, ta disponibilité et ton aide.

Monsieur Thierry Jouault pour nos travaux collaboratifs et ses suggestions

Monsieur Boualem Sendid pour ses conseils et pour m'avoir donné accès aux plateformes techniques du service de parasitologie du CHR de Lille

Audrey, Laura, Sébastien, Julien et Laure pour vos encouragements, votre soutien et nos nombreuses discussions.

Annick pour son aide technique et la relecture de ce travail, Bernadette pour son aide et les nombreuses tâches administratives, Anne-Marie pour m'avoir permis de travailler dans de bonnes conditions et Samir pour sa bonne humeur.

Je remercie également toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont collaboré à ce travail et qui m'ont beaucoup apporté lors de mes différentes formations : Caroline et Laure du service de parasitologie du CHR de Lille (séquençage), l'Institut Pasteur de Lille (formation expérimentation animale), Arnold du DHURE de l'université Lille 2 (manipulations souris), Aurore pour m'avoir formée au cytomètre, Neil Gow, Rebecca Hall et le groupe AFG d'Aberdeen pour leur collaboration dans la génération des mutants de *Candida albicans*.

Merci aux personnes qui ont sacrifié plusieurs heures de leur temps à la correction de mon mémoire.

Merci à ma famille, mes amis et personnes qui ont rendu ces trois années les moins stressantes possibles. Un grand merci à mon compagnon Grégory pour sa patience, sa compréhension, son soutien de tous les jours, son amour : la fin est proche !

SOMMAIRE

ABREVIATIONS	1
RESUME	2
SUMMARY	3
INTRODUCTION.....	4
GENERALITES.....	5
I. <i>Candida albicans</i>	5
I.1 Les candidoses	5
I.1.1 Facteurs favorisant les candidoses.....	5
I.1.2 Type de candidoses	6
I.1.3 Diagnostic	7
I.2 Caractères généraux	7
I.3 Organisation cellulaire	10
I.3.1 Cytoplasme et membrane plasmique	10
I.3.2 Paroi	10
I.3.2.1 La chitine et les β -glucanes	12
I.3.2.2 Les Mannoglycoconjugués	13
I.3.2.3 Les glycolipides.....	16
I.4 Biosynthèse des glycoconjugués	17
I.4.1 Biosynthèse des nucléotides sucres	17
I.4.2 La biosynthèse du squelette microfibrillaire.....	19
I.4.2.1 La Chitine.....	19
I.4.2.2 Les β -1,3 glucanes.....	19
I.4.2.3 Les β -1,6 glucanes.....	20
I.4.3 La biosynthèse des mannoprotéines	20
I.4.3.1 La N-glycosylation	21
I.4.3.2 La O-glycosylation	25

I.4.3.3 Ajout d'ancres glycosylphosphatidylinositols	26
I.4.4 La biosynthèse des sphingoglycolipides	27
II. Relations hôte-pathogène	28
II.1 Facteurs contribuant à la virulence	29
II.2 Résistance aux antifongiques	31
II.3 Modèles <i>in vivo</i> d'infections	33
II.4 Réponses de l'hôte	35
II.4.1 Réponses immunitaires contre <i>C. albicans</i>	35
II.4.1.1 Immunité innée	35
II.4.1.2 Immunité adaptative	39
II.4.1.3 Stratégies vaccinales	40
III. Les β -1,2 oligomannosides	41
III.1 Structure, distribution	41
III.2 Biosynthèse et régulation	42
III.2.1 Les β -1,2 mannosyltransférases	42
III.2.2 Régulation	45
III.3 Rôle des β -Mans dans la virulence	45
III.3.1 Adhérence	45
III.3.2 Immunomodulation	46
III.3.3 Production d'anticorps protecteurs	47
III.3.4 Rôle dans la virulence	47
IV- Objectifs	48
TRAVAUX PERSONNELS	49
I- Les β -1,2 mannosyltransférases 1 et 3 participent à la O- et N-mannosylation des formes levures et mycéliennes et modifie le pouvoir pathogène de <i>Candida albicans</i>	49
II- L'activité de Bmt1 conditionne le sérotype A ou B de <i>C. albicans</i> et module la colonisation digestive	93
III- L'altération de la glycosylation du phospholipomannane de <i>C. albicans</i> affecte ses activités de stimulation des macrophages	118

IV-Bmt5 n'est pas essentielle à la β -1,2 mannosylation du PLM qui ne contribue pas à l'expression de surface des β -Mans et n'a pas d'impact sur la résistance aux inhibiteurs de la synthèse des β -glucanes.....	145
DISCUSSION	154
BIBLIOGRAPHIE	161

ABBREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ALS	Agglutinin Like Sequence
ARN	Acide ribonucléique
β - Mans	β -1,2 oligomannosides
Bmts	β -1,2 mannosyltransférases
BSA	Bovin Serum Albumin
Chs	Chitine Synthase
5-FC	5-Flucytosine
Dol-P-Glc	Dolicol-Phosphate-Glucose
Dol-P-Man	Dolicol-Phosphate-Mannose
DP	Degré de Polymérisation
Gal-3	Galectine-3
GI	Gastro-Intestinal
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
IPC	Inositol-phospho-céramide
IP	IntraPéritonéale
IV	IntraVeineuse
KRE	Killer Resistant toxin
MIPC	Mannose-inositol-phospho-céramide
M(IP) _{2C}	Mannose-di(inositol-phospho)-céramide
MLST	MultiLocus Sequence Typing
Mnt	Mannosyltransférase
MPs	Mannoprotéines
MTL	Mating Type Locus
Ost	Oligosaccharyltransférase
PAMP	Pathogen Associated Molecular Pattern
PCR	Polymerase chain reaction
PLM	Phospholipomannane
Pmt	Protéine MannosylTransférase
PPM	Phosphopeptidomannane
QS	Quorum Sensing
RE	Réticulum Endoplasmique
Sap	Secreted aspartyl protease
Sod	Superoxide dismutase
Spt	Sérine palmitoyltransférase

RESUME

Les β -1,2 oligomannosides (β -Mans), dont la présence est relativement rare dans le monde vivant, font partie des facteurs de *C. albicans* contribuant à sa virulence. Ils sont retrouvés dans la paroi de la levure associés aux N-glycannes d'un haut polymère de mannoses lié à un peptide, le phosphopeptidomannane (PPM) et des mannoprotéines (MPs) ainsi qu'à la copule glycanique d'un glycolipide de la famille des mannose-inositol-phosphocéramides, le phospholipomannane (PLM). Les mécanismes de reconnaissance des β -Mans par l'hôte dépendent du degré de polymérisation des oligomannosides et des molécules qui les portent. Une famille de neuf enzymes, les β -1,2 mannosyltransférases (Bmts), permettent la biosynthèse des β -Mans de *C. albicans*. Ces enzymes ont des fonctions distinctes car leur activité a une spécificité assez stricte qui dépend du glycoconjugué et de l'étape de β -mannosylation. Le travail présenté dans cette thèse s'est appuyé sur la spécificité des Bmts, principalement celles initiant la biosynthèse des β -Mans (Bmt1: N-mannanes acido stables – Bmt2: N-mannanes acido labiles – Bmt5: PLM) pour définir i) le rôle respectif des β -Mans dans la virulence de *C. albicans* et ii) la contribution des différents glycoconjugués dans l'expression de surface des β -Mans. Une grande partie de l'étude a reposé sur la génération de doubles mutants (*bmt1* Δ /*bmt2* Δ et *bmt2* Δ /*bmt5* Δ) exprimant des β -Mans uniquement sur une fraction ou un type de glycoconjugué et d'un triple mutant n'exprimant plus de β -Mans (*bmt1* Δ /*bmt2* Δ /*bmt5* Δ). Nous avons tout d'abord réévalué la β -mannosylation des MPs qui était jusqu'à présent déduite de celle du PPM. En analysant les O-mannosides des mutants *bmts* Δ , nous avons pu mettre en évidence l'implication de Bmt1 et Bmt3, qui ajoutent respectivement le 1^{er} et le 2^{ème} β -mannose, dans la O-mannosylation des MPs. L'analyse de la β -mannosylation des MPs et d'une protéine recombinante chez le mutant *bmt1* Δ a mis en évidence le rôle essentiel de Bmt1 dans ce processus. L'analyse en immunofluorescence des différents mutants a montré que seul le PPM et les MPs sont responsables de l'expression de surface des β -Mans. Cette expression a un impact inattendu sur la virulence dans des modèles murins de candidoses disséminées. Les souches exprimant des β -Mans en surface sont en effet moins virulentes que les mutants présentant des défauts de β -Mannosylation. Les mutants, principalement *bmt1* Δ /*bmt2* Δ /*bmt5* Δ sont néanmoins moins virulents chez des souris n'exprimant plus la galectine 3, lectine reconnaissant les β -Mans. Ces résultats montrent le double rôle des β -Mans selon leur localisation et le conjugué qui les porte: d'une part ils permettent à l'hôte d'éliminer la levure *via* la galectine 3 et d'autre part ils peuvent contribuer à sa virulence *via* certainement le PLM. La β -mannosylation du PLM est indispensable pour l'activité inflammatoire du PLM sur les macrophages et sa modulation peut entraîner la résistance de la levure à certains antifongiques. La régulation de la β -mannosylation de ses glycoconjugués est un moyen pour *C. albicans* de s'adapter à différentes conditions. La β -mannosylation du PPM et des MPs est réduite à 37°C et lorsque le pH diminue, permettant ainsi à la levure d'être moins reconnue *in vivo* et d'échapper aux mécanismes de défense de l'hôte. Nous avons pu également mettre en évidence un mécanisme permettant à *C. albicans* de changer de sérotype en inactivant Bmt1. Ce mécanisme qui n'est pas encore parfaitement décrit, permet à la levure de mieux coloniser le tube digestif de souris. Nos résultats mettent ainsi en évidence d'une part l'expression complexe des β -Mans dans la paroi de *C. albicans* et leur rôle dans la virulence en fonction de leur localisation et d'autre part l'adaptation de la levure à différents environnements.

SUMMARY

β -1,2 oligomannosides (β -Mans) are rare in the living world and are considered as factors contributing to *C. albicans* virulence. They are present in the cell wall associated to N-glycans of a high mannose polymer linked to a peptide, the phosphopeptidomannan (PPM) and to mannoproteins (MPs) and they are part of the glycan moiety of a glycolipid from the mannose-inositol-phosphoceramide family, the phospholipomannan (PLM). Recognition of β -Mans by the host depends on their polymerization degree and molecules they are associated to. A family of nine enzymes, β -1,2 mannosyltransferases (Bmts), is involved in β -Mans biosynthesis of *C. albicans*. These enzymes have distinct functions with specificities of substrate and step of β -mannosylation. According to these specificities, especially for initiation of β -Mans biosynthesis (Bmt1: acid stable N-mannan- Bmt2: acid labile N-mannan- Bmt5: PLM), the thesis project was designed to define i) the respective role of β -Mans in *C. albicans* virulence and ii) the contribution of the different cell wall glycoconjugates in β -Mans surface expression. Double mutants (*bmt1bmt2* Δ and *bmt2bmt5* Δ) expressing β -Mans only on a fraction or a type of glycoconjugate and a triple mutant (*bmt1bmt2bmt5* Δ) expressing no more β -Mans have been generated. We have first reassessed MPs β -mannosylation which was originally deduced from the PPM one. After analysis of O-mannosides from *bmts* Δ mutants, we have evidenced that Bmt1 and Bmt3 are involved in MPs O-mannosylation by adding the first and the second β -mannose, respectively. β -mannosylation of both MPs and a recombinant protein in *bmt1* Δ mutant was checked and we evidenced an essential role of Bmt1 in this process. Immunofluorescence assays using the different mutants revealed that PPM and MPs are responsible for β -Mans surface expression. Expression of β -Mans at the cell surface had an unexpected impact on virulence in two murine models of disseminated candidiasis. Strains expressing superficial β -Mans were less virulent than mutants with β -mannosylation defects. These mutants, mainly *bmt1bmt2bmt5* Δ , were nevertheless less virulent in mice which do not express galectin-3, lectin that binds β -Mans. These results show different biologic properties of β -Mans depending on their localization and the conjugate they are associated to: they can enable yeast clearance *via* galectin 3 but they can also contribute to virulence certainly *via* PLM. PLM β -mannosylation is essential for the glycolipid inflammatory activities in macrophages and its modulation can lead to yeast resistance to some antifungals. Regulation of glycoconjugates β -mannosylation enables *C. albicans* to adapt to different conditions. PPM and MPs β -mannosylation is reduced at 37°C and at lower pH, which can help *C. albicans* to counteract host defense *in vivo* as it is then less recognized by galectin 3. We have also evidenced a mechanism by which *C. albicans* can switch serotype after Bmt1 inactivation. This mechanism, not completely described, allows the yeast to better colonize the murine digestive tract. Our results highlight both the complex expression of β -Mans in *C. albicans* cell wall and their role in virulence according to their localization and the adaptation of the yeast to different environments.

INTRODUCTION

La maîtrise relative des infections bactériennes par l'utilisation d'antibiotiques et la modernisation des actes médico-chirurgicaux, plus efficaces mais aussi plus agressifs, a provoqué l'émergence d'infections déterminées par des levures opportunistes du genre *Candida*. Ces levures sont des hôtes naturels du tube digestif humain. Les candidoses profondes sont actuellement au quatrième rang des infections systémiques hospitalières et sont celles responsables de la mortalité directement attribuable la plus élevée. Elles affectent des patients à prise en charge lourde (réanimation médicale, chirurgicale, pédiatrique, cancéreux, greffés). Malgré un coût de traitement très élevé, la maîtrise de ces infections est loin d'être acquise car les mécanismes impliqués ne sont pas suffisamment connus.

A l'heure actuelle, notre compréhension des processus impliqués dans l'interaction de *C. albicans* avec les cellules et les tissus de l'hôte et dans la régulation -de part et d'autre- de la transition saprophyte/pathogène est encore limitée. Une meilleure compréhension de ces processus devrait aider à la maîtrise des infections à *C. albicans*.

La paroi de *Candida albicans* est le point de contact entre la levure et l'hôte. C'est une structure complexe et dynamique contenant différents oligo et polysaccharides qui ne sont pas seulement importants pour son maintien mais qui ont également de nombreux rôles biologiques comme l'adhérence et l'immunomodulation. Parmi ces glycannes pariétaux, se trouvent des oligomannosides présentant des liaisons β -1,2 mannosidiques (β -Mans) rares dans le monde vivant. Durant l'infection à *C. albicans*, les β -Mans jouent un rôle important dans les interactions hôte/pathogène en agissant comme adhésines et en interférant avec les réponses immunitaires de l'hôte. Des études ont montré que l'expression des β -Mans est hétérogène à la surface des cellules, varie selon les souches de *C. albicans* et peut être modulée par différents facteurs environnementaux. Les β -Mans, qui sont biosynthétisés par une famille de 9 β -1,2 mannosyltransférases (BMTs) spécifiques du substrat et de l'étape de β -1,2 mannosylation, sont associés à différents glycoconjugués : le phosphopeptidomannane (PPM), le phospholipomannane (PLM) et les mannoprotéines (MPs).

Mon travail de thèse a concerné l'analyse génétique et biochimique de la β -1,2 mannosylation chez *C. albicans* et de ses relations avec la virulence.

Son objectif principal était l'analyse de la biosynthèse et de la régulation de la β -1,2 mannosylation des différents glycoconjugués pariétaux de la levure afin de déterminer leur contribution respective dans l'expression globale des β -Mans ainsi que la modulation de ces oligomannosides dans la paroi. Il a également permis en partie de définir la relation des glycoconjugués β -1,2 mannosylés de *C. albicans* et leurs rôles dans la virulence.

GENERALITES

I. *Candida albicans*

I.1 Les candidoses

C. albicans est une levure pathogène opportuniste qui vit à l'état saprophyte au niveau des muqueuses, principalement digestives et vaginales. Il y a entre 20 et 80% de sujets colonisés à un moment donné de leur vie avec des variations dans le temps pour un même individu. *C. albicans* prend avantage de perturbations de l'homéostasie chez son hôte pour devenir pathogène et provoquer des infections superficielles ou profondes (Fig. 1). *C. albicans* peut en effet provoquer différents types de candidoses (Odds, 1988). Les candidoses profondes peuvent également être provoquées par une source exogène du pathogène (ex: cathéter).

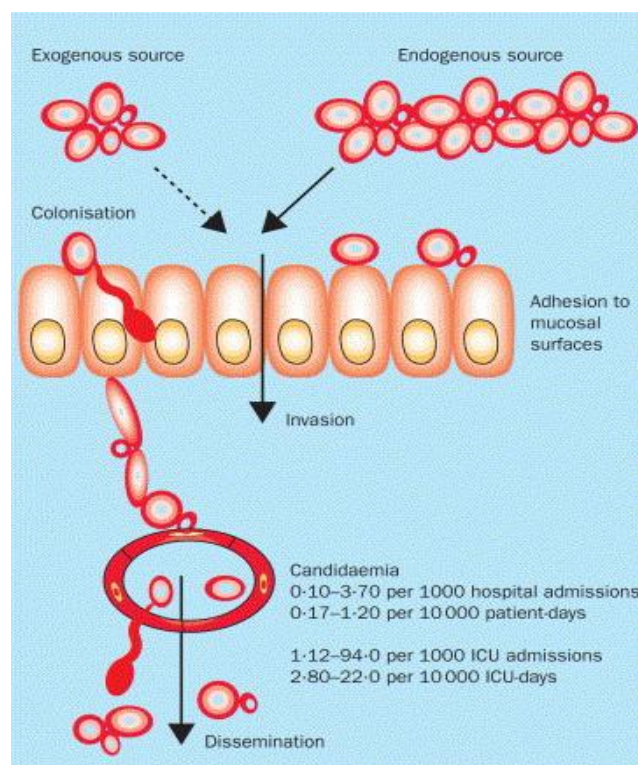


Figure 1 : Physiopathologie des candidoses invasives (Eggimann *et al.*, 2003)

I.1.1 Facteurs favorisant les candidoses

Les candidoses sont favorisées par différents facteurs locaux et/ ou généraux. L'humidité et la macération (ex: grands plis des obèses), les microtraumatismes, micro plaies et irritations locales (ex: appareils dentaires), l'hyperacidité (buccale, vaginale), les contacts répétés avec les sucres sont les principaux déséquilibres cutanés et muqueux qui facilitent la prolifération locale des *Candida*. Les cancers et les hémopathies, la maladie de Hodgkin, la tuberculose, les

polytraumatismes, les interventions chirurgicales lourdes, les endocrinopathies (en particulier le diabète), l'antibiothérapie au long cours, les traitements immunodépresseurs (corticoïdes, immunosuppresseurs prescrits lors des greffes d'organes et de moelle osseuse, chimiothérapie,...) et les maladies telles que certains cancers et différentes étapes de l'infection au virus de l'immunodéficience humaine (VIH) font partie des facteurs généraux favorisant les candidoses.

I.1.2 Type de candidoses

- Les candidoses cutanées et unguéales sont des infections bénignes mais parfois tenaces et difficiles à soigner. Les lésions qui en résultent sont localisées au niveau des plis interdigitaux (intertrigos) ou au niveau des ongles (onyxis) et favorisées par un environnement chaud et humide. Les candidoses granulomateuses des sujets très immunodéprimés s'expriment par des granulomes de la face et du cuir chevelu, avec généralisation secondaire.

- Les candidoses des muqueuses et cutanéomuqueuses sont les formes les plus souvent rencontrées et regroupent les candidoses buccales, digestives et vaginales. Les muqueuses buccales (muguet, perlèche, glossite) et vaginales sont les plus touchées. Près de 75% des femmes présenteront au moins une fois dans leur existence un épisode de candidose vulvo-vaginale avec des formes récidivantes dans 10% des cas. La colonisation de la muqueuse digestive par *C. albicans* est entre autre à l'origine des candidoses oropharyngées qui surviennent chez 90% des patients sidéens mais elle est également le point de départ de la dissémination de la levure.

- Les candidoses profondes ou invasives sont les infections les moins fréquentes mais les plus graves. Ce sont principalement des infections associées aux soins, touchant des patients immunodéprimés ou à prise en charge lourde (greffés, cancéreux, patients de réanimation, de chirurgie digestive). Les candidoses, principalement dues à *C. albicans*, occupent le 4^{ème} rang des infections rencontrées en milieu hospitalier mais sont la première cause de mortalité directement attribuable (~40%).

Ces infections, souvent secondaires à une dissémination hématogène, peuvent se traduire en fonction du (des) organe(s) atteints par différents troubles (respiratoires ou rénaux), des endocardites, des méningites et des endophtalmies (Kojic and Darouiche, 2004).

I.1.3 Diagnostic

Le diagnostic des candidoses superficielles consiste en l'examen des signes cliniques caractéristiques de la présence du champignon puis de son identification après prélèvement. Les techniques classiques d'identification (ex : auxanogramme et zymogramme) tendent à être remplacées par la spectrométrie de masse *MALDI-TOF* qui est plus facile, plus rapide et moins coûteuse (Marklein *et al.*, 2009). Pour le diagnostic des candidoses profondes, l'hémoculture est le « gold standard » avec une spécificité de 100%. Pourtant moins de 50% des hémocultures prélevées chez des patients ayant eu une candidose invasive prouvée à l'autopsie s'avèrent positives (Horvath *et al.*, 2004). Des techniques de détection d'anticorps et d'antigènes circulants ainsi que d'ADN peuvent compléter et affiner le diagnostic (Sendid *et al.*, 2003; Sendid *et al.*, 2004) qui reste difficile à réaliser car *C. albicans* est une levure endosaprophyte.

I.2 Caractères généraux

C. albicans fait partie des levures du genre *Candida* qui appartiennent au phylum des Ascomycota, de l'ordre des Saccharomycetales et de la classe des Hemiascomycetes. Ces champignons microscopiques unicellulaires sont de forme ovale avec un diamètre compris entre 3 et 10µm et se multiplient par bourgeonnement. Ils forment des colonies blanches crémeuses et, dans certaines conditions de culture (milieu pauvre en source azotée, pH6, 37°C), produisent des blastospores allongées à bourgeonnement polaire, correspondant au pseudomycélium. Dans d'autres conditions de culture, seules les espèces *C. albicans* et *C. dublinensis* présentent une morphogénèse spécifique par rapport aux autres espèces. Ainsi, dans du sérum, en moins de 3h, elles forment un tube germinatif qui s'allonge et se rigidifie ultérieurement pour donner du mycélium vrai. *C. parapsilosis* et *C. tropicalis* produisent des structures similaires appelées « tubes germinatifs-like ». *C. albicans* et *C. dublinensis* peuvent aussi se présenter (milieu pauvre, micro-aérobie, 25°C) sous forme de cellules de grande taille (10-12µm) à paroi épaisse, appelées chlamydozspores (Fig.2).

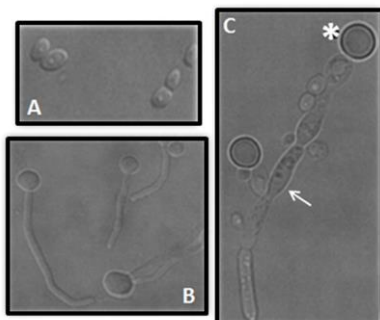


Figure 2 : Formes morphologiques de *C. albicans*. Les blastospores (A), les tubes germinatifs (B), le pseudomycélium (C, simple flèche) et les chlamydozspores (C, astérisque) ont été observés en microscopie interférentielle.

Photos prises au laboratoire Inserm U 995, équipe *Candida* et candidoses.

C. albicans est l'espèce la plus fréquemment rencontrée au cours des infections à *Candida*. D'autres espèces (*C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*,...) sont aussi des agents pathogènes de l'homme et il y a également émergence d'espèces réputées non pathogènes (*C. famata*) (Odds, 1988).

C. albicans est un organisme diploïde (Olaiya and Sogin, 1979) dont le génome de 30 Mégabases est réparti sur 8 chromosomes (1 à 7 et R) (Chibana *et al.*, 2000). Le génome de *C. albicans* est complètement séquencé et possède 6214 gènes dont seulement un peu plus de 24% sont caractérisés (<http://www.candidagenome.org/>).

La technique de MLST (MultiLocus Sequence Typing) a permis de mettre en évidence les pertes d'hétérozygotie sous pression antifongique. Une telle plasticité génétique avec un nombre de copies de gène et une répllication de chromosomes variables, confère une aptitude adaptative face à des conditions environnementales en permanence différentes (Poulain, 2013).

L'une des caractéristiques de *C. albicans* est son manque de cycle sexué. Des analyses moléculaires ont permis d'identifier un locus « mating type », MTL, partageant des similarités avec le locus *MAT* (0.7Kb) de *S. cerevisiae*. Ce dernier est constitué de deux allèles (Haber, 2012) :

- *MATa* codant pour l'homéodomaine de la protéine $\alpha 1$, exprimée constitutivement, n'a pas encore de fonction connue dans les cellules a.
- *MAT α* codant pour un domaine de la protéine $\alpha 1$ qui active les gènes α -spécifiques et un homéodomaine de la protéine $\alpha 2$ qui a pour fonction de réprimer les gènes α -spécifiques (Fig 3).

Chez *C. albicans*, le locus *MTL* possède également deux allèles, *MTLa* et *MTL α* et a une plus grande taille (9kb) que *MAT* (0.7kb) principalement due à la présence de trois gènes supplémentaires sur chaque loci: *PAP* (poly (A) polymérase), *PIK* (phosphatidylinositol kinase) et *OBP* (oxysterol bindin proteins) (Fig.3) (Hull and Johnson, 1999).

Le mating type de *C. albicans* est, comme chez *S. cerevisiae*, régulé par la production de phéromones α (levures de type α) reconnues par un récepteur des levures de type a. Le gène *MF α* code pour une α -phéromone immature, qui après l'action d'une sérine protéinase; Kex2; donne deux protéines matures, MF13 et MF14 (Bennett *et al.*, 2003; Panwar *et al.*, 2003). L' α -phéromone induit les gènes α -spécifiques dont les composants de la voie des MAP-kinases (Chen *et al.*, 2002), des protéines de surface comme Hwp1, Rbt1, Rbt4 ou des enzymes protéolytiques telles que Sap4 et Sap6.

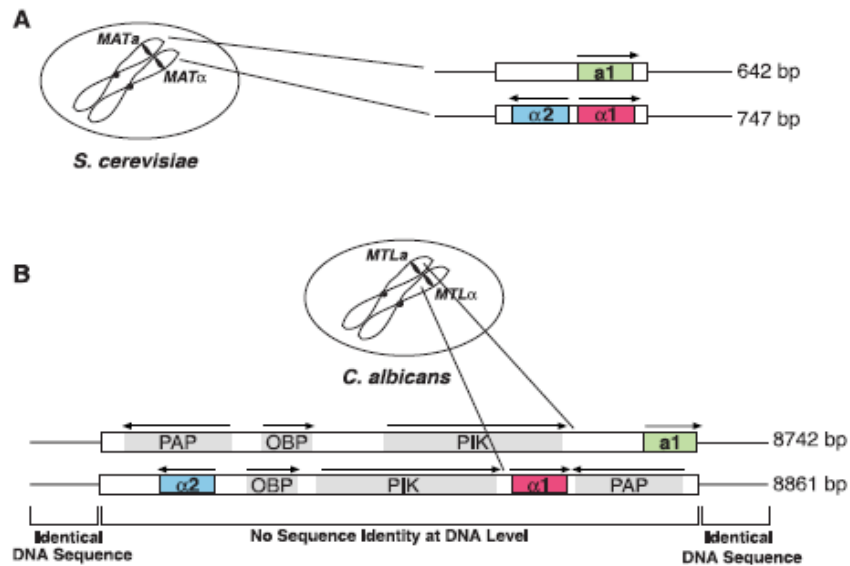


Figure 3: Caractéristiques du mating type de *S. cerevisiae* (*MAT*) et *C. albicans* (*MTL*) (Hull and Johnson, 1999).

Distribution de *C. albicans*

Les souches de *C. albicans* ont tout d'abord été divisées en deux sérotypes selon la présence (sérotypage A) ou l'absence (sérotypage B) d'un antigène mannosidique particulier au niveau de leur paroi (voir chapitre III. Les β -1,2 oligomannosides). Des analyses plus fines de biologie moléculaire, DNA fingerprinting et MLST, ont permis de séparer les souches en plusieurs groupes et d'analyser leur répartition en fonction de différents facteurs dont la zone géographique de provenance, la pathogénicité et la susceptibilité ou résistance aux antifongiques.

La technique de DNA fingerprinting avec la séquence répétitive Ca3 utilisée comme sonde a permis de répartir des isolats en 5 groupes ou clades suivant les zones géographiques: le clade E est relativement spécifique de l'Europe, le clade SA de l'Afrique du sud et les groupes génétiques I, II et III de l'Amérique du Nord avec des variations suivant la localisation (Soll and Pujol, 2003). La répartition géographique des souches a été retrouvée après séparation de 1347 isolats en 17 clades par MLST (Odds *et al.*, 2007). Cette étude a également analysé le type ABC (défini par la présence ou non d'un intron dans l'ADN ribosomal), du locus *MTL* et de la susceptibilité aux antifongiques pour les isolats des différents clades. Si la distribution du type ABC des souches dépend des clades, la susceptibilité aux antifongiques est plus liée au type *MTL* avec une réduction de la susceptibilité pour les isolats homozygotes (a/a préférentiellement et α/α).

La résistance à la 5-fluorocytosine (5-FC) est cependant retrouvée majoritairement pour les isolats du clade 1 et est caractérisée par un changement d'acide aminé dans la séquence de la protéine codée par le gène *FUR1*, une ribosyl transférase (Dodgson *et al.*, 2004; Hope *et al.*, 2004; Tavanti *et al.*, 2005). Bien que le polymorphisme des gènes *ALS3*, *ALS5* et *ALS6* codant pour des adhésines importantes dans l'adhérence de la levure aux cellules hôte (Sheppard *et al.*, 2004) soit dépendant des clades, la virulence des souches ne semble pas y être associée (MacCallum *et al.*, 2009). Il semble donc que la répartition des isolats en clades doit être associée à d'autres facteurs comme le locus *MTL* pour apporter des informations épidémiologiques relevantes sur la pathogénicité des souches de *C. albicans*.

I.3 Organisation cellulaire

I.3.1 Cytoplasme et membrane plasmique

C. albicans possède les organites classiques des cellules eucaryotes. Le noyau a une forme irrégulière et possède une double membrane qu'il garde intacte en se divisant. Le cytoplasme est riche en ribosomes et il contient également le réticulum endoplasmique qui produit un très grand nombre de vésicules, un appareil de golgi et des mitochondries bien développées (Rambourg *et al.*, 1995; Tronchin *et al.*, 1982). Le compartiment digestif se trouve dans le cytoplasme sous forme de vacuoles contenant une importante réserve d'enzymes. La principale réserve polysaccharidique se trouve dans les particules de glycogène présentes au niveau du cytoplasme.

La membrane plasmique donne fréquemment naissance à des invaginations intracytoplasmiques (Necas *et al.*, 1981) et peut être associée à la paroi par l'intermédiaire de fibrilles. Cette membrane est le lieu de nombreuses activités enzymatiques, impliquées dans la biosynthèse des constituants de la paroi : chitine synthases, glucanes synthases, glycosyl et mannosyltransférases, ATPases et phospholipases (Ram *et al.*, 1983).

Entre le plasmalemma et la paroi de la levure se trouve l'espace périplasmique où sont localisées des enzymes qui régulent le transport des métabolites et des composés structuraux.

I.3.2 Paroi

La paroi de *C. albicans* (Fig. 4) est un élément important tant au niveau de l'adhérence que de l'antigénicité et constitue l'interface entre la levure et son hôte. Elle est le point de contact et d'attachement de la levure aux tissus qu'elle colonise et aux composants cellulaires et humoraux de l'hôte. La paroi est une structure stratifiée, dynamique et complexe composée

majoritairement de sucres avec une importante diversité glycannique (Klis *et al.*, 2001; Smits *et al.*, 2001).

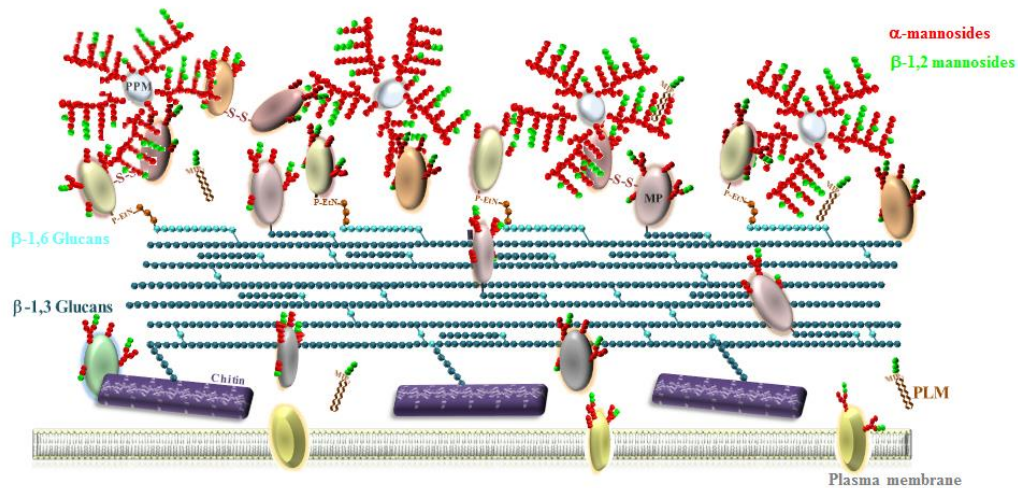


Figure 4 : Représentation schématique de la paroi de *C. albicans*

De nombreuses études ont montré l'importance de l'interface glycobiologique entre *C. albicans* et son hôte dans les mécanismes de pathogénie. Cette interface est complexe et loin d'être complètement élucidée en ce qui concerne les codes glycanniques exprimés par la levure et leurs récepteurs chez les cellules hôte (Fig.5). Il y a une communication et adaptation permanente entre *Candida* et son hôte, le moindre changement dans la composition pariétale de la levure sera perçu par l'hôte, qui à son tour va s'adapter à ce nouveau stimulus et ainsi de suite.

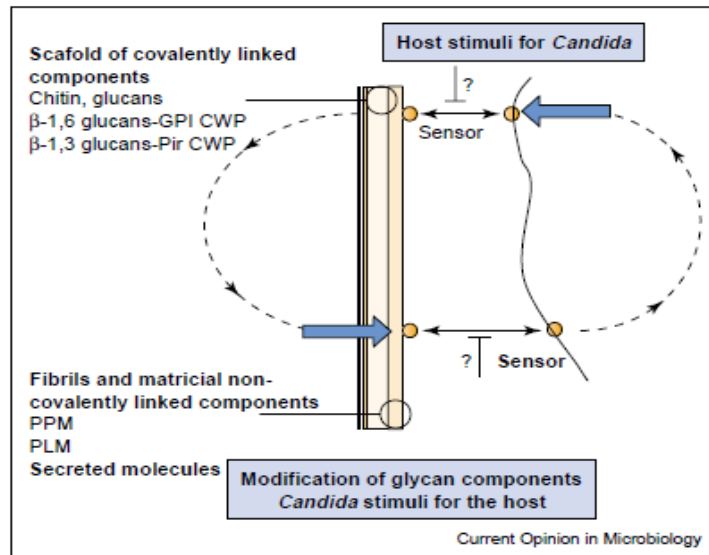


Figure 5: Modèle schématique de l'interface entre les glycannes pariétaux de *C. albicans* et l'hôte (Poulain and Jouault, 2004). Chaque protagoniste s'adapte de manière continue aux stimuli de l'autre. Un changement dans la surface cellulaire de la levure induit une réponse de l'hôte, qui à son tour est perçue par la levure et résulte en un nouveau changement. Du côté de *C. albicans*, les cellules possèdent différentes capacités d'adaptation grâce à des « sensors », voies de transduction et facteurs de transcription différents. Du côté de l'hôte, la réponse repose sur la reconnaissance des sucres du « non-soi », basée sur l'immunité naturelle et acquise des cellules. Le point d'interrogation définit quelles interactions moléculaires sont déterminantes dans les processus de colonisation et de pathogénicité.

I.3.2.1 La chitine et les β -glucanes

Le squelette microfibrillaire, qui est un réseau de polysaccharides liés par des liaisons covalentes, est responsable de la résistance chimique et mécanique de la paroi. Il joue un rôle essentiel dans le maintien de l'intégrité de la paroi. Il fait partie des éléments les plus internes de la paroi et est constitué de chitine et de couches de β -glucanes plus ou moins denses dont certaines ont des ramifications (Klis, 1994; Ruiz-Herrera *et al.*, 2006).

La chitine

La chitine, polymère linéaire de résidus N-acétyl-D-glucosamine liés en β -1,4, est un composé mineur de la paroi (2 à 4%). Elle a principalement un rôle structural au sein de cette dernière : l'inhibition de sa synthèse par la polyoxine D induit la lyse cellulaire et l'absence de formation du septum (Cabib and Bowers, 1975). En effet, la chitine est importante dans la formation des septa, pendant la croissance du bourgeon et sa séparation mais également dans

la réparation des dommages de la paroi: l'augmentation de la production de chitine compense les défauts de synthèse (quantitative et qualitative) des β -glucanes chez certains mutants (Kapteyn *et al.*, 2000). La distribution de la chitine au sein de la paroi est aléatoire et varie en fonction du cycle cellulaire (Braun and Calderone, 1978). La forme mycélienne a un taux plus élevé de chitine que la forme levure (Chattaway *et al.*, 1968; Elorza *et al.*, 1994; Sullivan *et al.*, 1983).

Les β -glucanes

Les β -glucanes sont les composants majeurs de la paroi (40 à 60%) qui ont un rôle essentiel dans la résistance chimique et mécanique de la paroi et qui sont impliqués dans les connexions cellule-cellule. Ils sont formés de longues chaînes de résidus glucose liés en β -1,3 sur lesquelles peuvent se ramifier des chaînes latérales liées en β -1,6 (Gopal *et al.*, 1984). Des associations se forment entre des β -1,3 glucanes et la chitine ou des mannoprotéines (MPs) telle que l'invertase et entre les β -1,6 glucanes et les résidus mannose du core des ancras GPI. Les proportions respectives en β -1,3 et β -1,6 glucanes varient suivant l'âge des cellules et leur morphologie (Chattaway *et al.*, 1968).

I.3.2.2 Les Mannoglycoconjugués

Les Mannoglycoconjugués constituent 30 à 40% de la paroi et, principalement les MPs déterminent les propriétés de surface, permettant à *C. albicans* d'adhérer aux tissus de l'hôte (Chaffin *et al.*, 1998).

Le phosphopeptidomannane

Le phosphopeptidomannane (PPM) encore appelé mannane, est le composant polysaccharidique superficiel de la paroi et il présente de fortes propriétés antigéniques (Domer, 1989; Nelson *et al.*, 1991; Rimek *et al.*, 2004; Suzuki, 1995). Il est constitué de polymères et d'oligomères de mannose attachés à un squelette protéique par des liaisons N- ou O- glycosidiques (Fig. 6) (Suzuki and Fukazawa, 1982). Cette structure n'est pas liée à la paroi de manière covalente et est facilement extractible par simple autoclavage. La nature des oligomannosides présents dans le mannane dépend des conditions de culture (Suzuki, 1995), impliquant une régulation des mannosyltransférases spécifiques impliquées.

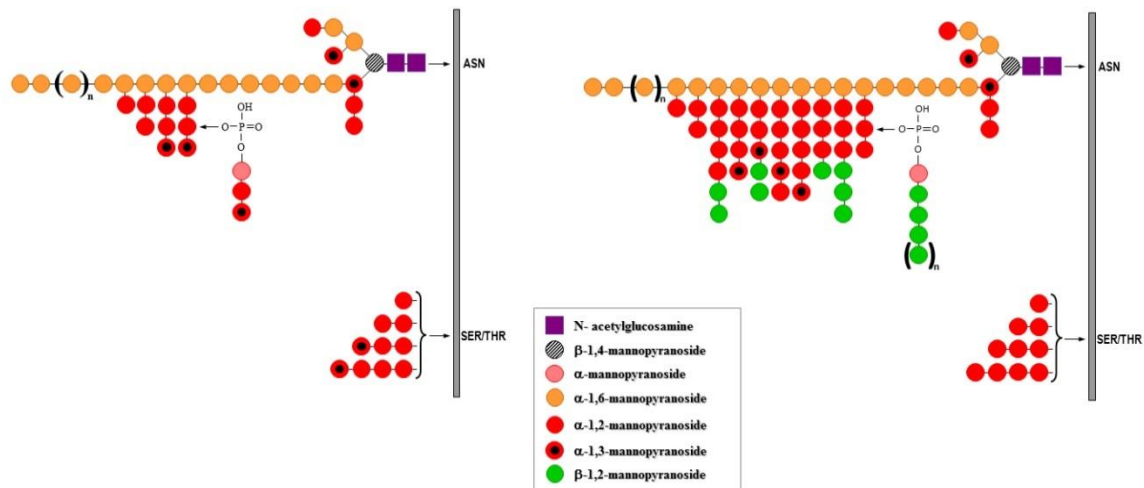


Figure 6 : Représentation schématique du phosphopeptidomannane de *S. cerevisiae* et de *C. albicans* de sérotype A

Les O-glycosyls ou O-mannanes, attachés au résidu hydroxyl d'une sérine ou d'une thréonine, sont formés de chaînes d'oligomères (1 à 6 résidus) de mannose liés en α -1,2. Contrairement aux O-mannanes de *S. cerevisiae*, ces oligomères ne portent pas de résidus α -1,3 mannosyl terminaux (Lussier *et al.*, 1999).

Les N-glycosyls sont liés à une asparagine du squelette peptidique par l'intermédiaire d'un dimère de N-acétylglucosamine. Le core interne $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ qui contient ce dimère est une structure conservée chez toutes les cellules eucaryotes. A ce core interne est rattachée une structure polymannosidique, appelée core externe, plus ou moins complexe qui varie selon les organismes, les espèces, les souches mais également suivant les conditions de culture. Deux fractions peuvent être distinguées en fonction de leur sensibilité à l'hydrolyse acide. La 1^{ère} fraction, appelée « acide stable » est constituée d'une chaîne linéaire de résidus mannose (jusqu'à 150 résidus) liés en α -1,6 sur lesquels sont branchées des chaînes latérales de résidus mannose liés en α -1,2 pouvant être terminées par des séquences de 1 à 3 résidus mannose liés en α -1,3 (Suzuki and Fukazawa, 1982) ou β -1,2 (Shibata *et al.*, 1985). Seules les souches de sérotype A, par opposition aux souches de sérotype B, contiennent ces β -1,2 mannosyl terminaux (Hasenclever and Mitchell, 1961a). A cette fraction acide stable est liée, par l'intermédiaire d'une liaison phosphodiester, une fraction « acide labile » formée d'une chaîne linéaire de résidus mannose liés en β -1,2, encore appelée phosphomannane.

Selon les auteurs, la taille de ces β -1,2 oligomannosides varie de 2 à 7 (Suzuki *et al.*, 1995) ou de 2 à plus de 14 (Trinel *et al.*, 1997).

Les mannoprotéines

Elles peuvent être structurales, participant au maintien du squelette cellulaire par leur association à la chitine et aux β -glucanes (Kapteyn *et al.*, 2000). Les MPs peuvent aussi être enzymatiques (ex: hydrolases), contribuant à l'élaboration et aux modifications de la paroi, ou permettant la digestion des substrats dont la cellule a besoin pour sa croissance. Elles possèdent également une fonction majeure dans les processus de transition morphologique (Ruiz-Herrera *et al.*, 2006).

Les MPs pariétales sont différenciées selon leur mode de liaison à la paroi. Des MPs sont liées, comme le PPM, de manière non-covalente à la paroi tandis que d'autres sont liées de manière covalente aux composés pariétaux via une partie d'ancre GPI (glycosylphosphatidylinositol), un pont disulfure ou directement aux β -1,3 glucanes (MPs alcali-solubles). L'incorporation de ces protéines dépend du pH du milieu de croissance (favorisée à pH acide) (de Groot *et al.*, 2004). De manière surprenante, plusieurs rapports font état de la présence de protéines cytoplasmiques dans la paroi, ces protéines sont décrites comme « sécrétées de manière non conventionnelle » (Chaffin *et al.*, 1998). Les protéines à ancre GPI (GPI-MPs) et les MPs alcali-solubles sont les MPs les mieux documentées.

Les protéines à ancre GPI

Les GPI-MPs sont liées aux β -1,6 glucanes par l'intermédiaire d'une partie de leur ancre GPI (glycosylphosphatidylinositol). Une séquence peptidique consensus en C-terminal porteuse du site d'attachement et de la région située en amont a été définie à partir de plusieurs espèces de champignons et permet l'identification *in silico* des GPI-MPs (voir partie I.4.3.3 Ajout d'ancres glycosylphosphatidylinositols). En recherchant dans le génome de *C. albicans* les MPs porteuses d'une telle séquence, environ 115 possibles GPI-MPS ont été identifiées et divisées en quatre classes suivant leur fonction (Eisenhaber *et al.*, 2004): 66% ont une fonction inconnue, environ 13% ont une fonction liée à la biogénèse et au remodelage de la paroi, 11% sont impliquées dans l'adhérence et l'interaction intercellulaire et 10% possèdent diverses propriétés enzymatiques comme l'activité superoxyde dismutase (Sod) et aspartyl protéase (Sap). Elles peuvent être séparées en 18 familles (8 familles de 2 membres, 6 de 6 membres, 2 familles de 4 membres et 2 familles avec 8 membres).

On retrouve notamment la famille des Als impliquées dans l'adhérence à différents substrats, Cht2, Crh11, Pga4, Phr1 (Calderon *et al.*, 2010; Eckert *et al.*, 2007; McCreath *et al.*, 1995; Pardini *et al.*, 2006) intervenant dans le remodelage de la paroi; deux membres de la famille des aspartyl protéases sécrétées (Albrecht *et al.*, 2006) Sap9 et Sap10, pour l'invasion

tissulaire ou encore Hwp1 impliquée dans l'adhérence aux cellules de l'hôte (Sundstrom, 2002).

Les mannoprotéines alcali-solubles

Les MPs alcali-solubles branchées directement aux β -1,3glucanes peuvent être libérées par un traitement alcalin. Ce traitement, correspondant à une β -élimination, permet de libérer les O-mannosides des MPs liés aux β -1,3 glucanes (Kapteyn *et al.*, 1999). Contrairement au GPI-MPs, il n'existe pas de séquence consensus pour ces MPs donc seules des analyses protéomiques sur des extraits pariétaux permettent de les identifier. Cependant l'analyse de MPs particulières, une famille de protéines avec des répétitions internes répétées (Toh-e *et al.*, 1993), les protéines Pir, et la β -1,3 glucanase Scw1 (Gomez *et al.*, 1996), encore appelée MP65, a permis de mettre en évidence que ces MPs sont liées dans la paroi aux β -1,3 glucanes. Les protéines Pir sont composées d'un peptide signal en N-terminal pour la sécrétion, d'un site de clivage Kex2p, d'un domaine central avec un nombre variable de répétitions en tandem caractéristiques et d'une région terminale composée de quatre résidus cystéines avec des espacements conservés.

I.3.2.3 Les glycolipides

Parmi les glycolipides de *C. albicans*, une molécule appartenant à la famille des mannose-inositol-phosphorylcéramides (MIPC) (Trinel *et al.*, 2002b) a été identifiée. Cette molécule, dénommée phospholipommanne (PLM), a une masse moléculaire apparente de 14-18kDa. Sa partie glycanique est constituée d'une chaîne linéaire non branchée de 2 à 18 résidus de mannose liés exclusivement en β -1,2 et sa partie lipidique est une phytocéramide associant une phytosphingosine en C18 ou C20 et un acide gras C24, C25 ou C26 généralement hydroxylé (Trinel *et al.*, 1993; Trinel *et al.*, 1999) (Fig.7). Cette structure lui confère des propriétés hydrophiles qui lui permettent de diffuser dans la paroi (Poulain *et al.*, 2002).

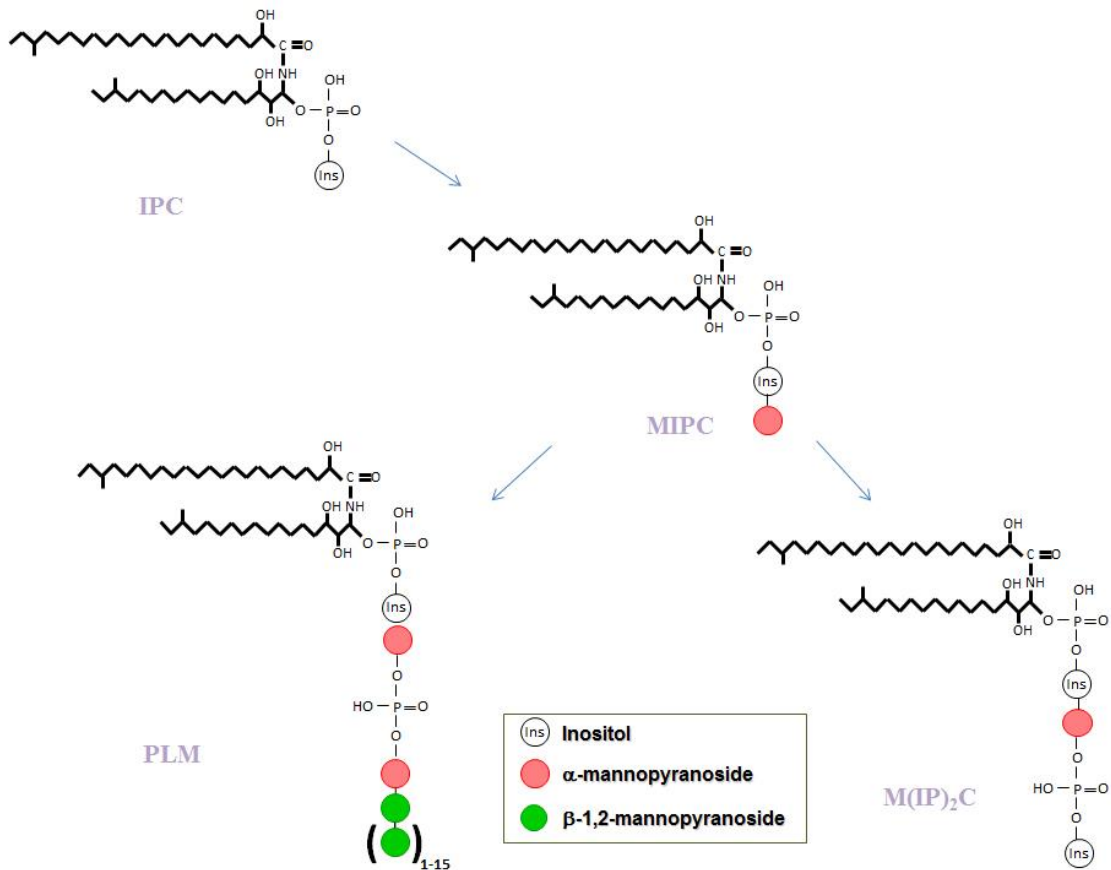


Figure 7 : Représentation schématique du phospholipomannane de *C. albicans* de sérotype A (Mille *et al.*, 2004).

La paroi de *C. albicans* renferme également différents lipides correspondant à 7% du poids sec de la paroi, comme des phospholipides, des triglycérides et des stérols libres ou estérifiés (Chattaway *et al.*, 1968; Ghannoum *et al.*, 1987). Ils ont un rôle important dans la signalisation cellulaire et l'élaboration de la paroi.

I.4 Biosynthèse des glycoconjugués

I.4.1 Biosynthèse des nucléotides sucres

Les études sur *S. cerevisiae* ont permis d'obtenir de précieuses informations sur la structure et la fonction des enzymes impliquées dans la glycosylation des protéines.

Les nucléotides sucres sont biosynthétisés dans le cytosol à partir des monosaccharides correspondants (Fig. 8). Chez *S. cerevisiae*, l'UDP-N-acétyl glucosamine (UDP-GlcNAc), le GDP-Mannose (GDP-Man) et l'UDP-Glucose (UDP-Glc) participent à la glycosylation des protéines. Ces nucléotides sucres servent soit directement de donneurs dans les réactions cytoplasmiques soit de précurseurs pour la synthèse des Dolichol phospho glucose et mannose

(Dol-P-Glc et Dol-P-Man). Ils sont également essentiels dans la biosynthèse du mannane, de la chitine et des β -glucanes. De plus, la mutation des gènes impliqués dans la biosynthèse de ces donneurs de sucre entraîne de gros changements dans la synthèse pariétale ou la morphogénèse (Orlean, 1997).

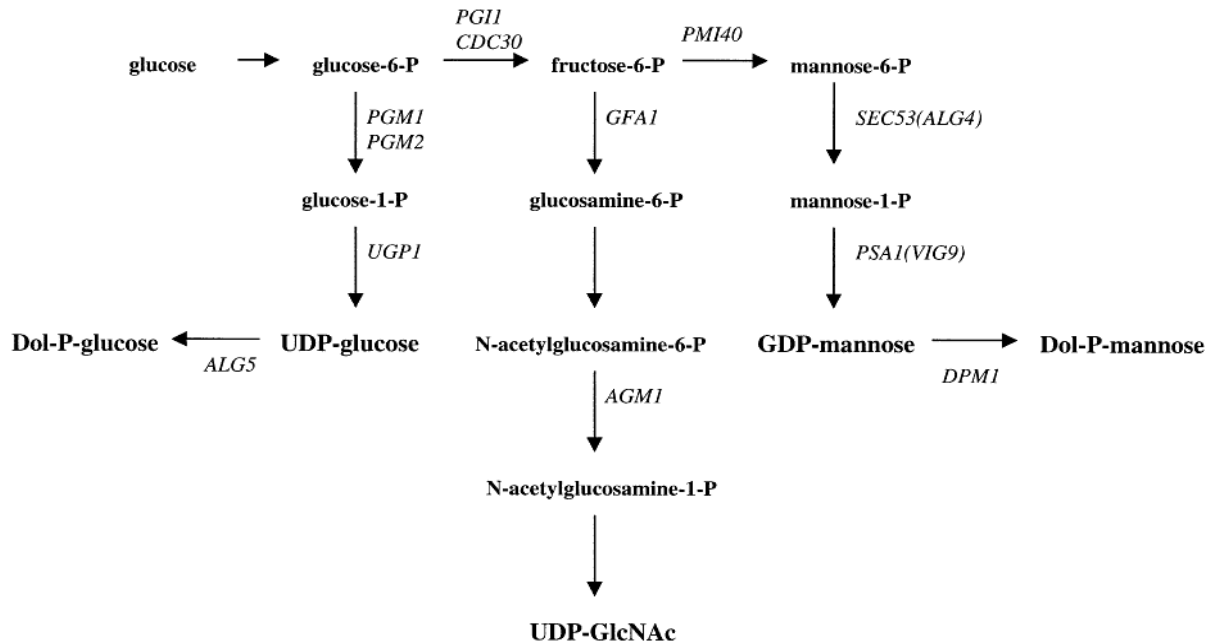


Figure 8: Biosynthèse des substrats nucléotides sucre (Burda and Aebi, 1999). La synthèse de l'UDP glucose débute à partir du glucose-6-P. Les deux phosphoglucomutases, *PGM1* et *PGM2*, catalysent la conversion réversible du glucose-6-P en glucose-1-P. L'UDP glucose est catalysé par l'UDP-glucose pyrophosphorylase (*UGPI*). La conversion du glucose-6-P en fructose-6-P est requise pour la synthèse de l'UDP-GlcNAc et du GDP-Mannose. Deux gènes *PGI1* et *CDC30* permettent cette conversion. La biosynthèse de l'UDP-GlcNAc est initiée par la glucosamine : fructose-6-P-aminotransférase (*GFA1*) qui convertit le fructose-6-P en glucosamine-6-P. Cette dernière est N-acétylée et la N-acétylglucosamine-6-P résultante est convertie en N-acétylglucosamine-1-P par la N-acétylglucosamine-phosphomutase, *AGM1*. L'UDP-GlcNAc pyrophosphorylase reste à identifier. Trois réactions enzymatiques sont nécessaires à la synthèse du GDP-mannose à partir du fructose-6-P : la phosphomannoisomérase (*PMI40*) catalyse l'isomérisation du fructose-6-P en mannose-6-P, la phosphomannomutase (*SEC53/ALG4*) convertit le mannose-6-P en mannose-1-P et enfin la GDP-Man pyrophosphorylase (*PSA1/VIG9*) catalyse la formation du GDP-mannose à partir du mannose-1-P.

I.4.2 La biosynthèse du squelette microfibrillaire

I.4.2.1 La Chitine

C. albicans possède 4 chitines synthases (Chs); Chs1, Chs2, Chs3 et Chs8 contribuant collectivement à la biosynthèse de la chitine. La délétion de chacun des gènes codant pour ces enzymes a mis en évidence des fonctions spécifiques des différentes Chs (Munro, 2013). L'expression de ces enzymes est régulée en fonction du cycle cellulaire mais également de la morphologie: la forme mycélienne présente un taux plus élevé de chitine que la forme levure (Chattaway *et al.*, 1968; Elorza *et al.*, 1994; Sullivan *et al.*, 1983).

- Chs2 est une enzyme de la classe I qui est exprimée préférentiellement par les tubes germinatifs. Elle est responsable de l'activité chitine synthase principale uniquement dans les hyphes (Gow *et al.*, 1994). La formation de tubes germinatifs est plus lente pour le mutant *chs2Δ*. Ses hyphes contiennent moins de chitine (~40%) alors que les levures n'ont pas de défaut de biosynthèse de chitine. Le mutant *chs2Δ* est aussi virulent que la souche parentale.

- Chs8 est aussi une enzyme de classe I mais elle est exprimée à la fois chez les levures et dans les hyphes. Elle contribue aux longues fibrilles de chitines dans le septum (Munro *et al.*, 2003). Le mutant *chs8Δ* présente une croissance, une morphologie et une teneur en chitine normales.

- Chs1, enzyme de classe II est essentielle pour la formation du septum primaire, la forme, l'intégrité cellulaire et la viabilité des levures et des hyphes. Les cellules filles du mutant *chs1Δ* ne se détachent pas des cellules mères et le septum primaire ne se forme pas chez les tubes germinatifs (Mio *et al.*, 1996; Munro *et al.*, 2001).

- Chs3 est une enzyme de classe IV requise pour la synthèse de la chitine globale à la fois chez les levures et les tubes germinatifs chez qui elle partage le rôle avec Chs2. Les cellules (levures et tubes germinatifs) du mutant *chs3Δ* possèdent beaucoup moins de chitine que la souche sauvage (Mio *et al.*, 1996). Chs3 contribue également à la synthèse de courts bâtonnets de chitine (Lenardon *et al.*, 2007).

I.4.2.2 Les β -1,3 glucanes

Les β -1,3 glucane synthases utilisent l'UDP-glucose comme substrat et ajoutent les résidus glucose aux extrémités non réductrices du polymère (réaction de transglycosylation). Elles sont constituées d'au moins deux composants: une sous unité catalytique Gsc1/Fks1 (Mio *et al.*, 1997a) et une sous unité régulatrice à activité GTP-ase, Rho1 (Kondoh *et al.*, 1997). L'association de Rho1 est requise pour activer la synthèse de glucanes par FKS1.

Cela permet à la cellule de produire des β -1,3 glucanes quand elle en a besoin pour sa croissance ou pour renforcer la paroi en réponse à un stress.

Comme les chaînes de β -1,3 glucanes sont synthétisées linéairement, la présence de ramifications dans les molécules matures implique l'existence d'enzymes intervenant dans la maturation des β -1,3 glucanes (Iorio *et al.*, 2008). Parmi celles-ci se trouvent Phr1, Phr2 et Gas1 qui catalysent les réactions de transglycosylation pour l'élongation et le réarrangement des chaînes de β -1,3 glucanes (Mouyna *et al.*, 2000; Popolo and Vai, 1999), Bgl2 qui introduit les chaînes de β -1,6 glucanes par une activité β -1,3 glucosyltransférase (Sarthy *et al.*, 1997) et Xog1 qui est la principale exo β -1,3 glucanase de *C. albicans* (González *et al.*, 1997).

De par son importance dans la biogénèse de la paroi, les β -1,3 glucane synthases sont une cible majeure dans le développement d'agents antifongiques. La famille des échinocandines, inhibiteurs de la β -1,3 glucane synthase, est couramment utilisée en clinique pour le traitement des aspergilloses et candidoses (Walker *et al.*, 2011).

I.4.2.3 Les β -1,6 glucanes

La biosynthèse des β -1,6 glucanes reste à ce jour très peu documentée. Nos connaissances actuelles de cette biosynthèse ont été déduites d'études réalisées chez *S. cerevisiae* qui possèdent plusieurs gènes capables d'affecter le taux de β -1,6 glucanes dans la paroi (Shahinian and Bussey, 2000). Le crible de résistance à la toxine K1, protéine létale qui se lie aux β -1,6 glucanes, a permis la sélection de souches mutantes présentant un taux réduit ou indétectable de β -1,6 glucanes (Bussey, 1991). L'utilisation de ce crible a permis l'identification de plusieurs gènes *KRE* (*Killer toxin REsistant*) qui codent pour des molécules ayant un rôle direct ou indirect dans la biosynthèse des β -1,6 glucanes (Al-Aidroos and Bussey, 1978; Boone *et al.*, 1990; Brown *et al.*, 1993). Ainsi chez *C. albicans* sont retrouvés des homologues de *KRE1* (Boone *et al.*, 1991), *KRE5* (Herrero *et al.*, 2004), *KRE6* (Mio *et al.*, 1997b) et *KRE9* (Lussier *et al.*, 1998), qui sont tous impliqués dans la biosynthèse séquentielle des β -1,6 glucanes.

I.4.3 La biosynthèse des mannoprotéines

Les levures ont servi de modèles d'études de la glycosylation des cellules eucaryotes. Plusieurs processus de sécrétion sont en effet conservés entre les levures et les mammifères. Plusieurs composants ont pu ainsi être découverts chez les mammifères par similarité avec les levures (Bennett and Scheller, 1993; Whiteheart and Kubalek, 1995). La glycosylation des

MPs se fait essentiellement dans le réticulum endoplasmique (RE) et l'appareil de golgi et concerne donc les protéines membranaires et les protéines sécrétées. Il est généralement admis que la paroi des levures est une barrière servant à retenir la majorité des MPs sécrétées.

L'importance de la glycosylation des MPs de levures a été révélée grâce à des mutants présentant des défauts globaux ou ciblés de glycosylation (Ballou, 1990; Bates *et al.*, 2013; Hall *et al.*, 2013; Novick and Schekman, 1979). Si la glycosylation des protéines est importante pour leur transport, elle l'est également pour leur activité enzymatique et leur reconnaissance par d'autres molécules. Il existe trois types majeurs de glycosylation chez les cellules eucaryotes dépendant de l'acide aminé portant les glycanes : N-glycosylation (asparagine), O-glycosylation (sérine ou thréonine) et C-glycosylation (tryptophane). Ces différents types de glycosylation utilisent des systèmes enzymatiques différents. Les MPs de *C. albicans* contiennent uniquement des N- et O-glycanes. Certaines de ces MPs peuvent également contenir une ancre GPI entière ou tronquée qui leur permet de s'ancrer à la membrane plasmique ou aux β -1,6 glucanes. La N- et O-glycosylation ont été montrées comme étant importantes dans l'intégrité pariétale (Bates *et al.*, 2006; Mora-Montes *et al.*, 2007), l'adhésion (Munro *et al.*, 2005), la virulence (Bates *et al.*, 2006; Bates *et al.*, 2005; Hall *et al.*, 2013; Munro *et al.*, 2005; Rouabhia *et al.*, 2005) et constituent un des majeurs PAMPs reconnus par le système immunitaire inné de l'hôte (Fradin *et al.*, 2008; Hall *et al.*, 2013; Mora-Montes *et al.*, 2010; Mora-Montes *et al.*, 2007; Netea *et al.*, 2006).

