UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE-SANTE DE LILLE

THESE DE DOCTORAT

En vue de l'obtention du titre de Docteur de l'Université de Lille 1

Spécialité Biochimie et Biologie moléculaire

Soutenue publiquement le 10 février 2015 par

Karine LECOINTE

Relations Hôte-Pathogène lors de pathologies respiratoires et Caractérisation des modifications pariétales d'*Aspergillus fumigatus* au cours de la germination

Composition du jury :

Président	Pr Elisabeth ELASS, Université de Lille 1
Directeur de thèse	Dr Renaud LEONARD, Université de Lille 1
Rapporteurs	Pr Jean-Paul LATGE, Institut Pasteur Paris
	Dr Nathalie JUGE, Institut of Food Research Norwich
	Dr Michel RIVIERE, Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, Toulouse
Examinateurs	Pr Boualem SENDID, Université de Lille 2
	Dr Anne BEAUVAIS, Institut Pasteur Paris

© 2015 Tous droits réservés.

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE-SANTE DE LILLE

THESE DE DOCTORAT

En vue de l'obtention du titre de Docteur de l'Université de Lille 1

Spécialité Biochimie et Biologie moléculaire

Soutenue publiquement le 10 février 2015 par

Karine LECOINTE

Relations Hôte-Pathogène lors de pathologies respiratoires et Caractérisation des modifications pariétales d'*Aspergillus fumigatus* au cours de la germination

Composition du jury :

Président	Pr Elisabeth ELASS, Université de Lille 1
Directeur de thèse	Dr Renaud LEONARD, Université de Lille 1
Rapporteurs	Pr Jean-Paul LATGE, Institut Pasteur Paris
	Dr Nathalie JUGE, Institut of Food Research Norwich
	Dr Michel RIVIERE, Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, Toulouse
Examinateurs	Pr Boualem SENDID, Université de Lille 2
	Dr Anne BEAUVAIS, Institut Pasteur Paris

© 2015 Tous droits réservés.

© 2015 Tous droits réservés.

doc.univ-lille1.fr

Remerciements

Je remercie les directeurs successifs de l'UGSF, **Jean-Claude Michalski** et **Christophe D'Hulst** de m'avoir accueillie au sein de l'Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle de l'Université de Lille1-UMR 8576 du CNRS.

Je tiens à remercier le **Pr Elisabeth Elass** d'avoir accepté de présider mon jury de thèse. J'adresse également toute ma gratitude au **Pr Jean-Paul Latgé** et au **Dr Nathalie Juge** d'évaluer mes travaux de thèse en qualité de rapporteur. Je remercie également le **Dr Anne Beauvais** et le **Pr Boualem Sendid** qui me font le plaisir d'évaluer mon travail en tant qu'examinateur.

Je remercie aussi le **Dr Renaud Léonard** d'avoir pris le relais au cours de cette thèse quelque peu chaotique. Merci pour tes conseils et ton aide qui devraient me permettre de m'en sortir pour l'avenir.

Je remercie également, le **Dr Catherine Robbe-Masselot,** de m'avoir co-encadrée avec le Dr Renaud Léonard et de m'avoir mis un pied dans le monde des mucines et des interactions hôte-pathogène. Merci d'avoir été là dans les moments un peu difficiles de cette thèse.

Marie, nous avons commencé nos thèses pratiquement en même temps, on s'est soutenue mutuellement dans les hauts et les bas que sont cette aventure et on s'en est finalement sortie… Un grand merci pour ton soutien et tes conseils et ne t'inquiètes pas, j'arrêterai de faire « mes bêtises ».

Belinda, ça va faire maintenant presque 8 ans qu'on se connaît, à notre arrivée à Lille en M1, nous avions formé un bon duo puis nous nous sommes un peu perdue de vue jusqu'à ce qu'on se retrouve cette année au labo, ça a été un plaisir de travailler avec toi ces derniers mois, merci pour ce que tu m'as apporté en espérant que ce ne soit pas la fin…

Anaïs, merci pour ta bonne humeur, reste aussi enthousiaste que tu ne l'es déjà et tu atteindras tes objectifs.

Je tiens aussi à remercier les personnes du labo 206 que sont **Manu** pour sa bonne humeur et sa bise quotidienne, **Bernadette, Nao** et **Fred** pour leur aide en GC.

Je remercie également l'**Unité des Aspergillus de l'Institut Pasteur** qui m'a toujours bien accueillie et plus particulièrement **Rémi** qui a toujours pris le temps de m'aider dans les manips.

Un grand merci à **Coralie** qui a pris le temps il y a 5 ans de me former à toutes sortes de techniques, d'avoir pris le temps de me connaître et d'en être là où j'en suis aujourd'hui.

Yannick, avec Coralie, tu es celui qui me connaît depuis le début, merci pour les conversations scientifiques ou non que nous avons eu ainsi que pour les conseils que tu m'as donnés qui m'ont permis d'avancer.

J'ai aussi une pensée particulièrement à **Florent D.,** que j'ai appris à connaître en salle de GC. Merci pour ces discussions à refaire la vie du labo ou plus personnelles que nous avons eu dans cette salle ou dans les couloirs. Je te souhaite bon courage pour la fin de ta thèse.

Trois ans de thèse, c'est aussi la rencontre de beaucoup de personnes internes ou externes au labo dont la plupart sont devenues des amis maintenant. Merci à **Pierre M., Jorick, Marie B., Florent C., Hêla, Jeanne, Clément, Maxime, Cindy, Alex, Pierre D., Vito** pour toutes les soirées passées ensembles qui nous permettaient de décompresser.

© 2015 Tous droits réservés.

Merci également à **Yvon, Nadège, Gaëlle** pour leur aide au niveau administratif que ce soit pour les commandes, les ordres de mission ou autres documents à remplir souvent incompréhensibles pour nous…

Audrey, notre amitié a commencé il y a une dizaine d'années et j'espère qu'elle continuera encore longtemps malgré la distance. Merci pour ton soutien.

Elodie et Laurent, mes anciens voisins devenus amis, merci de tous vos dépannages au quotidien et les bons moments passés ensembles.

Maïté, merci de ton aide précieuse ! Saches que j'étais fière de toi quand tu as eu ton BTS même si tu avais des doutes alors que tu ne devais pas en avoir vu ton travail… Aies plus confiance en toi et bon courage pour la suite

Romain Z., comme je te l'ai déjà dit, tu resteras mon stagiaire préféré, celui qui m'a fait retrouver ma bonne humeur dans une période difficile. Merci de ton aide lors des manips et de ne pas avoir rechigné sur les horaires. Merci pour les discussions scientifiques ou non que nous avons eu. Restes comme tu es et j'espère que tu réussiras dans la voie que tu as choisie.

Je te dédie ces quelques mots à toi, rien qu'à toi**, Steffi,** simplement te dire merci pour ces deux années passées avec toi dans la joie et la bonne humeur malgré tout ce qui a pu se passer. J'espère que nos routes ne se sépareront pas malgré les choix professionnels que nous ferons. Je te souhaite une bonne fin de thèse et pleins d'articles !

Romain et Cécile, vous avez toujours été là ces derniers temps pour me soutenir. Romain, tu as su me remettre dans le droit chemin quand il le fallait, j'ai adoré inventer des plans B avec toi pour notre avenir, et n'oublions pas notre objectif : devenir millionnaire à 40ans ! Quant à toi Cécile, on a appris à se connaître et ça a collé ! Merci de ta présence à tous les instants.

Mes parents, mon frère et ma sœur, merci de m'avoir laissé vivre ma vie pendant ces trois années même si vous ne m'avez pas beaucoup vue surtout cette année… Mais bonne nouvelle pour vous, j'ai a priori enfin fini mes études !

© 2015 Tous droits réservés.

Publications

Alteration or adaptation, two roads for human gastric mucin glycosylation infected by *Helicobacter pylori.* Joncquel Chevalier Curt M, Lecointe K, Mihalache A, Rossez Y, Gosset P, Leonard R, Robbe-Masselot C. Accepté avec révisions à Glycobiology

Lysosomal di-N-acetylchitobiase-deficient mouse tissues accumulate Man2GlcNAc2 and Man3GlcNAc2.Persichetti E, Klein K, Paciotti S, Lecointe K, Balducci C, Franken S, Duvet S, Matzner U, Roberti R, Hartmann D, Gieselmann V, Beccari T. *Biochim Biophys Acta* 2012 Jul..;1822(7):1137-46

Poster

Etude structurale de la paroi des conidies d*'Aspergillus fumigatus*. Lecointe K., Michalski JC, Latgé JP, Léonard R . 13ème Journée André Verbert, Colloque annuel des doctorants, Faculté de médecine pôle Recherche, Lille, 18 septembre 2013

© 2015 Tous droits réservés.

Liste des tableaux et figures

Tableau 1 : Nomenclature des mutations CFTR 13
Tableau 2 : Structure des différents cores des O-glycannes présents sur les mucines 19
Tableau 3 : Les épitopes sanguins 20
Tableau 4 : Composition pariétale du mycélium en % de polysaccharides 40
Tableau 5 : Les chitine synthases du génome d'*Aspergillus fumigatus* 46
Tableau 6 : Enzymes impliquées dans le remodelage pariétal 51
Tableau 7 : Composition en monosaccharides des fractions alcalino-insoluble et alcalino-soluble des parois conidiale et mycélienne 56
Tableau 8 : Quantité relative de galactomannanes à partir de 0,01mg/ml des fractions alcalino-soluble (AS) et alcalino-insoluble (AI) mesurée par EIA dans la paroi de la conidie aux 3 stades : Dormance, gonflement et germination 56
Tableau 9 : Structures des oligosaccharides retrouvés dans le surnageants après digestion par la LamA 78
Tableau 10 : Rapport molaire des monosaccharides de chaque fraction par rapport au mannose80
Tableau 11 : Pourcentage résiduel des monosaccharides de la fraction AI après la digestion par la LamA 82
Tableau 12 : Structures des oligosaccharides retrouvés dans le surnageants après digestion par la ChiA 85
Tableau 13 : Pourcentage résiduel des monosaccharides de la fraction AI après la digestion par la ChiA 88
Tableau 14 : Structures des oligosaccharides retrouvés dans le surnageants après digestion par la chitosanase 91
Tableau 15 : Pourcentage résiduel des monosaccharides de la fraction AI après la digestion par la chitosanase 93
Tableau 16 : Structures des oligosaccharides retrouvés dans le surnageants après digestion par la lichenase 96
Tableau 17 : Pourcentage résiduel des monosaccharides de la fraction AI après la digestion par la lichénase 99
Tableau 18 : Composition en monosaccharides de la fraction alcalino-soluble de la paroi de conidies au cours de la germination 103
Tableau 19 : Estimation de la masse des α1,3-glucanes au cours de la germination des conidies après chromatographie d'exclusion 108
Tableau 20 : Estimation de la masse des α1,3-glucanes des conidies de trois mutants et de la souche sauvage après chromatographie d'exclusion 109

© 2015 Tous droits réservés.

Tableau 21 : Estimation de la masse des α1,3-glucanes des conidies du mutant Δags3 et de la souche sauvage G10 après chromatographie d'exclusion.....109
Tableau 22 : Proportion des fractions AI et AS des protoplastes en régénération à 1h et 2h 116
Tableau 23 : Composition des structures O-glycanniques des mucines pulmonaires et porcines .123
Tableau 24 : Structures glycanniques retrouvées sur les sputums de différents patients atteints de mucoviscidose.....133

Figure 1: Schéma représentant l'appareil respiratoire humain 9
Figure 2: Représentation schématique de l'épithélium respiratoire muqueux 10
Figure 3 : Schéma du mécanisme d'action des transporteurs ABC.....11
Figure 4 : Topologie du canal à chlorure CFTR 12
Figure 5 : Schéma général de la structure d'une mucine 14
Figure 6 : Profil de distribution des mucines chez l'homme.....15
Figure 7 : Schéma des mucines membranaires et secrétées 16
Figure 8 : Schéma de l'initiation de la O-glycosylation de type mucine.....18
Figure 9 : Structure du glycanne précurseur.....21
Figure 10 : Structure des 3 types de N-glycannes.....22
Figure 11: C-mannosylation 23
Figure 12 : Schéma des mécanismes moléculaire aboutissant à l'obstruction des voies respiratoires24
Figure 13 : Exemples de structures O-glycanniques retrouvées sur les mucines respiratoires 25
Figure 14: Classification d'*Aspergillus fumigatus* dans le règne fongique.....28
Figure 15: Cycle biologique d'*Aspergillus fumigatus* 29
Figure 16: Rôle du système immunitaire inné dans l'infection par *Aspergillus fumigatus* 32
Figure 17: Organisation de la fraction alcalino-insoluble de la paroi d'*Aspergillus fumigatus* 40
Figure 18: Schéma récapitulatif de l'organisation de la paroi cellulaire d'*Aspergillus fumigatus* ..53
Figure 19: Modèle de la voie de signalisation du CWI chez *Aspergillus fumigatus* 53
Figure 20: Schéma du « CWI pathway » chez *S. cerevisiae* 54
Figure 21: Organisation probable de la paroi conidiale d'*Aspergillus fumigatus* 55
Figure 22: Surface conidiale.....57
Figure 23 : Schéma de la biosynthèse de la DHN-mélanine.....58
Figure 24 : Proportion relative des fractions AI et AS de la paroi au cours de la germination des conidies 72
Figure 25 : Composition en monosaccharides des fractions AI et AS de la paroi des conidies au cours de la germination.....73
Figure 26 : Digestion séquentielle de la fraction AI par les enzymes et les produits de digestion attendus 74
Figure 27 : Rendement en % des fractions AI résistantes aux digestions séquentielles 75

© 2015 Tous droits réservés.

Figure 28 : Spectre de masse des oligosaccharides présents dans le surnageant après digestion LamA de la fraction AI des conidies dormantes 76
Figure 29 : Spectre de masse des oligosaccharides présents dans le surnageant après digestion LamA de la fraction AI des conidies gonflées 76
Figure 30 : Spectre de masse des oligosaccharides présents dans le surnageant après digestion LamA de la fraction AI des conidies germées 76
Figure 31 : Composition en monosaccharides des surnageants après digestion LamA des fractions AI des conidies au cours de la germination 79
Figure 32 : Composition en monosaccharides des fractions non retenue (A) et retenue (B) sur ConA du surnageant des conidies germées après LamA 80
Figure 33 : Analyse des liaisons glycosidiques des oligosaccharides présents dans les surnageants après digestion LamA 81
Figure 34 : Composition en monosaccharides des fractions AI résistantes à la digestion LamA des conidies au cours de la germination 82
Figure 35 : Spectre de masse des oligosaccharides présents dans le surnageant après digestion ChiA de la fraction AI des conidies dormantes 84
Figure 36 : Spectre de masse des oligosaccharides présents dans le surnageant après digestion ChiA de la fraction AI des conidies gonflées 84
Figure 37 : Spectre de masse des oligosaccharides présents dans le surnageant après digestion ChiA de la fraction AI des conidies germées 85
Figure 38 : Composition en monosaccharides des surnageants après digestion ChiA des fractions AI des conidies au cours de la germination 86
Figure 39 : Analyse des PMAA du surnageant des fractions AI digérées par la ChiA 87
Figure 40 : Composition en monosaccharides des fractions AI résistantes à la digestion ChiA des conidies au cours de la germination 88
Figure 41 : Spectre de masse des oligosaccharides présents dans le surnageant après digestion Chitosanase de la fraction AI des conidies dormantes 89
Figure 42 : Spectre de masse des oligosaccharides présents dans le surnageant après digestion Chitosanase de la fraction AI des conidies gonflées 89
Figure 43 : Spectre de masse des oligosaccharides présents dans le surnageant après digestion Chitosanase de la fraction AI des conidies germées 90
Figure 44 : Composition en monosaccharides des surnageants après digestion par la chitosanase des fractions AI des conidies au cours de la germination 92
Figure 45 : Analyse des PMAA des surnageants des fractions AI après digestion par la chitosanase. 93
Figure 46 : Composition en monosaccharides des fractions AI résistantes à la digestion par la chitosanase des conidies au cours de la germination 94

© 2015 Tous droits réservés.

Figure 47 : Spectre de masse des oligosaccharides présents dans le surnageant après digestion Lichénase de la fraction AI des conidies dormantes 95
Figure 48 : Spectre de masse des oligosaccharides présents dans le surnageant après digestion Lichénase de la fraction AI des conidies gonflées 95
Figure 49 : Spectre de masse des oligosaccharides présents dans le surnageant après digestion Lichénase de la fraction AI des conidies germées 95
Figure 50 : Composition en monosaccharides des surnageants après digestion par la lichenase des fractions AI des conidies au cours de la germination 97
Figure 51 : Analyse des PMAA des surnageants des fractions AI digérées par la lichénase 98
Figure 52 : Composition en monosaccharides des fractions AI résistantes à la digestion par la lichénase des conidies au cours de la germination 99
Figure 53 : Evolution des proportions en monosaccharides après chaque digestion 99
Figure 54 : Chromatogramme des PMAA de la fraction AI des conidies dormantes résistante à toute digestion 100
Figure 55 : Chromatogramme des PMAA de la fraction AI des conidies gonflées résistante à toute digestion 101
Figure 56 : Chromatogramme des PMAA de la fraction AI des conidies germées résistante à toute digestion 102
Figure 60 : Spectre de masse des oligosaccharides libérés après digestion par l'α1,3 glucanase des fractions AS au cours de la germination des conidies 104
Figure 61 : Analyse des PMAA retrouvés dans les surnageants après digestion par l'α1,3glucanase 105
Figure 62 : Proportion des PMAA de la fraction résistante à la digestion par l'α1,3glucanase 106
Figure 63 : Analyse des dextrans carboxyméthylés sur chromatographie d'exclusion 107
Figure 64 : Droite d'étalonnage de la chromatographie d'exclusion 108
Figure 65 : Hypothèse du remodelage de la paroi au cours de la germination qui expliquerait la libération des oligosaccharides composés de GlcNAc et de Glucose 111
Figure 66 : Composition en monosaccharides de la paroi des protoplastes à différents de temps de régénération (10min, 30min, 2h) 114
Figure 67 : Analyse des liaisons glycosidiques de la paroi totale des protoplastes en régénération d'*Aspergillus fumigatus* 115
Figure 68 : Composition en monosaccharides des fractions AI et AS des protoplastes en régénération d'*A. fumigatus* 116
Figure 69 : Chromatogramme des PMAA retrouvés dans les fractions AI et AS des protoplastes au temps de régénération 1h et 2h 117
Figure 70 : Schéma récapitulatif de la biosynthèse de la paroi d'*Aspergillus fumigatus* 118
Figure 71 : Schéma du principe du test d'adhésion 121

© 2015 Tous droits réservés.

Figure 72 : Test d'adhésion de *P. aeruginosa* sur mucines immobilisées sur membrane de nitrocellulose 121
Figure 73 : Spectre MS des O-glycannes de mucines de poumons humains 122
Figure 74: Spectre MS des O-glycannes de mucines de poumons de porc 123
Figure 75 : Rapport molaire des monosaccharides composant les O-glycannes des mucines pulmonaires humaines et porcines par rapport à la GalNAc 127
Figure 76 : Spectre MS des O-glycannes de mucines du patient 1 128
Figure 77 : Spectre MS des O-glycannes de mucines du patient 2 128
Figure 78 : Spectre MS des O-glycannes de mucines du patient 3 129
Figure 79 : Spectre MS des O-glycannes de mucines du patient 5 129
Figure 80 : Spectre MS des O-glycannes de mucines du patient 7 130
Figure 81: Spectre MS des O-glycannes de mucines du patient 8 130
Figure 82 : Spectre MS des O-glycannes de mucines du patient 9 131
Figure 83 : Spectre MS des O-glycannes de mucines du patient 10 131
Figure 84 : Spectre MS des O-glycannes de mucines du patient 11 131
Figure 85 : Spectre MS des O-glycannes de mucines du patient 12 132
Figure 86 : Histogramme représentant les taux de O-glycannes sialylés, sulfatés et neutres chez les 10 patients atteints de mucoviscidose 137
Figure 87 : Rapport molaire des monosaccharides composant les O-glycannes des mucines des différents patients atteints de mucoviscidose par rapport à la GalNAc 138
Figure 88 : Taux de glycosylation des mucines des différents patients atteints de mucoviscidose 138
Figure 89 : Test d'adhésion sur membrane de nitrocellulose de *P. aeruginosa* sur des mucines issues d'expectorats d'individus atteints de mucoviscidose 139
Figure 90 : Test d'inhibition de l'adhérence de *P. aeruginosa* avec co-incubation préalable soit avec de l'acide sialique, soit avec *Aspergillus fumigatus*..... 140
Figure 91 : Test d'inhibition de l'adhérence de *P. aeruginosa* avec co-incubation préalable avec 1 mg de mucines du patient 10 140
Figure 92 : Test d'inhibition de l'adhésion de *P. aeruginosa* avec incubation préalable avec les O-glycannes libérés par β-élimination de l'axe protéique des mucines 141
Figure 93 : Test d'inhibition de l'adhésion de *P. aeruginosa* par pré-incubation avec des mucines du porc 3 et des mucines digérées par la pronase. 142
Figure 94 : Test d'adhésion sur membrane de nitrocellulose d' *A .fumigatus* sur des mucines issues de sputums d'individus atteints de mucoviscidose (Individu 1 à 12) ainsi que de poumons humains (Homme 1 et 2) et de porcs 142
Figure 95: Test d'adhésion d'*H.pylori* sur des mucines gastriques portant différents antigènes de groupes sanguins issus de patients atteints ou non de métaplasies. 146

© 2015 Tous droits réservés.

Sommaire **1**

Abbéviations **5**

Résumé **6**

Exposé bibliographique

Chapitre 1 : Mucoviscidose et interaction hôte-pathogène **9**
- **I. L'appareil respiratoire** **9**
- **II. La mucoviscidose** **10**
  - A) Présentation 10
  - B) CFTR (Cystic Fibrosis transmembrane conductance regulator) 11
  - C) Symptômes associés à la mucoviscidose 13
- **III. Les mucines** **14**
  - A) Les mucines sécrétées 15
  - B) Les mucines membranaires 16
  - C) Les glycoprotéines de type-membranaires 17
  - D) La glycosylation des mucines 17
    - 1) La O-glycosylation 17
    - 2) La N-glycosylation 20
    - 3) La C-mannosylation 22
- **IV. Les mucines du tractus respiratoire** **23**
  - A) Les mucines du mucus respiratoires 23
  - B) Altération de la glycosylation et de la sulfatation des mucines lors de la fibrose kystique 25
- **V. Pseudomonas aeruginosa et adhérence sur les mucines respiratoires** **26**

Chapitre 2 : Présentation d'*Aspergillus fumigatus* **28**
- **I. Le cycle biologique d'*Aspergillus fumigatus*** **28**
  - A) Classification 28
  - B) La reproduction asexuée 28
  - C) La reproduction sexuée 29
- **II. Pathologies associées à *Aspergillus fumigatus*** **30**
- **III. Le système immunitaire inné de l'hôte** **30**
- **IV. Traitements des aspergilloses** **33**

Chapitre 3 : La paroi d'*Aspergillus fumigatus* **34**
- **I. Les protéines pariétales** **34**
  - A) Protéines pariétales ayant un rôle dans l'adhérence 34
  - B) Protéines ayant un rôle de défense contre le système immunitaire et dans l'invasion de l'hôte 37
  - C) Protéines pariétales ayant un rôle dans le remodelage de la paroi 38
- **II. La paroi mycéliale et sa composition en monsaccharides** **38**
- **III. Les enzymes impliquées dans la biosynthèse et le remodelage de la paroi** **40**
  - A) Les enzymes agissant sur le β1,3-glucane 40
    - 1) Le complexe glucane synthase 40
    - 2) Les enzymes de remodelage : les Gelp et Bgtp 41
    - 3) Les enzymes de « dégradation » : les β1,3 glucanases 43
  - B) Les enzymes agissant sur la chitine 45
    - 1) Les chitine synthases 45
    - 2) Les chitinases 46
  - C) Les enzymes agissant sur l'α1,3-glucane 48
    - 1) Les α1,3-glucane synthases 48
    - 2) Les α1,3 glucanases 49

© 2015 Tous droits réservés. doc.univ-lille1.fr

D) Les enzymes agissant sur le galactomannanes 49
IV. Le pathway d'intégrité pariétale (CWI) 53
V. La paroi conidiale 55
A) La couche interne de la paroi conidiale 55
B) La couche externe de la paroi conidiale 57
1) La mélanine 57
2) Les hydrophobines 58
C) Ecm33p et CspA : deux protéines pariétales importantes dans le maintien de l'intégrité conidiale 59
1) Ecm33p 59
2) Cell surface protein A (CspA) 60

Matériels et Méthodes

I. Préparation des parois des conidies dormantes, gonflées et germées ainsi que des mutants d'*Aspergillus fumigatus* 63
II. Production de LamA (endo-β1,3-glucanase de *Thermogota neapolitana*) pour la digestion de la fraction AI 63
III. Digestion de la fraction AI par la LamA 64
IV. Production de ChiA recombinante (ChitinaseA de Serratia *marcescens*) pour la digestion de la fraction AI 65
V. Digestion de la fraction AI résistante à la LamA par la ChiA 65
VI. Digestion de la fraction AI résistante à la ChiA par la Chitosanase 66
VII. Digestion de la fraction AI résistante à la Chitosanase par la lichénase 66
VIII. Carboxyméthylation des α1,3-glucanes 66
IX. Formation de protoplastes et régénération 67
X. Préparation et extraction des mucines pulmonaires 67
XI. Composition en monosaccharides des fractions AI, AS et des mucines par triméthylsilylation 68
XII. Purification des O-glycannes 68
XIII. Perméthylation des O-glycannes de mucines pulmonaires et des oligosaccharides résultant des digestions enzymatiques de la paroi d'*Aspergillus fumigatus* 69
XIV. Analyse des O-glycannes et oligosaccharides purifiés par MALDI-TOF 69
XV. Perméthylation des Polysaccharides pariétaux de la fraction alcalino-insoluble 69
XVI. Marquage des bactéries au DAPI (4',6'-diamidino-2-phényl-indole) 70
XVII. Test d'adhésion bactérienne sur membrane de nitrocellulose 70

Résultats

Partie 1 : Etude structurale de la paroi d'*Aspergillus fumigatus* au cours de la germination .72