I.4.3.1 La N-glycosylation

Sites d'initiation et translocation

La synthèse des N-glycanes s'effectue dans deux sites cytologiques différents : 1) le RE où s'effectue le pré-assemblage sur le dolichol d'un oligosaccharide unique qui sera ensuite transféré en bloc sur un résidu asparagine de la protéine naissante; 2) l'appareil de golgi où la maturation des glycoprotéines par une série de glycosyltransférases a lieu de façon progressive et séquentielle.

Synthèse de la chaîne interne oligosaccharidique

De manière générale, le processus de N-glycosylation chez *C. albicans* est similaire à *S. cerevisiae* bien qu'il existe quelques différences du N-mannane entre ces deux espèces, comme le degré de polymérisation des chaînes latérales α -1,2 mannosidiques et la présence ou non de β -Mans terminaux ou le phosphomannose et donc des α -1,3 Mans terminaux

(Fig.6). La biosynthèse des oligosaccharides N-liés débute par l'assemblage de l'oligosaccharide précurseur sur le porteur dolichol pour donner: (Glc)₃-(Man)₉-(GlcNAc)₂-dol-PP (Burda *et al.*, 1999). La biosynthèse de ce précurseur débute dans le cytosol pour continuer dans la lumière du RE. Chez *S. cerevisiae*, elle est initiée par Alg7 qui transfère une unité GlcNAc-P de l'UDP-GlcNAc (voir partie I.4.1) vers le dol-P pour former une molécule de dolichol pyrophosphate-N-acétylglucosamine ou dol-PP-(GlcNAc)₂ (Burda and Aebi, 1999). Un second résidu de β-1,4-N-acétylglucosamine est ajouté mais cette étape n'a pas encore été caractérisée. Les étapes suivantes contribuent à l'addition de cinq unités mannose pour aboutir à la formation du dol-PP-(GlcNAc)₂-(Man)₅. Alg1 et Alg2 ajoutent respectivement le 1^{er} et le 2^{ème} mannose mais d'autres mannosyltransférases restent à être identifiées. A cette étape le polysaccharide bascule vers la lumière du RE où quatre mannosyltransférases (Alg3, 9, 12 et une inconnue) et trois glucosyltransférases (Alg6p, 8 et 10) terminent de compléter la structure du core interne (Burda and Aebi, 1999; Fig.9).

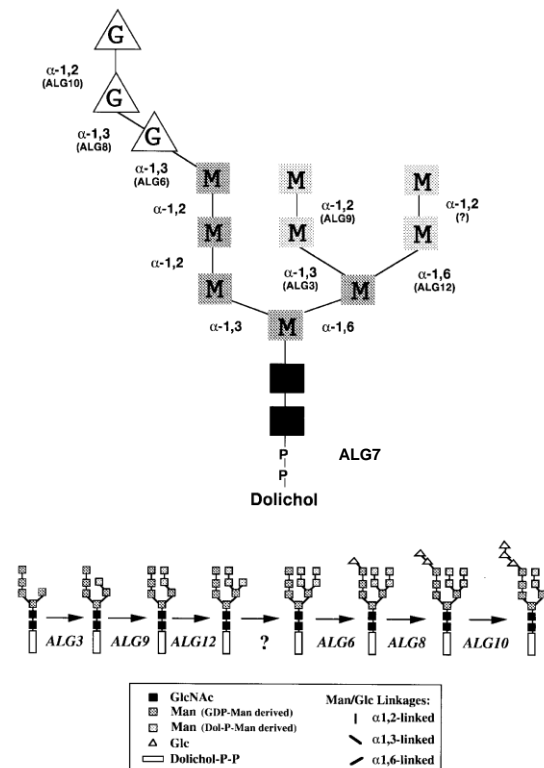


Figure 9 : Structure et voie d'assemblage du pyrophosphoryl-oligosaccharide de dolichol. Les différentes étapes de synthèse ont lieu au niveau de la membrane du RE catalysées par une série de glycosyltransférases hautement spécifiques codées par les gènes *ALGs*. La portion des voies d'assemblage se produisant dans la lumière du RE est montrée. Le lien de chaque résidu glycosyl et des loci codant pour les glycosyltransférases correspondantes sont indiquées (Burda *et al.*, 1999).

Le transfert en bloc du core oligosaccharidique est transféré du dolichyl pyrophosphate à l'asparagine de la protéine, plus précisément sur une séquence consensus Asn-X-Ser/Thr (le X pouvant être n'importe quel acide aminé à l'exception d'une proline), des chaînes polypeptidiques naissantes durant la translocation dans la lumière du RE (Burda *et al.*, 1999; Knauer and Lehle, 1999). Cette translocation est catalysée par l'enzyme N-oligosaccharyltransférase (Ost), il en existe 9 sous unités : Ost1p, Ost2p, Stt3p, Wbp1p et Swp1p sont essentielles pour la viabilité cellulaire; Ost4p est essentielle pour une croissance cellulaire à 37°C mais pas à 25°C ; Ost3p, Ost5p et Ost6p sont requises pour une activité enzymatique optimale (Knauer and Lehle, 1999).

Modification de la chaîne interne

Des glucosidases, α -1,2-glucosidase (GlcI) et α -1,3-glucosidase (GlcII), suppriment les résidus glucose et l' α -mannosidase Mns1 convertit ensuite le core interne en (Man)₈-(GlcNAc)₂-Asn (Herscovics, 1999b) avant le transit dans l'appareil de Golgi où des chaînes élaborées externes sont ajoutées.

Synthèse de la chaîne externe

Après l'action des glycosidases, la maturation des N-glycoprotéines a lieu rapidement dans les différents compartiments de l'appareil de Golgi. Un squelette linéaire d'au moins cinquante résidus mannose α -1,6 liés est établi sur le core interne. De hautes structures branchées sont ensuite créées par l'addition de mannoses liés en α -1,2 et α -1,3 (Ballou, 1990; Herscovics, 1999a; Herscovics and Orlean, 1993) formant une structure ramifiée et complexe. Un phosphomannose dont la synthèse faite, est positivement régulée par Mnn4 (Odani *et al.*, 1996) est ajouté par Mnn6 (Ballou, 1975), capable de reconnaître n'importe quel oligosaccharide contenant au moins une unité mannoïose liée en α -1,2, à certaines chaîne latérales (Rayner and Munro, 1998). Chez *C. albicans*, des mannoses liés en β -1,2 sont rajoutés en bout de chaînes latérales ou au phosphomannose (Suzuki *et al.*, 1995; Trinel *et al.*, 1997).

La N-glycosylation est dépendante d'un grand nombre d'activités de glycosyltransférases permettant l'addition des différents résidus mannoses (Bates *et al.*, 2005; Hall and Gow, 2013). L'étude des mutants *mnn1* de *S. cerevisiae* puis de *C. albicans* a largement contribué au décryptage de la biosynthèse de la chaîne externe des N-glycoprotéines. La génération des

chaînes externes est dépendante d'Och1 qui ajoute le 1^{er} mannose lié en α -1,6 sur le core interne, ainsi l'inactivation d'Och1 bloque l'élongation des N-mannanes de *C. albicans* (Bates *et al.*, 2006). Chez *S. cerevisiae*, la chaîne principale d' α -1,6 mannosides est ensuite élongée par des polymérase de type I et II composée d'Mnn9/Van1 et Mnn9/Anp1, respectivement, (Hashimoto and Yoda, 1997; Jungmann and Munro, 1998) alors que chez *C. albicans* cette action est remplie principalement par Mnn9 (Southard *et al.*, 1999). Des chaînes latérales composées d' α -1,2 mannosides parfois terminées par d'autres résidus mannosidiques sont attachées à cette chaîne principale. Chez *S. cerevisiae*, l'initiation de la synthèse des unités α -1,2-mannosidiques est réalisée par la mannosyltransférase Mnn2 suivie de l'action de Mnn5, dont les orthologues ont été retrouvés chez *C. albicans* (Hall *et al.*, 2013), qui va élonger la chaîne α -1,2 mannosidique parfois terminée par des α -1,3 mannosides. Chez *C. albicans*, les chaînes externes peuvent également se terminer par des unités α -1,3 mannosidiques via Mnn1 (Romero *et al.*, 1999; Yip *et al.*, 1994) mais également β -1,2 mannosidiques ajoutées par Bmt1 puis Bmt3 (Ballou, 1976; Hall and Gow, 2013; Mille *et al.*, 2008). Chez *C. albicans*, Mnn4 participe comme régulateur positif à l'attachement du phosphomannose aux chaînes externes du N-mannane (Hobson *et al.*, 2004). Le phosphomannose est β -1,2 mannosylé successivement par Bmt2, Bmt3 et Bmt4 (Ballou, 1975; Mille *et al.*, 2008). De nombreuses glycosyltransférases restent à être caractérisées (Fig.10).

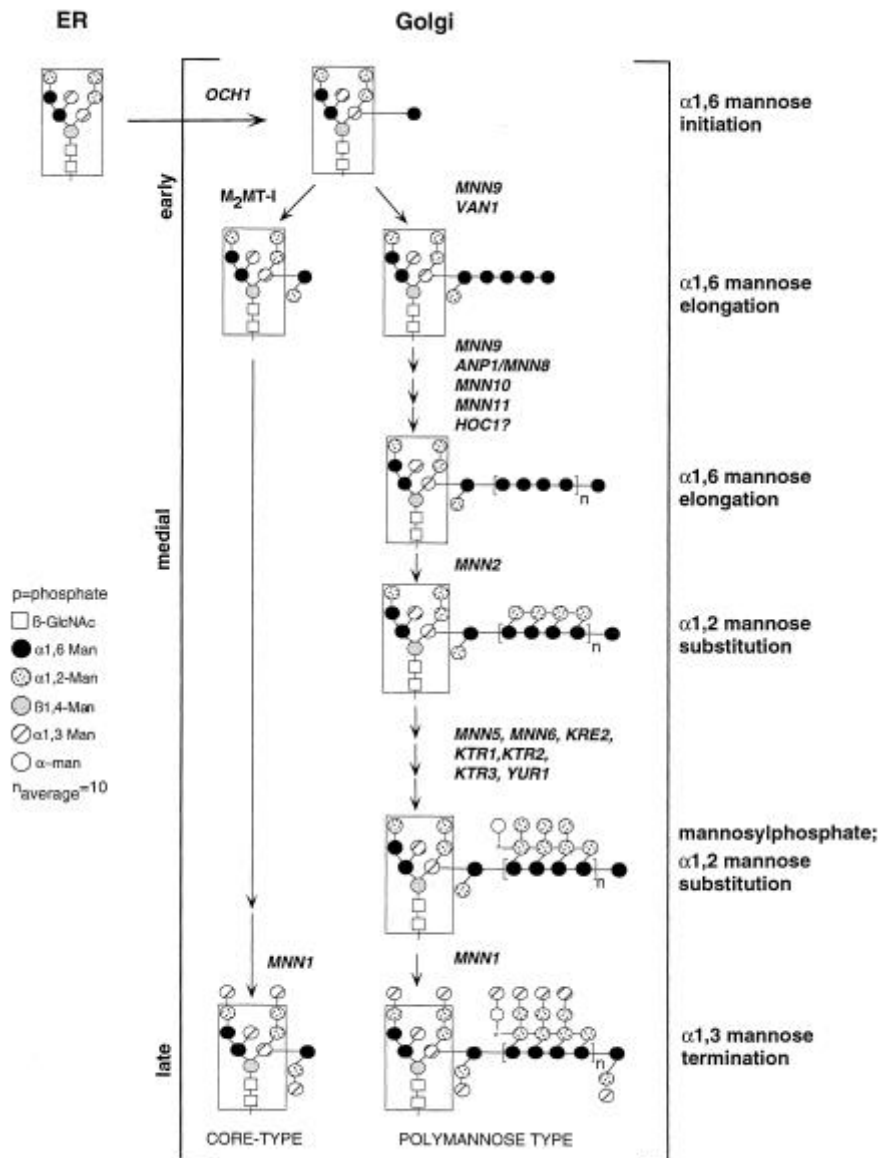


Figure 10 : Modifications post-traductionnelles des glycoprotéines néo-synthétisées chez *S. cerevisiae* (Dean, 1999).

Fin de l'élongation

L'addition d'un résidu α -1,2 mannose au α -1,6 mannose à l'extrémité non réductrice des oligosaccharides agit comme un signal d'arrêt et permet de contrôler l'élongation de la chaîne externe (Ballou, 1990).

I.4.3.2 La O-glycosylation

La O-glycosylation est initiée dans le RE par le transfert d'un résidu mannose sur un résidu sérine ou thréonine d'une protéine en cours de synthèse. Chez *C. albicans*, les O-glycannes

sont des oligosaccharides linéaires de un à six résidus α -1,2 mannosidiques (Buurman *et al.*, 1998; Shibata *et al.*, 1985). Leur synthèse est initiée par une enzyme de la famille des protéines mannosyltransférases (Pmts), qui est composée de six membres (Prill *et al.*, 2005). La délétion de Pmt1 ou Pmt6 entraîne une diminution de glycosylation de certaines protéines et du taux de croissance, une hypersensibilité à des antifongiques, un défaut de transition levure-mycélium et une atténuation dans la virulence (Timpel *et al.*, 1998; Timpel *et al.*, 2000) soulignant l'importance de la O-mannosylation des mannoprotéines de *C. albicans*. De plus, Pmt2 est le seul membre de la famille essentiel pour la viabilité cellulaire (Prill *et al.*, 2005). Mnt1 et Mnt2 sont des α -1,2 mannosyltransférases impliquées dans l'addition du 1^{er} et 2nd α -1,2 mannose (Munro *et al.*, 2005; Fig.11). La délétion de *MNT1* et *MNT2* seul ou combiné résulte en un O-mannane tronqué (Buurman *et al.*, 1998). La récente caractérisation biochimique de la famille de gènes *MNT* suggère que *MNT1* peut promouvoir l'élaboration des chaînes O-mannane (Díaz-Jiménez *et al.*, 2012).

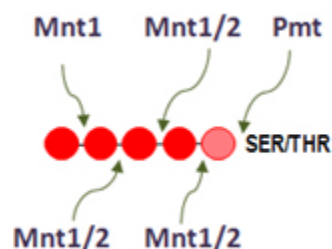


Figure 11 : Structure du mannane O-lié et enzymes impliqués dans la O-glycosylation de *C. albicans* (Munro *et al.*, 2005).

I.4.3.3 Ajout d'ancres glycosylphosphatidylinositols

La partie C-terminale de la protéine est liée par une liaison peptidique, via un phosphoéthanolamine (P-EtN), à un tétra-saccharide de séquence : Mannose α (1-2) Mannose α (1-6) Mannose α (1-4) Glucosamine (M3-M2-M1-GlcN). Ce dernier est à son tour lié en α (1-6) à un inositol. Enfin, l'inositol est attaché via un phosphate à un groupement lipidique hydrophobe qui permet à l'ancre de s'enchâsser dans la membrane et d'y former un réseau de liaisons hydrophobes assurant son attachement. Des modifications ont lieu au niveau du groupement des trois mannoses ou du groupement lipidique en fonction de chaque organisme (Tiede *et al.*, 1999).

Après la biogénèse de l'ancre dans la membrane du RE grâce aux enzymes codées par les différents gènes *GPIs* (Eisenhaber *et al.*, 2003) celle-ci est transférée sur les protéines cibles

destinées à être ancrées à la membrane via un GPI et possédant les critères suivants (Mayor and Riezman, 2004) :

- un peptide signal hydrophobe en N-terminal qui permet à la protéine d'être envoyée vers le RE
- un peptide C-terminal hydrophobe (10-15 acides aminés) qui ancre de manière transitoire la protéine synthétisée dans la membrane du RE
- un triplé d'acides aminés de petite taille situé au niveau du site de coupure (site ω) puis d'attachement de l'ancre. Le site ω est localisé 9 à 10 acides aminés avant le domaine C-terminal hydrophobe et la nature des acides aminés en amont du site de clivage ω est décisif dans l'envoi des protéines GPI à la paroi (Thomas *et al.*, 1990).

Le transfert de l'ancre sur la protéine est catalysé dans la lumière par un complexe transamidase composé de cinq protéines constitué de deux sous unités : Gpi8p/Gpi16p/Gaa1p et Gab1p/Gpi17p (Eisenhaber *et al.*, 2001).

I.4.4 La biosynthèse des sphingoglycolipides

Les sphingolipides sont constitués d'une phytosphingosine d'une chaîne de 18 à 20 carbones associée à des acides gras hydroxylés en C24, C25 ou C26. La synthèse des sphingolipides commence par la condensation d'une sérine et d'un palmityl-CoA aboutissant à la 3-ketodihydrosphingosine. Cette réaction essentielle et irréversible est catalysée par la sérine palmitoyltransférase (Spt) (cible de nombreux inhibiteurs naturels comme les sphingofongiques, lipoxamycine, etc...). Chez *S. cerevisiae*, Lcb1 et Lcb2 sont les sous unités de Spt (Nagiec *et al.*, 1994). La 3-ketodihydrosphingosine est réduite en dihydrosphingosine (ou encore sphinganine) par une réaction NADPH-dépendante (Pinto *et al.*, 1992). Les enzymes nécessaires à cette étape n'ont pas encore été caractérisées.

Un acide gras de 24 à 26 carbones (Lester *et al.*, 1993) est ensuite associé via une liaison amide sur la dihydrosphingosine pour former une dihydrocéramide. Cette réaction est catalysée par la dihydrosphingosine N-acetyltransférase (céramide synthase).

Chez *S. cerevisiae* les céramides sont modifiées par l'addition d'un phosphate myo-inositol pour former un inositol phosphocéramide, l'IPC. Cette réaction est catalysée par une IPC synthase dont l'activité dépend du gène *AURI* (Nagiec *et al.*, 1997). L'IPC est mannosylé pour aboutir à un mannose-inositol-phosphocéramide (MIPC), réaction qui nécessite l'action des enzymes Sur1 et Csg2 (Beeler *et al.*, 1994).

La dernière étape de synthèse des sphingolipides chez *S. cerevisiae* est initiée par Ipt1, homologue de Aur1 (Dickson *et al.*, 1997) responsable de l'addition d'inositol phosphate sur le MIPC pour former un M(IP)₂C (Fig.12). Chez *C. albicans*, la mannosylation d'IPC aboutissant à la formation du MIPC est catalysée par Mit1 (Mille *et al.*, 2004). La biosynthèse des sphingolipides débute dans le RE et initie la formation des céramides. Par la suite, les sphingolipides complexes [IPC, MIPC et M(IP)₂C] sont synthétisés dans l'appareil du Golgi (Prasad *et al.*, 2005). Les sphingolipides sont très hétérogènes de par l'absence ou non d'hydroxylation, la longueur de la chaîne carbonée ou la nature de l'acide gras.

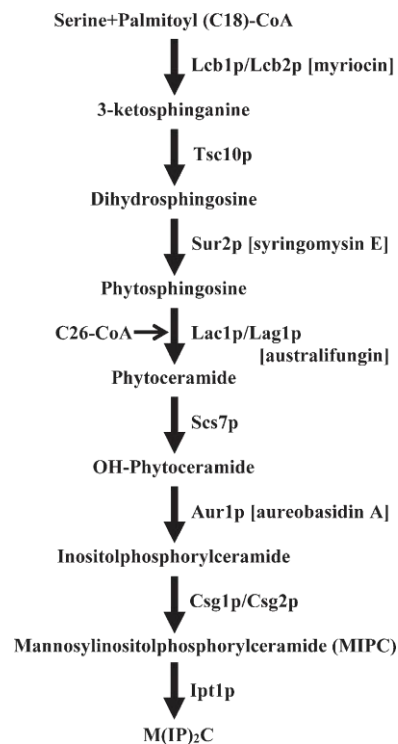


Figure 12: Voie générale de biosynthèse des sphingolipides chez *S. cerevisiae* (Prasad *et al.*, 2005). Les inhibiteurs d'enzymes particulières ou les composés qui exigent des produits pour l'inhibition de croissance sont entre parenthèses.

II. Relations hôte-pathogène

C. albicans est bien adapté aux conditions physiologiques de l'hôte puisqu'il vit à l'état commensal chez environ 50% des individus sains, principalement au niveau des muqueuses digestives et vaginales. Cette levure possède également différents attributs lui permettant de prendre avantage des perturbations de l'homéostasie de l'homme (antibiothérapie, immunodépression acquise par des agents chimique ou des maladies,...). Elle peut ainsi

proliférer, envahir ou dégrader les cellules et tissus de l'hôte (Calderone and Fonzi, 2001). La mise en évidence de ces facteurs contribuant à la virulence est essentielle pour déterminer les mécanismes impliqués afin de développer de nouvelles molécules antifongiques ainsi que de nouveaux outils diagnostic.

II.1 Facteurs contribuant à la virulence

Parmi les nombreux facteurs contribuant à la virulence de *C. albicans*, nous ne citerons que les principaux. L'adhérence de *C. albicans* aux cellules de l'hôte est certainement une étape importante dans la colonisation des muqueuses et dans l'infection qui en résulte. La levure possède différentes adhésines qui lui permettent de se fixer à de nombreuses cellules et molécules de l'hôte (Chaffin, 2008). Différentes mannoprotéines pariétales permettant la fixation de *C. albicans* aux cellules épithéliales et endothéliales ont été identifiées. Ces adhésines incluent les protéines de la famille des Als (*Agglutinin-Like Sequence*) qui se lient à diverses protéines (laminine, collagène, fibrinogène,...) ainsi qu'à des cellules épithéliales et endothéliales via des liaisons non-covalentes (Murciano *et al.*, 2012) et Hwp1 (Hyphal Wall Protein 1), substrat pour les transglutaminases, qui permet l'attachement de *C. albicans* aux tissus par l'intermédiaire de liaisons covalentes (Ponniiah *et al.*, 2007; Staab *et al.*, 2013). Inversement, les cellules de l'hôte -dont les cellules immunitaires- possèdent de nombreuses lectines membranaires -ou s'associant aux membranes- reconnaissant les glycannes pariétaux de la levure (Poulain and Jouault, 2004). L'interaction de ces glycannes avec leur récepteur peut permettre la colonisation des tissus (interaction avec les cellules épithéliales), la phagocytose permettant la destruction de *C. albicans* ou son passage à travers la barrière endothéliale (Fratti *et al.*, 1998) et la modulation de la réponse immunitaire (Jouault *et al.*, 2009).

Le processus d'invasion tissulaire fait intervenir différentes enzymes hydrolytiques secrétées différemment selon l'environnement et surtout selon les substrats disponibles. Ces enzymes font partie des familles des aspartyl protéinases, Sap (Secreted Aspartyl Proteinase), des lipases (Lip), phospholipases et sont très représentatives des propriétés adaptatives de *C. albicans* (Noumi *et al.*, 2010; Schaller *et al.*, 2005). L'expression des différents membres sont dépendants, entre autre, du pH, de la localisation de *C. albicans* et de sa morphologie (Hube, 2004). Leur rôle est varié (dégradation de protéines/lipides/phospholipides, dégradation des structures cellulaires et tissulaires de l'hôte, dégradation de composants du système

immunitaire, activation de l'inflammasome) et nécessaire pour l'établissement de l'infection (Pietrella *et al.*, 2013) (Gropp *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2014).

La filamentation a souvent été associée à la virulence de *C. albicans*. Les formes filamenteuses seraient importantes lors des processus d'invasion (pouvoir de pénétration des tissus plus important que les levures) et adhèreraient davantage que les levures à de nombreux substrats et cellules (Magee, 2010). Différentes adhésines, dont Hwp1 et Als3 ainsi que des enzymes hydrolytiques comme Sap4-6 sont uniquement exprimées après germination de la levure (Hube, 2004). De plus, le passage de la forme levure à la forme filamenteuse permet à *C. albicans* d'échapper mécaniquement aux phagocytes ou aux cellules endothéliales (Calderone and Fonzi, 2001; Jiménez-López and Lorenz, 2013). La germination de la levure ne doit cependant pas être considérée comme un facteur de virulence exclusif. En effet, les formes levures et mycéliennes sont retrouvées au niveau de tissus infectés (Winblad, 1975) il semblerait que si les formes mycéliennes sont importantes pour l'invasion tissulaire, les formes levures permettraient la dissémination de *C. albicans* (Bendel *et al.*, 2003; Saville *et al.*, 2003).

En plus de la germination, *C. albicans* possède la caractéristique de pouvoir changer fréquemment de phénotypes identifiables notamment par la morphologie des colonies (Slutsky *et al.*, 1985). Cette conversion du phénotype original en phénotype variant, qui est spontanée et réversible, a été dénommée *switching* (Soll, 2014). En ce qui concerne la corrélation entre « *switching* » et pathogénicité, il a été montré que le pourcentage de souches de *C. albicans* présentant la capacité de changer phénotypiquement est plus élevé chez les souches isolées d'infections profondes que celles isolées d'infections superficielles (Jones *et al.*, 1994). Le « *switching* » qui découle d'un réarrangement génomique, ne modifie pas uniquement le phénotype morphologique de la levure mais peut modifier l'expression de facteurs intervenants dans la virulence de *C. albicans* comme les enzymes hydrolytiques et certaines adhésines. De plus, la susceptibilité aux antifongiques azolés est régulée *in vitro* par le *switching* (Gallagher *et al.*, 1992). Il semble donc clair que, même si toutes ses composantes ne sont pas élucidées, le « *switching* » contribue à l'adaptation de *C. albicans* à son hôte ainsi qu'à sa pathogénicité.

II.2 Résistance aux antifongiques

L'augmentation de la prévalence des isolats résistants aux agents antimicrobiens est un problème clinique (Sanglard *et al.*, 2009; Sanglard and Odds, 2002). Il existe différents antifongiques classés suivant leur site d'action au niveau de la cellule :

- Les polyènes, comme la nystatine ou l'amphotéricine B, provoquent la mort cellulaire en s'intercalant dans l'ergostérol membranaire pour former des canaux et détruire le gradient de proton dans la cellule accompagné de la perte du contenu cytoplasmique (Wynn *et al.*, 2003).
- Les azolés, incluant les imidazoles et les triazoles, inhibent la biosynthèse de l'ergostérol induisant sa diminution au niveau de la membrane (Wynn *et al.*, 2003).
- La 5-Flucytosine (5-FC) induit l'interruption de la synthèse de l'ADN et des protéines (Wynn *et al.*, 2003).
- Les échinocandines inhibent la synthèse des β -1,3 glucanes (Cuenca-Estrella *et al.*, 2000).

La résistance est dite primaire lorsque l'organisme est résistant à l'antifongique avant exposition et secondaire lorsqu'elle est induite en réponse à l'antifongique (Wynn *et al.*, 1999). Ce dernier mécanisme a permis l'émergence de la résistance aux azolés (ex : fluconazole), utilisés dans le traitement des candidoses mucosales des patients HIV (White *et al.*, 2002). Parmi les nombreux gènes contribuant à la résistance aux antifongiques, on trouve ceux codant pour des pompes à efflux. *C. albicans* en possède deux : l'Adénosine triphosphate Binding Cassette (ABC) codée par les gènes *CDR* (*CDR1* et *CDR2*) et un facilitateur majeur codé par les gènes *MDR* participant à la résistance au fluconazole. Ces gènes ont été démontrés comme étant surexprimés lors de la formation de biofilm (Chandra *et al.*, 2001; Ramage *et al.*, 2002).

La résistance de *C. albicans* à la 5-flucytosine (5-FC) est due à un changement nucléotidique d'une cytosine à une thymine en position 301 du gène de l'uracile phosphoribosyltransférase (*FUR1*) aboutissant à la déficience d'enzyme impliquée dans l'induction, le transport et la transformation de la 5-FC. Les souches homozygotes (C/C) sont susceptibles à la 5-FC, les souches hétérozygotes (C/T) sont moins susceptibles et les souches homozygotes (T/T) sont résistantes à la 5-FC. Cette mutation est restreinte aux souches de *C. albicans* du clade I. (Dodgson *et al.*, 2004).

Le mécanisme de résistance aux échinocandines est lié à une mutation dans le complexe de la β -1,3 glucane synthase, notamment au niveau de deux régions hautement conservées du gène

FKS1 (Fig.13 A). Le mutant *fks1Δ* peut être jusqu'à mille fois moins sensible aux échinocandines. De plus, en inhibant la synthèse de la (1,3)-β-D-glucane, les échinocandines causent une perte de l'intégrité cellulaire et induisent un stress cellulaire (Perlin, 2007). Rho1, qui est un régulateur positif de l'activité de la (1,3)-β-D-glucane synthase, agit également sur la voie de signalisation de la protéine kinase C (PKC), responsable du remodelage de la paroi en réponse à de nombreux stress accompagnée de la synthèse compensatrice d'autres composants cellulaires comme la chitine et le mannane (Cowen and Steinbach, 2008).

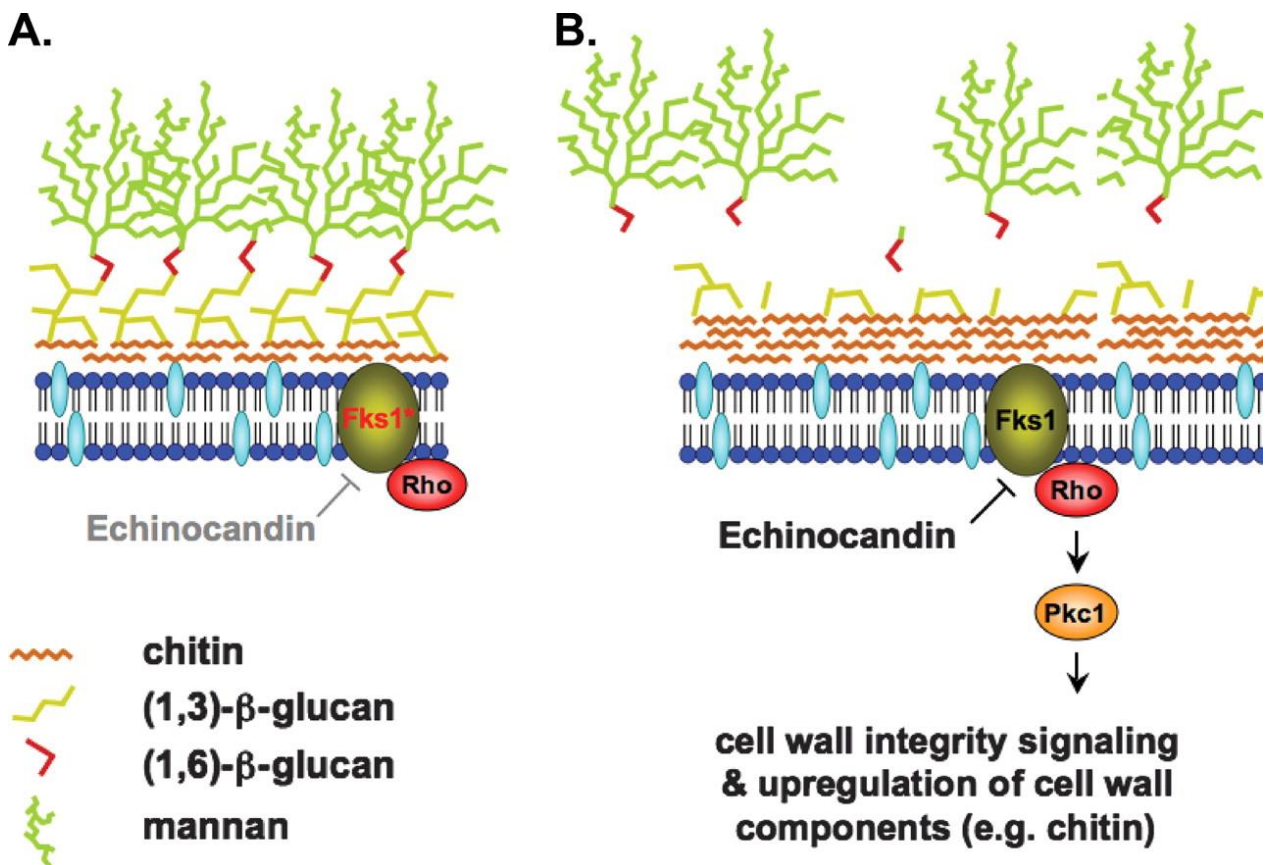


Figure 13: Résistance aux échinocandines (Cowen and Steinbach, 2008; White *et al.*, 1998). (A) La mutation de la (1,3)-β-d-glucane synthase, cible des échinocandines codée par *FKS1*, confère la résistance aux échinocandines en minimisant l'impact de la drogue sur la cellule. (B) Rho1 est un régulateur positif de la glucane synthase et il contribue à la tolérance des échinocandines en médiant les réponses au stress, incluant l'activation de la voie PKC d'intégrité cellulaire et la régulation de la synthèse d'autres composants cellulaires comme la chitine.

C. albicans a la capacité de former des biofilms qui sont définis comme une communauté composée d'une ou plusieurs espèces bactériennes et/ou fongiques. Les interactions et les mécanismes de régulation entre les microorganismes renforcent la complexité, la dangerosité et la résistance aux antimicrobiens (Bonhomme and d'Enfert, 2013; Douglas, 2003; Nobile and Mitchell, 2006). La structure tridimensionnelle complexe du biofilm permet une optimisation des influx de nutriments, de l'élimination des déchets et l'établissement d'une niche microbiologique. Les connaissances sur les mécanismes de régulation de la formation de ce type de structure restent encore partielles (Finkel and Mitchell, 2011). Néanmoins, les levures qui composent le biofilm, sont moins exposées aux défenses immunitaires de l'hôte et moins susceptibles aux antifongiques rendant le traitement difficile des patients atteints d'infection systémique ainsi qu'une colonisation des dispositifs implantables favorisée (Ramage *et al.*, 2001).

II.3 Modèles *in vivo* d'infections

Différents modèles d'étude ont été développés afin de découvrir les mécanismes permettant à *C. albicans* de devenir virulent. Un bon modèle doit être reproductible, facile à mettre en place, si possible peu coûteux et bien sûr relevant des candidoses chez l'homme. Les animaux utilisés sont divers (rongeurs, suidés, léporidés,...) mais la majorité des modèles animaux utilisent des rongeurs car ils sont peu coûteux, faciles à manipuler, à soigner et la disponibilité de lignées génétiquement modifiées permet de mimer des conditions génétiques humaines afin de sélectionner de nouvelles thérapies ou médicaments (Maccallum, 2012).

Modèles d'infection mucoale

Les modèles d'infection mucoale ont été développés afin d'étudier les infections orales, digestives et vaginales provoquées par *C. albicans*. L'établissement de l'infection nécessite l'utilisation d'immunosuppresseurs afin de diminuer l'activité du système immunitaire et l'aptitude des macrophages à phagocyter *C. albicans* ou d'antibiotiques modifiant la flore bactérienne ou d'animaux « germ-free » dépourvus de microorganismes (Kamai *et al.*, 2001; Samaranyake and Samaranyake, 2001).

Pour évaluer la virulence dans un modèle d'infection oro-pharyngée murin, les souris sont prétraitées avec des corticostéroïdes et les cellules de *Candida* sont administrées dans la cavité orale des animaux anesthésiés en appliquant un coton imbibé de *Candida* en dessous de la langue ou en appliquant directement l'inoculum sur les dents, la gencive (Naglik *et al.*, 2008; Samaranyake and Samaranyake, 2001). La virulence est estimée d'après la charge

fongique des organes et l'histopathologie. L'utilisation de ce modèle a permis de mettre en évidence l'importance du *switching* levure/mycélium (Nobile *et al.*, 2008) et de la protéine kinase Ck2 (Chiang *et al.*, 2007) dans les infections orales.

Des modèles d'infections vaginales ont été également développés. L'oestrus des rongeurs doit être maintenu pour conserver la colonisation et l'infection (Clemons *et al.*, 2004). Ce modèle a permis de montrer la variabilité d'isolats cliniques de *C. albicans* à provoquer la maladie (Taylor *et al.*, 2000).

Le modèle gastro-intestinal peut être appliqué chez des souriceaux nouveau-nés. L'avantage est qu'une infection intra-gastrique peut être obtenue sans le prétraitement des souris. Cependant, pour obtenir une colonisation des souris adultes, l'administration d'antibiotiques à large spectre est nécessaire pour éliminer la flore gastro-intestinale naturelle. Les souris sont infectées par gavage ou via leur nourriture ou eau. Le traitement des souris colonisées avec des immunosuppresseurs et/ou des drogues, qui endommagent la paroi intestinale, permet la dissémination fongique (Cole *et al.*, 1996; Naglik *et al.*, 2008). La virulence est déterminée par la charge fongique des organes comme les reins, le foie et la rate (Clemons *et al.*, 2006). Dans ce modèle la colonisation est plus importante dans l'estomac, le caecum et le petit intestin (Mellado *et al.*, 2000; Wiesner *et al.*, 2001). L'utilisation de ce modèle a permis de démontrer qu'une souche filamenteuse est avirulente par rapport à une souche déficiente dans la formation de mycéliums, suggérant un rôle important du *switching* levure-hyphes dans la dissémination de *Candida* (Bendel *et al.*, 2003). Cependant des différences de colonisation ont été observées entre différentes lignées de souris (Cantorna and Balish, 1990).

Un modèle murin de colonisation par *C. albicans* permet d'induire une colite par du DSS (*Dextran Sodium Sulfate*). Le DSS induit des lésions mucosales et une inflammation du tube digestif menant à une colite sévère et une colonisation accrue de la levure. Ce modèle a été proposé pour mimer les conditions pathologiques humaines retrouvées lors des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin comme la maladie de Crohn (Jawhara *et al.*, 2008).

Modèles d'infection invasive

Il existe différents modèles d'infection invasive : l'IV (injection intraveineuse), l'IP (injection intrapéritonéale) et la colonisation gastro-intestinale (GI) suivie d'une dissémination.

Pour l'IV, les cellules de *Candida* sont injectées dans la veine caudale des souris pour se retrouver directement dans la circulation sanguine. Dans ce modèle, les cellules fongiques disséminent dans différents organes. La virulence est évaluée par le taux de survie des

animaux infectés. Ce modèle a permis d'identifier plus de 200 facteurs contribuant à la virulence de *C. albicans* (Szabo and MacCallum, 2011). C'est un modèle très bien caractérisé, reproductible et qui permet de mimer les infections invasives humaines dues aux cathéters. Il dépend cependant de la lignée de souris et de la taille de l'inoculum injecté.

L'IP permet l'administration des cellules de *C. albicans* dans l'espace entourant les organes abdominaux. La diffusion se fait ensuite à travers le péritoine vers le compartiment plasmatique puis dans les différents organes. La virulence est évaluée par la charge fongique contenue dans le foie, la rate et les reins (Kretschmar *et al.*, 1999).

Malgré l'existence de ces différents modèles, il faut rester vigilant et tenir compte de différents paramètres comme un système immunitaire entre la souris et l'homme similaire mais pas identique et une susceptibilité à l'infection variable entre différentes lignées de souris : par exemple les souris DBA/2 qui sont déficientes en composé du complément C5, impliqué dans la réponse innée contre les pathogènes, sont plus vulnérables que les souris BALB/c avec un système du complément normal. Contrairement à l'homme, *Candida* ne colonise pas naturellement la souris remettant en question l'adéquation du modèle de souris utilisé. Suivant le modèle d'infection, une même souche de *C. albicans* peut induire une virulence différente (Ashman *et al.*, 1996; MacCallum and Odds, 2005).

II.4 Réponses de l'hôte

II.4.1 Réponses immunitaires contre *C. albicans*

Les mécanismes immunitaires de défense contre les infections fongiques sont nombreux et varient d'une réponse rapide et peu spécifique constituant l'immunité innée ou naturelle à une réponse plus tardive mais spécifique appelée immunité adaptative. Les cellules de l'immunité innée possèdent différents récepteurs à leur surface, les *Pattern Recognition Receptors* (PRRs), qui reconnaissent des motifs particuliers exprimés par les microorganismes pathogènes comme *C. albicans*, les PAMPs (*Pathogen Associated Molecular Pattern*). La nature des cellules hôtes et des systèmes ligands-récepteurs pourra conditionner la nature de la réponse immune acquise (Jouault *et al.*, 2009).

II.4.1.1 Immunité innée

L'immunité innée est le mécanisme de défense qui a pour rôle de limiter les infections dans les phases précoces (Hoffmann *et al.*, 1999). Son rôle est de distinguer les éléments du soi et du non-soi. Les composants de la paroi de *C. albicans* sont principalement reconnus par les

récepteurs lectiniques et les *Toll-like* récepteurs (TLRs) à la surface cellulaire de l'hôte et mènent à différents signaux comme la production de chemokines/cytokines et la phagocytose (Jouault *et al.*, 1995; Netea *et al.*, 2006; Romani, 2004). Les PRRs peuvent fonctionner en tant que récepteurs pour la phagocytose, c'est-à-dire comme opsonines directes ou indirectes, mais peuvent également moduler l'expression d'autres récepteurs (Kerrigan and Brown, 2009). Le mécanisme de reconnaissance de la levure pour la phagocytose est complexe et fait certainement intervenir différents récepteurs.

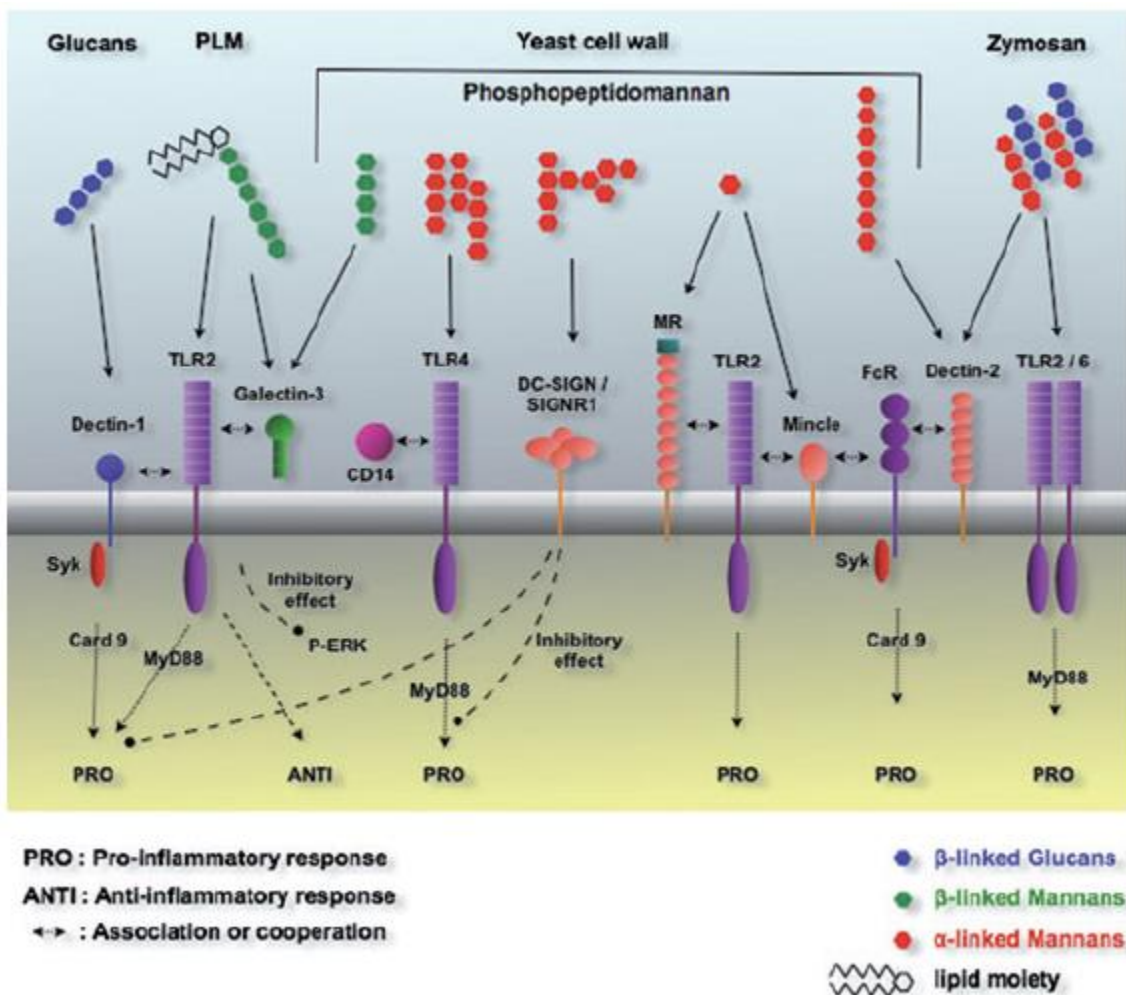


Figure 14 : Principaux PRRs de l'hôte interagissant avec les PAMPs de *Candida* (Jouault *et al.*, 2012)

Récepteurs lectiniques de l'hôte

Les cellules de l'hôte -dont les cellules immunitaires- possèdent de nombreuses lectines membranaires -ou s'associant aux membranes- reconnaissant les glycannes pariétaux de la levure (Cheng *et al.*, 2012). Ces lectines peuvent être de différent type et elles reconnaissent

les structures glycaniques de la levure en fonction du sucre, de l'anométrie de liaison et de la nature de la molécule qui les portent.

Les récepteurs lectiniques à calcium, lectines de type C, reconnaissent les β -1,3 glucanes et les α -mannosides. A titre d'exemple, les β -1,3 glucanes sont reconnus par dectine 1 (Brown *et al.*, 2002; Taylor *et al.*, 2007), les α -mannosides par le récepteur à mannose (MMR, *Macrophage Mannose récepteur*) (van de Veerdonk *et al.*, 2009), la lectine soluble à mannose (MBL, *Mannose Binding Lectin*) (Damiens *et al.*, 2013), la dectine 2 (Saijo and Iwakura, 2011) ou Mincle (Bugarcic *et al.*, 2008; Wells *et al.*, 2008) (Fig.14). Les lectines reconnaissant les α -mannosides ne reconnaissent pas les β -Mans qui se fixent à une lectine de type-S, la galectine 3 (Fradin *et al.*, 2000).

L'intégrine CR3/Mac1 reconnaît les β -1,3 glucanes et agit de manière synergique avec l'autre récepteur pour ces glycanes (dectine 1) pour éliminer la levure (Li *et al.*, 2011).

Des PRRs intracellulaires, les NLRs (*Nucleotide-binding domain, leucin-rich, Repeat-containing receptors* ou *NOD-like receptors*), interviennent également dans la reconnaissance des PAMPs, principalement intracellulaires, de *C. albicans*. NLRP3 qui fait partie de ces récepteurs, jouerait un rôle important dans la défense anti-*Candida* en activant la caspase-1 à l'intérieur de l'inflammasome menant à la production de cytokines de la famille des interleukines 1 (IL-1) (Brodsky and Monack, 2009). De plus, des souris NLRP3^{-/-} sont plus susceptibles aux infections systémiques et mucosales à *Candida* (Cheng *et al.*, 2012; Hise *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2009).

Les Toll like récepteurs

Parmi la famille des TLRs extracellulaires, TLR2 (Jouault *et al.*, 2003) et TLR4 (Netea *et al.*, 2006) semblent être les plus impliqués, respectivement, dans la reconnaissance du PLM et des O-mannanes des levures et jouent un rôle dans le développement de l'infection par *C. albicans*. La reconnaissance de *C. albicans* par les macrophages se fait en partie par l'association TLR2/gal-3 (Jouault *et al.*, 2006).

De nombreuses études ont montré que l'activation des cellules par des levures nécessite des co-récepteurs aux TLRs. Ainsi, le TLR4, reconnaît en association avec le CD14, le mannane de *C. albicans* et de *S. cerevisiae* (Tada *et al.*, 2002), tandis que le TLR2 s'associe à la dectine-1 pour stimuler les cellules en réponse aux β -glucanes pariétaux de *C. albicans* (Brown *et al.*, 2006; Gantner *et al.*, 2003). Suivant la forme de *C. albicans*, la réponse cytokinique peut varier. En effet, TLR2 et TLR4 sont capables de reconnaître des blastoconidies et induisent la sécrétion de TNF- α et d'IFN γ . Les tubes germinatifs sont quant

à eux reconnus seulement par TLR2 avec une légère production de TNF- α (van der Graaf *et al.*, 2005).

Il existe également des TLRs intracellulaires comme TLR9 qui reconnaît l'ADN de *C. albicans* entraînant l'induction de la production de cytokines par les cellules dendritiques (Miyazato *et al.*, 2009).

Cellules immunitaires

Les 1^{ère} lignes de défense de l'immunité innée sont les barrières physiques qui séparent l'organisme de son environnement : la peau, les muqueuses du tractus respiratoire, gastro-intestinal et génito-urinaire. Ces dernières sont des barrières physiques possédant des substances antimicrobiennes à leur surface dont certaines sont synthétisées par les cellules épithéliales et endothéliales. De plus, elles possèdent une microflore commensale qui ralentit la colonisation par des micro-organismes pathogènes (Romani, 2004). Une fois les barrières physiques franchies, *C. albicans* est confrontée aux cellules phagocytaires incluant les neutrophiles, les macrophages et les cellules dendritiques.

Les polynucléaires neutrophiles sont essentiels contre les infections à *Candida* comme l'atteste la forte susceptibilité des patients neutropéniques à développer des candidoses disséminées (Aratani *et al.*, 1999; Aratani *et al.*, 2002). Ils détruisent le pathogène par une combinaison de mécanismes oxydatifs et non oxydatifs au sein de leur phagolysosome (Diamond *et al.*, 1980; Faurischou and Borregaard, 2003; Mansour and Levitz, 2002) et libèrent, après activation, la chromatine et les granules extracellulaires qui forment des éléments, appelés NETs, (*Neutrophil Extracellular Traps*) qui sont aussi actifs contre les formes mycéliennes, contrairement à la phagocytose (Urban *et al.*, 2006).

Les macrophages ont pour rôle de phagocyter et détruire le pathogène *via* des substances microbicides (protéases, dérivés de l'oxygène, enzymes lysosomiales) mais aussi de moduler la réponse immunitaire en l'initiant par présentation antigénique et sécrétion de médiateurs (cytokines, chimiokines, prostaglandines).

Les cellules dendritiques expriment un large éventail de récepteurs permettant de détecter la présence de pathogènes et font partie, comme les macrophages, des cellules présentatrices d'antigènes. Elles initient d'une part la réponse immune adaptative (lymphocytes T et B) dirigée contre des antigènes du « non-soi », d'autre part elles permettent un maintien de la tolérance au « soi ».

Les cellules endothéliales recrutent les leucocytes au site d'infection (Filler *et al.*, 1991), par l'expression d'adhésines. A ces cellules endothéliales adhèrent les plaquettes qui ont la particularité de libérer des activateurs du complément. Elles contribuent à l'élimination sanguine de *C. albicans* en interagissant avec le fibrinogène (Robert *et al.*, 1991).

II.4.1.2 Immunité adaptative

L'immunité adaptative est essentielle car elle permet l'établissement d'une mémoire à l'antigène et donc d'acquérir une résistance de l'organisme contre le pathogène. Elle fait intervenir deux types de réponses : l'immunité à médiation cellulaire via les cellules T, B et les cellules présentatrices d'antigènes et l'immunité humorale via les anticorps. En fonction du profil de cytokines produites les lymphocytes T CD4⁺ peuvent être orientés en deux populations, les Th1 et les Th2. L'IL-12, l'interféron γ et le TNF α et/ou GM-CSF produits par les lymphocytes Th1 jouent un rôle central dans l'immunité à médiation cellulaire dite pro-inflammatoire (Huffnagle and Deepe, 2003). Le profil Th2 à médiation humorale, dite anti-inflammatoire, est déterminé par la production d'IL-4, IL-5, IL-13 et IL-10 (Romani, 2004). C'est la balance entre les deux types de régulation qui contribue à l'équilibre commensal-pathogène. Récemment, la nouvelle voie Th17 a été décrite comme cruciale dans le recrutement des neutrophiles et l'induction des peptides antimicrobiens (AMPs) aux sites d'infection et donc dans la défense de l'hôte contre *C. albicans* (Hernández-Santos and Gaffen, 2012). Les lymphocytes T CD8⁺ fonctionnent comme des cellules cytotoxiques pour éliminer les cellules infectées *via* des IFN- γ (Villamón *et al.*, 2004). L'immunité via les lymphocytes B permet la production d'anticorps spécifiques contre un antigène donné. Leurs actions se font par l'intermédiaire de mécanismes comme l'opsonisation, l'inhibition de l'adhérence, la neutralisation des facteurs de virulence et l'inhibition de la transition levure-mycélium (Gozalbo *et al.*, 2004; Montagnoli *et al.*, 2003; Sevilla *et al.*, 2006; Torosantucci *et al.*, 2009).

Les cellules dendritiques discriminent la forme levure de la forme mycélienne de *C. albicans* et sont capables de produire des cytokines pour induire une réponse Th adaptée (Romani, 2004).

II.4.1.3 Stratégies vaccinales

Si la vaccination est difficilement envisageable pour les candidoses disséminées, qui sont principalement associées à une immunodéficience, elle peut être intéressante dans le cadre des candidoses mucosales comme des candidoses vaginales. La recherche de candidats potentiels à la vaccination contre *C. albicans* a néanmoins été en partie réalisée dans des modèles murins de candidoses disséminées (Mourad and Friedman, 1961, 1968) car chez ces animaux, la dissémination de la levure est généralement indépendante de toute immunodépression.

Han *et al* ont montré en 1995 qu'une fraction de mannane encapsulé dans des liposomes et utilisés pour vacciner des souris induisait des réponses protectives contre les candidoses disséminées. L'encapsulation du mannane est requise car l'extrait seul est très peu immunogène (Han and Cutler, 1995). Cependant la partie liposomale est instable et de nombreux vaccins de rappel sont nécessaires pour induire une forte production d'anticorps protecteurs. Une étude a montré que le mannane conjugué de manière covalente à une protéine, la BSA, induisait un effet protecteur contre les candidoses disséminées et vaginales (Han *et al.*, 1999).

Ibrahim *et al* montre en 2005 que l'adhésine Als1 qui permet la fixation de *C. albicans* aux cellules humaines, est une candidate intéressante dans la vaccination contre cette levure. En effet, les anticorps dirigés contre cette adhésine exprimée en surface inhibent l'adhérence de *C. albicans* aux cellules épithéliales et protègent les souris contre les candidoses disséminées et oropharyngées (Ibrahim *et al.*, 2005; Spellberg *et al.*, 2005). De plus, la protéine Als1 recombinante, rAls1-N, augmente la réponse Th1 du système immunitaire et protège les souris déficientes en cellules B (Ibrahim *et al.*, 2006; Spellberg *et al.*, 2006). Un autre vaccin constitué de la protéine recombinante, rAls3-N, a également prouvé son efficacité contre les candidoses oropharyngées et vaginales (Spellberg *et al.*, 2006).

L'immunisation intravaginale avec la protéase aspartique sécrétée 2 (Sap2) est efficace dans la protection contre les infections vaginales dans un modèle de rat (Sandini *et al.*, 2011). Sap2 représente donc un outil intéressant pour un éventuel vaccin contre cette infection commune et fréquemment chronique.

Les β -glucanes, polysaccharides essentiels à la viabilité cellulaire et présents chez tous les champignons pathogènes humains, peuvent être considérés comme un composé utile à la vaccination. Un vaccin immunoprophylactique composé de β -1,3 glucanes de l'algue

Laminaria digitata conjugué à la *diphtheria toxoid* CRM197, protéine utilisée dans d'autres vaccins humains afin d'augmenter leur pouvoir immunogène, a montré son effet protecteur contre des infections expérimentales systémiques et mucosales de *C. albicans* (Torosantucci *et al.*, 2005).

Il a été montré que la guérison de patients atteints de candidose disséminée était corrélée avec la présence d'anticorps anti-Hsp90 en combinaison avec un traitement antifongique. L'anticorps recombinant Mycograb contre l'Hsp90 a montré les mêmes propriétés (Matthews *et al.*, 2003).

III. Les β -1,2 oligomannosides

Les liaisons β -1,2 oligomannosidiques sont des structures peu communes et présentes dans un très faible nombre d'espèces eucaryotes non mammifères comme chez certaines levures du genre *Candida* (Shibata *et al.*, 2012) et *Pichia pastoris* (Vinogradov *et al.*, 2000), le parasite protozoaire *Leishmania mexicana* (Ralton *et al.*, 2003) ainsi que chez certains procaryotes comme *Salmonella thompson* (Lindberg *et al.*, 1988).

III.1 Structure, distribution

De nombreuses analyses structurales du PPM par RMN ont permis de mettre en évidence la présence de β -Mans au niveau de ses N-glycannes. En 1985, Shibata *et al.* décrivent pour la première fois la présence de β -Mans dans le PPM de *C. albicans* (Shibata *et al.*, 1985). Ces oligomannosides de 1 à 6 résidus mannose sont liés au reste de la molécule par un pont phosphodiester sensible à l'hydrolyse acide. Plus tard, des études ont montré que ces phosphomannosides pouvaient avoir un degré de polymérisation (DP) maximal de 7 (Suzuki *et al.*, 1995) ou de 14 (Trinel *et al.*, 1997). Les β -Mans n'existent pas que sous forme homopolymérique au sein du PPM puisqu'ils sont également présents sous la forme d'hétéropolymères : ils sont liés à l'extrémité non réductrice de certaines chaînes latérales α -1,2 oligomannosidiques (Kobayashi *et al.*, 1992). Les β -Mans hétéropolymériques ont un DP allant de 1 à 3 et ne sont pas présents chez toutes les souches de *C. albicans*. La présence ou l'absence de ces résidus déterminent respectivement les sérotypes A et B des souches de *C. albicans* (Kobayashi *et al.*, 1990; Shibata *et al.*, 1989; Shibata *et al.*, 1985).

Les études menées au laboratoire par Pierre André Trinel ont mis en évidence la β -1,2 mannosylation d'un autre glycoconjugué pariétal de la levure. En effet, différentes études (Trinel *et al.*, 1993; Trinel *et al.*, 1997; Trinel *et al.*, 1999) ont permis de décrire la présence

de β -Mans sur une molécule de *C. albicans* dépourvue de résidus α -oligomannosides. Ce conjugué d'une taille comprise entre 14 et 18kDa, est résistant aux protéases et contient de l'acide palmitique (Trinel *et al.*, 1993). Suivant sa nature liposaccharidique, il a été dénommé phospholipomannane (PLM). Ce glycolipide de la famille des MIPs, est présent chez les deux sérotypes de *C. albicans* avec une variabilité du DP des β -Mans en fonction du sérotype. Les β -Mans du PLM des souches de sérotype A ont un DP maximal de 19 alors que le PLM des souches de sérotype B contient des β -Mans plus courts avec un DP 3 majoritaire.

Le PPM et le PLM contribuent certainement à l'expression de surface des β -Mans (Poulain *et al.*, 2002). Les β -Mans sont présents chez les espèces les plus pathogènes du genre *Candida* dont *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* et *C. dubliniensis*. Cantelli *et al.*, montrent en 1995 une distribution variable de ces oligomannosides dans différentes souches de *Candida* en utilisant des anticorps mono et polyclonaux. En western blot, les épitopes β -Mans sont retrouvés associés aux MPs de moyen et haut poids moléculaire donnant des profils reproductibles intra-espèces et variables inter-espèces (Cantelli *et al.*, 1995). En 2008, la présence de ces épitopes sur le *O*-mannane des MPs a été révélée pour la première fois (Fradin *et al.*, 2008). Parmi les nombreuses MPs jouant un rôle dans l'interface hôte-pathogène, l'attention s'est portée sur MP65 encore appelée Scw1; une β -glucanase de 65kDa. Elle est la cible du système immunitaire humain contre *Candida*. En effet, les mutants déficients en MP65 forment peu de mycéliums et présentent une perte d'adhérence au plastique. Ces deux caractéristiques font que les mutants sont moins virulents que la souche sauvage dans des modèles d'infection à *Candida* (Sandini *et al.*, 2007).

III.2 Biosynthèse et régulation

III.2.1 Les β -1,2 mannosyltransférases

Les β -1,2 mannosyltransférases (Bmts) ont été étudiées pour la 1^{ère} fois par Suzuki *et al* en 1995 (Suzuki *et al.*, 1995). En effet, une activité β -1,2 mannosyltransférase II (ManTase II) a été détectée dans une fraction insoluble d'une souche de sérotype A de *C. albicans*: après incubation d'un mannopentaose contenant un résidu β - mannose terminal avec du GDP-Man, un deuxième β - mannose terminal est ajouté avec la formation d'un mannohexaose. L'activité de cette ManTase II est inhibée par le Zn^{2+} et est retrouvée chez les deux sérotypes (Suzuki, 1995). D'autres activités Bmt ont été mises en évidence chez *C. guilliermondii* (Suzuki *et al.*, 1997).

La comparaison du génome de *C. albicans* à celui de *S. cerevisiae*, premier organisme eucaryote dont le génome a été entièrement séquencé (Goffeau *et al.*, 1996), a permis d'identifier plusieurs gènes similaires entre ces deux levures. L'annotation du génome de *S. cerevisiae* a ainsi permis d'annoter celui de *C. albicans* et d'identifier différentes protéines codées par ces gènes. La paroi de *S. cerevisiae* ne contient pas de β -Mans, cette levure ne possède donc pas de gènes codant pour des Bmts qui auraient permis de rechercher les gènes similaires dans le génome de *C. albicans*. Des études *in silico* réalisées avec plusieurs α -mannosyltransférases n'ont pas permis d'identifier des séquences non annotées présentant des similarités même réduites. Il a donc fallu attendre la fin des années 2000 pour qu'une étude publiée pour la première fois les séquences des Bmts de *C. albicans*. Cette étude a été réalisée par notre groupe en collaboration avec une compagnie américaine, Glycofi, travaillant sur la levure non pathogène, *P. pastoris*, qui exprime des β -Mans au niveau de son PPM et de ses MPs. En criblant différents mutants avec des défauts de glycosylation de leurs MPs, un mutant ne β -mannosylant plus ses MPs a été mis en évidence, permettant ainsi d'identifier le premier gène *BMT*. Des analyses *in silico* des génomes de *P. pastoris* et *C. albicans* ont permis d'identifier respectivement 3 et 9 gènes similaires à ce gène *BMT* (Mille *et al.*, 2008). La génération de mutants n'exprimant plus l'une des 9 *BMTs* et l'analyse de la β -mannosylation de leurs conjugués a permis de définir la fonction de 6 des 9 Bmts. Ces 6 Bmts présentent des spécificités assez strictes de conjugué et d'accepteur.

BMT1-4 codent pour les enzymes impliquées dans les étapes d'ajout de β -mannoses sur le PPM (Mille *et al.*, 2008). Bmt1 et Bmt2 ajoutent respectivement le 1^{er} β -mannose sur les chaînes α -1,2 mannosidiques et le phosphomannose du PPM alors que Bmt3 et Bmt4 accrochent respectivement le 2^{ème} et le 3^{ème} β -mannose pour former à la fois les hétéro et homopolymères (Fig.15 et 16). Bmt4 permet également l'élongation des homopolymères composant les phosphomannosides du PPM. Ces enzymes ne semblent pas avoir d'activité sur le PLM. Bmt 5 et 6 permettent la β -mannosylation de cette molécule en ajoutant respectivement le 1^{er} et 3^{ème} β -mannose (Mille *et al.*, 2012). Bmt6 permet l'élongation de la chaîne β -mannosidique du PLM. Aucune Bmt ajoutant le 2^{ème} β -mannose du PLM n'a été identifiée; une hypothèse peut être néanmoins émise: Bmt5 pourrait ajouter les deux premiers β -mannose du PLM comme Mnt1 peut ajouter les deux premiers α -1,2 mannose des O-mannanes (Munro *et al.*, 2005).