A- Détermination des proportions relatives des fractions alcalino-insolubles et alcalino-solubles au cours de la germination d'*A. fumigatus*
B- Etude de la fraction alcalino-insoluble de la paroi d'*Aspergillus fumigatus*……74
I) Stratégie d'étude de la fraction AI : Digestions séquentielles 74
II) Etude des oligosaccharides libérés et du culot résiduel après digestion LamA 75
1) Analyse des oligosaccharides libérés dans le surnageant après digestion LamA ... 75
a) Analyse des oligosaccharides libérés par spectrométrie de masse 75
b) Analyse de la composition en monosaccharides du surnageant après digestion LamA 78
c) Analyse des liaisons glycosidiques des oligosaccharides du surnageant libérés par la LamA par GC-MS 80
2) Analyse du culot résiduel après la digestion LamA 82

© 2015 Tous droits réservés. doc.univ-lille1.fr

III) Etude des oligosaccharides libérés et du culot résiduel après digestion ChiA sur le culot résiduel après LamA 83
1) Analyse des oligosaccharides libérés dans le surnageant après digestion ChiA 83
a) Analyse des oligosaccharides libérés par spectrométrie de masse 83
b) Analyse de la composition en monosaccharides du surnageant après ChiA 86
c) Analyse des liaisons glycosidiques des oligosaccharides du surnageant libérés par la ChiA par GC-MS 86
2) Analyse du culot résiduel après la digestion par la ChiA 87
IV) Etude des oligosaccharides libérés et du culot résiduel après digestion Chitosanase 88
1) Analyse des oligosaccharides libérés dans le surnageant après chitosanase 88
a) Analyse des oligosaccharides libérés par spectrométrie de masse 88
b) Analyse de la composition en monosaccharides du surnageant et des liaisons glycosidiques après digestion par la chitosanase 92
2) Analyse du culot résiduel après digestion par la chitosanase 93
V) Etude des oligosaccharides libérés et du culot résiduel après digestion par la lichénase 94
1) Analyse des oligosaccharides libérés dans le surnageant après digestion par la lichénase 94
a) Analyse des oligosaccharides libérés par spectrométrie de masse 94
b) Analyse de la composition en monosaccharides du surnageant après digestion par la lichénase 96
c) Analyse des liaisons glycosidiques des oligosaccharides du surnageant libérés par la lichénase par GC-MS 97
2) Analyse du culot résiduel après la digestion par la lichénase 98
a) Analyse de la composition en monosaccharides du culot résiduel résistant à la digestion par la lichénase 98
b) Analyse des liaisons glycosidiques du culot résiduel résistant à la digestion par la lichénase par GC-MS 100

C- Etude de la fraction Alcalino-Soluble de la paroi d'*Aspergillus fumigatus* 103

I) Composition en monosaccharides et Analyse des liaisons glycosidiques de la fraction AS 103
II) Estimation de la masse moléculaire des chaînes d'α 1,3-glucanes par chromatographie d'exclusion 107
1) Calibration de la colonne de chromatographie d'exclusion HR 500S 107
2) Analyse des α 1,3-glucanes au cours de la germination des conidies 108
3) Analyse des α 1,3-glucanes chez les mutants ΔAGS 108
D- Discussion et perspectives 110

Partie 2 : Analyse des protoplastes en régénération 114

Discussion et perspectives 118

Partie 3 : Glycosylation des mucines pulmonaires et implication dans le phénomène d'adhérence hôte-pathogène 120

I) Mise au point d'un test d'adhésion des bactéries sur mucines immobilisées 120
II) Glycosylation des mucines pulmonaires 122
1) Comparaison de la glycosylation des mucines bronchiques humaines et porcines d'individus sains 122

© 2015 Tous droits réservés. doc.univ-lille1.fr

2) Analyse de la glycosylation des mucines bronchiques de patients atteints de mucoviscidose.....127
3) Adhésion de *Pseudomonas aeruginosa* aux mucines pulmonaires des patients atteints de mucoviscidose.....139
4) Adhésion d'*Aspergillus fumigatus* aux mucines pulmonaires 142
III) Discussion et perspectives.....143

Partie 4 : Glycosylation des mucines gastriques humaines en réponse à l'infection par *Helicobacter pylori* 145

Publication : Alteration or adaptation, the two roads for human gastric mucin glycosylation infected by *Helicobacter pylori* 147

Références bibliographiques.....177

© 2015 Tous droits réservés.

doc.univ-lille1.fr

Abbréviations

***A. fumigatus*:** *Aspergillus fumigatus*
AI: alcalino-insoluble
AS: alcalino-soluble
ATFA: acide trifluoroacétique
ChiA: Chitinase A
CFTR: Cystic Fibrosis transmembrane conductance regulator
CPG: chromatographie phase gazeuse
DAPI: 4',6'-diamidino-2-phénylindole
DMSO: diméthylsulfoxyde
EDTA: éthylènediaminetétracétate
Fuc: fucose
Gal: galactose
GalNAc: N-Acétylgalactosamine
GalNAcol: N-Acétylgalactosaminitol
Glc: glucose
GlcNAc: N-Acétylglucosamine
GlcNH2: Glucosamine
Hex: hexose
HexNAc: N-AcétylHexosamine
HexNH2 : hexosamine
LamA : Laminarinase A
Le^a : antigène $Lewis^a$
Le^b : antigène $Lewis^b$
Le^x : antigène $Lewis^x$
Le^y : antigène $Lewis^y$
MALDI : Matrix-assisted laser desorption/ionisation
Man : mannose
$NaBH_4$: Borohydrure de sodium
NaOAc : Acétate de sodium
NaOH : soude
NeuAc: acide N-acétylneuraminique
P.aeruginosa : *Pseudomonas aeruginosa*
PMAA : Alditol-Acétates Partiellement Méthylés
TOF: time of flight

© 2015 Tous droits réservés.

doc.univ-lille1.fr

Résumé

Chaque jour, nous inhalons des organismes pathogènes ou non tels que des bactéries ou des champignons. Chez l'individu sain, l'infection est évitée grâce à l'action conjuguée du mucus pulmonaire sécrété qui empêche la colonisation des pathogènes et par le battement des cils de l'épithélium pulmonaire permettant ainsi la clairance des poumons. Si cette barrière ne suffit pas, les cellules du système immunitaire entrent alors en jeu et vont reconnaître les pathogènes *via* une famille de récepteurs particuliers, les PRR. Chez les personnes immunodéprimées ou atteintes de mucoviscidose, ces mécanismes ne sont plus fonctionnels favorisant le développement de pathogènes tels que *Pseudomonas aeruginosa* ou *Aspergillus fumigatus*. Afin de mieux comprendre la pathogénèse des infections pulmonaires, mon travail de thèse a consisté d'une part à caractériser la paroi d'*A. fumigatus* au cours de la germination des conidies et d'autre part à identifier les motifs glycanniques portés par les mucines et reconnus par les pathogènes.

Lors de la germination des conidies, nous avons observé une augmentation de la proportion de β1,3-glucane, α1,3-glucane et de chitine corrélée à une diminution en galactomannanes. Nous avons également estimé la taille des α1,3-glucanes au cours de la germination ainsi que de divers mutants afin d'avoir une idée plus précise du rôle des 3 Alpha-Glucane Synthases (AGS) présentes chez *A. fumigatus*. Dans un deuxième temps, nous avons purifié les mucines pulmonaires de patients atteints de mucoviscidose et caractérisé leurs profils de glycosylation. Nous avons pu démontrer de très fortes variations inter-individuelles avec pour certains patients la présence de mucines essentiellement neutres alors que pour d'autres les mucines étaient presque exclusivement acides. Ces résultats sont certainement le reflet d'un niveau d'inflammation, d'infection et d'avancée de la maladie différent. Nous avons ensuite développé un test d'adhésion de bactéries fluorescentes sur mucines déposées sur des membranes de nitrocellulose. En analysant les profils de glycosylation des mucines sur lesquelles les bactéries ont adhéré, nous avons pu démontrer que *P. aeruginosa* adhère préférentiellement aux structures sialylées et sulfatées. Nous avons également montré qu'*A. fumigatus* adhérait aux mucines pulmonaires humaines et de porc.

Ce travail devrait permettre à terme d'identifier de nouvelles molécules permettant d'inhiber l'adhésion de pathogènes et ainsi de lutter plus efficacement contre les infections.

© 2015 Tous droits réservés.

doc.univ-lille1.fr

Abstract

Daily, we inhale pathogenic or non-pathogenic bacteria and fungi organisms. In healthy individuals, infection is prevented by the combined action of secreted pulmonary mucus which avoids colonization of pathogens and the beating of cilia of pulmonary mucosal epithelium allowing clearance of the lungs. If the first barrier's effect is not sufficient, immune cells will recognize pathogens *via* the pathogen recognition receptors (PRR) family. In immunocompromised people or cystic fibrosis patients, these mechanisms are no longer functional promoting the development of pathogens such as *Pseudomonas aeruginosa* or *Aspergillus fumigatus*. In order to better understand pathogenesis of pulmonary infection, my PhD work was focused on the characterization of *A. fumigatus* wall during conidial germination and on the identification of oligosaccharidic ligands carried by mucins and recognized by pathogens.

During conidial germination, we have observed an increase of the proportion of β1,3-glucan, chitin and α1,3-glucan correlated with a decrease in galactomannans. We also estimated the molecular size of α1,3-glucan during germination and various mutants in order to have a clearer picture of the role of Alpha 3 Glucan Synthase (AGS) expressed by *A. fumigatus*. In the second part of the work, we have purified respiratory mucins from patients with cystic fibrosis and analyzed their glycosylation profile. We have demonstrated profund inter-individual variation with for some patients mainly neutral mucins whereas for others, mucins were essentially acidic. These results certainly reflect the level of inflammation, infection and progression of disease. We thus developed an adhesion assay of fluorescently labeled bacteria on mucins spotted on nitrocellulose membrane. By analyzing the repertoire of glycosylation of mucins to which bacteria bind to, we were able to demonstrate that *P. aeruginosa* preferentially adheres on sulfated and sialylated structures. We also showed that *A. fumigatus* is able to bind to human and pig lung mucins.

This work paves the way for the development of alternative strategies against pathogens infection, using adherence inhibitors.

© 2015 Tous droits réservés.

doc.univ-lille1.fr

Exposé bibliographique

© 2015 Tous droits réservés.

doc.univ-lille1.fr

CHAPITRE 1 : Mucoviscidose et interaction Hôte-Pathogène

I. L'appareil respiratoire

L'appareil respiratoire est composé des voies aériennes, des poumons, de la plèvre, de la circulation pulmonaire et des muscles respiratoires insérés sur la paroi thoracique. Les voies aériennes sont divisées en voies aériennes supérieures et voies aériennes inférieures. Les voies aériennes supérieures sont situées dans la face et dans le cou et comprennent les fosses nasales et les sinus paranasaux, le pharynx, le larynx. Les voies aériennes inférieures sont situées dans le cou et le thorax. Elles sont composées de la trachée et de l'arbre bronchique jusqu'aux alvéoles pulmonaires. Les poumons, entourés de la plèvre, sont les deux organes parenchymateux où se produisent les échanges gazeux entre l'atmosphère et la circulation pulmonaire ou petite circulation (Fig.1).

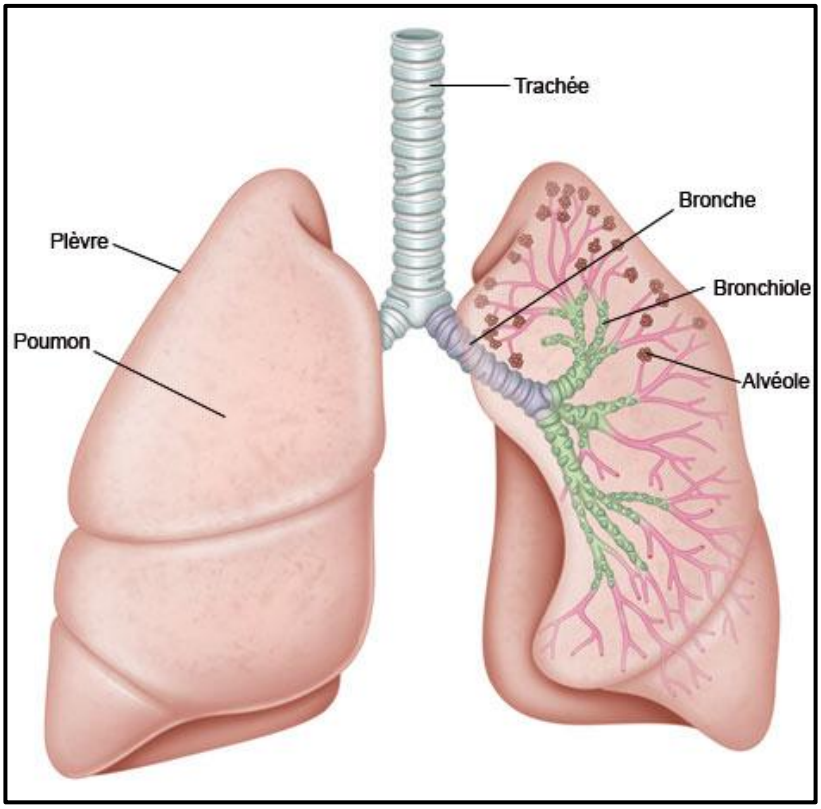


Figure 1: Schéma représentant l'appareil respiratoire humain (d'après CoursMédecine.com)

Les voies aériennes ont pour rôle : la conductance, le conditionnement (réchauffement et humidification) et la purification de l'air. Concernant ce dernier point, les particules inhalées sont piégées par le mucus produit par les glandes muqueuses et les cellules caliciformes de l'épithélium respiratoire de l'arbre trachéo-bronchique (Fig.2). Cet épithélium est constitué de cellules caliciformes, de cellules basales et de cellules ciliées qui permettent la clairance en faisant remonter les particules vers le pharynx. Si elles ne sont pas éliminées par ce mécanisme, elles peuvent être phagocytées par les macrophages alvéolaires. Les cellules caliciformes possèdent un corps basal aminci contenant le noyau et un pôle apical dilaté contenant les vacuoles de sécrétion. Ces vacuoles de

© 2015 Tous droits réservés. doc.univ-lille1.fr

sécrétion dérivent de l'appareil de Golgi et contiennent des glycoprotéines notamment les mucines qui seront libérées par exocytose pour former le mucus. Ce mucus forme un revêtement continu tapissant toutes les voies de conduction. On en produit entre 15 et 20 ml par jour. Il a un triple rôle :

1 – piège à particules : effet « papier tue-mouche »

2 – humidification de l'air inspiré: ceci provient d'une évaporation à partir de la couche superficielle du mucus qui, partiellement déshydratée, voit ainsi sa viscosité augmentée.

3 – protection physique des cellules épithéliales : il constitue un enduit recouvrant l'épithélium.

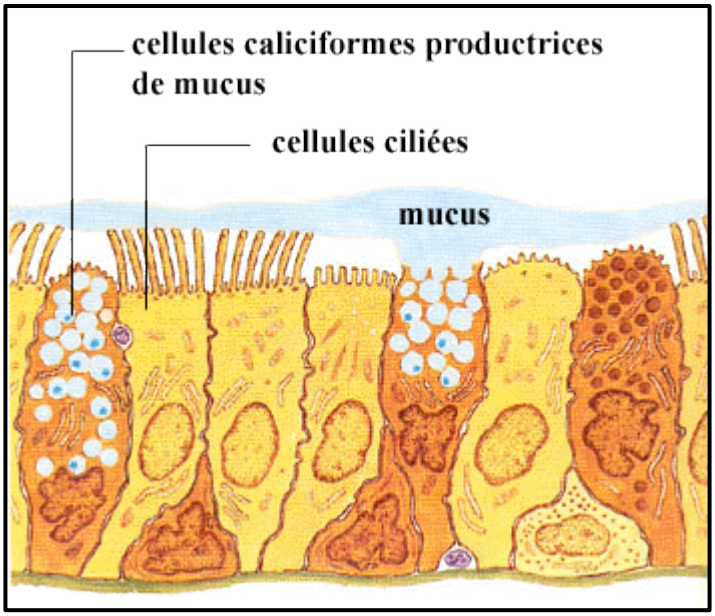


Figure 2: Représentation schématique de l'épithélium respiratoire muqueux (*d'après http://udsmed.u-strasbg.fr/*)

Dans certains cas pathologiques, le mucus s'épaissit et empêche l'action correcte des cellules ciliées comme dans la mucoviscidose. Dans d'autres cas, chez les patients immunodéprimés, ce sont les cellules immunitaires qui manquent à l'appel permettant le développement de certains pathogènes comme *Aspergillus fumigatus* menant à l'aspergillose invasive.

II. La Mucoviscidose

A) Présentation

La mucoviscidose ou fibrose kystique (Cystic Fibrosis (CF) chez les anglo-saxons) est une maladie génétique autosomale récessive décrite en 1936 par Guido Fanconi mettant en relation la maladie coeliaque, la fibrose cystique du pancréas et une dilatation des bronches. Elle est considérée comme la plus fréquente des maladies héréditaires monogéniques sévères dans les populations caucasiennes (Andersen D.H. *et al.*, 1946). Sa prévalence est de 1/3500 en Europe. Au départ, le diagnostic de cette maladie était établi par le test à la sueur (Di San't Agnese P.A. *et al.*, 1953) avant d'être confirmé par test génétique. En effet, en réponse à un stimulus thermique doux, la sueur sécrétée était anormale

© 2015 Tous droits réservés. doc.univ-lille1.fr

chez 43 patients ayant une fibrose cystique du pancréas. Les concentrations en sodium (Na^+) et en chlorure (Cl^-) de la sueur de ces patients étaient 2 à 4 fois supérieures par rapport à celles de 50 autres patients avec différentes pathologies. La même chose a été observée pour la concentration en potassium (K^+) mais dans une moindre mesure. Pour l'anecdote, la maladie pouvait déjà être diagnostiquée au Moyen-âge, le folklore médiéval prédisait déjà la mort d'un enfant s'il était « salé » quand on l'embrassait (Quinton P.M, 1999).

B) CFTR (Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator)

La mucoviscidose est due à la mutation des allèles du gène CFTR qui code une protéine de 1480 acides aminés. Le gène est situé sur le chromosome 7. Ces mutations causent une perte de la fonction « canal à chlorure » de CFTR modifiant l'homéostasie ionique et aqueuse à la surface épithéliale ce qui explique l'augmentation de la viscosité du mucus. CFTR est une protéine membranaire appartenant à la famille des transporteurs ABC. Ces transporteurs utilisent l'hydrolyse de l'ATP pour transporter des substrats (ions, sucres, acides aminés, protéines…) à travers la membrane cellulaire contre un gradient de concentration et peuvent être soit des importeurs (principalement chez les procaryotes), soit des exporteurs (Higgins C.F., 1992) (Fig. 3).

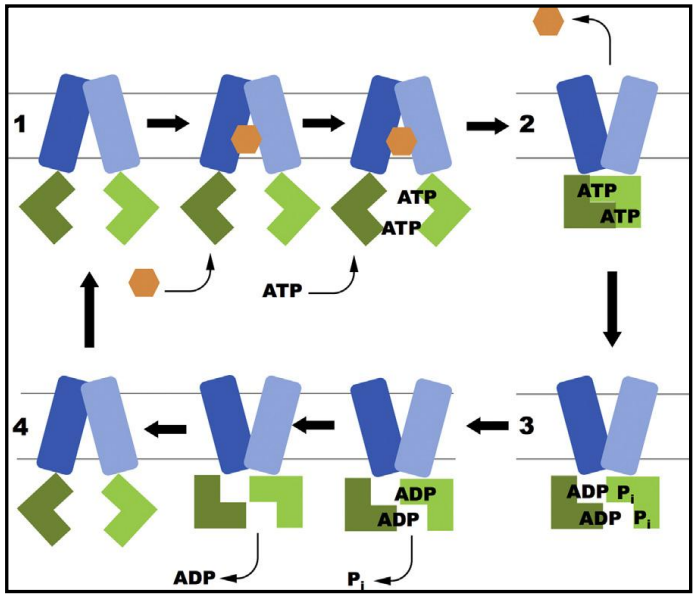


Figure 3 : Schéma du mécanisme d'action des transporteurs ABC. (1) Le subtrat se lie sur un site intracellulaire des TMDs (domaines transmembranaires) ce qui augmente l'affinité des NBDs (Nucleotide Binding Domain) pour ATP favorisant ainsi la formation du dimère NBD. (2) La liaison de l'ATP mène à la formation de la conformation fermée du dimère NBD en "head-to-tail sandwich" qui permute les TMD d'une conformation fermée vers l'intérieur à une conformation ouverte vers l'extérieur, permettant le relâchement du substrat dans le milieu extracellulaire. (3) L'hydrolyse de l'ATP entraîne la destabilisation du dimère NBD. (4) Le relâchement séquentiel de Pi et d'ADP replace le transporteur dans sa conformation initiale, prêt pour accepter une nouvelle molécule à transporter. *(Les rectangles bleus représentent les TMDs ; les boîtes en forme de L représentent quant à elle les NBDs ; et le substrat est représenté par un hexagone orange)*. (D'après Cant N. *et al.*, 2014)

© 2015 Tous droits réservés. doc.univ-lille1.fr

CFTR est le seul membre connu de la famille des transporteurs ABC à être un canal ionique. La protéine est localisée sur les membranes des cellules épithéliales des voies aériennes, intestinales, reproductrices, ainsi que sur les glandes de sécrétion externes telles que les glandes sudorales, pancréatiques et salivaires. Cette protéine est un canal de régulation du passage des ions chlorure (Cl^-) à travers la membrane des cellules épithéliales, mais elle agit également comme un régulateur de conductibilité et exerce une influence modulatrice sur de nombreux autres canaux ioniques et protéines de transport tels que le canal épithélial de Na^+ (Briel M. *et al.*, 1998), les canaux à eau (Schreiber R. *et al.*, 1999) et les mécanismes d'exportation de l'ATP (Sugita M. *et al.*, 1998). CFTR a une structure typique de celle des transporteurs ABC, c'est-à-dire composée de deux domaines transmembranaires (TMD) et de deux domaines de liaison aux nucléotides (NBD) (Higgins C.F., 1992). Il est à noter qu'il existe également une région de régulation additionnelle unique à CFTR. Les deux domaines transmembranaires composés de six domaines transmembranaires en hélices α formeraient le pore par lequel transitent les ions (Fig.4).

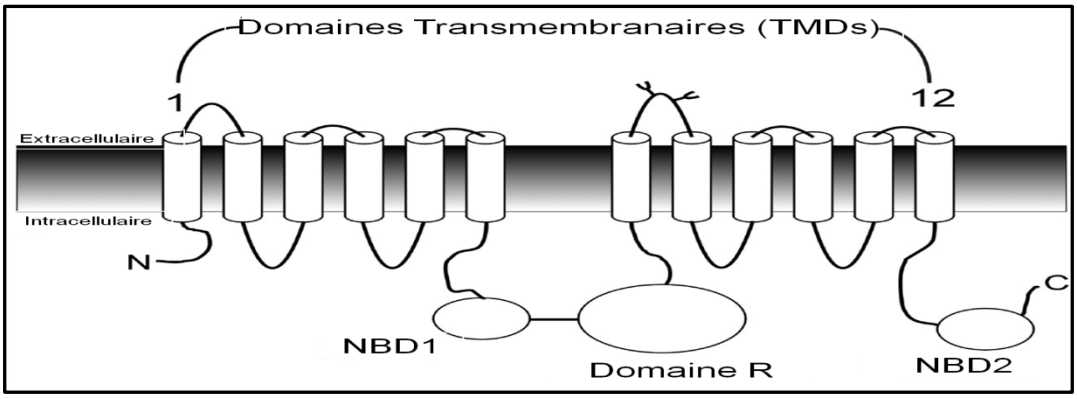


Figure 4 : Topologie du canal à chlorure CFTR. (D'après Lindsdell P., 2006)

Le transport rapide des ions Cl^- à travers la membrane serait assuré par des acides aminés chargés positivement des TMDs formant le pore. L'arginine R334 du TMD6 attire les ions Cl^- dans le pore à partir du milieu extracellulaire, alors qu'une autre charge positive de la lysine K95 sur le TMD 1 attire un ion Cl^- du côté intracellulaire de la membrane. Ces interactions électrostatiques entre les ions Cl^- et ces acides aminés sont nécessaires au bon fonctionnement du canal puisqu'une mutation de ces charges positives réduit le flux des ions à travers le pore comme c'est le cas pour la mutation R334 lors de la fibrose kystique (Lindsell P., 2006).

A ce jour, plus de 1900 mutations du gène CFTR sont connues pour causer la mucoviscidose mais dans plus de 70% des cas, la mutation associée à cette pathologie est la délétion de la phénylalanine en position 508 (ΔF508). Comme c'est une maladie génétique récessive, les individus doivent avoir les deux allèles mutés pour déclencher la maladie. Il existe une nomenclature des différentes mutations du gène CFTR engendrant différents phénotypes qui est présentée dans le tableau 1 suivant (d'après Prickett M. et Jain M., 2013) :

© 2015 Tous droits réservés.
doc.univ-lille1.fr

Tableau 1 : Nomenclature des mutations CFTR

Classe	Classification	Mutations associées les plus fréquentes	Fréquence	Phénotype	Devenir de la protéine CFTR
I	Défaut de synthèse	W1282X, G542X	10%	Sévère	Pas de protéine
II	Défaut de maturation	ΔF508, N1303K	70%	Sévère	Dégradation intracellulaire
III	Blocage de la régulation	G551D	3-4%	Sévère	Défaut de déclenchement
IV	Diminution de la conductance	R117H, R347P	<2%	Léger	Diminution des mouvements Cl^-
V	Diminution de son abondance	A455E,3849 +10kb C→T	<1%	Variable	Diminution du taux de CFTR wild-type

La mutation ΔF508 est la plus étudiée, elle engendre un défaut de mise en conformation de la protéine au niveau du réticulum endoplasmique rugueux ce qui entraîne sa dégradation par le système ERAD. Seul 1% des protéines traduites atteignent la membrane plasmique et sont fonctionnelles. L'une des approches thérapeutiques envisagées est de développer des molécules capables d'augmenter le taux de CFTR au niveau de la membrane plasmique. Un médicament basé sur cette stratégie est le VX-809 (Van Goor F. *et al.*, 2006) pouvant être associé à un potentialisateur (ex : le Kalydeco) qui stimule l'activité du canal s'il est arrimé à la membrane.

C) Symptômes associés à la mucoviscidose

Les caractéristiques physiopathologiques de la CF sont un mucus anormal ou un épaississement muqueux de la lumière du pancréas, des poumons et de l'intestin ainsi que l'émission de sécrétions salées anormales par les glandes sudoripares. Au niveau respiratoire, le mucus produit par les cellules caliciformes qui tapissent les bronches sera donc plus épais et s'écoulera difficilement obstruant les voies respiratoires diminuant la clairance par l'épithélium ciliaire pulmonaire. Ce mucus sera, par ailleurs, un milieu très favorable au développement de germes (bactéries telles que *Pseudomonas aeruginosa*, champignons tels qu'*Aspergillus fumigatus*) provoquant des infections difficilement traitables. Ces phénomènes augmentent la mortalité et la morbidité associée à cette maladie. Le mucus tapissant la lumière des différents organes producteurs est principalement composé d'eau, d'ions, de lipides, de protéines et de glycoprotéines nommées mucines, macromolécules importantes notamment dans les phénomènes d'interaction hôte-pathogène.

© 2015 Tous droits réservés.

doc.univ-lille1.fr

III. Les mucines

Les mucines sont des macromolécules hautement glycosylées (masse glucidique> 80%). Elles sont caractérisées par un squelette protéique (apomucine) codé par les gènes MUC. L'apomucine est constituée de séquences peptidiques appelées « tandem repeats (TR) » riche en prolines, thréonines et sérines (région PTS). Ces deux derniers acides aminés seront les points d'attache des O-glycannes (Fig.5). La répétition en tandem dans le gène MUC du fragment d'ADN codant les TRs engendre des Variable Number Tandem Repeats (VNTR) responsables du polymorphisme d'une mucine donnée au sein et entre les individus (Vinall L.E. *et al.*, 1998).

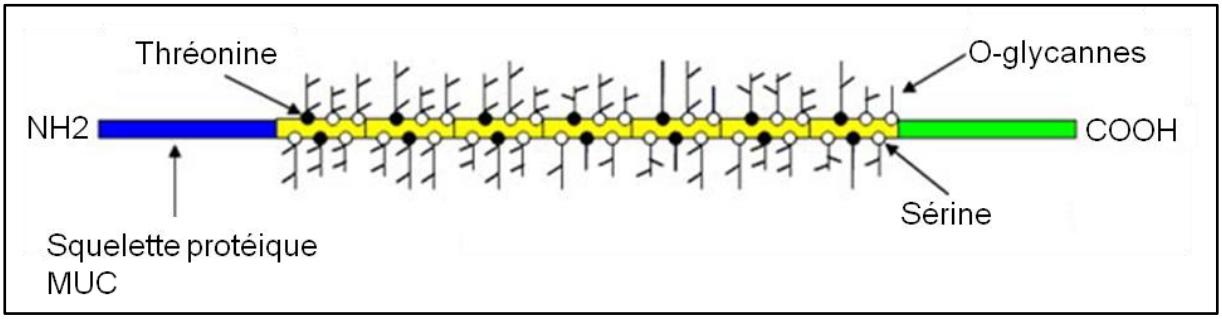


Figure 5 : Schéma général de la structure d'une mucine**.** (En bleu : le domaine N-terminal, en jaune : les domaines TR, en vert : le domaine C-terminal) (D'après Rose M.C. et Voynow J.A., 2006)

© 2015 Tous droits réservés.

doc.univ-lille1.fr

La nature et la quantité de ces O-glycannes peuvent influer les propriétés biologiques et rhéologiques du mucus. Les mucines peuvent être dans une moindre mesure également N-glycosylées et C-glycosylées. Elles sont produites par une variété de cellules épithéliales rencontrées à l'interface des tissus épithéliaux tapissant les conduits et le milieu externe contigüe. Il existe trois sphères principales de production de mucines : les voies aériennes et respiratoires, les voies digestives et le système reproducteur dont le profil de distribution est présenté dans la figure 6. Mais on peut les retrouver dans d'autres endroits tels que les glandes mammaires, les systèmes otologique, oculaire et urinaire. Le profil d'expression des mucines varie en fonction des organes.

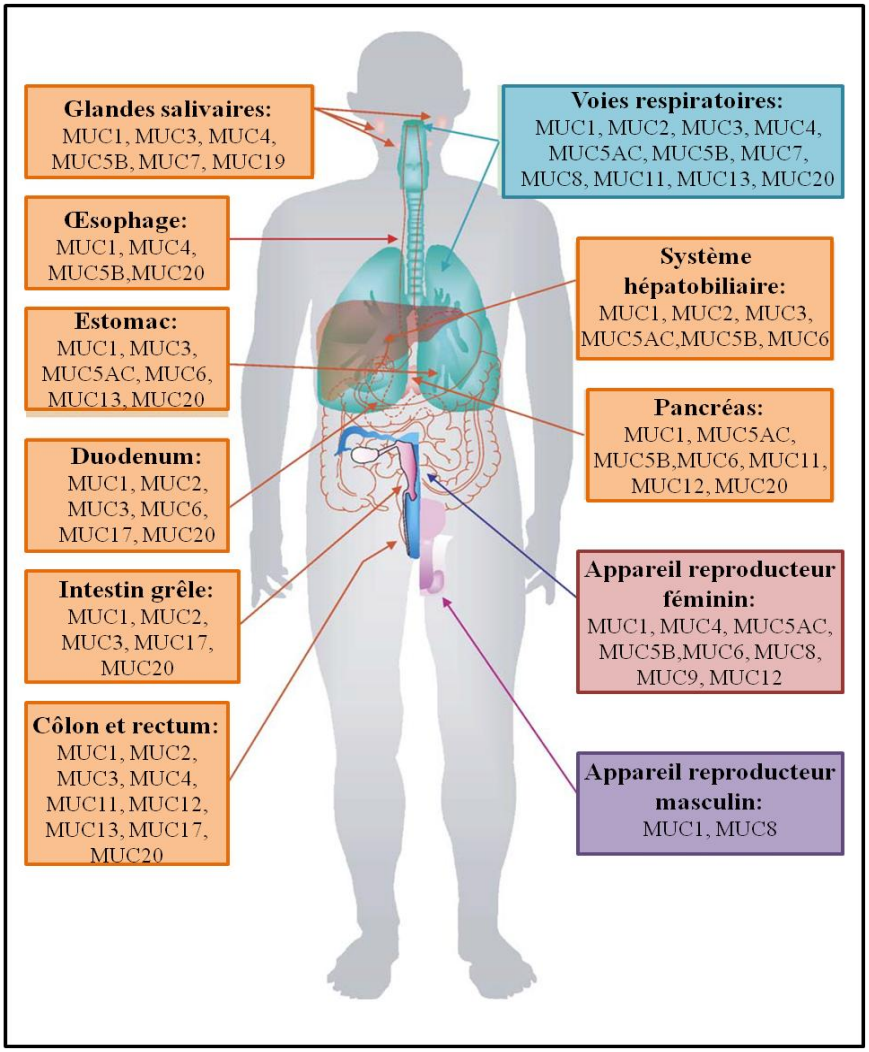


Figure 6 : Profil de distribution des mucines chez l'homme. (Modifié d'après Andrianifahanana M. *et al.*, 2006)

Il existe deux principales classes de mucines : les mucines sécrétées formant ou non un gel et les mucines membranaires. Il est à noter l'existence de molécules qui sans être des mucines à proprement parlée sont dites de type mucine.

A) <u>Les mucines sécrétées</u>

© 2015 Tous droits réservés.

doc.univ-lille1.fr

Ces mucines sont principalement produites par des cellules spécialisées que sont les cellules caliciformes à la surface épithéliale ainsi que par les cellules à mucus des glandes sous-muqueuses. Elles peuvent être divisées en deux sous-classes : celles pauvres en résidus cystéines et celles riches en cystéine. Ces dernières, sécrétées, pour former un gel, sont MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6 et MUC19. Elles sont donc caractérisées par une région riche en cystéine appelée CK (Cystine knot) en C-ter ainsi que par des domaines D qui sont semblables aux régions correspondantes du facteur de coagulation pro-von Willebrand (vWF) en N-ter et C-ter. Les domaines CK constituent des sites de dimérisation des mucines *via* des ponts disulfures formés au sein du réticulum endoplasmique rugueux (van Klinken B.J. *et al.*, 1998). Chez MUC2, les *N*-glycannes de la mucine en cours de synthèse sont reconnus par les protéines chaperonnes telles que la calnexine et calréticuline impliquées dans la mise en conformation tridimensionnelle des protéines et leur oligomerisation (McCool *et al.*, 1999). Les mucines sont ensuite acheminées dans l'appareil de Golgi où elles achèveront leur maturation notamment la O-glycosylation. Quant aux domaines D, ils faciliteront leur oligomérisation (Offner G.D. *et al.*, 1998). A la fin de ce processus de maturation, les mucines sont stockées dans des granules sécrétoires avant leur largage dans l'environnement extérieur.

MUC7, MUC8 et MUC9 sont des mucines sécrétées ne formant pas de gel mais à ce jour peu d'informations est disponible sur elles (Fig 7).

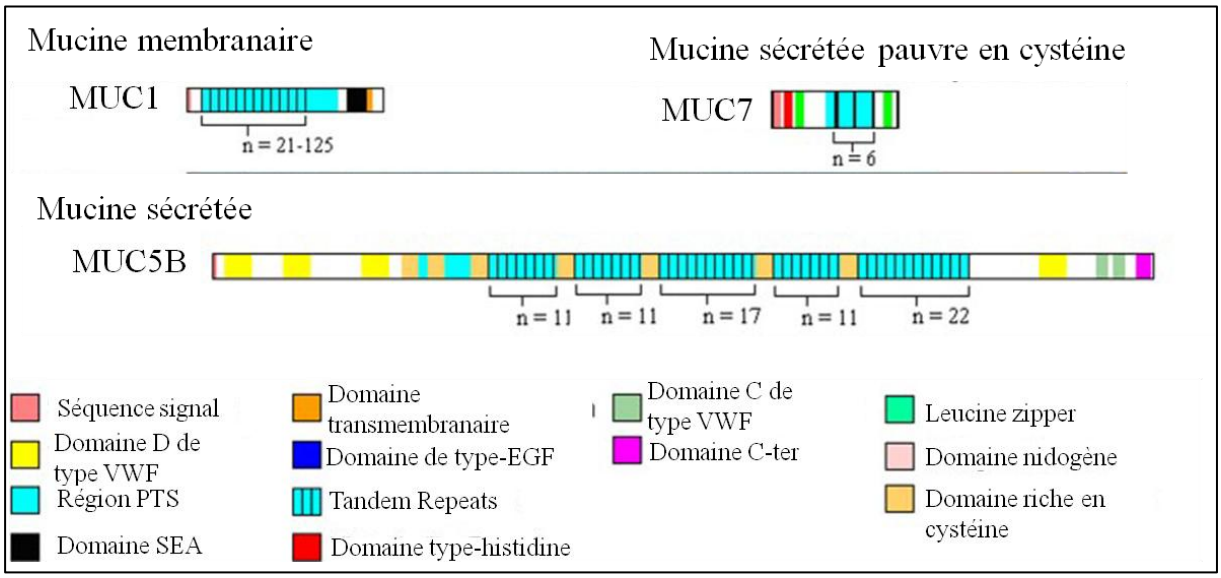


Figure 7 : Schéma des mucines membranaires et secrétées (D'après Rose M.C. et Voynow J.A., 2006)

B) Les mucines membranaires

Il en existe 10 : MUC1, MUC3A, MUC3B, MUC4, MUC12, MUC13, MUC15, MUC16, MUC17, MUC20. Ces mucines peuvent être rendues solubles suite à un clivage protéolytique ou par épissage alternatif.

Elles sont constituées de trois régions principales :

© 2015 Tous droits réservés.

doc.univ-lille1.fr

-un domaine extracellulaire ou ectodomaine qui possède une région TR centrale avec des séquences uniques
-un simple domaine transmembranaire
-une queue cytoplasmique contenant des sites potentiels de phosphorylation pour la transmission d'un signal
L'ectodomaine est organisé en modules affichant au moins quatre domaines fonctionnels potentiels, dont le domaine de type EGF (Epidermal Growth Factor) impliqué dans les interactions récepteur-ligand sur MUC3, MUC4, MUC12, MUC13, et MUC17 ; le module SEA (Sea-urchin sperm protein, Enterokinase and Agrin) reporté sur MUC1, MUC3, MUC13, MUC16 et MUC17 est impliqué dans le clivage des sous-unités des mucines lors de leur biosynthèse puisqu'il contient un site de coupure (par exemple : G/SIVV sur MUC3 du rat, le clivage a lieu entre la glycine et la sérine) ainsi que dans leur ré-association (Khatri I.A. *et al.,* 2003) ; ainsi que des domaines riche en cystéines (Fig.7).
Concernant leur biosynthèse en prenant l'exemple de MUC1, elles sont synthétisées comme une chaîne polypeptidique, précurseur qui sera clivé en deux sous-unités de façon co-traductionnelle. Les sous-unités restent associées via des interactions non covalentes non déterminées aboutissant à la formation d'hétérodimères. A la suite de cette néo-synthèse, MUC1 partiellement glycosylée fait la navette à la membrane cellulaire et est ré-internalisée via le trans-Golgi où aura lieu le processus de O-glycosylation. Enfin, MUC1 est retransloquée à la membrane sous sa forme mature.

C) Les glycoprotéines de type-mucine

Elles ont un poids moléculaire entre 50 et 240 kDa et possèdent un domaine riche en sérine, thréonine et proline (PTS) pouvant être organisé ou non en tandem repeats. Elles ne possèdent pas de polymorphisme VNTR que l'on peut retrouver chez les mucines classiques. La plupart des molécules appartenant à cette classe sont des ligands de sélectines, tels que GlyCAM-1, CD34, PSGL-1 ou MAdCAM-1. Leur particularité est de posséder outre les autres modules, un domaine immunoglobuline et donc d'appartenir à la superfamille correspondante. MUC18 (Mel-CAM) est à la charnière entre mucine et molécule de type mucine car elle possède les caractéristiques des deux familles (Andrianifahanana M. *et al.,* 2006).

D) La glycosylation des mucines

1) La O-glycosylation

La *O*-glycosylation est la glycosylation majeure des mucines. Cette modification post-traductionnelle (MPT) n'a pas seulement un rôle de barrière de protection et de lubrification dans de nombreux tissus à cause de leur capacité d'hydratation mais est aussi impliquée dans la mise en conformation des protéines, la réponse immunitaire, le développement embryonnaire ainsi que dans les interactions hôte-pathogène.

© 2015 Tous droits réservés. doc.univ-lille1.fr

Cette MPT est initiée par les polypeptides N-acétylgalactosamine transférases (ppGalNAcTs) qui transfèrent une α-GalNAc sur le groupe hydroxyle de la chaîne latérale d'une sérine ou d'une thréonine. Cela aboutit à la formation de l'antigène Tn (Fig.8). Contrairement à la *N*-glycosylation pour laquelle il existe une séquence consensus Asn-X-Ser/Thr (X= tout acide aminé excepté la proline) où se lient les N-glycannes, aucune n'a été définie pour la *O*-glycosylation sauf s'il y a une proline adjacente qui facilite la glycosylation (Wilson *et al.,* 1991).

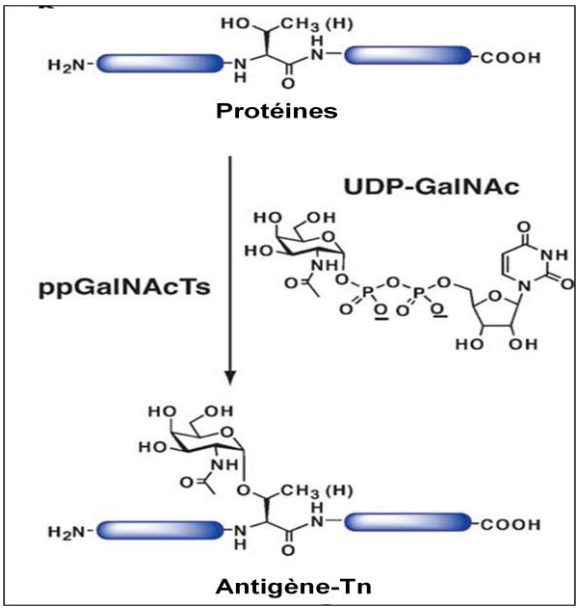


Figure 8 : Schéma de l'initiation de la O-glycosylation de type mucine. Les ppGalNAcTs utilisent l'UDP-GalNAc comme nucléotide-sucre donneur qui est transféré sur la protéine-substrat accepteur aboutissant à la formation de l'antigène Tn (modifié d'après Hang H.C. *et al.,* 2005)

Cet antigène Tn est ensuite « étendu » par différentes glycosyltransférases dans les citernes de l'appareil de Golgi par l'ajout de galactose (Gal) par une liaison en β1,3 aboutissant au core 1 ou antigène T impliquant l'activité de la core 1 β3-galactosyltransférase ; ou par l'ajout d'une *N*-acétylglucosamine (GlcNAc) en β1,3 formant le core 3 par la β1,3-*N*-acétylglucosaminyltranférase (β3Gn-T6). Les cores 2 et 4 sont les structures branchées issues des cores 1 et 3. Ces branchements sont catalysés par les β1,6-*N*-acétyglucosaminyltransférases. Il existe trois β1,6-*N*-acétyglucosaminyltransférases dont deux catalysent la formation du core 2 et la dernière est responsable de la formation des structures branchées des cores 2 et 6. Les différents cores sont présentés dans le tableau 2.

© 2015 Tous droits réservés.

doc.univ-lille1.fr

Tableau 2 : Structure des différents cores des O-glycannes présents sur les mucines.

	Structure
Core 1 ou Antigène T	Gal(β1,3) — GalNAc
Core 2	GlcNAc(β1,6) — GalNAc Gal(β1,3) — GalNAc
Core 3	GlcNAc(β1,3) — GalNAc
Core 4	GlcNAc(β1,6) — GalNAc GlcNAc(β1,3) — GalNAc
Core 5	GalNAc(α1,3) — GalNAc
Core 6	GlcNAc(β1,6) — GalNAc
Core 7	GalNAc(α1,6) — GalNAc
Core 8	Gal(α1,3) — GalNAc

Le core 2 peut être retrouvé dans les glycoprotéines et les mucines de nombreuses cellules et tissus tandis que les cores 3 et 4 ont seulement été observés dans les mucines sécrétées de tissus particuliers tels que les bronches, le côlon et les glandes salivaires. Les cores 5 à 8 sont très rares ; le core 5 n'a été observé que dans le méconium humain et le tissu intestinal d'adénocarcinome. Quant au core 6, on le retrouve dans les mucines de l'intestin et du kyste ovarien. Enfin le core 8 a été observé dans les mucines respiratoires.

Ces différents cores peuvent être par la suite allongés par l'ajout de résidus de galactose et/ou de N-acétylglucosamine que l'on appelle chaîne polylactosaminique. La chaîne de type 1 correspond à une liaison en β1,3 entre le galactose et la N-acétylglucosamine tandis que le type 2 correspond à une liaison en β1,4 entre ces résidus (Mutsaers J.H. *et al.*, 1986).

Enfin, à la périphérie de ces chaînes, on retrouve différents motifs glycaniques tels que les groupes sanguins, composés de fucose, galactose et GalNAc) (Tableau 3), d'acides sialiques ou encore de groupements sulfates.

© 2015 Tous droits réservés.

doc.univ-lille1.fr

Tableau 3 : Les épitopes sanguins (d'après Brockhausen I *et al.*, dans Essentials of Glycobiology. 2nd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009. Chapter 9)

Antigène O, H	Fucα1-2Gal-
Antigène A	GalNAcα1-3(Fucα1-2)Gal-
Antigène B	Galα1-3(Fucα1-2)Gal-
Antigène de Galili	Galα1-3Gal-
Antigène i	Galβ1-4GlcNAcβ1-3Gal-
Antigène I	Galβ1-4GlcNAcβ1-6(Galβ1-4GlcNAcβ1-3)Gal-
Antigène Sd(a), Cad	GalNAcβ1-4(NeuAcα2-3)Gal-
Antigène Lewis^{a}	Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAc-
Antigène Lewis^{x}	Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAc-
Antigène sialyl-Lewis^{x}	NeuAcα2-3Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAc-
Antigène Lewis^{y}	Fucα1-2Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAc-

L'antigène i correspond a un enchaînement linéaire de dimères de Gal et de GlcNAc tandis que l'antigène I voit la formation d'une structure ramifiée avec l'apparition d'une liaison en C6 sur le Gal (Hounsell E.F. *et al.*, 1988). Les enzymes impliquées dans cette élongation sont les GlcNAc-Transférases iGnT, et IGnT ainsi que les β4-Gal-T. L'antigène de Galili retrouvé chez le porc est responsable du rejet lors de xénogreffes chez l'Homme (Galili U., 2006). L'ajout d'acide sialique met en jeu différentes sialyltransférases dépendantes du type de liaison synthétisée (ST3Gal I, ST3Gal IV, ST6GalNAc I, II, III ou IV). La sulfatation peut mettre en jeu la Core 1 3-O-sulfotransferase (Gal3ST4). L'ajout d'un résidu de fucose en α1,2 sur le galactose de chaînes de type1 des antigènes des groupes sanguins A, B, O est le résultat de la fucosyltransférase FUT2 aboutissant au phénotype sécréteur. Les individus ne possédant pas cette enzyme sont qualifiés de non sécréteurs. Cependant, il existe deux autres fucosyltransférases FUT1 et FUT3 qui agissent également sur les mucines.

2) La N-glycosylation

En plus d'être fortement O-glycosylées les mucines portent souvent des N-glycannes, produits d'une autre modification post-traductionnelle initiée dans le RER. On estime que 70% des protéines cellulaires sont *N*-glycosylées (Mononen I. et Karjalainen E., 1999). La *N*-glycosylation assure un rôle essentiel dans la stabilité, le trafic, la localisation et l'oligomérisation des protéines, mais elle présente également d'importantes implications dans les interactions cellulaires et les voies de signalisation (Freeze H.H., 2006).

La *N*-glycosylation est un processus qui débute dans le RE et s'achève dans l'appareil de Golgi. Elle démarre par la synthèse séquentielle d'un glycanne précurseur sur un lipide isoprénique, le phospho-dolichol (Kornfeld R. et Kornfeld. S, 1985). Ce précurseur est composé de deux *N*-acétylglucosamines (GlcNAc), 9 mannoses (Man) et 3 glucoses (Glc) (Fig.9). L'étape essentielle correspond au transfert

© 2015 Tous droits réservés. doc.univ-lille1.fr

en bloc de ce glycanne précurseur sur une protéine en voie de synthèse. Il est transféré au niveau d'une séquence consensus Asn-X-Ser/Thr (X=tout acide aminé sauf la proline) par le complexe de l'oligosaccharyltransférase (OST).

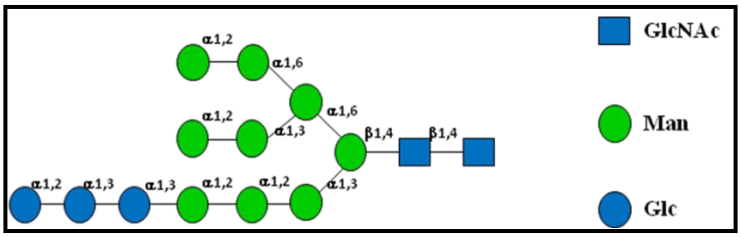


Figure 9 : Structure du glycanne précurseur**.**

Dans le RE, les *N*-glycoprotéines nouvellement synthétisées vont subir une étape de mise en conformation afin d'acquérir leur structure native nécessaire à leur activité biologique. Cette étape est facilitée grâce à des protéines chaperonnes (comme BiP encore appelée Grp78), des enzymes (PDI, peptide disulfure isomérase ; PPI, peptide prolyl *cis/trans* isomérase) ou encore des lectines calcium-dépendantes que sont la calnexine et la calréticuline (Hammond C. et Helenius A., 1995). L'environnement oxydant du RE est également un facteur essentiel à ce processus en favorisant la formation des ponts disulfures.

Malgré ce « contrôle qualité », on considère qu'environ 30% des *N*-glycoprotéines nouvellement synthétisées demeurent mal conformées (Schubert U. *et al.*, 1998) : afin d'éviter un engorgement du RE, elles seront dégradées via un processus que l'on appelle ERAD (Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation). Par contre, la grande majorité des glycoprotéines qui vont acquérir une structure native dans le RE vont s'engager dans la voie de sécrétion Golgienne où elles subiront la maturation de leurs glycannes via l'action de nombreuses glycosyltransférases. On aboutit alors à la formation de trois types de N-glycannes : oligomannosidique, complexe et hybride (Fig.10).

© 2015 Tous droits réservés.

doc.univ-lille1.fr

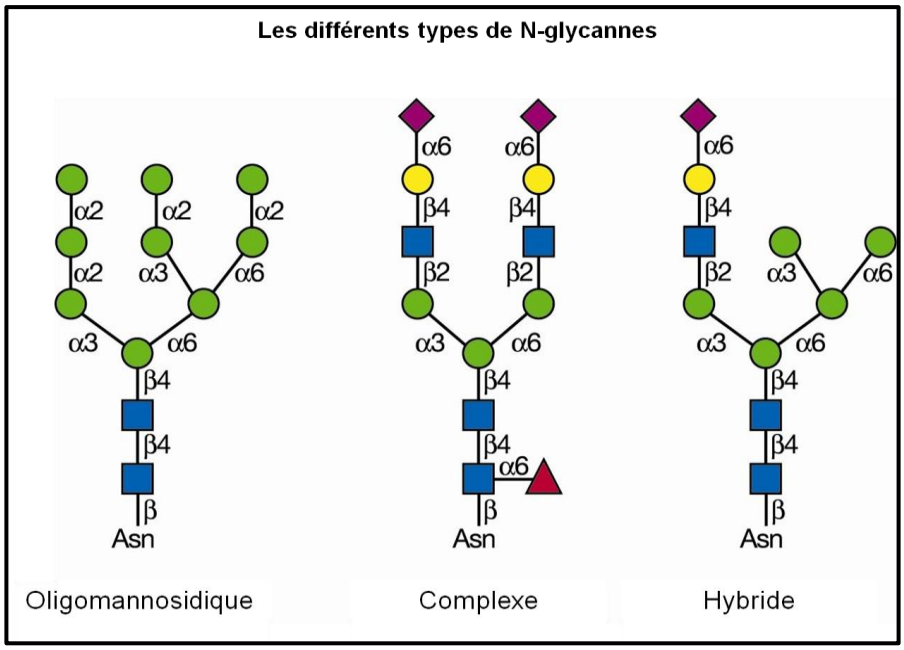


Figure 10 : Structure des 3 types de N-glycannes**.** Le core commun est $Man_3GlcNAc_2$**.** *(rond vert : mannose ; carré bleu : GlcNAc ; triangle rouge : fucose ; rond jaune: galactose ; losange violet : acide N-Acétylneuraminique) (d'après Stanley P., et al., 2009)*

Chez le rat, le domaine CK de MUC2, nécessaire à sa dimérisation, possède deux N-glycannes sur les sites N9 et N10. Suite à des expériences de mutations, il a été démontré que le N-glycanne du site N9 était important pour maintenir un taux élevé de mise en conformation des monomères MUC2 ainsi que pour la maturation et la stabilité des dimères avant qu'ils ne soient transportés vers le Golgi (Bell S.L. *et al.*,2003).