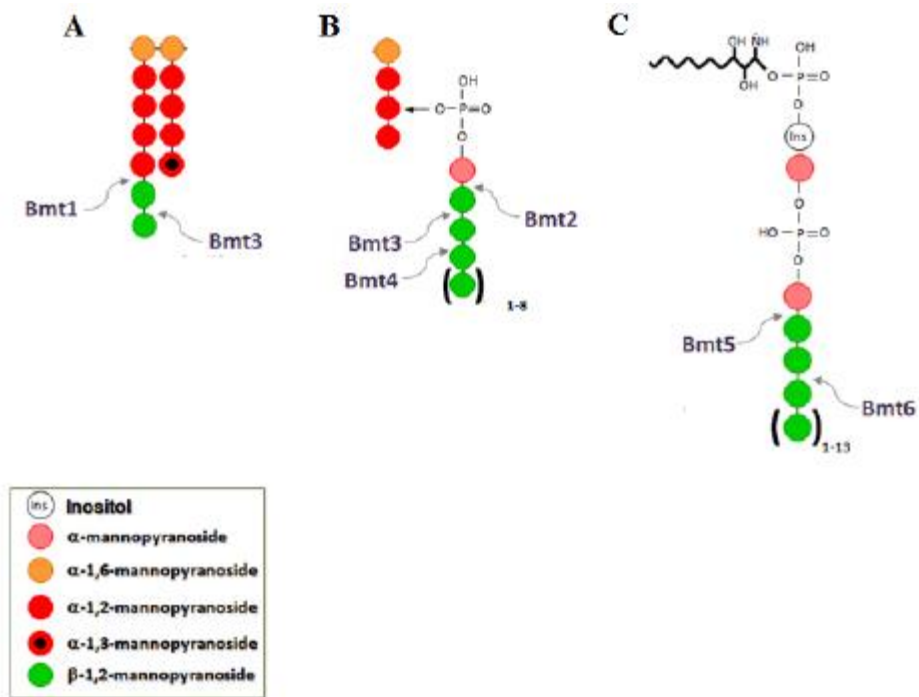


Figure 15 : Représentation schématique de l'activité de Bmt1-6 sur les glycoconjugués de *C. albicans*. (A) Les β -Mans, exprimés à l'extrémité non réductrice α -1,2 Mans du PPM, sont biosynthétisés par Bmt1 et Bmt3. (B) Bmt2, Bmt3 et Bmt4 ajoutent de manière séquentielle les β -mannoses sur le phosphomannose du PPM liés aux α -1,2 Mans. (C) La β -1,2 mannosylation du PLM implique Bmt5 et Bmt6 qui transfèrent le β -mannose sur l'inositol phosphate ajouté au mannose-inositol-phosphocéramide. Les flèches indiquent où les enzymes agissent et quel β -mannose est ajouté (Courjol *et al.*, 2013).



Figure 16 : Arbre phylogénétique des β -1,2 mannosyltransférases de *C. albicans*. Cet arbre, basé sur la séquence entière des enzymes, illustre la similarité entre les Bmts partageant les mêmes étapes de β -mannosylation et le même accepteur.

III.2.2 Régulation

Différentes études ont montré que l'expression des β -Mans est hétérogène au sein de la paroi. Suivant les conditions de culture, *C. albicans* est capable de moduler l'expression des β -Mans. A pH2, le mannane des souches de sérotype A ne contient ni de phosphomannosides ni de β -Mans au niveau des hétéropolymères (Kobayashi *et al.*, 1994). Cette absence de β -Mans à pH acide entraîne une production excessive de résidus α -1,3 mannosidiques terminaux (Kobayashi *et al.*, 1997). A 37°C, l'expression des épitopes β -Mans est réduite au niveau des MPs et non du PLM de *C. albicans*. Les β -Mans du PLM sont également toujours présents à pH acide, montrant que la β -1,2 mannosylation et la régulation de ce conjugué est différente de celles du PPM et des MPs (Okawa *et al.*, 1996; Okawa *et al.*, 1994; Suzuki *et al.*, 1995; Trinel *et al.*, 2002a).

III.3 Rôle des β -Mans dans la virulence

III.3.1 Adhérence

La reconnaissance des β -Mans est hautement spécifique, elle dépend fortement de leur degré de polymérisation, de la molécule porteuse et de fractions d'une même molécule (Kobayashi *et al.*, 1990; Mille *et al.*, 2008; Mille *et al.*, 2012; Shibata *et al.*, 1985; Trinel *et al.*, 1999). Un β -1,2 mannotétraose (β -Man₄), appelé antigène 10G, a été détecté en surface des levures et au niveau de leur membrane plasmique (Li and Cutler, 1991). Ce β -Man₄ est une adhésine impliquée dans l'interface *Candida*/hôte lors de l'infection et capable de se fixer aux macrophages et permettant l'adhérence des levures (Li and Cutler, 1993). L'anticorps 26G7 spécifique d'une glycoprotéine pariétale de *C. glabrata*, réagit seulement avec les souches de sérotype A et inhibe leur adhérence sur une résine dentaire (Elguezabal *et al.*, 2004). En 1992 Miyakawa *et al.*, montrent l'importance de l'antigène 6, correspondant aux β -Mans terminaux des chaînes hétéropolymériques du PPM et donc spécifique des souches de sérotype A de *C. albicans*, dans l'adhérence aux cellules épithéliales buccales humaines. Les β -Mans interviennent également dans l'adhérence des levures à la membrane des macrophages. Cette interaction s'effectue via une lectine endogène de 32 kilodalton, Gal-3, nécessaire pour l'endocytose et l'élimination des souches de *C. albicans* exprimant des β -Mans sur les deux fractions du PPM par les macrophages. (Fradin *et al.*, 1996; Fradin *et al.*, 2000; Kohatsu *et al.*, 2006).

Les β -Mans sont impliqués dans l'interaction *Candida*-entérocyte et dans l'adhérence des levures à la surface mucosale. En effet, la pré incubation de levures avec des anticorps anti- β -Mans inhibe de manière dose-dépendante l'adhésion de *C. albicans* aux cellules Caco-2 (Dalle *et al.*, 2003). Dromer *et al* montrent en 2002 que l'administration orale de β -Mans synthétiques peut prévenir la colonisation intestinale par cette levure (Dromer *et al.*, 2002).

III.3.2 Immunomodulation

En 1995, Jouault *et al* détectent la stimulation des macrophages quant à la production de TNF- α par les β -Mans des phosphomannosides du PPM. Cette stimulation est dépendante du DP des β -Mans et de leur concentration (Jouault *et al.*, 1995). Le PLM de *C. albicans*, ainsi que les glycolipides de pathogènes comme *Leishmania donovani*, *Mycobacterium tuberculosis* et *Plasmodium falciparum* sont également capables d'induire la production de TNF- α (Jouault *et al.*, 1998). En modulant les voies de signalisation/sécrétion des macrophages, les β -Mans interviennent dans la survie des cellules de *C. albicans*, plus précisément, en permettant leur échappement par apoptose des cellules phagocytaires qui est associée à des différences de phosphorylation des voies de transduction du signal MEK, ERK1/2 et p90RSK (Ibata-Ombetta *et al.*, 2003a, b; Ibata-Ombetta *et al.*, 2001). L'absence d'un type de glycannes peut perturber les réponses immunitaires normalement déclenchées par la levure. En effet, une étude montre que chez un mutant déficient en β -Mans sur les *N*-mannanes, la production de cytokines inflammatoires (IL-6, IL-12p40 et TNF- α) par les cellules dendritiques de souris est réduite (Ueno *et al.*, 2013). Un extrait de paroi de *C. albicans* peut également induire une artérite coronarienne à des souris, similaire à la maladie de Kawasaki. Celle-ci est associée à une augmentation des réponses inflammatoires plus sévère lorsque l'extrait de paroi ne contient pas de β -Mans (Ohno, 2004).

Récemment il a été montré que l'immunisation de souris avec un mannoheptaose hétéropolymérique (α -1,6/ β -1,2 Mans) de *C. guillermondii* synthétique induit une augmentation de la population lymphocytaires T CD3⁺ et du ratio CD4⁺/CD8⁺. Cela entraîne une élévation de la proportion des cellules T CD4⁺/CD25⁺ et une induction des réponses immunes Th1, Th2 et Th17 (Paulovičová *et al.*, 2012).

L'immunomodulation induite par les β -Mans est dépendante de Gal-3 qui intervient également dans l'élimination de la levure.

III.3.3 Production d'anticorps protecteurs

La production d'anticorps est importante dans le diagnostic des candidoses (Sendid *et al.*, 2002; Sendid *et al.*, 1999). Par exemple, chez des patients atteints de candidoses disséminées, une réponse IgG3 dirigée contre les β -Mans liés au mannane et au PLM est retrouvée (Poulain *et al.*, 1993). La spécificité de l'épitope et l'activation du complément sont essentiels pour que l'anticorps protège contre les candidoses disséminées (Han *et al.*, 2001). L'anticorps permet au facteur C3 du complément de se fixer à la surface des levures et d'induire leur opsonisation et élimination par les phagocytes. Comme décrit dans le paragraphe « II.6.1.3. Stratégies vaccinales », un antisérum de souris immunisées avec du mannane de *C. albicans* encapsulé dans un lysosome contient deux anticorps monoclonaux majeurs spécifiques : B6.1, qui protège les souris des candidoses disséminées et vaginales, est spécifique de la fraction acide labile du PPM (β -1,2 mannotriose), et B6 qui ne protège pas est spécifique de la fraction acide stable du PPM (Han and Cutler, 1995). Ces deux anticorps sont des immunoglobulines M (IgM) qui s'agglutinent fortement aux cellules (Han and Cutler, 1995, 1997). L'anticorps C3.1, de la famille des IgG a le même épitope que B6.1 et a le même effet protecteur contre les candidoses disséminées (Han *et al.*, 2000). En 2008, le β -1,2 mannotriose conjugué à des peptides « carriers », dérivés de la paroi de *C. albicans*, a montré son efficacité comme vaccin en protégeant les souris contre les candidoses disséminées (Xin *et al.*, 2008).

III.3.4 Rôle dans la virulence

Mille *et al.*, montrent en 2004 que le PLM pourrait avoir un rôle essentiel au cours des candidoses disséminées. La délétion du gène qui code pour une GDP-mannose :inositol-phospho-céramide mannose transférase (Mit1), atténue la virulence de *C. albicans* dans un modèle murin de candidoses disséminées. Mit1 mannosyle les IPCs en MIPC qui à leur tour sont transformés en M(IP)₂C ou en PLM. Si Mit1 intervient dans la biosynthèse du PLM, elle n'est pas spécifique de cette molécule puisqu'après inactivation de Mit1 aucun glycosphingolipides (MIPC, MIP₂C et PLM) n'est biosynthétisé. Il est donc difficile de donner une conclusion définitive et pertinente de ces résultats.

La découverte des gènes codant pour les Bmts a permis de générer des mutants pour associer plus spécifiquement la mutation à son impact sur la virulence et donc de conclure quant au rôle des glycoconjugués β -mannosylés dans les différentes étapes de l'infection à *C. albicans*. Les Bmts ont en effet une spécificité assez stricte de la molécule porteuse et de l'étape de β -1,2 mannosylation.

IV- Objectifs

Mon travail de thèse a concerné l'analyse génétique et biochimique de la β -1,2 mannosylation chez *C. albicans* et de ses relations avec la virulence.

Son objectif principal était l'analyse de la biosynthèse et de la régulation de la β -1,2 mannosylation des différents glycoconjugués pariétaux de la levure afin de déterminer leur contribution respective dans l'expression globale des β -Mans ainsi que la modulation de ces oligomannosides dans la paroi. Il a également permis en partie de définir la relation des glycoconjugués β -1,2 mannosylés de *C. albicans* et leurs rôles dans la virulence.

Ce travail sera présenté sous forme en quatre paragraphes dans le chapitre « Travaux Personnels » :

I- Les β -1,2 mannosyltransférases 1 et 3 participent à la O- et N-mannosylation des formes levures et mycéliennes et modifie le pouvoir pathogène de *Candida albicans*

Ce travail a été soumis à la revue *Cellular Microbiology*.

II- L'activité de Bmt1 conditionne le sérotype A ou B de *C. albicans* et module la colonisation digestive

Cette étude fait suite au travail précédent et sera donc soumis après acceptation de ce dernier.

III- L'altération de la glycosylation du phospholipomannane de *C. albicans* affecte ses activités de stimulation des macrophages

Un projet collaboratif dans l'équipe entre notre thème et celui de Thierry Jouault a abouti à la publication dans PLOS One des résultats obtenus avec partage de la position de 1^{er} auteur entre les deux thèmes.

IV- Bmt5 n'est pas essentielle à la β -1,2 mannosylation du PLM qui ne contribue pas à l'expression de surface des β -Mans et n'a pas d'impact sur la résistance aux inhibiteurs de la synthèse des β -glucanes

De nouvelles avancées sur la β -1,2 mannosylation du PLM sont présentées sous forme de manuscrit en préparation dépendant de données complémentaires en cours d'obtention.

TRAVAUX PERSONNELS

I-Les β -1,2 mannosyltransférases 1 et 3 participent à la O- et N-mannosylation des formes levures et mycéliennes et modifie le pouvoir pathogène de *Candida albicans*

Une avancée majeure a été faite concernant la β -1,2 mannosylation des glycoconjugués de *C. albicans* avec l'identification des six enzymes impliquées dans l'addition des β -1,2 oligomannosides (β -Mans) sur le phosphopeptidomannane (PPM) et le phospholipomannane (PLM). Ces deux glycoconjugués contribuent à la virulence de la levure en partie grâce aux β -Mans qu'ils portent. Ces oligomannosides font également partie des glycanes des différentes mannoprotéines (MPs) pariétales. Il est généralement admis que la mannosylation des MPs est similaire à celle du PPM bien qu'aucune étude ne l'ait à ce jour démontrée.

Dans une étude précédente, nous avons montré que si comme le PPM, les différentes familles de MPs sont β -mannosylées, le mode d'attachement des β -Mans à ces MPs diffère de celui du PPM. En effet, des épitopes β -Mans sont détectés au niveau des O-mannosides de ces MPs. Nous avons donc analysé leur biosynthèse et leur éventuelle implication dans la virulence.

La séparation des O-mannosides de la souche sauvage SC5314 en électrophorèse des sucres, FACE, a permis de mettre en évidence un O-mannotétraose (O-M3) et un O-mannopentaose (O-M5) résistants à l' α -1,2 ; 1-3 ; 1-6 mannosidase. Ces deux O-mannosides sont plus détectés à 28°C qu'à 37°C comme les épitopes β -Mans des MPs. L'analyse des O-mannosides des mutants *bmtsΔ* disponibles au laboratoire et de leur souche parentale a montré que les mutants *bmt1Δ* et *bmt3Δ* ont des O-mannosides tronqués : *bmt1Δ* n'a pas d'O-mannosides avec un DP supérieur à trois et *bmt3Δ* présente le O-M3 et non le O-M5 résistant à l' α -mannosidase.

Après confirmation avec le double mutant *mnt1Δ/mnt2Δ*, n'exprimant pas les α -1,2 mannosyltransférases responsables de la mannosylation du O-mannose des MPs, nous avons pu déduire que Bmt1 puis Bmt3 β -mannosylent un O- α -1,2 M3. Bmt1 semble être essentielle pour la β -mannosylation des MPs car aucun épitope β -Man n'est exprimé chez le mutant *bmt1Δ* au niveau des i) MPs des formes levures et ii) MPs spécifiques de la forme mycélienne purifiées après expression sous forme recombinante. Le PPM du mutant *bmt1Δ* est quant à lui toujours β -mannosylé. Les MPs sont responsables de l'expression de surface des β -Mans au

niveau des tubes germinatifs. Comme le mutant *bmt2Δ* n'a aucun défaut de β-mannosylation des MPs, il semble que les MPs n'aient pas de phosphomannose β-mannosylé comme le PPM. La délétion du gène *BMT1* a un impact inattendu sur la virulence. En effet, le mutant *bmt1Δ* est plus virulent que sa souche parentale dans deux modèles de candidoses disséminées. Afin de vérifier que ces résultats ne soient pas en partie biaisés par une compensation des β-Mans du PLM et du PPM sur la virulence, nous avons généré un mutant n'exprimant plus les Bmts ajoutant le 1^{er} β-mannose sur les différents glycoconjugués Bmt1, Bmt2 et Bmt5. Le mutant *bmt1Δ/bmt2Δ/bmt5Δ*, qui n'exprime plus de β-Mans, est également plus virulent que la souche parentale. Deux hypothèses peuvent être émises à partir de ces résultats : i) les β-Mans masquent des α-mannosides impliqués dans la virulence ii) les β-Mans présents à la surface de la souche parentale permettent son élimination par l'hôte. Des études, dont une récente, ont en effet montré que le récepteur pour les β-Mans, la Gal-3, peut tuer la levure en se fixant sur ces β-Mans exprimés en surface et permet l'opsonisation et la phagocytose de la levure par les neutrophiles dans un modèle murin de candidose disséminée.

Nous avons donc réévalué la virulence des deux mutants (*bmt1Δ* et *bmt1Δ/bmt2Δ/bmt5Δ*) en utilisant des souris Gal-3^{-/-} et les souris contrôles dites « sauvages ». La souche parentale est significativement plus virulente que le mutant *bmt1Δ/bmt2Δ/bmt5Δ* chez les souris Gal-3^{-/-}. Ces résultats indiquent que les β-Mans de *C. albicans* peuvent à la fois permettre l'élimination de la levure par l'hôte après reconnaissance par la Gal-3 et contribuer à la virulence de la levure. Les modèles d'infection utilisés dans cette étude (injection de la levure dans circulation sanguine ou dans le péritoine) ne sont certainement pas appropriés pour analyser ce second rôle des β-Mans.

β -1,2 mannosyltransferases 1 and 3 participate in yeast and hyphae *O*- and *N*-linked mannosylation and alter *Candida albicans* fitness during infection

Flavie Courjol^{1,2}, Thierry Jouault^{1,2}, Céline Mille^{1,2,1}, Rebecca Hall³, Emmanuel Maes^{4,5}, Jean Maurice Mallet⁶, Yann Guerardel^{4,5}, Neil A.R. Gow³, Daniel Poulain^{1,2,7}, Chantal Fradin^{1,2*}

¹Unité Inserm 995, 59000 Lille, France; ²Université Lille 2, Group "Candida and Candidiasis", Faculté de Médecine, 59000 Lille, France; ³Aberdeen Fungal Group, School of Medical Sciences, Institute of Medical Sciences, University of Aberdeen, Foresterhill, Aberdeen AB252ZD, United Kingdom ; ⁴Université Lille 1, Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, 59650 Villeneuve d'Ascq, France; ⁵CNRS, UMR 8576, 59650 Villeneuve d'Ascq, France; ⁶Laboratoire des biomolécules UMR7203, Université Pierre et Marie Curie, Ecole Normale Supérieure, 24 rue Lhomond, 75005 Paris, France ; ⁷CHRU Lille, Centre Biologie et Pathologie, 59000 Lille, France;

Running title: Host recognition of *Candida* beta-mannan

Key words: *Candida albicans*, cell wall, *O*-mannosylation, β -1,2 oligomannosides, mannosyltransferase, fungal virulence

***For correspondence.** E-mail: chantal.fradin@univ-lille2.fr; Tel: (+33) 3 20 62 34 17; Fax: (+33) 3

20 62 34 16

¹ Present address : Center for Infection and Immunity of Lille, Inserm U1019 - CNRS UMR 8204, Université Lille Nord de France, Institut Pasteur de Lille, 59019 Lille Cedex, FRANCE

Summary

β -1,2 mannosylation of *Candida albicans* glycoconjugates has been investigated via the identification of enzymes involved in the addition of β -1,2 oligomannosides (β -Mans) to phosphopeptidomannan and phospholipomannan. These glycoconjugates contribute to *C. albicans* infection partly through their β -Mans epitopes. In a previous study, we showed that cell wall mannoproteins (CWMPs) harbor β -Mans in their *O*-mannosides; we therefore analyzed their biosynthesis and impact on virulence. Here we demonstrate that *O*-mannans are heterogenous, and that α -mannosylated *O*-mannosides, which are biosynthesized by Mnt1 and Mnt2 α -1,2 mannosyltransferases, can be modified with β -Mans but only at the non-reducing end of α -1,2 mannotriose. β -1,2 mannosylation of this *O*-mannotriose depends on growth conditions, and involves two β -1,2 mannosyltransferases, Bmt1 and Bmt3. These Bmts are essential for β -1,2 mannosylation of CWMPs and expression of β -Mans on germ tubes. A *bmt1* Δ mutant and a mutant expressing no β -Mans disseminated more in BALB/c mice while they had neither attenuated nor enhanced virulence in C57BL/6 mice. In Gal-3 knock-out mice, which lack β -Mans innate receptor, the mutants were less virulent, suggesting that this ligand receptor couple is involved in *C. albicans* fitness during infection.

Introduction

Candida albicans is a harmless commensal in immune competent people, but a successful pathogen in immunosuppressed patients leading to frequent nosocomial infections with high mortality rate (Poulain, 2013). The fungal cell wall is a complex and dynamic structure that forms the natural interface with the host (Klis *et al.*, 2001). Cell wall components are however highly regulated meaning that the host surface is a moving target in terms of host recognition mechanisms. Among these immunologically active components of the cell wall are glycans which are present either as polysaccharides or glyco-conjugates of proteins and lipids. These major cell wall elements are important for either maintaining the cell shape and integrity or protein modifications that allow intracellular trafficking of glycoproteins or glycolipids, protein folding, anchoring of macromolecules to the cell membrane, signal transduction, cell/cell interactions, as well as determining glycoprotein half-life (Helenius and Aebi, 2001; Loibl and Strahl, 2013).

In human commensals and pathogens status of *C. albicans*, these molecules also have specific roles in adherence and immunomodulation (Nelson *et al.*, 1991; Poulain and Jouault, 2004). Amongst its glycan diversity, *C. albicans* expresses β -1,2 linked oligomannosides (β -Mans), which are unusual as only evidenced in few non-mammalian eukaryotes (Ralton *et al.*, 2003; Shibata *et al.*, 2012; Vinogradov *et al.*, 2000) and prokaryotes (Lindberg *et al.*, 1988). β -Mans are involved in the interplay between *C. albicans* and its host, for example mediating adhesion of *C. albicans* to macrophages and epithelial cells (Dalle *et al.*, 2003; Fradin *et al.*, 1996a), inducing cytokine production (Jouault *et al.*, 1995) and the generation of protective antibodies against vaginal and disseminated candidiasis (Han *et al.*, 1998; Xin *et al.*, 2008). However, very little is known about their relative and respective functions inside the wall. The biosynthesis of β -Mans involves distinct mannosyltransferases from a nine member family (Mille *et al.*, 2008a).

Several NMR analysis (Kobayashi *et al.*, 1990; Shibata *et al.*, 1989; Shibata *et al.*, 1985) have shown that β -Mans are present in the *N*-glycan of the cell wall outer layer phosphopeptidomannan (PPM). Within this molecule, they are linked to a phosphomannose (Fig. 1A) and, only for serotype A strains, they are also at the non-reducing end of its α -1,2 oligomannose chains (Fig. 1B). Structural studies have demonstrated that β -Mans are associated to mannose inositol phosphoceramides to form a glycolipid named phospholipomannan (PLM) (Fig. 1C) (Trinel *et al.*, 1999), which is thought to be present in

the outer cell wall layer. Six β -1,2 mannosyltransferases (Bmts), have been shown to have distinct substrate specificities and catalyse different steps of β -1,2 mannosylation (Mille *et al.*, 2008a; Mille *et al.*, 2012). Bmt 1-4 are specific for PPM, while Bmt5-6 act on PLM (Fig. 1). Bmt1, 2 and 5 initiate β -1,2 mannosylation, which is then elaborated with additional β -mannoside units through the sequential actions of Bmt3 and Bmt4 or Bmt6. Characterization of a *bmt5* Δ mutant suggested that other, as yet unidentified, proteins with β -1,2 mannosyltransferase activity compensate for the loss of Bmt5 function (Mille *et al.*, 2012). The genome of *C. albicans* predicts that there are three additional enzymes (Bmt7-9) that possess β -1,2 mannosyltransferase activity, but so far their function has not been identified.

Interaction of β -Mans with host cells and tissues, as well as, preliminary evidence of their immunomodulatory properties were highlighted by using synthetic oligomannosides and oligomannosides from PPM phosphomannosides purified by mild acid hydrolysis (Dalle *et al.*, 2003; Dromer *et al.*, 2002; Fradin *et al.*, 1996a; Fradin *et al.*, 2000; Jouault *et al.*, 2000; Jouault *et al.*, 1995; Li and Cutler, 1993). Among cell wall glycoconjugates, β -Mans have different functions associated to virulence depending on their carrier molecule and cellular location (Hobson *et al.*, 2004; Ibata-Ombetta *et al.*, 2003a; Mille *et al.*, 2004). PPM and PLM phosphomannosides, both display β -Mans, and have distinct immune-modulatory properties. The β -Mans in PLM participate in the stimulation of a variety of host signaling pathways (Ibata-Ombetta *et al.*, 2003a; Jouault *et al.*, 1998; Jouault *et al.*, 2003), but seem to have little effect on PPM phosphomannosides (Hobson *et al.*, 2004).

In a previous study, we revealed for the first time, the presence of β -Mans epitopes on cell wall mannoproteins (CWMPs) O-mannan (Fradin *et al.*, 2008). O-mannosylation is an essential glycosylation process for protein modification, but is also important for *C. albicans* adhesion and virulence (Arroyo *et al.*, 2011; Loibl and Strahl, 2013; Prill *et al.*, 2005a; Rouabhia *et al.*, 2005). Here, we demonstrate that two β -1,2 mannosyltransferases, Bmt1 and Bmt3, are responsible for β -1,2 mannosylation of O-mannosides. Bmt1 and Bmt3 act on an O-mannotriose, whose biosynthesis involves the α -1,2 mannosyltransferases, Mnt1 and Mnt2 (Munro *et al.*, 2005). Deletion of Bmt1 resulted in biosynthesis of truncated O-mannosides, and had a surprising impact on *C. albicans* virulence since the deletant strains disseminated more in BALB/c mice while they had neither attenuated nor enhanced virulence in C57BL/6 mice. Reduced dissemination of the mutants was observed in mice which do not express galectin-3 (Gal3), a β -Mans binding lectin (Fradin *et al.*, 2000) involved in the host innate

immunity (Chung *et al.*, 2013; Nieminen *et al.*, 2005; Rotshenker, 2009). Gal3 aids the host in eliminating *C. albicans* infection, and in its absence β -Mans certainly promoted dissemination of the fungus.

Results

α -mannosidase resistant O-mannosides of C. albicans

In a previous study, we highlighted the presence of β -Mans epitopes in the *O*-glycan modification of cell wall proteins (Fradin *et al.*, 2008). To further analyse this β -1,2 mannosylation, a standard β -elimination protocol (Shibata *et al.*, 1985) was applied to release *O*-mannosides from whole *C. albicans* yeast cells (Bates *et al.*, 2006; Munro *et al.*, 2005; Singleton *et al.*, 2005). Mild acid hydrolysis was performed before whole cells underwent β -elimination treatment to prevent contamination of the *O*-mannoside fraction with phosphomannosides (Kobayashi *et al.*, 1990). These mannosides were then analyzed by fluorophore assisted carbohydrate electrophoresis (FACE) which separates oligosaccharides according to their degree of polymerization, but also to the type of saccharide (e.g. glucose vs. mannose) and to some extent to their glycosidic linkage (e.g. α -1,4 vs. α -1,6 glucans) (Goins and Cutler, 2000). To differentiate between α - and β -mannosyl residues linked to the non-reducing end of *O*-mannosides, released oligosaccharides were incubated with α -mannosidase from *Canavalia ensiformis* (Jack Bean), which is specific for $\alpha(1\rightarrow2,3,6)$ linked terminal α -mannosyl residues, prior to electrophoresis. Because β -1,2 mannosylation is regulated by the environment (Trinel *et al.*, 2002a), yeast cells were grown at two temperatures (28°C and 37°C) which are known to regulate β -1,2 mannosylation. Western blotting using mAb 5B2 (reacting with β -1,2 linked mannohexose as a minimal epitope), and the lectin ConA (specific for terminal α -D mannosyl/glucosyl) revealed that the glycans from yeast cells grown at 28°C contained more β -1,2 Mans than those from yeast cells grown at 37°C (Fig. 2A). As expected, lower expression of β -Mans unmasked terminal α -mannosyl residues that were more exposed on CWMPs when yeast cells were grown at 37°C. As previously described (Munro *et al.*, 2005), *O*-mannosides have a degree of polymerization of up to seven mannosides, with majority consisting of mannohexose, mannotriose and mannopentaose, whereas in phosphomannosides the majority are mannotriose and mannotetraose with mannosides having up to more than 8 mannose units (Fig.2B). The content of *O*-mannosides clearly varied with culture conditions. At 37°C, a higher quantity of mannohexose could be detected, and the mannopentaose migrated as a doublet. From this doublet, only the upper band was digested by the α -mannosidase (Fig. 2B). The lower band, which corresponded to the main mannopentamer recovered when cells were incubated at 28°C, and the mannotetraose were the only mannosides resistant to α -mannosidase digestion. These two mannosides were not digestion products of the mannohexose, which was barely detectable in the samples from

cells cultured at 28°C. The same level of mannopentamer was detected before and after α -mannosidase treatment, thus the mannotetraose did not result from hydrolysis. These data suggest that α -mannosidase resistant mannotetraose and mannopentaose contain terminal β -Mans. β -1,2 mannosidase is not currently available as a recombinant enzyme and so it was difficult to conclude if these β -Mans were linked to an α -mannosidase sensitive *O*-mannotriose, or if the *O*-mannotetraose and *O*-mannopentaose contained only β -Mans.

Bmt1 and Bmt3 are involved in β -1,2 mannosylation of *O*-mannosides

To confirm the presence of β -Mans in *C. albicans* *O*-mannan and to unravel the enzymology of their biosynthesis, we applied the strategy used previously to identify the six Bmts involved in the β -1,2 mannosylation of PPM and PLM (Mille *et al.*, 2008a; Mille *et al.*, 2012) (Fig. 1). *O*-mannosides from mutants lacking one of the nine Bmts and their reference strain, grown at 28°C, were then analyzed by FACE. We hypothesized that the three Bmts with unknown function (*Bmt7*, *Bmt8* and *Bmt9*) may be involved in *O*- β -1,2 mannosylation. As in SC5314 the *O*-mannosides of strain BWP17 had a degree of polymerization of up to seven with the majority comprising of mannotriose and mannopentaose (Fig. 3A). If a doublet corresponding to the mannopentaose was present, the lower band was the major one. All the mutants, similar to the control strain, displayed the mannotriose, the upper mannopentaose band and the mannohexaose. However, *O*-mannosides from *bmt1* Δ and *bmt3* Δ mutants contained lower amounts of the above mentioned mannosides. As expected, *bmt5* Δ and *bmt6* Δ mutants had no defect in *O*-mannan polymerization, but, similar patterns of polymerisation were observed with *O*-mannans from *bmt7* Δ , *bmt8* Δ and *bmt9* Δ (Fig. 3A) suggesting they are not involved in *O*- β -1,2 mannosylation. Deletion of *BMT2* or *BMT4*, which encode Bmts involved in β -1,2 mannosylation of PPM phosphomannosides, also had no effect on *O*-mannoside biosynthesis (Fig. 3A). In contrast, analysis of *O*-mannosides from mutants lacking *BMT1* and *BMT3* revealed the accumulation of a mannotriose and a mannotetraose, respectively (Fig 3A.). Both mutants were lacking the lower *O*-mannopentaose band, while only the *bmt1* Δ mutant did not express the *O*-mannotetraose. Normal *O*-mannosides were recovered when wild type copies of *BMT1* and *BMT3* were reintroduced into the corresponding deletion strains (Fig. 3.). This result suggests strongly that *Bmt1* and *Bmt3* add the first and the second β -mannose onto the α -linked *O*-mannotriose, respectively. These two Bmts would use a substrate biosynthesized by one or more members of the *Pmts* family (Prill *et al.*, 2005a) and by *Mnt1* and/or *Mnt2*

which synthesis Man_{2-3} (Díaz-Jiménez *et al.*, 2012; Munro *et al.*, 2005) and form an heteropolymer (Fig. 3D). As expected, FACE analysis of *O*-mannosides from the double *mnt1* Δ /*mnt2* Δ mutant revealed that, unlike the CAI-4 reference strain, they contained neither a mannotetraose nor a mannopentaose (Fig. 3B). Additional bands detected in *mnt1* Δ /*mnt2* Δ mutant were certainly non-mannosyl products as previously reported (Munro *et al.*, 2005). The impact of Mnt1 and Mnt2 on CWMPs β -1,2 mannosylation was then determined. Whole yeast cell extracts from CAI-4 and the *mnt1* Δ /*mnt2* Δ mutant grown at 28°C were analyzed by western blot with anti- β -Mans mAb 5B2 and the lectin ConA. Reactivity to mAb 5B2 was reduced on CWMPs of *mnt1* Δ /*mnt2* Δ mutant compared to the CAI-4 control strain, while α -Mans levels were comparable between the two strains (Fig. 3C).

BMT1 deletion dramatically affects mannoproteins β -1,2 mannosylation

Precise differences between the biological reactivities of glycans from PPM and CWMPs have never been made clear. PPM but not CWMPs glycans have been structurally defined (Kobayashi *et al.*, 1989; Kobayashi *et al.*, 1990; Shibata *et al.*, 1989). It has been assumed that CWMPs glycans are similar to those of PPM. The impact the deletion of *BMT1* had on PPM β -1,2 mannosylation is only partial as the mutant still expresses, even if to a lower degree, β -Mans on PPM phosphomannosides [Fig. 4A, (Mille *et al.*, 2008a)]. To further analyze CWMPs β -1,2 mannosylation, β -Mans epitopes were mapped for the *bmt1* Δ mutant. The β -Mans detected from this mutant CWMPs was compared to those from the reference strain, BWP17, and the mutants lacking the Bmts, which add the first β -mannose on PPM phosphomannosides (Bmt2) and PLM (Bmt5) and the three Bmts with unknown functions (Bmt7-9). Yeast cells were grown at 28°C which is optimal for CWMPs β -1,2 mannosylation. In contrast to PPM, β -Mans epitopes were not detected on CWMPs from the *bmt1* Δ mutant, whereas CWMPs from the other *bmt* Δ mutants were β -1,2 mannosylated like the reference strain (Fig. 4A). Similar results were obtained with other anti- β -Mans antibodies, including mAb 26G7 which is specific for β -Mans at the non-reducing end [Fig. 2A, (Elguezabal *et al.*, 2009)]. Enhanced staining was obtained for the *bmt1* Δ mutant with ConA compared to the other strains. This was likely to be due to the unmasking of terminal α -mannosyl (data not shown). These data further support that CWMPs and PPM are glycosylated in a different manner, and that CWMPs β -1,2 mannosylation is only initiated by Bmt1.

The β -1,2 mannosylation of hyphal CWMPs was also studied. To be able to differentiate specific hyphal cell wall proteins from yeast ones, we focused on the glycosylation of the specific hyphal wall protein, Hwp1 (Hyphal Wall Protein 1). Hwp1 is highly *O*-glycosylated (Staab *et al.*, 2004) and, as shown in our previous study, is also β -1,2 mannosylated (Fradin *et al.*, 2008). In order to be able to perform virulence assays, a new *bmt1* Δ mutant, with CAI-4 as the parental genetic background, was used. CAI-4 background was preferred to BWP17 background as it has only one auxotrophy and BWP17 cells tends to have reduced hyphae production rate compared to CAI-4, which can impact the virulence assays. This mutant showed the same phenotype (truncated *O*-mannosides and no β -mannosylation of CWMPs) as the mutant in the BWP17 background (data not shown). After replacement of the GPI signal sequence with a 6x histidine (6xHis) tagged, recombinant protein Hwp1 was purified from culture supernatants of CAI-4 and *bmt1* Δ , under hyphal inducing conditions, by affinity chromatography (Fig. 4B). Hwp1 mobility was assessed by western blot analysis using mAb 16B1 (specific to Hwp1). However, protein staining showed that the recombinant 6xHis-Hwp1 protein co-purified with another protein of 75 kDa (Fig. 4B). Mass spectrometry analysis of this protein, which was performed by the SICaPS platform of IMAGIF (Centre de Recherche de Gif-www.imagif.cnrs.fr), confirmed that it was not a digestion product of Hwp1, but was the hyphal cell wall protein Pra1 (pH Regulated Antigen 1) (Sentandreu *et al.*, 1998). Pra1 is secreted by hyphal cells (Luo *et al.*, 2010), and thus it was not surprising to recover it from culture supernatants. Furthermore, Pra1 is a zinc binding protein (Citiulo *et al.*, 2012); with affinity for other divalent cations, which may explain why Pra1 co-purified on the nickel column. Western analysis with mAb 5B2 showed that similar to Hwp1, Pra1 was β -1,2 mannosylated, but in contrast to Hwp1, Pra1 had β -Mans epitopes in both *O*- and *N*-glycans (Fig.4B). It was difficult to assess if Hwp1 was *N*-mannosylated because PNGase treatment did not affect its molecular weight. On the other hand, PNGase treatment of Pra1 resulted in a clear molecular weight shift of this protein (Fig. 4B), and a reduction in mAb 5B2 specificity.

Deletion of *Bmt1* deprived r6xHis-Hwp1 and Pra1 of their β -Mans epitopes (Fig.4C). Similar results were obtained with other anti- β -Mans antibodies (Fig.4C, data not shown). Staining with mAb 16B1 and ConA confirmed that CAI-4 and *bmt1* Δ expressed approximately equal amounts of proteins. Taken together, these results suggest that, as for yeast cell CWMPs, initiation of β -Mans expression on hyphal CWMPs is dependent on *Bmt1*.

Pra1 β -1,2 mannosylation was not affected in the *bmt2* Δ mutant, indicating a lack of phosphomannosides containing β -Mans in hyphal CWMPs (Fig.4D). Weak expression of β -Mans epitopes on Pra1 from *mnt1* Δ /*mnt2* Δ mutant (data not shown) is more likely to be due to β -Mans at the non-reducing end of PPM α -1,2 Mans (Fig.2A). Bmt1 was therefore predicted to be crucial for β -1,2 mannosylation of CWMPs from both yeast and hyphal cells.

Bmt1 is responsible for surface expression of hyphal β -Mans

We showed previously that single *BMT* deletions have only a slight effect on β -Mans surface expression (Mille *et al.*, 2008a). Considering that β -Man biosynthesis is initiated by at least three Bmts, it is perhaps not surprising that deletion of single species of these redundant enzymes has only a weak impact on surface expression of β -Mans. PPM differs between yeast and hyphal cells (Shibata *et al.*, 2007), with reduced amounts of β -Mans in PPM phosphomannosides of hyphal cells (Fig. 2B). Therefore, we assessed whether deletion of *BMT1* would affect expression of β -Mans at the cell surface. Staining of hyphal cells from selected strains with mAbs 5B2 and 26G7 confirmed that, compared to CAI-4, the *bmt1* Δ mutant only expressed β -Mans on the mother cells and not on the lateral walls of germ tubes (Fig.5). Expression of β -Mans in germ tubes was recovered by the reintroduction of Bmt1 by genetic complementation. On the other hand, *bmt2* Δ and *bmt5* Δ mutants expressed β -Mans at the surface of both germ tubes and mother cells (data not shown). This immunofluorescence confirmed that, in contrast to mother cells, germ tubes do not express β -Mans from N-glycan phosphomannosides and PLM on their surface (Fig. 2B and C). The *mnt1* Δ /*mnt2* Δ mutant expressed, even if at a reduced level, β -Mans on germ tubes, at the non-reducing ends of (PPM and/or CWMPs) N-glycans (Fig. 2A). These data suggest that the glycosylation motifs on the cell wall surface vary between germ tubes and mother cells. The β -Mans expressed on the germ tube surface were therefore biosynthesised by Bmt1 and Bmt3 corresponding to β -Mans from O-mannans (Fig. 2D). β -Mans were also synthesized at the non-reducing end of α -1,2 Mans from N-glycans (Fig. 2A).

BMT1 is not hypha-specific but is more highly expressed by hyphal cells at 37°C

As expected, β -Mans epitopes mapped by western blot on CWMPs clearly showed that yeast culture conditions (28°C) favored CWMPs β -1,2 mannosylation compared to the cells grown at 37°C (Fig. 6A). This was not due to optimal β -1,2 mannosylation activity at 28°C, as CWMPs from hyphal cells grown at 37°C, expressed strong levels of β -Mans (Fig. 6A). Moreover, *BMT1* expression is correlated with Bmt1 specific β -Mans epitopes, with elevated *BMT1* levels occurring under yeast growth conditions (28°C), compared to hyphal inducing conditions (37°C; Fig. 6B). Neutrophils inhibited *HWP1* expression in *C. albicans* as a result of reduced hyphae formation (Fradin *et al.*, 2005) as well as *BMT1* expression, confirming the influence of *C. albicans* morphology on *BMT1* expression (Fig. 6C).

BMT1 deletion affects C. albicans virulence

Several studies have shown that *O*-mannosides are associated with several aspects of *C. albicans* host interactions (Munro *et al.*, 2005; Rouabhia *et al.*, 2005). To investigate the possible involvement of β -Mans to *O*-mannosides virulence, we analysed the virulence properties of the *bmt1* Δ mutant in two murine models of disseminated candidosis (Kretschmar *et al.*, 1999; MacCallum, 2012). Deletion of *BMT1* reduced the survival of BALB/c mice, suggesting that the *bmt1* Δ mutant displays hyper virulence (Table 1). Similar to β -Man epitope biosynthesis, wild type virulence was partially recovered by complementing the mutant with a single copy of *BMT1*. Comparable results were obtained when spleen, kidneys and liver fungal burdens were determined following BALB/c mice intraperitoneal infection (Fig.7). Organs, particularly spleen and liver, contained more fungal cells after mice challenge with *bmt1* Δ mutant than reference strain (Fig.7). All independent experiments gave similar results and even with the strong heterogeneity of the mutant fungal burdens between mice, the differences between the *bmt1* Δ mutant and the reference strain was significant in the liver. Restoration of the native *BMT1* gene into *bmt1* Δ mutant attenuated significantly its dissemination. β -Mans can be expressed by other conjugates (including PPM phosphomannosides and PLM) (Fig.1B-C), which could compensate for the lack of β -Mans on *O*-mannans and at the non-reducing end of PPM α -1,2 Mans (Fig.2A and 3D). Therefore, we generated a strain that did not express β -Mans on any conjugates. For this purpose, we deleted *BMT2* and *BMT5*, coding for Bmts that initiate the synthesis of β -Mans on PPM phosphomannosides and PLM in the *bmt1* Δ mutant background. We confirmed by western

analysis (data not shown) and immunofluorescence (Fig.5) that the *bmt1Δ/bmt2Δ/bmt5Δ* mutant had no β -Man in its cell wall. Surprisingly, this mutant was as virulent as *bmt1Δ* mutant (Table 1 and Fig.7). Furthermore, the differences between the *bmt1Δ/bmt2Δ/bmt5Δ* mutant and the wild type strain were significant in the different organs analyzed. The lectin, galectin-3 (Gal3), has been described as a β -Mans receptor (Fradin *et al.*, 2000), and is proposed to induce killing of *C. albicans* (Kohatsu *et al.*, 2006). More recently, Gal3 has been shown to enhance phagocytosis of *C. albicans* by neutrophils (Linden *et al.*, 2013b). Murine neutrophils secrete Gal3 upon infection by *C. albicans* cells, which are then opsonized by this lectin. We therefore determined whether mutants expressing reduced β -Mans would be less susceptible to Gal3-dependent killing. Spleen, kidneys and liver fungal burdens in Gal3^{-/-} mice and C57BL/6 control mice were analyzed following intraperitoneal infection with the *bmt1Δ* mutant, the *bmt1/bmt2Δ/bmt5Δ* mutant and the control strain. Infections of C57BL/6 mice gave similar results in the liver than those obtained with BALB/c mice, even if the difference between mutant strains and the reference strain was weakened and not significant (Fig.8A). However, dissemination in the spleen and the kidneys was similar for the three strains. Interestingly, spleen from Gal3^{-/-} mice infected with CAI-4 contained significantly ($p < 0.05$) higher fungal burdens than those from C57BL/6 mice (Fig.8B). In contrast, no significant difference was observed with the two *bmtsΔ* mutants (Fig. 8). Gal3^{-/-} mice displayed lower fungal burdens in the spleen and liver when infected with either the *bmt1Δ* mutant, or the *bmt1Δ/bmt2Δ/bmt5Δ* mutant. These data suggest that β -Mans certainly have a role in *C. albicans* virulence, as well as in host defense against this yeast.

Discussion

CWMPs glycans have never been chemically characterized, but are often extrapolated from structural information obtained from PPM. We have shown that β -Mans epitopes are widely distributed among the different CWMPs (Fradin *et al.*, 2008). We also demonstrated that, in contrast to PPM, *O*-mannosylation is part of the *C. albicans* β -1,2 mannosylation process. Structural studies of *C. albicans* PPM have not detected these oligomannosides on *O*-mannans (Hayette *et al.*, 1992b; Shibata *et al.*, 2012). Therefore, the *O*-mannosides from the PPM might not be β -1,2 mannosylated, or these epitopes may not have survived β -elimination during PPM purification with Fehling's solution. *O*-mannans have been implicated in *C. albicans* virulence (Mora-Montes *et al.*, 2010a; Munro *et al.*, 2005; Peltroche-Llacsahuanga *et al.*, 2006; Rouabhia *et al.*, 2005), therefore it was important to better understand the role of β -Mans in these mannosides and their impact on the host-fungus interaction. This study establishes both the presence of β -Mans and their biosynthetic process in *C. albicans* *O*-mannan. Two mutants, *bmt1* Δ and *bmt3* Δ , had truncated *O*-mannosides with an accumulation of *O*-mannotriose and *O*-mannotetraose, respectively. Alpha-mannosidase treatment of *O*-mannosides from wild type strain digests all mannosides containing less than 4 mannose residues. It seemed that a heteropolymer rather than a homopolymer made up α -mannosidase resistant *O*-mannans. Bmt1 is known to add β -mannose on α -1,2 Man in PPM acid stable fraction, initiating then a heteropolymer composed of α -1,2 Man with terminal β -1,2 Mans [Fig.1A, (Mille *et al.*, 2008a)]. This Bmt1 substrate would also be available on *O*-mannosides after biosynthesis of Mnt1 and possibly Mnt2 [Fig.3D, (Díaz-Jiménez *et al.*, 2012; Munro *et al.*, 2005)]. The mutant that lacks these two enzymes was deprived of β -mannosylated *O*-mannopentaose and expressed less β -Mans on CWMPs than the reference strain. As for β -Mans at the non-reducing end of PPM α -1,2 Mans (Mille *et al.*, 2008a), Bmt3 adds the second β -mannose. β -1,2 mannosylated *O*-mannosides identical to the *C. albicans* glycans described in this report have been described previously in *Pichia pastoris* (Trimble *et al.*, 2004).

β -Mans at the non-reducing end of α -1,2 Mans are major CWMPs β -Mans in both yeast and hyphae. Yeast CWMPs from *bmt1* Δ mutant did not harbor β -Mans epitopes and two purified hyphal proteins, Hwp1 and Pra1, were no more β -1,2 mannosylated when expressed in this mutant. Lack of Bmt1 activity has been reported to have no impact on yeast surface expression of β -Mans (Mille *et al.*, 2008a) certainly due to expression of alternative sources

of β -Mans such as those present on PLM and PPM phosphomannosides. Surprisingly, we could show here that surface expression of β -Mans on germ tubes was initiated only by Bmt1. β -1,2 mannosylation of Hwp1 and Pra1 was not affected in the *bmt2* Δ mutant, but it was diminished in the *mnt1* Δ /*mnt2* Δ mutant, suggesting that *N*-glycans of hypha-specific CWMPs contain β -Mans only at the non-reducing end of α -1,2 Mans. Supporting this, others have observed presence of non- β -1,2 mannosylated phosphomannose in hyphae (Shibata *et al.*, 1989). Lack of *BMT2* had no impact on β -1,2 mannosylation of yeast CWMPs. Yeast and hyphal CWMPs had very similar glycans, which differed then from PPM glycans, especially phosphomannosides and *O*-mannans. These data suggest that germ tubes and not the parent mother cells do not contain the most commonly described PPM (Shibata *et al.*, 2012). Because the ratio PPM/CWMPs was weakened in hyphae, their CWMPs phosphomannose could be detected by NMR (Shibata *et al.*, 1989).

Surface cell wall molecules are important because they can directly interact with the host. However, β -Mans biosynthesized by Bmt1 apparently have no detrimental impact on the host, because mutants lacking Bmt1 were either more virulent or equally virulent than control strains in two different genetic background mice use in a model of disseminated candidiasis. Indeed, in BALB/c mice, survival was reduced, and organs contained higher fungal burdens after infection with the *bmt1* Δ mutant. This suggested that Bmt1 specific β -Mans are a potential avirulence factor, whose presence attenuates pathogen mediated damage. Using C57/BL6 mice, differences were reduced even nonexistent. This result was not expected but BALB/c and C57BL/6 mice can produce different immunological responses to *C. albicans* infections that can impact yeast virulence and dissemination (Carvalho *et al.*, 2012; Mosci *et al.*, 2013; Schofield *et al.*, 2005; Staab *et al.*, 2013; Wellington *et al.*, 2009; Zou *et al.*, 2012). Wild type strain clearly disseminated more in organs of C57BL/6 mice while differences between mutants were lower between the two genetic background mice.

β -1,2 mannosylation is a terminal step of *N*-glycan and *O*-mannan glycosylation and would not be expected to impact CWMPs stability or tertiary structure, which could result in alterations in the sensitivity to chemicals and host defense components (Loibl and Strahl, 2013).

All *bmt* mutants characterized to date had neither growth nor defects in cell wall biogenesis [(Mille *et al.*, 2008a), this study], that might impact on virulence. Our results show that *bmt1* Δ mutant tends to be more virulent suggesting that either i) β -Mans mask *C. albicans* virulence

attributes, including α -mannosides (Hall *et al.*, 2013; Munro *et al.*, 2005) or ii) that the mutants described here still expresses other β -Mans, such as those on PLM, which dominate virulence attributes or, iii) that β -Mans expressed at the surface are detected by host components to eliminate *C. albicans*.

Modulation of immune response is a process used by *C. albicans* to counteract host defenses (Cheng *et al.*, 2012; Jouault *et al.*, 2009). The different glycans expressed by the yeast form of *C. albicans* are recognized by different host receptors inducing pro- or anti-inflammatory responses. Removal of one type of glycan could therefore disrupt immune response normally triggered by the yeast. *C. albicans* yeast cell wall extracts have been shown to induce murine coronary arteritis similar to Kawazaki's disease, which is associated with an increased inflammatory response which has been reported to be more severe in the absence of β -Mans (Nagi-Miura *et al.*, 2004; Ohno, 2004; Shinohara *et al.*, 2006). Lack of β -Mans are also apparently compensated for by an increase in expression of α -1,3 Mans (Kobayashi *et al.*, 1994), which have more pro-inflammatory activities (Bates *et al.*, 2013b). It has been shown that *C. albicans* PPM deprived of β -Mans stimulates dendritic cells to induce strong inflammatory response (Ueno *et al.*, 2013). However, structural analysis of PPM from *bmt1* Δ mutant did not reveal an unmasking of α -1,3 Man (Mille *et al.*, 2008a). Furthermore, this mutant still had β -Mans in PPM and PLM phosphomannosides, which can trigger anti-inflammatory responses (Jouault *et al.*, 2000; Jouault *et al.*, 2003) and have the potential to impact a more virulence phenotype to the *bmt1* Δ mutant strain. We also generated a strain lacking the three Bmts responsible for β -Mans initiation on PPM (Bmt1 and Bmt2), CWMPs (Bmt1) and PLM (Bmt5). This strain contained no β -Mans and had an equivalent virulence to the *bmt1* Δ mutant. Nevertheless, the fungal burdens measured in mice infected with the β -Mans deficient mutant were more homogeneous between mice than with *bmt1* Δ mutant, highlighting that *bmt1* Δ mutant expresses Bmt2 and Bmt5 specific β -Mans that can differently influence virulence.

Kohatsu *et al.* have shown that Gal3 could induce death of *C. albicans* strains expressing β -Mans of the PPM acid stable and labile fractions (Kohatsu *et al.*, 2006). Gal3 that is a soluble lectin known to bind β -Mans (Fradin *et al.*, 2000), that is dispensable for endocytosis of *C. albicans* by macrophages but is essential for TLR2-dependent cytokine production in response to the yeast (Jouault *et al.*, 2006a). Recent studies have demonstrated that this lectin helps mice to overcome *Candida* systemic infections (Linden *et al.*, 2013a). Gal3 may be

secreted by neutrophils to aid opsonization and phagocytosis of yeast cells (Linden *et al.*, 2013b). Comparing dissemination in wild type and Gal3^{-/-} mice, we showed that the wild type strain was more virulent in the knock-out mice while the mutants had similar (*bmt1Δ* mutant) or reduced (*bmt1Δ/bmt2Δ/bmt5Δ* mutant) virulence. Our data show that Gal3 potentiates the elimination of *C. albicans* but in Gal3^{-/-} deficient cells, β-Mans expressing strains of *C. albicans* are more virulent. β-Mans expression is complex as yeast cells grown at 37°C express less β-Mans on PPM and CWMPs than yeasts grown at 28°C (Goto and Okawa, 2008; Trinel *et al.*, 2002a). We highlighted heterogeneity of *O*-mannosides released from whole yeast cells and we demonstrated variability in the β-Mans content determined by growth temperature. *C. albicans* cells display two *O*-mannopentaoses mainly composed of an α-mannosidase sensitive Man₅ at 37°C and an α-mannosidase resistant Man₅ at 28°C. These data suggest that β-Mans from both *N*- and *O*-glycans undergo the same temperature dependent regulation.

β-Mans expression is under the control of regulatory mechanisms that may facilitate the yeast to counteract Gal3-mediated host defenses. The level of Gal3 in colonized patients and patients with candidaemia may enable a better understanding of the role of this lectin in defense against the yeast. Gal3 expression is increased in phagocytes that are incubated with *C. albicans* (Reales-Calderón *et al.*, 2012). Regulation of Gal3 expression (e.g. during neutropenia) by the host and regulation of β-Mans expression by *C. albicans* may be crucial events controlling the balance between saprophytic and parasitic status of *C. albicans*. Current studies are performed to determine which β-Mans on which glycoconjugate is responsible of *C. albicans* virulence in our Gal3^{-/-} model of disseminated candidosis.

Experimental procedures

Fungal strains, preculture and growth conditions

All strains used in this study are listed in Table 2. Pre-cultured cells were obtained by growing yeast cells overnight at 37°C in YPD broth (1% yeast extract, 2% Bactopeptone, 2% glucose) with continuous shaking at 150 rpm. The cells were washed twice and resuspended in 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS).

For yeast cells, cells were inoculated into YPD broth at a density of 10^6 cells ml⁻¹ and grown at 28°C or 37°C with continuous shaking at 150 rpm until the optical density at 600 nm of the culture was 1.0 (approximately 2×10^7 cells ml⁻¹). Hyphae were obtained after inoculation of RPMI medium (Invitrogen) with cells at a density of 5×10^6 cells ml⁻¹ and incubation 3h at 37°C with continuous shaking at 150 rpm. Cells were monitored microscopically to ensure that they had the expected morphologies. For animal experiments, cells were grown on YPD at 30°C for 16 h, washed twice and then suspended in saline solution (NaCl 0.9%) before injection.

Lectin and monoclonal antibodies

Biotinylated concanavalin A (ConA) specific for terminal α -D-mannosyl and α -D-glucosyl residues was purchased from Sigma. MAbs 5B2 and 26G7 (rat-mouse immunoglobulin M [IgM] and mouse IgM, respectively) are specific for β -Mans (Elguezabal *et al.*, 2009; Elguezabal *et al.*, 2004; Trinel *et al.*, 1992). MAb 5B2 recognizes β -Mans with a manno-1,2-mannobiose as minimal epitope while mAb 26G7 is specific for β -Mans at the non-reducing ends of α -1,2-Mans from *N*-glycans. MAb 16B1 is a mouse IgG specific for Hwp1 (Fradin *et al.*, 2008; Marot-Leblond *et al.*, 2004).

Whole-cell protein extraction and western analysis

Cells were washed twice with 50 mM Tris buffer (pH 8.0). Cells were suspended in lysis buffer (50 mM Tris [pH 8.0], 10 mM EDTA, protease inhibitors [protease inhibitor cocktail setIV; Calbiochem]), lysed and homogenized by vortexing with acid-washed glass beads (0.5 mm; Sigma) for 30 min at 4°C. Lysates were then incubated 15 min at 100°C to solubilized PPM and chilled 5min on ice. Loading buffer was added to equal amount of each sample in order to have the following final concentrations: 2% SDS, 50mM Tris pH 6.8, 10% glycerol and 2% β -mercaptoethanol. Samples were boiled 5 min and centrifuged 5 min at 10000g. Supernatants were analyzed by SDS–polyacrylamide gel electrophoresis [PAGE; (Laemmli,

1970)] on 5–20% or 8-16% acrylamide gel slabs. Membranes were probed, as previously described (Fradin *et al.*, 2008), with mAbs 5B2 diluted 1:2000 and 26G7 diluted 1:1000 and then incubated with a 1:2000 dilution of alkaline phosphatase-conjugated anti-rat IgM or anti-mouse IgM, respectively. Enzyme activity was detected with nitroblue tetrazolium and 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (Promega) diluted in 0.1 M Tris (pH 9.5), 0.15 M NaCl, 5 mM MgCl₂.

For lectin staining, membranes were incubated with biotinylated ConA diluted 1:1000 and then incubated with HRP-labeled Streptavidin (AbCam). Peroxidase activity was detected with diaminobenzidine (SIGMAFAST DAB; Sigma).

Whole cell hydrolysis

Cells were washed three times with milliQ water and suspended in 1 ml of 10 mM HCl for acid hydrolysis in a boiling-water bath for 1 h with occasional shaking. After cooling, pH was neutralized with NaOH and the supernatants containing phosphomannosides were harvested by centrifugation at 12000 g for 15 min. Remaining cells were washed three times with milliQ water and suspended in 1ml of 100 mM NaOH for β -elimination at room temperature for 16h with continuous shaking. After pH neutralization with HCl, supernatants containing O-mannosides were harvested by centrifugation at 12000 g for 15 min. Both supernatants were filtered through 0.22 μ m PVDF filter (Millipore) and stored at -20°C until use.

FACE analyses of released phosphomannosides and O-mannosides

Hydrolysates were dried in a vacuum concentrator and tagged with 0.15 M 8-aminonaphthalene-1,3,6-trisulfonate (ANTS, Sigma) and 1 M sodium cyanoborohydride for 16 h at 37°C (Goins and Cutler, 2000). After drying with a vacuum concentrator, the samples were suspended in glycerol/water (1/4). Electrophoresis of ANTS-labeled oligomannosides was performed on 25-30% acrylamide separating gels. Acid-hydrolyzed dextran and oligomannosides from PPM phosphomannosides that were separated by gel filtration chromatography were also tagged with ANTS and used as carbohydrate standards. Gels were dried and images were acquired with the Gel Doc 2000 image analysis apparatus from Biorad equipped with a 365 nm UV-transilluminator.

Generation of C. albicans cells expressing 6xHis Hwp1

Escherichia coli strains DH5 α were used for recombinant DNA work. *HWP1* gene (orf19.1321; <http://www.candidagenome.org/>) and its promoter were cloned in pYES 2.1-TOPO plasmid (Invitrogen) to fuse the gene to DNA sequence coding for 6xHis. Primers (HWP1-1 and HWP1-2, Table 3) use to amplify *HWP1*, were designed to amplify 999bp of the promoter and the ORF missing its last 75 nucleotides, which code for the 26 C-terminal amino-acids, and its stop codon. A fragment of pYES 2.1 TOPO-6xHIS-HWP1 was amplified using the primers HWP1-1 and V5-His (Table 3) and cloned in pCR2.1-TOPO. The fragment containing the sequence coding for 6xHis-Hwp1 was released from the plasmid after digestion with *NotI* and *SacI*, purified from agarose gel with Invisorb Spin DNA Extraction Kit (Invitex) and ligated with T4 DNA ligase (Invitrogen) into CIp10 plasmid digested by the same enzymes and dephosphorylated with calf intestinal alkaline phosphatase (Invitrogen). CIp10-6xHIS-HWP1 was digested by *NheI* and integrated into *HWP1* promoter of CAI-4, *bmt1* Δ , *bmt2* Δ and *mnt1/mnt2* Δ cells. Correct integration of the plasmid was confirmed by Southern blot analysis with probes obtained with primers (probe Fwd/ probe Rev) listed in Table 3.

Production and purification of secreted 6xHis Hwp1

Precultured cells were inoculated into M199 medium (Invitrogen) at a density of 5.10⁶ cells.ml⁻¹, in order to undergo the yeast-to-hypha transition. After 3 h of incubation at 37°C with shaking, medium supernatants were cooled, filtered through GF-F membranes (Millipore) and was adjusted to contain 20 mM sodium phosphate, 500 mM NaCl and 20 mM imidazole, pH 7.4. 6xHis-Hwp1 was purified from the supernatants using His GraviTrap column (GE Healthcare) following the manufacturer's information, eluted with 20 mM sodium phosphate, 500 mM NaCl and 250 mM imidazole, pH7.4 and dialyzed using PD-10 *Desalting* Columns (GE Healthcare). 6xHis-Hwp1 was analyzed by western blotting of whole cell extracts.

Enzymatic treatments

For α -mannosidase treatment, glycans were dried in a vacuum concentrator, solubilized in citrate buffer 50 mM, pH 4.6, and incubated 8 h at room temperature with 0.7U of α -Mannosidase (Sigma) from *Canavalia ensiformis* (Jack bean), specific for α -1,2; α -1,3 and α -1,6 linked terminal α -mannosyl residues. The reaction was stopped by boiling the samples, which were then cooled and stored at -20°C until used.

For PNGase F treatment, proteins samples were precipitated in cold 20% trichloroacetic acid on ice for 1 h, washed twice with ice-cold acetone, suspended in sodium phosphate 0.5 M, pH 7.5 and incubated with peptide-N-glycosidase F following recommendation of the manufacturer (Sigma).

Indirect immunofluorescence assays

Hyphal cells were fixed with formalin and coated on 10 wells slides (Thermoscientific). Wells were washed with PBS-BSA, blocked with PBS containing 5% BSA and incubated 1h at 37°C with monoclonal antibodies or biotinylated ConA, all diluted 1:500 in PBS. Wells were washed with PBS-BSA and incubated with a 1:100 dilution of the corresponding RPE-conjugated anti-Ig or FITC-conjugated streptavidin, all containing 0.002% of Evans blue counterstain. After wells were washed, slides were mounted and visualized by fluorescent microscopy.