3) La C-mannosylation

Un autre type de glycolysation, la C-mannosylation, a également été identifiée sur des mucines synthétisées in vitro (MUC5AC et MUC5B) (Perez-Vilar J. *et al.*, 2004). Ce type de glycosylation a initialement été décrit sur la RNAse2. Elle consiste en la liaison entre le carbone anomérique d'un résidu mannose et le carbone 2 du premier tryptophane d'une séquence consensus : Trp-Ser/Thr-AA-Trp (Fig. 11). Certaines études ont reporté occasionnellement de faibles niveaux de mannose dans les mucines sécrétées, en les considérant comme contaminants. Cependant, si le mannose reflète le niveau de C-mannosylation des mucines respiratoires synthétisées *in vivo*, ces petits glycannes pourraient contribuer aux propriétés biologiques et/ou physiques de ces mucines (Rose M.C. et Voynow J.A., 2006) ou dans le transport des mucines dans le Golgi, leur mise en conformation ou encore dans les interactions avec les autres composants du mucus (Desseyn J.L. *et al.*, 2000 ; Perez-Vilar J. *et al.*, 2004). La C-mannosylation aurait lieu dans le RER puisque qu'elle nécessite du Dol-P-Man.

© 2015 Tous droits réservés.
doc.univ-lille1.fr

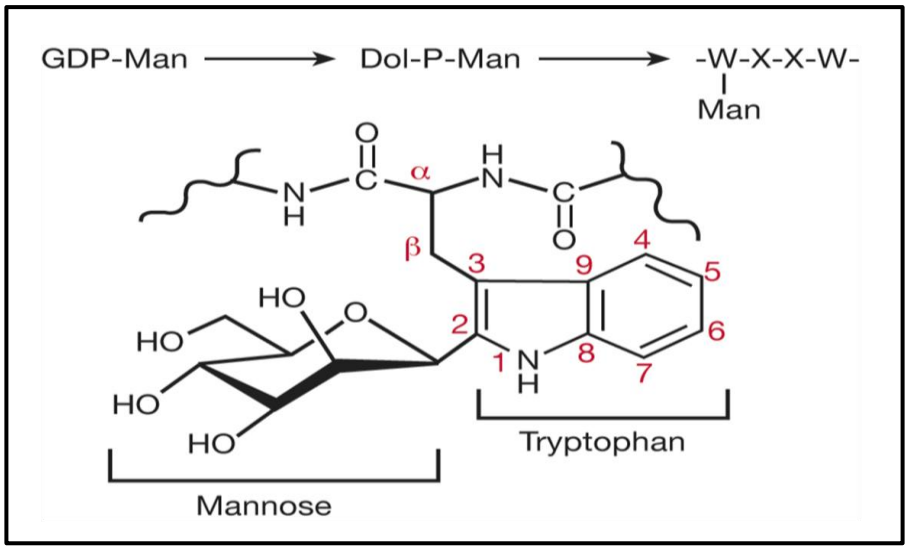


Figure 11: C-mannosylation (d'après Essentials of Glycobiology. 2nd Edition. Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. Cold Spring Harbor (NY))

IV. Les mucines du tractus respiratoire

A) Les mucines du mucus respiratoire

Le mucus respiratoire forme une barrière protectrice entre l'épithélium du tractus respiratoire et l'environnement. Ce mucus est principalement composé d'eau, d'ions et de 5% de protéines sécrétées par les cellules respiratoires, incluant notamment les mucines, le lysozyme, la lactoferrine, des défensines, des anti-protéases, des IgA, des IgG, des protéoglycannes (Boat T.H. *et al.*, 1980; Kaliner M. *et al.*, 1984). Le mucus participe aux échanges d'eau et de chaleur dans le tractus respiratoire et lie les particules et les bactéries qui seront éliminées par les cils de l'épithélium muqueux. Lors de pathologies pulmonaires, l'obstruction des voies respiratoires par le mucus est la somme de plusieurs processus complexes : la dérégulation des gènes MUC, l'hypersécrétion des mucines et l'hyperplasie des cellules caliciformes (GCH) (Fig.12).

© 2015 Tous droits réservés.

doc.univ-lille1.fr

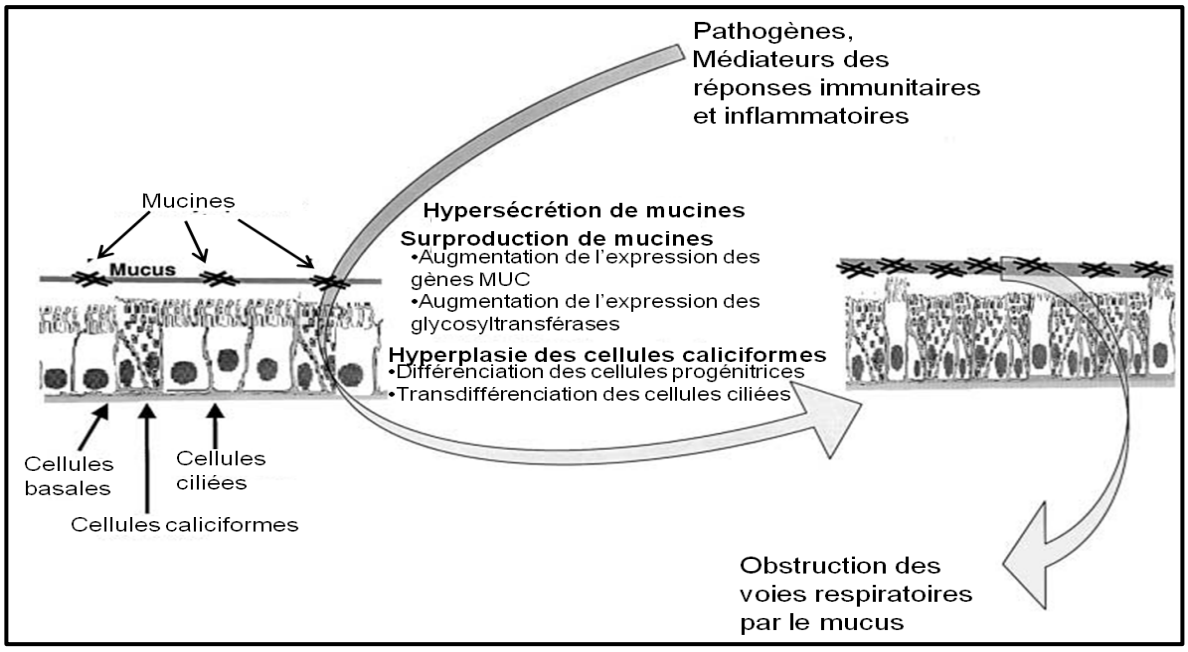


Figure 12 : Schéma des mécanismes moléculaire aboutissant à l'obstruction des voies respiratoires (Rose M.C. *et al*., 2001).

Dans les poumons humains sains, on retrouve les transcripts correspondant à MUC1, 2, 4, 5AC, 5B, 7, 8 et 13 (Rose M.C. *et al.,* 2001). Par hybridation *in situ*, il a été démontré que la localisation de l'expression des gènes de mucines est restreinte à certains types cellulaires de l'épithélium du système respiratoire. MUC1 et MUC4 sont exprimées dans toutes les cellules épithéliales superficielles des voies respiratoires tandis que MUC2 est présente à de moindres niveaux. MUC5AC est exprimée de façon prédominante dans les cellules caliciformes tandis que MUC5B est exprimée dans les cellules à mucus des glandes sous-muqueuses. Enfin, MUC7 est exprimée dans les cellules séreuses des glandes sous-muqueuses.

MUC5AC et MUC5B sont les mucines majoritaire constituant le mucus respiratoire, cela a été montré par l'utilisation d'anticorps spécifiques (Hovenberg H.W. *et al.,* 1996 ; Thorton D.J. *et al.,* 1997). MUC2 représente de 2,5% des mucines totale du mucus pulmonaire. Elle a été plus particulièrement trouvée dans les expectorats d'individus atteints de mucoviscidose. MUC5B existe sous deux glycoformes dans le mucus respiratoire, l'une que l'on appelle MUC5B « low-charge » et la seconde désignée MUC5B « high-charge ». Ces deux isoformes diffèrent par leur densité de charge et donc par leur mobilité électrophorétique (Thorton D.J. *et al.,* 1997). MUC5B « low charge » serait responsable des propriétés physiques du mucus puisqu'elle y représente 79% des mucines totales. MUC5B serait assemblée en premier lieu en fils linéaires de taille différente (polydisperse) qui se lient par la suite *via* les domaines riches en cystéines par la formation de ponts disulfures (Sheehan J.K. *et al.,* 1999). Il a été observé que les expectorats de patients atteints de mucoviscidose ou de maladies pulmonaires obstructives chroniques montraient une augmentation des quantités relatives de MUC5B, particulièrement sa forme « low-charge », sur MUC5AC (Kirkham S. *et al.,* 2002).

© 2015 Tous droits réservés. doc.univ-lille1.fr

B) Altération de la glycosylation et de la sulfatation des mucines lors de la fibrose kystique

Plusieurs équipes ont étudiés la glycosylation et la sulfatation des mucines respiratoires lors de fibrose cystique par rapport à celle d'individus sains, malgré la difficulté représente l'obtention des échantillons à analyser. La plupart des échantillons issus d'individus sains ont été obtenus après induction saline. En 2005, Xia B. *et al*,. ont montré que le mucus de deux donneurs CF était plus riche en monosaccharides et en O-glycannes liés aux mucines que celui d'individus non-CF. Les mucines des deux catégories d'individus contenaient des GlcNAc-6-Sulfate, Gal-6-Sulfate et Gal-3-Sulfate. Cependant les mucines issues des patients CF contenaient de plus grandes quantités d'espèces 6-sulfatées et il a été aussi observé une augmentation de la sialylation. Par ailleurs, il avait déjà été montré une augmentation du taux d'hexoses neutres et d'acides sialiques en fonction de la sévérité de la maladie (Chace K.V. *et al.*, 1983). Jusqu'à 260 structures de O-glycannes ont été identifiées pouvant être fucosylées, sulfatés et/ou sialylées. Les O-glycannes sulfatés et fucosylés des mucines respiratoires sont basés sur les cores 2 et 4 (Fig.13).

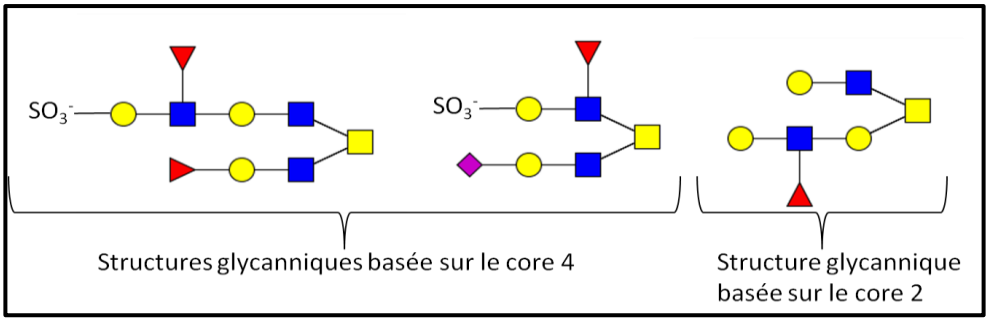


Figure 13 : Exemples de structures O-glycanniques retrouvées sur les mucines respiratoires.

Les différents épitopes structuraux identifiés dans les expectorats CF sont pour la plupart des ligands hautement affins pour les bactéries (ex : *Pseudomonas aeruginosa*) tels que le Lewis a (Le^a), Le^x, Le^y, sLe^x, ainsi que d'autres épitopes sialylés et fucosylés ce qui augmentent l'adhérence et la formation de biofilm chez les patients CF. Cependant, ces ligands sont aussi affins pour les leucocytes et contribuent à une prédisposition aux infections chroniques et à l'inflammation (Schulz B.L. *et al.*, 2007). Quelques hypothèses ont été émises pour expliquer les changements de glycosylation constatés:

-le défaut d'activité du canal CFTR entraînerait une mauvaise acidification de l'appareil de Golgi ce qui perturberait l'activité ou la localisation de certaines glycosyltransférases telles que les sialyltransférases (Barasch J. et al-Awqati Q., 1993).

-l'état d'inflammation pourrait être responsable des modifications de synthèse et de glycosylation de certaines glycoprotéines. Le TNFα modifieraient l'activité des glycosyl- et sulfotransférases responsables de la biosynthèse du Lewis x et de son épitope sialylé et/ou sulfaté (Colomb F. *et al.*, 2012)

© 2015 Tous droits réservés.

doc.univ-lille1.fr

V. *Pseudomonas aeruginosa* et adhérence sur les mucines respiratoires

Dans le cas d'une mucoviscidose, on observe au niveau de l'épithélium pulmonaire, un épaississement du mucus dû à une hyper-réabsorption de l'eau et de Na^+ ainsi qu'une sécrétion de Cl^-. Ce mucus épais empêche le battement normal des cils de l'épithélium muqueux pulmonaire d'où un défaut de clairance des divers pathogènes inhalés chaque jour par les individus. Ce mucus devient donc un terrain idéal pour les infections à long terme par divers organismes tels que *Pseudomonas aeruginosa, Hemophilus influenzae ou Streptococcus pneumoniae*. *Pseudomonas aeruginosa* est un bacille gram négatif de la famille des *Pseudomonadaceae.* Elle est également connue sous le nom de bacille pyocyanique car elle produit un pigment bleu : la pyocyanine qui entre autre réprime la réponse immunitaire de l'hôte et induit l'apoptose des neutrophiles (Allen L. *et al.,* 2005). C'est une espèce ubiquitaire et saprophyte que l'on retrouve dans les environnements humides et les sols. C'est un pathogène opportuniste commun des infections communautaires telles que les infections respiratoires (mucoviscidose), oculaires, cutanées et des otites ainsi que des infections nosocomiales. *P. aeruginosa* est responsable de l'augmentation de la morbidité et de la mortalité des patients atteints de mucoviscidose. Le génome de la souche PAO1 de *P. aeruginosa,* a été séquencé et est constitué de 6,3 millions de paires de bases comprenant 5570 gènes (Stover *et al.,* 2000). Parmi ces gènes, 8.4 % codent des protéines impliquées dans des fonctions de régulation faisant de cette bactérie le pathogène possédant le plus grand nombre de gènes de régulation. Ces bactéries ont tendance à former des biofilms afin de résister aux antibiotiques et aux défenses immunitaires de l'hôte et de contribuer à la colonisation initiale des voies aériennes. Pour former ce biofilm, elles vont produire une matrice extracellulaire composée d'exopolysaccharides tels que l'alginate (polymère linéaire de D-mannuronate et L-guluronate), le Psl (riche en mannose et galactose) et le Pel (riche en glucose). L'alginate est responsable de la résistance aux antibiotiques (Nivens D.E. *et al.,* 2001). Avant de former un biofilm, *P.aeruginosa* doit adhérer à un support biologique ou non grâce à ses pili sur lesquels on peut trouver des adhésines permettant le phénomène d'adhérence à l'hôte. En effet, *P.aeruginosa* se lie aux mucines respiratoires humaines par des mécanismes impliquant des interactions récepteur/composants flagellaires. L'une des adhésines particulièrement connue est FliD qui peut être sous deux types selon la souche de la bactérie. Elle est de type A chez la souche PAK et de type B chez PAO1 ce qui entraîne des différences dans l'adhérence aux mucines. FliD et la flagelline seront impliquées dans ce phénomène chez PAO1 alors que seule la flagelline intervient chez la souche PAK. *P.aeruginosa* se lie aux glycoconjugués portant des motifs Le^x, sLe^x (Scharfman A. *et al.,* 2001) ou sulfo-6-Le^x (Sharfman A. *et al.,* 2000). Il a aussi été montré que *P.aeruginosa* exprimait une neuraminidase qui serait impliquée dans la formation du biofilm en désialylant les glyconjugués pour exposer les motifs GalNAcβ1,4Gal sur lequel *P.aeruginosa* adhère. Le gène codant cette neuraminidase est l'un des plus exprimés retrouvés chez les patients CF (Soong G. *et al.*, 2006).

© 2015 Tous droits réservés. doc.univ-lille1.fr

Pseudomonas aeruginosa n'est pas l'unique pathogène à coloniser les poumons de patients CF, on trouve également des champignons du genre *Aspergillus* notamment *Aspergillus fumigatus* lui aussi responsable de la hausse de la morbidité. La colonisation de ce champignon se manifeste de plusieurs façons, soit par une sensibilisation par les IgE, soit par le développement d'une aspergillose broncho-pulmonaire allergique (ABPA). L'ABPA est souvent diagnostiquée tardivement ou mal diagnostiquée entraînant une mauvaise prise en charge de la pathologie. *Aspergillus fumigatus* se développe également chez les personnes immunodéprimées et est l'une des causes majeures de la mortalité des patients dans les hôpitaux. Ce qui fait la force de ce champignon pathogène opportuniste est sa paroi qui agit comme une armure lui permettant de résister à son environnement. D'où la nécessité de caractériser la structure de cette paroi afin de comprendre les évènements de biosynthèse pour développer de nouveaux inhibiteurs de synthèse de la paroi fongique.

© 2015 Tous droits réservés.

doc.univ-lille1.fr

CHAPITRE 2 : Présentation d'*Aspergillus fumigatus*

I. Le cycle biologique d'*Aspergillus fumigatus*

A) *Classification*

La classification d'*Aspergillus fumigatus* est la suivante : (Figure14 modifiée d'après Tefsen B. *et al.*, 2012)

-Division des Ascomycota

-Sous-division des Pezizomycotina

-Classe des Eurotiomycètes

-Ordre des Eurotiales

-Genre des *Aspergillus*

-Espèce : *fumigatus*

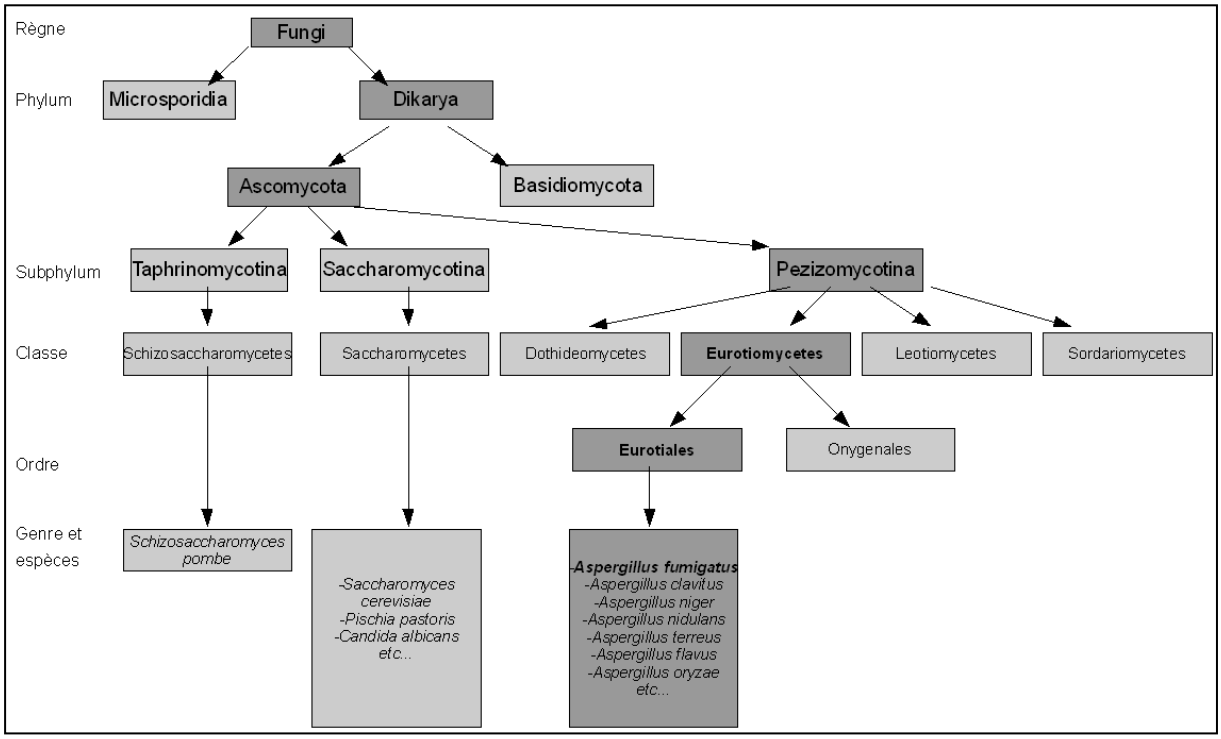


Figure 14: Classification d'*Aspergillus fumigatus* dans le règne fongique.

B) *La reproduction asexuée*

Aspergillus fumigatus est un champignon saprophyte ubiquitaire jouant un rôle dans le recyclage du carbone et de l'azote de l'environnement. Sa niche écologique principale est le sol où il vit et croît sur de la matière organique et produit des conidies. *Aspergillus fumigatus* possède un cycle de développement simple reposant un mode de reproduction asexuée. Celui-ci débute par la germination des conidies quand l'environnement est favorable. Une conidie (ou conidiospore) est une spore, dénuée de mobilité autonome. Les conidies d'*A. fumigatus* sont vertes échinulées, de 2,5 à 3 µm de diamètre, produites en chaîne de façon basipète à partir des phialides verdâtres (6 à 8µm sur 2 à 3µm)

© 2015 Tous droits réservés. doc.univ-lille1.fr

et sont disséminées dans l'air pouvant ainsi être inhalées par l'homme. Les conidies gonflent puis émettent un tube germinatif passant d'une croissance isotrope à une croissance polaire. En effet, avant la première mitose, la conidie peut prendre une forme de poire indiquant la mise en place d'un axe de polarité. Après la 1ère mitose, plus de 90% des cellules d'*A.fumigatus* auront une croissance polaire et les cycles se succèdent toutes les 45 minutes. Un 2nd tube germinatif va émerger des conidies après la 3è mitose pour les plus précoces. Cependant, seulement 19% des cellules d'*A. fumigatus* ne développent ce second tube germinatif qu'à la 5è mitose. Il peut être positionné à 180° du premier (50% des cas), c'est alors un arrangement bipolaire. Dans 33% des cas il est placé à 90° du premier dans un arrangement qualifié de quadripolaire. Dans les autres cas, l'angle est aléatoire. La croissance de ces tubes germinatifs mène à la formation d'hyphes cloisonnés. La formation du 1er septum a lieu après la 4è division de mitose. Les septa suivants sont disposés à intervalle régulier le long de l'hyphe après chaque mitose. Les noyaux du compartiment subapical sont en interphase tandis que les noyaux du compartiment apical subissent des mitoses synchrones (Momany M. et Taylor I., 2000). Quand le milieu s'amenuise, des filaments se différencient et se terminent par une vésicule portant des phialides où sont produites de façon basipète les chaînes de conidies. (Figure 15)

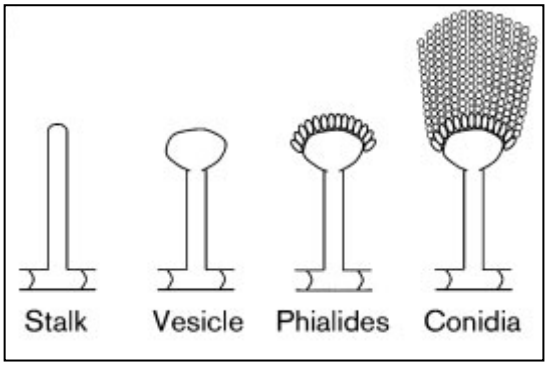


Figure 15: Cycle biologique d'*Aspergillus fumigatus*
(schéma d'après Tao L. et Yu J.H.,2011)

C) La reproduction sexuée

L'analyse du génome d'*Aspergillus fumigatus* a permis d'identifier des gènes de type « mating » qu'on peut retrouver chez la levure suggérant ainsi l'existence d'une reproduction sexuée chez cette espèce. C'est ce que O'Gorman C. *et al.*, 2009 ont démontré en décrivant le téléomorphe *Neosartorya fumigata* menant à la formation de cléisthotèces (fructifications caractéristiques de la reproduction sexuée chez les Ascomycètes) et d'ascospores . Dans ces cléisthotèces, on trouve des asques contenant des ascospores lenticulaires d'environ 5 µm de diamètre de couleur jaune-blanche à blanche-verdâtre avec deux crêtes équatoriales, elles ne sont pas aussi hydrophobes que les conidies de l'anamorphe *A. fumigatus*. Cette reproduction sexuée nécessite des souches complémentaires MAT1-1 et MAT1-2 et un milieu de croissance particulier (agar avec notamment de l'avoine) ainsi qu'une mise à l'obscurité à 30°C. Les cléisthotèces ont été observés au bout de 6 mois d'incubation. Deux souches d'*Aspergillus fumigatus* ont été identifiées parmi une cinquantaine d'isolats comme étant deux « super reproducteurs » : AFB62 (MAT1-1) et AFIR928 (MAT1-2) qui ont un cycle sexuel complet en 4

© 2015 Tous droits réservés. doc.univ-lille1.fr

semaines produisant en grande quantité des cléisthotèces. Contrairement aux conidies, les ascospores ne gonflent pas avant la germination. Celle-ci est initiée par l'ouverture de la spore au niveau des deux crêtes équatoriales (Sugui J.A. *et al.*, 2011).

II. Pathologies associées à *Aspergillus fumigatus*

Aspergillus fumigatus est un pathogène opportuniste à l'origine de diverses pathologies plus ou moins sévères selon l'état immunitaire de l'hôte. Les pathologies vont de la simple allergie à l'aspergillose invasive en passant par l'aspergillose allergique broncho-pulmonaire (ABPA) et l'aspergillome. Les vecteurs de ces pathologies sont les conidies disséminées dans l'air et ainsi être inhalées par l'hôte. (Latgé J.P., 1999)

L'aspergillose allergique broncho-pulmonaire (ABPA) se développe chez les patients souffrant d'asthme atopique (atopie : prédisposition génétique à devenir sensibilisé par l'intermédiaire d'IgE spécifiques vis-à-vis d'allergènes rencontrés communément dans l'environnement) et de fibrose cystique. L'ABPA est une sorte d'asthme bronchique caractérisée par des infiltrats pulmonaires transitoires, une forte éosinophilie et un taux élevé d'IgE dans le sérum. Si la maladie n'est pas détectée, elle peut évoluer en fibrose pulmonaire ou en défaillance respiratoire.