RNA isolation and northern hybridization

Frozen cells were lysed and homogenized by vortexing in TriReagent (Sigma) with acid-washed glass beads (0.4–0.6 mm; Sigma) for 30 min. Total RNA was extracted as described previously (Fradin *et al.*, 2003). Total RNA (5 µg) from each sample was loaded on a formaldehyde gel. mRNA levels were measured relative to the ribosomal RNAs by loading approximately equal amounts of total RNA in each lane of the Northern blots. Blots were hybridized with DIG-labelled probes [primers used (probe Fwd/ probe Rev) are listed in Table 3] at 42°C in DIG easy Hyb solution (Roche) for 16h. After hybridization, blots were washed twice at room temperature in 2x SSC, 0.1% SDS at room temperature for 10min, twice in 0.1 SSC, 0.1% SDS at 68°C for 45 min and once in washing buffer (0.1 M maleic acid, 0.15 M NaCl and 0.3% Tween, pH7.5) at room temperature for 10 min. The membranes were then blocked with washing buffer containing 1% blocking reagent (Roche) for 1 h. For the detection of DIG-labelled probes, membranes were incubated with an anti-DIG antibody conjugated to phosphatase alkaline (Roche) diluted 1:10000 in blocking solution at room temperature for 1 h. After blocking, DIG-labelled probes were detected as described above using CDP star reagent (Roche) and exposed to X-ray film (Roche).

Gene disruption

All mutants were generated in the CAI-4 background using the mini ura blaster method as previously described (Wilson *et al.*, 2000). Region of pDDB57 plasmid containing *URA3* selection marker is amplified by PCR with primers listed in Table 3 (*BMT* knockout Fwd/*BMT* knockout Rev) containing 20 and 80 bases homologous to the plasmid and to the gene of interest, respectively. The PCR fragment was used to transform CAI-4 by the lithium acetate method described previously (Sanglard *et al.*, 1996). Clones formed on YNB (0,67% Yeast Nitrogen Based, 2% glucose, 2% agar) plates were spread onto 5-fluoroorotic acid plates to recycle selection *URA3* marker. A second round of transformation was performed to delete the second allele by the same method. Homologous integration of the cassette was checked by Southern blot with probes obtained with primers (probe Fwd/ probe Rev) listed in Table 3. A *BMT1* reconstituted strain was constructed by cloning a PCR fragment containing the native *BMT1* gene into CIp10 (Murad *et al.*, 2000). The PCR fragment containing the *BMT1* region from positions -652 to +870 was ligated into CIp10 and the resulting pCIp-*BMT1* was transformed into Ura⁻ Δ *bmt1* after linearization. To give the corresponding controls, linearized CIp10 alone was transformed into CAI-4 and the different mutants. A single integration of these plasmids at the RPS1 locus in the same allele was confirmed by Southern blot analysis with probes obtained with primers (probe Fwd/ probe Rev) listed in Table 3.

Animal experiments

All mouse experiments were performed according to protocols approved by the Minister of superior education and of the Research and in accordance with the European legal and institutional guidelines (2010/63/UE) for the care and use of laboratory animals. All animals had free access to food and water throughout the experiments.

For survival assays, cells were harvested, washed twice with sterile, physiological saline, and resuspended in sterile, physiological saline to produce inocula of $2 \cdot 10^5$ cfu in 100 μ l. For each *C. albicans* strain tested, five female BALB/c mice (8-10 weeks old average weight: 18.8 \pm 0.7g) were injected intravenously with 100 μ l of cell suspension into the lateral tail vein. Mice were monitored daily and humanely killed when they showed signs of distress or were unable to freely reach food and water.

For determination of organs fungal burdens, cells were harvested, washed twice with sterile, physiological saline, and suspended in sterile, physiological saline at a density of $1.25 \cdot 10^8$ cfu in 1ml. For each *C. albicans* strain tested, five female BALB/c mice (8-10 weeks old) or four

C57Bl/6 or gal3^{-/-} mice (8-10 weeks old) were injected intraperitoneally with 400 µl of cell suspension. Three days after injection, mice were sacrificed and organs (spleen, kidneys and liver) were removed aseptically, weighed, homogenized and suspended in 5 ml of sterile water. Homogenates were plated on Sabouraud glucose agar containing 0.5 g.l⁻¹ of chloramphenicol and incubated for 24 h at 37°C. CFU were counted and reported to the organ's weight to establish colonization level.

The results shown are from three independent experiments. Survival data were analyzed by the Kaplan Meier survival analysis. Fungal burdens were analyzed by the Kruskal-Wallis test followed by post hoc testing using the unpaired Mann-Whitney U test.

P values < 0.05 were considered significant.

All statistical analyses were performed with IBM SPSS Statistics Software.

Acknowledgements

This work was supported by the “Agence Nationale de la Recherche” [ANR-09-MIE-031-01]; the European project “AllFun” from the 7th Framework programme-Health [260338] and the “College Doctoral Lille Nord de France” [Ouverture Internationale des Etudes et de la Formation Doctorale en Région Nord-Pas de Calais]. NG was also supported by the Wellcome Trust (080088, 086827, 075470 and 099215).

This work has benefited from the facilities and expertise of the SICaPS platform of IMAGIF (Centre de Recherche de Gif-www.imagif.cnrs.fr).

We gratefully acknowledge Prof. A. P. Mitchell (Carnegie Mellon University, Pittsburgh, USA), Prof. A. J. P. Brown (Department of Molecular and Cell Biology, Aberdeen, UK), Prof. R. Robert (GEIHP, Université d’Angers, France) and Prof M. D. Moragues (Universidad del País Vasco, Bilbao, Spain) for providing pDDB57 and CIp10 plasmids and mAbs 16B1 and 26G7, respectively. We are indebted to Annick Masset, Aminati Hamissi and Timothé Dauchy for excellent technical assistance.

References

- Arroyo, J., Hutzler, J., Bermejo, C., Ragni, E., García-Cantalejo, J., Botías, P., *et al.* (2011) Functional and genomic analyses of blocked protein O-mannosylation in baker's yeast. *Mol Microbiol* **79**: 1529-1546.
- Bates, S., Hall, R.A., Cheetham, J., Netea, M.G., MacCallum, D.M., Brown, A.J., *et al.* (2013) Role of the *Candida albicans* MNN1 gene family in cell wall structure and virulence. *BMC Res Notes* **6**: 294.
- Bates, S., Hughes, H.B., Munro, C.A., Thomas, W.P., MacCallum, D.M., Bertram, G., *et al.* (2006) Outer chain N-glycans are required for cell wall integrity and virulence of *Candida albicans*. *J Biol Chem* **281**: 90-98.
- Carvalho, A., Giovannini, G., De Luca, A., D'Angelo, C., Casagrande, A., Iannitti, R.G., *et al.* (2012) Dectin-1 isoforms contribute to distinct Th1/Th17 cell activation in mucosal candidiasis. *Cellular & molecular immunology* **9**: 276-286.
- Cheng, S.C., Joosten, L.A., Kullberg, B.J. and Netea, M.G. (2012) Interplay between *Candida albicans* and the mammalian innate host defense. *Infect Immun* **80**: 1304-1313.
- Chung, A.W., Sieling, P.A., Schenk, M., Teles, R.M., Krutzik, S.R., Hsu, D.K., *et al.* (2013) Galectin-3 regulates the innate immune response of human monocytes. *J Infect Dis* **207**: 947-956.
- Citiulo, F., Jacobsen, I.D., Miramón, P., Schild, L., Brunke, S., Zipfel, P., *et al.* (2012) *Candida albicans* scavenges host zinc via Pra1 during endothelial invasion. *PLoS Pathog* **8**: e1002777.
- Dalle, F., Jouault, T., Trinel, P.A., Esnault, J., Mallet, J.M., d'Athis, P., *et al.* (2003) Beta-1,2- and alpha-1,2-linked oligomannosides mediate adherence of *Candida albicans* blastospores to human enterocytes in vitro. *Infect Immun* **71**: 7061-7068.
- Díaz-Jiménez, D.F., Mora-Montes, H.M., Hernández-Cervantes, A., Luna-Arias, J.P., Gow, N.A. and Flores-Carreón, A. (2012) Biochemical characterization of recombinant *Candida albicans* mannosyltransferases Mnt1, Mnt2 and Mnt5 reveals new functions in O- and N-mannan biosynthesis. *Biochem Biophys Res Commun* **419**: 77-82.
- Dromer, F., Chevalier, R., Sendid, B., Improvisi, L., Jouault, T., Robert, R., *et al.* (2002) Synthetic analogues of beta-1,2 oligomannosides prevent intestinal colonization by the pathogenic yeast *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* **46**: 3869-3876.
- Elguezabal, N., Maza, J.L., Moragues, M.D. and Pontón, J. (2009) Monoclonal antibody-mediated inhibition of adhesion of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to human epithelial cells. *Eur J Oral Sci* **117**: 474-478.
- Elguezabal, N., Maza, J.L. and Pontón, J. (2004) Inhibition of adherence of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to a resin composite restorative dental material by salivary secretory IgA and monoclonal antibodies. *Oral Dis* **10**: 81-86.
- Fonzi, W.A. and Irwin, M.Y. (1993) Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics* **134**: 717-728.
- Fradin, C., De Groot, P., MacCallum, D., Schaller, M., Klis, F., Odds, F.C. and Hube, B. (2005) Granulocytes govern the transcriptional response, morphology and proliferation of *Candida albicans* in human blood. *Mol Microbiol* **56**: 397-415.

Fradin, C., Jouault, T., Mallet, A., Mallet, J.M., Camus, D., Sinay, P. and Poulain, D. (1996) Beta-1,2-linked oligomannosides inhibit *Candida albicans* binding to murine macrophage. *J Leukoc Biol* **60**: 81-87.

Fradin, C., Kretschmar, M., Nichterlein, T., Gaillardin, C., d'Enfert, C. and Hube, B. (2003) Stage-specific gene expression of *Candida albicans* in human blood. *Mol Microbiol* **47**: 1523-1543.

Fradin, C., Poulain, D. and Jouault, T. (2000) beta-1,2-linked oligomannosides from *Candida albicans* bind to a 32-kilodalton macrophage membrane protein homologous to the mammalian lectin galectin-3. *Infect Immun* **68**: 4391-4398.

Fradin, C., Slomianny, M.C., Mille, C., Masset, A., Robert, R., Sendid, B., *et al.* (2008) Beta-1,2 oligomannose adhesin epitopes are widely distributed over the different families of *Candida albicans* cell wall mannoproteins and are associated through both N- and O-glycosylation processes. *Infect Immun* **76**: 4509-4517.

Gillum, A.M., Tsay, E.Y. and Kirsch, D.R. (1984) Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae* *ura3* and *E. coli* *pyrF* mutations. *Mol Gen Genet* **198**: 179-182.

Goins, T.L. and Cutler, J.E. (2000) Relative abundance of oligosaccharides in *Candida* species as determined by fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis. *J Clin Microbiol* **38**: 2862-2869.

Goto, K. and Okawa, Y. (2008) Activity and stability of alpha- and beta-mannosyltransferases in *Candida albicans* cells cultured at high temperature and at low pH. *Biol Pharm Bull* **31**: 1333-1336.

Hall, R.A., Bates, S., Lenardon, M.D., Maccallum, D.M., Wagener, J., Lowman, D.W., *et al.* (2013) The *Mnn2* mannosyltransferase family modulates mannoprotein fibril length, immune recognition and virulence of *Candida albicans*. *PLoS Pathog* **9**: e1003276.

Han, Y., Morrison, R.P. and Cutler, J.E. (1998) A vaccine and monoclonal antibodies that enhance mouse resistance to *Candida albicans* vaginal infection. *Infect Immun* **66**: 5771-5776.

Hayette, M.P., Strecker, G., Faille, C., Dive, D., Camus, D., Mackenzie, D.W. and Poulain, D. (1992) Presence of human antibodies reacting with *Candida albicans* O-linked oligomannosides revealed by using an enzyme-linked immunosorbent assay and neoglycolipids. *Journal of clinical microbiology* **30**: 411-417.

Helenius, A. and Aebi, M. (2001) Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* **291**: 2364-2369.

Hobson, R.P., Munro, C.A., Bates, S., MacCallum, D.M., Cutler, J.E., Heinsbroek, S.E., *et al.* (2004) Loss of cell wall mannosylphosphate in *Candida albicans* does not influence macrophage recognition. *J Biol Chem* **279**: 39628-39635.

Ibata-Ombetta, S., Idziorek, T., Trinel, P.A., Poulain, D. and Jouault, T. (2003) *Candida albicans* phospholipomannan promotes survival of phagocytosed yeasts through modulation of bad phosphorylation and macrophage apoptosis. *J Biol Chem* **278**: 13086-13093.

Jouault, T., El Abed-El Behi, M., Martinez-Esparza, M., Breuilh, L., Trinel, P.A., Chamailard, M., *et al.* (2006) Specific recognition of *Candida albicans* by macrophages requires galectin-3 to discriminate *Saccharomyces cerevisiae* and needs association with TLR2 for signaling. *J Immunol* **177**: 4679-4687.

- Jouault, T., Fradin, C., Trinel, P.A., Bernigaud, A. and Poulain, D. (1998) Early signal transduction induced by *Candida albicans* in macrophages through shedding of a glycolipid. *J Infect Dis* **178**: 792-802.
- Jouault, T., Fradin, C., Trinel, P.A. and Poulain, D. (2000) *Candida albicans*-derived beta-1,2-linked mannoooligosaccharides induce desensitization of macrophages. *Infect Immun* **68**: 965-968.
- Jouault, T., Iyata-Ombetta, S., Takeuchi, O., Trinel, P.A., Sacchetti, P., Lefebvre, P., *et al.* (2003) *Candida albicans* phospholipomannan is sensed through toll-like receptors. *J Infect Dis* **188**: 165-172.
- Jouault, T., Lepage, G., Bernigaud, A., Trinel, P.A., Fradin, C., Wieruszeski, J.M., *et al.* (1995) Beta-1,2-linked oligomannosides from *Candida albicans* act as signals for tumor necrosis factor alpha production. *Infect Immun* **63**: 2378-2381.
- Jouault, T., Sarazin, A., Martinez-Esparza, M., Fradin, C., Sendid, B. and Poulain, D. (2009) Host responses to a versatile commensal: PAMPs and PRRs interplay leading to tolerance or infection by *Candida albicans*. *Cellular microbiology* **11**: 1007-1015.
- Klis, F.M., de Groot, P. and Hellingwerf, K. (2001) Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans*. *Med Mycol* **39 Suppl 1**: 1-8.
- Kobayashi, H., Shibata, N., Mitobe, H., Ohkubo, Y. and Suzuki, S. (1989) Structural study of phosphomannan of yeast-form cells of *Candida albicans* J-1012 strain with special reference to application of mild acetolysis. *Arch Biochem Biophys* **272**: 364-375.
- Kobayashi, H., Shibata, N., Nakada, M., Chaki, S., Mizugami, K., Ohkubo, Y. and Suzuki, S. (1990) Structural study of cell wall phosphomannan of *Candida albicans* NIH B-792 (serotype B) strain, with special reference to ¹H and ¹³C NMR analyses of acid-labile oligomannosyl residues. *Arch Biochem Biophys* **278**: 195-204.
- Kobayashi, H., Takahashi, S., Shibata, N., Miyachi, M., Ishida, M., Sato, J., *et al.* (1994) Structural modification of cell wall mannans of *Candida albicans* serotype A strains grown in yeast extract-Sabouraud liquid medium under acidic conditions. *Infect Immun* **62**: 968-973.
- Kohatsu, L., Hsu, D.K., Jegalian, A.G., Liu, F.T. and Baum, L.G. (2006) Galectin-3 induces death of *Candida* species expressing specific beta-1,2-linked mannans. *J Immunol* **177**: 4718-4726.
- Kretschmar, M., Bertsch, T., Göller, M., Schaller, M., Hof, H. and Nichterlein, T. (1999) Parameters for determination of *Candida albicans* virulence in murine peritonitis. *Mycoses* **42 Suppl 2**: 19-24.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Li, R.K. and Cutler, J.E. (1993) Chemical definition of an epitope/adhesin molecule on *Candida albicans*. *J Biol Chem* **268**: 18293-18299.
- Lindberg, B., Leontin, K., Lindquist, U., Svenson, S.B., Wrangsell, G., Dell, A. and Rogers, M. (1988) Structural studies of the O-antigen polysaccharide of *Salmonella thompson*, serogroup C1 (6,7). *Carbohydr Res* **174**: 313-322.
- Linden, J.R., De Paepe, M.E., Laforce-Nesbitt, S.S. and Bliss, J.M. (2013a) Galectin-3 plays an important role in protection against disseminated candidiasis. *Med Mycol* **51**: 641-651.

- Linden, J.R., Kunkel, D., Laforce-Nesbitt, S.S. and Bliss, J.M. (2013b) The role of galectin-3 in phagocytosis of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* by human neutrophils. *Cell Microbiol* **15**: 1127-1142.
- Loibl, M. and Strahl, S. (2013) Protein O-mannosylation: What we have learned from baker's yeast. *Biochim Biophys Acta* **1833**: 2438-2446.
- Luo, S., Hartmann, A., Dahse, H.M., Skerka, C. and Zipfel, P.F. (2010) Secreted pH-regulated antigen 1 of *Candida albicans* blocks activation and conversion of complement C3. *J Immunol* **185**: 2164-2173.
- MacCallum, D.M. (2012) Mouse intravenous challenge models and applications. *Methods Mol Biol* **845**: 499-509.
- Marot-Leblond, A., Grimaud, L., David, S., Sullivan, D.J., Coleman, D.C., Ponton, J. and Robert, R. (2004) Evaluation of a rapid immunochromatographic assay for identification of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *J Clin Microbiol* **42**: 4956-4960.
- Mille, C., Bobrowicz, P., Trinel, P.A., Li, H., Maes, E., Guerardel, Y., *et al.* (2008) Identification of a new family of genes involved in beta-1,2-mannosylation of glycans in *Pichia pastoris* and *Candida albicans*. *J Biol Chem* **283**: 9724-9736.
- Mille, C., Fradin, C., Delplace, F., Trinel, P.A., Masset, A., François, N., *et al.* (2012) Members 5 and 6 of the *Candida albicans* BMT family encode enzymes acting specifically on β -mannosylation of the phospholipomannan cell-wall glycosphingolipid. *Glycobiology* **22**: 1332-1342.
- Mille, C., Janbon, G., Delplace, F., Ibata-Ombetta, S., Gaillardin, C., Strecker, G., *et al.* (2004) Inactivation of CaMIT1 inhibits *Candida albicans* phospholipomannan beta-mannosylation, reduces virulence, and alters cell wall protein beta-mannosylation. *J Biol Chem* **279**: 47952-47960.
- Mora-Montes, H.M., Bates, S., Netea, M.G., Castillo, L., Brand, A., Buurman, E.T., *et al.* (2010) A multifunctional mannosyltransferase family in *Candida albicans* determines cell wall mannan structure and host-fungus interactions. *J Biol Chem* **285**: 12087-12095.
- Mosci, P., Pietrella, D., Ricci, G., Pandey, N., Monari, C., Pericolini, E., *et al.* (2013) Mouse strain-dependent differences in estrogen sensitivity during vaginal candidiasis. *Mycopathologia* **175**: 1-11.
- Munro, C.A., Bates, S., Buurman, E.T., Hughes, H.B., Maccallum, D.M., Bertram, G., *et al.* (2005) Mnt1p and Mnt2p of *Candida albicans* are partially redundant alpha-1,2-mannosyltransferases that participate in O-linked mannosylation and are required for adhesion and virulence. *J Biol Chem* **280**: 1051-1060.
- Murad, A.M., Lee, P.R., Broadbent, I.D., Barelle, C.J. and Brown, A.J. (2000) CIP10, an efficient and convenient integrating vector for *Candida albicans*. *Yeast* **16**: 325-327.
- Nagi-Miura, N., Shingo, Y., Adachi, Y., Ishida-Okawara, A., Oharaseki, T., Takahashi, K., *et al.* (2004) Induction of coronary arteritis with administration of CAWS (*Candida albicans* water-soluble fraction) depending on mouse strains. *Immunopharmacol Immunotoxicol* **26**: 527-543.
- Nelson, R.D., Shibata, N., Podzorski, R.P. and Herron, M.J. (1991) *Candida* mannan: chemistry, suppression of cell-mediated immunity, and possible mechanisms of action. *Clin Microbiol Rev* **4**: 1-19.

Nieminen, J., St-Pierre, C. and Sato, S. (2005) Galectin-3 interacts with naive and primed neutrophils, inducing innate immune responses. *J Leukoc Biol* **78**: 1127-1135.

Ohno, N. (2004) Murine model of Kawasaki disease induced by mannoprotein-beta-glucan complex, CAWS, obtained from *Candida albicans*. *Jpn J Infect Dis* **57**: S9-10.

Peltroche-Llacsahuanga, H., Goyard, S., d'Enfert, C., Prill, S.K. and Ernst, J.F. (2006) Protein O-mannosyltransferase isoforms regulate biofilm formation in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* **50**: 3488-3491.

Poulain, D. (2013) *Candida albicans*, plasticity and pathogenesis. *Crit Rev Microbiol*.

Poulain, D. and Jouault, T. (2004) *Candida albicans* cell wall glycans, host receptors and responses: elements for a decisive crosstalk. *Curr Opin Microbiol* **7**: 342-349.

Prill, S.K., Klinkert, B., Timpel, C., Gale, C.A., Schroppe, K. and Ernst, J.F. (2005) PMT family of *Candida albicans*: five protein mannosyltransferase isoforms affect growth, morphogenesis and antifungal resistance. *Mol Microbiol* **55**: 546-560.

Ralton, J.E., Naderer, T., Piraino, H.L., Bashtannyk, T.A., Callaghan, J.M. and McConville, M.J. (2003) Evidence that intracellular beta1-2 mannan is a virulence factor in *Leishmania* parasites. *J Biol Chem* **278**: 40757-40763.

Reales-Calderón, J.A., Martínez-Solano, L., Martínez-Gomariz, M., Nombela, C., Molero, G. and Gil, C. (2012) Sub-proteomic study on macrophage response to *Candida albicans* unravels new proteins involved in the host defense against the fungus. *J Proteomics* **75**: 4734-4746.

Rotshenker, S. (2009) The role of Galectin-3/MAC-2 in the activation of the innate-immune function of phagocytosis in microglia in injury and disease. *J Mol Neurosci* **39**: 99-103.

Rouabhia, M., Schaller, M., Corbucci, C., Vecchiarelli, A., Prill, S.K., Giasson, L. and Ernst, J.F. (2005) Virulence of the fungal pathogen *Candida albicans* requires the five isoforms of protein mannosyltransferases. *Infect Immun* **73**: 4571-4580.

Sanglard, D., Ischer, F., Monod, M. and Bille, J. (1996) Susceptibilities of *Candida albicans* multidrug transporter mutants to various antifungal agents and other metabolic inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* **40**: 2300-2305.

Schofield, D.A., Westwater, C. and Balish, E. (2005) Divergent chemokine, cytokine and beta-defensin responses to gastric candidiasis in immunocompetent C57BL/6 and BALB/c mice. *Journal of medical microbiology* **54**: 87-92.

Sentandreu, M., Elorza, M.V., Sentandreu, R. and Fonzi, W.A. (1998) Cloning and characterization of PRA1, a gene encoding a novel pH-regulated antigen of *Candida albicans*. *J Bacteriol* **180**: 282-289.

Shibata, N., Fukasawa, S., Kobayashi, H., Tojo, M., Yonezu, T., Ambo, A., *et al.* (1989) Structural analysis of phospho-D-mannan-protein complexes isolated from yeast and mold form cells of *Candida albicans* NIH A-207 serotype A strain. *Carbohydr Res* **187**: 239-253.

Shibata, N., Ichikawa, T., Tojo, M., Takahashi, M., Ito, N., Okubo, Y. and Suzuki, S. (1985) Immunochemical study on the mannans of *Candida albicans* NIH A-207, NIH B-792, and J-1012 strains prepared by fractional precipitation with cetyltrimethylammonium bromide. *Arch Biochem Biophys* **243**: 338-348.

- Shibata, N., Kobayashi, H. and Suzuki, S. (2012) Immunochemistry of pathogenic yeast, *Candida* species, focusing on mannan. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences* **88**: 250-265.
- Shibata, N., Suzuki, A., Kobayashi, H. and Okawa, Y. (2007) Chemical structure of the cell-wall mannan of *Candida albicans* serotype A and its difference in yeast and hyphal forms. *Biochem J* **404**: 365-372.
- Shinohara, H., Nagi-Miura, N., Ishibashi, K., Adachi, Y., Ishida-Okawara, A., Oharaseki, T., *et al.* (2006) Beta-mannosyl linkages negatively regulate anaphylaxis and vasculitis in mice, induced by CAWS, fungal PAMPS composed of mannoprotein-beta-glucan complex secreted by *Candida albicans*. *Biol Pharm Bull* **29**: 1854-1861.
- Singleton, D.R., Masuoka, J. and Hazen, K.C. (2005) Surface hydrophobicity changes of two *Candida albicans* serotype B mnn4delta mutants. *Eukaryotic cell* **4**: 639-648.
- Staab, J.F., Bahn, Y.S., Tai, C.H., Cook, P.F. and Sundstrom, P. (2004) Expression of transglutaminase substrate activity on *Candida albicans* germ tubes through a coiled, disulfide-bonded N-terminal domain of Hwp1 requires C-terminal glycosylphosphatidylinositol modification. *J Biol Chem* **279**: 40737-40747.
- Staab, J.F., Datta, K. and Rhee, P. (2013) Niche-Specific Requirement for Hyphal Wall protein 1 in Virulence of *Candida albicans*. *PloS one* **8**: e80842.
- Trimble, R.B., Lubowski, C., Hauer, C.R., 3rd, Stack, R., McNaughton, L., Gemmill, T.R. and Kumar, S.A. (2004) Characterization of N- and O-linked glycosylation of recombinant human bile salt-stimulated lipase secreted by *Pichia pastoris*. *Glycobiology* **14**: 265-274.
- Trinel, P.A., Faille, C., Jacquinet, P.M., Cailliez, J.C. and Poulain, D. (1992) Mapping of *Candida albicans* oligomannosidic epitopes by using monoclonal antibodies. *Infect Immun* **60**: 3845-3851.
- Trinel, P.A., Jouault, T., Cutler, J.E. and Poulain, D. (2002) Beta-1,2-mannosylation of *Candida albicans* mannoproteins and glycolipids differs with growth temperature and serotype. *Infect Immun* **70**: 5274-5278.
- Trinel, P.A., Plancke, Y., Gerold, P., Jouault, T., Delplace, F., Schwarz, R.T., *et al.* (1999) The *Candida albicans* phospholipomannan is a family of glycolipids presenting phosphoinositolmannosides with long linear chains of beta-1,2-linked mannose residues. *J Biol Chem* **274**: 30520-30526.
- Ueno, K., Okawara, A., Yamagoe, S., Naka, T., Umeyama, T., Utena-Abe, Y., *et al.* (2013) The mannan of *Candida albicans* lacking β -1,2-linked oligomannosides increases the production of inflammatory cytokines by dendritic cells. *Med Mycol* **51**: 385-395.
- Vinogradov, E., Petersen, B.O. and Duus, J.O. (2000) Isolation and characterization of non-labeled and ¹³C-labeled mannans from *Pichia pastoris* yeast. *Carbohydr Res* **325**: 216-221.
- Wellington, M., Dolan, K. and Krysan, D.J. (2009) Live *Candida albicans* suppresses production of reactive oxygen species in phagocytes. *Infect Immun* **77**: 405-413.
- Wilson, R.B., Davis, D., Enloe, B.M. and Mitchell, A.P. (2000) A recyclable *Candida albicans* URA3 cassette for PCR product-directed gene disruptions. *Yeast* **16**: 65-70.
- Wilson, R.B., Davis, D. and Mitchell, A.P. (1999) Rapid hypothesis testing with *Candida albicans* through gene disruption with short homology regions. *J Bacteriol* **181**: 1868-1874.

Xin, H., Dziadek, S., Bundle, D.R. and Cutler, J.E. (2008) Synthetic glycopeptide vaccines combining beta-mannan and peptide epitopes induce protection against candidiasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 13526-13531.

Zou, Y., Zhang, H., Li, H., Chen, H., Song, W. and Wang, Y. (2012) Strain-dependent production of interleukin-17/interferon-gamma and matrix remodeling-associated genes in experimental *Candida albicans* keratitis. *Molecular vision* **18**: 1215-1225.

Table1. Mean survival times of BALB/c mice injected with *bmt*Δ mutants and control *C. albicans* strain, CAI-4

Strains	CAI-4+Clp10	<i>bmt1</i> Δ+Clp10	<i>bmt1</i> Δ+ Clp10- <i>BMT1</i>	<i>bmt1</i> Δ/ <i>bmt2</i> Δ/ <i>bmt5</i> Δ +Clp10
Average days of mortality (+/- SD)	12.6 (+/-3.8)	6.4 (+/-1.5)*	8.75 (+/-5.7)	6.1 (+/-1.73)*

The results shown are from three independent experiments.

*Difference with CAI-4, P<0.05

Table2. *C. albicans* strains used in this study

Strain	Parental strain	Genotype	Reference
SC5314		Wild type	(Gillum <i>et al.</i> , 1984)
BWP17 + Clp10	RM1000	<i>arg4::hisG/arg4::hisG;his1::hisG/his1::hisG;ura3Δ::limm434/ura3Δ::limm434, RPS10/rps1Δ::Clp10</i>	(Wilson <i>et al.</i> , 1999)
<i>bmt1Δ</i> + Clp10	BWP17	<i>bmt1Δ::ARG4/bmt1Δ::HIS1, RPS10/rps1Δ::Clp10</i>	(Mille <i>et al.</i> , 2008a)
<i>bmt1Δ</i> + Clp10-BMT1	<i>bmt1Δ</i>	As <i>bmt1Δ</i> but <i>RPS10/rps1Δ::Clp10-BMT1</i>	(Mille <i>et al.</i> , 2008a)
<i>bmt2Δ</i> + Clp10	BWP17	<i>bmt2Δ::ARG4/bmt2Δ::HIS1, RPS10/rps1Δ::Clp10</i>	(Mille <i>et al.</i> , 2008a)
<i>bmt3Δ</i> + Clp10	BWP17	<i>bmt3Δ::ARG4/bmt3Δ::HIS1, RPS10/rps1Δ::Clp10</i>	(Mille <i>et al.</i> , 2008a)
<i>bmt3Δ</i> + Clp10-BMT3	<i>Bmt3Δ</i>	As <i>bmt3Δ</i> but <i>RPS10/rps1Δ::Clp10-BMT3</i>	(Mille <i>et al.</i> , 2008a)
<i>bmt4Δ</i> + Clp10	BWP17	<i>bmt4Δ::ARG4/bmt4Δ::HIS1, RPS10/rps1Δ::Clp10</i>	(Mille <i>et al.</i> , 2012)
<i>bmt5Δ</i> + Clp10	BWP17	<i>bmt5Δ::ARG4/bmt5Δ::HIS1, RPS10/rps1Δ::Clp10</i>	(Mille <i>et al.</i> , 2012)
<i>bmt6Δ</i> + Clp10	BWP17	<i>bmt6Δ::ARG4/bmt6Δ::HIS1, RPS10/rps1Δ::Clp10</i>	(Mille <i>et al.</i> , 2008a)
<i>bmt7Δ</i> + Clp10	BWP17	<i>bmt7Δ::ARG4/bmt7Δ::HIS1, RPS10/rps1Δ::Clp10</i>	(Mille <i>et al.</i> , 2008a)
<i>bmt8Δ</i> + Clp10	BWP17	<i>bmt8Δ::ARG4/bmt8Δ::HIS1, RPS10/rps1Δ::Clp10</i>	(Mille <i>et al.</i> , 2008a)
<i>bmt9Δ</i> + Clp10	BWP17	<i>bmt9Δ::ARG4/bmt9Δ::HIS1, RPS10/rps1Δ::Clp10</i>	(Mille <i>et al.</i> , 2008a)
CAI-4	CAF2-1	<i>ura3Δ::λimm434/ura3::λimm434</i>	(Fonzi and Irwin, 1993)
CAI-4+Clp10	CAI-4	<i>RPS10::rps10Clp10-URA3</i>	This study
<i>bmt1Δ</i>	CAI-4	As CAI-4 but <i>bmt1Δ::dpl200/bmt1Δ::dpl200</i>	This study
<i>bmt1Δ</i> +Clp10	<i>bmt1Δ</i>	As <i>bmt1Δ</i> but <i>bmt1Δ::dpl200/bmt1Δ::dpl200, RPS10/rps1Δ::Clp10</i>	This study
<i>bmt2Δ</i>	CAI-4	As CAI-4 but <i>bmt2Δ::dpl200/bmt2Δ::dpl200</i>	This study
<i>bmt2Δ</i> +Clp10	<i>bmt2Δ</i>	As <i>bmt2Δ</i> but <i>bmt2Δ::dpl200/bmt2Δ::dpl200, RPS10/rps1Δ::Clp10</i>	This study
<i>bmt2 Δ/bmt5Δ</i>	<i>bmt2Δ</i>	As CAI-4 but <i>bmt2Δ::dpl200/bmt2Δ::dpl200,bmt5Δ::dpl200/bmt5Δ::dpl200</i>	This study
<i>bmt1Δ/bmt2 Δ /bmt5Δ</i> +Clp10	<i>bmt2 Δ/bmt5Δ</i>	As CAI-4 but <i>bmt1Δ::dpl200/bmt1Δ::dpl200,bmt2Δ::dpl200/bmt2Δ::dpl200, bmt5Δ::dpl200/bmt5Δ::dpl200, RPS10/rps1Δ::Clp10</i>	This study
<i>bmt1Δ</i> +Clp10-BMT1	<i>bmt1Δ</i>	As <i>bmt1Δ</i> but <i>RPS10/rps1Δ::Clp10-BMT1</i>	This study
NGY112	NGY111	As CAI-4 but <i>mnt1-mnt2Δ::hisG/mnt1-mnt2Δ::hisG</i>	(Munro <i>et al.</i> , 2005)
<i>mnt1mnt2Δ</i> +Clp10	NGY112	As NGY112 but <i>RPS10/rps10Δ::Clp10</i>	(Munro <i>et al.</i> , 2005)
CAI-4+Clp10-6xHIS-HWP1	CAI-4	As CAI-4 but <i>HWP1/hwp1Δ::Clp10-6xHIS-HWP1</i>	This study
<i>bmt1Δ</i> +Clp10-6xHIS-HWP1	<i>bmt1Δ</i>	As <i>bmt1Δ</i> but <i>HWP1/hwp1Δ::Clp10-6xHIS-HWP1</i>	This study
<i>bmt2Δ</i> +Clp10-6xHIS-HWP1	<i>bmt2Δ</i>	As <i>bmt2Δ</i> but <i>HWP1/hwp1Δ::Clp10-6xHIS-HWP1</i>	This study
<i>mnt1Δ/mnt2Δ</i> +Clp10-6xHIS-HWP1	NGY112	As NGY112 but <i>HWP1/hwp1Δ::Clp10-6xHIS-HWP1</i>	This study

Table 3. *C. albicans* primers used in this study

Primers	Séquences
<i>BMT1</i> knockout Fwd	CTAAAAAGGTAAACGAACAATTATATCCCAAATAATTTCAATCATGTTTCATGATCATAAAGGTTCTTATATGATGAAAGTTT TCCAGTCACGACGTT
<i>BMT1</i> knockout Rev	TCTTTTTCAATTGTCCAAGATGAAATACCATTGGGGATAAATTAATTATAATGTTACATAAACCTTTATCTAAATACCATGTG GAATTGTGAGCGGATA
<i>BMT2</i> knockout Fwd	CCTTCAGCCCTGTTTGAAAAGGTACAAAATAGGCACAAAAGTTAACTTTACTACTTGCCTTTGCTTACTTTTGGCATT CCCAGTCACGACGTT
<i>BMT2</i> knockout Rev	TAAACCATAATCATTCAATTCTAATAATTCAGTTTTGGATCATCAAATAGTATTGACTTTAATAATCCTTTGATATGATGTGG AATTGTGAGCGGATA
<i>BMT5</i> knockout Fwd	GCAGTACCGATTTGCCCAAAGTCAATATTCACATTTGTGTTTCTATGTTTTGTTGCAATAGTTGCATAATATCCACATCTTT CCCAGTCACGACGTT
<i>BMT5</i> knockout Rev	CTGTTTGTGCAATAAATATTCAGATAATATCGACTTTAGTATTCCTTCATGTGTATAATATCAACTGTAGAATCAGATGTG GAATTGTGAGCGGATA
probe <i>BMT1</i> Fwd	ATACAATCATTTAGTCATCAA
probe <i>BMT1</i> Rev	ATACTGGGATAGGGGCGATT
probe <i>BMT2</i> Fwd	GAGAAATGTGGCTGTGGTGA
probe <i>BMT2</i> Rev	TGTTTTTCGGGACCGTATGT
probe <i>BMT5</i> Fwd	GACTCGCCGTTATTGGACAT
probe <i>BMT5</i> Rev	ATTGGCACACCAAATCCAT
probe <i>URA3</i> Fwd	GCCTCACCAGTAGCACAACGATTA
probe <i>URA3</i> Rev	GCATTCCAACCAGCATCTCTATACC
probe <i>HWP1</i> Fwd	CAACTCCAGCTACTACTCCA
probe <i>HWP1</i> Rev	GTCATTTTCAGGAGCAGGAGC
probe <i>RPS1</i> Fwd	ATGGCTGTCGGTAAAAACAAG
probe <i>RPS1</i> Rev	AAAGCCAATAATGAACCCAAG
probe <i>ACT1</i> Fwd	ACCGAAGCTCCAATGAATCCA
probe <i>ACT1</i> Rev	GGATGGACCAGATTCGTCGTA
<i>HWP1-1</i>	CTCGAGTGTACGTAGCTTCTATAG
<i>HWP1-2</i>	TTCAAATGTAGAAATAGGAGC
<i>V5-HIS</i>	CTCGAGTGCAGGGCCGACGCTTGC

Fig.1

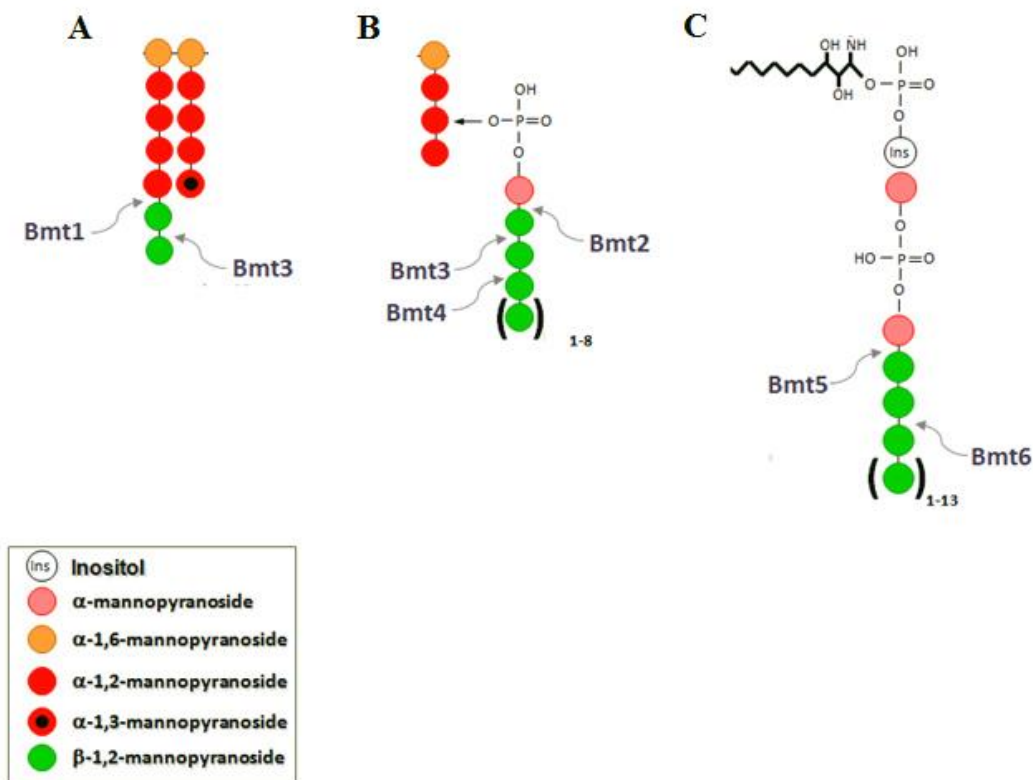


Figure 1: Schematic representation of Bmt1–6 activities on *C. albicans* cell-wall glycoconjugates. (A) β -Mans, expressed at the non-reducing end of α -1,2 Mans from PPM N-glycans, are biosynthesized by Bmt1 and Bmt3. (B) Bmt2, Bmt3 and Bmt4 sequentially add β -mannose on PPM N-glycan phosphomannose linked to α -1,2 Mans. (C) PLM β -1,2 mannosylation involves Bmt5 and Bmt6, which transfer β -mannose on the inositol phosphate added to mannose-inositol-phosphoceramide.

The arrows indicate where the enzymes act and which β -mannose is added.

Fig.2

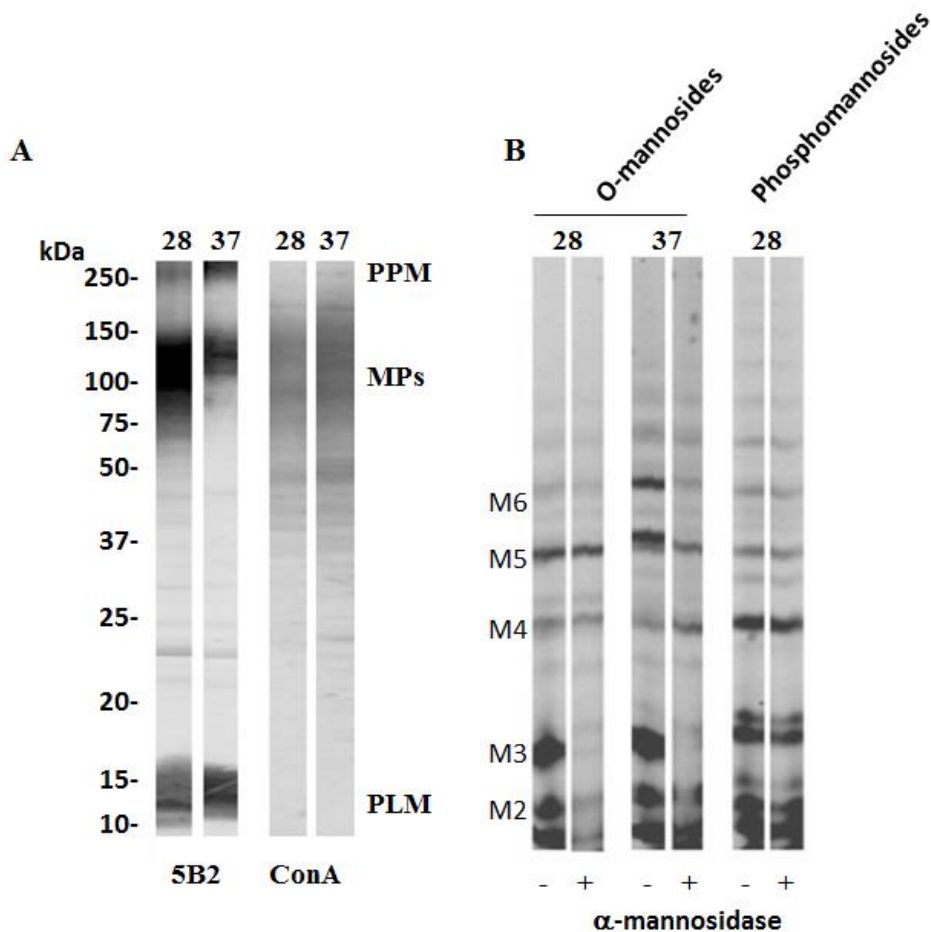


Figure 2: Analysis of β -1,2 mannosylation and *O*-mannosylation of *C. albicans* glycoconjugates. (A) Western blots of whole-cell extracts from SC5314 strain grown at 28°C (28) and 37°C (37) were stained with anti- β -1,2 oligomannosides monoclonal antibody 5B2 and lectin ConA, specific for terminal α -mannoside. PPM, CWMPs and PLM are indicated. (B) *O*-mannosides and phosphomannosides released by β -elimination and mild acid hydrolysis, respectively, from whole cells of strain SC5314 grown at 28°C (28) and 37°C (37) were analyzed by FACE. Prior to the electrophoresis, α -mannosidase treatment was performed or not to remove terminal α -1,2; α -1,3 and α -1,6 mannosyl residues. Different carbohydrate standards were used to evaluate the monomer number in the oligomannoside chains: M2, purified β -mannobiose; M3, purified β -mannotriose; M4, purified β -mannotetraose; M5, purified β -mannopentaose and M6, purified β -mannohexaose.

Fig.3

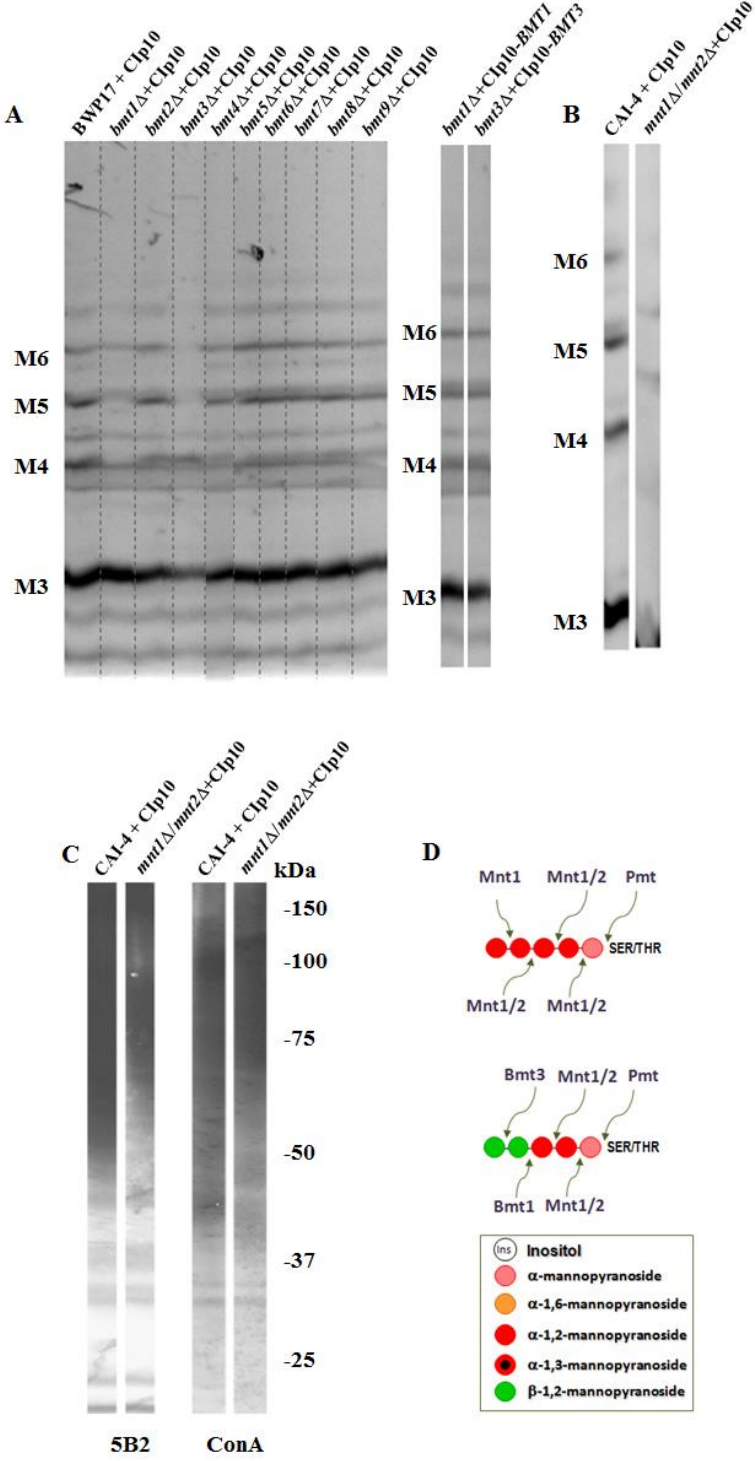


Figure 3: Analysis of *O*-mannosides from *bmts* Δ and *mnt1* Δ /*mnt2* Δ mutants and β -1,2 mannosylation of *mnt1* Δ /*mnt2* Δ mutant mannoproteins. (A-B) *O*-mannosides from mutants lacking 1 of the 9 *Bmts*, mutants lacking two enzymes involved in cell wall *O*-mannosylation, *Mnt1* and *Mnt2*, and their respective reference strain, BWP17 and CAI-4, respectively, were analyzed by FACE. All the strains were grown at 28°C before their *O*-mannosides were released by β -elimination treatment.

Different carbohydrate standards were used to evaluate the monomer number in the oligomannoside chains: M2, purified β -mannobiose; M3, purified β -mannotriose; M4, purified β -mannotetraose; M5, purified β -mannopentaose and M6, purified β -mannohexaose. (C) Western blots of mannoproteins from CAI-4 strain and *mnt1* Δ /*mnt2* Δ mutant grown at 28°C were stained with anti- β -1,2 oligomannosides monoclonal antibody 5B2 and lectin ConA, specific for terminal α -mannoside. (D) Detailed structure and biosynthetic pathway of the two *O*-mannopentamers: the mannopentaose previously described [Top panel, (Díaz-Jiménez *et al.*, 2012; Munro *et al.*, 2005)] and the mannopentaose partly biosynthesized by *Bmt1* and *Bmt3* as deduced from this study (Bottom panel). The arrows indicate where the enzymes act and which β -mannose is added.

Fig.4

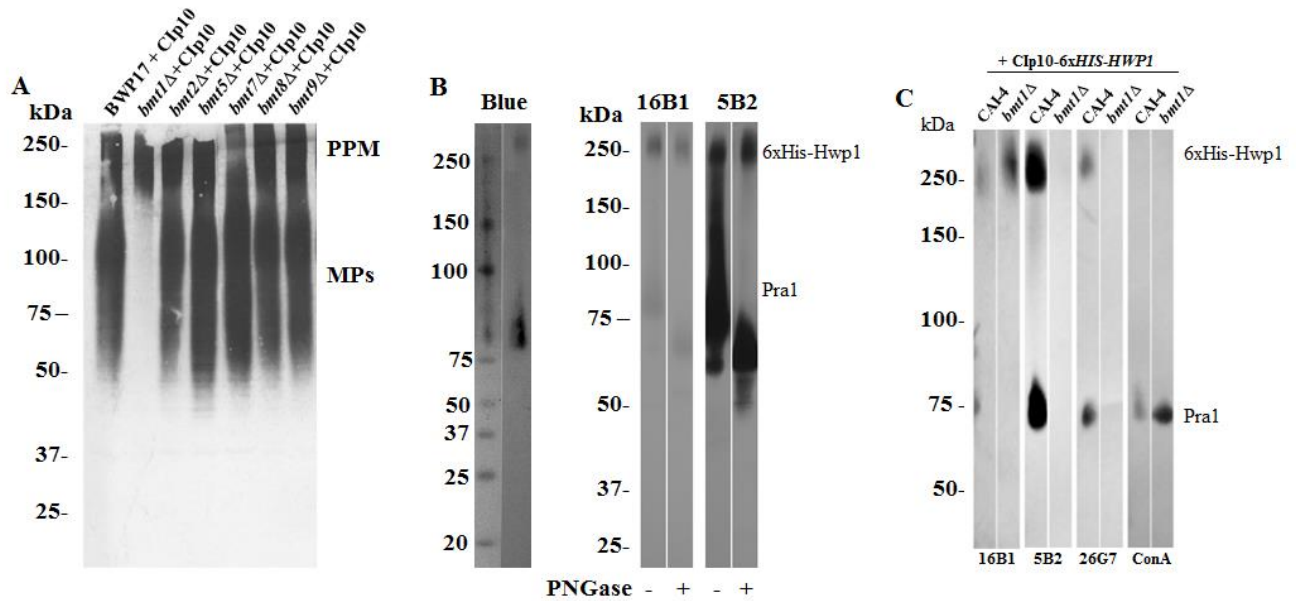


Figure 4: Mapping of β -1,2 oligomannosides epitopes on yeast and hyphal mannoproteins. (A) Western blots of whole-cell extracts from different strains grown at 28°C were stained with anti- β -1,2 oligomannosides monoclonal antibody 5B2. PPM and CWMPs are indicated. (B) Six His-tagged recombinant Hwp1 (6xHis-Hwp1) was produced and secreted in the culture supernatant by CAI-4 strain. Recombinant Hwp1 was purified on nickel column together with a zinc binding protein, Pra1, as seen after Coomassie blue staining of the SDS PAGE gel. The two purified hyphal mannoproteins were analyzed by western blot with monoclonal antibodies 16B1, specific for Hwp1; and 5B2. Prior to separation by SDS PAGE the proteins were treated or not with PNGase F. The two proteins are indicated. (C) 6xHis-Hwp1 and Pra1 were expressed by CAI-4 strain and *bmt1* Δ mutant, purified on nickel column and analyzed by western blot with monoclonal antibodies 16B1, 5B2 and 26G7, specific for β -Mans at the non-reducing end of PPM β -1,2 Mans (Fig. 2A) and ConA, lectin specific for terminal α -mannosides. The two proteins are indicated.

Fig.5

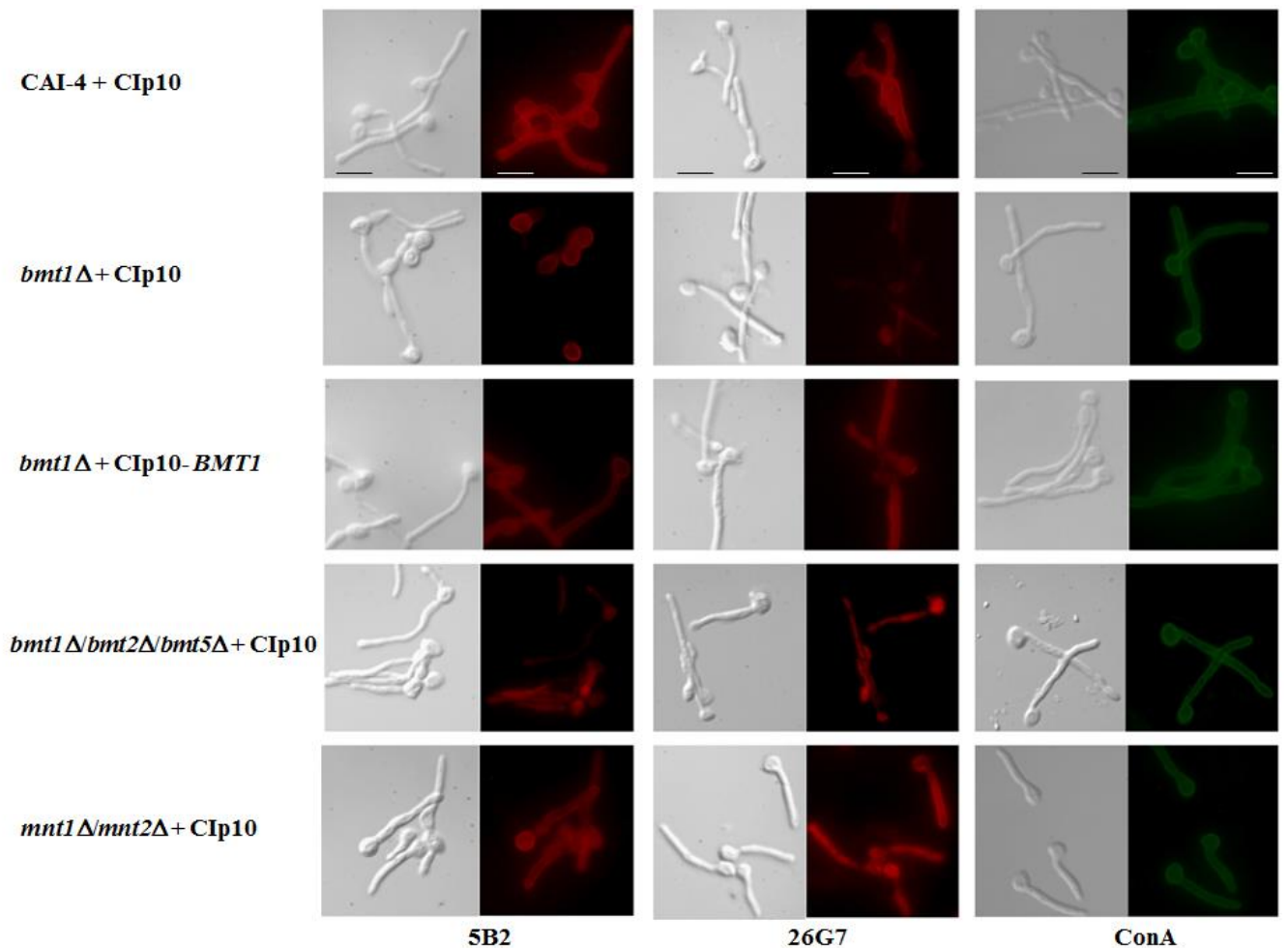


Figure 5: Mapping of β -1,2 oligomannoside epitopes expressed at the surface of hyphae. Indirect immunofluorescence assays were performed on hyphae from *bmt1*Δ + Cip10, *bmt1*Δ/*bmt2*Δ/*bmt5*Δ + Cip10 and *mnt1*Δ/*mnt2*Δ + Cip10 mutants, *bmt1*Δ + Cip10-*BMT1* re-integrand and their reference strain, CAI-4 + Cip10, using anti- β -1,2 oligomannosides monoclonal antibodies 5B2 and 26G7, and lectin ConA. Evan's blue was used as counterstain to decrease the nonspecific background fluorescence and to visualize non stained cells, which display then red fluorescence in their cytoplasm (*bmt1*Δ/*bmt2*Δ/*bmt5*Δ + Cip10 mutant, 5B2 and 26G7 mAbs; *bmt1*Δ + Cip10 mutant, 26G7 mAb). For each strain, a micrograph of phase contrast and a fluorescence micrograph with the mentioned antibody or lectin are shown.

Scale bars = 10 μ m

Fig.6

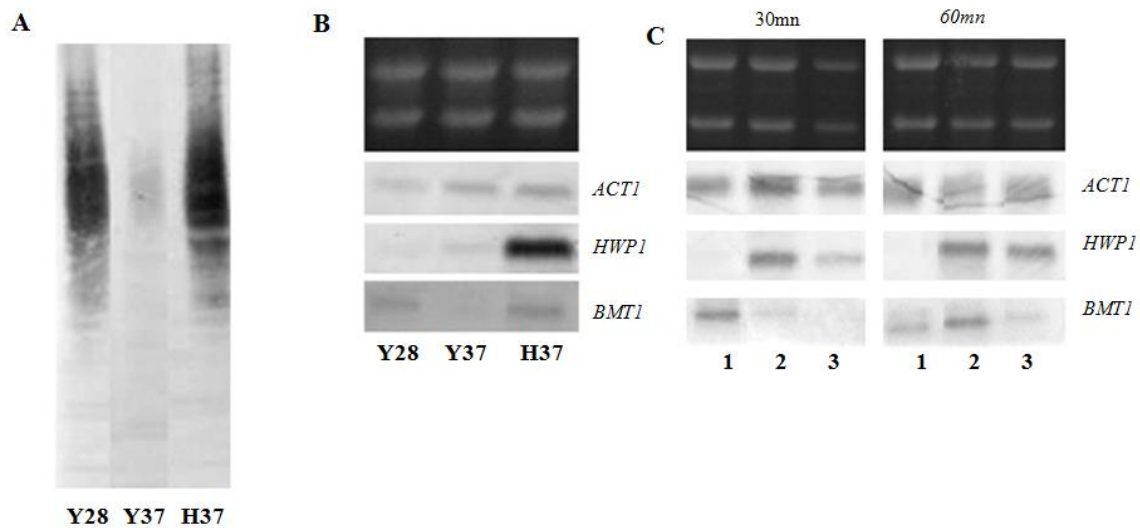


Figure 6: β -1,2 mannosylation of yeast and hyphal mannoproteins: mapping of Bmt1 specific β -1,2 oligomannoside epitopes and analysis of *BMT1* expression. (A-B) Glycoconjugates (A) and RNA (B) from whole SC5314 yeast (Y) and hyphal (H) cells grown 3 h at 28°C (28) or 37°C (37) in YPD (Y) or RPMI (H) were analyzed by western blotting and northern blotting, respectively. Western blots were stained with anti-Bmt1 specific β -Mans mAb 26G7. Northern blots were probed with DIG-labeled *BMT1* but also *ACT1* and *HWP1* to confirm the approximately equal amount (5 μ g) of RNA loaded and the expression of hyphae specific genes, respectively. (C) Approximately equal amounts of total RNA (5 μ g) from SC5314 cells incubated 30 and 60 min in YPD (1), human plasma (2) or human plasma containing neutrophils (3) were analyzed by northern blotting with DIG-labeled *BMT1* but also *ACT1* and *HWP1* probes.

Fig.7

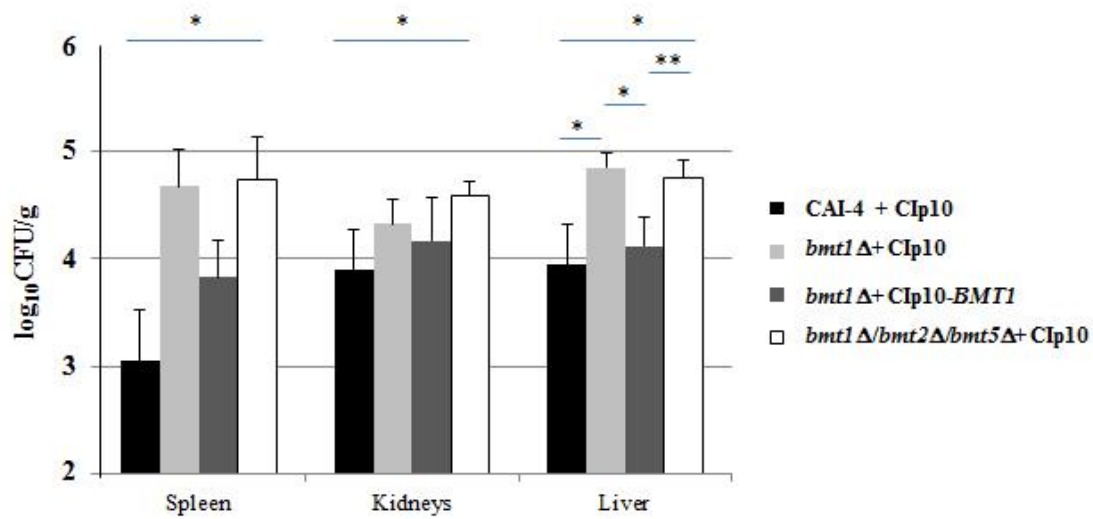


Figure 7: Fungal burdens of different *C. albicans* strains in the spleen, kidneys and liver of BALB/c mice, 3 days post intraperitoneal infection. Mice received intraperitoneal injection of 5×10^7 CAI-4 + Cip10, *bmt1*Δ+ Cip10, *bmt1*Δ+ CIP10-BMT1 and *bmt1*Δ/*bmt2*Δ/*bmt5*Δ + Cip10 cells.

The results shown are from three independent experiments. *, P<0.05; **, P<0.01.