L'aspergillome (ou boule fongique) se développe dans des cavités fongiques pré-existantes causées par la tuberculose ou une sarcoïdose par exemple. Elle est caractérisée par une masse sphéroïde d'hyphes enchâssés dans une matrice protéineuse avec des structures sporulantes à la périphérie. L'un des symptômes de cette pathologie est l'hémoptyse. Le développement du champignon est principalement dû à de faibles défenses immunitaires locales.

L'aspergillose invasive se développe chez les hôtes immunodéprimés suite à un traitement par chimiothérapie, suite à une transplantation d'organe (traitement immunosuppresseur pour éviter le rejet) ou chez des patients atteints du SIDA. Le champignon se développe dans les poumons, des fragments de mycélium peuvent passer dans la circulation sanguine et aller coloniser d'autres organes. L'issue de cette pathologie est la plupart du temps fatale pour le patient même si un traitement est donné car le diagnostic est souvent tardif. Les symptômes sont fièvre, toux, douleurs thoraciques, difficultés respiratoires.

III. Le système immunitaire inné de l'hôte

Aspergillus fumigatus est rarement pathogène chez un hôte immunocompétent. C'est la dérégulation du système immunitaire par les thérapies immunosuppressives ou les désordres congénitaux qui

© 2015 Tous droits réservés. doc.univ-lille1.fr

déclenchent le développement d'une aspergillose invasive. L'hôte immunocompétent possède des mécanismes de défense innée pour contrer l'infection. Dans un premier temps, les conidies inhalées sont éliminées par les mouvements ciliaires de l'épithélium muqueux au niveau des poumons. Les conidies qui échapperaient à cette barrière anatomique, se retrouvent face à différentes populations cellulaires de l'immunité innée telles que les macrophages alvéolaires et les neutrophiles afin de les phagocyter pour les détruire. Au cours de leur gonflement, les conidies perdent leur couche d'hydrophobines RodA ce qui démasque une séries d'épitopes appelés PAMPs (pour Pathogen-Associated Molecular Patterns). Ces PAMPs peuvent dès lors être reconnus par des récepteurs spécifiques appelés PRRs (pour Pattern Recognition Receptors) à la surface des cellules immunitaires de l'hôte telles que les phagocytes.

Dans un premier temps, les conidies gonflées sont reconnues et phagocytées par les macrophages alvéolaires permettant une clairance fongique au niveau des poumons ainsi que la génération d'une réponse immunitaire pro-inflammatoire déclenchant l'infiltration locale des neutrophiles et leur migration au site d'infection. Différents PRRs interviennent dans cette reconnaissance des conidies, notamment la Dectine-1 qui reconnaît le β1,3-glucane entraînant leur internalisation dans les phagolysosomes où elles sont détruites. Il semblerait que les ROS (pour reactive oxygen species) contribuent à cette élimination puisque des macrophages alvéolaires de souris mutées incapables de produire ces ROS par la NADPH-oxydase n'éliminent pas les conidies. Pour contourner ce mécanisme de défense, *A. fumigatus* possède 4 gènes codant des SOD (SuperOxide Dismutase) qui détoxifient les anions superoxides. Cependant, certaines études suggèrent que les ROS joueraient plutôt un rôle dans la signalisation pour l'activation des cellules effectrices immunitaires puisque la délétion des gènes codant les SOD fongiques n'atténue pas la virulence d'Aspergillus dans des modèles murins neutropéniques ou immunodéprimés par un traitement à la cortisone. En plus de la dectine-1, les conidies activent les macrophages à travers TLR2 et TLR4 induisant la production de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires incluant le TNFα, IL-1α, IL-1β, IL-6, MIP-2, MIP-1, G-CSF et GM-CSF. DC-SIGN est également un type de récepteur exprimé à la surface des macrophages participant à l'internalisation des conidies par interaction avec les galactomannanes (Segal B.H., 2007).

Dans un second temps, les neutrophiles, attirés par les chimiokines et les anaphylatoxines C3a et C5a produites lors de l'activation du complément, quittent la circulation sanguine pour migrer aux sites d'infection. Sur cette population cellulaire, on retrouve également la Dectine-1 ainsi que des TLR permettant l'interaction avec les conidies ou les hyphes. Les conidies seront également phagocytées évitant leur germination. Mais les hyphes, produisant des métabolites secondaires tels que la gliotoxine ou la fumagilline diminuent la réponse immunitaire des neutrophiles. Lorsque les conidies germent et se développent en mycélium, les neutrophiles ne sont pas capables d'ingérer ces hyphes trop imposants. Ils mettent donc en place des mécanismes de défenses extracellulaires en relâchant des enzymes lytiques par dégranulation et de l'ADN pour former des pièges extracellulaires neutrophiles (NETs : Neutrophils Extracellular Traps). Ces NETs sont donc composés de fibres d'ADN couverts de

© 2015 Tous droits réservés. doc.univ-lille1.fr

granules et de protéines cytosoliques et ont un effet fongistatique en piégeant le pathogène qui évite ainsi sa dispersion. Cela peut aussi permettre le recrutement d'autres neutrophiles ou cellules immunitaires au site de l'infection (Figure 16). L'interaction hyphes/neutrophiles déclenchent un « burst » respiratoire, la sécrétion de ROS et la dégranulation. Une proportion de 50% de l'hyphe est détruite après 2h d'incubation (Latgé J.P., *2001*).

Le système du complément est lui aussi activé et module alors les fonctions phagocytaires. L'activation du système du complément induit l'opsonisation de la surface du pathogène avec les molécules du complément qui permettent une meilleure reconnaissance par les cellules phagocytaires ainsi que la production des anaphylatoxines qui ont des activités chimio-attractantes, pro-inflammatoires, antifongiques et antimicrobiennes. La présence d'Aspergillus entraîne l'activation des voies classique, alternative et lectinique *via* la MBL, une lectine de liaison aux mannanes. En incubation avec du sérum humain, les conidies d'*A. fumigatus* sont opsonisées avec C3b ce qui améliore la phagocytose par les macrophages. L'importance des protéines du complément a été démontrée grâce à des souris déficientes en C5. Un sérum normal a été injecté chez ces souris infectées par *A. fumigatus* ce qui a eu pour conséquence de restaurer la localisation des neutrophiles et d'augmenter le taux de survie de ces souris. Pour échapper à l'activation du complément, les conidies se lient aux régulateurs du complément tels que le facteur H, FHL-1, CFHR-1, C4BP ou le plasminogène ce qui leur confèrent une protection comme pour les cellules de l'hôte. Quant aux hyphes, ils ont une interaction moindre avec ces régulateurs mais sécrètent en contrepartie des protéases dont Alp1 qui dégrade les protéines du complément. (Brakhage A.A. *et al.*, 2010 ; Levitz S.M., 2010 ; Hohl T. *et al.*, 2006)

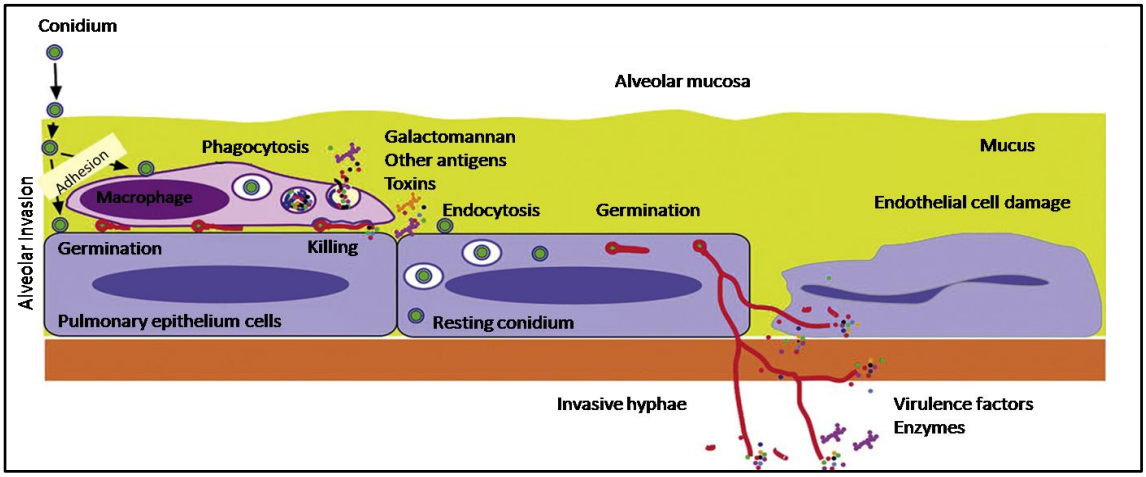


Figure 16: Rôle du système immunitaire inné dans l'infection par *Aspergillus fumigatus*. (d'après Abad A. *et al.*,2010)

© 2015 Tous droits réservés.

doc.univ-lille1.fr

IV. Traitements des aspergilloses

Il existe plusieurs familles de molécules pour le traitement des aspergilloses : les polyènes, les azoles et les échinocandines.

Parmi les polyènes, il y a l'amphotéricine B dont le mode d'action consiste à se fixer à l'ergostérol des membranes fongiques ce qui les déstabilise en créant des canaux. Cela modifie ainsi l'équilibre des flux ioniques à travers les membranes donc leur dépolarisation entraînant la mort cellulaire. On observe des effets secondaires toxiques puisque l'amphotéricine B peut se fixer au cholestérol des membranes des cellules de mammifères.

Les azoles inhibent la 14α-lanostérol déméthylase, enzyme-clé impliquée dans la conversion du lanostérol en ergostérol, composant caractéristique et essentiel de la membrane fongique en entrant en compétition avec le fer au niveau du cytochrome P450. Le voriconazole, le posaconazole et l'itraconazole sont les principales molécules utilisées dans cette famille. Le posaconazole exhibe une activité *in vitro* supérieure à celle du voriconazole et de l'amphotéricine B. De plus, il inhibe des isolats d'*Aspergillus* spp. résistants à l'amphotéricine B et au voriconazole.

Les échinocandines sont des inhibiteurs non-compétitifs de la β1,3-glucane synthase, enzyme essentielle dans la synthèse de la paroi des levures et des champignons filamenteux. La caspofongine est le premier membre de cette classe autorisé pour le traitement des aspergilloses invasives. Les effets secondaires sont limités puisque ce type d'inhibiteurs agit sur une enzyme absente des cellules de mammifères. La micafongine et l'anidulafongine sont deux autres types d'échinocandines.

© 2015 Tous droits réservés.

doc.univ-lille1.fr

CHAPITRE 3 : La paroi d'*Aspergillus fumigatus*

Comme tous les champignons, *Aspergillus fumigatus* possède une paroi cellulaire. Celle-ci joue un rôle essentiel dans l'adaptation du champignon à son environnement et dans les interactions hôte-pathogène. En effet, elle contient des enzymes, que l'on retrouve également associées à la membrane plasmique et qui peuvent être secrétées pour faciliter la dégradation de substrats organiques végétaux et des tissus de l'hôte. Cette sécrétion est cruciale pour récupérer les éléments nutritifs essentiels à la croissance fongique et pour envahir l'hôte. La paroi contient également des senseurs de l'environnement permettant de résister au stress et à la pression osmotique ainsi qu'aux molécules toxiques (Latgé J.P., 2010). Une perturbation dans l'intégrité de la paroi peut déclencher le « Cell Wall Integrity Pathway » (CWI) afin de renforcer cette barrière essentielle à la survie du champignon.

90% des parois fongiques sont composées de polysaccharides qu'on ne retrouve pas chez les hôtes humains ou végétaux en faisant ainsi une cible privilégiée pour le développement de nouveaux anti-fongiques. Les parois partagent un core structural commun à tous les champignons composés de β1,3-glucane et de chitine. La paroi fongique, qui a longtemps été considérée comme un squelette inerte, est maintenant vue comme une structure dynamique en perpétuel remodelage afin de s'adapter aux différents évènements morphogénétiques du cycle de vie d'*Aspergillus fumigatus* : croissance du mycélium, développement de phialides, conidies… On trouve également des protéines qui sont associées à la paroi (ancre GPI) ou en transit avant d'être sécrétées dans le milieu extérieur.

I. Les protéines pariétales

La paroi d'*A. fumigatus* est composée à plus de 90% de polysaccharides (β1,3-glucane, chitine, β1,3/ β1,4-glucane, α1,3-glucane et galactomannanes) et d'environ 5% de (glyco)protéines. La plupart de ces protéines associées aux parois sont :

-soit des protéines sécrétées qui sont en transit dans cette paroi pouvant être solubilisées par des détergents et agents réducteurs

-soit des protéines à ancre GPI ou non qui pourront avoir un rôle dans le remodelage, dans le maintien de l'intégrité de la paroi ou dans l'adhérence

Cependant, la rétention de certaines protéines dans la paroi pourrait être due à des liaisons non covalentes des polysaccharides à travers des forces ioniques ou hydrogènes.

A) Protéines pariétales ayant un rôle dans l'adhérence

La paroi conidiale est la première structure à entrer en contact avec la matrice extracellulaire et les cellules épithéliales pulmonaires de l'hôte. Pour favoriser les mécanismes d'adhérence avec l'hôte, il existerait 38 adhésines potentielles déterminées par bio-informatique (Sheppard D.C., 2011). Cela a aussi été montré par traitement des conidies avec de la trypsine qui conduisait à une adhérence à la membrane basale inhibée (Gil M.L. *et al.*, 1996 ; Penalver M.C. *et al.*, 1996). Parmi ces adhésines, se

© 2015 Tous droits réservés. doc.univ-lille1.fr

trouve l'hydrophobine RodA formant un réseau régulier de bâtonnets ronds rendant la surface hydrophobe. Le mutant δrodA perd sa capacité d'adhérence au collagène mais pas à la fibronectine, à la laminine ou aux cellules épithéliales pulmonaires (Thau N. *et al.,* 1994). Il existe cinq autres gènes codant des hydrophobines dont RodB. Cependant, sa délétion n'entraîne aucun effet bien que les tests d'adhérence aux composants de la matrice extracellulaire n'aient pas été effectués (Beauvais A. *et al.,* 2007).

CspA (Cell surface protein A glycosylée de MM=75kDa) et Ecm33 sont deux protéines à ancre GPI de la paroi conidiale importantes dans le maintien de l'intégrité pariétale. CspA est démasquée pendant la germination de la conidie et est exprimée pendant la croissance hyphale. Le mutant δcspA entraîne une diminution de l'adhérence des conidies dormantes à la matrice extracellulaire de cellules pulmonaires murines. CspA interagit avec Ecm33p et Gel2p. Les doubles mutants δcspAδecm33 ou δcspAδgel2 entraînent une désorganisation de la paroi conidiale. CspA est nécessaire au maintien d'une architecture correcte de la paroi. Trois autres gènes codant des CWP-GPI potentielles ont aussi été identifiés et qu'il reste à étudier : AFUA_2G05150 (MP-2) ; AFUA_4G09600 et AFUA_6G14090 (Ledvansky E. *et al., 2010*).

Suite à une étude sur l'hydrophobicité de la paroi du mycélium, qui se liait à des billes de polystyrène, il a été mis en évidence dix-neuf protéines de masse apparente allant de 20 à 70 kDa ainsi que deux glycoprotéines de 115 et 210 kDa suite à un étiquetage à la biotine et à un traitement de la paroi au β-mercaptoéthanol. Ces extraits protéiques ont été analysés par SDS-PAGE et révélés par Western blot par extravidine conjuguée à la peroxidase et par concanavaline A (Peňalver M.C. *et al.,* 1996). Cette même équipe a notamment identifié au niveau des conidies, deux polypeptides particuliers de 23 et 30kDa capables d'interagir spécifiquement avec la fibronectine, composant de la matrice extracellulaire de l'hôte. Ce résultat a été obtenu à partir d'un homogénat pariétal et d'extraits protéiques obtenus par traitement au SDS et au β-mercaptoéthanol qui ont été analysés par SDS-PAGE et révélés par Bleu de Coomassie. Il a été obtenu un complexe de chaînes polypeptidiques de 16 à 35 espèces de 17 à 150 kDa selon l'extrait. Cependant, suite à un traitement avec la fibronectine et des anticorps anti-fibronectine, seuls 2 polypeptides ont réagi positivement (Peňalver M.C. *et al.,* 1996). Toujours par SDS-PAGE et Western-blot mais cette fois-ci avec la laminine, un autre polypeptide de 37kDa a été identifié interagissant spécifiquement avec ce composant de la matrice extracellulaire (Gil M.L. *et al.,* 1996).

Une autre équipe a voulu étudier l'expression de récepteurs à la laminine pendant le gonflement de la conidie. La microscopie électronique a montré que les sites de liaison à la laminine étaient distribués sur la couche externe de la conidie au repos. Par cytométrie en flux, il a été montré que l'expression de ces récepteurs à la surface diminuait au fur et à mesure du gonflement de la conidie. Pour identifier ces

© 2015 Tous droits réservés. doc.univ-lille1.fr

récepteurs, un SDS-PAGE et un Western blot avec la laminine ont été effectués et ont permis l'identification d'un polypeptide de 72 kDa interagissant de façon spécifique avec la laminine (Tronchin G. *et al.*, 1997 ; Bouchara J.P. et Tronchin G., 1999). Cette même équipe a purifié et partiellement caractérisé à partir de parois de conidies dormantes une lectine de 32 kDa spécifique des acides sialiques et permettrait ainsi l'adhésion des conidies aux composants de la matrice extracellulaire de l'hôte (Tronchin G. *et al.*, 2002). Par ailleurs, une autre lectine de 32 kDa spécifique du fucose avait déjà été identifiée au niveau des conidies (Ishimaru T.E. *et al.*, 1996)

La protéine recombinante AspF2 (MM=37 kDa) est un allergène qui serait également impliqué dans l'adhésion à la MEC. Par Blast, AspF2 a un fort degré d'homologie avec ASPND1 (60%) d'*A.nidulans* et avec la *fibrinogen binding protein* (44%) de *C. albicans*. Son affinité à la laminine a été prouvée par test ELISA. Cette protéine a une masse apparente de 37 kDa et 4 sites potentiels de *N*-glycosylation (Banerjee B. *et al.*, 1998).

Plus récemment, Upadhyay *et al.*, 2009, ont mis au point le logiciel SPAAN (Software program for prediction of adhesins and adhesin like proteins using neural networks) permettant le screening *in silico* de nouvelles adhésines. Sur 9894 protéines screenées, 0,83 % (n=82) ont une P_{ad}>0,9 (P_{ad} = Probabilité qu'a une protéine d'être une adhésine.), 2,47 % (n=243) ont une P_{ad}>0,8 et 11,62 % (n=1149) ont une P_{ad}>0,5. RodA, par exemple, a une P_{ad} de 0,79. Ils ont choisi de cloner et d'exprimer dans *E.coli*, la protéine *Af*CalAp afin de vérifier ses propriétés d'interaction avec des composants de la matrice extracellulaire de l'hôte. C'est une protéine de 18,7 kDa dont les transcrits sont détectés dans les conidies gonflées. *Af*CalAp aurait un peptide signal et serait donc une protéine secrétée. L'utilisation d'anticorps anti-*Af*CalAp a permis sa localisation au niveau des conidies dormantes et gonflées et a empêché la liaison des conidies à la laminine.

Une autre base de données établie à partir de 8 espèces de champignons pathogènes prédit l'existence de 20 adhésines potentielles chez *A. fumigatus* basée sur la structure générale de ce type de protéines consistant en un domaine N-ter pour la liaison peptidique ou polysaccharidique, des domaines glycosylés centraux riches en Ser/Thr et une région C-ter médiant une liaison covalente avec la paroi via une ancre GPI (Chaudhuri R. *et al.*, 2011).

La plupart de ces protéines sont glycosylées et il a été montré que des molécules encore non identifiées portaient des structures glycanniques contenant des acides sialiques favorisant ainsi l'adhérence des conidies aux protéines de la lame basale de l'épithélium pulmonaire. On peut ainsi supposer que les glycannes de ces différentes protéines comportent des acides sialiques. Un traitement des conidies avec une sialidase diminue la liaison entre les conidies et la fibronectine de 65 %. Ces acides sialiques interagiraient plus particulièrement avec les domaines « glycosaminoglycanes » des

© 2015 Tous droits réservés. doc.univ-lille1.fr

protéines de la lame basale (Wasylnka J.A. and Moore M.M., 2000). Par analyse en cytofluométrie en flux avec différentes lectines dont la SNA, il a été déterminé que ces acides sialiques étaient principalement liés en α2,6 sur un résidu de galactose. Par HPLC et MALDI-TOF suite à un traitement acide doux permettant le relâchement des acides sialiques, le Neu5Ac était l'espèce majoritaire retrouvée à la surface de la conidie. Ces acides sialiques sont également importants pour la phagocytose des conidies par les macrophages (Warwas M.L. *et al.*, 2007).

B) Protéines ayant un rôle de défense contre le système immunitaire et dans l'invasion de l'hôte

Afin de se défendre contre les réactions immunitaires de l'hôte notamment la production de ROS, *A. fumigatus* produit un arsenal d'enzymes qui transitent par la paroi avant d'être excrété dans le milieu extracellulaire dont font partie les catalases et les superoxydes dismutases. Parmi les catalases, on trouve CatA (protéine dimérique de 2 sous-unités de 84,5 kDa) spécifique des conidies dont la délétion du gène entraîne une augmentation de la sensibilité à H_2O_2 et à la dégradation par les neutrophiles (Paris S. *et al.* ,2003). Une glycoprotéine présentant deux masses de 54 à 58 kDa a également été mise en évidence à la surface de la conidie et se lie au facteur du complément C3 et à ses fragments après clivage (Sturtevant J.E. and Latgé J.P., 1992).

Afin d'envahir les organes de l'hôte, diverses enzymes peuvent être sécrétées, qui dégradent les divers composants de la matrice extracellulaire. (Dagenais T.R.T. et Keller N.P., 2009 ; Abad A. *et al.*, 2010):

-sérine protéases : Alp/Aspf13 (dégradation de l'élastine, du collagène, fibrinogène et caséine), Alp2 (dégradation de l'élastine), et Aspf18 (dégradation des protéines)

-métalloprotéases : Mep/Aspf5 (dégradation de l'élastine, du collagène) et Mep20 (dégradation des protéines)

-protéases aspartiques : Pep/Aspf10 (dégradation du collagène), Pep2 (dégradation des protéines) et CtsD (dégradation des protéines)

-dipeptidylpeptidases : DppIV et DppV : dégradation des protéines

-phospholipases : PLB 1, PLB 2, PLB 3 et PLC : dégradation des phospholipides, destruction de la membrane

Ces produits relâchés par l'action de ces enzymes peuvent servir à la nutrition d'*Aspergillus fumigatus* pour sa croissance dans l'hôte.

La dipeptidylpeptidaseV (88 kDa), la catalase1 et la ribonucléase Aspf1 (18 kDa) sont deux protéines sécrétées servant au diagnostic des aspergilloses.

La phosphatase acide (PhoAp) est d'abord une protéine GPI avant d'être clivée et sécrétée. C'est la seule protéine qui a été relâchée par un traitement avec une β1,3-glucanase signifiant donc qu'elle était soit liée de façon covalente au β1,3-glucane, soit elle était retenue dans les mailles du réseau

© 2015 Tous droits réservés. doc.univ-lille1.fr

polysaccharidique que le traitement enzymatique a dégradées. PhoAp a 12 sites potentiels de *N*-glycosylation (Bernard M.*et al.*, 2002).

C) Protéines pariétales ayant un rôle dans le remodelage de la paroi

Les enzymes de remodelage seraient pour la plupart des protéines à ancre GPI. Elles seraient donc ancrées au niveau de la membrane et exerceraient leur activité de remodelage des polysaccharides dans la paroi. Par exemple, des activités endo-α et β1,3-glucanase et chitinase sont détectées dans les conidies au repos. Elles pourraient être responsables de l'hydrolyse pariétale quand l'eau pénètre lors de la germination de la conidie d'où une localisation correcte nécessaire des enzymes lors des différents évènements morphogénétiques (Latgé J.P., 2007). Ces enzymes seront détaillées dans le paragraphe III.

II. La paroi mycéliale et sa composition en polysaccharides

La paroi mycéliale d'*Aspergillus fumigatus* a fait l'objet d'une étude qui a permis l'identification et la caractérisation des polysaccharides qui composent cette paroi. Suite à un traitement alcalin, on obtient deux fractions :

-une fraction alcalino-insoluble qui correspond au squelette fibrillaire assurant la rigidité de la paroi

-une fraction alcalino-soluble qui représente le ciment amorphe de la paroi

Concernant la fraction alcalino-insoluble qui a été plus particulièrement étudiée (Fontaine T., *et al.*, 2000), elle est majoritairement composée de β1,3-glucane et de chitine. Le β1,3-glucane, qui est un polymère de glucose lié en β1,3, représente environ 30% du contenu de la paroi.

Quant à la chitine, polymère de *N*-acétylglucosamine en β1,4, elle constitue environ 10% du contenu de la paroi. La chitine est liée de façon covalente à l'extrémité non-réductrice d'une chaîne de β1,3-glucane provoquant son insolubilité. Par ailleurs, il a été été décrit que le β1,3-glucane était une structure très ramifiée qui comporte environ 4% de points de branchements par des liaisons en β1,6. Outre la chitine qui se lie en β1,4 au β1,3-glucane, d'autres structures polysaccharidiques sont associées telles que les galactomannanes et le β1,3/1,4-glucane linéaire. Les galactomannanes sont constitués d'un core de mannose liés en α (2Man-6Man-2Man-2Man) sur lequel viennent se greffer de courtes chaînes latérales de 5 galactofuranoses liés en β1,5. La partie mannane est liée par une liaison en β1,6 à l'extrémité non-réductrice de la chaîne glucanique. Les chaînes de β1,3/1,4-glucane se lient également à l'extrémité non-réductrice du β1,3-glucane. Il a aussi été retrouvé du galactosaminogalactane ainsi que du chitosan représentant 4% de la paroi (Maubon D. *et al., 2010*). (Figure 16)

Le galactosaminogalactane est un polysaccharide hétérogène et linéaire composé de résidus de galactose liés en α1,4 et de galactosamine liés en α1,4 également distribués de manière aléatoire. Le pourcentage de galactose par chaîne varie de 15 à 60 %. Ce polysaccharide est antigénique et promeut

© 2015 Tous droits réservés. doc.univ-lille1.fr

le développement fongique chez les souris immunocompétentes grâce à ses propriétés immunosuppressives. Ce polysaccharide est retrouvé dans les conidies germées ainsi que dans le mycélium (Fontaine T. *et al.,* 2011).