Fig.8

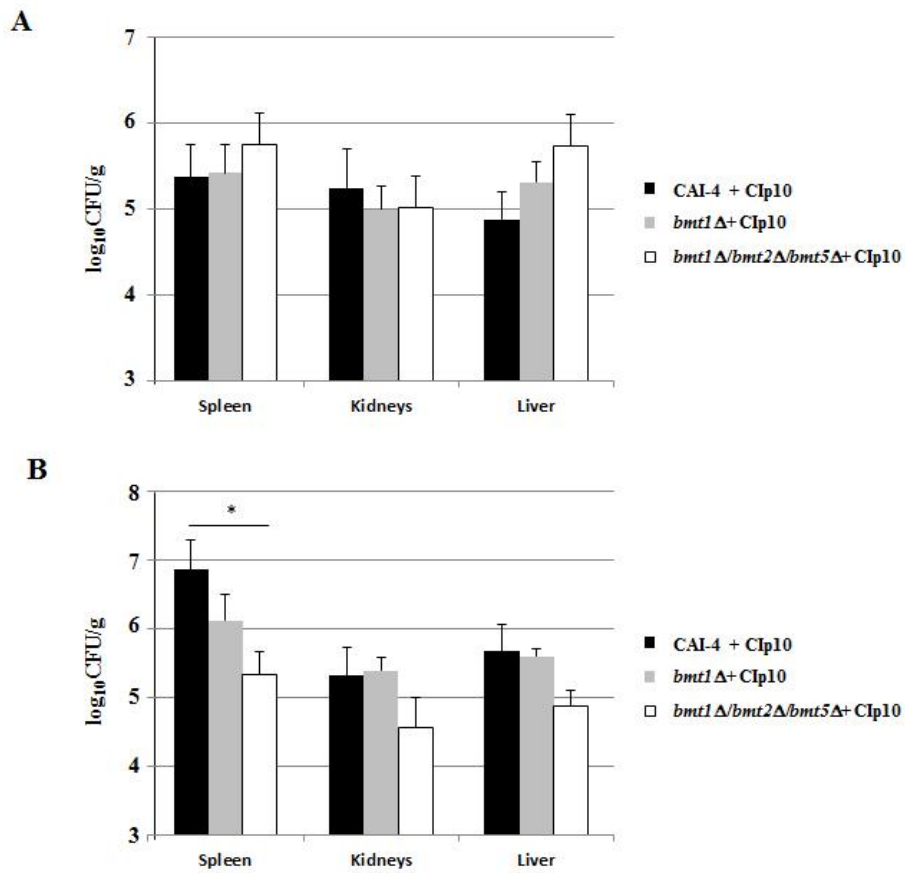


Figure 8: Fungal burdens of different *C. albicans* strains in the spleen, kidney and liver of C57BL/6 (A) and Gal3^{-/-} (B) mice, 3 days post intraperitoneal infection. Mice received intraperitoneal injection of 5x10⁷ CAI-4 + CIp10, *bmt1*Δ + CIp10 and *bmt1*Δ/*bmt2*Δ/*bmt5*Δ + CIp10 cells.

The results shown are from three independent experiments. *, P<0.05.

II- L'activité de Bmt1 conditionne le sérotype A ou B de *C. albicans* et module la colonisation digestive

Les souches de *C. albicans* ont été longtemps classées en deux sérotypes: A et B. Leur distribution varie selon le pays, le fond génétique et le contexte infectieux de l'hôte. Ces aspects épidémiologiques n'ont pas pu être liés à une molécule stable puisque son expression est régulée en fonction des conditions de croissance. La différenciation des deux sérotypes se fait par l'analyse de la présence (sérotype A) ou de l'absence (sérotype B) des β -Mans au niveau de la fraction acide stable du PPM. La biosynthèse de ces β -Mans fait intervenir trois Bmts: Bmt1, Bmt3 et Bmt4 ajoutant respectivement le 1^{er}, le 2nd et le 3^{ème} β -mannose. Comme Bmt3 et Bmt4 permettent également la biosynthèse du phosphomannoside du PPM qui est présent chez les souches de sérotype B, nous avons déterminé si i) une perte d'activité de Bmt1 chez certaines souches est responsable de l'apparition du sérotype B et ii) l'impact de cette perte d'activité sur la colonisation digestive des souches de sérotype B par rapport aux souches de sérotype A. Des analyses électrophorétiques des *O*-mannosides et phosphomannosides de souches de sérotype A et B ainsi que des analyses immunochimiques des conjugués de ces souches ont montré: i) comme attendu, un degré de polymérisation identique des phosphomannosides du PPM des deux sérotypes, ii) une absence d'*O*-mannosides β -mannosylés chez les souches de sérotype B, iii) une absence d'épitopes β -Mans chez les souches de sérotype B et iv) qu'aucun β -Mans n'est présent à la surface des tubes germinatifs chez les souches de sérotype B. Ces différents phénotypes sont similaires à ceux obtenus avec le mutant *bmt1* Δ . Nous avons analysé si le gène *BMT1* est présent chez les souches de sérotype B. Par PCR et analyse en northern blot, nous avons montré que *BMT1* est présent et autant exprimé par les souches de sérotype B qu'une souche de sérotype A exprimant faiblement les β -Mans spécifiques du sérotype A. Après séquençage de *BMT1* (promoteur + ORF) de quatre souches de sérotype B, nous avons donc décelé une délétion de 19 bases en début d'ORF de ce gène. Cela induit un décalage du cadre de lecture avec l'apparition précoce d'un codon stop aboutissant certainement à la synthèse d'une enzyme tronquée et donc inactive. Nous avons montré par PCR que les deux allèles du gène portent cette délétion. En introduisant une copie du gène *BMT1* d'une souche de sérotype A dans le génome d'une souche de sérotype B, nous avons converti cette souche de sérotype B en sérotype A avec les différents phénotypes associés au sérotype A. Nous avons analysé cette souche, sa souche parentale (sérotype B), le mutant *bmt1* Δ et sa souche parentale (sérotype A)

dans un modèle de colonisation digestive induite par antibiothérapie et nous avons observé que les souches sans activité Bmt1 colonisent plus le tube digestif. Ces résultats montrent le bénéfice d'un sérotype par rapport à un autre en termes de colonisation et suggèreraient un possible mécanisme d'adaptation de ce sérotype à un environnement spécifique. Ces résultats sont d'autant plus intéressants que la séquence mutée est précédée par 14 bases identiques aux dernières bases de cette mutation, suggérant une possible recombinaison à l'origine de la conversion des souches de sérotype A en sérotype B. Au cours de cette thèse nous avons montré que les β -Mans, dont la synthèse est initiée par Bmt1, permettent à l'hôte d'éliminer *C. albicans* (partie « I-Les β -1,2 mannosyltransférases 1 et 3 participent à la *O*- et *N*-mannosylation des formes levures et mycéliennes et modifie le pouvoir pathogène de *Candida albicans* »). Il semble que la perte de ces β -Mans soit un avantage pour la levure et qu'une pression - encore inconnue et à déterminer - induirait la recombinaison au niveau de *BMT1* pour inactiver l'enzyme codée par ce gène. *BMT1* ainsi que les β -Mans spécifiques de Bmt1 sont d'ailleurs plus exprimés à 28°C qu'à température physiologique et plus exprimés à pH6 qu'à pH acide, proche de celui de l'estomac, très colonisé par les souches de sérotype B. Différentes pistes doivent être examinées afin de déterminer la pression permettant la recombinaison au niveau du gène *BMT1* : i) étude de l'influence du milieu environnemental (œsophage et estomac) et ii) étude de l'influence de la Gal-3 (seule ou en présence de phagocytes).

β -1,2 mannosyltransferase 1 activity discriminates between serotypes A and B of *Candida albicans* strains and moderates gut colonization

Flavie Courjol¹, Jackeline Paredes Choque¹, Céline Mille¹, Aurore Sarazin¹, Laure Marceau², Boualem sendid, Maria Dolores Moragues, Thierry Jouault¹, Daniel Poulain¹ and Chantal Fradin¹

¹ Regulation of the Host-Candida glycan interface, Inserm U995-Université Lille 2, 1 place de Verdun, Lille 59045, France

² Pôle de Biologie Pathologie Génétique du CHU de Lille, Bd du Professeur J. Leclercq 59 037 Lille, France

³Departamento de Enfermería I, Universidad del País Vasco, Bilbao, Vizcaya, Spain

Summary

Candida albicans strains were previously grouped in two serotypes: A and B depending on the presence of terminal β -1,2-linked mannose residues (β -Mans) in the acid-stable fraction of serotype A phosphopeptidomannan (PPM). These β -Mans are transferred to PPM by β -1,2 mannosyltransferases (Bmts) 1 and 3, which also participate in mannoproteins (MPs) O-linked mannosylation. In a recent study, we have shown that these β -Mans alter *C. albicans* fitness during infection. The distribution of *C. albicans* serotypes varies according to country and human host genetic and infectious backgrounds. However, no epidemiological trait has been related to virulence attributes for these two serotypes. In this study, we analyzed which defect(s) induce(s) absence of β -Mans in the PPM acid stable fraction of serotype B strains and its impact on *C. albicans* colonization. Serotype B strains displayed β -1,2 mannosylation patterns on their MPs and at their cell surface similar to the *bmt1* Δ mutant from a serotype A parental strain. These data indicated that serotype B strains certainly lack Bmt1 activity. Serotype B strains have Bmt1 encoding gene in their genome but with 19 bases missing in the 5' end of its ORF. This deletion induces a frameshift with a STOP codon appearing early, which certainly leads to the synthesis of a truncated enzyme. Serotype B strain transformed with serotype A *BMT1* gene recover Bmt1 activity as it could express β -Mans in its PPM acid stable fraction and MPs. This strain has a reduced ability to colonize murine gastrointestinal tract than its parental strain. *BMT1* polymorphism determines *C. albicans* strain serotypes and their ability to colonize the gut.

Introduction

Several epidemiological studies have analyzed the relation between *Candida albicans* strains distribution and different attributes such as antifungal resistance and pathogenicity. DNA fingerprinting and Multi Locus Sequence Typing (MLST) methods have been widely used to group strains together in clades (Odds *et al.*, 2007; Soll and Pujol, 2003). According to the studies, different number of clades have been assigned and could be associated to geographical location, antifungal resistance and polymorphism of genes such as the ones coding for Als adhesins that are essential for adherence to host cells (Dodgson *et al.*, 2004; Hope *et al.*, 2004; Sheppard *et al.*, 2004; Tavanti *et al.*, 2005). None of these studies have nevertheless demonstrated a link between specific clades and strains virulence. Before molecular biology tools were sufficiently developed, *C. albicans* strains were divided in two antigenic groups upon the agglutinating properties of a rabbit antiserum to the strains (hasenclever and mitchell, 1961). The strains that were agglutinated have been designated as serotype A whereas the others were serotype B. The distribution of *C. albicans* serotypes varies according to country and human host genetic and infectious backgrounds (Brawner *et al.*, 1992; Drouhet *et al.*, 1975; Miyakawa *et al.*, 1992; Odds, 1988; Stiller *et al.*, 1982). However, these epidemiological traits have not yet been related to a phenotypically stable molecule as cell surface expression of the serotype A antigen depends on the growth conditions (Kobayashi *et al.*, 1991; Kobayashi *et al.*, 1994; Okawa *et al.*, 1994). Some studies have reported that serotype A strains are more adherent on buccal epithelial cells (Miyakawa *et al.*, 1992) whereas serotype B strains are more resistant to 5-fluorocytosine (5-FC) (Auger *et al.*, 1979; Drouhet *et al.*, 1975; Stiller *et al.*, 1982) and they are predominantly isolated from HIV/AIDS patients with oro-pharyngeal candidiasis (Brawner *et al.*, 1992; Torres-Rodríguez *et al.*, 1991).

NMR studies from Suzuki's laboratory have evidenced the antigen, present in the cell wall outer layer phosphopeptidomannan (PPM), which is recognized by the rabbit antiserum (Suzuki and Fukazawa, 1982; Suzuki, 1995). This antigen corresponds to β -1,2 linked mannose residues (β -Mans) at the non-reducing end of PPM α -1,2 mannosides (Fig. 1). Serotype B strains have not a global defect of PPM β -1,2 mannosylation as they still harbor β -Mans on their PPM phosphomannosides (Singleton *et al.*, 2005; Suzuki *et al.*, 1995). Different hypothesis have been uttered to understand the lack of serotype A antigen on serotype B PPM. Some of those have evidenced possible distinct regulatory mechanisms between the two serotypes. Kobayashi *et al* have shown that serotype A strains behave as

serotype B when grown at pH2 since they do not express their specific antigen (Kobayashi *et al.*, 1991). At 37°C, overall expression of β -Mans epitopes on PPM is reduced for the two serotypes (Trinel *et al.*, 2002). Poulain *et al.* showed in 1983 that serotype B yeast cells and germ tubes expressed serotype A antigen in rabbit infected tissues and germ tubes also expressed it *in vitro* (Poulain *et al.*, 1983). Similar observations were made by Ponton and coworkers (Ponton and Jones, 1986). Suzuki *et al.* have speculated that the lack of β -Mans in the acid stable fraction of serotype B strains could be the result of a mutational event affecting one of the enzymes responsible for β -mannose addition (Suzuki *et al.*, 1995).

We have previously characterized β -1,2 mannosyltransferases (Bmts) responsible for PPM β -mannosylation (Mille *et al.*, 2008). Biosynthesis of serotype A antigen on *C. albicans* is initiated by Bmt1 and Bmt3 and Bmt 4 add respectively the second and third β -mannose (Mille *et al.*, 2008). We have reported in a recent study that Bmt1 and Bmt3 also participate in *O*-linked mannosylation, they are responsible of surface expression of β -Mans on germ tubes and they alter *C. albicans* fitness during infection (Courjol *et al.*, submitted). Here we demonstrate that serotype B strains display a lack of Bmt1 activity with its associated phenotypes. These strains have a mutation in their *BMT1* gene responsible for the production of an inactive enzyme. Bmt1 activity could be restored in a serotype B strain after transformation with serotype A *BMT1* gene. The resulting strain colonized less mice gastrointestinal tract than its parental strain, suggesting that Bmt1 alters gut colonization.

Experimental procedures

Fungal strains, preculture and growth conditions

All strains used in this study are listed in Table 1. Pre-cultured cells were obtained by growing yeast cells overnight at 37°C in YPD broth (1% yeast extract, 2% Bactopeptone, 2% glucose) with continuous shaking at 150 rpm. The cells were washed twice and resuspended in 0.1 M phosphate-buffered (PBS).

For yeast cells, cells were inoculated into YPD broth at a density of 10^6 cells ml⁻¹ and grown at 28°C or 37°C with continuous shaking at 150 rpm until the optical density at 600 nm of the culture was 1.0 (approximately 2×10^7 cells ml⁻¹). Hyphae were obtained after inoculation of RPMI medium (Invitrogen) with cells at a density of 5×10^6 cells ml⁻¹ and incubation 3h at 37°C with continuous shaking at 150 rpm. Cells were monitored microscopically to ensure that they had the expected morphologies.

Lectin and monoclonal antibodies

Biotinylated concanavalin A (Con A) specific for terminal α -D-mannosyl and α -D-glucosyl residues was purchased from Sigma. MAbs 5B2 and 26G7 (rat-mouse immunoglobulin M [IgM] and mouse IgM, respectively) are specific for β -Mans (Elguezabal *et al.*, 2009; Elguezabal *et al.*, 2004; Trinel *et al.*, 1992). MAb 5B2 recognizes β -Mans with a manno-1,2-mannobiose as minimal epitope while mAb 26G7 is specific for β -Mans at the non-reducing ends of α -1,2-Mans from *N*-glycans.

Whole-cell protein extraction and western analysis

Cells were washed twice with 50 mM Tris buffer (pH 8.0). Cells were suspended in lysis buffer (50 mM Tris [pH 8.0], 10 mM EDTA, protease inhibitors [protease inhibitor cocktail setIV; Calbiochem]), lysed and homogenized by vortexing with acid-washed glass beads (0.5 mm; Sigma) for 30 min at 4°C. Lysates were then incubated 15 min at 100°C to solubilized PPM and chilled 5min on ice. Loading buffer was added to equal amount of each sample in order to have the following final concentrations: 2% SDS, 50mM Tris pH 6.8, 10% glycerol and 2% β -mercaptoethanol. Samples were boiled 5 min and centrifuged 5 min at 10000g. Supernatants were analyzed by SDS–polyacrylamide gel electrophoresis [PAGE; (Laemmli, 1970)] on 5–20% acrylamide gel slabs. Membranes were probed, as previously described (Fradin *et al.*, 2008), with mAbs 5B2 diluted 1:2000 and 26G7 diluted 1:1000 and then incubated with a 1:2000 dilution of alkaline phosphatase-conjugated anti-rat IgM or

anti- mouse IgM, respectively. Enzyme activity was detected with nitroblue tetrazolium and 5- bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (Promega) diluted in 0.1 M Tris (pH 9.5), 0.15 M NaCl, 5 mM MgCl₂.

For lectin staining, membranes were incubated with biotinylated ConA diluted 1:1000 and then incubated with HRP-labeled Streptavidin (AbCam). Peroxidase activity was detected with diaminobenzidine (SIGMAFAST DAB; Sigma).

Whole cell hydrolysis

Cells were washed three times with milliQ water and suspended in 1 ml of 10 mM HCl for acid hydrolysis in a boiling-water bath for 1 h with occasional shaking. After cooling, pH was neutralized with NaOH and the supernatants containing phosphomannosides were harvested by centrifugation at 12000 g for 15 min. Remaining cells were washed three times with milliQ water and suspended in 1ml of 100 mM NaOH for β -elimination at room temperature for 16h with continuous shaking. After pH neutralization with HCl, supernatants containing O-mannosides were harvested by centrifugation at 12000 g for 15 min. Both supernatants were filtered through 0.22 μ m PVDF filter (Millipore) and stored at -20°C until use.

FACE analyses of released phosphomannosides and O-mannosides

Hydrolysates were dried in a vacuum concentrator and tagged with 0.15 M 8-amino-naphthalene-1,3,6-trisulfonate (ANTS, Sigma) and 1 M sodium cyanoborohydride for 16 h at 37°C (Goins and Cutler, 2000). After drying with a vacuum concentrator, the samples were suspended in glycerol/water (1/4). Electrophoresis of ANTS-labeled oligomannosides was performed on 25-30% acrylamide separating gels. Acid-hydrolyzed dextran and oligomannosides from PPM phosphomannosides that were separated by gel filtration chromatography were also tagged with ANTS and used as carbohydrate standards. Gels were dried and images were acquired with the Gel Doc 2000 image analysis apparatus from Biorad equipped with a 365 nm UV-transilluminator.

RNA isolation and Real-Time RT-PCR

Frozen cells were lysed and homogenized by vortexing in TriReagent (Sigma) with acid-washed glass beads (0.4–0.6 mm; Sigma) for 30 min. Total RNA was extracted and cDNA synthesis was performed as described previously (Felk *et al.*, 2002 2003, Stage-specific gene expression of *Candida albicans* in human blood). Relative quantification of transcripts was

then performed using Absolute Blue QPCR ROX Mix (Thermo Scientific) on a 7900HT Real-Time PCR system (Applied Biosystems). Primers and probes used are listed in table 2. Relative transcripts abundance was determined with the $2^{-\Delta\Delta C}$ method (Livak and Schmittgen, 2001) with RNA from SC5314 strain grown 9h at 37°C and *ACT1* abundance as an endogenous control.

Sequencing

A 3,9-kb DNA fragment containing *BMT1* ORF and 1000b of both its downstream and upstream flanking promoter (1000 bases upstream and downstream) was amplified from NIHB DNA by polymerase chain reaction (PCR) using the primers listed in table 2 (*BMT1* Fwd/*BMT1* Rev). Amplified fragment was then cloned in a pCR4-TOPO plasmid (Life Technologies). DNA is sequenced by the Sanger method using the BigDye terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystem). Different primers, listed in Table 2 (Seq-) were designed to sequence *BMT1* ORF and its promoter. Sequence analyses were performed with BioEdit Sequence Alignment Editor Software and compared to *BMT1* sequence of SC5314 available in the *Candida* genome database (<http://www.candidagenome.org/>). For other strains sequencing were realized with DNA fragments amplified by PCR using the primers listed in Table 2 (Seq-BMT1-3 Fwd/ BMT1 Rev).

Introduction of BMT1 in NIHB strain

Escherichia coli strains DH5 α were used for recombinant DNA work. pBM04 (Mille *et al.*, 2008) and pSFI1 (Wirsching *et al.*, 2000) vector, containing gene provided resistance against mycophenolic acid (MPA) to select wild type strain, were digested with SpeI. The fragment containing the sequence coding for MPA was released from the plasmid after digestion with SpeI, purified from agarose gel with Invisorb Spin DNA Extraction Kit (Invitek) and ligated with T4 DNA ligase (Invitrogen) into pBM04 plasmid digested by the same enzyme and dephosphorylated with Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIAP) (ROCHE). Transformants were selected on LB-Amp plates and presence of *MPA* was checked by PCR (Invitrogen) and enzyme restriction digestion. NIHB strain was transformed with StuI digested pBM04/pSFI1 vector. Correct integration of the plasmid was confirmed by Southern blot analysis with probes obtained (probe *BMT1* Fwd /probe *BMT1* Rev and probe *RPS1* Fwd/probe *RPS1* Rev) with primers listed in Table 2.

Flow Cytometry

Yeasts were washed with PBS-BSA2% at 4°C. After centrifugation, cells were incubated with 26G7 diluted 1:200 or ConA diluted 1:100 diluted in PBS-BSA2% buffer for 15 min at 4°C. After several washes, FITC-Streptavidin and RPE anti-mouse IgM secondary antibodies diluted at 1:100 in PBS-BSA2% buffer were added for 15 min at 4°C. Yeasts were washed twice with PBS-BSA2%, once with only PBS and fixed with paraformaldehyde 4% in PBS. Flow cytometry analyses were performed with Accuri C6 Flow Cytometer. Cells granulometry (FSC) and their size (SSC) were monitored on linear scale whereas green fluorescent intensity (FL1) and red (FL2) on logarithmic scale.

Animal experiments

All mouse experiments were performed according to protocols approved by the Minister of superior education and of the Research and in accordance with the European legal and institutional guidelines (2010/63/UE) for the care and use of laboratory animals. All animals had free access to food and water throughout the experiments. The virulence of *C. albicans* CAI4+CIp10, *bmt1Δ*+CIp10 and *bmt1Δ*-*BMT1*, NIHB792-MPA, NIHB792(A)-MPA strains were tested in the murine models of gut colonization described by Bendel and coworkers (Bendel *et al.*, 2003). Eight week old female BALB/c mice were used. Five mice were used by strains and the results shown are from three independent experiments. All mice were maintained by Charles River Laboratories (France). Three days before oral inoculation with *C. albicans* and for the duration of the experiment mice were treated with antibiotics in their drinking water (1mg/mL bacitracin, 2mg/mL streptomycin, 0.1mg/mL gentamicin (Sigma chemical Co.)) to facilitate intestinal colonization. Strains were grown on YPD at 30°C for 16h, washed twice and then suspended at a density of 10⁸ yeast/mL, in sterilized water. 100μl of each suspension was orally given to the mice by gavage. For each mouse, one faeces is taken daily (until mice sacrifice) for quantitative determination of *C. albicans* CFU. The fifth day after inoculation, mice were sacrificed and stomach, intestine, caecum and colon were removed to determinate CFU/g of organ. Fungal burdens were analyzed by the Kruskal-Wallis test followed by *post hoc* testing using the unpaired Mann-Whitney *U* test. Fractional data were analyzed by χ^2 with continuity correction. *P* values <0.05 were considered significant.

Results and discussion

Serotype B strains lack Bmt1 activity

In a previous study, our group have identified the Bmts responsible of β -Mans biosynthesis on *C. albicans* PPM. Bmt1, Bmt3 and less frequently Bmt4 add sequentially β -Mans on PPM acid stable fraction while Bmt2, Bmt3 and Bmt4 β -mannosylate the phosphomannose to form the PPM phosphomannosides (Fig.1). Serotype B strains lack β -Mans from PPM acid stable fraction (Fig. 2A) but as serotype A strains, they contain phosphomannosides in their PPM, suggesting that they have Bmt3 and Bmt4 activities (Singleton *et al.*, 2005). Furthermore, Suzuki *et al.* have detected a Bmt activity in serotype B strains that, from its function, certainly corresponds to Bmt3 activity (Suzuki *et al.*, 1995). It seems then that distinction between the two serotypes relies on Bmt1 activity. As we recently show that Bmt1 can also add β -mannose on MPs O-mannosides and is specific of β -Mans expression on germ tubes (Courjol *et al.*, submitted), we analyzed i) β -Mans epitope expression on MPs and ii) O-mannosides from serotype B strains.

Because β -1,2 mannosylation is regulated by the environment (Trinel *et al.*, 2002), yeast cells were grown at two different temperatures (28°C and 37°C) which are known to regulate β -1,2 mannosylation. Western blotting using mAbs 5B2 (reacting with β -1,2 linked manno- β -glucose as a minimal epitope) and 26G7, specific for serotype A specific β -Mans, revealed as expected that serotype B strains (NIHB-792 and LGH10195) express PPM β -Mans but not serotype A specific ones and their PLM have a lower molecular weight than those of serotype A strains (SC5314 and VW32) (Fig.2A). PPM from serotype A specific β -Mans, were more expressed when cells were grown at 28°C. SC5314 strain expressed more these β -Mans than VW32 strain. There is an expression polymorphism of these β -Mans among serotype A strains. Whatever the temperature of growth, serotype B strains display no β -Mans epitopes on their MPs that are more stained by ConA, lectin specific for terminal α -D mannosyl/glucosyl, certainly more exposed in serotype B strains. A standard β -elimination protocol (Shibata *et al.*, 1985) was applied to release O-mannosides from whole *C. albicans* yeast cells (Munro *et al.*, 2005; Singleton *et al.*, 2005; Bates *et al.*, 2006). Mild acid hydrolysis was performed before whole cells underwent β -elimination treatment to prevent contamination of the O-mannosides fraction with phosphomannosides (Kobayashi *et al.*, 1990). These mannosides were then analyzed by fluorophore assisted carbohydrate electrophoresis (FACE) which separates oligosaccharides according to their degree of polymerization (DP), but also to the

type of saccharide (e.g. glucose vs. mannose) and to some extent to their glycosidic linkage (e.g. α -1,4 vs. α -1,6 glucans) (Goins and Cutler, 2000). In our previous study we could differentiate Man₅ homopolymer (α -1,2 mannosides) from Man₅ heteropolymer (α -1,2 mannosides with terminal β -Mans) (Fig.1D). To differentiate between α - and β - mannosyl residues linked to the non-reducing end of *O*-mannosides, released oligosaccharides were incubated with α -mannosidase from *Canavalia ensiformis* (Jack Bean), which is specific for α (1 \rightarrow 2,3,6) linked terminal α -mannosyl residues, prior to electrophoresis. Serotype A (SC5314) and serotype B (NIHB-792) strains display similar *O*-mannosides upon temperature of growth with higher DP at 37°C. However, all NIHB-792 *O*-mannosides were digested by α -mannosidase whereas SC5314 *O*-mannosides are more heterogenous with two α -mannosidase resistant *O*-mannosides: Man₄ and Man₅, which are more expressed at 28°C. NIHB-792 strain have strong phenotype similarities with *bmt1* Δ mutant (Courjol *et al.*, submitted) with respect to PPM and MPs β -1,2 mannosylation. This serotype B strain could be a natural *bmt1* Δ mutant if its PLM, like the one of most serotype B strains, wouldn't display β -Mans with lower DPs.

Regulation of BMT1 expression is not sufficient to explain lack of Bmt1 activity in serotype B background

PCR analysis of serotype B strains with specific *BMT1* primers confirmed the presence of this gene in serotype B strains genome. Different studies have suggested that regulatory mechanisms could be responsible for no or rather low and then undetectable expression of serotype A specific antigen by serotype B strains (Ponton and Jones, 1986; Poulain *et al.*, 1983). These reports showed that serotype B strains display in some specific conditions (preferentially *in vivo* and on germ tubes) this antigen on their surface. We investigated then if *BMT1* gene is differently regulated between *C. albicans* serotypes. Real-time RT-PCR assays were performed to relatively quantified *BMT1* expression by SC5314 and NIHB-792 strains in growth conditions known to modulate β -1,2 mannosylation of serotype A specific antigen. We then grew these strains at 28°C and 37°C for 3h and 9h. Results obtained showed that, as for SC5314, NIHB-792 had more *BMT1* transcript when grown at 28°C (Fig.3). Relative level of *BMT1* was reduced in NIHB-792 compared to SC5314 while expression of *BMT2*, used as a control, was almost identical for the two strains. More strikingly, *BMT1* level was almost identical for the two strains grown at 37°C after either 3h or 9h of culture, condition in which SC5314 expresses serotype A specific antigen and NIHB-792 not (Fig.2A). This observation

in addition to the regulation of *BMT1* gene by NIHB-792 in a similar way than SC5314 strain, strongly suggest that differential *BMT1* regulation is not sufficient to explain why serotype B strains do not express serotype A specific antigen. Suzuki *et al.* have uttered the hypothesis that lack of β -Mans in the PPM acid stable fraction serotype B strains could be the result of a mutational event affecting one of the enzymes responsible for β -mannose addition (Suzuki *et al.*, 1995). This hypothesis seems rather reasonable from the following observations: i) serotype B strains lack Bmt1 activity even if they express gene coding for this enzyme, ii) serotype A and B strains expressed the same relative level of *BMT1* transcripts in some conditions (growth at 37°C) but only serotype A strain has detectable amount of β -Mans whose synthesis is initiated by Bmt1. Post transcriptional regulation could affect Bmt1 activity in serotype B strains but we could then wonder why Bmt3 and Bmt4 that have the same activity are not affected. Regarding Suzuki's hypothesis, it is striking that serotype B strains expressed serotype A specific antigen in some conditions. Antibodies used may have broader epitope specificities allowing them to recognize other glycan epitopes expressed in the conditions used. Serotype B strains express PLM with shorter β -Mans that might be as well recognized.

Serotype B BMT1 has a mutation responsible for lack of Bmt1 activity

To reveal any mutation in NIHB-792 *BMT1*, we cloned this gene and its flanking region to sequence its ORF and promoter. After comparison of the obtained nucleotides sequence with SC5314 genome database (<http://www.candidagenome.org/>), we noticed 19 bases were missing in *BMT1* ORF. This deletion occurred between the positions 129 to 149 out of 2055 bases and induced a frameshift with a STOP codon generated very early in the sequence, probably leading to the synthesis of a truncated enzyme (Fig.4). We then analyzed if this deletion is present in *BMT1* of other serotype B strains. We sequenced *BMT1* regions surrounding this mutation from three other serotype B (LGH1905, A9 and 4305) and three serotype A (VW32, 4277 and BWP17) strains. None of serotype A strains display the mutation while all serotype B strains did, confirming the mutation specificity for this serotype. Transformed NIHB-792 with CIp10 plasmid containing a serotype A *BMT1* and the gene coding for MPA resistance as selection marker (Wirsching *et al.*, 2000) display similar phenotype than SC5314 as it was able to express serotype A specific antigen i) in MPs and ii) at the cell surface of yeast and hyphae (Fig.5B). NIHB-792 strain transformed only with CIp10-MPA didn't display Bmt1 activity, confirming that serotype A *BMT1* was essential for

such phenotype. Mannosides expression at the cell surface of the two NIHB-792 transformants was also analyzed by flow cytometry and compared to the serotype A strain CAI4+CIP10, its single mutant *bmt1Δ*+CIP10 and the retransformant *bmt1Δ*+CIP10-*BMT1* (Courjol *et al.*, submitted). All strains carry α -mannosides at their surface but only CAI4, *bmt1Δ*/BMT1 and NIHB-792(A) have β -Mans at their cell surface, confirming that wild type NIHB-792, at least concerning serotype A specific β -Mans, can be considered as a natural *bmt1Δ* mutant (Fig.6). As all serotype B strains tested display mutated *BMT1*, we analyzed the impact of this deletion on serotype B strains interaction with the host. Epidemiological studies have evidenced prevalence of serotype B strains in HIV/AIDS patients developing oropharyngeal candidiasis (Torres-Rodríguez *et al.*, 1991), for which gut colonization is certainly predisposing. We analyzed then the impact of *BMT1* deletion in a murine model of gut colonization induced by antibiotherapy as described earlier (Bendel *et al.*, 2003). We tested in this model a serotype A parental strain (CAI-4), its *bmt1Δ* mutant and a serotype B parental strain (NIHB-792) acting as a natural *bmt1Δ* mutant and its derived serotype A strain (NIH-792(A)). Antibiotics favored murine gut colonization by the four strains, with higher colonization level in the stomach. NIHB-792 background strains colonized more than the CAI-4 ones, confirming that there is an heterogeneity of colonization among the different *C. albicans* strains (Maccallum, 2012). Whatever the genetic background (serotype A or B) strains with no Bmt1 activity colonized more the gut. These results suggest that Bmt1 specific β -Mans are not important for *C. albicans* interaction with the host but would rather favor yeast clearance. In a previous study we highlighted this by showing that they also impair the yeast fitness during dissemination of *C. albicans* (Courjol *et al.*, submitted). β -Mans could possibly be eliminated by Gal-3 that has been described to bind these oligomannosides. This lectin has a constitutive expression in the normal mucosa and help to prevent inappropriate immune response against commensal bacteria or food components (Müller et al 2006). It then can eliminate the yeast at the beginning of colonization to control the yeast count at the intestinal epithelium surface. Gal-3 was shown to directly kill the yeast after binding to β -Mans or can induced the opsonisation and elimination of *C. albicans* by neutrophils. Analyzes of impact of Gal-3 binding on these different strains killing are in progress. The results will confirm the possible role of Gal-3 in *C. albicans* clearance.

The correlation observed between colonization and Bmt1 activity is more evident for NIHB-792 background. Serotypes A and B cells were discriminated upon their Bmt1 activity (Hasenclever and Mitchell, 1961) but they can have other differences. Most of serotype B

strains, including NIHB-762, have PLM that have shorter β -Mans (Trinel *et al.*, 2005). As PLM immunomodulatory properties are correlated to the high β -Mans DP (Devillers*, Courjol* *et al.*, 2013), PLM might induce gut inflammation that might better clear *C. albicans* serotype A with or without Bmt1 activity. NIH-B792 background strains displaying no inflammatory PLM colonise more than CAI-4 background strains.

PLM can be secreted by *C. albicans* cells (Jouault *et al.*, 2000), it could inhibit interaction of Gal-3 with surface β -Mans and elimination of the yeast that could then more colonize. It is then important to better define the affinity of Gal-3 with β -Mans upon their DP.

Serotype B could be an advantage for *C. albicans* cells to avoid recognition by Gal-3 but serotype A specific antigen might help the host to better tolerate *C. albicans*, which can be then a very powerful commensal.

Aknowledgments

This work was supported by the “Agence Nationale de la Recherche” [ANR-09-MIE-031-01] and the European project “AllFun” from the 7th Framework programme-Health [260338]. We gratefully acknowledge Prof. J. Morschhäuser (University of Wurzburg, Germany) for providing pSFI plasmid.

- Auger, P., C. Dumas, and J. Joly, 1979, A study of 666 strains of *Candida albicans*: correlation between serotype and susceptibility to 5-fluorocytosine: *J Infect Dis*, v. 139, p. 590-4.
- Bendel, C. M., D. J. Hess, R. M. Garni, M. Henry-Stanley, and C. L. Wells, 2003, Comparative virulence of *Candida albicans* yeast and filamentous forms in orally and intravenously inoculated mice: *Crit Care Med*, v. 31, p. 501-7.
- Brawner, D. L., G. L. Anderson, and K. Y. Yuen, 1992, Serotype prevalence of *Candida albicans* from blood culture isolates: *J Clin Microbiol*, v. 30, p. 149-53.
- Cantelli, C., P. A. Trinel, A. Bernigaud, T. Jouault, L. Polonelli, and D. Poulain, 1995, Mapping of beta-1,2-linked oligomannosidic epitopes among glycoconjugates of *Candida* species: *Microbiology*, v. 141 (Pt 10), p. 2693-7.
- Dodgson, A. R., K. J. Dodgson, C. Pujol, M. A. Pfaller, and D. R. Soll, 2004, Clade-specific flucytosine resistance is due to a single nucleotide change in the *FUR1* gene of *Candida albicans*: *Antimicrob Agents Chemother*, v. 48, p. 2223-7.
- Drouhet, E., L. Mercier-Soucy, and S. Montplaisir, 1975, [Sensitivity and resistance of pathogenic yeasts to 5-fluoropyrimidines. I.--Relation between the phenotypes of resistance to 5-fluorocytosine, the serotype of *Candida albicans* and the ecology of various species of *Candida* of human origin (author's transl)]: *Ann Microbiol (Paris)*, v. 126B, p. 25-39.
- Elguezabal, N., J. L. Maza, M. D. Moragues, and J. Pontón, 2009, Monoclonal antibody-mediated inhibition of adhesion of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to human epithelial cells: *Eur J Oral Sci*, v. 117, p. 474-8.
- Elguezabal, N., J. L. Maza, and J. Pontón, 2004, Inhibition of adherence of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to a resin composite restorative dental material by salivary secretory IgA and monoclonal antibodies: *Oral Dis*, v. 10, p. 81-6.
- Felk, A., M. Kretschmar, A. Albrecht, M. Schaller, S. Beinhauer, T. Nichterlein, D. Sanglard, H. C. Korting, W. Schäfer, and B. Hube, 2002, *Candida albicans* hyphal formation and the expression of the *Efg1*-regulated proteinases *Sap4* to *Sap6* are required for the invasion of parenchymal organs: *Infect Immun*, v. 70, p. 3689-700.
- Gillum, A. M., E. Y. Tsay, and D. R. Kirsch, 1984, Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae* *ura3* and *E. coli* *pyrF* mutations: *Mol Gen Genet*, v. 198, p. 179-82.
- Hasenclever, H. F., and W. O. Mitchell, 1961, Antigenic studies of *Candida*. I. Observation of two antigenic groups in *Candida albicans*: *J Bacteriol*, v. 82, p. 570-3.
- Hope, W. W., L. Taberner, D. W. Denning, and M. J. Anderson, 2004, Molecular mechanisms of primary resistance to flucytosine in *Candida albicans*: *Antimicrob Agents Chemother*, v. 48, p. 4377-86.
- Jouault, T., C. Fradin, P. A. Trinel, and D. Poulain, 2000, *Candida albicans*-derived beta-1,2-linked mannoooligosaccharides induce desensitization of macrophages: *Infect Immun*, v. 68, p. 965-8.
- Kobayashi, H., P. Giummelly, S. Takahashi, M. Ishida, J. Sato, M. Takaku, Y. Nishidate, N. Shibata, Y. Okawa, and S. Suzuki, 1991, *Candida albicans* serotype A strains grow in yeast extract-added Sabouraud liquid medium at pH 2.0, elaborating mannans without beta-1,2 linkage and phosphate group: *Biochem Biophys Res Commun*, v. 175, p. 1003-9.
- Kobayashi, H., S. Takahashi, N. Shibata, M. Miyauchi, M. Ishida, J. Sato, K. Maeda, and S. Suzuki, 1994, Structural modification of cell wall mannans of *Candida albicans* serotype A strains grown in yeast extract-Sabouraud liquid medium under acidic conditions: *Infect Immun*, v. 62, p. 968-73.

- Maccallum, D. M., 2012, Hosting infection: experimental models to assay *Candida* virulence: *Int J Microbiol*, v. 2012, p. 363764.
- Mille, C., P. Bobrowicz, P. A. Trinel, H. Li, E. Maes, Y. Guerardel, C. Fradin, M. Martínez-Esparza, R. C. Davidson, G. Janbon, D. Poulain, and S. Wildt, 2008, Identification of a new family of genes involved in beta-1,2-mannosylation of glycans in *Pichia pastoris* and *Candida albicans*: *J Biol Chem*, v. 283, p. 9724-36.
- Miyakawa, Y., T. Kuribayashi, K. Kagaya, M. Suzuki, T. Nakase, and Y. Fukazawa, 1992, Role of specific determinants in mannan of *Candida albicans* serotype A in adherence to human buccal epithelial cells: *Infect Immun*, v. 60, p. 2493-9.
- Odds, F. C., 1988, *Candida and Candidosis*, Philadelphia, 2nd ed. Bailliere Tindall.
- Odds, F. C., M. E. Bounoux, D. J. Shaw, J. M. Bain, A. D. Davidson, D. Diogo, M. D. Jacobsen, M. Lecomte, S. Y. Li, A. Tavanti, M. C. Maiden, N. A. Gow, and C. d'Enfert, 2007, Molecular phylogenetics of *Candida albicans*: *Eukaryot Cell*, v. 6, p. 1041-52.
- Okawa, Y., T. Takahata, M. Kawamata, M. Miyauchi, N. Shibata, A. Suzuki, H. Kobayashi, and S. Suzuki, 1994, Temperature-dependent change of serological specificity of *Candida albicans* NIH A-207 cells cultured in yeast extract-added Sabouraud liquid medium: disappearance of surface antigenic factors 4, 5, and 6 at high temperature: *FEBS Lett*, v. 345, p. 167-71.
- Ponton, J., and J. M. Jones, 1986, Identification of two germ-tube-specific cell wall antigens of *Candida albicans*: *Infect Immun*, v. 54, p. 864-8.
- Poulain, D., G. Tronchin, A. Vernes, R. Popeye, and J. Biguet, 1983, Antigenic variations of *Candida albicans* in vivo and in vitro--relationships between P antigens and serotypes: *Sabouraudia*, v. 21, p. 99-112.
- Sheppard, D. C., M. R. Yeaman, W. H. Welch, Q. T. Phan, Y. Fu, A. S. Ibrahim, S. G. Filler, M. Zhang, A. J. Waring, and J. E. Edwards, 2004, Functional and structural diversity in the Als protein family of *Candida albicans*: *J Biol Chem*, v. 279, p. 30480-9.
- Shibata, N., T. Ichikawa, M. Tojo, M. Takahashi, N. Ito, Y. Okubo, and S. Suzuki, 1985, Immunochemical study on the mannans of *Candida albicans* NIH A-207, NIH B-792, and J-1012 strains prepared by fractional precipitation with cetyltrimethylammonium bromide: *Arch Biochem Biophys*, v. 243, p. 338-48.
- Singleton, D. R., J. Masuoka, and K. C. Hazen, 2005, Surface hydrophobicity changes of two *Candida albicans* serotype B mnn4delta mutants: *Eukaryot Cell*, v. 4, p. 639-48.
- Soll, D. R., and C. Pujol, 2003, *Candida albicans* clades: *FEMS Immunol Med Microbiol*, v. 39, p. 1-7.
- Stiller, R. L., J. E. Bennett, H. J. Scholer, M. Wall, A. Polak, and D. A. Stevens, 1982, Susceptibility to 5-fluorocytosine and prevalence of serotype in 402 *Candida albicans* isolates from the United States: *Antimicrob Agents Chemother*, v. 22, p. 482-7.
- Suzuki, A., Y. Takata, A. Oshie, A. Tezuka, N. Shibata, H. Kobayashi, Y. Okawa, and S. Suzuki, 1995, Detection of beta-1,2-mannosyltransferase in *Candida albicans* cells: *FEBS Lett*, v. 373, p. 275-9.
- Suzuki, M., and Y. Fukazawa, 1982, Immunochemical characterization of *Candida albicans* cell wall antigens: specific determinant of *Candida albicans* serotype A mannan: *Microbiol Immunol*, v. 26, p. 387-402.
- Suzuki, S., 1995, [Immunochemical study on mannan, the antigenic polysaccharide of pathogenic yeasts in man of genus *Candida*]: *Yakugaku Zasshi*, v. 115, p. 280-94.
- Tavanti, A., A. D. Davidson, M. J. Fordyce, N. A. Gow, M. C. Maiden, and F. C. Odds, 2005, Population structure and properties of *Candida albicans*, as determined by multilocus sequence typing: *J Clin Microbiol*, v. 43, p. 5601-13.

- Torres-Rodríguez, J. M., M. C. Nicolás, N. Madrenys, and C. Gallach, 1991, [Distribution of serotypes A and B of *Candida albicans* in 502 strains isolated from pathological specimens]: *Med Clin (Barc)*, v. 97, p. 1-3.
- Trinel, P. A., F. Delplace, E. Maes, J. P. Zanetta, C. Mille, B. Coddeville, T. Jouault, G. Strecker, and D. Poulain, 2005, *Candida albicans* serotype B strains synthesize a serotype-specific phospholipomannan overexpressing a beta-1,2-linked mannotriose: *Mol Microbiol*, v. 58, p. 984-98.
- Trinel, P. A., C. Faille, P. M. Jacquinet, J. C. Cailliez, and D. Poulain, 1992, Mapping of *Candida albicans* oligomannosidic epitopes by using monoclonal antibodies: *Infect Immun*, v. 60, p. 3845-51.
- Trinel, P. A., T. Jouault, J. E. Cutler, and D. Poulain, 2002, Beta-1,2-mannosylation of *Candida albicans* mannoproteins and glycolipids differs with growth temperature and serotype: *Infect Immun*, v. 70, p. 5274-8.
- Wilson, R. B., D. Davis, and A. P. Mitchell, 1999, Rapid hypothesis testing with *Candida albicans* through gene disruption with short homology regions: *J Bacteriol*, v. 181, p. 1868-74.
- Wirsching, S., S. Michel, and J. Morschhäuser, 2000, Targeted gene disruption in *Candida albicans* wild-type strains: the role of the MDR1 gene in fluconazole resistance of clinical *Candida albicans* isolates: *Mol Microbiol*, v. 36, p. 856-65.

Table 1. *C. albicans* strains used in this study

Strains	Parental strains	Genotypes	References
SC5314		Wild type	(Gillum <i>et al.</i> , 1984)
BWP17	RM1000	<i>arg4::hisG/arg4::hisG;his1::hisG/his1::hisG;ura3Δ::limm434/ura3Δ::limm434</i>	(Wilson <i>et al.</i> , 1999)
VW32		Wild type	(Cantelli <i>et al.</i> , 1995)
4277		Wild type	(Trinel <i>et al.</i> , 2005)
LGH 1095		Wild type	ATCC MYA-2719
NIHB792-MPA		Wild type	(Shibata <i>et al.</i> , 1985)
A9		Wild type	(Singleton <i>et al.</i> , 2005)
4302		Wild type	(Trinel <i>et al.</i> , 2005)
CAI-4+Clp10	CAI-4	<i>RPS10::rps10Clp10-URA3</i>	(Courjol <i>et al.</i> , submitted)
<i>bmt1Δ</i> +Clp10	<i>bmt1Δ</i>	As <i>bmt1Δ</i> but <i>bmt1Δ::dpl200/bmt1Δ::dpl200, RPS10/rps1Δ::Clp10</i>	(Courjol <i>et al.</i> , submitted)
<i>bmt1Δ</i> +Clp10- <i>BMT1</i>	<i>bmt1Δ</i>	As <i>bmt1Δ</i> but <i>RPS10/rps1Δ::Clp10-BMT1</i>	This study
NIHB792(A)-MPA	NIHB	<i>NIHB</i> but <i>RPS10/rps10Δ::Clp10-MPA-BMT1</i>	This study

Table 2. Primers used in this study

Primers	Séquences
probe <i>BMT1</i> Fwd	ATACAATCATTAGTCATCAA
probe <i>BMT1</i> Rev	ATACTGGGATAGGGGCGATT
probe <i>RPS1</i> Fwd	ATGGCTGTCGGTAAAAACAAG
probe <i>RPS1</i> Rev	AAAGCCAATAATGAACCCAAG
Taq- <i>BMT1</i> Fwd	AACCATGGAACAAGCTTTGG
Taq- <i>BMT1</i> Rev	TCATTGCTGGTGATGCTTCT
Probe Taq- <i>BMT1</i>	AGCGATGGTGGTGGTGGTGG
Taq- <i>BMT2</i> Fwd	GATTAAATGCCGAAAAATCG
Taq- <i>BMT2</i> Rev	ATCAGGCCACCATGGTAAAA
Probe Taq- <i>BMT2</i>	GGATTGGGGTCGCTAGAGCAGC
Taq- <i>ACT1</i> Fwd	TGTCGACTTGTTCGGTTCTG
Taq- <i>ACT1</i> Fwd	ACTGGAATCCATTGGTGAGC
Probe Taq- <i>ACT1</i>	AGGTCCAAAACAGCTGCCAAA
<i>BMT1</i> Fwd	ATACAATCATTAGTCATCAA
<i>BMT1</i> Rev	ATACTGGGATAGGGGCGATT
Seq-BMT1-2 Fwd	CTACTACACATTCAAATCCA
Seq-BMT1-2 Rev	CAGGTAAGATATTATTATG
Seq-BMT1-3 Fwd	CCATTAACACTTCCTCCCT
Seq-BMT1-3Rev	ATACTGGGATAGGGGCGATT
Seq-BMT1-4Fwd	GAAGCATCACCAGCAATGAA
Seq-BMT1-4 Rev	GTAATACACCGGCATCTTCA
Seq-BMT1-5 Rev	CAGTTTGTTCGACAGCCAAT
Seq-M13F	GTAAAACGACGGCCAG
Seq-M13R	CAGGAAACAGCTATGAC

Fig.1

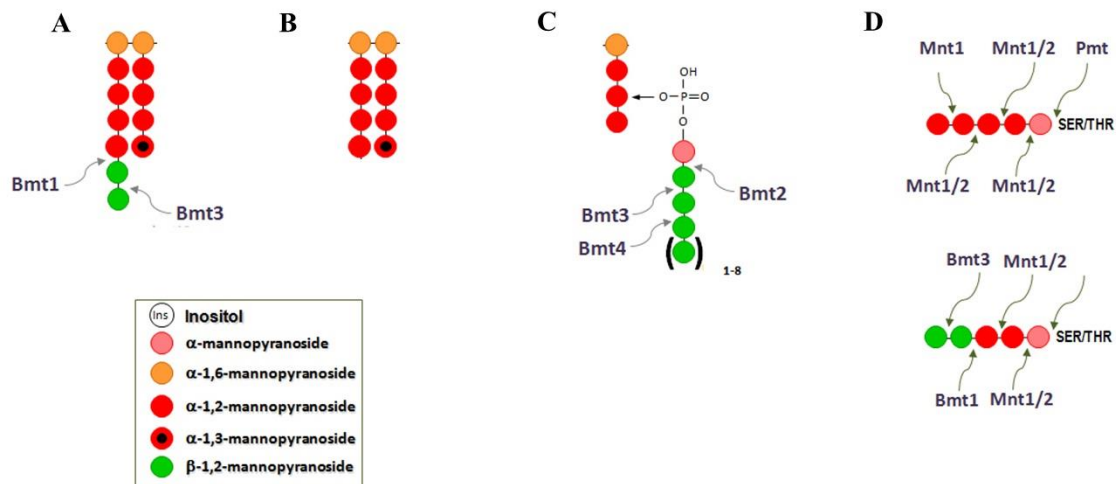


Figure 1: Schematic representation of Bmt1–6 activities on *C. albicans* cell-wall glycoconjugates. (A) β -Mans expressed at the non-reducing end of α -1,2 Mans from serotype A PPM N-glycans, are biosynthesized by Bmt1 and Bmt3. (B) α -1,2 Mans from serotype B PPM N-glycans (C) Bmt2, Bmt3 and Bmt4 sequentially add β -mannose on PPM N-glycan phosphomannose linked to α -1,2 Mans. (D) Detailed structure and biosynthetic pathway of the two *O*-mannopentamers: the mannopentaose previously described [Top panel, (Munro *et al.*, 2005; Díaz-Jiménez *et al.*, 2012)] and the mannopentaose partly biosynthesized by Bmt1 and Bmt3 as deduced from this study (Bottom panel).

The arrows indicate where the enzymes act and which β -mannose is added.

Fig.2

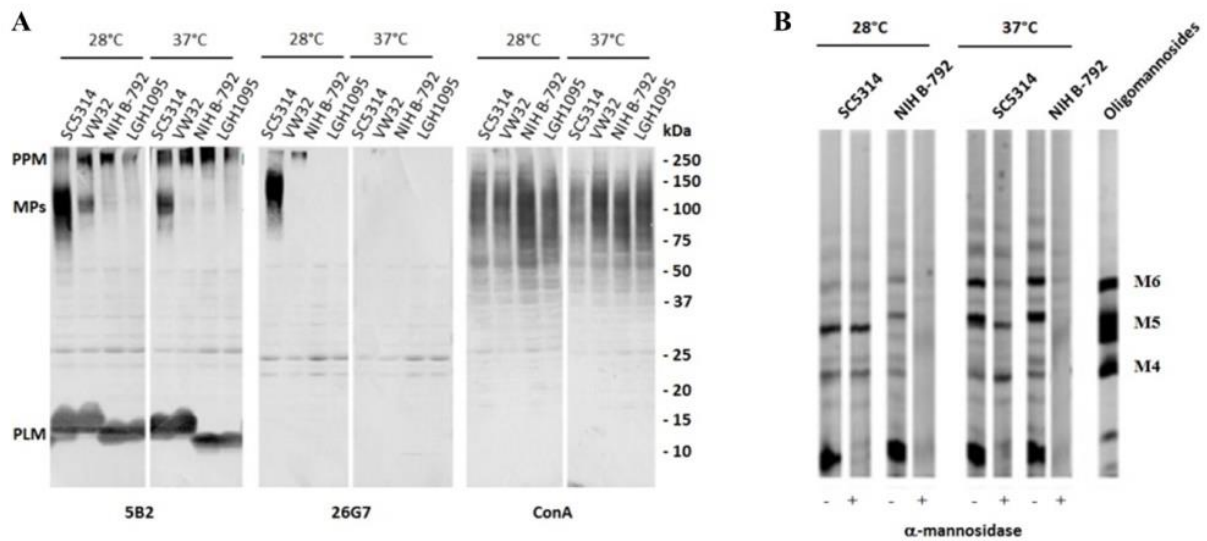


Figure 2: Analysis of β -1,2 mannosylation and *O*-mannosylation of *C. albicans* glycoconjugates. (A) Western blots of whole-cell extracts from SC5314, VW32, NIHB-792 and LGH1095 strains grown at 28°C and 37°C were stained with anti- β -1,2 oligomannosides monoclonal antibodies 5B2, specific for β -Mans with mannobiose as minimal epitope, and 26G7, specific for β -Mans at the non-reducing end of PPM α -1,2 Mans, and lectin ConA, specific for terminal α -mannosyl. PPM, CWMPs and PLM are indicated. (B) *O*-mannosides released by mild acid hydrolysis, from whole cells of strains SC5314 and NIHB-792 grown at 28°C and 37°C were analyzed by FACE. Prior to the electrophoresis, α -mannosidase treatment was performed or not to remove terminal α -1,2; α -1,3 and α -1,6 mannosyl residues. Purified oligomannosides from phosphomannosides by acid hydrolysis carbohydrate were used as standard: M4, purified β -mannotetraose; M5, purified β -mannopentaose and M6, purified β -mannohexaose.

Fig.3

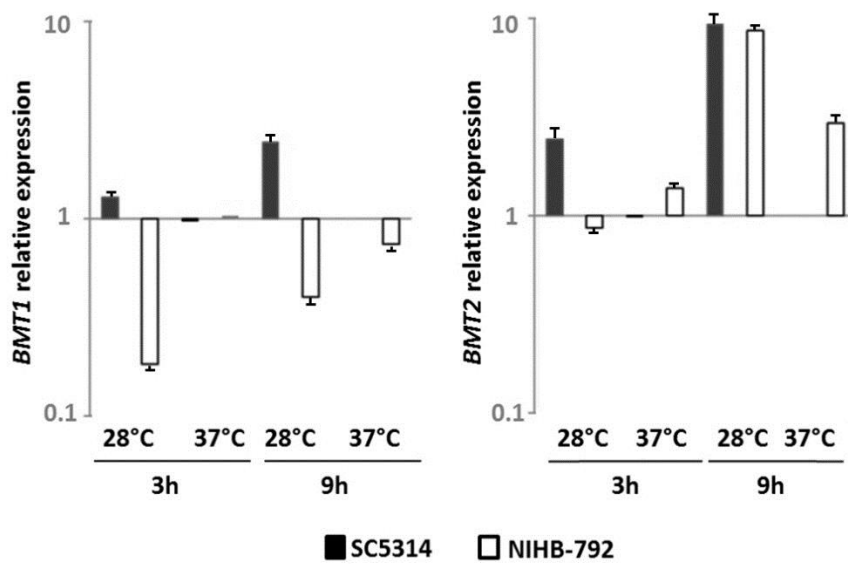


Figure 3: Analysis of *BMT1* and *BMT2* expression by TaqMan. Relative quantification of transcripts was determined with RNA from SC5314 and NIHB-792 strains grown at 28°C and 37°C for 3h and 9h of incubation. Relative transcripts abundance was determined with RNA from SC5314 strain grown 9h at 37°C and *ACT1* abundance as an endogenous control.

Fig.4

```

SC5314      ATG GAT AAA TTT ATA CAA TCA TTT AGT CAT CAA TAT TTG GAT TCT TCT TCA TCA CTT AAA 60
NIHB-792    ATG GAT AAA TTT ATA CAA TCA TTT AGT CAT CAA TAT TTG GAT TCT TCT TCA TCA CTT AAA 60
            ATG GAT AAA TTT ATA CAA TCA TTT AGT CAT CAA TAT TTG GAT TCT TCT TCA TCA CTT AAA

SC5314      TTA ACA GCA CGA AGG AAA CGG AAA TTG ACC ATT CTC GGT CTT TTT TTA TTT TCA TTA ATT 120
NIHB-792    TTA ACA GCA CGA AGG AAA CGG AAA TTG ACC ATT CTC GGT CTT TTT TTA TTT TCA TTA ATT 120
            TTA ACA GCA CGA AGG AAA CGG AAA TTG ACC ATT CTC GGT CTT TTT TTA TTT TCA TTA ATT

SC5314      TCA TTA ATG ATA ATA ATA TCT TAT TCC AAT AAT AAT ATC TTA CCT GGA TTA TCG GGA ATT 180
NIHB-792    TCA TTA ATG-----AT AAT AAT ATC TTA CCT GGA TTA TCG GGA ATT 161
            TCA TTA ATG                               ATA ATA ATA TCT TAC CTG GAT TAT CGG GAA TTA

SC5314      AGT ATT AGT AGT ACA TTT TCT GAT TAT TAT TCC AAC CCT AAA CAA CAA AAT AAA TTT GAA 240
NIHB-792    AGT ATT AGT AGT ACA TTT TCT GAT TAT TAT TCC AAC CCT AAA CAA CAA AAT AAA TTT GAA 221
            GTA TTA GTA GTA CAT TTT CTG ATT ATT ATT CCA ACC CTA AAC AAC AAA ATA AAT TTG AAC

SC5314      CAA CAA ATT CAA GAT CAT CAA ACT ACT AAA AAA GGT AAA CGA ACA ATT ATA TTC CCA AAT 300
NIHB-792    CAA CAA ATT CAA GAT CAT CAA ACT ACT AAA AAA GGT AAA CGA ACA ATT ATA TTC CCA AAT 281
            AAC AAA TTC AAG ATC ATC AAA CTA CTA AAA AAG GTA AAC GAA CAA TTA TAT TCC CAA ATA

SC5314      AAT TTC AAT CAT GTT CAT GAT CAT AAA GGT TCT TAT ATG A 340
NIHB-792    AAT TTC AAT CAT GTT CAT GAT CAT AAA GGT TCT TAT ATG A 321
            ATT TCA ATC ATG TTC ATG ATC ATA AAG GTT CTT ATA TGA

```

Figure 4: First 340 bases of *BMT1* ORF of SC5314 (serotype A strain) and NIHB-792 (serotype B strain) compared with ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). The 19 bases not present in *BMT1* of serotype B strains are represented by dotted lines and codon STOP in serotype B strain is framed. The third sequence corresponds to NIHB-792 *BMT1* sequence with the frameshift after the deletion.

FIG.5

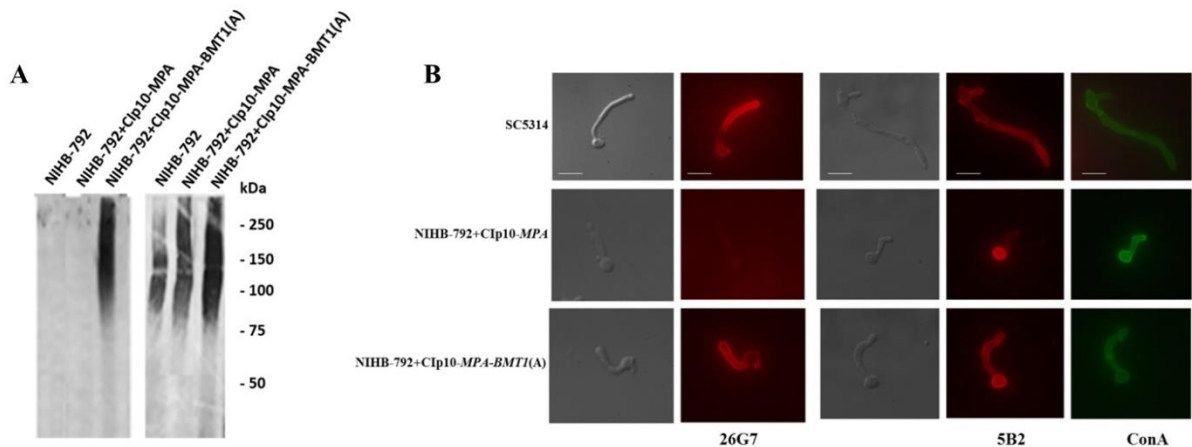


Figure 5: Mapping of β -1,2 oligomannosides epitopes on yeast and hyphal mannoproteins. (A) Western blots of whole-cell extracts from NIHB-792, NIHB-792+CIp10-MPA, NIHB-792+CIp10-MPA-BMTI(A) yeast cells grown at 28°C were stained with anti- β -1,2 oligomannosides monoclonal antibody 5B2 and ConA. (B) Mapping of β -1,2 oligomannosides epitopes expressed at the surface of hyphae. Indirect immunofluorescence assays were performed on hyphae from SC5314, NIHB-792+CIp10-MPA, NIHB-792+CIp10-MPA-BMTI(A), using anti- β -1,2 oligomannosides monoclonal antibodies 5B2 and 26G7, and lectin ConA. Evan's blue was used as counterstain to decrease the nonspecific background fluorescence and to visualize non stained cells, which display then red fluorescence in their cytoplasm. For each strain, a micrograph of phase contrast and a fluorescence micrograph with the mentioned antibody or lectin are shown.

Scale bars = 10 μ m

Fig.6

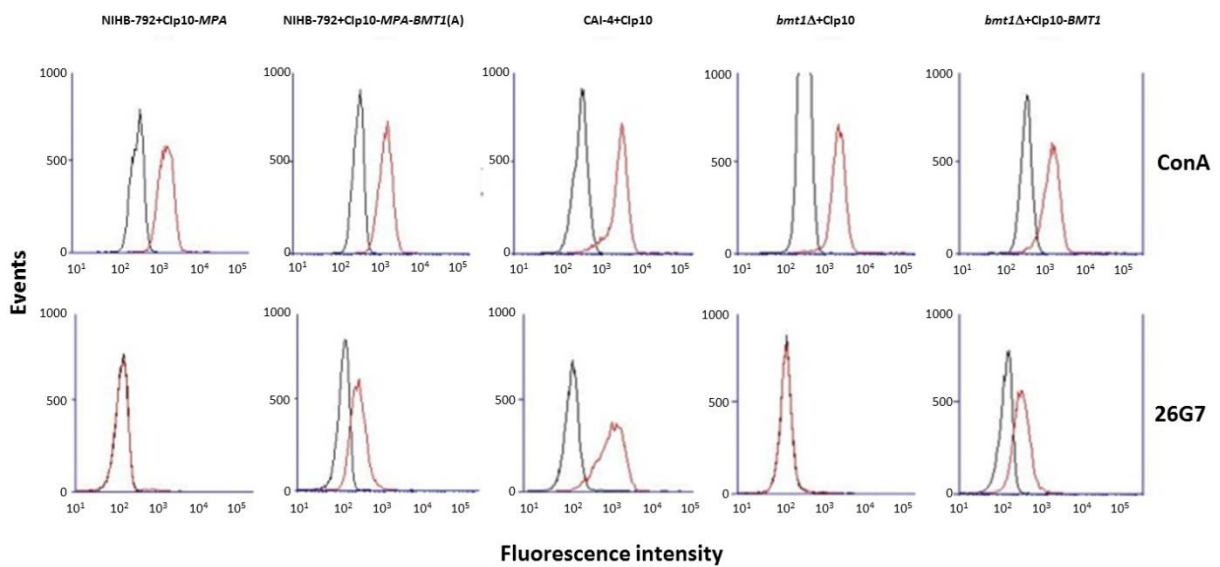


Figure 6: Expression of serotype A specific epitope on different *C. albicans* strains at the cell surface. NIHB-792+CIp10-MPA, NIHB-792+CIp10-MPA-BMT1(A), CAI-4+CIp10, *bmt1*Δ+CIp10, *bmt1*Δ+CIp10-BMT1 strains were probed 26G7 diluted 1:200 or ConA diluted 1:100 (red areas) and compared with controls (black areas) by flow cytometry.

Fig.7

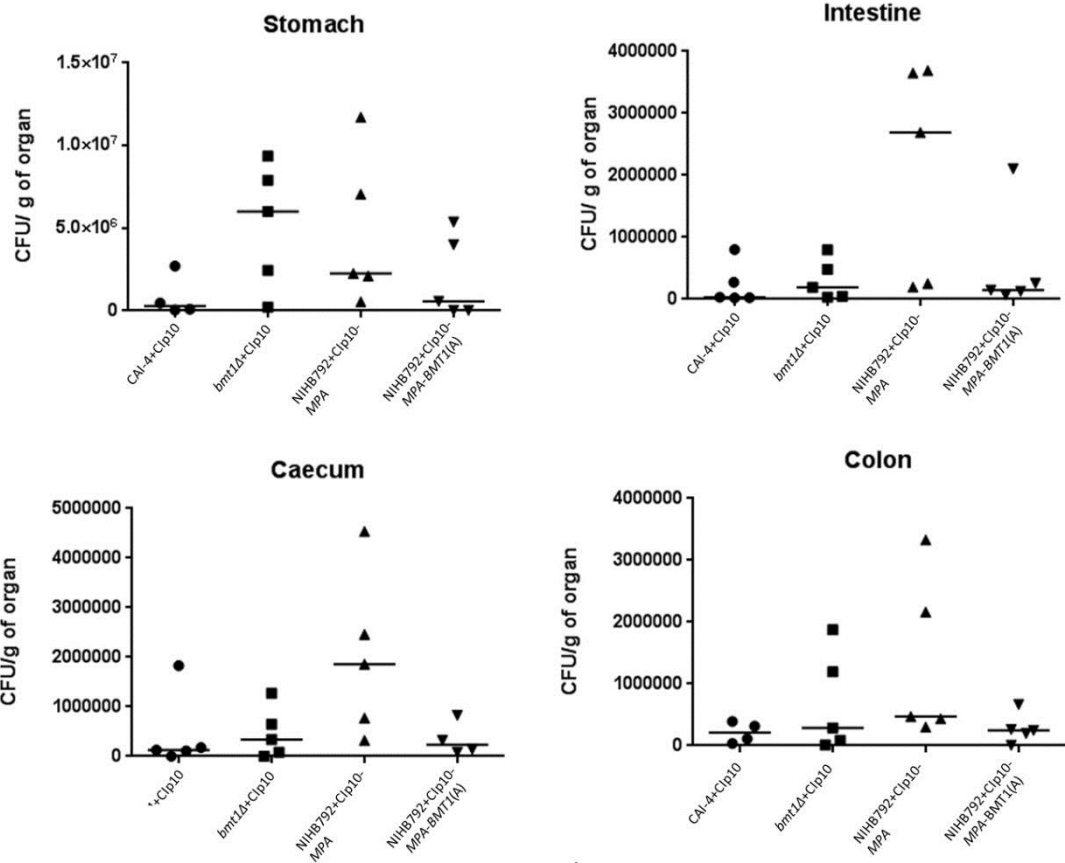


Figure 7: Fungal burdens of different *C. albicans* strains in the stomach, intestine, caecum and colon of BALB/c mice, five days post oral infection. Mice received oral inoculation of 10⁸ CAI-4+CIp10, *bmt1Δ*+CIp10, NIHB-792+CIp10-MPA, NIHB-792+CIp10-MPA-*BMT1(A)* cells. *, P<0.05; **, P<0.01.

III- L'altération de la glycosylation du phospholipomannane de *C. albicans* affecte ses activités de stimulation des macrophages

Le PLM de *C. albicans* induit la sécrétion de TNF- α par les macrophages via une voie TLR-2 dépendante ainsi que l'apoptose des macrophages par la modulation de la voie ERK induite lors de la phagocytose (Ibata-Ombetta *et al.*, 2003a; Ibata-Ombetta *et al.*, 2001). Une étude menée au laboratoire a montré que l'absence complète de transformation du MIPC en PLM est induite par la délétion du gène *MIT1* (Mille *et al.*, 2004). *In vitro*, le mutant *mit1* Δ n'est pas capable d'échapper aux macrophages par régulation de la phosphorylation d'ERK1/2 et *in vivo* il induit une diminution de la virulence dans un modèle d'infection systémique murin. Le PLM est composé de β -Mans dont le degré de polymérisation (DP) est variable : les souches de sérotype A ont un PLM avec un DP moyen de 14 alors que les souches de sérotype B ont un PLM avec des chaînes β -Mans plus courtes avec un mannotriose majeur. Parmi les neuf β -1,2 mannosyltransférases identifiées, Bmt6 est l'une des enzymes agissant spécifiquement dans la β -1,2 mannosylation du PLM. Sa mutation résulte en l'expression d'un PLM contenant uniquement un β -1,2 mannotriose. Le mutant *bmt5* Δ , qui n'exprime plus de PLM β -1,2 mannosylé, n'a pas été utilisé dans cette étude car la perte de Bmt5 est compensée par une autre Bmt (Mille *et al.*, 2012) (IV «Bmt5 n'est pas essentielle à la β -1,2 mannosylation du PLM qui ne contribue pas à l'expression de surface des β -Mans et n'a pas d'impact sur la résistance aux inhibiteurs de la synthèse des β -glucanes »). L'objectif de cette étude était d'analyser les effets du degré de polymérisation des β -Mans du PLM sur sa capacité à induire une réponse proinflammatoire par les macrophages. Pour cela, nous avons comparé les propriétés proinflammatoires de trois PLM différents : PLM-A, souche de sérotype A, PLM-B, souche de sérotype B et PLM-*bmt6* Δ , du mutant *bmt6* Δ .

Nous avons montré que les différents PLMs activent la caspase-1 et la production d'IL-1 β dans les cellules de la lignée murine macrophagique J774 indépendamment de la longueur de chaîne glycanique. Aucun des PLMs ne stimule la production des ROS (*Reactive Oxygen Species*), indiquant que l'activation de la caspase-1 peut se produire par une voie ROS-indépendante. De plus, seul les longues chaînes oligomannosidiques présentes au niveau du PLM-A sont capables d'induire la production de TNF- α dans les macrophages indépendamment de toute endocytose car elle n'est pas inhibée par la Latrunculin A. Enfin, nous avons démontré que la galectine-3 est capable de potentialiser la production de TNF- α

par les macrophages après stimulation par le PLM-A. En revanche, la galectine-3 n'a aucun effet sur les activités des PLM-B et PLM-*bmt6Δ*.

Ces résultats montrent que des PLMs avec des chaînes glycaniques tronquées sont encore capable d'activer l'inflammasome et la caspase-1, indiquant que le squelette lipidique du PLM joue un rôle dans ce processus. Cependant, la présence de longues chaînes β -1,2 mannosidiques est essentielle pour la production de TNF- α par les macrophages et favorise l'interaction avec la galectine-3, amplifiant ainsi les réponses inflammatoires.

Deficient beta-mannosylation of *Candida albicans* phospholipomannan affects the proinflammatory response in macrophages

Audrey Devillers^{1,2,3§}, Flavie Courjol^{1,2,3§}, Chantal Fradin^{1,2,3}, Agnes Coste^{4,5}, Daniel Poulain^{1,2,3}, Bernard Pipy^{4,5}, Emerson Soares Bernardes^{6¶}, Thierry Jouault^{1,2,3*¶}

¹ Inserm U995, Team 2, Lille, France

² Université Lille Nord de France, Lille, France

³ Université Droit et Santé Lille2, Lille, France

⁴ Unité Mixte de Recherche MD3, EA2405 Polarisation des macrophages et récepteurs nucléaires dans les pathologies inflammatoires et infectieuses, Université Paul Sabatier, Toulouse, France

⁵ Unité Mixte de Recherche 152, Université Paul Sabatier, Toulouse, France

⁶ Cancer Institute of the State of São Paulo (ICESP), São Paulo, Brazil

Corresponding author:

*Thierry Jouault, Inserm U995, Team 2, Université Lille2, Faculté de Médecine H. Warembourg, Pôle Recherche, Place Verdun, 59037 Lille Cedex, France. Tel: (33) 3 20 62 34 15; Fax: (33) 3 20 62 34 16; E-mail: thierry.jouault@univ-lille2.fr

§ These authors share first authorship.

¶ These authors contributed equally to this work.

Abstract

Candida albicans produces a complex glycosphingolipid called phospholipomannan (PLM), which is present on the cell-wall surface of yeast and shed upon contact with host cells. The glycan moiety of PLM is composed of β -Mannosides with degrees of polymerization up to 19 in *C. albicans* serotype A. PLM from serotype B strains displays a twofold decrease in the length of the glycan chains. In this study we compared the proinflammatory activities of PLMs purified from *C. albicans* serotype A and serotype B strains and from a *bmt6* Δ mutant of *C. albicans*, whose PLM is composed of short truncated oligomannosidic chain. We found that PLMs activate caspase-1 in murine macrophage cell line J774 independent of the glycan chain length although IL-1 β secretion is more intense with long glycan chain. None of the tested PLMs stimulate ROS production, indicating that caspase-1 activation may occur through a ROS-independent pathway. On the other hand, only long-chain oligomannosides present on PLM from serotype A strain (PLM-A) are able to induce TNF- α production in macrophages, a property that is not affected by blocking endocytosis through latrunculin A treatment. Finally, we demonstrate that soluble and not cell surface-bound galectin-3, is able to potentiate PLM-A-induced TNF- α production in macrophages. PLMs from *C. albicans* serotype B and from *bmt6* Δ mutant are not able to induce TNF- α production and galectin-3 pretreatment does not interfere with this result. In conclusion, we show here that PLMs are able to evoke a proinflammatory state in macrophage, which is in part dependent on their glycosylation status. Long-glycan chains favor interaction with soluble galectin-3 and help amplify inflammatory response.

Introduction

Candida albicans produces a complex glycosphingolipid (GSL) called phospholipomannan (PLM) [1], which is present at the surface of the cell wall and is shed in contact with host cells [2-5]. Although the impact of PLM on *C. albicans* biology is unknown, it is considered to be a virulence factor of *C. albicans*. PLM induces tumor necrosis factor alpha (TNF- α) secretion from cells of macrophage lineage via a TLR-2-dependent pathway [6,7] and macrophage apoptosis via modulation of the ERK pathway [8,9] induced at the time of phagocytosis. The glycan moiety of PLM is unique. It is mainly composed of β -1,2 mannosides with degrees of polymerization up to 19 in *C. albicans* serotype A strains. PLM from serotype B strains displays shorter β -1,2 mannosides chains with a predominant mannotriose [10]. β -1,2 mannosides by themselves act as stimuli for macrophage activity and are recognized by macrophages through an interaction involving galectin-3, a glycan-binding protein highly produced and secreted by macrophages [11]. Therefore, due to the prominent cell surface expression of β -1,2 mannosides in *C. albicans*, galectin-3 is able to discriminate between this pathogen [12] and the non-pathogenic yeast *Saccharomyces cerevisiae* [13,14]. It has been shown that the complete absence of PLM affects the virulence of *C. albicans* [15].

Alteration of the *MIT1* gene in *C. albicans* resulted in complete absence of glycosylated PLM. Absence of *MIT1* leads to no biosynthesis, then no secretion of PLM, and abolishes the immune activities of yeasts both *in vitro*, toward macrophages, and in animal models [15]. The absence of PLM caused by deletion of *MIT1* led to a decrease in virulence of yeasts during both the acute and chronic phases of systemic infection in mice (75 and 50% reduction in mortality, respectively). *In vitro*, *mit1* Δ mutant was not able to escape macrophage lysis through downregulation of the ERK1/2 phosphorylation, a previously shown PLM-induced escape mechanism [15].

Recently, a new family of genes encoding β -mannosyltransferases (Bmt1–9) has been identified as responsible for adding β -1,2 mannosides to different carriers present in the *C. albicans* cell wall [16]. Among these nine β -mannosyltransferases, Bmt6 was shown to be one of the enzymes specifically involved in β -1,2 mannosylation of PLM. Deletion of *BMT6* results in an impairment in the addition of the third β -mannose to PLM backbone [10,17] but has no impact on upstream sphingolipid (IPCs, MIPCs and M (IP)₂Cs) biosynthesis, meaning that both wild-type (WT) and *bmt6* Δ mutant yeasts share a common lipid backbone. In addition, it does not affect the addition of β -mannose to other carriers in *C. albicans* such as phosphopeptidomannan and mannoproteins.

The aim of this study was to investigate the effects of differential β -1,2 mannosylation of PLM on its ability to induce proinflammatory response in macrophages. Therefore, we compared the proinflammatory properties of three different types of PLMs: PLM-A, isolated from SC5314, a WT *C. albicans* serotype A strain; PLM-B, isolated from the NIHB strain, a serotype B strain and PLM-BMT6 Δ , isolated from the *bmt6* Δ mutant. We conclude that PLMs displaying short and truncated glycan chains are still able to lead to inflammasome activation in macrophage, indicating that PLM lipid backbone plays a role in this process. However, the presence of long chains of β -1,2-linked mannosides is essential for the induction of TNF- α production in macrophages and the binding of PLM-A to soluble galectin-3, which may amplify PLM-A-induced inflammatory response.

Materials and Methods

Reagents and antibodies

All reagents were obtained from Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Fluorochrome inhibitor of caspase 1 (FLICA) was purchased from Immunochemistry Technologies (Bloomington, MI). Anti-caspase-1 p10 antibody (M-20) was obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). The anti-galectin-3 antibody (clone M3/38) was purchased from Millipore (Temecula, CA). FITC-conjugated anti-mouse IgG antibody and horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-rabbit IgG were obtained from Southern Biotechnology Laboratories (Birmingham, AL).

To avoid possible LPS contamination, which could interfere with the observations, purified PLMs and r-Gal3 were tested for endotoxin contamination (Limulus Amebocyte Lysate - Pyrogen Plus, Lonza - Walkersville, MA). Endotoxins were below the detection limit of the assay (<0.03 EU/ml).

Strains and growth conditions

C. albicans wild type strains SC5314 (serotype A, [18]) and NIH B 792 (serotype B, [19]) were used in this study. The mutant strain, *bmt6* Δ , expressing a truncated PLM was obtained after deletion of *BMT6* from strain BWP17 by PCR based gene targeting [20].

Yeast cells were maintained at 4°C on YPD (1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose)-agar medium. Before each experiment, yeast cells were transferred onto fresh YPD and incubated overnight at 37°C. Yeasts were recovered by centrifugation, resuspended in phosphate buffered saline (PBS) and used at different concentrations.

PLMs purification

PLM from the different strains was purified as described previously [1]. Sphingolipids were first extracted from dried yeasts with chloroform/methanol/water (10/10/3) solution. After extensive butanol/water partitions, aqueous components, among which PLM, were purified on phenyl-sepharose using increasing concentrations of ethanol (1–40%) for elution. Purified PLM fractions were checked and analyzed by thin-layer chromatography using a butanol/acetic acid/water (20/8/17) solvent system and visualized with orcinol reagent. β -1,2 mannosides released from the different PLMs were analyzed by Fluorescent Assisted Carbohydrate Electrophoresis (FACE).

Fluorescent Assisted Carbohydrate Electrophoresis

Purified PLMs were hydrolyzed in 20 mM HCl for 1 h at 100°C to release β -1,2 oligomannosides. After neutralization, hydrolysates were dried before to be tagged with 0.15 M 8-amino-naphthalene-1,3,6-trisulfonate (ANTS) and 1 M sodium cyanoborohydride for 16 h at 37°C [21]. The dried samples were resuspended in glycerol/water (1/4). Electrophoresis of ANTS-labeled oligomannosides was performed on 35% (w/v) acrylamide separating gels. Acid-hydrolyzed dextran and purified oligosaccharides were used as carbohydrate standards. Gels were visualized with a 365 nm UV-transilluminator.

Cell lines

The mouse macrophage-like J774 cell line (ECAC 85011428), derived from a tumor of a female BALB/c mouse, was from the European Collection of Cell Cultures (ECAC) and is provided by Sigma Aldrich. Adherent cells were cultured at 37°C in an atmosphere containing 5% CO₂ in DMEM supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) (Valbiotech, Paris, France), 5 mM L-glutamine, 100 μ g/ml streptomycin, and 50 μ g/ml penicillin (culture medium). Before use, the cells were gently scraped off with a rubber policeman and, depending on the experiment, either plated onto 8-well Labtek tissue culture chambers (Nunc, Naperville, IL) or onto 24- or 48-well tissue culture dishes.

Stimulation of cells with PLMs

Macrophages (5×10^5 cells/well) were incubated with different concentrations of PLMs for 3 or 5h at 37°C for TNF- α production. For IL-1 β production, plated cells were primed for 5h with 500 ng/ml of LPS and then incubated with PLMs for 12 or 24h. After incubation, the supernatants were collected and stored at -80°C until cytokine assays were performed. Cytokine concentrations in cell-free supernatants were measured using a commercial ELISA kit according to the manufacturer's instructions (eBioscience, San Diego, CA). In some experiments, plated cells were incubated for 30 min with 2 ng/ml Latrunculin A (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI) prior addition of PLMs in order to inhibit activation depending on internalization.

Galectin-3 preparation

Recombinant human Galectin-3 (rGal-3) was produced in *Escherichia coli* and prepared as previously described [22]. rGal-3 was purified by affinity chromatography and detoxified on detoxi-gel beads (Detoxi-Gel Endotoxin Removing Columns, Thermo-Fisher Scientific - Rockford, IL) to eliminate any contaminating LPS. Endotoxin contamination tested with the Limulus Amebocyte Lysate, Pyrogen Plus (Lonza) was below the detection limit of the assay.

Binding of rGal-3 to cells

Macrophages (5×10^5 cells/well) plated onto 8-well Labtek tissue culture chambers were incubated with rGal-3 at 10 $\mu\text{g/ml}$ for 1 h. Binding of rGal-3 was stained with the anti-Gal3 antibody (Clone M3/38) and FITC anti-mouse IgG (Southern Biotech). After fixation with 4% paraformaldehyde in PBS, the slides were mounted and the cells were examined by fluorescent microscopy.

Effect of rGal-3 on stimulation

Macrophages (5×10^5 cells/well) plated onto 48-well tissue culture dishes were incubated with rGal-3 at a concentration of 10 $\mu\text{g/ml}$ for 1 h. Cells were then stimulated for 3 to 5 h with or without different concentrations of PLM or with Pam3CSK4 (500 ng/ml) or curdlan (100 and 10 $\mu\text{g/ml}$) used as control. In parallel experiments, PLM or control stimuli were incubated for 1 h at 37°C with rGal-3 (10 $\mu\text{g/ml}$) before addition to the cells. PLM and control stimuli were incubated with or without 10 $\mu\text{g/ml}$ of rGal-3 for 1 h at 37°C. The mixture was then added to plated cells as described above for stimulation. In parallel, PLM and control stimuli were incubated for 1 h with rGal-3 (10 $\mu\text{g/ml}$) before addition to the cells. rGal-3 activity was inhibited by incubation with 50 mM lactose, a specific inhibitor of Galectin-3, for 15 min before the experiments.

Reactive oxygen species (ROS) production by cells

The oxygen-dependent respiratory burst of cells was measured by chemiluminescence in the presence of 5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione (66 μM , Luminol; Sigma-Aldrich) using a thermostatically (37°C) controlled luminometer (Wallac 1420 Victor2). The production of chemiluminescence was monitored continuously for 2 h after cell stimulation with yeast cells (5:1, yeast:cell ratio) or PLMs. One-hundred μM of 12-O-tetradecanoyl-

phorbol-13-acetate (TPA) was used as a positive control for stimulation. Inhibition of ROS production was performed 30 min before stimulation using Latrunculin A (500 ng/ml).

Caspase 1 activation

After plating in Labtek tissue culture chambers, macrophages (3×10^5 cells/well) were incubated with lipopolysaccharide (LPS) (100 ng/ml) for 2 h before addition of PLMs (50 μ g/ml), aluminum hydroxide (Alum, 0.1 μ g/ml) or ATP (25 μ g/ml), for 4 hours. Cells were then treated either for proteins extraction for Western blot analyses or for detection of caspase-1 activation.

Western blot analysis of activated caspase-1

Total cell proteins were extracted with RIPA buffer (1% NP40, 0.5% Sodium Deoxycholate, 0.1% SDS) for 30 min on ice with occasional checking. Lysates were clarified by centrifugation for 10 min at $12\,000 \times g$ at 4°C and then conserved at -20°C . A fixed amount of lysate, determined by the protein concentration, was mixed with 4 x concentrated electrophoresis sample buffer (1 x : 125 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 5% glycerol and bromophenol blue) and boiled for 5 min at 100°C . The extracted proteins were then separated by 15 % SDS polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to a nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell, Dassel, Germany) for 1 h at 200 mA in a semi-dry transfer system. After staining with 0.1% Ponceau S in 5% acetic acid to confirm equivalence of loading and transfer, membrane were saturated with TNT (Tris 10 mM, NaCl 100 mM, Tween 0.1%) containing 5% non-fat dry milk for 1 h at 20°C . The membrane was then probed with anti-caspase-1 p10 (M-20) (diluted 1:1000) in TNT-0.5% non-fat dry milk overnight at 4°C . After several washes, the membrane was incubated for 2 h at 20°C with a 1:1000 dilution of HRPO-conjugated anti-rabbit IgG in TNT-0.5% non-fat dry milk. Finally, proteins were visualized with ECL detection reagents (ThermoFisher, Waltham, MA) and exposed to hyperfilm ECL.

Fluorescent examination of activated caspase-1

Macrophages (3×10^5 cells/well) were plated overnight onto 8-wells Labtech chambers (Nunc). Cells were then stimulated with LPS for 2h. Stimuli were then added and incubation continued for 4 h. After washing, the cells were stained with the fluorescent specific inhibitor of caspase-1, FAM-YVAD-FMK (5-carboxyfluorescein-Tyr-Val-Ala-Asp-fluoromethylketone, FLICA) according to the manufacturer's instructions (Immunochemistry Technologies, Bloomington, MN). The slides were then washed and mounted for microscopic examination.

Statistical analysis

All experiments were repeated at least three times. For cytokine production, the values reported are the means \pm SD of the results obtained from three independent experiments. Statistical significance was accepted at $P < 0.05$, determined by ANOVA or student's t test depending on the experiments.

Results

PLMs activate inflammasome in a glycan-independent manner

In order to investigate the effects of PLM glycosylation on macrophage activation, we first purified PLMs from *C. albicans* serotype A (SC5314), *C. albicans* serotype B (NIHB) and from the *bmt6* Δ mutant of *C. albicans*. Molecular structural differences between the three different types of PLMs are summarized in the Figure 1A. Fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis (FACE) analyses revealed the major oligomannosides released by acid hydrolysis of PLMs (Figure 1B). As can be seen in the Figure 1 (A and B), PLM from serotype A strains (PLM-A) display a twofold increase in glycan chain length in comparison with PLM from serotype B (PLM-B), and PLM from *bmt6* Δ mutant (PLM-BMT6 Δ) which displays a short, truncated glycan chain.

Because inflammasome plays an essential role in antifungal immunity, we tested whether PLMs with different levels of glycosylation were able to induce caspase-1 activation in macrophage. Then, cells were primed with LPS and stimulated with PLMs, ATP or Alum (used as a positive control for caspase-1 activation) and the cleavage of pro-caspase-1 into active caspase was examined by FLICA (Fluorescent Labeled Inhibitor of Caspases) assay. As shown in the Figure 2A, PLMs (either PLM-A or PLM-BMT6 Δ) were able to activate caspase-1. To further confirm this result, LPS-primed macrophages were stimulated with PLMs and the activation of caspase-1 was monitored by Western blot. The active caspase-1 (p10) was detected in cell lysates of PLMs-stimulated macrophage, irrespective of their glycosylation status (Figure 2B). As expected, LPS-primed murine macrophages did not exhibit significant caspase-1 activation without secondary stimulation (Figure 2B).

To further examine the effect of PLMs on inflammasome activation, cells were primed with LPS and IL-1 β production was evaluated in cell-free supernatants. As shown in the Figure 2C, PLM-A was able to induce the secretion of IL-1 β by primed cells. No cytokine was produced by unprimed cells (data not shown). PLM-B and PLM-BMT6 Δ also induced the secretion of IL-1 β by primed cells, although the amount of cytokine was lower compared to that obtained with PLM-A.

In order to determine whether PLMs must be internalized to induce the activation of caspase-1, LPS-primed macrophages were treated with a known inhibitor of endocytic activity, Latrunculin A. Interestingly, Latrunculin A was not able to inhibit caspase-1 activation induced by any of the tested PLMs (Figure 2D). Altogether, these results demonstrate that PLMs induce inflammasome activation and IL-1 β production in LPS-primed macrophages.

PLMs are not able to induce ROS production in macrophage

Since reactive oxygen species (ROS) have been shown to be one of the main mechanisms involved in caspase-1 activation [23], the effect of purified PLMs on ROS stimulation was also investigated. First, we checked whether *C. albicans* yeast cells of serotype A and B display any difference in their capacity to induce ROS generation in macrophage. As shown in the Figure 2E, although both *C. albicans* serotype A and B were able to stimulate the production of ROS by macrophages, *C. albicans* serotype A induced higher levels of ROS even in comparison with TPA, used as a positive control. In both cases, ROS generation was inhibited by pretreatment with Latrunculin A, indicating that phagocytosis of the yeasts was required for the induction of ROS production by macrophages.

In contrast to *C. albicans* yeast cells, all tested PLMs did not induce any ROS stimulation (Figure 2F). This result suggests that PLMs-induced caspase-1 activation is not linked to ROS generation.

Long-chain oligomannosides of PLM are required for induction of TNF- α in macrophage

We have previously shown that PLM is able to stimulate TNF- α production by macrophage in a Toll-like receptor-dependent manner [13]. Because TNF- α production occurs via a distinct pathway independent of inflammasome and caspase-1 activation, we also checked whether or not glycosylation changes in PLMs would affect their ability to induce TNF- α production. The PLMs isolated from the different sources were first examined for their ability to stimulate TNF- α production by macrophages. As expected [6,13], PLM-A isolated from strain SC5314 (which displays long-chain oligomannosides) was able to induce TNF- α production in a dose-dependent manner and reached a plateau at a PLM-A concentration of 25 μ g/ml (Figure 3A). In contrast, macrophages incubated with PLM-B purified from *C. albicans* serotype B (which displays oligomannoside-type chains of intermediate size) or with PLM-BMT6 Δ from yeast mutant lacking *BMT6* gene (which displays a short truncated glycan chain) did not stimulate significant TNF- α production even at the highest dose tested (Figure 3A). In addition, PLM-A induced levels of TNF- α similar to those observed with 100 μ g/ml of curdlan or 500 ng/ml of Pam3CSK4, used as a positive control for dectin-1 and TLR2 activation, respectively (Figure 3B). These results suggest that the glycan chain in PLMs plays an essential role in inducing TNF- α production in macrophages.

PLM-induced secretion of TNF- α is independent of internalization

Taking into consideration that the molecular differences between the three different types of PLMs (Figure 1A) may affect their intermolecular interactions and lead to a different pattern of internalization and/or interaction with cell surface receptors, we next tested whether Latrunculin A would affect PLM-induced TNF- α . As shown in the Figure 3C, PLM-A was the only molecule able to induce TNF- α production and the pretreatment of macrophages with Latrunculin A had no effect on its capacity to induce TNF- α . As expected, PLM-B and PLM-BMT6 Δ did not stimulate TNF- α production and this result was not changed by pretreatment of the macrophages with Latrunculin A (Figure 3C). Similar to PLM-A, neither curdlan nor Pam3CSK4-stimulated macrophages were affected by pretreatment with Latrunculin A, demonstrating that internalization had no effect on the response to these soluble stimuli (Figure 3D). On the other hand, macrophage pretreatment with Latrunculin A led to a significant decrease in TNF- α production induced by *C. albicans* yeast cells (serotype A), showing that phagocytosis is an important step for host defense against *C. albicans* (Figure 3D). *C. albicans* yeast cells (serotype B), which are similarly phagocytized by macrophages (data not shown), were unable to induce significant production of TNF- α , regardless of whether the macrophages were pretreated with Latrunculin A (Figure 3D). Taking together, these results demonstrate that PLM-A-induced TNF- α production is not dependent on internalization and may involve direct interaction of PLM-A with cell surface receptors.

Galectin-3 interacts with long-chain oligomannosides of PLM and potentiates its activities on macrophage

We have previously shown that galectin-3 acts as a receptor for β -1,2 linked oligomannosides [11], which in association with TLR2 allows macrophages to discriminate between pathogenic and non-pathogenic yeasts based on their cell surface glycans [13]. Therefore, we investigated whether changes in PLM glycosylation would affect its interaction with galectin-3 and interfere with the PLMs capability to stimulate macrophages. First we verified the galectin-3 expression and galectin-3-binding sites levels on the macrophage surface. As expected, J774 macrophages expressed low levels of endogenous galectin-3 (Figure 4A) and the addition of exogenous rGal-3 led to an enhanced level of galectin-3 at the cell surface (Figure 4B). Then, we checked whether the enhanced levels of galectin-3 at the cell surface would interfere with PLM-A-induced TNF- α production in macrophages.

As shown in the Figure 4C, there was no significant difference in TNF- α production when rGal-3-pretreated macrophages were stimulated with PLM-A in comparison with PLM-A stimulation alone. PLM-BMT6 Δ was not able to induce TNF- α even in rGal-3-pretreated macrophages, which displayed increased levels of TNF- α (Figure 4C). Thus, PLM-A had no additive or enhanced effect on rGal-3-pretreated macrophages. Similar results were obtained with curdlan or Pam3CSK4, both of which induced similar levels of TNF- α in rGal-3-pretreated or not macrophages (Figure 4D).

Different results were obtained when rGal-3 was preincubated with increasing concentrations of PLMs prior to addition to macrophages (Figure 5). In this case, compared to macrophages stimulated with rGal-3 or PLM-A alone, the complex rGal-3/PLM-A induced a significant increase in TNF- α production by macrophages (Figure 5A). However, different results were obtained with PLM-B and PLM-BMT6 Δ , both of which did not stimulate TNF- α production even after preincubation with rGal-3 (Figure 5B and 5C, respectively). The addition of lactose, a specific inhibitor of galectin-3, during the preincubation step with rGal-3, decreased but did not abolish the enhancing effect of rGal-3 on PLM-A activity (data not shown). The enhancing effect of rGal-3 on PLM-A activity appears to be specific since no significant effect was observed when curdlan or Pam3CSK4 were preincubated with rGal-3 (Figure 5D). These results demonstrate that soluble galectin-3 may interact with long-chain oligomannosides of PLM-A and potentiates its effects on macrophage activation.

Discussion

The present study was undertaken to examine the role of the glycan moiety of PLM, a glycolipid present in the cell-wall and that plays an important role in the interplay between *C. albicans* and host immune cells [4,6,7,9]. Through a series of experiments, we demonstrated that differential glycosylation of PLM-A, PLM-B and PLM-BMT6 Δ does not affect their capacity to induce caspase-1 activation in murine macrophage-like cell line J774. Although each PLM induced the secretion of IL-1 β , a higher production was observed after stimulation with PLM-A. Long chains of β -1,2-linked mannosides on PLM are essential for PLM-induced TNF- α since PLMs with short (PLM-B) or truncated (PLM-BMT6 Δ) β -1,2-linked mannosides were not able to stimulate TNF- α production in macrophages. In addition, long glycan chains on PLM-A favors the formation of complexes with exogenous galectin-3, a glycan-binding protein secreted by macrophages [24] and that binds to β -1,2 mannosylated compounds [11].

We have previously shown that PLM, a *C. albicans* cell-wall glycolipid bearing β -1,2-linked oligomannosides, induces TNF- α production through an interaction involving galectin-3 and TLR2 [2, 11, 25]. PLM has been shown to interact with host cells and to induce both pro-inflammatory cytokine production [4,6] and apoptosis through the regulation of ERK signaling pathway via regulation of phosphatase MKP-1 [9]. However, until now, the role of the glycan moiety of PLM in macrophage activation has not been completely investigated since there were no mutant yeasts lacking specific mannosyltransferases required for PLM glycosylation. We recently obtained a series of mutants of *C. albicans* altered in their capability to mannosylate different cell wall components [16]. Among them, *bmt6* Δ mutant was shown to be altered in its ability to elongate the glycan arm of the PLM molecule [17], resulting in a short oligomannosidic moiety similar to one of the major PLM components present in *C. albicans* serotype B [10].

Recently, it was demonstrated that *C. albicans* triggers activation of the inflammasome [26, 27] and, therefore, we hypothesized that PLMs may act as a stimulus that activates the inflammasome in macrophages. Surprisingly, both mannosylated PLM and PLM bearing short chains of oligomannosides were able to induce caspase-1 cleavage, a marker of inflammasome activation. However, PLMs-induced caspase-1 activation is not directly related to the glycosylation status of PLM indicating that the lipid core of PLM, which is similar for all PLMs studied, accounts for inflammasome activation. Accordingly, soluble galectin-3 was not able to potentiate PLMs-induced caspase-1 activation (data not shown).

Even though PLMs induce the activation of caspase-1 and secondarily the secretion of IL-1 β , our results demonstrated that none of the PLMs tested were able to induce ROS production, which suggests that PLM-induced inflammasome activation is mediated by Syk-ROS independent pathway, as opposed to other PAMPs such as beta-glucans [26,28]. Since the lipid moiety is involved in the pro-apoptotic activity of PLM through modulation of MKP-1, a phosphatase related to ERK [29], it is possible that the lipid core of PLM plays a major role in caspase-1 activation, independently of ROS production or phagocytosis. Indeed, the structure of the lipid core of PLMs resembles that of lipids present in ceramides [1] which are known to activate Nlrp3 inflammasome [30]. Experiments are in progress to define the role of the lipid core of PLM in inflammasome activation and the IL-1 β secretion processes.

PLM isolated from *C. albicans* serotype A, whose mannosylated arm is composed of long chains of oligomannosides with up to 19 β -1,2-linked mannoses [1], was able to induce strong TNF- α production in macrophages. In comparison, PLM from *C. albicans* serotype B whose glycan moiety is composed of up to 10 mannoses with predominant trimannosides [10], and PLM from *bmt6* Δ mutant of *C. albicans*, which presents only short chains of oligomannosides with up to three linked mannoses, did not stimulate the cells to produce TNF- α . This is in agreement with our previous results [25], which showed that the activity for β -1,2-linked oligomannosides in macrophages was achieved with chains presenting at least four mannose residues, with optimal activity being observed with chains composed of at least eight β -1,2-linked mannoses. This emphasizes the predominant role of sugars in PLM activity since neither PLM-B nor PLM-BMT6 Δ was able to stimulate the cells. We also demonstrated that phagocytosis was not necessary for the PLM-A-induced proinflammatory activity and, therefore, the inhibition of actin polymerization by Latrunculin-A did not modify its properties. This result suggested that long chains of β -1,2-linked mannoses present on PLM-A stimulate TNF- α production by interacting directly with its receptor at the cell membrane. Therefore, enhanced complex formation and endocytosis of PLM displaying incomplete glycosylation do not account for the decreased capability of PLM-B or PLM-BMT6 Δ to stimulate macrophages.

We have previously shown that galectin-3 binds to β -1,2 mannoses from *C. albicans* [11] and is required to discriminate between the pathogenic yeast *C. albicans* from the non-pathogenic *Saccharomyces cerevisiae* [13]. In this study, we demonstrated that soluble rGal-3 potentiates the PLM-induced stimulation of macrophages, as demonstrated for PLM-bearing long chain of β -1,2-linked mannoses (PLM-A). It is not known whether the formation of

complexes between PLM and galectin-3 would enhance secondary binding to TLR2 or to other receptors known to interact with galectin-3 and favor recognition of PLM.

In contrast to soluble galectin-3, increasing the surface-bound galectin-3 level did not result in any further increase in TNF- α production by macrophages. Galectin-3 has been shown to associate with TLR2 [13] but also with other membrane receptors such as Dectin-1, thus favoring the interaction of the yeasts with the macrophage plasma membrane [31]. Galectin-3 is able to interact with other glycoproteins present at the cell membrane, which could increase the binding of PLM to the plasma membrane receptors. In our experimental settings, we can not rule out that surface-bound galectin-3 may indeed lead to an increase in PLM-binding to the cell surface. However, since no increased stimulation was observed in comparison with PLM-A pretreated with rGal-3, we suggest that soluble galectin-3 may affect PLM complex formation, which leads to enhanced activation. Indeed, it has been recently shown that LPS preincubation with galectin-3 decreases the LPS concentration threshold for neutrophil activation [22].

The results of this study show that PLM is able to activate inflammasome pathway through a ROS-independent mechanism. This activity seems to be related to the lipid moiety of the molecule since all tested PLMs were able to induce caspase-1 activation and IL-1 β secretion. On the other hand, the induction of TNF- α production is dependent on the glycan moiety displayed by PLM; PLMs-bearing short length or truncated β -1,2-linked mannosides were not able to stimulate TNF- α production in macrophages. PLM activity is not influenced by phagocytosis, suggesting that the interaction with receptors occurs at the cell membrane. Galectin-3, a host cell receptor for β -1,2-linked mannoses, enhances PLM-induced TNF- α production and may act as an amplifier of inflammatory response caused by *C. albicans*. Altogether, our results show that depending on the pathway examined, both the lipid core and the glycan moiety of PLM are important for macrophage activation.

References

1. Trinel PA, Maes E, Zanetta JP, Delplace F, Coddeville B, *et al.* (2002) *Candida albicans* phospholipomannan, a new member of the fungal mannose inositol phosphoceramide family. *J Biol Chem* 277: 37260-37271.
2. Trinel PA, Plancke Y, Gerold P, Jouault T, Delplace F, *et al.* (1999) The *Candida albicans* phospholipomannan is a family of glycolipids presenting phosphoinositolmannosides with long linear chains of beta-1,2-linked mannose residues. *J Biol Chem* 274: 30520-30526.
3. Trinel PA, Borg-von-Zepelin M, Lepage G, Jouault T, Mackenzie T, *et al.* (1993) Isolation and preliminary characterization of the 14- to 18-kilodalton *Candida albicans* antigen as a phospholipomannan containing beta-1,2-linked oligomannosides. *Infect Immun* 61: 4398-4405.
4. Jouault T, Fradin C, Trinel PA, Bernigaud A, Poulain D (1998) Early signal transduction induced by *Candida albicans* in macrophages through shedding of a glycolipid. *J Infect Dis* 178: 792-802.
5. Poulain D, Slomianny C, Jouault T, Gomez JM, Trinel PA (2002) Contribution of phospholipomannan to the surface expression of beta-1,2-oligomannosides in *Candida albicans* and its presence in cell wall extracts. *Infect Immun* 70: 4323-4328.
6. Jouault T, Ibata-Ombetta S, Takeuchi O, Trinel PA, Sacchetti P, *et al.* (2003) *Candida albicans* phospholipomannan is sensed through toll-like receptors. *J Infect Dis* 188: 165-172.
7. Jouault T, Bernigaud A, Lepage G, Trinel PA, Poulain D (1994) The *Candida albicans* phospholipomannan induces in vitro production of tumour necrosis factor-alpha from human and murine macrophages. *Immunology* 83: 268-273.
8. Ibata-Ombetta S, Jouault T, Trinel PA, Poulain D (2001) Role of extracellular signal-regulated protein kinase cascade in macrophage killing of *Candida albicans*. *J Leukoc Biol* 70: 149-154.
9. Ibata-Ombetta S, Idziorek T, Trinel PA, Poulain D, Jouault T (2003) *Candida albicans* phospholipomannan promotes survival of phagocytosed yeasts through modulation of bad phosphorylation and macrophage apoptosis. *J Biol Chem* 278: 13086-13093.
10. Trinel PA, Delplace F, Maes E, Zanetta JP, Mille C, *et al.* (2005) *Candida albicans* serotype B strains synthesize a serotype-specific phospholipomannan overexpressing a beta-1,2-linked mannotriose. *Mol Microbiol* 58: 984-998.
11. Fradin C, Poulain D, Jouault T (2000) beta-1,2-linked oligomannosides from *Candida albicans* bind to a 32-kilodalton macrophage membrane protein homologous to the mammalian lectin galectin-3. *Infect Immun* 68: 4391-4398.
12. Kohatsu L, Hsu DK, Jegalian AG, Liu FT, Baum LG (2006) Galectin-3 induces death of *Candida* species expressing specific beta-1,2-linked mannans. *J Immunol* 177: 4718-4726.
13. Jouault T, El Abed-El Behi M, Martinez-Esparza M, Breuilh L, Trinel PA, *et al.* (2006) Specific recognition of *Candida albicans* by macrophages requires galectin-3 to discriminate *Saccharomyces cerevisiae* and needs association with TLR2 for signaling. *J Immunol* 177: 4679-4687.

14. Dalle F, Jouault T, Trinel PA, Esnault J, Mallet JM, *et al.* (2003) Beta-1,2- and alpha-1,2-linked oligomannosides mediate adherence of *Candida albicans* blastospores to human enterocytes in vitro. *Infect Immun* 71: 7061-7068.
15. Mille C, Janbon G, Delplace F, Iyata-Ombetta S, Gaillardin C, *et al.* (2004) Inactivation of CaMIT1 inhibits *Candida albicans* phospholipomannan beta-mannosylation, reduces virulence, and alters cell wall protein beta-mannosylation. *J Biol Chem* 279: 47952-47960.
16. Mille C, Bobrowicz P, Trinel PA, Li H, Maes E, *et al.* (2008) Identification of a new family of genes involved in beta-1,2-mannosylation of glycans in *Pichia pastoris* and *Candida albicans*. *J Biol Chem* 283: 9724-9736.
17. Mille C, Fradin C, Delplace F, Trinel PA, Masset A, *et al.* (2012) Members 5 and 6 of the *Candida albicans* BMT family encode enzymes acting specifically on beta-mannosylation of the phospholipomannan cell-wall glycosphingolipid. *Glycobiology* 22: 1332-1342.
18. Gillum AM, Tsay EY, Kirsch DR (1984) Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae* *ura3* and *E. coli* *pyrF* mutations. *Mol Gen Genet* 198: 179-182.
19. Kobayashi H, Shibata N, Nakada M, Chaki S, Mizugami K, *et al.* (1990) Structural study of cell wall phosphomannan of *Candida albicans* NIH B-792 (serotype B) strain, with special reference to ¹H and ¹³C NMR analyses of acid-labile oligomannosyl residues. *Arch Biochem Biophys* 278: 195-204.
20. Gola S, Martin R, Walther A, Dunkler A, Wendland J (2003) New modules for PCR-based gene targeting in *Candida albicans*: rapid and efficient gene targeting using 100 bp of flanking homology region. *Yeast* 20: 1339-1347.
21. Goins TL, Cutler JE (2000) Relative abundance of oligosaccharides in *Candida* species as determined by fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis. *J Clin Microbiol* 38: 2862-2869.
22. Fermino ML, Polli CD, Toledo KA, Liu FT, Hsu DK, *et al.* (2011) LPS-induced galectin-3 oligomerization results in enhancement of neutrophil activation. *PLoS ONE* 6: e26004.
23. Tschopp J, Schroder K (2010) NLRP3 inflammasome activation: The convergence of multiple signalling pathways on ROS production? *Nat rev Immunol* 10: 210-215.
24. Feuk-Lagerstedt E, Jordan ET, Leffler H, Dahlgren C, Karlsson A (1999) Identification of CD66a and CD66b as the major galectin-3 receptor candidates in human neutrophils. *J Immunol* 163: 5592-5598.
25. Jouault T, Lepage G, Bernigaud A, Trinel PA, Fradin C, *et al.* (1995) Beta-1,2-linked oligomannosides from *Candida albicans* act as signals for tumor necrosis factor alpha production. *Infect Immun* 63: 2378-2381.
26. Gross O, Poeck H, Bscheider M, Dostert C, Hanneschläger N, *et al.* (2009) Syk kinase signalling couples to the Nlrp3 inflammasome for anti-fungal host defence. *Nature* 459:433-436.
27. Joly S, Ma N, Sadler JJ, Soll DR, Cassel SL, *et al.* (2009) Cutting edge: *Candida albicans* hyphae formation triggers activation of the Nlrp3 inflammasome. *J Immunol* 183: 3578-3581.

28. Kankkunen P, Teirilä L, Rintahaka J, Alenius H, Wolff H, *et al.* (2010) (1,3)- β -Glucans Activate Both Dectin-1 and NLRP3 Inflammasome in Human Macrophages. *J Immunol* 184:6335-6342.
29. Ibata-Ombetta S, Idziorek T, Trinel PA, Poulain D, Jouault T (2003) Role of phospholipomannan in escape from macrophages and induction of cell apoptosis through regulation of bad phosphorylation. *Ann N Y Acad Sci* 1010: 573-576.
30. Schroder K, Tschopp J (2010) The inflammasomes. *Cell* 140: 821-832.
31. Esteban A, Popp MW, Vyas VK, Strijbis K, Ploegh HL, *et al.* (2011) Fungal recognition is mediated by the association of dectin-1 and galectin-3 in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 14270-14275.

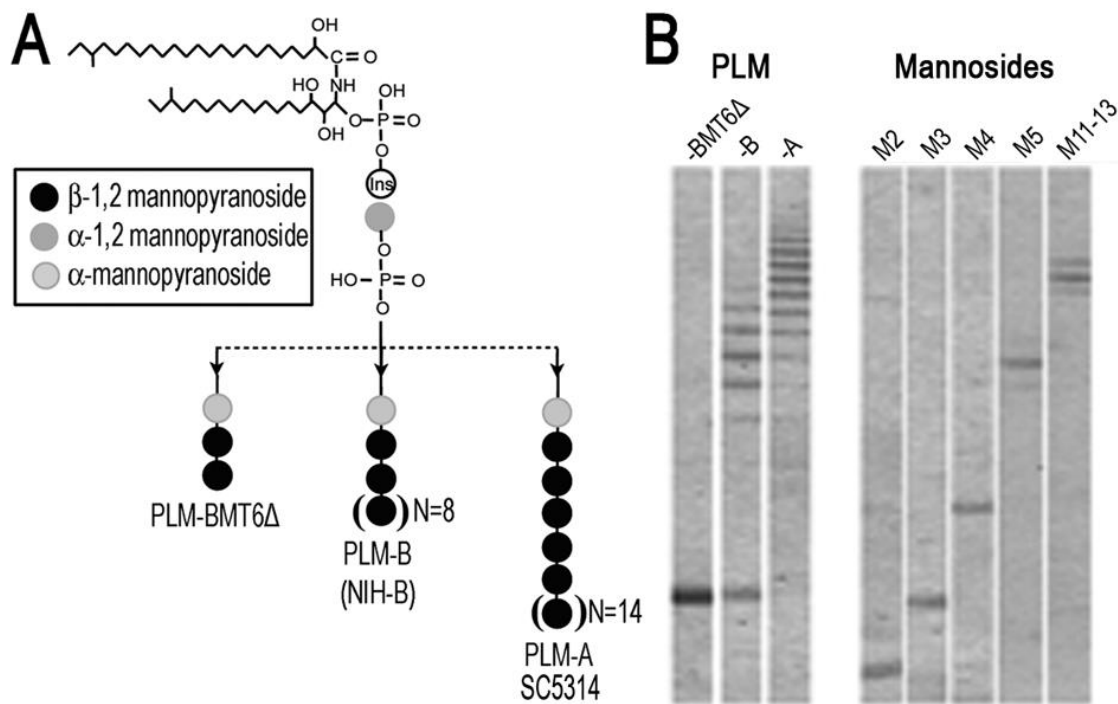


Figure 1. Structural comparison between glycan chains of PLM-A, PLM-B and PLM-BMT6 Δ . (A). General structure of PLMs used in the present study, showing the differences in glycan chain length linked to the lipid backbone. (B). PLM-A was isolated from SC5314, a WT *C. albicans* serotype A strain; PLM-B, isolated from the NIHB strain, a serotype B strain and; PLM-BMT6 Δ , isolated from the *bmt6* Δ mutant. Following, PLMs were submitted to hydrolysis and analyzed by Fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis (FACE) method. The analysis shows the different mannosidic chains released after the hydrolysis protocol. Isolated mannosides (M2, M3, M4, M8, M11-13) were used as control.

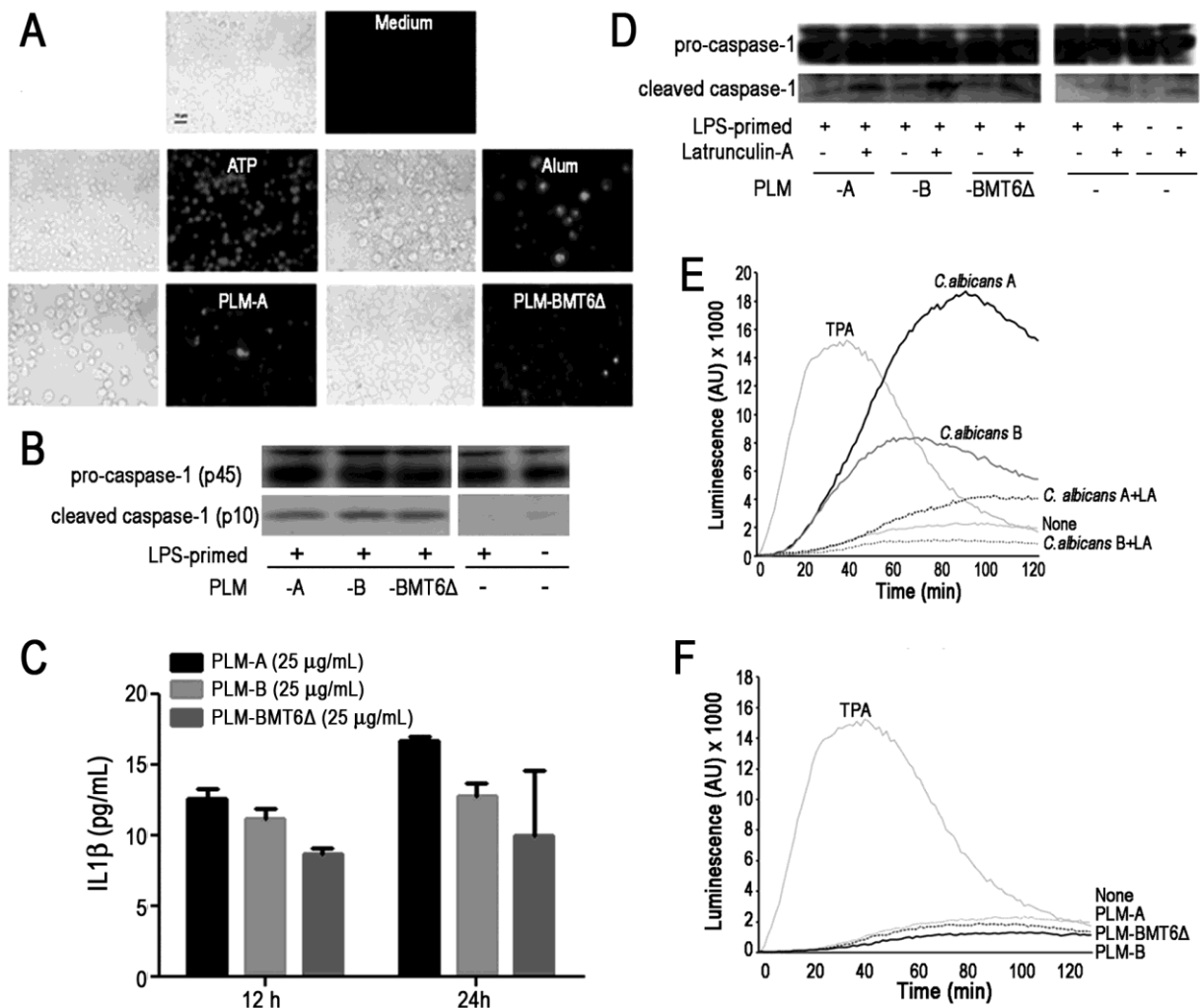


Figure 2. PLMs induce caspase-1 activation independent on ROS production. (A-C). J774 macrophages were primed with LPS (100 ng/ml) for 2h. Then, indicated stimuli were added and cells were cultivated for additional 4h. **(A)**. Caspase-1 activation was revealed by addition of fluorescent FAM-YVAD-FMK and examined by fluorescent microscopy. Adenosine triphosphate (ATP) and Aluminum hydroxide (Alum) were used as positive control for caspase-1 activation. **(B)**. Total pro-caspase-1 and cleaved caspase-1 levels were revealed by western blot analysis. **(C)**. Production of IL-1β after stimulation with PLMs of LPS-primed cells was measured after 12- and 24h-incubation by ELISA. **(D)**. Macrophages were pretreated or not with Latrunculin-A and then stimulated with indicated PLMs. Total pro-caspase-1 and cleaved caspase-1 levels were revealed by western blot analysis. Data are

representative of 4 independent experiments. **(E and F)**. Macrophages were pretreated or not with Latrunculin A for 30min. Live yeast cells at 5 yeast: 1 cell ratio **(E)** or PLMs (50µg/ml) **(F)** were then added. Chemiluminescence was monitored for 2h in the presence of 66 µM of 5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione (luminol). 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA, 100 µM) was used as a positive control. Results are representative of 2 independent experiments.

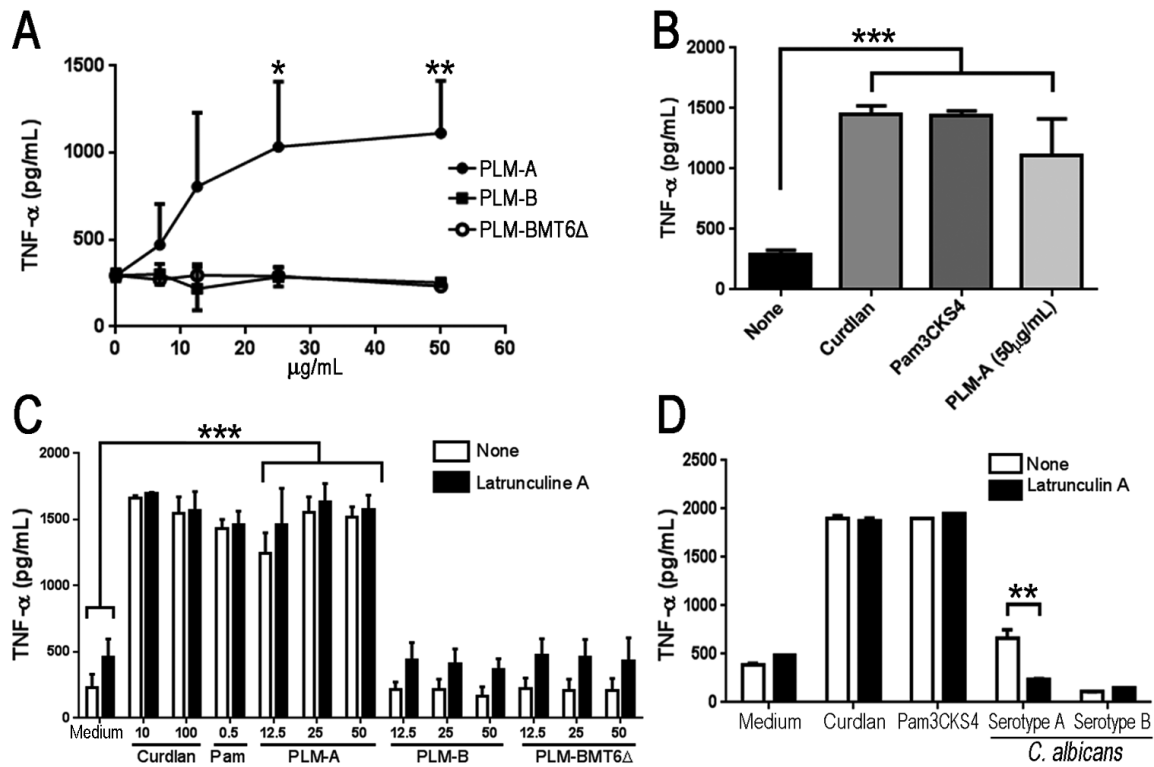


Figure 3. Long chain oligomannosides are required for PLM-induced TNF- α production. (A). J774 macrophages were incubated with increasing concentration of PLM-A (●), PLM-B (■) or PLM-BMT6 Δ (○) and cultivated for 5h at 37°C. Cell culture supernatants were harvested and TNF- α production was evaluated by ELISA. (B). Alternatively, cells were stimulated with PLM-A (50 μ g/ml) or with curdlan (100 μ g/ml) and Pam3CSK4 (500 ng/ml) as positive controls. Data represents the mean \pm standard deviation from 3 independent experiments, each one performed in triplicates. (C and D). J774 macrophages were pretreated (■) or not (□) with Latrunculin A for 30 min prior to PLMs addition at the indicated concentrations (C) or live *C. albicans* serotype A and B yeast cells at a 5 yeast : 1 cell ratio (D). Curdlan and Pam3CSK4 were used as positive controls. TNF- α concentration in cell-free supernatants was determined by ELISA after 4h incubation. Data are representative of two independent experiments performed in triplicates. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.0005$.

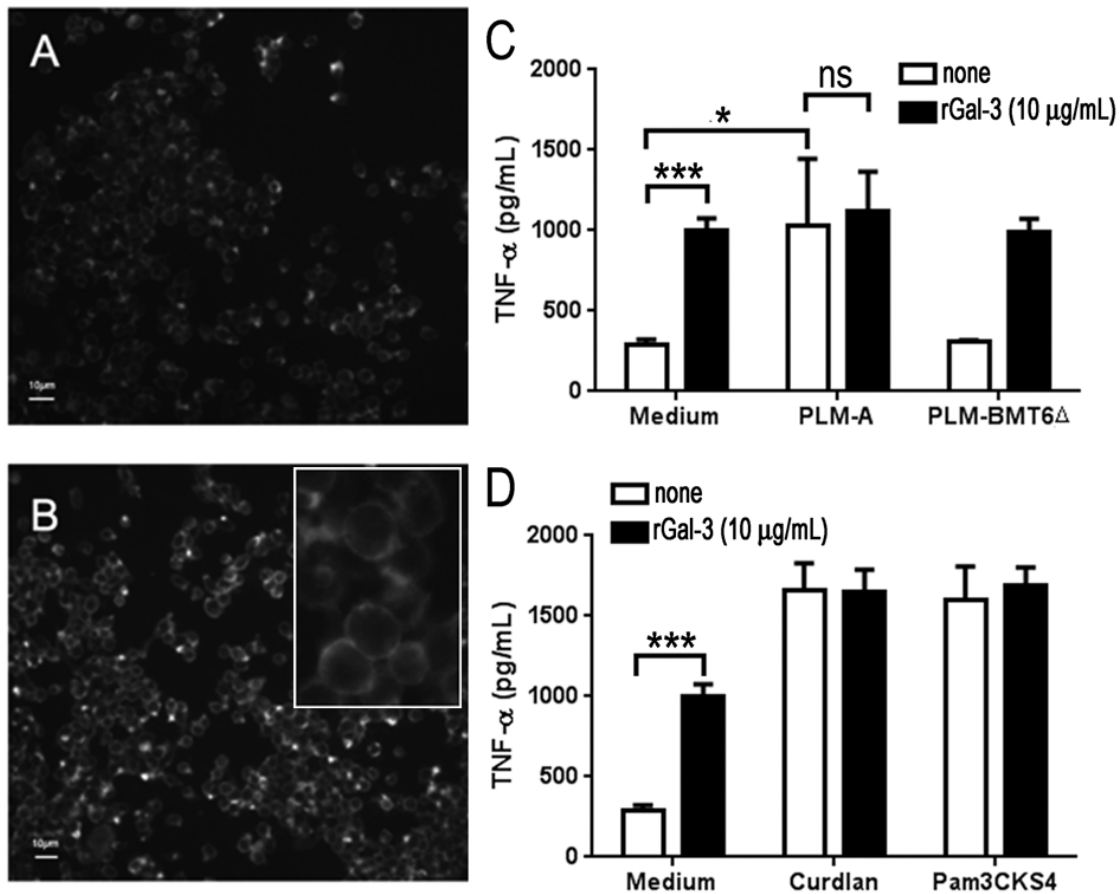


Figure 4. Cell-bound galectin-3 does not potentiate PLM-A-induced TNF- α production.

(A). The levels of endogenous galectin-3 bound to the J774 cell surface were determined by immunofluorescent staining using anti-galectin-3 antibody and FITC-conjugated secondary antibody. Cells were then fixed and analyzed by fluorescence microscopy. (B). Alternatively, cells were incubated with 10 μ g/ml of exogenous rGal-3 for 1h at 20°C before staining and analysis performed as described in (A). Insert shows high magnification of labeled cells. (C and D) Cells were preincubated for 1h with (■) or not (□) 10 μ g/ml of exogenous rGal-3 prior to the addition of 10 μ g/ml of PLM-A or PLM-BMT6 Δ (C) 10 μ g/ml of curdlan or 500 ng/ml of Pam3CSK4 (D). Cells were cultivated for additional 4h. Then, supernatants were collected and TNF- α concentration was determined by ELISA. Results are presented as the mean \pm standard deviation from 3 independent experiments. * p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.0005.