La fraction alcalino-soluble est essentiellement composée d'α1,3-glucane représentant environ 40% de la paroi, des galactomannanes ainsi que des protéines (Hearn V. M. et Sietsma J. H., *1994*). Il existerait 1 % d'interconnexion de liaison en α1,4 dans l'α1,3-glucane (Beauvais A., Morelle W. et Latgé J.P., unpublished dans l'article Latgé J.P.,2010).

L'α1,3-glucane est l'un des composants de la matrice extracellulaire hydrophobe qui va « coller » les hyphes entre eux et former ainsi *in vitro* un biofilm en conditions statiques aériennes. Les colonies en biofilm ont une meilleure croissance et sont souvent plus résistantes aux anti-fongiques comme l'Amphotéricine B ou la nystatine (Beauvais A. *et al.,* 2007). Cette matrice extracellulaire *in vitro* est composée d'α1,3-glucane, de galactomannanes, de mélanine, de protéines incluant les antigènes majeurs secrétés par *A. fumigatus* (dipeptidylpeptidase V, catalase B et AspF1) ainsi que des hydrophobines. Le biofilm se forme lors de l'invasion de l'hôte et sa composition varie selon la pathologie aspergillaire. En effet, sa composition *in vivo* a pu être analysée et a permis l'identification du galactosaminogalactane (aussi retrouvé *in vitro* lors de cette étude) et des galactomannanes comme étant les polysaccharides majoritaires. En revanche, l'α1,3-glucane détecté dans la matrice extracellulaire *in vitro* n'est présent que dans l'aspergillome à l'interface de la couche interne de la matrice et de la paroi cellulaire de l'hyphe. Quant aux autres composants *in vitro* comme les antigènes, ils ne sont pas retrouvés dans la matrice *in vivo* mais ils sont détectés au niveau de la paroi ou intracellulairement. Ils sont plutôt sécrétés que concentrés dans la matrice en conditions infectieuses. La mélanine reste également l'un des composants majeurs de la matrice *in vivo* même s'il reste à déterminer s'il s'agit de DHN-mélanine comme le pigment de la paroi conidiale ou de pyomélanine synthétisée à partir de la L-tyrosine au niveau du mycélium (Loussert C. *et al.,* 2010). Les deux protéines majeures impliquées dans la biosynthèse de la pyomélanine sont HmgA (homogentisate dioxygénase) et HppD (4-hydroxyphénylpyruvate dioxygénase). La délétion de hmgA entraîne une accumulation d'acide homogentisique induisant une augmentation de la biosynthèse de pyomélanine. En revanche, ni pyomélanine, ni accumulation d'acide homogentisique ne sont observées chez le mutant δhppD. (Schmaler-Ripcke J. *et al.,* 2009)

© 2015 Tous droits réservés. doc.univ-lille1.fr

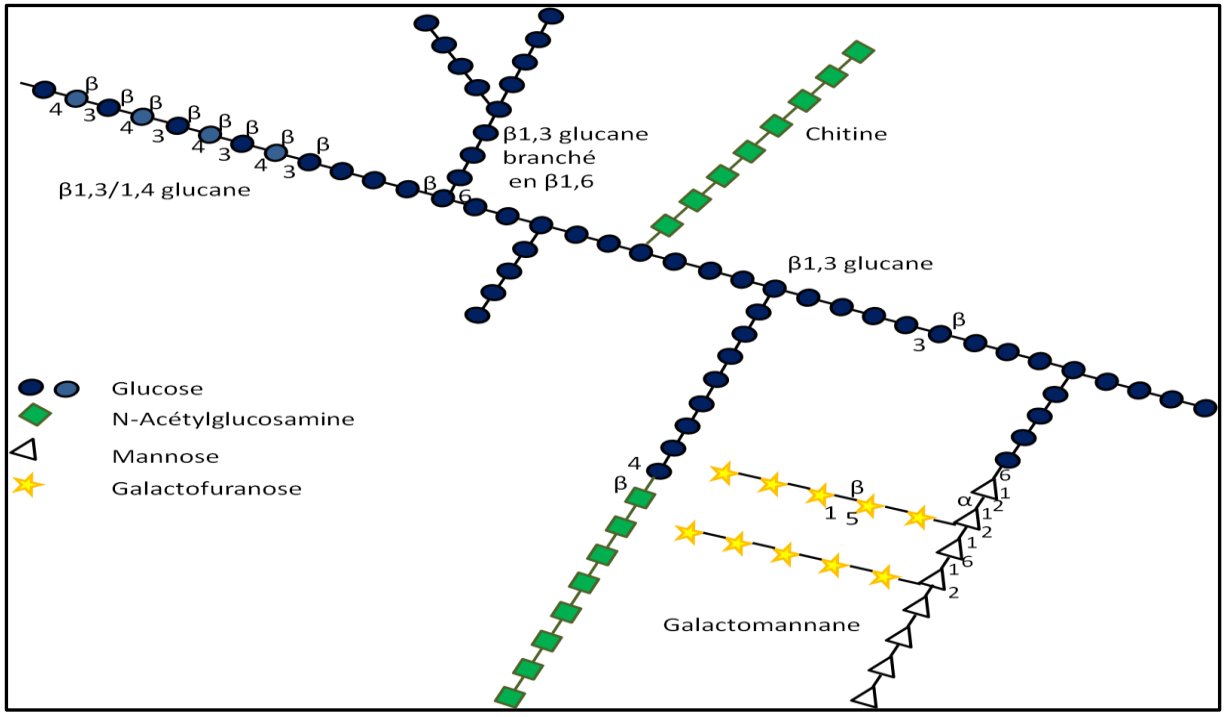


Figure 17: Organisation de la fraction alcalino-insoluble de la paroi d'*Aspergillus fumigatus*. (d'après Fontaine T. *et al.*, 2000)

Tableau 4 : Composition pariétale du mycélium en % de polysaccharides

Polysaccharides	% dans la paroi fongique
β1,3-glucane	20-30% dont ≈ 10% de β1,3/1,4-glucane
Chitine	7-15%
α1,3-glucane	35-46%
Galactomannanes	20-25%
Galactosaminogalactanes	2-5%
Chitosan	≈4%

III. Les enzymes impliquées dans la biosynthèse et le remodelage de la paroi

A) Les enzymes agissant sur β1,3-glucane

1) Le complexe glucane synthase

Le β1,3-glucane est synthétisé par un complexe glucane synthase lié à la membrane plasmique utilisant l'UDP-Glc comme substrat et extrude les chaînes de β1,3-glucane à travers la membrane plasmique dans l'espace périplasmique. Ce complexe glucane synthase est composé d'une sous-unité catalytique FKS1 et de sous-unités régulatrices Rho1-4 et peut synthétiser *in vitro* des chaînes de β1,3-glucane jusqu'à 1500 résidus de glucose. Le gène FKS d'*A. fumigatus* a été identifié par comparaison de séquences à partir de *Saccharomyces cerevisiae.* Un gène homologue a aussi été retrouvé dans le génome d'*Aspergillus nidulans.* AfFKS1p est une protéine de 16 domaines transmembranaires de 218

© 2015 Tous droits réservés.
doc.univ-lille1.fr

kDa avec une séquence de liaison RXTG potentielle à l'UDP-Glc à l'extrémité C-terminale. Cette protéine est essentielle à la viabilité d'*A.fumigatus* tout comme FKS1 et FKS2 chez *S. cerevisiae*. Quant aux sous-unités régulatrices potentielles, seule Rho1p a été étudiée de par sa forte homologie de séquence en acides aminés avec celle de *S. cerevisiae*. C'est une protéine de 21,5 kDa contenant des sites de liaison et d'hydrolyse du GTP. (Beauvais A. *et al.*, 2001)

Cependant, les chaînes de β1,3-glucane produites par ce complexe β1,3-glucane synthase restent désorganisées et alcalino-solubles jusqu'à ce que des liaisons covalentes soient faites entre β1,3-glucanes et/ou d'autres composants pariétaux. Pour cela, différentes glucanosyltransférases et glucanases vont intervenir afin de remodeler ce β1,3-glucane.

2) Les enzymes de remodelage : les Gelp et les Bgtp

Gel1p est une β1,3-glucanosyltransférase ancrée à la membrane par une ancre GPI et est codée par GEL1 (Glucan ELongating glucanosyltransferase 1). Gel1p a été en premier lieu isolée d'un autolysat de paroi sous forme de polypeptide de masse moléculaire de 49kDa. Gel1p a une extrémité amino-hydrophobe caractéristique des séquences signal de la voie de sécrétion, trois sites potentiels de *N*-glycosylation, une région riche en sérine qui constituerait des sites potentiels de *O*-glycosylation et une extrémité carboxyl-hydrophobe caractéristique des protéines à ancre GPI. Cette enzyme reconnaît un laminarioligosaccharide d'au moins 11 glucoses. Gel1p agit dans un premier temps comme une endoglucanase en coupant en interne une molécule de β1,3-glucane, puis transfère l'extrémité réductrice nouvellement générée à une extrémité non réductrice d'une autre molécule de β1,3-glucane formant ainsi une nouvelle liaison en β1,3 permettant l'élongation de ce polysaccharide. La protéine Gel1p est homologue à d'autres familles de protéines de levures codées par GAS chez *Saccharomyces cerevisiae*, PHR chez *Candida albicans* et EPD chez *Candida maltosa*. Les protéines recombinantes correspondantes Gas1p, Phr1p et Phr2p ont montré une activité β1,3-glucanosyltransférase similaire à celle de Gel1p. Gel1p peut complémenter le mutant δgas1 de *S. cerevisiae*. Ce mutant a un taux de croissance réduit et a une paroi mal organisée :

-une diminution du contenu en glucane ainsi qu'une modification de sa structure suggérée par des différences de ratio de liaison β1,3/1,6-glucane et de solubilité des fractions pariétales

-un relâchement de β1,3-glucane et/ou de protéines pariétales β-glucosylées dans le milieu de culture

-une augmentation du niveau de chitine

-une augmentation de l'incorporation de mannoprotéines dans la paroi, notamment Cwp1p, qui se lie à la chitine au lieu des glucanes (Mouyna I. *et al.*, 2000).

La délétion de GEL1 n'a pas entraîné de modifications du phénotype que ce soit dans la morphologie hyphale ou conidiale. De plus, la croissance mycéliale et la germination des conidies ne sont pas affectées et la composition en polysaccharides des fractions alcalino-insolubles et alcalino-solubles sont similaires à celle d'une souche WT (Mouyna I. *et al.*, 2005).

© 2015 Tous droits réservés. doc.univ-lille1.fr

GEL2 est l'homologue de GEL1 et partagent 38 % d'identité de séquence ainsi que des caractéristiques communes :

-GEL1 et GEL2 sont exprimées de façon constitutive lors de multiples conditions de croissance

-Gel2p est aussi une protéine GPI potentielle et partage la même activité β1,3-glucanosyltransférase que Gel1p

-tout comme Gel1p, Gelp2 peut complémenter la délétion de gas1 chez *Saccharomyces cerevisiae* confirmant que Gelp et Gasp ont les mêmes activités enzymatiques.

Gel2p possède 5 sites potentiels de *N*-glycosylation et a une masse moléculaire théorique de 52 kDa. La protéine recombinante Gel2p451 (sans ancre GPI) migre à une MM apparente de 60-62 kDa qui après déglycosylation est de 50 kDa. La délétion de δgel2 ainsi que la double délétion δgel1/δgel2 entraînent une croissance ralentie, une conidiogénèse anormale (problème dans la formation des phialides), une composition de la paroi modifiée ainsi qu'une diminution de la virulence. Les conidies ne présentent pas non plus la couche caractéristique pigmentée de mélanine. Une diminution de la proportion en galactomannanes a été observée dans la fraction alcalino-soluble. Concernant la fraction alcalino-insoluble, la quantité en hexose diminue de 39 % chez la souche WT à 31% chez δgel2 et δgel1/ δgel2. Cette réduction est compensée par une augmentation en hexosamine. La paroi de ces 2 mutants est plus sensible aux inhibiteurs de synthases des polysaccharides tels que la Nikkomycine Z, la Muluncandine ou encore Lilly 303366. (Mouyna I. *et al.*, 2005)

Ces deux gènes codant des enzymes qui appartiennent à la famille des GEL comportant 7 membres (F/GH72 (CaZy)) que l'on peut classer en deux sous-familles en fonction de leur séquence:

-GEL3, GEL4, GEL5 et GEL7 (de 53 à 65 % d'identité)

-GEL1, GEL2 et GEL6 (de 36 à 38 % d'identité)

Gel4p est essentielle pour la croissance d'*Aspergillus fumigatus* (Gastebois A. *et al., 2010*).

Bgt1p (β1,3-1,6 glucanosyltransférase) est une enzyme qui introduit des liaisons intra-chaînes en β1,6 dans du β1,3-glucane. Cette enzyme a la même activité que Bgl2p présente chez *S. cerevisiae.* Elle relâche une unité disaccharidique à partir de l'extrémité réductrice d'un laminarioligosaccharide et transfère la nouvelle extrémité réductrice générée à l'extrémité non réductrice d'une autre molécule de β1,3-glucane en formant une liaison β1,6 intra-chaîne créant un pli β1,3/1,6. Bgt1p a été purifiée à partir d'un autolysat de paroi et possède une masse moléculaire de 37 kDa, cependant elle a été purifiée en association avec une protéine mineure de 35 kDa. Ces 2 formes auraient une glycosylation différente. Elle partage 40 % d'identité avec les protéines codées par les gènes BGL2 de *S. cerevisiae* et *C. albicans.* Bgt1p contient deux sites potentiels de *N*-glycosylation et un peptide signal indiquant qu'elle est sécrétée. Le mutant δbgt1 a été construit afin de déterminer l'importance de ce gène dans la biosynthèse de la paroi mais aucune différence phénotypique n'a été observée entre les souches mutée et parentale. Il a alors été suggéré que Bgt1p pourrait jouer un rôle dans la nutrition du champignon en

© 2015 Tous droits réservés. doc.univ-lille1.fr

relâchant de haute concentration de laminaribiose dans le milieu de culture qui peut ensuite être hydrolysé en glucose pouvant être alors métabolisé par la cellule. (Mouyna I., *et al.,*1998)

Comme Bgt1p, Bgt2p relâche du laminaribiose à partir de l'extrémité réductrice d'un oligosaccharide lié en β1,3 et transfère la chaîne restante à une autre molécule. Ce transfert a lieu au C-6 d'un groupe interne de l'accepteur, résultant en un produit lié en β1,3 avec une branche latérale. Bgt2p contient 4 sites potentiels de *N*-glycosylation, un N-ter hydrophobe et un C-ter qui comporte une région riche en sérine et une séquence caractéristique des protéines à ancre GPI, avec une séquence consensus de site de clivage carboxylpeptidase. Un mutant δbgt2 a été construit ainsi qu'un double mutant δbgt1/ δbgt2. Ces deux mutants ne montraient pas de différence phénotypique par rapport à la souche parentale. La composition en monosaccharides était également similaire ainsi que le taux de branchement du β1,3-glucane. Le niveau de point de branchement a été déterminé chez ces souches par traitement à la LamA puis par HPAEC des produits de digestion. Les profils chromatographiques étaient semblables pour les souches parentales et mutées avec un taux de branchement correspondant à 5 % du glucose relâché et du laminaribiose montrant que le branchement du β1,3-glucane n'est pas modifié par la délétion δbgt1/ δbgt2. Bgt1p et Bgl2p sont des protéines orthologues de Bgt2 chez *S. cerevisiae*. Bgt1p et Bgt2p appartiennent à la famille GH17 qui contient aussi des β-glucanases et des transglycosidases. Le site actif de cette famille consiste en deux résidus de glutamate agissant respectivement comme un donneur de H^+ et un nucléophile pour cliver les substrats β-liés aux liaisons équatoriales et retiennent la configuration β-anomérique. Comme le double mutant a montré un phénotype WT, il doit exister au moins une autres enzymes présentant une activité de branchement chez *A. fumigatus* ; les candidats potentiels seraient Scw4p et Scw11p (Gastebois A. *et al.,* 2010).

3) Les enzymes de « dégradation » : les β1,3-glucanases

La β1,3-endoglucanase 1 (Eng1p) est une protéine de 72 kDa codée par le gène ENGL1. La disruption de ce gène n'entraîne pas de modification du phénotype. Eng1 permettrait la formation d'extrémités réductrices ou non-réductrices qui seraient nécessaires à l'activité β1,3 glucanosyltransférase (Mouyna I. *et al.,* 2002). Il existe des protéines orthologues chez les levures notamment chez *S. cerevisiae* où la délétion d'*eng1* entraîne l'agglutination des cellules montrant qu'Eng1p est impliquée dans la dissolution du septum mère-fille pendant la séparation cellulaire (Baladrón V. *et al*., 2002). Chez *S. pombe*, la délétion d'eng1 entraîne l'incapacité de dégradation du β1,3-glucane du septum primaire qui sépare les cellules-fille.(Martín-Cuadrado A.B. *et al*., 2003)

Il est à noter que dix endo-β1,3-glucanases potentielles ont été identifiées chez *A. fumigatus* dont deux qui auraient un site de modification par une ancre GPI : AFUA_3g03080 dont l'expression n'a pu être détectée malgré l'utilisation de deux paires d'amorces et AFUA_2g14360 qui code Eng2p. Celle-ci est exprimée de façon constitutive quelque soient les conditions et n'est pas stimulée par la laminarine.

© 2015 Tous droits réservés. doc.univ-lille1.fr

Eng2p est une protéine à ancre GPI de 652 acides aminés, de masse moléculaire de 66 kDa et possède deux sites potentiels de *N*-glycosylation. Aucun orthologue d'ENG2 n'a été identifié chez les levures sauf chez *S. pombe* mais Eng2 ne possède pas d'ancre GPI. Elle appartient à la famille des glycosylhydrolases 16 (GH16). Eng2 peut dégrader le β1,3-glucane et le lichenan (β1,3/1,4glucane) mais agit préférentiellement sur des polymères solubles tels que la laminarine et les β1,3-glucanes courts et linéaires. Il a été montré que Eng2p avait une activité hydrolase et transférase pour les oligosaccharides de faible degré de polymérisation. Eng2p ne dégrade pas le β1,3-glucane isolé de la fraction alcalino-insoluble de la paroi cellulaire suggérant qu'Eng2 ne serait pas impliquée dans les évènements morphogénétiques. De plus, le mutant δeng2 ne présente pas de modifications de son phénotype par rapport à la souche parentale ce qui peut être expliqué par des réactions compensatoires d'une ou des 9 autres endo-β-1,3-glucanases (Hartl L. *et al.,* 2011). Une endo-β1,3-glucanase de 74 kDa a également été purifiée et caractérisée à partir d'un autolysat. Cette enzyme serait O-glycosylée et hydrolyse des chaînes linéaires de β-1,3-glucane. Elle agit à un pH optimum de 7. Elle aurait un rôle potentiel pendant la morphogénèse d*'A. fumigatus*. (Fontaine T. *et al.,* 1997)

Deux exo-β1,3-glucanases (exoG-I et exoG-II) ont été isolées à partir d'un autolysat de paroi cellulaire d*'A. fumigatus*. ExoG-I a été purifiée sous forme monomérique de 82 kDa dont 2 kDa de *N*-glycannes tandis qu'exoG-II a été purifiée sous forme dimérique ayant une masse moléculaire de 230 kDa dont 44 kDa de *N*-glycannes. Ces 2 exo-β-1,3-glucanases ont des modes d'action bien distincts. En effet, exoG-I est considérée comme une β-1,3-glucan-glucohydrolase puisqu'elle agit spécifiquement sur les liaisons β1,3, la présence de liaison β1,6 ralentit son activité. Plus la chaine de β1,3-glucane est longue, plus son activité est forte. Quant à exoG-II, c'est une β-D-glucoside-glucohydrolase clivant les liaisons β1,3 et β1,6. Ces deux enzymes sont actives sur la laminarine réduite et les laminari-oligosaccharides réduits (β1,3-glucane soluble) ce qui démontre que les substrats sont dégradés à partir de l'extrémité non réductrice. L'enzyme exoG-I relâche des résidus de glucose en configuration anomérique α jusqu'à aboutir à un laminariotétraose puis elle passe à une autre chaîne. En revanche, exoG-II libère du glucose en conformation anomérique β et divers laminari-oligosaccharides réduits intermédiaires (G7r à G2r). L'enzyme exoG-II est exprimée plus tardivement qu'exoG-I et ne jouerait pas un rôle majeur dans l'organisation du β1,3-glucane de la paroi puisqu'elle a une activité limitée sur le β1,3-glucane de la fraction alcalino-insoluble. Une 3è exoglucanase de 43 kDa a également été isolée et décrite comme ayant un mode d'action semblable à exoG-I. L'enzyme exoG-I et l'exoglucanase de 43 kDa ont une expression constitutive et une action spécifique sur le β1,3-glucane suggérant un rôle possible dans l'expansion cellulaire (Fontaine T. *et al.,* 1997). Chez *S.cerevisiae*, la production de β-glucanases est associée à la croissance et régulée par le cycle cellulaire. La disruption de ces gènes n'est pas létale chez la levure.

© 2015 Tous droits réservés. doc.univ-lille1.fr

B) Le enzymes agissant sur la chitine

1) Les chitine synthases

La chitine est un polymère linéaire de *N*-acétylglucosamine lié en β1,4 que l'on trouve dans la fraction alcalino-insoluble de la paroi cellulaire d'*Aspergillus fumigatus.* La chitine a une résistance à la traction beaucoup plus forte que la plupart des matériaux artificiels. Cette force est le résultat de liaisons hydrogène interchaînes mises en place lors de la synthèse du polysaccharide. La chitine est synthétisée par des chitine synthases (CS) dont le nombre varie en fonction des espèces de 1 chez *S. pombe* à 7 chez quelques champignons filamenteux dont *A. fumigatus* (de ChsA à ChsG) en passant par trois chez *S. cerevisiae*. A ce jour, plus de 150 chitine synthases fongiques ont été identifiées mais peu ont été caractérisées fonctionnellement. Il existe deux familles de CS pouvant être subdivisées en classes :

- 1ère famille : -classe I } Levure + champignons filamenteux
  -classe II
  -classe III : champignons filamenteux

- 2è famille : -classe IV : levure + fungi
  -classe V : champignons filamenteux
  -classe VI : *A. fumigatus*+ *A. oryzae*
  -CS-like

Une duplication ancienne du gène survenue à la base du règne fongique serait à l'origine de ces deux familles. Les chitines synthases catalysent la polymérisation de GlcNAc à partir d'UDP-GlcNAc. Ce sont des protéines membranaires (Roncero C., 2002). Des mutants pour certains gènes ont été contruits et leur phénotype a été observé (Tableau 5).

Suite à un traitement aux échinocandines, la transcription de ChsA et ChsC est augmentée suggérant un rôle compensatoire à l'inhibition de la synthèse de β1,3-glucane. Des simples (δchsA, δchsC), double (δchsA/δchsC) mutants de ces gènes ont été construits. Leur croissance n'a pas été affectée, l'hyphe du double mutant δchsA/δchsC était rugueux et applati suggérant une diminution de l'intégrité structurale donc une désorganisation. L'activité chitine synthase est inchangée chez δchsC, diminuée de 53% dans δchsA et de 76% δchsA/δchsC cependant le contenu en chitine est inaltéré. Le taux de transcription de la ChsF augmente chez les mutants. (Rogg L.E *et al.*, 2011)

Seuls deux gènes de la famille des chitines synthases : ChsE et ChsG joueraient un rôle dans la morphogénèse d'*Aspergillus fumigatus* puisque les simples mutants ont montré un phénotype modifié. Chez le mutant δChsE, il a été observé une réduction de 30% du contenu en chitine, un gonflement excessif de l'hyphe et une conidiogénèse réduite tandis que chez le mutant δChsG, il a été observé une croissance anormale des hyphes (hyphes hyperbranchés) ainsi qu'une diminution de l'activité chitine synthase. Un double mutant pour ces deux gènes a été construit : l'activité chitine synthase a été

© 2015 Tous droits réservés. doc.univ-lille1.fr

réduite ainsi que le taux de croissance radiale des colonies, les hyphes sont également très branchés. De plus, des caractères aberrants tels que des renflements périodiques le long de l'hyphe ou un blocage de la conidiogénèse ont été observés et peuvent être réversés par des stabilisateurs osmotiques. Les capacités de germination (plus rapide) et la forme des conidies (sphérique ou en poire) sont altérées et les parois ne contiennent plus que la moitié de la chitine par rapport aux souches parentales et sont enrichis en α1,3-glucane. L'absence de létalité chez le double mutant peut s'expliquer par l'existence des 5 autres gènes qui restent fonctionnels compensant ainsi l'activité chitine synthase. La chitine manquante est peut être également compensée par un autre polysaccharide de la paroi. L'effet additif des deux mutants suggère que ChsE et ChsG jouent des rôles différents dans la biosynthèse de la chitine (Mellado E. *et al.*, 2003).

Tableau 5 : Les chitine synthases du génome d'*Aspergillus fumigatus*.

Enzymes		
ChsA	Chitine synthase	-Classe I -Zymogénique -δChsA : pas de modification du phénotype
ChsB		-Classe II -Zymogénique -δChsB : pas de modification du phénotype
ChsC		-Classe III -Zymogénique -δChsC : pas de modification du phénotype
ChsD		-Classe VI -δChsD : réduction de 20% du contenu en chitine
ChsE		-Classe V -δChsE : Réduction de 30% du niveau de chitine, gonflement excessif de l'hyphe, conidiogénèse réduite
ChsF		-Classe IV
ChsG		-Classe III -Zymogénique -δChsG : Croissance anormale des hyphes (hyphes branchés), diminution de l'activité chitine synthase

2) Les chitinases

Les chitinases interviennent lors d'évènements morphogénétiques comme la germination des conidies qui nécessite la plasticité et l'expansion de la paroi. Elles appartiennent à la famille des GH18. Les chitinases sont divisées en 3 sous-groupes :

-le sous-groupe A correspondant aux chitinases fongiques/bactériennes (Classe V) contient 6 gènes codant pour des enzymes secrétées chez *A.fumigatus*.

© 2015 Tous droits réservés. doc.univ-lille1.fr

-le sous-groupe B correspondant aux chitinases fongiques/de plantes (Classe III) contient 5 gènes.
-le sous-groupe C correspondant aux chitinases spécifiquement retrouvées chez les champignons filamenteux contient 6 gènes. Les protéines codées par ces gènes ont un module de liaison à la chitine (CBM).

Les chitinases du sous groupe A sont des enzymes sécrétées jouant un rôle dans la digestion de la chitine exogène ou dans l'utilisation de la chitine fongique pendant l'autolyse fournissant de l'énergie. Quant aux chitinases du sous groupe B, elles auraient un rôle direct dans la morphogénèse notamment chez *S. cerevisiae* chez qui la disruption du gène CTS mène à l'incapacité des cellules-mère et fille à se séparer pendant la division cellulaire. De même, la disruption de chiA chez *A. nidulans* diminue le taux de croissance hyphale et la fréquence de germination.

Au sein du sous groupe A, la chitinase recombinante ChiB1 a été produite et caractérisée chez *Pischia pastoris*. C'est une chitinase de 45 kDa présentant 56 % d'identité de séquence avec celle d'*A. nidulans* et contenant un site potentiel de *N*-glycosylation. Suite à l'analyse des produits obtenus à partir de l'incubation du substrat $(GlcNAc)_6$ et de rChiB1, il a été conclu que ChiB1 clivait préférentiellement entre la 2è et 3è GlcNAc à partir de l'extrémité non réductrice du substrat relâchant donc en large quantité du $(GlcNAc)_2$ ainsi que du $(GlcNAc)_4$. Il a été aussi observé la présence de $(GlcNAc)_8$ montrant des réactions de transglycosylation soit par combinaison de deux tétramères, soit d'un dimère et d'un hexamère. Ce mécanisme serait dépendant des hautes concentrations de produits dérivant de cette activité chitinolytique. Le phénotype du mutant δchiB1 est semblable à celui de la souche parentale. ChiB1 aurait un rôle dans l'activité chitinolytique extracellulaire (phase autolytique) d'*A. fumigatus* (Jaques A.K. *et al.*, 2003).
Au cours de cette même étude, ChiA1, du sous groupe B, a également été étudiée. ChiA1 partage 50,3% d'identité de séquence avec celle d'*A. nidulans* et aurait une ancre GPI ainsi que des sites de clivage au niveau du C-ter de la protéine. Le mutant δchiA1 présente une diminution du taux de germination des conidies et un faible taux de croissance hyphale. ChiA aurait donc un rôle potentiel dans la croissance et la morphogénèse chez les champignons filamenteux comme cela est suggéré pour la plupart des protéines à ancre GPI. De plus, ChiA1 possède un domaine riche en Ser/Thr dans sa partie terminale qui aurait un rôle dans la projection du site actif N-ter dans la paroi d'*A. fumigatus* comme cela a été montré chez d'autres champignons.

Une étude a récemment été entreprise afin de déterminer le rôle fonctionnel des chitinases du sous-groupe B par la création d'un quintuple mutant. Ce mutant n'affichait pas de modifications phénotypiques par rapport aux souches WT. Cette étude a permis de conclure que les chitinases de classe III n'avaient pas de rôle morphogénétique. Elles seraient impliquées dans la fourniture d'énergie aux champignons suite à la dégradation de leur paroi « fantôme » pendant la phase autolytique (Alcazar-Fuoli L. *et al.*, 2010).

© 2015 Tous droits réservés. doc.univ-lille1.fr

La rigidité de la chitine pourrait être modifiée par déacétylation des résidus de GlcNAc permettant ainsi la formation de chitosan. Mais cette activité n'a pas encore été décrite chez *Aspergillus fumigatus.* Cependant, deux chitine déacétylases potentielles ont été identifiées dans son génome par comparaison avec celui de la levure dont l'une serait liée à la membrane par une ancre GPI.

C) Les enzymes agissant sur l'α1,3-glucane

1) Les α1,3-glucane synthases

L'α1,3-glucane est le composant majeur de la paroi mycélienne d'*A. fumigatus* (environ 40 %). La biosynthèse de ce polysaccharide, que l'on retrouve dans la fraction alcalino-soluble, est due à l'action d'α1,3-glucane synthases (AGS). Chez *Aspergillus*, deux gènes, AGS1 et AGS2, sont des homologues du gène AGS1 de *S. pombe* et codent des α1,3-glucane synthases. Ces protéines ont une masse moléculaire d'environ 270 kDa et partagent 72 % d'identité de séquence en acides aminés. L'analyse des deux simples mutants a montré une altération de la polarité cellulaire ainsi qu'une conidiogénèse réduite due à une mauvaise formation des phialides. Les mutants produisent des hyphes présentant des ramifications excessives et des apex dichotomiques. Seul le mutant δags1 présentait une diminution du contenu en α1,3-glucane dans la paroi et était plus sensible aux inhibiteurs pariétaux (Nikkomycine Z et rouge congo). Par des études menées en immunofluorescence, il a été déterminé qu'Ags1p est localisée au niveau de la paroi des conidies germantes et sur la région apicale des tubes germinatifs ainsi que sur le septum. Quant à Ags2p, elle est retrouvée intracellulairement dans les spores et le tube germinatif ainsi qu'à l'apex. Les mutants présentaient la même virulence que la souche WT suggérant que l'α1,3-glucane n'a pas de rôle dans ce phénomène contrairement à ce qui a été décrit chez d'autres espèces telles que *Criptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum* ou *Blastomyces dermatidis* chez qui l'absence d'α1,3-glucane aboutit à l'absence de virulence.(Beauvais A. *et al.*, 2005)

Une troisième α1,3-glucane synthase, AGS3, a été caractérisée. C'est une protéine membranaire de 268 kDa qui partage 56 % d'identité avec Ags1p et Ags2p. Elle contient des domaines potentiels de synthase et de transglycosidase. Le mutant δags3 ne montre pas de modification significative de la composition en polysaccharides par rapport à la souche parentale, dans la morphologie de l'hyphe ou dans la germination des conidies. Cependant, la couche externe des conidies du mutant δags3 est plus épaisse que celle de la souche parentale (74 nm contre 33 nm). Ceci est dû à une augmentation de la quantité de mélanine. La virulence de ce mutant a été étudiée dans un modèle murin d'aspergillose et a montré une meilleure croissance par rapport à la souche parentale corrélée à l'augmentation de la sécrétion de galactomannanes qui est un indice de l'invasion du champignon. Cette hypervirulence peut être attribuée à la mélanine qui confère une résistance accrue vis-à-vis des cellules phagocytaires ou des ROS. Cela a été montré chez les espèces *C. neoformans*, *E. dermatitidis* ainsi que chez *A. fumigatus* chez qui les mutants déficients en mélanine apparaissaient moins virulents.

L'expression de ces trois gènes a été analysée chez les différents mutants et la souche parentale. La délétion d'AGS2 ne modifie pas celles d'AGS1 et AGS3. En revanche, la délétion d'AGS3 entraîne

© 2015 Tous droits réservés. doc.univ-lille1.fr

une augmentation de l'expression d'AGS1 (x2,8) et AGS2 (x1,9). De la même manière, celle d'AGS1 entraîne une légère augmentation de l'expression d'AGS2 et AGS3. AGS1 pourrait donc compenser la perte d'AGS3 ce qui expliquerait que la quantité d'α1,3-glucane ne soit pas modifiée chez δags3. AGS1 serait donc l'α1,3-glucane synthase majoritaire impliquée dans la biosynthèse de l'α1,3-glucane (Maubon D. *et al.,* 2006).

Un triple mutant δags1δags2δags3 a été construit afin de déterminer l'importance de l'α1,3-glucane dans le développement d'*A. fumigatus*. Ce triple mutant était totalement dépourvu d'α1,3-glucane mais cela n'affectait en rien ni sa croissance, ni sa viabilité. Dans la fraction alcalino-soluble qui est normalement composée d'α1,3-glucane, du β1,3-glucane dont on ignore encore l'origine et la structure a été retrouvé chez le triple mutant. L'absence d'α1,3-glucane est également compensée par une augmentation de galactosamine qui compose les galactosaminogalactanes dans les fractions alcalino-soluble et insoluble. Les taux de β1,3-glucane et de chitine augmentent également dans la fraction alcalino-insoluble mycéliale alors que seule la proportion en chitine augmente dans la paroi conidiale. Cette augmentation de chitine entraîne une diminution de la sensibilité à la Nikkomycine Z (inhibiteur de chitine synthase) chez ce triple mutant. (Henry C. *et al.,* 2012)

2) *Les α1,3-glucanases*

Le mécanisme de remodelage de l'α1,3-glucane reste inconnu bien que neuf α1,3 glucanases aient été identifiées (Gastebois A. *et al.,* 2009). Chez *S. pombe*, une α1,3-glucanase Agn1p intervient lors de la cytokinèse afin de dégrader le septum secondaire qui entoure le septum primaire dégradé par Eng1p entre les cellules-mère et fille (Dekker N. *et al.,* 2004). Il existe une seconde α1,3-glucanase Agn2p qui a un rôle dans la dégradation de la paroi des asques afin de relâcher les ascospores. Agn1p et Agn2p relâchent principalement des pentasaccharides d'α1,3-glucane. (Dekker N. *et al.,* 2007)

D) Les enzymes agissant sur le galactomannane

Les galactomannanes sont constitués d'un core de mannose liés en α (2Man-6Man-2Man-2Man) sur lequel viennent se greffer de courtes chaînes latérales de 5 galactofuranoses liés en β1,5. Cette biosynthèse fait intervenir des mannosyl- et galactosyltransférases. L'UDP-galactopyranose mutase (UGM) est l'enzyme-clé impliquée dans le métabolisme du galactofuranose, monosaccharide composant donc les galactomannanes ainsi que les glycoconjugués contenant du galactofuranose. Elle catalyse l'isomérisation de l'UDP-galactopyranose en UDP-galactofuranose. Un mutant du gène glfA codant cette enzyme a été construit et a montré une absence de galactofuranose. Il a été observé une diminution du taux de croissance radiale ainsi que la conidiogénèse qui est abolie à 42°C. La paroi du mutant δglfA apparaît aussi moitié moins épaisse que celle de la souche WT ce qui entraîne une sensibilité accrue à plusieurs agents anti-fongiques. Le mutant δglfA affiche également une moindre virulence dans un modèle murin d'aspergillose invasive (Schmalhorst P.S. *et al.,*2008). Le

© 2015 Tous droits réservés. doc.univ-lille1.fr

galactofuranose est un monosaccharide absent chez les mammifères et les plantes supérieures qu'on retrouve chez les bactéries, les protozoaires, les champignons, l'étoile de mer, les éponges, les algues vertes mais surtout chez les espèces pathogènes et les parasites. Le galactofuranose est un composant essentiel de la paroi cellulaire chez les espèces fongiques, présent également dans les molécules sécrétées. Chez les *Aspergillus spp.*, le galactofuranose peut être présent comme résidus terminaux au sein des *N*-glycannes et est lié soit en α1,2, soit en β1,2 à un résidu de mannose. Il peut de plus être présent au sein des galactomannanes en β1,3 ou β1,5 ; dans les O-glycannes en β1,5 et β1,6 et dans les glycosphingolipides en β1,2 et β1,6. Le galactofuranose de la paroi semble important au maintien de l'intégrité pariétale et à la virulence des espèces fongiques. En effet, les mutants déficients en gal*f* sont souvent hypersensibles aux agents antifongiques, ont un stress osmotique constitutif et/ou une virulence atténuée. Les souches mutantes peuvent également montrer des défauts dans la conidiogénèse (Tefsen B. *et al.*, 2012).

Une fois synthétisé, l'UDP-galactofuranose doit être transporté dans les organelles de la voie de sécrétion afin de s'ajouter aux différents glycoconjugués. Un transporteur de nucléotides-sucres, GlfB, identifié au niveau du Golgi, joue ce rôle. L'implication de ce transporteur dans la galactofuranosylation a été montrée par une approche de délétion du gène glfB. GlfB est une protéine de 400 acides aminés formant 11 hélices transmembranaires partageant 40% d'identité de séquences avec les transporteurs de phosphate homologues d'*Arabidopsis*. Par alignement de séquence de plusieurs transporteurs, deux lysines (Lys59 et Lys294) apparaissent conservées et seraient impliquées dans la liaison avec le substrat. Tous les champignons du sous-phylum *Pezizomycotina* (phylum des Ascomycètes) dont le génome a été séquencé ont un homologue de glfB en cluster avec glfA comme c'est le cas pour *A. fumigatus*. Chez les Basidiomycètes (ex : *C. neoformans*), quand ces deux gènes sont présents, ils sont plus distants et peuvent même être trouvés sur des chromosomes différents. Suite à la délétion du gène glfB, l'analyse de glycoconjugués, que ce soit des *N*-glycannes de glycoprotéines, des glycolipides ou des composants de la paroi, a montré une absence de galactofuranosylation par rapport à la souche parentale. Le mutant a une morphologie altérée associée à une croissance radiale plus lente qui sont plus prononcées à haute température (Engel J. *et al.*, 2009).

Concernant la synthèse de la partie mannane, elle nécessiterait l'implication de la gmtA qui est un transporteur actif de GDP-Man. En effet, l'étude de la déficience en gmtA a montré une quasi-absence de mannose donc une déficience en galactomannane. Ce mutant présente des défauts de croissance et de sporulation. De plus, la déficience en ce transporteur entraîne l'arrêt de la biosynthèse des glycolipides ce qui est compatible avec l'absence de GDP-Man dans la lumière du Golgi (Engel J. *et al.*, 2012).

© 2015 Tous droits réservés. doc.univ-lille1.fr

Les galactosyltransférases responsables de l'élongation des chaînes de galactofuranoses ainsi que de leur transfert sur les mannanes restent inconnues. La biosynthèse des mannanes demeure inconnue chez *A. fumigatus* contrairement à celle des levures comme *S. cerevisiae* (Abad A. *et al.*, 2010). Quatre orthologues de HOC1 et OCH1 qui sont des gènes initiant la biosynthèse des *N*-mannanes chez la levure ont été retrouvés chez *A. fumigatus*. Des orthologues MNN9, VAN1 et ANP1 ont également été identifiés et sont impliqués dans la synthèse des α-mannanes linéaires chez la levure.

Un récapitulatif des enzymes impliquées dans le remodelage pariétal et un schéma de l'organisation potentielle de la paroi mycéliale d'*A. fumigatus* sont présentées dans le tableau 6 et la figure 18.

Tableau 6 : Enzymes impliquées dans le remodelage pariétal

Enzymes	Rôles	Observations
Modifications du β1,3-glucane		
Gel1p (Glucan elongating glucanosyltransferase 1)	Glucanosyltransférase	-Protéine associée à la membrane plasmique via une ancre GPI -Clive une molécule de β1,3-glucane (minimum 10 Glc) et transfère la nouvelle extrémité réductrice générée (>5 Glc) à une autre molécule de β1,3-glucane : élongation -Expression constitutive pendant la croissance mycélienne -Complémente Gas1p chez la levure Δgel1 : pas de modification du phénotype
Gel2p		- Protéine associée à la membrane plasmique via une ancre GPI -Expression constitutive -Même activité que Gel1p Δgel2 :-Croissance ralentie, conidiogénèse anormale, absence de mélanine -Paroi: fraction AS: diminution en galactomannanes fraction AI : diminution en β1,3-glucane et augmentation en chitine -Virulence diminuée
Gel3p		
Gel4p		-Protéine à ancre GPI -Expression constitutive -Essentielle pour la morphogénèse et la viabilité
Gel5p		
Gel6p		
Gel7p		
Bgt1p (1,3-1,6-βglucanosyltransferase 1)	Glucanosyltransférase	-Clive du laminaribiose à partir de l'extrémité réductrice du β1,3-glucane transformant le glucane

© 2015 Tous droits réservés.

doc.univ-lille1.fr

		restant en un β1,3-glucane accepteur avec une liaison β1,6 formant un pli dans la molécule linéaire -δBgt1 : pas de modification du phénotype -Rôle potentiel dans la nutrition du champignon
Bgt2p		-Relâche comme Bgt1p du laminaribiose mais le transfert a lieu sur le C-6 d'un groupe interne de l'accepteur : formation d'une branche latérale liée en β1,6 sur une chaîne de β1,3-glucane - δbgt2 : pas de modification du phénotype
Eng1	Endoglucanase	- Formation d'extrémités réductrices ou non-réductrices - δeng1 : pas de modification du phénotype
Eng2		-Protéine GPI -Activité transférase sur des substrats de faible DP -δeng2 : pas de modification du phénotype donc pas de rôle morphogénétique+ incapacité à dégrader le β1,3-glucane de la fraction AI
Modifications de la chitine		
Chitinases fongiques/de plantes (5) : classe A		-Pas de rôle morphogénétique mais implication dans la fourniture d'énergie -ChiA1p : protéine GPI
Chitinases fongiques/bactériennes (6) : classe B		-Rôle dans la digestion de la chitine exogène -ChiB1p : chitinase sécrétée
Chitinases spécifiques des champignons filamenteux (6) : classe C		
AFUA_8G05020	Chitobiase	
AFUA_6G10430	Chitine déacétylase	-Protéine GPI potentielle
AFUA_4G09940		
Biosynthèse de l'α1,3-glucane		
AGS1	α1,3-glucane synthase	- Localisation en périphérie de la cellule en connexion avec la paroi -δags1 : Diminution du contenu en α1,3-glucane de 50%, Conidiogénèse réduite, Morphologie des hyphes altérée (mauvaise polarité, apex dichotomiques)
Modifications del'α1,3-glucane		
9 α1,3 glucanases	Endoglucanase	-AFUA_8G06030: protéine potentiellement GPI

© 2015 Tous droits réservés.

doc.univ-lille1.fr

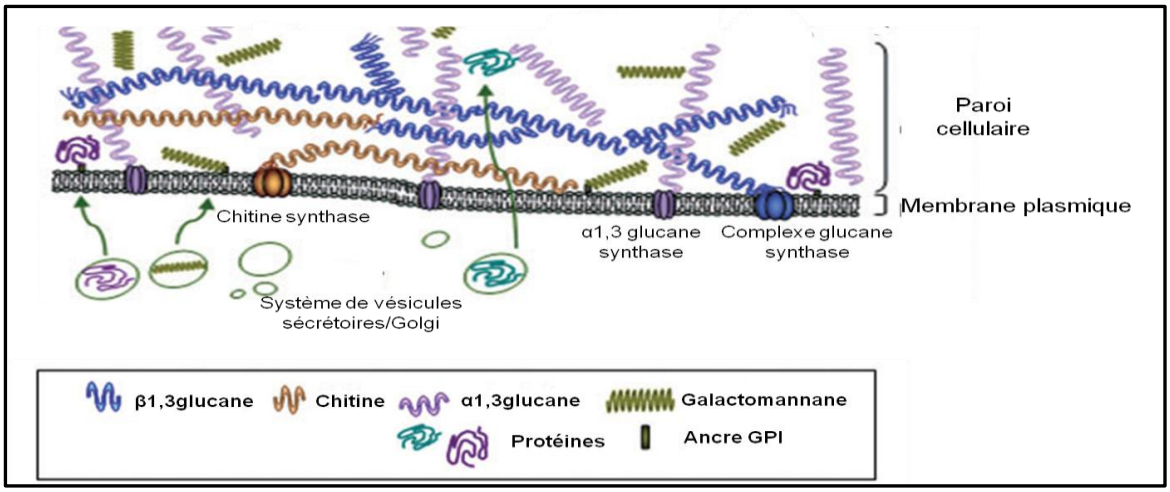


Figure 18: Schéma récapitulatif de l'organisation de la paroi cellulaire d'*Aspergillus fumigatus* (modifié d'après Latgé J.P. *et al.*, 2010)

IV. Le pathway d'intégrité pariétale (CWI)

La paroi fongique peut subir différents stress (osmotique, thermique, oxydatif, morphogénèse, drogues…) pouvant influer sur son intégrité. Afin de contrecarrer ces agents perturbateurs et de maintenir cette intégrité, il existe une voie de signalisation CWI (Cell Wall Integrity) faisant intervenir une cascade de MAP Kinases dont les gènes-cible sont impliqués dans la biosynthèse de la paroi cellulaire. Cette voie de signalisation comprend Bck1 (MAPKKK), Mkk2 (MAPKK) et MpkA (MAPK). En cas de stress, ces kinases s'activent par phosphorylation. Chez *S. cerevisiae*, ce « CWI pathway » a été bien étudié et un modèle a été proposé chez *A. fumigatus* (Fig.19). En effet, au niveau de la membrane, il existe 5 « capteurs » : Wsc1, Wsc2, Wsc3, Mid2 et Mtl1 dont on retrouve les homologues chez *A. fumigatus*.

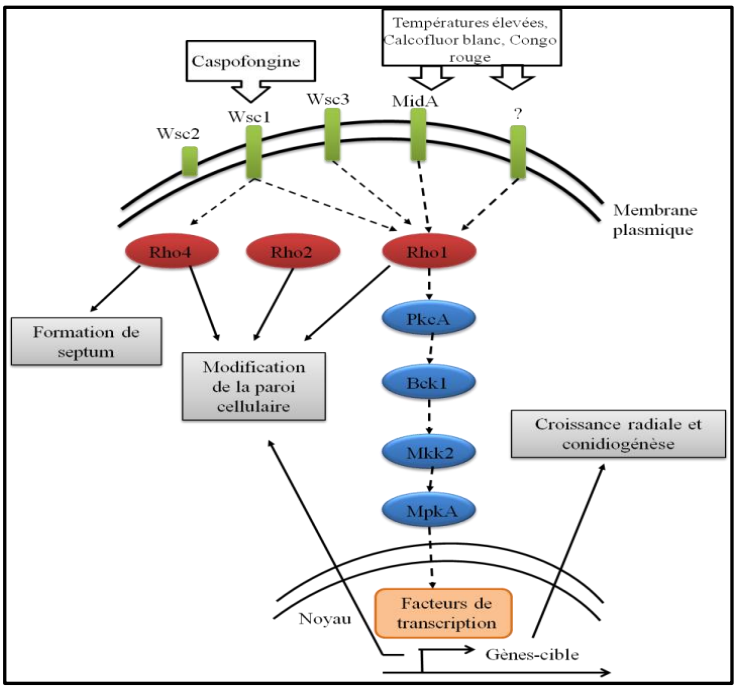


Figure 19: Modèle de la voie de signalisation du CWI chez *Aspergillus fumigatus*. Les lignes en pointillées indiquent une transduction du signal hypothétique. (d'après Dichtl K. *et al.*, 2012)

© 2015 Tous droits réservés.

doc.univ-lille1.fr

Les protéines Wsc d'*A. fumigatus* présentent une structure générale constituée d'un domaine N-ter WSC (Wall Stress Component) suivi d'une région riche en sérine et thréonine, d'un domaine transmembranaire et d'une queue cytosolique (sauf pour Wsc2). Wsc1-3 et MidA sont localisées à la surface membranaire ainsi qu'au niveau des septa. Quant aux protéines Rho, elles sont retrouvées à l'extrémité hyphale pour Rho1 et Rho3, dans le cytosol pour Rho2 et au niveau du septum pendant sa formation pour Rho4. Suite à un stress pariétal, les différents senseurs vont transmettre le signal à Rho1, GTPase requérant une protéine GEF (Guanine nucleotide exchange factor) pour l'activer sous sa forme GTP. Ce facteur d'échange est Rom1/2 chez *S. cerevisiae*, on trouve un homologue à ces protéines chez *A. fumigatus* qui est Rom2. Rho1 peut ensuite activer la cascade MAPK (Mitogen-activated protein kinase) de signalisation dépendante de PkcA. Ce module de MAPK est composé de Bck1 (MAPKKK) qui va phosphoryler Mkk2 (MAPKK) qui, quant à elle, phosphoryle MpkA (MAPK). Cette dernière va activer des facteurs de transcription induisant des gènes impliqués dans la biogénèse et l'organisation de la paroi. (Fig.20)

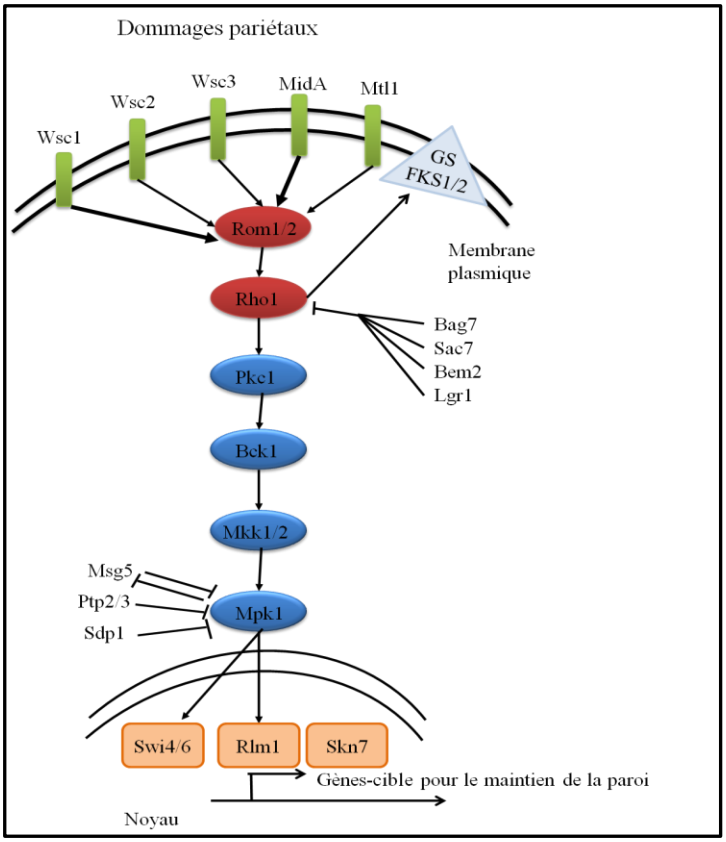


Figure 20: Schéma du « CWI pathway » chez *S. cerevisiae* (modifié d'après Levin D.E., 2005)

Parmi les gènes régulés, on peut trouver ceux codant pour Gel1p, l'α1,3glucanase et d'autres protéines associées à la paroi, des catalases et de SOD pour la résistance aux ROS. Enfin, MpkA régule l'expression de gènes notamment impliqués dans la production de pyomélanine, de gliotoxine ou encore dans la biosynthèse de sidérophores. (Jain R. *et al.*, 2011)

© 2015 Tous droits réservés.

doc.univ-lille1.fr

Il reste à déterminer quelles sont les phosphatases qui vont atténuer la transduction du signal quand la réponse aux dommages pariétaux est émise. Ce seront sûrement des homologues à celles trouvées chez *S. cerevisiae* telles que Bag7, Sac7, Bem2, Lgr1, Msg5, Ptp2/3et Sdp1.