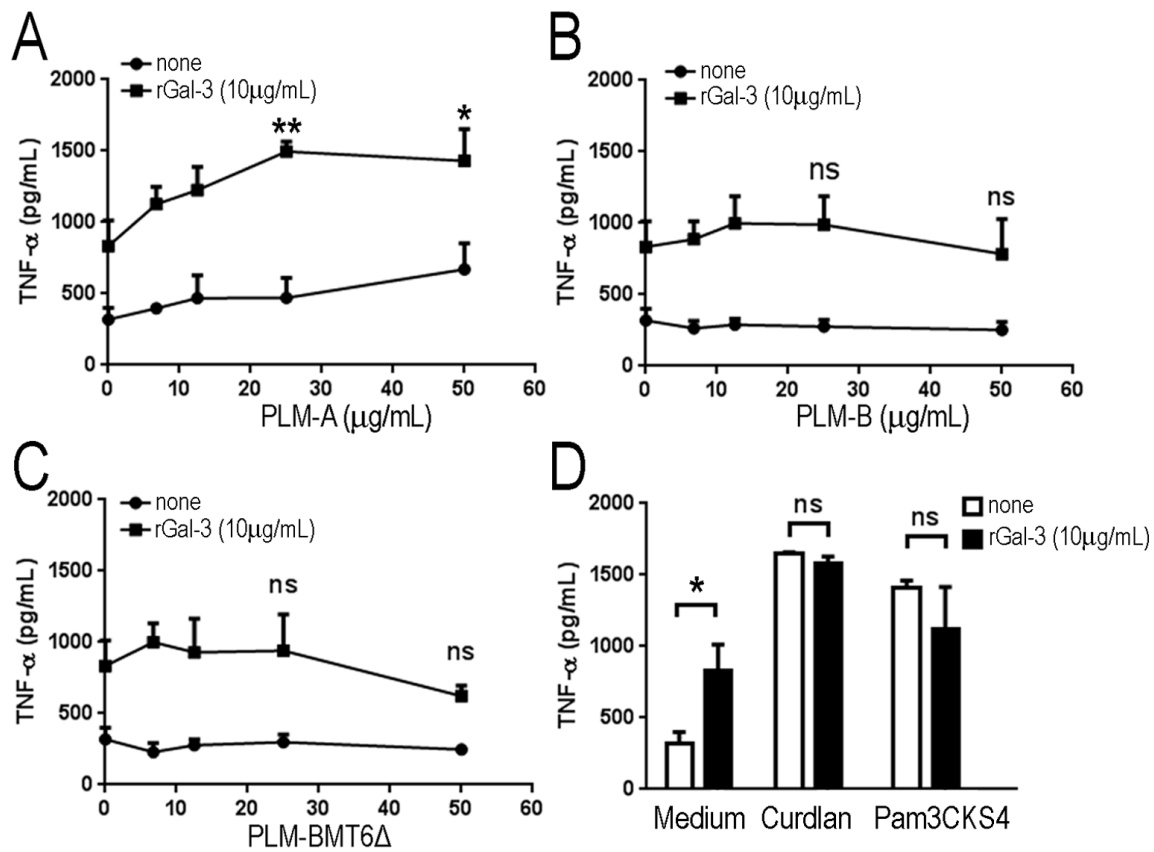


Figure 5. Soluble galectin-3 potentiates PLM-A-induced TNF- α production. Exogenous rGal-3 (10 μ g/ml) was preincubated (■) or not (□) with increasing concentrations of PLM-A (A), PLM-B (B) or PLM-BMT6 Δ (C) for 1h. The mixtures were then added to J774 macrophages and incubated for an additional 4h. TNF- α concentration in cell-free supernatants was determined by ELISA. (D) Exogenous rGal-3 (10 μ g/ml) was preincubated (■) or not (□) with 10 μ g/ml of curdlan or 500 ng/ml of Pam3CSK4. Results are represented as the mean \pm standard deviation from 3 independent experiments. P values refer to the statistical differences between the effect exerted by galectin-3 alone and in association with PLMs. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

IV-Bmt5 n'est pas essentielle à la β -1,2 mannosylation du PLM qui ne contribue pas à l'expression de surface des β -Mans et n'a pas d'impact sur la résistance aux inhibiteurs de la synthèse des β -glucanes

Lors de la caractérisation des enzymes responsables de la β -1,2 mannosylation du PLM, nous avons montré que le PLM du mutant ne synthétisant plus Bmt5, responsable de l'ajout du 1^{er} β -mannose, contient toujours d'infimes quantités de β -Mans avec un DP élevé, suggérant qu'une autre Bmt pouvait partiellement compenser la perte d'activité de Bmt5 (Mille *et al.*, 2012). Les travaux des groupes lillois et japonais ont montré qu'il existe une régulation de l'expression des β -Mans du PPM et des MPs suivant la température et le pH (Kobayashi *et al.*, 1991; Okawa *et al.*, 1994; Trinel *et al.*, 2002a). Le groupe a mis en évidence une régulation distincte de la β -mannosylation du PLM de celle des PPM/MPs en fonction du pH. Au cours de ce travail de thèse, nous avons donc analysé la régulation de l'activité compensatrice de la perte de Bmt5 et nous avons montré qu'elle est favorisée à 28°C et réprimée à pH2, comme l'activité des Bmts des PPM/MPs. Notre attention s'est portée sur Bmt2 qui partage de fortes similarités de séquence avec Bmt5 et qui possède le même accepteur: un phosphomannose. La génération du double mutant *bmt2 Δ /bmt5 Δ* , pour lequel aucun β -Man sur le PLM n'est détecté en western blot, a confirmé que Bmt2 peut compenser l'activité de Bmt5 bien que la perte d'activité de Bmt2 ne soit pas compensée par l'activité de Bmt5 ou d'une autre Bmt. 2- Des études suggèrent que le PLM est un glycolipide présent à la surface des cellules (Poulain *et al.*, 2002). Au cours de notre étude, nous avons montré par immunofluorescence que Bmt1 est essentielle à l'expression des β -Mans à la surface des tubes germinatifs et non des cellules mères car elle partage ce rôle avec une ou d'autres Bmts. Les mutants *bmt2 Δ* , *bmt5 Δ* et *bmt2 Δ /bmt5 Δ* expriment des β -Mans à la surface des levures, des tubes germinatifs et de leurs cellules mères alors que ces différentes formes cellulaires ne sont plus reconnues par les anticorps anti- β -Mans chez le mutant *bmt1 Δ /bmt2 Δ* et du triple mutant *bmt1 Δ /bmt2 Δ /bmt5 Δ* . Ces résultats indiquent que i) seuls les PPM/MPs contribuent à l'expression de surface des β -Mans dans nos conditions expérimentales et que ii) Bmt1 et Bmt2 initient la biosynthèse de ces oligomannosides à la surface des levures et des cellules mères des tubes germinatifs et seule Bmt1 est essentielle à l'expression des β -Mans sur les tubes germinatifs. Différentes conditions de culture sont à étudier (culture sur milieu liquide, modèles d'infection) pour analyser plus finement la (les) localisation(s) du PLM au sein de la paroi.

Lors des tests de sensibilité de nos mutants *bmtsΔ* à différents facteurs (déséquilibre osmotique, oxydation, perturbation de la synthèse de la paroi...) nous avons mis en évidence la résistance plus ou moins importante de trois mutants (*bmt5Δ* << *bmt2Δ/bmt5Δ* = *bmt1Δ/bmt2Δ* / *bmt5Δ*) au rouge congo et au calcofluor. Comme le mutant *bmt2Δ* est très sensible à ces composés, la β-1,2 mannosylation du PLM serait liée à cette résistance. Ces deux colorants anioniques inhiberaient les chitine et glucane synthases en se fixant sur leurs accepteurs (fibrilles en cours de formation). Afin de confirmer la résistance de ces mutants à l'inhibition, entre autre, des glucane synthases, nous avons testé leur susceptibilité aux échinocandines, antifongiques inhibant la β-1,3 glucane synthase. Les résultats montrent qu'il y a bien résistance à l'inhibition de la synthèse du squelette microfibrillaire. Une des hypothèses seraient que le PLM non β-mannosylé soit localisé dans la partie la plus interne de la paroi, protégeant ainsi la levure, par un mécanisme encore à définir, de perturbation de l'intégrité de sa paroi par ces molécules.

Afin d'analyser le rôle du PLM dans la virulence et d'éviter toute interférence avec Gal-3 après fixation sur les β-mans de surface dont la synthèse est initiée par Bmt1 et/ou Bmt2, nous envisageons de comparer les mutants *bmt1Δ/bmt2Δ* et *bmt1Δ* / *bmt2Δ/bmt5Δ*, respectivement avec ou sans PLM β-mannosylé dans les modèles de candidoses disséminées.

Bmt5 is not essential for PLM β -1,2 mannosylation that has no impact on β -Mans surface expression and resistance to glucan synthesis inhibitors

Compensation of *Bmt5* inactivation

Along with identification of Bmts (Bmts 5 and 6) that add β -Mans on PLM, we reported that PLM from *bmt5 Δ mutant still contain some β -Mans with high DP (Mille *et al.*, 2012). Identification of *C. albicans* Bmts and their functions was performed with *bmts* Δ yeast cells (mutants and parental strain) grown at 37°C. This growth temperature might not be optimal as β -Mans from PPM and MPs are more expressed at 28°C than 37°C. We then analyzed β -mannosylation of *bmt5 Δ PLM at 28°C to check if remaining β -Mans on this molecule are more expressed under these conditions. Cells were also grown at acidic pH that inhibits β -Mans biosynthesis on PPM and MPs.**

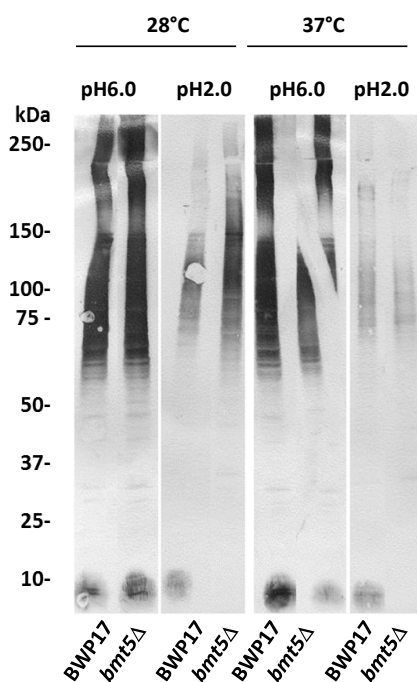
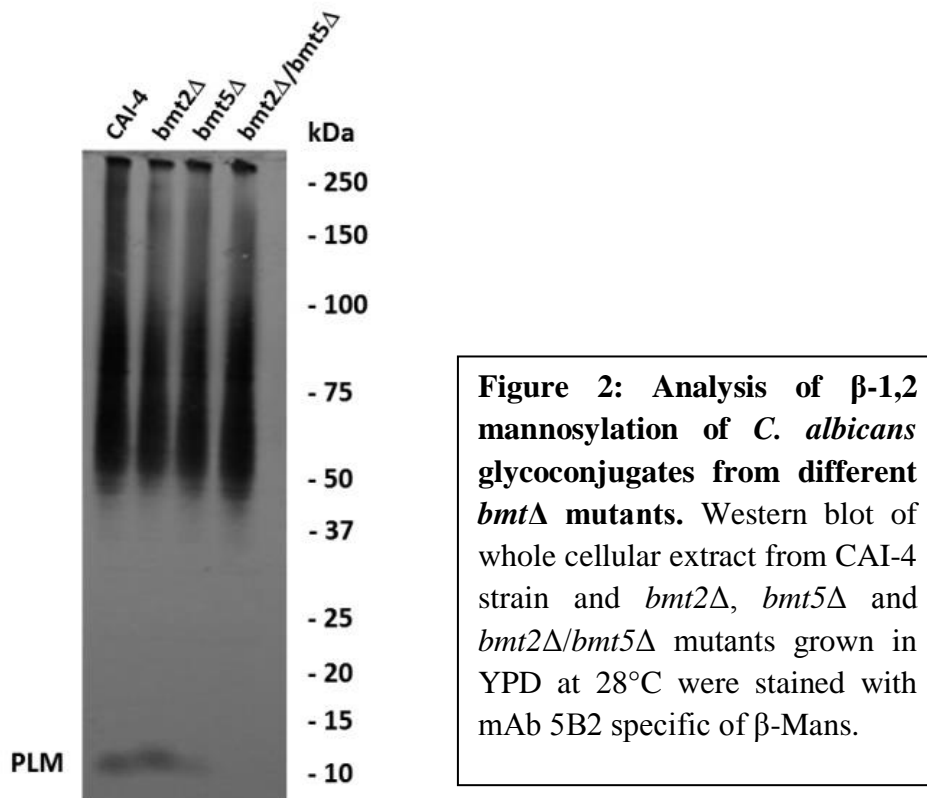


Figure 1: Analysis of β -1,2 mannosylation of *C. albicans* glycoconjugates. Western blot of whole cellular extract from BWP17 strain and *bmt5* Δ grown in YPD medium at 28 or 37°C and at pH2 or pH6 stained with mAb 5B2 specific for β -Mans.

Western blot analysis of whole cell extracts with anti- β -Mans monoclonal antibody clearly shows that only PLM β - 1,2 mannosylation is affected in *bmt5* Δ mutant. By contrast with parental strain (BWP17), this mutant has no more PLM detected when cells were grown at acidic pH. However at pH6, *bmt5* Δ PLM was either weakly or equally β - 1,2 mannosylated when cells were grown at 37°C or 28°C, respectively. The loss of Bmt5 activity is then compensated by the activity of another Bmt whose expression is enhanced at 28°C and repressed at pH2. We hypothesized that Bmt2 could be this enzyme as 1- its activity is

dependent on temperature and pH, 2- it shares strong similarities with Bmt5 and 3- it has the same acceptor than Bmt5: a phosphomannose. We generated then a double mutant *bmt2Δ/bmt5Δ* and checked for the presence of β -Mans on its PLM in the optimal condition for the compensation: growth at 28°C and pH6.0.



No more PLM was detected in whole cell extract of *bmt2* Δ /*bmt5* Δ , demonstrating that Bmt2 can add β -Mans not only on PPM phosphomannose but also on PLM phosphomannose, compensates by the loss of Bmt5 activity in *bmt5* Δ mutant. Surprisingly, loss of Bmt2 activity in *bmt2* Δ is not compensated by Bmt5 or any other enzyme (Mille 2008). An hypothesis could be uttered concerning the role of Bmt2 in PLM β -mannosylation. Bmt2 and Bmt5 could indeed add β -Mans on two very similar but distinct glycosphingolipids with Bmt6 elongating β -Mans on both molecules. Analysis of PLM from *bmt5* Δ /*bmt6* Δ and from *bmt8* Δ /*bmt6* Δ will help us to understand the role of Bmt2 in PLM β -mannosylation.

Location of PLM in the cell wall

The relative strict specificities of Bmts allowed us to generate different tools, mainly mutants and expression probes, to analyze specific traits of selective β -1,2 mannosylated glycoconjugates. Enzymes adding the 1st β - mannose are very valuable as their inactivation

will avoid β -1,2 mannosylation of specific conjugates. We have generated different single (*bmt1* Δ , *bmt2* Δ and *bmt5* Δ), double (*bmt1* Δ /*bmt2* Δ and *bmt2* Δ /*bmt5* Δ) and triple (*bmt1* Δ /*bmt2* Δ , *bmt5* Δ) mutants. We didn't generate *bmt1* Δ /*bmt5* Δ mutant as *bmt5* loss is compensated by *bmt2*. These mutants display different β -1,2 mannosylated glycoconjugates as detected by western blotting with anti- β -Mans monoclonal antibody.

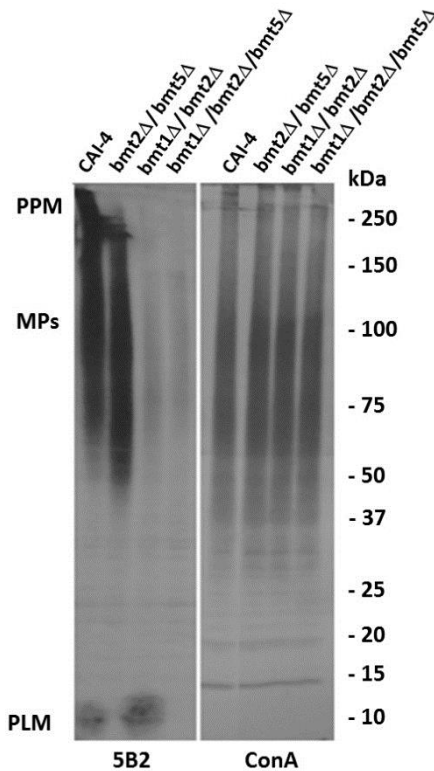


Figure 3: β -1,2 mannosylation and α -mannosylation of glycoconjugates from different mutants. Western blot of whole cellular extract from CAI-4 strain and *bmt1* Δ /*bmt2* Δ , *bmt2* Δ /*bmt5* Δ , *bmt1* Δ /*bmt2* Δ /*bmt5* Δ mutants were stained with mAb 5B2, specific for β -Mans and ConA lectin, specific for terminal α -mannosyl glucosyl

Different β -mannosylation patterns can be observed:

- *bmt2* Δ /*bmt5* Δ mutant has only β -Mans in PPM and MPs heteropolymers
- *bmt1* Δ /*bmt2* Δ mutant carries only β -Mans in its PLM
- *bmt1* Δ /*bmt2* Δ /*bmt5* Δ mutant has no β -Man

These mutants and their parental strain are equally α -mannosylated. Using these mutants and the single ones, we could determine which molecule contribute to surface expression of β -Mans. From the different assays presented in this thesis, we could summarize immunofluorescence assays performed with the different knock-out strains.

	Yeasts	Hyphae	
		Mother cells	Germ tubes
CAI-4	+	+	+
<i>bmt1</i> Δ	+	+	-
<i>bmt2</i> Δ	+	+	+
<i>bmt5</i> Δ	+	+	+
<i>bmt1</i> Δ/ <i>bmt2</i> Δ	-	-	-
<i>bmt2</i> Δ/ <i>bmt5</i> Δ	+	+	+
<i>bmt1</i> Δ/ <i>bmt2</i> Δ/ <i>bmt5</i> Δ	-	-	-

Table 1: Reactivity of mAb 5B2, specific for β -Mans with a mannoiose as minimal epitope, with *bmts*Δ mutants and their parental strains as assayed by immunofluorescence.

If Bmt1 is crucial for β -Mans expression at the surface of germ tubes, Bmt5 is dispensable for expression of these oligomannosides at the surface of the different cell morphologies of *C. albicans* as *bmt1*Δ/*bmt2*Δ mutant that displays β -Mans only on PLM is not recognized by the anti- β -Mans like the β -Mans negative *bmt1*Δ/*bmt2*Δ/ *bmt5*Δ mutant. This would suggest that PLM is not located at the surface of the cell wall as widely admitted. If this conclusion is true for *C. albicans* cells grown in liquid medium, it might be otherwise for cells grown on solid medium as demonstrated in earlier studies (Poulain *et al.*, 2002), as well as cells during *in vivo* infections. This will be part of future projects of the group. The different mutants will also be tested for their pro- or anti-inflammatory properties in *in vitro* and *in vivo* studies.

Inhibition of PLM β -1,2 mannosylation enhances resistance to inhibitors of β -glucan synthesis

The different *bmts*Δ mutants were tested for their susceptibility to different chemical agents inducing osmotic stress, oxidative stress or disruption of cell wall homeostasis. Following these drop test assays, we could highlight that three strains display different level of resistance to Congo red and calcofluor (*bmt5*Δ<<*bmt2*Δ/*bmt5*Δ=*bmt1*Δ/*bmt2*Δ /*bmt5*Δ). These two anionic dyes are believed to inhibit chitin and β -glucan synthases after binding to nascent β -1,3 glucan or chitin fibers. As *bmt2*Δ is highly sensitive to these compounds, PLM β -1,2 mannosylation is probably associated to this resistance. *BMT5* mutation is not sufficient to have the full effect because of the compensation by Bmt2.

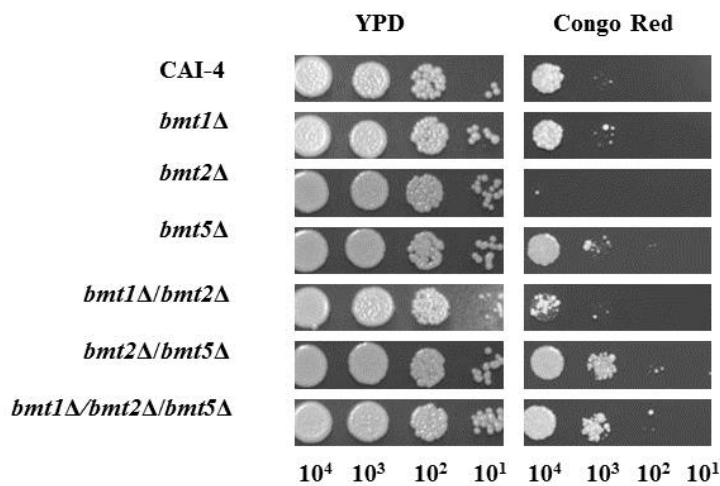


Figure 4: Sensitivity of *C. albicans* cells to Congo Red. Serial 10-fol dilution of CAI-4 strain, *bmt1Δ*, *bmt2Δ*, *bmt5Δ*, *bmt1Δ/bmt2Δ*, *bmt2Δ/bmt5Δ*, *bmt1Δ/bmt2Δ/bmt5Δ* mutants were inoculated on YPD agar medium containing or not 100μg/mL Congo Red.

These mutants were also resistant to echinocandins, antifungal drug that inhibit the β -1,3 glucan synthase then synthesis of β-glucans.

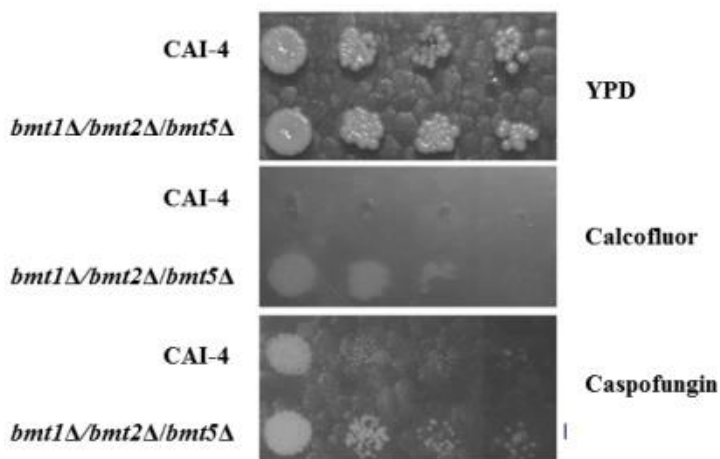


Figure 5: Sensitivity of *C. albicans* cells to Calcofluor and Caspofungin. Serial 10-fol dilution of CAI-4 strain, *bmt1Δ/bmt2Δ/bmt5Δ* mutants were inoculated on YPD agar medium containing or not 100μg/mL Calcofluor or Caspofungin.

Materials and methods

Fungal strains, preculture and growth conditions

All strains used in this study are listed in Table 1. Pre-cultured cells were obtained by growing yeast cells overnight at 37°C in YPD broth (1% yeast extract, 2% Bactopeptone, 2% glucose) with continuous shaking at 150 rpm. The cells were washed twice and resuspended in 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS).

For yeast cells, cells were inoculated into YPD broth at a density of 10^6 cells ml^{-1} and grown at 28°C or 37°C with continuous shaking at 150 rpm until the optical density at 600 nm of the

culture was 1.0 (approximately 2×10^7 cells ml^{-1}). Hyphae were obtained after inoculation of RPMI medium (Invitrogen) with cells at a density of 5×10^6 cells ml^{-1} and incubation 3h at 37°C with continuous shaking at 150 rpm. Cells were monitored microscopically to ensure that they had the expected morphologies.

Lectin and monoclonal antibodies

Biotinylated concanavalin A (Con A) specific for terminal α -D-mannosyl and α -D-glucosyl residues was purchased from Sigma. MAbs 5B2 and 26G7 (rat-mouse immunoglobulin M [IgM] and mouse IgM, respectively) are specific for β -Mans (Elguezabal *et al.*, 2009; Elguezabal *et al.*, 2004; Trinel *et al.*, 1992). MAb 5B2 recognizes β -Mans with a manno-1,2-mannobiose as minimal epitope while mAb 26G7 is specific for β -Mans at the non-reducing ends of α -1,2-Mans from *N*-glycans.

Whole-cell protein extraction and western analysis

Cells were washed twice with 50 mM Tris buffer (pH 8.0). Cells were suspended in lysis buffer (50 mM Tris [pH 8.0], 10 mM EDTA, protease inhibitors [protease inhibitor cocktail setIV; Calbiochem]), lysed and homogenized by vortexing with acid-washed glass beads (0.5 mm; Sigma) for 30 min at 4°C. Lysates were then incubated 15 min at 100°C to solubilized PPM and chilled 5min on ice. Loading buffer was added to equal amount of each sample in order to have the following final concentrations: 2% SDS, 50mM Tris pH 6.8, 10% glycerol and 2% β -mercaptoethanol. Samples were boiled 5 min and centrifuged 5 min at 10000g. Supernatants were analyzed by SDS–polyacrylamide gel electrophoresis [PAGE; (Laemmli, 1970)] on 5–20% or 8-16% acrylamide gel slabs. Membranes were probed, as previously 1 described (Fradin *et al.*, 2008), with mAbs 5B2 diluted 1:2000 and 26G7 diluted 1:1000 and 2 then incubated with a 1:2000 dilution of alkaline phosphatase-conjugated anti-rat IgM or anti-3 mouse IgM, respectively. Enzyme activity was detected with nitroblue tetrazolium and 5-4 bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (Promega) diluted in 0.1 M Tris (pH 9.5), 0.15 M NaCl, 5 5 mM MgCl_2 .

For lectin staining, membranes were incubated with biotinylated ConA diluted 1:1000 and 7 then incubated with HRP-labeled Streptavidin (AbCam). Peroxidase activity was detected 8 with diaminobenzidine (SIGMAFAST DAB; Sigma).

Indirect immunofluorescence assays

Hyphal cells were fixed with formalin and coated on 10 wells slides (Thermoscientific). Wells 5 were washed with PBS-BSA, blocked with PBS containing 5% BSA and incubated 1h at 37°C with monoclonal antibodies or biotinylated ConA, all diluted 1:500 in PBS. Wells were washed with PBS-BSA and incubated with a 1:100 dilution of the corresponding RPE-conjugated anti-Ig or FITC-conjugated streptavidin, all containing 0.002% of Evans blue counterstain. After wells were washed, slides were mounted and visualized by fluorescent microscopy.

Phenotypic characterization of C. albicans bmtsA mutants

To determine the sensitivity to chemical and antifungal agents, 2µl of serial 1:10 dilutions of an overnight culture were spotted onto YPD/YNB agar plates containing 100µg/ml Congo red, 100µg/ml caspofungin, 100µg/ml calcofluor, 100µg/ml hygromycin, 5µg/ml fluconazole, amphotericin B 1µg/ml, H₂O₂ 1 and 5 mM, SDS 0.01%, NaCl 1M, CaCl₂ 50mM. Plates were incubated at 37°C for 1 to 3 days.

Table1. C. albicans strains used in this study

Strain	Parental strain	Genotype	Reference
BWP17 + Clp10	RM1000	<i>arg4::hisG/arg4::hisG;his1::hisG/his1::hisG;ura3Δ::limm434/ura3Δ::limm434, RPS10/rps1Δ::Clp10</i>	(Wilson <i>et al.</i> , 1999)
<i>bmt5Δ</i> + Clp10	BWP17	<i>bmt5Δ::ARG4/bmt5Δ::HIS1, RPS10/rps1Δ::Clp10</i>	(Mille <i>et al.</i> , 2012)
CAI-4+Clp10	CAI-4	<i>RPS10::rps10Clp10-URA3</i>	Courjol <i>et al.</i> , submitted
<i>bmt1Δ</i> +Clp10	<i>bmt1Δ</i>	As <i>bmt1Δ</i> but <i>bmt1Δ::dpl200/bmt1Δ::dpl200, RPS10/rps1Δ::Clp10</i>	Courjol <i>et al.</i> , submitted
<i>bmt2Δ</i> +Clp10	<i>bmt2Δ</i>	As <i>bmt2Δ</i> but <i>bmt2Δ::dpl200/bmt2Δ::dpl200, RPS10/rps1Δ::Clp10</i>	Courjol <i>et al.</i> , submitted
<i>bmt5Δ</i> +Clp10	<i>bmt5Δ</i>	As <i>bmt5Δ</i> but <i>bmt5Δ::dpl200/bmt5Δ::dpl200, RPS10/rps1Δ::Clp10</i>	Courjol <i>et al.</i> , submitted
<i>bmt1 Δ/bmt2Δ</i>	<i>bmt2Δ</i>	As CAI-4 but <i>bmt1Δ::dpl200/bmt1Δ::dpl200,bmt2Δ::dpl200/bmt2Δ::dpl200</i>	Courjol <i>et al.</i> , submitted
<i>bmt2 Δ/bmt5Δ</i>	<i>bmt2Δ</i>	As CAI-4 but <i>bmt2Δ::dpl200/bmt2Δ::dpl200,bmt5Δ::dpl200/bmt5Δ::dpl200</i>	Courjol <i>et al.</i> , submitted
<i>bmt1Δ/bmt2 Δ /bmt5Δ</i> +Clp10	<i>bmt2 Δ/bmt5Δ</i>	As CAI-4 but <i>bmt1Δ::dpl200/bmt1Δ::dpl200,bmt2Δ::dpl200/bmt2Δ::dpl200, bmt5Δ::dpl200/bmt5Δ::dpl200, RPS10/rps1Δ::Clp10</i>	Courjol <i>et al.</i> , submitted

DISCUSSION

La paroi est un élément important tant au niveau des échanges avec le milieu extérieur, que de l'adhérence et de l'antigénicité de *C. albicans*. Elle est le point de contact et d'attachement de la levure aux tissus qu'elle colonise et aux composants cellulaires et humoraux de l'hôte. La paroi est une structure dynamique et complexe composée majoritairement de sucres avec une importante diversité glycanique. De nombreuses études ont montré l'importance de l'interface glycobiologique entre *C. albicans* et son hôte dans les mécanismes de pathogénie (Klis, 1994; Poulain and Jouault, 2004). Cette interface est complexe et loin d'être complètement élucidée en ce qui concerne les codes glycaniques exprimés par la levure et leurs récepteurs chez les cellules hôtes. Parmi les glycannes exprimés par *C. albicans* l'attention de certains groupes (Cutler, 1991; Gomez *et al.*, 1996; Mille *et al.*, 2008; Singleton *et al.*, 2005; Suzuki *et al.*, 1995) s'est focalisée sur les β -Mans dont la présence est relativement rare dans le monde vivant. Les β -Mans ont été décrits comme éléments importants de la virulence de *C. albicans* qui agissent à différentes étapes du processus d'infection, comprenant la colonisation mucoale et l'immunomodulation (Dalle *et al.*, 2003; Dromer *et al.*, 2002; Fradin *et al.*, 1996; Ibata-Ombetta *et al.*, 2003a; Jouault *et al.*, 1997; Poulain and Jouault, 2004). Les mécanismes de reconnaissance des β -Mans par l'hôte dépendent de leur degré de polymérisation (Jouault *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1998) et des molécules qui les portent (Hobson *et al.*, 2004; Mille *et al.*, 2004). Des analyses chimiques ont montré que les β -Mans sont associés au PPM, fraction peptidique fortement glycosylée et liée de manière non-covalente à la paroi, et au PLM, glycolipide du groupe des MIPCs (Kobayashi *et al.*, 1990; Shibata *et al.*, 1989; Shibata *et al.*, 1985; Trinell *et al.*, 1999). La biosynthèse des β -Mans sur ces deux molécules est catalysée par six Bmts appartenant à une famille de neuf membres. Bmts1 à 4 sont impliquées dans la biosynthèse du PPM (Mille *et al.*, 2008) et Bmts5 et 6 agissent au niveau du PLM (Mille *et al.*, 2012). Ces enzymes ont une spécificité assez stricte de la molécule porteuse et de l'étape de β -1,2 mannosylation. Cette spécificité nous a permis de générer des outils (mutants et sondes) pour approfondir nos connaissances sur l'expression et la localisation des β -Mans, leur régulation ainsi que leur impact dans la virulence de *C. albicans*.

Il était jusqu'à présent admis que les différentes MP's pariétales étaient β -mannosylées comme le PPM et donc que leurs fractions *O*- et *N*- glycaniques étaient identiques. Cette structure hypothétique des glycannes des MP's n'a jamais été confirmée expérimentalement.

En 2008, notre équipe a montré que les différentes MPs pariétales, liées de manière non-covalente ou covalente comme les GPI-MPs et MPs alcali solubles, sont β -1,2 mannosylées comme décrit précédemment (Cantelli *et al.*, 1995; Trinel *et al.*, 1992) au niveau de leurs N-glycannes mais également au niveau de leurs O-glycannes comme il a été décrit chez *P. pastoris* (Fradin *et al.*, 2008; Vinogradov *et al.*, 2000). Nous avons montré que Bmt1 et 3 sont responsables de la β -mannosylation des O-mannosides des MPs (Courjol *et al.*, submitted). Elles agissent sur un O-mannotriose α -mannosylé dont la biosynthèse fait intervenir deux membres de la famille des α -1,2 Mnts, Mnt1 et Mnt2. Ce résultat est cohérent car ce substrat correspond aux chaînes latérales α -1,2 mannosidiques des N-glycannes du PPM qui peuvent être β -1,2 mannosylées par Bmt1 et Bmt3. Comme ces chaînes latérales, les O-mannosides peuvent être présents sous forme d'homopolymères (α -1,2 mannosides) ou d'hétéropolymères β -mannosylés (α -1,2 mannosides terminés par un β -1,2 mannoside) avec des DP variables mais à ce jour, aucun α -1,3 mannoside terminal n'a été détecté sur les O-mannosides. Ce résultat est surprenant puisque d'autres levures comme *S. cerevisiae* expriment des α -1,3 mannosides terminaux. Il est possible que les différentes techniques utilisées pour analyser les O-mannosides de *C. albicans* ne puissent pas les détecter. De plus, les α -1,3 mannosyltransférases n'ont été que très récemment identifiées (Bates *et al.*, 2013).

Les études structurales du PPM de *C. albicans* n'ont pas détecté de β -Mans sur ses O-mannosides (Hayette *et al.*, 1992; Shibata *et al.*, 2012). La purification du PPM comprend une étape de précipitation à la liqueur de Fehling qui a potentiellement β -éliminé une partie de ses O-mannosides et donc rendu indetectable les hétéropolymères β -mannosylés. Il se peut également que le PPM ne contienne pas ces hétéropolymères ce qui suggèrerait que le PPM et les MPs ont des fractions glycaniques distinctes. Cette hypothèse n'est pas invraisemblable car notre travail a montré que Bmt1 est essentielle à la β -mannosylation des MPs alors qu'elle partage cette activité avec Bmt2 au niveau du PPM. Il n'est pas exclu que les MPs contiennent un phosphomannose non β -mannosylé au niveau de leur N-glycane comme chez *S. cerevisiae*. Afin de répondre à ces questions, il est nécessaire d'identifier la fraction peptidique du PPM. Une collaboration avec l'équipe de Yann Guerardel (UMR8576 du CNRS) porte sur l'analyse du PPM potentiellement tronqué du mutant *bmt7* Δ . En effet ce mutant, qui n'affiche pas de défaut de β -mannosylation particulier, a un PPM de faible poids moléculaire lié certainement à la synthèse de chaînes glycaniques plus courtes par un mécanisme non élucidé. Ce PPM a donc un ratio glycane/peptide plus faible qu'un PPM sauvage qui permettrait l'identification de sa fraction peptidique.

De nombreuses études réalisées à l'aide d'anticorps ou de β -Mans libérés du PPM par hydrolyse acide ou de synthèse, ont mis en évidence des propriétés d'adhérence (Dalle *et al.*, 2003; Dromer *et al.*, 2002; Fradin *et al.*, 1996; Fradin *et al.*, 2000; Li and Cutler, 1993) et immunomodulatrices (Han and Cutler, 1995; Ibata-Ombetta *et al.*, 2003b; Ibata-Ombetta *et al.*, 2001; Jouault *et al.*, 1997; Jouault *et al.*, 1995; Torosantucci *et al.*, 2009) des β -Mans. Ces études ne permettent pas de conclure quant à la contribution des β -Mans dans la virulence de *C. albicans*. En effet certaines d'entre elles ne montrent que l'activité de β -Mans libres, alors qu'au sein de la paroi ils sont entourés d'autres motifs glycaniques ayant également des activités biologiques parfois antagonistes. Les études montrant le rôle protecteur des anticorps anti- β -Mans ne différencient pas l'effet antifongique (opsonisation ou apoptose) de l'effet inhibiteur de l'activité biologique (adhérence ou immunomodulation) des β -Mans (Han *et al.*, 1999; Ibata-Ombetta *et al.*, 2003b). L'effet inhibiteur des β -Mans de synthèse sur la colonisation digestive des souriceaux nouveaux-nés par la levure peut également avoir différentes interprétations: i) les β -Mans inhibent l'adhérence de *C. albicans* sur les parois digestives; ii) les β -Mans affectent positivement l'homéostasie de l'épithélium digestif inhibant la colonisation par la levure. Récemment, il a en effet été montré que des β -glucanes purifiés préviennent de la colonisation digestive grâce à leurs effets anti-inflammatoires dans un modèle murin de colite chimio-induite (Jawhara *et al.*, 2012). Le modèle utilisé par Dromer *et al.*, n'est pas basé sur l'induction d'une inflammation mais sur une immunité mucoale immature qui pourrait être stimulée par les β -Mans, molécules immunomodulatrices, pour prévenir la colonisation (Dromer *et al.*, 2002).

Afin de définir le rôle des β -Mans pariétaux dans différentes étapes d'infection à *C. albicans*, il est nécessaire de comparer la virulence de souches de même background génétique exprimant ou non ces oligomannosides. La découverte des gènes codant pour les Bmts, a été une avancée majeure pour étudier la relation directe de la biosynthèse des β -Mans avec la pathogénicité (Mille *et al.*, 2008). Les MPs déterminent les propriétés de surface permettant à *C. albicans* d'adhérer aux tissus de l'hôte et de moduler la réponse immune (Chaffin *et al.*, 1998). Nous avons donc analysé l'impact de leurs β -Mans sur ces fonctions en générant le mutant *bmt1* Δ . Contrairement à ce qui était attendu, le mutant *bmt1* Δ est plus virulent dans deux modèles murins de candidoses disséminées: augmentation de la mortalité des souris et de la translocation de la levure dans les organes. Les β -Mans sont liés à des α -1,2 mannosides qui possèdent de fortes activités immunomodulatrices et leur démasquage par l'inactivation de *Bmt1* influenceraient leur rôle dans la virulence (Bates *et al.*, 2013; Hall *et al.*, 2013).

Ces α -1,2 mannosides ont également un rôle majeur dans l'adhérence et la virulence de la levure (Munro *et al.*, 2005). Cependant les études montrant le rôle de ces mannosides lors de l'infection ont été réalisées avec des mutants dépourvus d' α -mannosyltransférases agissant dans les premières étapes de mannosylation. Ces études ne tiennent donc pas compte de l'effet de la délétion sur la conformation des protéines et donc sur leurs activités possiblement liées à la croissance de la levure et donc à sa virulence. Par ailleurs, le mutant *bmt1* Δ exprime encore les autres Bmts agissant au niveau du PPM et du PLM qui peuvent moduler les réponses immunes (Jouault *et al.*, 1997; Jouault *et al.*, 2003; Jouault *et al.*, 1995). Les β -Mans de ces conjugués ne sont pas impliqués puisqu'une souche dépourvue de β -Mans (*bmt1* Δ /*bmt2* Δ /*bmt5* Δ) est aussi virulente que le mutant *bmt1* Δ . La question est donc de savoir si les β -Mans masquent les « véritables » facteurs contribuant à la virulence ou permettent à l'hôte d'éliminer *C. albicans*. Des souches de sérotype B de *C. albicans* se comportent comme des mutants naturels *bmt1* Δ . En effet, elles n'expriment pas de β -Mans sur les chaînes α -1,2 mannosidiques des N-glycannes (Shibata *et al.*, 1992) et des O-mannanes (Voir travaux II). Ces souches exprimeraient donc ces « véritables » facteurs de virulence et devraient être fréquemment isolées en milieu hospitalier. Aucune étude épidémiologique ne conforte cette hypothèse et les souches de sérotype B ne sont pas plus virulentes dans des modèles de candidoses disséminées (Hasenclever and Mitchell, 1961b). Par contre, les β -Mans peuvent générer une réponse protectrice anticorps dépendante qui protègent les animaux immunisés contre des candidoses vaginales et disséminées (Han *et al.*, 1997; Xin *et al.*, 2008). Les anticorps ainsi produits par l'hôte permettent l'élimination de *C. albicans* via les β -Mans qui sont alors les cibles du système immunitaire. L'hôte possède également une lectine soluble, Gal-3, décrite pour fixer les β -Mans (Fradin *et al.*, 2000) et tuer *C. albicans* après fixation (Kohatsu *et al.*, 2006). Gal-3 permet également l'opsonisation de la levure et sa phagocytose par les neutrophiles murins (Linden *et al.*, 2013b). Ainsi des souris Gal-3^{-/-} sont plus sensibles à l'infection systémique à *C. albicans* que les souris wild type (Linden *et al.*, 2013a). Dans nos modèles de dissémination, la souche de référence, contrairement au mutant *bmt1* Δ /*bmt2* Δ /*bmt5* Δ , est certainement reconnue par Gal-3 et éliminée, au moins partiellement, via cette lectine. La différence de charge fongique entre ces deux souches expliquerait alors les résultats de virulence obtenus. Les modèles animaux utilisés dépendent en effet du nombre de cellules de *C. albicans* injectées (MacCallum and Odds, 2005). Le mutant *bmt1* Δ est aussi virulent que le mutant *bmt1* Δ /*bmt2* Δ /*bmt5* Δ , allant à l'encontre de cette hypothèse sauf si i) Gal-3 reconnaît préférentiellement les β -Mans dont la synthèse est

initiiée par Bmt1 ; ii) Bmt1 est essentielle pour l'expression des β -Mans de surface. Des expériences sont en cours de réalisation pour analyser la survie des différents mutants *bmts* Δ après incubation avec Gal-3 recombinante humaine (rhGal-3) en présence ou non de phagocytes. L'action antifongique de Gal-3 sera également analysé sur les souches de sérotype A et B ainsi que sur les formes levures et mycéliennes. La contribution du PPM, PLM et MPs dans l'expression de surface des β -Mans a été étudié par immunofluorescence avec les mutants n'ayant des β -Mans que sur le PLM (*bmt1* Δ /*bmt2* Δ) ou sur les α -1,2 mannosides des MPs et du PPM (*bmt2* Δ /*bmt5* Δ) et de leurs intermédiaires, tous générés au cours de ce travail. Bmt1 et Bmt2 initient la synthèse des β -Mans de surface des levures et cellules mères des formes mycéliennes tandis que Bmt1 est essentielle à l'expression de surface des β -Mans au niveau des tubes germinatifs, associés à la virulence. Bmt1 a donc un rôle majeur dans l'expression des ligands de Gal-3 à la surface de la levure. Nous avons donc utilisé des souris Gal3^{-/-} pour réévaluer la virulence du mutant n'exprimant plus de β -Mans. Dans le modèle de candidoses disséminées, Gal-3 a un rôle important dans la réponse contre *C. albicans* puisque la souche de référence est plus virulente chez les souris Gal3^{-/-} que chez les souris sauvages. Par contre, *bmt1* Δ /*bmt2* Δ /*bmt5* Δ est moins virulent que la souche de référence chez les souris Gal3^{-/-}. Ces résultats montrent que si les β -Mans permettent à l'hôte d'éliminer *C. albicans*, ils peuvent également devenir des facteurs de virulence lorsque les conditions leur sont favorables. Il y a donc, entre autre, une balance entre régulation de l'expression de Gal-3 par l'hôte et modulation de la β -mannosylation par *C. albicans*. Il a été montré qu'après incubation avec la levure, les macrophages surexpriment Gal-3. Il sera également intéressant de doser le taux de cette lectine dans les sérums de patients colonisés ou infectés et de sujets sains colonisés ou non.

L'expression des β -Mans pariétaux est sous le contrôle de mécanismes de régulation dépendants des souches de *C. albicans* et des conditions environnementales qui affectent la β -1,2 mannosylation des molécules ainsi que leur localisation dans la paroi (Poulain *et al.*, 2002; Trinel *et al.*, 2002b). Nous avons montré une corrélation entre l'expression des β -Mans et l'expression des gènes codant pour les Bmts qui les synthétisent. *BMT1* et *BMT2* sont plus exprimés à 28°C qu'à 37°C permettant à la levure de réduire son taux de β -Mans en surface dans des conditions de température physiologique. Ces gènes sont également moins exprimés à pH acide, condition retrouvée dans le tube digestif plus particulièrement dans l'estomac très colonisé par la levure dans les modèles expérimentaux de colonisation. Cette modulation d'expression des β -Mans pourrait permettre à la levure d'échapper à Gal-3 dans des

conditions physiologiques. Nous avons montré dans un modèle murin de colonisation digestive que les souches dépourvues d'activité *Bmt1* étaient plus colonisantes. Nous avons identifié un polymorphisme du gène *BMT1* permettant de différencier les souches de sérotypes A et B. En effet, nous avons décelé une délétion de 19 bases en début d'ORF de ce gène. Cela induit un décalage du cadre de lecture avec l'apparition précoce d'un codon STOP aboutissant certainement à la synthèse d'une enzyme tronquée et donc inactive. Ces résultats sont d'autant plus intéressants que la séquence mutée est précédée par 14 bases identiques aux dernières bases de cette mutation, suggérant une possible recombinaison à l'origine de la conversion des souches de sérotype A en sérotype B. Cette recombinaison pourrait permettre à *C. albicans* de s'adapter à un environnement particulier favorable à sa croissance. Les souches de sérotype B sont plus résistantes à la 5-fluorocytosine (5-FC) que les souches de sérotype A (Auger *et al.*, 1979). Nous avons pensé à un lien entre la recombinaison au niveau de *BMT1* et la résistance à la 5-FC mais il a été montré qu'un changement nucléotidique de la cytosine à la thymine dans le gène de l'uracil phosphoribosyltransferase, *FURI*, de *C. albicans* est responsable de cette résistance (Dodgson *et al.*, 2004). Différents essais de recombinaison sont envisagés : i) incubations successives de souches de sérotype A avec des phagocytes (macrophages et neutrophiles) en présence ou non de rGal-3 ; ii) passages successifs de ces souches dans les modèles murins de colonisation et de dissémination (Voir Travaux Personnels IV) en présence ou non de rGal-3 ; iii) incubations successives des souches avec rGal-3. Il pourra être envisagé d'ajouter de la 5-FC à ces différents tests.

Le moyen le plus efficace pour *C. albicans* d'échapper à Gal-3 est de ne pas exprimer les glycoconjugués β -mannosylés à la surface. Le PLM qui a longtemps été décrit comme molécule de surface de la levure semble être un de ses glycoconjugués. La génération de mutants *bmts* Δ multiples a permis de réévaluer l'expression de surface du PLM même si nous devons vérifier que l'inactivation de *Bmt1* et *Bmt2* ne modifie pas la localisation sauvage du PLM. Les β -Mans de cette molécule ne sont en effet pas accessibles aux anticorps anti- β -Mans disponibles dans le groupe. Le PLM peut ainsi échapper à Gal-3 et par la suite induire des réponses pro-inflammatoires par les macrophages (Devillers*, Courjol* *et al.*, 2013). Cette molécule pourrait avoir cette activité après sécrétion dans le milieu extracellulaire ou après dégradation de la paroi (phagocytose,...) (Devillers*, Courjol* *et al.*, 2013). Nous avons montré que *C. albicans* induit les réponses pro-inflammatoires par les macrophages uniquement après phagocytose appuyant cette hypothèse (Devillers*, Courjol* *et al.*, 2013). Le PLM est en effet sécrété dans le milieu extracellulaire en présence de macrophages

(Jouault *et al.*, 2009) Les réponses pro- et anti-inflammatoires des différents mutants *bmtsΔ* seront analysées afin de mieux approfondir nos conclusions quant au rôle néfaste ou bénéfique des β -Mans pour l'hôte au cours des infections.

BIBLIOGRAPHIE

- Al-Aidroos, K., and H. Bussey, 1978, Chromosomal mutants of *Saccharomyces cerevisiae* affecting the cell wall binding site for killer factor: *Can J Microbiol*, v. 24, p. 228-37.
- Albrecht, A., A. Felk, I. Pichova, J. R. Naglik, M. Schaller, P. de Groot, D. Maccallum, F. C. Odds, W. Schäfer, F. Klis, M. Monod, and B. Hube, 2006, Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteases of *Candida albicans* target proteins necessary for both cellular processes and host-pathogen interactions: *J Biol Chem*, v. 281, p. 688-94.
- Aratani, Y., H. Koyama, S. Nyui, K. Suzuki, F. Kura, and N. Maeda, 1999, Severe impairment in early host defense against *Candida albicans* in mice deficient in myeloperoxidase: *Infect Immun*, v. 67, p. 1828-36.
- Aratani, Y., F. Kura, H. Watanabe, H. Akagawa, Y. Takano, K. Suzuki, M. C. Dinauer, N. Maeda, and H. Koyama, 2002, Relative contributions of myeloperoxidase and NADPH-oxidase to the early host defense against pulmonary infections with *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*: *Med Mycol*, v. 40, p. 557-63.
- Ashman, R. B., A. Fulurija, and J. M. Papadimitriou, 1996, Strain-dependent differences in host response to *Candida albicans* infection in mice are related to organ susceptibility and infectious load: *Infect Immun*, v. 64, p. 1866-9.
- Auger, P., C. Dumas, and J. Joly, 1979, A study of 666 strains of *Candida albicans*: correlation between serotype and susceptibility to 5-fluorocytosine: *J Infect Dis*, v. 139, p. 590-4.
- Ballou, C., 1976, Structure and biosynthesis of the mannan component of the yeast cell envelope: *Adv Microb Physiol*, v. 14, p. 93-158.
- Ballou, C. E., 1990, Isolation, characterization, and properties of *Saccharomyces cerevisiae* mnn mutants with nonconditional protein glycosylation defects: *Methods Enzymol*, v. 185, p. 440-70.
- Ballou, D. L., 1975, Genetic control of yeast mannan structure: mapping genes *mnn2* and *mnn4* in *Saccharomyces cerevisiae*: *J Bacteriol*, v. 123, p. 616-9.
- Bates, S., R. A. Hall, J. Cheetham, M. G. Netea, D. M. Maccallum, A. J. Brown, F. C. Odds, and N. A. Gow, 2013, Role of the *Candida albicans* MNN1 gene family in cell wall structure and virulence: *BMC Res Notes*, v. 6, p. 294.
- Bates, S., H. B. Hughes, C. A. Munro, W. P. Thomas, D. M. MacCallum, G. Bertram, A. Atrih, M. A. Ferguson, A. J. Brown, F. C. Odds, and N. A. Gow, 2006, Outer chain N-glycans are required for cell wall integrity and virulence of *Candida albicans*: *J Biol Chem*, v. 281, p. 90-8.
- Bates, S., D. M. MacCallum, G. Bertram, C. A. Munro, H. B. Hughes, E. T. Buurman, A. J. Brown, F. C. Odds, and N. A. Gow, 2005, *Candida albicans* Pmr1p, a secretory pathway P-type Ca²⁺/Mn²⁺-ATPase, is required for glycosylation and virulence: *J Biol Chem*, v. 280, p. 23408-15.
- Beeler, T., K. Gable, C. Zhao, and T. Dunn, 1994, A novel protein, CSG2p, is required for Ca²⁺ regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: *J Biol Chem*, v. 269, p. 7279-84.
- Bendel, C. M., D. J. Hess, R. M. Garni, M. Henry-Stanley, and C. L. Wells, 2003, Comparative virulence of *Candida albicans* yeast and filamentous forms in orally and intravenously inoculated mice: *Crit Care Med*, v. 31, p. 501-7.
- Bennett, M. K., and R. H. Scheller, 1993, The molecular machinery for secretion is conserved from yeast to neurons: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 90, p. 2559-63.
- Bennett, R. J., M. A. Uhl, M. G. Miller, and A. D. Johnson, 2003, Identification and characterization of a *Candida albicans* mating pheromone: *Mol Cell Biol*, v. 23, p. 8189-201.
- Bonhomme, J., and C. d'Enfert, 2013, *Candida albicans* biofilms: building a heterogeneous, drug-tolerant environment: *Curr Opin Microbiol*, v. 16, p. 398-403.

- Boone, C., A. Sdicu, M. Laroche, and H. Bussey, 1991, Isolation from *Candida albicans* of a functional homolog of the *Saccharomyces cerevisiae* KRE1 gene, which is involved in cell wall beta-glucan synthesis: *J Bacteriol*, v. 173, p. 6859-64.
- Boone, C., S. S. Sommer, A. Hensel, and H. Bussey, 1990, Yeast KRE genes provide evidence for a pathway of cell wall beta-glucan assembly: *J Cell Biol*, v. 110, p. 1833-43.
- Braun, P. C., and R. A. Calderone, 1978, Chitin synthesis in *Candida albicans*: comparison of yeast and hyphal forms: *J Bacteriol*, v. 133, p. 1472-7.
- Brodsky, I. E., and D. Monack, 2009, NLR-mediated control of inflammasome assembly in the host response against bacterial pathogens: *Semin Immunol*, v. 21, p. 199-207.
- Brown, G. D., P. R. Taylor, D. M. Reid, J. A. Willment, D. L. Williams, L. Martinez-Pomares, S. Y. Wong, and S. Gordon, 2002, Dectin-1 is a major beta-glucan receptor on macrophages: *J Exp Med*, v. 196, p. 407-12.
- Brown, J. L., Z. Kossaczka, B. Jiang, and H. Bussey, 1993, A mutational analysis of killer toxin resistance in *Saccharomyces cerevisiae* identifies new genes involved in cell wall (1-->6)-beta-glucan synthesis: *Genetics*, v. 133, p. 837-49.
- Brown, V., J. A. Sexton, and M. Johnston, 2006, A glucose sensor in *Candida albicans*: *Eukaryot Cell*, v. 5, p. 1726-37.
- Bugarcic, A., K. Hitchens, A. G. Beckhouse, C. A. Wells, R. B. Ashman, and H. Blanchard, 2008, Human and mouse macrophage-inducible C-type lectin (Mincle) bind *Candida albicans*: *Glycobiology*, v. 18, p. 679-85.
- Burda, P., and M. Aebi, 1999, The dolichol pathway of N-linked glycosylation: *Biochim Biophys Acta*, v. 1426, p. 239-57.
- Burda, P., C. A. Jakob, J. Beinhauer, J. H. Hegemann, and M. Aebi, 1999, Ordered assembly of the asymmetrically branched lipid-linked oligosaccharide in the endoplasmic reticulum is ensured by the substrate specificity of the individual glycosyltransferases: *Glycobiology*, v. 9, p. 617-25.
- Bussey, H., 1991, K1 killer toxin, a pore-forming protein from yeast: *Mol Microbiol*, v. 5, p. 2339-43.
- Buurman, E. T., C. Westwater, B. Hube, A. J. Brown, F. C. Odds, and N. A. Gow, 1998, Molecular analysis of CaMnt1p, a mannosyl transferase important for adhesion and virulence of *Candida albicans*: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 95, p. 7670-5.
- Cabib, E., and B. Bowers, 1975, Timing and function of chitin synthesis in yeast: *J Bacteriol*, v. 124, p. 1586-93.
- Calderon, J., M. Zavrel, E. Ragni, W. A. Fonzi, S. Rupp, and L. Popolo, 2010, PHR1, a pH-regulated gene of *Candida albicans* encoding a glucan-remodelling enzyme, is required for adhesion and invasion: *Microbiology*, v. 156, p. 2484-94.
- Calderone, R. A., and W. A. Fonzi, 2001, Virulence factors of *Candida albicans*: *Trends Microbiol*, v. 9, p. 327-35.
- Cantelli, C., P. A. Trinel, A. Bernigaud, T. Jouault, L. Polonelli, and D. Poulain, 1995, Mapping of beta-1,2-linked oligomannosidic epitopes among glycoconjugates of *Candida* species: *Microbiology*, v. 141 (Pt 10), p. 2693-7.
- Cantorna, M. T., and E. Balish, 1990, Mucosal and systemic candidiasis in congenitally immunodeficient mice: *Infect Immun*, v. 58, p. 1093-100.
- Chaffin, W. L., 2008, *Candida albicans* cell wall proteins: *Microbiol Mol Biol Rev*, v. 72, p. 495-544.
- Chaffin, W. L., J. L. López-Ribot, M. Casanova, D. Gozalbo, and J. P. Martínez, 1998, Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression: *Microbiol Mol Biol Rev*, v. 62, p. 130-80.
- Chandra, J., D. M. Kuhn, P. K. Mukherjee, L. L. Hoyer, T. McCormick, and M. A. Ghannoum, 2001, Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance: *J Bacteriol*, v. 183, p. 5385-94.

- Chattaway, F. W., M. R. Holmes, and A. J. Barlow, 1968, Cell wall composition of the mycelial and blastospore forms of *Candida albicans*: *J Gen Microbiol*, v. 51, p. 367-76.
- Chen, J., S. Lane, and H. Liu, 2002, A conserved mitogen-activated protein kinase pathway is required for mating in *Candida albicans*: *Mol Microbiol*, v. 46, p. 1335-44.
- Cheng, S. C., L. A. Joosten, B. J. Kullberg, and M. G. Netea, 2012, Interplay between *Candida albicans* and the mammalian innate host defense: *Infect Immun*, v. 80, p. 1304-13.
- Chiang, L. Y., D. C. Sheppard, V. M. Bruno, A. P. Mitchell, J. E. Edwards, and S. G. Filler, 2007, *Candida albicans* protein kinase CK2 governs virulence during oropharyngeal candidiasis: *Cell Microbiol*, v. 9, p. 233-45.
- Chibana, H., J. L. Beckerman, and P. T. Magee, 2000, Fine-resolution physical mapping of genomic diversity in *Candida albicans*: *Genome Res*, v. 10, p. 1865-77.
- Clemons, K. V., G. M. Gonzalez, G. Singh, J. Imai, M. Espiritu, R. Parmar, and D. A. Stevens, 2006, Development of an orogastrointestinal mucosal model of candidiasis with dissemination to visceral organs: *Antimicrob Agents Chemother*, v. 50, p. 2650-7.
- Clemons, K. V., J. L. Spearow, R. Parmar, M. Espiritu, and D. A. Stevens, 2004, Genetic susceptibility of mice to *Candida albicans* vaginitis correlates with host estrogen sensitivity: *Infect Immun*, v. 72, p. 4878-80.
- Cole, G. T., A. A. Halawa, and E. J. Anaissie, 1996, The role of the gastrointestinal tract in hematogenous candidiasis: from the laboratory to the bedside: *Clin Infect Dis*, v. 22 Suppl 2, p. S73-88.
- Cowen, L. E., and W. J. Steinbach, 2008, Stress, drugs, and evolution: the role of cellular signaling in fungal drug resistance: *Eukaryot Cell*, v. 7, p. 747-64.
- Cuenca-Estrella, M., E. Mellado, T. M. Díaz-Guerra, A. Monzón, and J. L. Rodríguez-Tudela, 2000, Susceptibility of fluconazole-resistant clinical isolates of *Candida* spp. to echinocandin LY303366, itraconazole and amphotericin B: *J Antimicrob Chemother*, v. 46, p. 475-7.
- Cutler, J. E., 1991, Putative virulence factors of *Candida albicans*: *Annu Rev Microbiol*, v. 45, p. 187-218.
- Dalle, F., T. Jouault, P. A. Trinel, J. Esnault, J. M. Mallet, P. d'Athis, D. Poulain, and A. Bonnin, 2003, Beta-1,2- and alpha-1,2-linked oligomannosides mediate adherence of *Candida albicans* blastospores to human enterocytes in vitro: *Infect Immun*, v. 71, p. 7061-8.
- Damiens, S., P. M. Danze, A. S. Drucbert, L. Choteau, T. Jouault, D. Poulain, and B. Sendid, 2013, Characterization of the recognition of *Candida* species by mannose-binding lectin using surface plasmon resonance: *Analyst*, v. 138, p. 2477-82.
- de Groot, P. W., A. D. de Boer, J. Cunningham, H. L. Dekker, L. de Jong, K. J. Hellingwerf, C. de Koster, and F. M. Klis, 2004, Proteomic analysis of *Candida albicans* cell walls reveals covalently bound carbohydrate-active enzymes and adhesins: *Eukaryot Cell*, v. 3, p. 955-65.
- Dean, N., 1999, Asparagine-linked glycosylation in the yeast Golgi: *Biochim Biophys Acta*, v. 1426, p. 309-22.
- Diamond, R. D., F. Oppenheim, Y. Nakagawa, R. Krzesicki, and C. C. Haudenschild, 1980, Properties of a product of *Candida albicans* hyphae and pseudohyphae that inhibits contact between the fungi and human neutrophils in vitro: *J Immunol*, v. 125, p. 2797-804.
- Dickson, R. C., E. E. Nagiec, M. Skrzypek, P. Tillman, G. B. Wells, and R. L. Lester, 1997, Sphingolipids are potential heat stress signals in *Saccharomyces*: *J Biol Chem*, v. 272, p. 30196-200.
- Dodgson, A. R., K. J. Dodgson, C. Pujol, M. A. Pfaller, and D. R. Soll, 2004, Clade-specific flucytosine resistance is due to a single nucleotide change in the *FUR1* gene of *Candida albicans*: *Antimicrob Agents Chemother*, v. 48, p. 2223-7.
- Domer, J. E., 1989, *Candida* cell wall mannan: a polysaccharide with diverse immunologic properties: *Crit Rev Microbiol*, v. 17, p. 33-51.
- Douglas, L. J., 2003, *Candida* biofilms and their role in infection: *Trends Microbiol*, v. 11, p. 30-6.

- Dromer, F., R. Chevalier, B. Sendid, L. Improvisi, T. Jouault, R. Robert, J. M. Mallet, and D. Poulain, 2002, Synthetic analogues of beta-1,2 oligomannosides prevent intestinal colonization by the pathogenic yeast *Candida albicans*: *Antimicrob Agents Chemother*, v. 46, p. 3869-76.
- Díaz-Jiménez, D. F., H. M. Mora-Montes, A. Hernández-Cervantes, J. P. Luna-Arias, N. A. Gow, and A. Flores-Carreón, 2012, Biochemical characterization of recombinant *Candida albicans* mannosyltransferases Mnt1, Mnt2 and Mnt5 reveals new functions in O- and N-mannan biosynthesis: *Biochem Biophys Res Commun*, v. 419, p. 77-82.
- Eckert, S. E., W. J. Heinz, K. Zakikhany, S. Thewes, K. Haynes, B. Hube, and F. A. Mühlshlegel, 2007, PGA4, a GAS homologue from *Candida albicans*, is up-regulated early in infection processes: *Fungal Genet Biol*, v. 44, p. 368-77.
- Eggimann, P., J. Garbino, and D. Pittet, 2003, Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients: *Lancet Infect Dis*, v. 3, p. 685-702.
- Eisenhaber, B., P. Bork, and F. Eisenhaber, 2001, Post-translational GPI lipid anchor modification of proteins in kingdoms of life: analysis of protein sequence data from complete genomes: *Protein Eng*, v. 14, p. 17-25.
- Eisenhaber, B., S. Maurer-Stroh, M. Novatchkova, G. Schneider, and F. Eisenhaber, 2003, Enzymes and auxiliary factors for GPI lipid anchor biosynthesis and post-translational transfer to proteins: *Bioessays*, v. 25, p. 367-85.
- Eisenhaber, B., G. Schneider, M. Wildpaner, and F. Eisenhaber, 2004, A sensitive predictor for potential GPI lipid modification sites in fungal protein sequences and its application to genome-wide studies for *Aspergillus nidulans*, *Candida albicans*, *Neurospora crassa*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*: *J Mol Biol*, v. 337, p. 243-53.
- Elguezabal, N., J. L. Maza, M. D. Moragues, and J. Pontón, 2009, Monoclonal antibody-mediated inhibition of adhesion of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to human epithelial cells: *Eur J Oral Sci*, v. 117, p. 474-8.
- Elguezabal, N., J. L. Maza, and J. Pontón, 2004, Inhibition of adherence of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to a resin composite restorative dental material by salivary secretory IgA and monoclonal antibodies: *Oral Dis*, v. 10, p. 81-6.
- Elorza, M. V., A. Marcilla, R. Sanjuán, S. Mormeneo, and R. Sentandreu, 1994, Incorporation of specific wall proteins during yeast and mycelial protoplast regeneration in *Candida albicans*: *Arch Microbiol*, v. 161, p. 145-51.
- Faurschou, M., and N. Borregaard, 2003, Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation: *Microbes Infect*, v. 5, p. 1317-27.
- Filler, S. G., B. O. Ibe, P. M. Luckett, J. U. Raj, and J. E. Edwards, 1991, *Candida albicans* stimulates endothelial cell eicosanoid production: *J Infect Dis*, v. 164, p. 928-35.
- Finkel, J. S., and A. P. Mitchell, 2011, Genetic control of *Candida albicans* biofilm development: *Nat Rev Microbiol*, v. 9, p. 109-18.
- Fradin, C., T. Jouault, A. Mallet, J. M. Mallet, D. Camus, P. Sinaÿ, and D. Poulain, 1996, Beta-1,2-linked oligomannosides inhibit *Candida albicans* binding to murine macrophage: *J Leukoc Biol*, v. 60, p. 81-7.
- Fradin, C., D. Poulain, and T. Jouault, 2000, beta-1,2-linked oligomannosides from *Candida albicans* bind to a 32-kilodalton macrophage membrane protein homologous to the mammalian lectin galectin-3: *Infect Immun*, v. 68, p. 4391-8.
- Fradin, C., M. C. Slomianny, C. Mille, A. Masset, R. Robert, B. Sendid, J. F. Ernst, J. C. Michalski, and D. Poulain, 2008, Beta-1,2 oligomannose adhesin epitopes are widely distributed over the different families of *Candida albicans* cell wall mannoproteins and are associated through both N- and O-glycosylation processes: *Infect Immun*, v. 76, p. 4509-17.
- Fratti, R. A., P. H. Belanger, M. A. Ghannoum, J. E. Edwards, and S. G. Filler, 1998, Endothelial cell injury caused by *Candida albicans* is dependent on iron: *Infect Immun*, v. 66, p. 191-6.

- Gallagher, P. J., D. E. Bennett, M. C. Henman, R. J. Russell, S. R. Flint, D. B. Shanley, and D. C. Coleman, 1992, Reduced azole susceptibility of oral isolates of *Candida albicans* from HIV-positive patients and a derivative exhibiting colony morphology variation: *J Gen Microbiol*, v. 138, p. 1901-11.
- Gantner, B. N., R. M. Simmons, S. J. Canavera, S. Akira, and D. M. Underhill, 2003, Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2: *J Exp Med*, v. 197, p. 1107-17.
- Ghannoum, M. A., K. Abu el-Teen, and S. S. Radwan, 1987, Blocking adherence of *Candida albicans* to buccal epithelial cells by yeast glycolipids, yeast wall lipids and lipids from epithelial cells: *Mykosen*, v. 30, p. 371-8.
- Goffeau, A., B. G. Barrell, H. Bussey, R. W. Davis, B. Dujon, H. Feldmann, F. Galibert, J. D. Hoheisel, C. Jacq, M. Johnston, E. J. Louis, H. W. Mewes, Y. Murakami, P. Philippsen, H. Tettelin, and S. G. Oliver, 1996, Life with 6000 genes: *Science*, v. 274, p. 546, 563-7.
- Gomez, M. J., A. Torosantucci, S. Arancia, B. Maras, L. Parisi, and A. Cassone, 1996, Purification and biochemical characterization of a 65-kilodalton mannoprotein (MP65), a main target of anti-*Candida* cell-mediated immune responses in humans: *Infect Immun*, v. 64, p. 2577-84.
- González, M. M., R. Díez-Orejas, G. Molero, A. M. Alvarez, J. Pla, C. Nombela, and M. Sánchez-Pérez, 1997, Phenotypic characterization of a *Candida albicans* strain deficient in its major exoglucanase: *Microbiology*, v. 143 (Pt 9), p. 3023-32.
- Gopal, P. K., M. G. Shepherd, and P. A. Sullivan, 1984, Analysis of wall glucans from yeast, hyphal and germ-tube forming cells of *Candida albicans*: *J Gen Microbiol*, v. 130, p. 3295-301.
- Gow, N. A., P. W. Robbins, J. W. Lester, A. J. Brown, W. A. Fonzi, T. Chapman, and O. S. Kinsman, 1994, A hyphal-specific chitin synthase gene (CHS2) is not essential for growth, dimorphism, or virulence of *Candida albicans*: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 91, p. 6216-20.
- Gozalbo, D., P. Roig, E. Villamón, and M. L. Gil, 2004, *Candida* and candidiasis: the cell wall as a potential molecular target for antifungal therapy: *Curr Drug Targets Infect Disord*, v. 4, p. 117-35.
- Gropp, K., L. Schild, S. Schindler, B. Hube, P. F. Zipfel, and C. Skerka, 2009, The yeast *Candida albicans* evades human complement attack by secretion of aspartic proteases: *Mol Immunol*, v. 47, p. 465-75.
- Haber, J. E., 2012, Mating-type genes and MAT switching in *Saccharomyces cerevisiae*: *Genetics*, v. 191, p. 33-64.
- Hall, R. A., S. Bates, M. D. Lenardon, D. M. Maccallum, J. Wagener, D. W. Lowman, M. D. Kruppa, D. L. Williams, F. C. Odds, A. J. Brown, and N. A. Gow, 2013, The Mnn2 mannosyltransferase family modulates mannoprotein fibril length, immune recognition and virulence of *Candida albicans*: *PLoS Pathog*, v. 9, p. e1003276.
- Hall, R. A., and N. A. Gow, 2013, Mannosylation in *Candida albicans*: role in cell wall function and immune recognition: *Mol Microbiol*.
- Han, Y., and J. E. Cutler, 1995, Antibody response that protects against disseminated candidiasis: *Infect Immun*, v. 63, p. 2714-9.
- Han, Y., and J. E. Cutler, 1997, Assessment of a mouse model of neutropenia and the effect of an anti-candidiasis monoclonal antibody in these animals: *J Infect Dis*, v. 175, p. 1169-75.
- Han, Y., T. Kanbe, R. Cherniak, and J. E. Cutler, 1997, Biochemical characterization of *Candida albicans* epitopes that can elicit protective and nonprotective antibodies: *Infect Immun*, v. 65, p. 4100-7.
- Han, Y., T. R. Kozel, M. X. Zhang, R. S. MacGill, M. C. Carroll, and J. E. Cutler, 2001, Complement is essential for protection by an IgM and an IgG3 monoclonal antibody against experimental, hematogenously disseminated candidiasis: *J Immunol*, v. 167, p. 1550-7.

- Han, Y., M. H. Riesselman, and J. E. Cutler, 2000, Protection against candidiasis by an immunoglobulin G3 (IgG3) monoclonal antibody specific for the same mannotriose as an IgM protective antibody: *Infect Immun*, v. 68, p. 1649-54.
- Han, Y., M. A. Ulrich, and J. E. Cutler, 1999, *Candida albicans* mannan extract-protein conjugates induce a protective immune response against experimental candidiasis: *J Infect Dis*, v. 179, p. 1477-84.
- Hasenclever, H. F., and W. O. Mitchell, 1961a, Antigenic studies of *Candida*. I. Observation of two antigenic groups in *Candida albicans*: *J Bacteriol*, v. 82, p. 570-3.
- Hasenclever, H. F., and W. O. Mitchell, 1961b, Antigenic studies of *Candida*. III. Comparative pathogenicity of *Candida albicans* group A, group B, and *Candida stellatoidea*: *J Bacteriol*, v. 82, p. 578-81.
- Hashimoto, H., and K. Yoda, 1997, Novel membrane protein complexes for protein glycosylation in the yeast Golgi apparatus: *Biochem Biophys Res Commun*, v. 241, p. 682-6.
- Hayette, M. P., G. Strecker, C. Faille, D. Dive, D. Camus, D. W. Mackenzie, and D. Poulain, 1992, Presence of human antibodies reacting with *Candida albicans* O-linked oligomannosides revealed by using an enzyme-linked immunosorbent assay and neoglycolipids: *J Clin Microbiol*, v. 30, p. 411-7.
- Hernández-Santos, N., and S. L. Gaffen, 2012, Th17 cells in immunity to *Candida albicans*: *Cell Host Microbe*, v. 11, p. 425-35.
- Herrero, A. B., P. Magnelli, M. K. Mansour, S. M. Levitz, H. Bussey, and C. Abeijon, 2004, KRE5 gene null mutant strains of *Candida albicans* are avirulent and have altered cell wall composition and hypha formation properties: *Eukaryot Cell*, v. 3, p. 1423-32.
- Herscovics, A., 1999a, Importance of glycosidases in mammalian glycoprotein biosynthesis: *Biochim Biophys Acta*, v. 1473, p. 96-107.
- Herscovics, A., 1999b, Processing glycosidases of *Saccharomyces cerevisiae*: *Biochim Biophys Acta*, v. 1426, p. 275-85.
- Herscovics, A., and P. Orlean, 1993, Glycoprotein biosynthesis in yeast: *FASEB J*, v. 7, p. 540-50.
- Hise, A. G., J. Tomalka, S. Ganesan, K. Patel, B. A. Hall, G. D. Brown, and K. A. Fitzgerald, 2009, An essential role for the NLRP3 inflammasome in host defense against the human fungal pathogen *Candida albicans*: *Cell Host Microbe*, v. 5, p. 487-97.
- Hobson, R. P., C. A. Munro, S. Bates, D. M. MacCallum, J. E. Cutler, S. E. Heinsbroek, G. D. Brown, F. C. Odds, and N. A. Gow, 2004, Loss of cell wall mannosylphosphate in *Candida albicans* does not influence macrophage recognition: *J Biol Chem*, v. 279, p. 39628-35.
- Hoffmann, J. A., F. C. Kafatos, C. A. Janeway, and R. A. Ezekowitz, 1999, Phylogenetic perspectives in innate immunity: *Science*, v. 284, p. 1313-8.
- Hope, W. W., L. Taberner, D. W. Denning, and M. J. Anderson, 2004, Molecular mechanisms of primary resistance to flucytosine in *Candida albicans*: *Antimicrob Agents Chemother*, v. 48, p. 4377-86.
- Horvath, L. L., B. J. George, C. K. Murray, L. S. Harrison, and D. R. Hospenthal, 2004, Direct comparison of the BACTEC 9240 and BacT/ALERT 3D automated blood culture systems for candida growth detection: *J Clin Microbiol*, v. 42, p. 115-8.
- Hube, B., 2004, From commensal to pathogen: stage- and tissue-specific gene expression of *Candida albicans*: *Curr Opin Microbiol*, v. 7, p. 336-41.
- Huffnagle, G. B., and G. S. Deepe, 2003, Innate and adaptive determinants of host susceptibility to medically important fungi: *Curr Opin Microbiol*, v. 6, p. 344-50.
- Hull, C. M., and A. D. Johnson, 1999, Identification of a mating type-like locus in the asexual pathogenic yeast *Candida albicans*: *Science*, v. 285, p. 1271-5.
- Ibata-Ombetta, S., T. Idziorek, P. A. Trinel, D. Poulain, and T. Jouault, 2003a, *Candida albicans* phospholipomannan promotes survival of phagocytosed yeasts through modulation of bad phosphorylation and macrophage apoptosis: *J Biol Chem*, v. 278, p. 13086-93.

- Ibata-Ombetta, S., T. Idziorek, P. A. Trinel, D. Poulain, and T. Jouault, 2003b, Role of phospholipomannan in *Candida albicans* escape from macrophages and induction of cell apoptosis through regulation of bad phosphorylation: *Ann N Y Acad Sci*, v. 1010, p. 573-6.
- Ibata-Ombetta, S., T. Jouault, P. A. Trinel, and D. Poulain, 2001, Role of extracellular signal-regulated protein kinase cascade in macrophage killing of *Candida albicans*: *J Leukoc Biol*, v. 70, p. 149-54.
- Ibrahim, A. S., B. J. Spellberg, V. Avanesian, Y. Fu, and J. E. Edwards, 2006, The anti-*Candida* vaccine based on the recombinant N-terminal domain of Als1p is broadly active against disseminated candidiasis: *Infect Immun*, v. 74, p. 3039-41.
- Ibrahim, A. S., B. J. Spellberg, V. Avenissian, Y. Fu, S. G. Filler, and J. E. Edwards, 2005, Vaccination with recombinant N-terminal domain of Als1p improves survival during murine disseminated candidiasis by enhancing cell-mediated, not humoral, immunity: *Infect Immun*, v. 73, p. 999-1005.
- Iorio, E., A. Torosantucci, C. Bromuro, P. Chiani, A. Ferretti, M. Giannini, A. Cassone, and F. Podo, 2008, *Candida albicans* cell wall comprises a branched beta-D-(1-->6)-glucan with beta-D-(1-->3)-side chains: *Carbohydr Res*, v. 343, p. 1050-61.
- Jawhara, S., K. Habib, F. Maggiotto, G. Pignede, P. Vandekerckove, E. Maes, L. Dubuquoy, T. Fontaine, Y. Guerardel, and D. Poulain, 2012, Modulation of intestinal inflammation by yeasts and cell wall extracts: strain dependence and unexpected anti-inflammatory role of glucan fractions: *PLoS One*, v. 7, p. e40648.
- Jawhara, S., X. Thuru, A. Standaert-Vitse, T. Jouault, S. Mordon, B. Sendid, P. Desreumaux, and D. Poulain, 2008, Colonization of mice by *Candida albicans* is promoted by chemically induced colitis and augments inflammatory responses through galectin-3: *J Infect Dis*, v. 197, p. 972-80.
- Jiménez-López, C., and M. C. Lorenz, 2013, Fungal immune evasion in a model host-pathogen interaction: *Candida albicans* versus macrophages: *PLoS Pathog*, v. 9, p. e1003741.
- Jones, S., G. White, and P. R. Hunter, 1994, Increased phenotypic switching in strains of *Candida albicans* associated with invasive infections: *J Clin Microbiol*, v. 32, p. 2869-70.
- Jouault, T., C. Delaunoy, B. Sendid, F. Ajana, and D. Poulain, 1997, Differential humoral response against alpha- and beta-linked mannose residues associated with tissue invasion by *Candida albicans*: *Clin Diagn Lab Immunol*, v. 4, p. 328-33.
- Jouault, T., M. El Abed-El Behi, M. Martínez-Esparza, L. Breuilh, P. A. Trinel, M. Chamailard, F. Trottein, and D. Poulain, 2006, Specific recognition of *Candida albicans* by macrophages requires galectin-3 to discriminate *Saccharomyces cerevisiae* and needs association with TLR2 for signaling: *J Immunol*, v. 177, p. 4679-87.
- Jouault, T., C. Fradin, P. A. Trinel, A. Bernigaud, and D. Poulain, 1998, Early signal transduction induced by *Candida albicans* in macrophages through shedding of a glycolipid: *J Infect Dis*, v. 178, p. 792-802.
- Jouault, T., S. Ibata-Ombetta, O. Takeuchi, P. A. Trinel, P. Sacchetti, P. Lefebvre, S. Akira, and D. Poulain, 2003, *Candida albicans* phospholipomannan is sensed through toll-like receptors: *J Infect Dis*, v. 188, p. 165-72.
- Jouault, T., G. Lepage, A. Bernigaud, P. A. Trinel, C. Fradin, J. M. Wieruszkeski, G. Strecker, and D. Poulain, 1995, Beta-1,2-linked oligomannosides from *Candida albicans* act as signals for tumor necrosis factor alpha production: *Infect Immun*, v. 63, p. 2378-81.
- Jouault, T., A. Sarazin, M. Martinez-Esparza, C. Fradin, B. Sendid, and D. Poulain, 2009, Host responses to a versatile commensal: PAMPs and PRRs interplay leading to tolerance or infection by *Candida albicans*: *Cell Microbiol*, v. 11, p. 1007-15.
- Jungmann, J., and S. Munro, 1998, Multi-protein complexes in the cis Golgi of *Saccharomyces cerevisiae* with alpha-1,6-mannosyltransferase activity: *EMBO J*, v. 17, p. 423-34.

- Kamai, Y., M. Kubota, T. Hosokawa, T. Fukuoka, and S. G. Filler, 2001, New model of oropharyngeal candidiasis in mice: *Antimicrob Agents Chemother*, v. 45, p. 3195-7.
- Kapteyn, J. C., L. L. Hoyer, J. E. Hecht, W. H. Müller, A. Andel, A. J. Verkleij, M. Makarow, H. Van Den Ende, and F. M. Klis, 2000, The cell wall architecture of *Candida albicans* wild-type cells and cell wall-defective mutants: *Mol Microbiol*, v. 35, p. 601-11.
- Kapteyn, J. C., H. Van Den Ende, and F. M. Klis, 1999, The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall: *Biochim Biophys Acta*, v. 1426, p. 373-83.
- Kerrigan, A. M., and G. D. Brown, 2009, C-type lectins and phagocytosis: *Immunobiology*, v. 214, p. 562-75.
- Klis, F. M., 1994, Review: cell wall assembly in yeast: *Yeast*, v. 10, p. 851-69.
- Klis, F. M., P. de Groot, and K. Hellingwerf, 2001, Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans*: *Med Mycol*, v. 39 Suppl 1, p. 1-8.
- Knauer, R., and L. Lehle, 1999, The oligosaccharyltransferase complex from yeast: *Biochim Biophys Acta*, v. 1426, p. 259-73.
- Kobayashi, H., P. Giummelly, S. Takahashi, M. Ishida, J. Sato, M. Takaku, Y. Nishidate, N. Shibata, Y. Okawa, and S. Suzuki, 1991, *Candida albicans* serotype A strains grow in yeast extract-added Sabouraud liquid medium at pH 2.0, elaborating mannans without beta-1,2 linkage and phosphate group: *Biochem Biophys Res Commun*, v. 175, p. 1003-9.
- Kobayashi, H., N. Shibata, M. Nakada, S. Chaki, K. Mizugami, Y. Ohkubo, and S. Suzuki, 1990, Structural study of cell wall phosphomannan of *Candida albicans* NIH B-792 (serotype B) strain, with special reference to ¹H and ¹³C NMR analyses of acid-labile oligomannosyl residues: *Arch Biochem Biophys*, v. 278, p. 195-204.
- Kobayashi, H., N. Shibata, and S. Suzuki, 1992, Evidence for oligomannosyl residues containing both beta-1,2 and alpha-1,2 linkages as a serotype A-specific epitope(s) in mannans of *Candida albicans*: *Infect Immun*, v. 60, p. 2106-9.
- Kobayashi, H., S. Takahashi, N. Shibata, M. Miyauchi, M. Ishida, J. Sato, K. Maeda, and S. Suzuki, 1994, Structural modification of cell wall mannans of *Candida albicans* serotype A strains grown in yeast extract-Sabouraud liquid medium under acidic conditions: *Infect Immun*, v. 62, p. 968-73.
- Kobayashi, H., S. Tanaka, J. Suzuki, Y. Kiuchi, N. Shibata, S. Suzuki, and Y. Okawa, 1997, Amended structure of side chains in a cell wall mannan from *Candida albicans* serotype A strain grown in yeast extract-Sabouraud liquid medium under acidic conditions: detection of the branched side chains corresponding to antigenic factor 4: *FEMS Microbiol Lett*, v. 152, p. 235-42.
- Kohatsu, L., D. K. Hsu, A. G. Jegalian, F. T. Liu, and L. G. Baum, 2006, Galectin-3 induces death of *Candida* species expressing specific beta-1,2-linked mannans: *J Immunol*, v. 177, p. 4718-26.
- Kojic, E. M., and R. O. Darouiche, 2004, *Candida* infections of medical devices: *Clin Microbiol Rev*, v. 17, p. 255-67.
- Kondoh, O., Y. Tachibana, Y. Ohya, M. Arisawa, and T. Watanabe, 1997, Cloning of the RHO1 gene from *Candida albicans* and its regulation of beta-1,3-glucan synthesis: *J Bacteriol*, v. 179, p. 7734-41.
- Kretschmar, M., T. Bertsch, M. Göller, M. Schaller, H. Hof, and T. Nichterlein, 1999, Parameters for determination of *Candida albicans* virulence in murine peritonitis: *Mycoses*, v. 42 Suppl 2, p. 19-24.
- Kumar, H., Y. Kumagai, T. Tsuchida, P. A. Koenig, T. Satoh, Z. Guo, M. H. Jang, T. Saitoh, S. Akira, and T. Kawai, 2009, Involvement of the NLRP3 inflammasome in innate and humoral adaptive immune responses to fungal beta-glucan: *J Immunol*, v. 183, p. 8061-7.
- Lenardon, M. D., R. K. Whitton, C. A. Munro, D. Marshall, and N. A. Gow, 2007, Individual chitin synthase enzymes synthesize microfibrils of differing structure at specific locations in the *Candida albicans* cell wall: *Mol Microbiol*, v. 66, p. 1164-73.

- Lester, R. L., G. B. Wells, G. Oxford, and R. C. Dickson, 1993, Mutant strains of *Saccharomyces cerevisiae* lacking sphingolipids synthesize novel inositol glycerophospholipids that mimic sphingolipid structures: *J Biol Chem*, v. 268, p. 845-56.
- Li, R. K., and J. E. Cutler, 1991, A cell surface/plasma membrane antigen of *Candida albicans*: *J Gen Microbiol*, v. 137, p. 455-64.
- Li, R. K., and J. E. Cutler, 1993, Chemical definition of an epitope/adhesin molecule on *Candida albicans*: *J Biol Chem*, v. 268, p. 18293-9.
- Li, X., A. Utomo, X. Cullere, M. M. Choi, D. A. Milner, D. Venkatesh, S. H. Yun, and T. N. Mayadas, 2011, The β -glucan receptor Dectin-1 activates the integrin Mac-1 in neutrophils via Vav protein signaling to promote *Candida albicans* clearance: *Cell Host Microbe*, v. 10, p. 603-15.
- Lindberg, B., K. Leontein, U. Lindquist, S. B. Svenson, G. Wrangsell, A. Dell, and M. Rogers, 1988, Structural studies of the O-antigen polysaccharide of *Salmonella thompson*, serogroup C1 (6,7): *Carbohydr Res*, v. 174, p. 313-22.
- Linden, J. R., M. E. De Paepe, S. S. Laforce-Nesbitt, and J. M. Bliss, 2013a, Galectin-3 plays an important role in protection against disseminated candidiasis: *Med Mycol*, v. 51, p. 641-51.
- Linden, J. R., D. Kunkel, S. S. Laforce-Nesbitt, and J. M. Bliss, 2013b, The role of galectin-3 in phagocytosis of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* by human neutrophils: *Cell Microbiol*, v. 15, p. 1127-42.
- Lussier, M., A. M. Sdicu, and H. Bussey, 1999, The KTR and MNN1 mannosyltransferase families of *Saccharomyces cerevisiae*: *Biochim Biophys Acta*, v. 1426, p. 323-34.
- Lussier, M., A. M. Sdicu, S. Shahinian, and H. Bussey, 1998, The *Candida albicans* KRE9 gene is required for cell wall beta-1, 6-glucan synthesis and is essential for growth on glucose: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 95, p. 9825-30.
- Maccallum, D. M., 2012, Hosting infection: experimental models to assay *Candida* virulence: *Int J Microbiol*, v. 2012, p. 363764.
- MacCallum, D. M., L. Castillo, K. Nather, C. A. Munro, A. J. Brown, N. A. Gow, and F. C. Odds, 2009, Property differences among the four major *Candida albicans* strain clades: *Eukaryot Cell*, v. 8, p. 373-87.
- MacCallum, D. M., and F. C. Odds, 2005, Temporal events in the intravenous challenge model for experimental *Candida albicans* infections in female mice: *Mycoses*, v. 48, p. 151-61.
- Magee, P. T., 2010, Fungal pathogenicity and morphological switches: *Nat Genet*, v. 42, p. 560-1.
- Mansour, M. K., and S. M. Levitz, 2002, Interactions of fungi with phagocytes: *Curr Opin Microbiol*, v. 5, p. 359-65.
- Marklein, G., M. Josten, U. Klanke, E. Müller, R. Horré, T. Maier, T. Wenzel, M. Kostrzewa, G. Bierbaum, A. Hoerauf, and H. G. Sahl, 2009, Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and reliable identification of clinical yeast isolates: *J Clin Microbiol*, v. 47, p. 2912-7.
- Matthews, R. C., G. Rigg, S. Hodgetts, T. Carter, C. Chapman, C. Gregory, C. Illidge, and J. Burnie, 2003, Preclinical assessment of the efficacy of mycograb, a human recombinant antibody against fungal HSP90: *Antimicrob Agents Chemother*, v. 47, p. 2208-16.
- Mayor, S., and H. Riezman, 2004, Sorting GPI-anchored proteins: *Nat Rev Mol Cell Biol*, v. 5, p. 110-20.
- McCreath, K. J., C. A. Specht, and P. W. Robbins, 1995, Molecular cloning and characterization of chitinase genes from *Candida albicans*: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 92, p. 2544-8.
- Mellado, E., M. Cuenca-Estrella, J. Regadera, M. González, T. M. Díaz-Guerra, and J. L. Rodríguez-Tudela, 2000, Sustained gastrointestinal colonization and systemic dissemination by *Candida albicans*, *Candida tropicalis* and *Candida parapsilosis* in adult mice: *Diagn Microbiol Infect Dis*, v. 38, p. 21-8.
- Mille, C., P. Bobrowicz, P. A. Trinel, H. Li, E. Maes, Y. Guerardel, C. Fradin, M. Martínez-Esparza, R. C. Davidson, G. Janbon, D. Poulain, and S. Wildt, 2008, Identification of a new family of genes

- involved in beta-1,2-mannosylation of glycans in *Pichia pastoris* and *Candida albicans*: *J Biol Chem*, v. 283, p. 9724-36.
- Mille, C., C. Fradin, F. Delplace, P. A. Trinel, A. Masset, N. François, B. Coddeville, P. Bobrowicz, T. Jouault, Y. Guerardel, S. Wildt, G. Janbon, and D. Poulain, 2012, Members 5 and 6 of the *Candida albicans* BMT family encode enzymes acting specifically on β -mannosylation of the phospholipomannan cell-wall glycosphingolipid: *Glycobiology*, v. 22, p. 1332-42.
- Mille, C., G. Janbon, F. Delplace, S. Iбата-Ombetta, C. Gaillardin, G. Strecker, T. Jouault, P. A. Trinel, and D. Poulain, 2004, Inactivation of CaMIT1 inhibits *Candida albicans* phospholipomannan beta-mannosylation, reduces virulence, and alters cell wall protein beta-mannosylation: *J Biol Chem*, v. 279, p. 47952-60.
- Mio, T., M. Adachi-Shimizu, Y. Tachibana, H. Tabuchi, S. B. Inoue, T. Yabe, T. Yamada-Okabe, M. Arisawa, T. Watanabe, and H. Yamada-Okabe, 1997a, Cloning of the *Candida albicans* homolog of *Saccharomyces cerevisiae* GSC1/FKS1 and its involvement in beta-1,3-glucan synthesis: *J Bacteriol*, v. 179, p. 4096-105.
- Mio, T., T. Yabe, M. Sudoh, Y. Satoh, T. Nakajima, M. Arisawa, and H. Yamada-Okabe, 1996, Role of three chitin synthase genes in the growth of *Candida albicans*: *J Bacteriol*, v. 178, p. 2416-9.
- Mio, T., T. Yamada-Okabe, T. Yabe, T. Nakajima, M. Arisawa, and H. Yamada-Okabe, 1997b, Isolation of the *Candida albicans* homologs of *Saccharomyces cerevisiae* KRE6 and SKN1: expression and physiological function: *J Bacteriol*, v. 179, p. 2363-72.
- Miyazato, A., K. Nakamura, N. Yamamoto, H. M. Mora-Montes, M. Tanaka, Y. Abe, D. Tanno, K. Inden, X. Gang, K. Ishii, K. Takeda, S. Akira, S. Saijo, Y. Iwakura, Y. Adachi, N. Ohno, K. Mitsutake, N. A. Gow, M. Kaku, and K. Kawakami, 2009, Toll-like receptor 9-dependent activation of myeloid dendritic cells by Deoxynucleic acids from *Candida albicans*: *Infect Immun*, v. 77, p. 3056-64.
- Montagnoli, C., S. Bozza, A. Bacci, R. Gaziano, P. Mosci, J. Morschhäuser, L. Pitzurra, M. Kopf, J. Cutler, and L. Romani, 2003, A role for antibodies in the generation of memory antifungal immunity: *Eur J Immunol*, v. 33, p. 1193-204.
- Mora-Montes, H. M., S. Bates, M. G. Netea, L. Castillo, A. Brand, E. T. Buurman, D. F. Díaz-Jiménez, B. Jan Kullberg, A. J. Brown, F. C. Odds, and N. A. Gow, 2010, A multifunctional mannosyltransferase family in *Candida albicans* determines cell wall mannan structure and host-fungus interactions: *J Biol Chem*, v. 285, p. 12087-95.
- Mora-Montes, H. M., S. Bates, M. G. Netea, D. F. Díaz-Jiménez, E. López-Romero, S. Zinker, P. Ponce-Noyola, B. J. Kullberg, A. J. Brown, F. C. Odds, A. Flores-Carreón, and N. A. Gow, 2007, Endoplasmic reticulum alpha-glycosidases of *Candida albicans* are required for N glycosylation, cell wall integrity, and normal host-fungus interaction: *Eukaryot Cell*, v. 6, p. 2184-93.
- Mourad, S., and L. Friedman, 1961, Active immunization of mice against *Candida albicans*: *Proc Soc Exp Biol Med*, v. 106, p. 570-2.
- Mourad, S., and L. Friedman, 1968, Passive immunization of mice against *Candida albicans*: *Sabouraudia*, v. 6, p. 103-5.
- Mouyna, I., T. Fontaine, M. Vai, M. Monod, W. A. Fonzi, M. Diaquin, L. Popolo, R. P. Hartland, and J. P. Latgé, 2000, Glycosylphosphatidylinositol-anchored glucanoyltransferases play an active role in the biosynthesis of the fungal cell wall: *J Biol Chem*, v. 275, p. 14882-9.
- Munro, C. A., 2013, Chitin and glucan, the yin and yang of the fungal cell wall, implications for antifungal drug discovery and therapy: *Adv Appl Microbiol*, v. 83, p. 145-72.
- Munro, C. A., S. Bates, E. T. Buurman, H. B. Hughes, D. M. Maccallum, G. Bertram, A. Atrih, M. A. Ferguson, J. M. Bain, A. Brand, S. Hamilton, C. Westwater, L. M. Thomson, A. J. Brown, F. C. Odds, and N. A. Gow, 2005, Mnt1p and Mnt2p of *Candida albicans* are partially redundant alpha-1,2-mannosyltransferases that participate in O-linked mannosylation and are required for adhesion and virulence: *J Biol Chem*, v. 280, p. 1051-60.

- Munro, C. A., R. K. Whitton, H. B. Hughes, M. Rella, S. Selvaggini, and N. A. Gow, 2003, CHS8-a fourth chitin synthase gene of *Candida albicans* contributes to in vitro chitin synthase activity, but is dispensable for growth: *Fungal Genet Biol*, v. 40, p. 146-58.
- Munro, C. A., K. Winter, A. Buchan, K. Henry, J. M. Becker, A. J. Brown, C. E. Bulawa, and N. A. Gow, 2001, Chs1 of *Candida albicans* is an essential chitin synthase required for synthesis of the septum and for cell integrity: *Mol Microbiol*, v. 39, p. 1414-26.
- Murciano, C., D. L. Moyes, M. Runglall, P. Tobouti, A. Islam, L. L. Hoyer, and J. R. Naglik, 2012, Evaluation of the role of *Candida albicans* agglutinin-like sequence (Als) proteins in human oral epithelial cell interactions: *PLoS One*, v. 7, p. e33362.
- Nagiec, M. M., J. A. Baltisberger, G. B. Wells, R. L. Lester, and R. C. Dickson, 1994, The LCB2 gene of *Saccharomyces* and the related LCB1 gene encode subunits of serine palmitoyltransferase, the initial enzyme in sphingolipid synthesis: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 91, p. 7899-902.
- Nagiec, M. M., E. E. Nagiec, J. A. Baltisberger, G. B. Wells, R. L. Lester, and R. C. Dickson, 1997, Sphingolipid synthesis as a target for antifungal drugs. Complementation of the inositol phosphorylceramide synthase defect in a mutant strain of *Saccharomyces cerevisiae* by the AUR1 gene: *J Biol Chem*, v. 272, p. 9809-17.
- Naglik, J. R., P. L. Fidel, and F. C. Odds, 2008, Animal models of mucosal *Candida* infection: *FEMS Microbiol Lett*, v. 283, p. 129-39.
- Necas, O., A. Svoboda, and E. Pivnicková, 1981, Plasma membrane particles in yeast protoplasts: *Acta Histochem Suppl*, v. 23, p. 151-5.
- Nelson, R. D., N. Shibata, R. P. Podzorski, and M. J. Herron, 1991, *Candida* mannan: chemistry, suppression of cell-mediated immunity, and possible mechanisms of action: *Clin Microbiol Rev*, v. 4, p. 1-19.
- Netea, M. G., N. A. Gow, C. A. Munro, S. Bates, C. Collins, G. Ferwerda, R. P. Hobson, G. Bertram, H. B. Hughes, T. Jansen, L. Jacobs, E. T. Buurman, K. Gijzen, D. L. Williams, R. Torensma, A. McKinnon, D. M. MacCallum, F. C. Odds, J. W. Van der Meer, A. J. Brown, and B. J. Kullberg, 2006, Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors: *J Clin Invest*, v. 116, p. 1642-50.
- Nobile, C. J., and A. P. Mitchell, 2006, Genetics and genomics of *Candida albicans* biofilm formation: *Cell Microbiol*, v. 8, p. 1382-91.
- Nobile, C. J., H. A. Schneider, J. E. Nett, D. C. Sheppard, S. G. Filler, D. R. Andes, and A. P. Mitchell, 2008, Complementary adhesin function in *C. albicans* biofilm formation: *Curr Biol*, v. 18, p. 1017-24.
- Noumi, E., M. Snoussi, H. Hentati, K. Mahdouani, L. del Castillo, E. Valentin, R. Sentandreu, and A. Bakhrouf, 2010, Adhesive properties and hydrolytic enzymes of oral *Candida albicans* strains: *Mycopathologia*, v. 169, p. 269-78.
- Novick, P., and R. Schekman, 1979, Secretion and cell-surface growth are blocked in a temperature-sensitive mutant of *Saccharomyces cerevisiae*: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 76, p. 1858-62.
- Odani, T., Y. Shimma, A. Tanaka, and Y. Jigami, 1996, Cloning and analysis of the MNN4 gene required for phosphorylation of N-linked oligosaccharides in *Saccharomyces cerevisiae*: *Glycobiology*, v. 6, p. 805-10.
- Odds, F. C., 1988, *Candida and Candidosis*, Philadelphia, 2nd ed. Bailliere Tindall.
- Odds, F. C., M. E. Bougnoux, D. J. Shaw, J. M. Bain, A. D. Davidson, D. Diogo, M. D. Jacobsen, M. Lecomte, S. Y. Li, A. Tavanti, M. C. Maiden, N. A. Gow, and C. d'Enfert, 2007, Molecular phylogenetics of *Candida albicans*: *Eukaryot Cell*, v. 6, p. 1041-52.
- Ohno, N., 2004, Murine model of Kawasaki disease induced by mannoprotein-beta-glucan complex, CAWS, obtained from *Candida albicans*: *Jpn J Infect Dis*, v. 57, p. S9-10.
- Okawa, Y., K. Goto, S. Nemoto, M. Akashi, C. Sugawara, M. Hanzawa, M. Kawamata, T. Takahata, N. Shibata, H. Kobayashi, and S. Suzuki, 1996, Antigenicity of cell wall mannans of *Candida*

- albicans NIH B-792 (serotype B) strain cells cultured at high temperature in yeast extract-containing sabouraud liquid medium: *Clin Diagn Lab Immunol*, v. 3, p. 331-6.
- Okawa, Y., T. Takahata, M. Kawamata, M. Miyauchi, N. Shibata, A. Suzuki, H. Kobayashi, and S. Suzuki, 1994, Temperature-dependent change of serological specificity of *Candida albicans* NIH A-207 cells cultured in yeast extract-added Sabouraud liquid medium: disappearance of surface antigenic factors 4, 5, and 6 at high temperature: *FEBS Lett*, v. 345, p. 167-71.
- Olaiya, A. F., and S. J. Sogin, 1979, Ploidy determination of *Candida albicans*: *J Bacteriol*, v. 140, p. 1043-9.
- Orlean, P., 1997, Biogenesis of yeast wall and surface components, In *molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces*, p. 229-362.
- Panwar, S. L., M. Legrand, D. Dignard, M. Whiteway, and P. T. Magee, 2003, MFalpha1, the gene encoding the alpha mating pheromone of *Candida albicans*: *Eukaryot Cell*, v. 2, p. 1350-60.
- Pardini, G., P. W. De Groot, A. T. Coste, M. Karababa, F. M. Klis, C. G. de Koster, and D. Sanglard, 2006, The CRH family coding for cell wall glycosylphosphatidylinositol proteins with a predicted transglycosidase domain affects cell wall organization and virulence of *Candida albicans*: *J Biol Chem*, v. 281, p. 40399-411.
- Paulovičová, L., E. Paulovičová, A. A. Karelin, Y. E. Tsvetkov, N. E. Nifantiev, and S. Bystrický, 2012, Humoral and cell-mediated immunity following vaccination with synthetic *Candida* cell wall mannan derived heptamannoside-protein conjugate: immunomodulatory properties of heptamannoside-BSA conjugate: *Int Immunopharmacol*, v. 14, p. 179-87.
- Perlin, D. S., 2007, Resistance to echinocandin-class antifungal drugs: *Drug Resist Updat*, v. 10, p. 121-30.
- Pietrella, D., N. Pandey, E. Gabrielli, E. Pericolini, S. Perito, L. Kasper, F. Bistoni, A. Cassone, B. Hube, and A. Vecchiarelli, 2013, Secreted aspartic proteases of *Candida albicans* activate the NLRP3 inflammasome: *Eur J Immunol*, v. 43, p. 679-92.
- Pinto, W. J., G. W. Wells, and R. L. Lester, 1992, Characterization of enzymatic synthesis of sphingolipid long-chain bases in *Saccharomyces cerevisiae*: mutant strains exhibiting long-chain-base auxotrophy are deficient in serine palmitoyltransferase activity: *J Bacteriol*, v. 174, p. 2575-81.
- Ponniah, G., C. Rollenhagen, Y. S. Bahn, J. F. Staab, and P. Sundstrom, 2007, State of differentiation defines buccal epithelial cell affinity for cross-linking to *Candida albicans* Hwp1: *J Oral Pathol Med*, v. 36, p. 456-67.
- Popolo, L., and M. Vai, 1999, The Gas1 glycoprotein, a putative wall polymer cross-linker: *Biochim Biophys Acta*, v. 1426, p. 385-400.
- Poulain, D., 2013, *Candida albicans*, plasticity and pathogenesis: *Crit Rev Microbiol*.
- Poulain, D., C. Faille, C. Delaunoy, P. M. Jacquinet, P. A. Trinel, and D. Camus, 1993, Probable presence of beta(1-2)-linked oligomannosides that act as human immunoglobulin G3 epitopes and are distributed over a *Candida albicans* 14- to 18-kilodalton antigen: *Infect Immun*, v. 61, p. 1164-6.
- Poulain, D., and T. Jouault, 2004, *Candida albicans* cell wall glycans, host receptors and responses: elements for a decisive crosstalk: *Curr Opin Microbiol*, v. 7, p. 342-9.
- Poulain, D., C. Slomianny, T. Jouault, J. M. Gomez, and P. A. Trinel, 2002, Contribution of phospholipomannan to the surface expression of beta-1,2-oligomannosides in *Candida albicans* and its presence in cell wall extracts: *Infect Immun*, v. 70, p. 4323-8.
- Prasad, T., P. Saini, N. A. Gaur, R. A. Vishwakarma, L. A. Khan, Q. M. Haq, and R. Prasad, 2005, Functional analysis of CalPT1, a sphingolipid biosynthetic gene involved in multidrug resistance and morphogenesis of *Candida albicans*: *Antimicrob Agents Chemother*, v. 49, p. 3442-52.

- Prill, S. K., B. Klinkert, C. Timpel, C. A. Gale, K. Schröppel, and J. F. Ernst, 2005, PMT family of *Candida albicans*: five protein mannosyltransferase isoforms affect growth, morphogenesis and antifungal resistance: *Mol Microbiol*, v. 55, p. 546-60.
- Ralton, J. E., T. Naderer, H. L. Piraino, T. A. Bashtannyk, J. M. Callaghan, and M. J. McConville, 2003, Evidence that intracellular beta1-2 mannan is a virulence factor in *Leishmania* parasites: *J Biol Chem*, v. 278, p. 40757-63.
- Ram, S. P., P. A. Sullivan, and M. G. Shepherd, 1983, The in situ assay of *Candida albicans* enzymes during yeast growth and germ-tube formation: *J Gen Microbiol*, v. 129, p. 2367-78.
- Ramage, G., S. Bachmann, T. F. Patterson, B. L. Wickes, and J. L. López-Ribot, 2002, Investigation of multidrug efflux pumps in relation to fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms: *J Antimicrob Chemother*, v. 49, p. 973-80.
- Ramage, G., B. L. Wickes, and J. L. Lopez-Ribot, 2001, Biofilms of *Candida albicans* and their associated resistance to antifungal agents: *Am Clin Lab*, v. 20, p. 42-4.
- Rambourg, A., Y. Clermont, L. Ovtracht, and F. Képès, 1995, Three-dimensional structure of tubular networks, presumably Golgi in nature, in various yeast strains: a comparative study: *Anat Rec*, v. 243, p. 283-93.
- Rayner, J. C., and S. Munro, 1998, Identification of the MNN2 and MNN5 mannosyltransferases required for forming and extending the mannose branches of the outer chain mannans of *Saccharomyces cerevisiae*: *J Biol Chem*, v. 273, p. 26836-43.
- Rimek, D., K. Redetzke, J. Singh, K. Heinrich, and R. Kappe, 2004, [Performance of the *Candida* mannan antigen detection in patients with fungemia]: *Mycoses*, v. 47 Suppl 1, p. 23-6.
- Robert, R., C. Mahaza, A. Marot-Leblond, G. Tronchin, and J. M. Senet, 1991, Binding of mouse fibrinogen to *Candida albicans* in vivo: *FEMS Microbiol Lett*, v. 62, p. 301-3.
- Romani, L., 2004, Immunity to fungal infections: *Nat Rev Immunol*, v. 4, p. 1-23.
- Romero, P. A., M. Lussier, S. Véronneau, A. M. Sdicu, A. Herscovics, and H. Bussey, 1999, Mnt2p and Mnt3p of *Saccharomyces cerevisiae* are members of the Mnn1p family of alpha-1,3-mannosyltransferases responsible for adding the terminal mannose residues of O-linked oligosaccharides: *Glycobiology*, v. 9, p. 1045-51.
- Rouabhia, M., M. Schaller, C. Corbucci, A. Vecchiarelli, S. K. Prill, L. Giasson, and J. F. Ernst, 2005, Virulence of the fungal pathogen *Candida albicans* requires the five isoforms of protein mannosyltransferases: *Infect Immun*, v. 73, p. 4571-80.
- Ruiz-Herrera, J., M. V. Elorza, E. Valentín, and R. Sentandreu, 2006, Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity: *FEMS Yeast Res*, v. 6, p. 14-29.
- Saijo, S., and Y. Iwakura, 2011, Dectin-1 and Dectin-2 in innate immunity against fungi: *Int Immunol*, v. 23, p. 467-72.
- Samaranayake, Y. H., and L. P. Samaranayake, 2001, Experimental oral candidiasis in animal models: *Clin Microbiol Rev*, v. 14, p. 398-429.
- Sandini, S., R. La Valle, F. De Bernardis, C. Macrì, and A. Cassone, 2007, The 65 kDa mannoprotein gene of *Candida albicans* encodes a putative beta-glucanase adhesin required for hyphal morphogenesis and experimental pathogenicity: *Cell Microbiol*, v. 9, p. 1223-38.
- Sandini, S., R. La Valle, S. Deaglio, F. Malavasi, A. Cassone, and F. De Bernardis, 2011, A highly immunogenic recombinant and truncated protein of the secreted aspartic proteases family (rSap2t) of *Candida albicans* as a mucosal anticandidal vaccine: *FEMS Immunol Med Microbiol*, v. 62, p. 215-24.
- Sanglard, D., A. Coste, and S. Ferrari, 2009, Antifungal drug resistance mechanisms in fungal pathogens from the perspective of transcriptional gene regulation: *FEMS Yeast Res*, v. 9, p. 1029-50.
- Sanglard, D., and F. C. Odds, 2002, Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences: *Lancet Infect Dis*, v. 2, p. 73-85.

- Sarthy, A. V., T. McGonigal, M. Coen, D. J. Frost, J. A. Meulbroek, and R. C. Goldman, 1997, Phenotype in *Candida albicans* of a disruption of the BGL2 gene encoding a 1,3-beta-glucosyltransferase: *Microbiology*, v. 143 (Pt 2), p. 367-76.
- Saville, S. P., A. L. Lazzell, C. Monteagudo, and J. L. Lopez-Ribot, 2003, Engineered control of cell morphology in vivo reveals distinct roles for yeast and filamentous forms of *Candida albicans* during infection: *Eukaryot Cell*, v. 2, p. 1053-60.
- Schaller, M., C. Borelli, H. C. Korting, and B. Hube, 2005, Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*: *Mycoses*, v. 48, p. 365-77.
- Sendid, B., D. Caillot, B. Baccouch-Humbert, L. Klingspor, M. Grandjean, A. Bonnin, and D. Poulain, 2003, Contribution of the Platelia *Candida*-specific antibody and antigen tests to early diagnosis of systemic *Candida tropicalis* infection in neutropenic adults: *J Clin Microbiol*, v. 41, p. 4551-8.
- Sendid, B., T. Jouault, R. Coudriau, D. Camus, F. Odds, M. Tabouret, and D. Poulain, 2004, Increased sensitivity of mannanemia detection tests by joint detection of alpha- and beta-linked oligomannosides during experimental and human systemic candidiasis: *J Clin Microbiol*, v. 42, p. 164-71.
- Sendid, B., J. L. Poirot, M. Tabouret, A. Bonnin, D. Caillot, D. Camus, and D. Poulain, 2002, Combined detection of mannanaemia and antimannan antibodies as a strategy for the diagnosis of systemic infection caused by pathogenic *Candida* species: *J Med Microbiol*, v. 51, p. 433-42.
- Sendid, B., M. Tabouret, J. L. Poirot, D. Mathieu, J. Fruit, and D. Poulain, 1999, New enzyme immunoassays for sensitive detection of circulating *Candida albicans* mannan and antimannan antibodies: useful combined test for diagnosis of systemic candidiasis: *J Clin Microbiol*, v. 37, p. 1510-7.
- Sevilla, M. J., B. Robledo, A. Rementeria, M. D. Moragues, and J. Pontón, 2006, A fungicidal monoclonal antibody protects against murine invasive candidiasis: *Infect Immun*, v. 74, p. 3042-5.
- Shahinian, S., and H. Bussey, 2000, beta-1,6-Glucan synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: *Mol Microbiol*, v. 35, p. 477-89.
- Sheppard, D. C., M. R. Yeaman, W. H. Welch, Q. T. Phan, Y. Fu, A. S. Ibrahim, S. G. Filler, M. Zhang, A. J. Waring, and J. E. Edwards, 2004, Functional and structural diversity in the Als protein family of *Candida albicans*: *J Biol Chem*, v. 279, p. 30480-9.
- Shibata, N., M. Arai, E. Haga, T. Kikuchi, M. Najima, T. Satoh, H. Kobayashi, and S. Suzuki, 1992, Structural identification of an epitope of antigenic factor 5 in mannans of *Candida albicans* NIH B-792 (serotype B) and J-1012 (serotype A) as beta-1,2-linked oligomannosyl residues: *Infect Immun*, v. 60, p. 4100-10.
- Shibata, N., S. Fukasawa, H. Kobayashi, M. Tojo, T. Yonezu, A. Ambo, Y. Ohkubo, and S. Suzuki, 1989, Structural analysis of phospho-D-mannan-protein complexes isolated from yeast and mold form cells of *Candida albicans* NIH A-207 serotype A strain: *Carbohydr Res*, v. 187, p. 239-53.
- Shibata, N., T. Ichikawa, M. Tojo, M. Takahashi, N. Ito, Y. Okubo, and S. Suzuki, 1985, Immunochemical study on the mannans of *Candida albicans* NIH A-207, NIH B-792, and J-1012 strains prepared by fractional precipitation with cetyltrimethylammonium bromide: *Arch Biochem Biophys*, v. 243, p. 338-48.
- Shibata, N., H. Kobayashi, and S. Suzuki, 2012, Immunochemistry of pathogenic yeast, *Candida* species, focusing on mannan: *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, v. 88, p. 250-65.
- Silva, N. C., J. M. Nery, and A. L. Dias, 2014, Aspartic proteinases of *Candida* spp.: role in pathogenicity and antifungal resistance: *Mycoses*, v. 57, p. 1-11.
- Singleton, D. R., J. Masuoka, and K. C. Hazen, 2005, Surface hydrophobicity changes of two *Candida albicans* serotype B mnn4delta mutants: *Eukaryot Cell*, v. 4, p. 639-48.
- Slutsky, B., J. Buffo, and D. R. Soll, 1985, High-frequency switching of colony morphology in *Candida albicans*: *Science*, v. 230, p. 666-9.

- Smits, G. J., H. van den Ende, and F. M. Klis, 2001, Differential regulation of cell wall biogenesis during growth and development in yeast: *Microbiology*, v. 147, p. 781-94.
- Soll, D. R., 2014, The role of phenotypic switching in the basic biology and pathogenesis of *Candida albicans*: *J Oral Microbiol*, v. 6.
- Soll, D. R., and C. Pujol, 2003, *Candida albicans* clades: *FEMS Immunol Med Microbiol*, v. 39, p. 1-7.
- Southard, S. B., C. A. Specht, C. Mishra, J. Chen-Weiner, and P. W. Robbins, 1999, Molecular analysis of the *Candida albicans* homolog of *Saccharomyces cerevisiae* MNN9, required for glycosylation of cell wall mannoproteins: *J Bacteriol*, v. 181, p. 7439-48.
- Spellberg, B. J., A. S. Ibrahim, V. Avanesian, Y. Fu, C. Myers, Q. T. Phan, S. G. Filler, M. R. Yeaman, and J. E. Edwards, 2006, Efficacy of the anti-*Candida* rAls3p-N or rAls1p-N vaccines against disseminated and mucosal candidiasis: *J Infect Dis*, v. 194, p. 256-60.
- Spellberg, B. J., A. S. Ibrahim, V. Avenissian, S. G. Filler, C. L. Myers, Y. Fu, and J. E. Edwards, 2005, The anti-*Candida albicans* vaccine composed of the recombinant N terminus of Als1p reduces fungal burden and improves survival in both immunocompetent and immunocompromised mice: *Infect Immun*, v. 73, p. 6191-3.
- Staab, J. F., K. Datta, and P. Rhee, 2013, Niche-specific requirement for hyphal wall protein 1 in virulence of *Candida albicans*: *PLoS One*, v. 8, p. e80842.
- Sullivan, P. A., C. Y. Yin, C. Molloy, M. D. Templeton, and M. G. Shepherd, 1983, An analysis of the metabolism and cell wall composition of *Candida albicans* during germ-tube formation: *Can J Microbiol*, v. 29, p. 1514-25.
- Sundstrom, P., 2002, Adhesion in *Candida* spp: *Cell Microbiol*, v. 4, p. 461-9.
- Suzuki, A., N. Shibata, M. Suzuki, F. Saitoh, H. Oyamada, H. Kobayashi, S. Suzuki, and Y. Okawa, 1997, Characterization of beta-1,2-mannosyltransferase in *Candida guilliermondii* and its utilization in the synthesis of novel oligosaccharides: *J Biol Chem*, v. 272, p. 16822-8.
- Suzuki, A., Y. Takata, A. Oshie, A. Tezuka, N. Shibata, H. Kobayashi, Y. Okawa, and S. Suzuki, 1995, Detection of beta-1,2-mannosyltransferase in *Candida albicans* cells: *FEBS Lett*, v. 373, p. 275-9.
- Suzuki, M., and Y. Fukazawa, 1982, Immunochemical characterization of *Candida albicans* cell wall antigens: specific determinant of *Candida albicans* serotype A mannan: *Microbiol Immunol*, v. 26, p. 387-402.
- Suzuki, S., 1995, [Immunochemical study on mannan, the antigenic polysaccharide of pathogenic yeasts in man of genus *Candida*]: *Yakugaku Zasshi*, v. 115, p. 280-94.
- Szabo, E. K., and D. M. MacCallum, 2011, The contribution of mouse models to our understanding of systemic candidiasis: *FEMS Microbiol Lett*, v. 320, p. 1-8.
- Tada, H., E. Nemoto, H. Shimauchi, T. Watanabe, T. Mikami, T. Matsumoto, N. Ohno, H. Tamura, K. Shibata, S. Akashi, K. Miyake, S. Sugawara, and H. Takada, 2002, *Saccharomyces cerevisiae*- and *Candida albicans*-derived mannan induced production of tumor necrosis factor alpha by human monocytes in a CD14- and Toll-like receptor 4-dependent manner: *Microbiol Immunol*, v. 46, p. 503-12.
- Tavanti, A., A. D. Davidson, M. J. Fordyce, N. A. Gow, M. C. Maiden, and F. C. Odds, 2005, Population structure and properties of *Candida albicans*, as determined by multilocus sequence typing: *J Clin Microbiol*, v. 43, p. 5601-13.
- Taylor, B. N., C. Fichtenbaum, M. Saavedra, J. Slavinsky III, R. Swoboda, K. Wozniak, A. Arribas, W. Powderly, and P. L. Fidel Jr, 2000, In vivo virulence of *Candida albicans* isolates causing mucosal infections in people infected with the human immunodeficiency virus: *J Infect Dis*, v. 182, p. 955-9.
- Taylor, P. R., S. V. Tsoni, J. A. Willment, K. M. Dennehy, M. Rosas, H. Findon, K. Haynes, C. Steele, M. Botto, S. Gordon, and G. D. Brown, 2007, Dectin-1 is required for beta-glucan recognition and control of fungal infection: *Nat Immunol*, v. 8, p. 31-8.

- Thomas, J. R., R. A. Dwek, and T. W. Rademacher, 1990, Structure, biosynthesis, and function of glycosylphosphatidylinositols: *Biochemistry*, v. 29, p. 5413-22.
- Tiede, A., I. Bastisch, J. Schubert, P. Orlean, and R. E. Schmidt, 1999, Biosynthesis of glycosylphosphatidylinositols in mammals and unicellular microbes: *Biol Chem*, v. 380, p. 503-23.
- Timpel, C., S. Strahl-Bolsinger, K. Ziegelbauer, and J. F. Ernst, 1998, Multiple functions of Pmt1p-mediated protein O-mannosylation in the fungal pathogen *Candida albicans*: *J Biol Chem*, v. 273, p. 20837-46.
- Timpel, C., S. Zink, S. Strahl-Bolsinger, K. Schröppel, and J. Ernst, 2000, Morphogenesis, adhesive properties, and antifungal resistance depend on the Pmt6 protein mannosyltransferase in the fungal pathogen *Candida albicans*: *J Bacteriol*, v. 182, p. 3063-71.
- Toh-e, A., S. Yasunaga, H. Nisogi, K. Tanaka, T. Oguchi, and Y. Matsui, 1993, Three yeast genes, PIR1, PIR2 and PIR3, containing internal tandem repeats, are related to each other, and PIR1 and PIR2 are required for tolerance to heat shock: *Yeast*, v. 9, p. 481-94.
- Torosantucci, A., C. Bromuro, P. Chiani, F. De Bernardis, F. Berti, C. Galli, F. Norelli, C. Bellucci, L. Polonelli, P. Costantino, R. Rappuoli, and A. Cassone, 2005, A novel glyco-conjugate vaccine against fungal pathogens: *J Exp Med*, v. 202, p. 597-606.
- Torosantucci, A., P. Chiani, C. Bromuro, F. De Bernardis, A. S. Palma, Y. Liu, G. Mignogna, B. Maras, M. Colone, A. Stringaro, S. Zamboni, T. Feizi, and A. Cassone, 2009, Protection by anti-beta-glucan antibodies is associated with restricted beta-1,3 glucan binding specificity and inhibition of fungal growth and adherence: *PLoS One*, v. 4, p. e5392.
- Trinel, P. A., M. Borg-von-Zepelin, G. Lepage, T. Jouault, D. Mackenzie, and D. Poulain, 1993, Isolation and preliminary characterization of the 14- to 18-kilodalton *Candida albicans* antigen as a phospholipomannan containing beta-1,2-linked oligomannosides: *Infect Immun*, v. 61, p. 4398-405.
- Trinel, P. A., C. Faille, P. M. Jacquinet, J. C. Cailliez, and D. Poulain, 1992, Mapping of *Candida albicans* oligomannosidic epitopes by using monoclonal antibodies: *Infect Immun*, v. 60, p. 3845-51.
- Trinel, P. A., T. Jouault, J. E. Cutler, and D. Poulain, 2002a, Beta-1,2-mannosylation of *Candida albicans* mannoproteins and glycolipids differs with growth temperature and serotype: *Infect Immun*, v. 70, p. 5274-8.
- Trinel, P. A., G. Lepage, T. Jouault, G. Strecker, and D. Poulain, 1997, Definitive chemical evidence for the constitutive ability of *Candida albicans* serotype A strains to synthesize beta-1,2 linked oligomannosides containing up to 14 mannose residues: *FEBS Lett*, v. 416, p. 203-6.
- Trinel, P. A., E. Maes, J. P. Zanetta, F. Delplace, B. Coddeville, T. Jouault, G. Strecker, and D. Poulain, 2002b, *Candida albicans* phospholipomannan, a new member of the fungal mannose inositol phosphoceramide family: *J Biol Chem*, v. 277, p. 37260-71.
- Trinel, P. A., Y. Plancke, P. Gerold, T. Jouault, F. Delplace, R. T. Schwarz, G. Strecker, and D. Poulain, 1999, The *Candida albicans* phospholipomannan is a family of glycolipids presenting phosphoinositolmannosides with long linear chains of beta-1,2-linked mannose residues: *J Biol Chem*, v. 274, p. 30520-6.
- Tronchin, G., D. Poulain, J. Herbaut, and J. Biguet, 1982, [Ultrastructural and cytochemical aspects of regenerating "*Candida albicans*" sphero-protoplasts (author's transl)]: *Ann Microbiol (Paris)*, v. 133, p. 275-91.
- Ueno, K., A. Okawara, S. Yamagoe, T. Naka, T. Umeyama, Y. Utena-Abe, N. Tarumoto, M. Niimi, H. Ohno, M. Doe, N. Fujiwara, Y. Kinjo, and Y. Miyazaki, 2013, The mannan of *Candida albicans* lacking β -1,2-linked oligomannosides increases the production of inflammatory cytokines by dendritic cells: *Med Mycol*, v. 51, p. 385-95.
- Urban, C. F., U. Reichard, V. Brinkmann, and A. Zychlinsky, 2006, Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms: *Cell Microbiol*, v. 8, p. 668-76.

- van de Veerdonk, F. L., R. J. Marijnissen, B. J. Kullberg, H. J. Koenen, S. C. Cheng, I. Joosten, W. B. van den Berg, D. L. Williams, J. W. van der Meer, L. A. Joosten, and M. G. Netea, 2009, The macrophage mannose receptor induces IL-17 in response to *Candida albicans*: *Cell Host Microbe*, v. 5, p. 329-40.
- van der Graaf, C. A., M. G. Netea, I. Verschueren, J. W. van der Meer, and B. J. Kullberg, 2005, Differential cytokine production and Toll-like receptor signaling pathways by *Candida albicans* blastoconidia and hyphae: *Infect Immun*, v. 73, p. 7458-64.
- Villamón, E., D. Gozalbo, P. Roig, C. Murciano, J. E. O'Connor, D. Fradelizi, and M. L. Gil, 2004, Myeloid differentiation factor 88 (MyD88) is required for murine resistance to *Candida albicans* and is critically involved in *Candida* -induced production of cytokines: *Eur Cytokine Netw*, v. 15, p. 263-71.
- Vinogradov, E., B. O. Petersen, and J. O. Duus, 2000, Isolation and characterization of non-labeled and ¹³C-labeled mannans from *Pichia pastoris* yeast: *Carbohydr Res*, v. 325, p. 216-21.
- Walker, S. S., Y. Xu, I. Triantafyllou, M. F. Waldman, C. Mendrick, N. Brown, P. Mann, A. Chau, R. Patel, N. Bauman, C. Norris, B. Antonacci, M. Gurnani, A. Cacciapuoti, P. M. McNicholas, S. Wainhaus, R. J. Herr, R. Kuang, R. G. Aslanian, P. C. Ting, and T. A. Black, 2011, Discovery of a novel class of orally active antifungal beta-1,3-D-glucan synthase inhibitors: *Antimicrob Agents Chemother*, v. 55, p. 5099-106.
- Wells, C. A., J. A. Salvage-Jones, X. Li, K. Hitchens, S. Butcher, R. Z. Murray, A. G. Beckhouse, Y. L. Lo, S. Manzanero, C. Cobbold, K. Schroder, B. Ma, S. Orr, L. Stewart, D. Lebus, P. Sobieszczuk, D. A. Hume, J. Stow, H. Blanchard, and R. B. Ashman, 2008, The macrophage-inducible C-type lectin, mincle, is an essential component of the innate immune response to *Candida albicans*: *J Immunol*, v. 180, p. 7404-13.
- White, T. C., S. Holleman, F. Dy, L. F. Mirels, and D. A. Stevens, 2002, Resistance mechanisms in clinical isolates of *Candida albicans*: *Antimicrob Agents Chemother*, v. 46, p. 1704-13.
- White, T. C., K. A. Marr, and R. A. Bowden, 1998, Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance: *Clin Microbiol Rev*, v. 11, p. 382-402.
- Whiteheart, S. W., and E. W. Kubalek, 1995, SNAPs and NSF: general members of the fusion apparatus: *Trends Cell Biol*, v. 5, p. 64-8.
- Wiesner, S. M., R. P. Jechorek, R. M. Garni, C. M. Bendel, and C. L. Wells, 2001, Gastrointestinal colonization by *Candida albicans* mutant strains in antibiotic-treated mice: *Clin Diagn Lab Immunol*, v. 8, p. 192-5.
- Winblad, B., 1975, Experimental renal candidiasis in mice and guinea pigs: *Acta Pathol Microbiol Scand A*, v. 83, p. 406-14.
- Wynn, R. L., M. A. Jabra-Rizk, and T. F. Meiller, 1999, Antifungal drugs and fungal resistance: the need for a new generation of drugs: *Gen Dent*, v. 47, p. 352-5.
- Wynn, R. L., M. A. Jabra-Rizk, and T. F. Meiller, 2003, Fungal drug resistance, biofilms, and new antifungals: *Gen Dent*, v. 51, p. 94-8.
- Xin, H., S. Dziadek, D. R. Bundle, and J. E. Cutler, 2008, Synthetic glycopeptide vaccines combining beta-mannan and peptide epitopes induce protection against candidiasis: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 105, p. 13526-31.
- Yip, C. L., S. K. Welch, F. Klebl, T. Gilbert, P. Seidel, F. J. Grant, P. J. O'Hara, and V. L. MacKay, 1994, Cloning and analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* MNN9 and MNN1 genes required for complex glycosylation of secreted proteins: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 91, p. 2723-7.
- Zhang, M. X., J. E. Cutler, Y. Han, and T. R. Kozel, 1998, Contrasting roles of mannan-specific monoclonal immunoglobulin M antibodies in the activation of classical and alternative pathways by *Candida albicans*: *Infect Immun*, v. 66, p. 6027-9.