V. La paroi conidiale

Les conidies sont le résultat de la reproduction asexuée d'*Aspergillus fumigatus*. Leur paroi cellulaire est la première structure à entrer en contact avec la matrice extracellulaire de l'hôte d'où l'intérêt de connaître la composition de celle-ci afin de définir de nouvelles cibles pour la synthèse d'agents anti-fongiques. Cela a fait l'objet de très peu d'études. La paroi conidiale est composée de 2 couches :

-une couche externe « opaque aux électrons » hydrophobe composée de mélanine et de protéines disposées de façon régulière en bâtonnets.

-une couche interne « transparente aux électrons » contenant des polysaccharides comme pour le mycélium. (Fig.21)

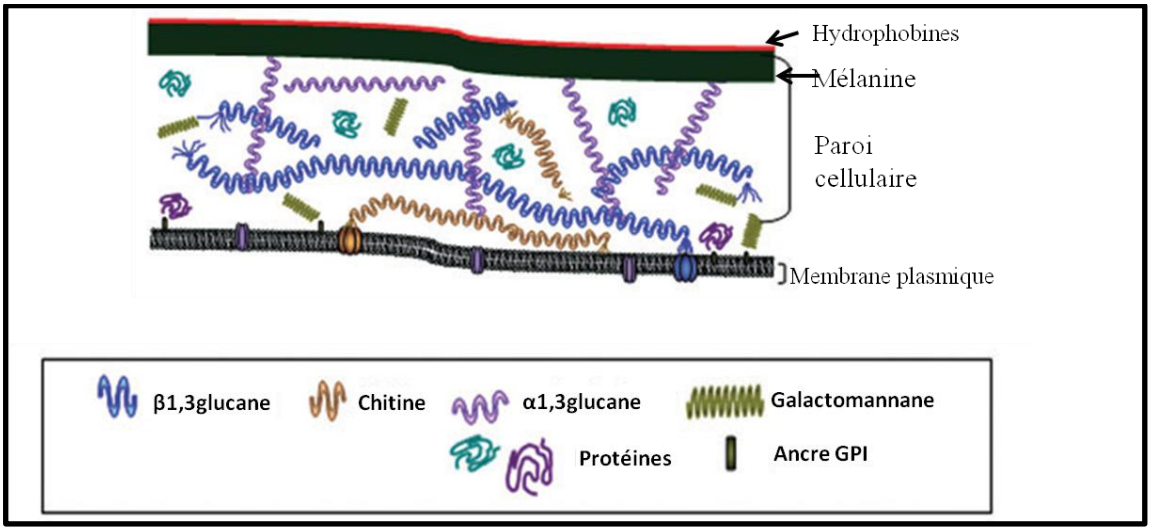


Figure 21: Organisation probable de la paroi conidiale d'*Aspergillus fumigatus* (d'après Latgé J.P., 2010)

A) La couche interne de la paroi conidiale

Comme pour la paroi du mycélium, elle a subi un traitement alcalin permettant l'obtention d'une fraction alcalino-insoluble et une fraction alcalino-soluble. La composition en monosaccharides a été déterminée et les résultats sont les suivants (Tableau 7) :

© 2015 Tous droits réservés.

doc.univ-lille1.fr

Tableau 7 : Composition en monosaccharides des fractions alcalino-insoluble et alcalino-soluble des parois conidiale et mycélienne. Les résultats sont exprimés en % d'oses. (*d'après Maubon D. et al., 2006*)

Mycélium	Fraction alcalino-insoluble	Fraction alcalino-soluble
Glucose	30+/-6	42+/-1
Mannose	2+/-2	0,9+/-0,3
Galactose	3+/-3	0,5+/-0,5
N-acétylglucosamine	13+/-2	0
Glucosamine	4+/-1	0
Galactosamine	4+/-1	2,3+/-0,5

Conidie en dormance	Fraction alcalino-insoluble	Fraction alcalino-soluble
Glucose	38 +/-3	19+/-0,3
Mannose	16+/-0,5	9,4+/-3
Galactose	10+/-1	4+/-0,3
N-acétylglucosamine	1,7+/-0,13	0,3+/-0,2
Glucosamine	3,9+/-0,3	0,2+/-0,1

Ces résultats suggèrent que la paroi conidiale serait moins riche en α1,3-glucane et en chitine mais il y aurait plus de galactomannanes. L'absence de galactosamine suggère qu'il n'y aurait pas de galactosaminogalactane dans la paroi des conidies en dormance, polysaccharide que l'on retrouve dans le mycélium et dans les conidies germantes (Fontaine T. *et al.*, 2011).

Dans une autre étude, le contenu relatif en galactomannanes a été mesuré par EIA (enzyme immunoassay) dans des fractions alcalino-soluble et alcalino-insoluble de paroi de conidies dormantes, gonflées et germées. Il est apparu que la quantité en galactomannanes était la plus abondante et en quantité comparable dans les fractions AS et AI des conidies germées (Tableau 8) (Chai L.Y.A. *et al.*, 2010).

Tableau 8 : Quantité relative de galactomannanes à partir de 0,01mg/ml des fractions alcalino-soluble (AS) et alcalino-insoluble (AI) mesurée par EIA dans la paroi de la conidie aux 3 stades : Dormance, gonflement et germination. (*d'après Chai L.Y.A. et al., 2010*)

Mean Galactomannan Index (GMI) :		
Dormance	Gonflement	Germination
AS 4,26 +/-0,06	AS 4,3+/-0,18	AS 9,13+/-0,11
AI 1,28+/-0,00	AI 7,66+/-0,18	AI 8,28+/-0,05

La germination des conidies peut se décomposer en 4 phases : fin de dormance, gonflement, établissement d'une polarité cellulaire et formation d'un tube germinatif. Lorsque la conidie gonfle, la couche externe disparaît, découvrant ainsi la couche polysaccharidique dont les α1,3-glucanes responsables de l'agrégation des conidies gonflées (*Fontaine T. et al., 2010*). En effet, lors de la germination de celle-ci, la couche externe de mélanine et d'hydrophobines disparaît, démasquant ainsi

© 2015 Tous droits réservés.

l'α1,3-glucane à la surface de la paroi. Un traitement avec une α1,3-glucanase peut inhiber cette interaction cependant le mécanisme impliqué dans le phénomène de reconnaissance α1,3-glucane-α1,3-glucane demeure inconnu. Cette agrégation de conidies n'est pas un phénomène commun à tous les champignons même si cela est connu depuis longtemps. En effet, les espèces possédant des Agsp et donc potentiellement de l'α1,3-glucane peuvent s'agglutiner contrairement à celles qui en sont dépourvues. Chez la levure *C. neoformans*, l'α1,3-glucane permet l'ancrage de la capsule à la paroi et les cellules du mutant déficient en capsule s'aggrégent suggérant un rôle de l'α1,3-glucane dans ce phénomène (Fontaine T. *et al.*, 2010). L'α1,3-glucane aurait donc plutôt un rôle de ciment pour les autres composants pariétaux sans ancrer ou masquer les molécules de surface qui jouent un rôle potentiel dans la pathogénicité.

B) La couche externe de la paroi conidiale

La couche externe de la paroi conidiale d'*A .fumigatus* est constituée de DHN (dihydroxynaphtalène)-mélanine et de petites protéines hydrophobes appelées hydrophobines disposées en bâtonnets donnant un aspect échinulé à la paroi (Fig.22).

Figure 22: Surface conidiale (d'après Aimanianda V. *et al.*, 2010)

1) La mélanine

La mélanine n'est pas une seule substance à proprement parler mais constitue un large groupe de diverses molécules ayant des propriétés similaires. Les mélanines ont longtemps étaient définies par leur résistance à la dégradation par les acides forts ou par les solutions alcalines concentrées. Elles sont formées par polymérisation de composés phénoliques ou indoliques et sont insolubles dans l'eau ou les solvants organiques. La mélanine est un pigment hydrophobe noir ou marron chargé négativement considéré comme un facteur de virulence important protégeant *A. fumigatus* contre les défenses de l'hôte. On trouve de la mélanine aussi bien chez les champignons pathogènes humains et phytopathogènes que chez les non-pathogènes. Chez les phytopathogènes, elle a un rôle essentiel dans la turgescence des appressoria des plantes pour pénétrer dans les feuilles. Concernant les pathogènes, elle a principalement un rôle de protection vis-à-vis de la réponse immunitaire de l'hôte. Il existe deux types principaux de mélanine synthétisés par deux voies différentes : la DOPA-mélanine caractéristique de *Cryptococcus neoformans* et la DHN-mélanine caractéristique des conidies d'*A. fumigatus* (Langfelder K. *et al.*, 2003). Cette DHN-mélanine est le résultat de la polymérisation du 1,8-DHN et serait nécessaire à l'assemblage correct de la paroi. La synthèse de la DHN-mélanine met en jeu six gènes : ALB1, AYG1, ARP1, ARP2, ABR1 et ABR2 exprimés pendant la conidiogénèse (Fig.23). Des mutants pour les gènes ALB1 et ARP2 ont été étudiés. Le mutant ALB1 n'avait pas de pigmentation alors que le mutant ARP2 avait une teinte brune. La paroi de ces mutants était lisse prouvant une perte de la couche externe avec ses hydrophobines et de son

© 2015 Tous droits réservés. doc.univ-lille1.fr

arrangement si particulier. L'étude a montré que les mutants ALB1 étaient moins virulents que la souche WT dans des modèles murins d'aspergillose. La délétion d'ARP2 n'entraînait pas de diminution de la virulence dans les modèles murins d'infection intranasale. *In vitro*, la mélanine a une action protectrice vis-à-vis de la phagocytose et des ROS. Il a été aussi observé lors de cette étude une augmentation de la capacité de liaison à la fibronectine (MEC) mais aussi une diminution de celle à la laminine chez les mutants prouvant donc que certaines adhésines fongiques se situent dans les « ornementations » de la paroi de la conidie en dormance. Cependant, les relations entre la mélanine et les différents composants de la paroi fongique ne sont pas encore définies (Pihet M. *et al.*, 2009).

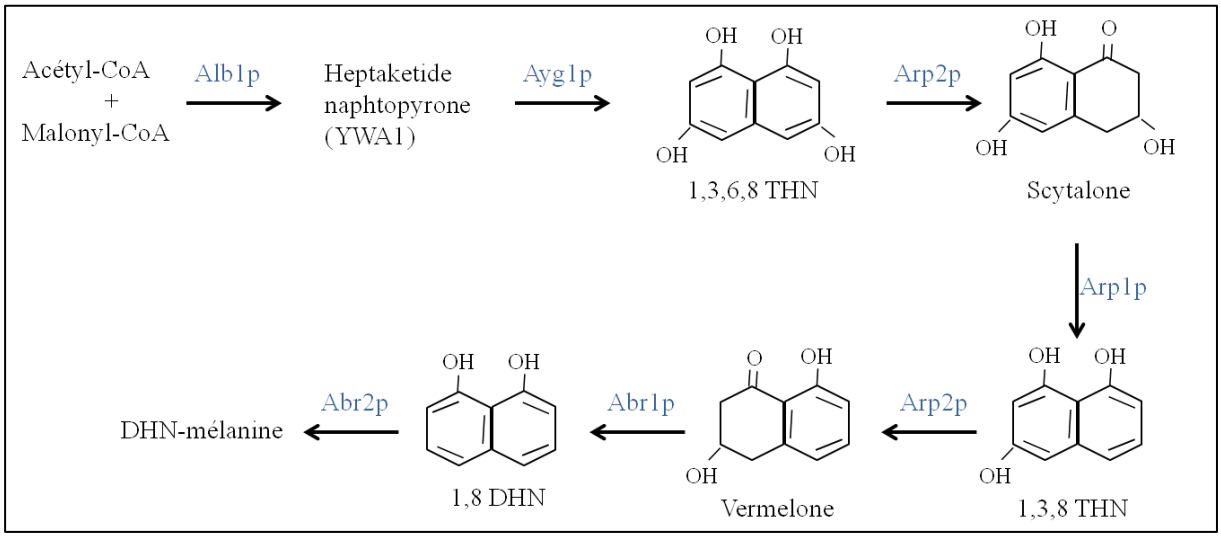


Figure 23 : Schéma de la biosynthèse de la DHN-mélanine (d'après Pihet M. *et al.*, 2009)

2) *Les hydrophobines*

Les hydrophobines sont le deuxième constituant important de la couche externe de la paroi conidiale. Elles appartiennent à une famille de protéines de faible poids moléculaire (<20kDa) caractérisées par huit résidus de cystéines conservés formant quatre ponts disulfure. Chez *A. fumigatus*, on trouve deux hydrophobines : RodAp (protéine GPI) et RodBp. Il existerait quatre autres gènes qui coderaient ce type de protéines. Ces hydrophobines disparaissent avec le gonflement de la conidie jusqu'à totalement disparaître à la germination et sont donc absentes de l'hyphe. Le gène RODA d'A. *fumigatus* partage 85 % de similarité avec celui d'*A. nidulans*. RodA a une masse moléculaire de 16 kDa et RodBp a une masse de 14 kDa. Les hydrophobines sont insolubles dans le SDS mais solubles dans le TFA (Paris S. *et al.*, 2002). Les mutants pour les gènes codant ces protéines ont été étudiés. Sur le mutant δRodA, on observait la perte de la couche en bâtonnets, les conidies devenaient hydrophiles et les mutants perdaient leur capacité à disperser les conidies mais gardaient leur virulence dans un modèle murin d'infection. (Thau N. *et al.*, 1994)

Quant au mutant δRodB, il n'affichait pas de modifications morphologiques particulières, il a été observé une couche de « bâtonnets » semblable à celle d'une souche WT signifiant ainsi que δRodB n'est pas nécessaire à la formation des « bâtonnets ». Un double mutant δRodAδRodB a été construit

© 2015 Tous droits réservés. doc.univ-lille1.fr

et affichait une surface amorphe lisse suggérant que RodB a un rôle dans la structure de la paroi conidiale. Le double mutant est plus sensible à l'attaque de macrophages alvéolaires. Les hydrophobines auraient donc un rôle protecteur contre les ROS produits par ces macrophages. (Paris S. *et al.,* 2002)

Ces hydrophobines évitent la reconnaissance par le système immunitaire de l'hôte en masquant les antigènes (β-glucane, α-glucane et galactomannanes) qui pourraient déclencher une réponse fatale à la survie du champignon. En effet, un traitement chimique par de l'acide hydrofluorique permet d'ôter cette couche d'hydrophobines mettant à découvert la paroi interne constituée de polysaccharides déclenchant la réponse immunitaire et de protéines à caractère antigénique qui vont être sécrétées. La réponse immunitaire est alors déclenchée au détriment de la survie du champignon. Les réactions inflammatoires qui en découlent peuvent être aussi préjudiciables pour l'hôte lui-même en menant à la mort des phagocytes et à la nécrose des tissus. Cela peut déclencher la croissance fongique dans le parenchyme pulmonaire.

Des expériences sur le potentiel immuno-stimulateur de RodAp ont été effectuées et se sont révélées négatives comme l'a prouvé le manque d'activation des cellules dendritiques (DC), l'absence d'expression de cytokines par les DC humains et les macrophages alvéolaires murins *in vitro* ainsi que l'incapacité à activer les réponses des cellules T *in vivo*. RodAp n'est pas dégradée par les cathepsines L et S phagolysosomales montrant sa résistance au clivage protéolytique et donc son inertie immunologique (Aimanianda V.*et al.,* 2009 ; Aimanianda V. et Latgé J.P., 2010).

C) Ecm33p et CspA : deux protéines pariétales importantes dans le maintien de l'intégrité de la paroi conidiale

1) Ecm33p

Ecm33p est une protéine à ancre GPI de masse apparente 55kDa. Ecm33p aurait un rôle potentiel dans l'assemblage de la paroi. Le gène ECM33 appartient aux familles SPS2 de *S. cerevisiae* et meu10 de *S.pombe* qui jouent un rôle dans la sporulation, et plus particulièrement dans la formation de la paroi des ascospores chez ces deux espèces de levure. La délétion d'ecm33 entraîne une augmentation du diamètre de la conidie (x1,6). On observe également une augmentation du contenu en chitine (x3) ainsi qu'un défaut dans la séparation des conidies qui serait due à une mauvaise localisation de la couche de glucane. Le mutant apparaît plus sensible aux inhibiteurs de chitine synthase (ex : Polyoxine D et Nikkomycine Z). Par ailleurs, les conidies ne sont plus viables après un stockage de 2 mois à température ambiante sans aération. De plus, les conidies de cette souche mutante sont plus résistantes à l'attaque des macrophages alvéolaires et aux polymorphonucléaires neutrophiles par rapport à une souche WT alors les tubes germinatifs des mutants sont plus sensibles aux neutrophiles (Chabane S. *et al.*,2006).

© 2015 Tous droits réservés. doc.univ-lille1.fr

2) *Cell surface protein A (CspA)*

CspA (Cell surface protein A) est une protéine pariétale glycosylée de masse moléculaire de 75 kDa ancrée par une ancre GPI pouvant être extraite par un traitement à l'acide hydrofluorique. CspA est démasquée pendant la germination de la conidie et est exprimée pendant la croissance hyphale. La délétion du gène entraîne une germination plus rapide et une diminution de l'adhérence des conidies dormantes à la matrice extracellulaire de cellules pulmonaires murines. La paroi du mutant δcspA est aussi moins épaisse. Sa surexpression augmente la résistance de la conidie aux enzymes de dégradation et inhibe sa germination. Il a été montré que CspA interagissait avec Ecm33p et Gel2p. Les doubles mutants δCspAδEcm33 ou δCspAδgel2 entraînent une désorganisation de la paroi conidiale menant à l'exposition des couches sous-jacentes de β-glucane et de chitine. Par marquage avec des lectines-FITC puis analyse par cytométrie en flux, il a été observé que les quantités de chitine, glucane et de mannanes augmentaient chez ces doubles mutants par rapport à une souche WT. CspA est nécessaire au maintien d'une architecture correcte de la paroi. Trois autres gènes codant des CWP (Cell Wall Protein)-GPI potentielles : AFUA_2G05150 (MP-2) ; AFUA_4G09600 et AFUA_6G14090 pourraient aussi être impliqués dans le maintien de cette intégrité pariétale (Ledvansky E. *et al.*, 2010).

© 2015 Tous droits réservés.

doc.univ-lille1.fr

Contexte du travail de thèse

Les infections fongiques invasives forment aujourd'hui un des groupes de pathologies infectieuses les plus graves en santé humaine. Les deux espèces les plus représentées chez les patients immunodéprimés dans nos pays industrialisés sont *Candida albicans* et *Aspergillus fumigatus*. La mortalité due aux mycoses invasives causées par ces deux champignons est en constante augmentation. Leur morbidité entraîne des prolongations de séjour hospitalier et le coût des traitements antifongiques croît régulièrement dans tous les hôpitaux européens et nord-américains.

Depuis plus de 10 ans maintenant, *A. fumigatus* est la cause d'un nombre croissant de décès à l'hôpital. Cette situation est associée à l'augmentation du nombre des patients à risque consécutivement :

(1) au développement de chimiothérapies de plus en plus drastiques pour combattre les cancers,

(2) à l'augmentation du nombre de transplantations d'organes (évalué à 500 000 par an dans le monde),

(3) à l'utilisation croissante de traitements immunosuppresseurs pour traiter les maladies auto-immunes et (4) à la persistance d'infections au VIH.

La paroi du champignon qui est essentiellement constituée de polysaccharides et de protéines est le lieu privilégié des échanges entre la cellule et l'hôte. Elle est indispensable à l'intégrité de la cellule fongique en jouant un rôle essentiel dans la résistance aux agressions externes et en particulier aux défenses des cellules immunitaires de l'hôte. L'étude de la paroi ou des mécanismes qui participent à son élaboration fait donc aujourd'hui l'objet de nombreuses études fondamentales et appliquées. La biosynthèse de la paroi est un processus biochimique extrêmement complexe. Contrairement à une opinion généralement admise jusqu'à ce jour, elle ne doit plus être considérée comme un squelette inerte mais plutôt comme une organelle dont la composition et la localisation des polymères constitutifs varient aux différents stades du cycle biologique (Bernard et Latgé, 2001 ; Latgé, 2010). Seules des approches globales et multidisciplinaires permettront de mieux appréhendrer l'ancrage et l'établissement du réseau tridimensionnel polysaccharidique extrêmement complexe de la paroi.

Le partenariat Sanofi-Aventis-Aviesan s'est entendu pour focaliser sa recherche sur les étapes précoces de l'infection. Le processus de germination de la conidie, une étape incontournable dans le développement du pathogène, sera étudié avec emphase sur l'étude de la paroi cellulaire qui est spécifique aux champignons et reste un réservoir de cibles pour des agents antifongiques.

Nous avons également étudié un second pathogène des voies respiratoires, *P. aeruginosa*, que l'on retrouve particulièrement chez les individus atteints de mucoviscidose. Ces bactéries interagissent avec des motifs glycanniques du mucus pulmonaire permettant ainsi leur adhésion et la formation de biofilm. L'objectif de ce deuxième travail consiste à determiner s'il existe des ligands préférentiels favorisant l'adhésion des bactéries chez ces individus malades. Cela permettra à terme la synthèse de glycomimétiques empêchant cette adhésion.

© 2015 Tous droits réservés. doc.univ-lille1.fr

Matériels et Méthodes

© 2015 Tous droits réservés.

doc.univ-lille1.fr

I. Préparation des parois des conidies dormantes, gonflées et germées ainsi que des mutants *d'Aspergillus fumigatus*

Après lyophilisation, 100 mg de parois lyophilisées sont traitées par 15 ml d'un tampon composé de Tris-HCl 100 mM pH7,4, d'EDTA 50 mM, de SDS 2% et de β-mercaptoéthanol 40 mM. Ce mélange est incubé 10 min à 100°C puis refroidi avant d'être centrifugé à 4°C pendant 10 min à 10.000*g*. Le surnageant 1 est conservé. Le culot subit une deuxième fois ce traitement puis les surnageants 1 et 2 sont rassemblés. Le culot est ensuite lavé trois fois dans ce même tampon sans SDS et sans β-mercaptoéthanol puis collecté par centrifugation à 4°C pendant 10 min à 10.000*g*. Ce traitement est suivi par trois lavages avec l'eau distillée. Le culot est lyophilisé puis pesé avant de préparer les fractions alcalino-insolubles (AI) et –soluble (AS).

Pour la préparation des fractions AI et AS, le culot subit deux fois le même traitement alcalin. Pour 75 mg de parois résiduelles, 4 ml de NaOH 1 M contenant 500 mM de $NaBH_4$ sont ajoutés au culot puis le mélange est incubé 30 min à 65°C et refroidi sur glace avant centrifugation à 4°C pendant 15 min. Les deux surnageants correspondant à la fraction AS sont rassemblés et neutralisés avec de l'acide acétique puis sont dialysés contre H_2O dans des boudins de dialyse avec un seuil de coupure de 1000 Da. A la fin de la dialyse, la fraction AS est centrifugée et le culot lyophilisé puis pesé. Concernant la fraction AI, elle est lavée à l'eau distillée jusqu'à obtention d'un pH neutre et est également lyophilisée puis pesée.

II. Production de LamA (endo-β1,3-glucanase de *Thermogota neapolitana*) pour la digestion de la fraction AI.

Une pré-culture de la souche *E.coli* possédant le vecteur d'expression de la LamA est réalisée dans 50 ml de milieu LB (Tryptone Peptone 10 g/L ; Yeast Extract 5 g/L ; NaCl 5g/L) contenant 2,5 mg d'Ampicilline et 2,5 mg de kanamycine à 37°C sous agitation pendant une journée.

Cette pré-culture sert à ensemencer à une DO_{600}=0,01 une culture effectuée dans 500 ml de LB contenant 25 mg d'ampicilline et 25 mg de kanamycine. La DO_{600} est monitorée jusqu'à atteindre une valeur comprise entre 0,55 et 0,6 puis l'expression de la LamA est induite pendant 4 heures par de l'IPTG à une concentration finale de 1 mM à partir d'une solution-stock à 100 mM.

La culture d'*E.coli* est ensuite centrifugée à 12.000 rpm pendant 10 min et le culot lavé 2 fois à l'eau puis stocké à -20°C jusqu'à la lyse.

Le culot bactérien est lysé dans 15-25 ml de tampon imidazole-acétate 50 mM, pH7,5 contenant du lysozyme à 0,2 mg/ml et de la DNaseI à 50 µl/ml. La lyse dure 30 min à 4°C avec des agitations régulières au vortex. L'extrait est soumis aux ultrasons à raison de quatre pulses de 30 secondes puis du Triton X100 est ajouté à une concentration finale à 0,1%. L'extrait est placé à 4°C pendant 45 min avant centrifugation à 12.000 rpm pendant 10 min et transfert du surnageant en tube falcon. Un aliquot de 20 µl est alors prélevé en vue d'effectuer une séparation et détection des protéines par SDS-PAGE.

© 2015 Tous droits réservés. doc.univ-lille1.fr

La « purification » de la LamA est effectuée à l'aide d'une colonne échangeuse d'anions DEAE-Sepharose-FF. Pour cela, la colonne est, dans un premier temps, équilibrée dans le tampon imidazole-acétate 50 mM, pH7,5 (tampon A). L'extrait est ensuite chargé sur la colonne. Le gradient d'élution débute par un mélange 100% A-0% B (tampon B : tampon NaCl 1 M en imidazole-acétate 50 mM, pH7,5) jusqu'à 50% A-50% B à un débit de 1 ml/min. Enfin, le gradient est augmenté à 100% B en 10 min.

A partir des fractions collectées, on effectue un SDS-PAGE afin de détecter la présence de LamA. La révélation s'effectue au Bleu de Coomassie. Si la révélation s'avère peu concluante, il est possible de déterminer les fractions contenant l'activité endoglucanase par un dosage au PABA.

Pour ce test d'activité, 2,5 µl d'échantillon sont prélevés (une fraction sur trois) auquel sont ajoutés 10 µl de laminarine réduite à 4mg/ml et 100µl de tampon NaOAc (acétate de sodium) à 0.5M pH5,5. Le mélange est incubé 10 min à 37°C. Puis 900 µl de réactif PABA sont ajoutés au mélange qui est incubé 10 min à 100°C. La DO_{405} est lue sur plaque ELISA 96 puits (200 µl par puit). Le blanc est effectué avec 10 µl de laminarine réduite et 990 µl de PABA.

Le PABA est préparé de la manière suivante pour 100 ml : 0,63 g de sodium sulfite sont dissous dans 20 ml d'eau milliQ puis sont ajoutés 5ml de NaOH 5M, 5 ml Citrate de sodium 0,5M, 5 ml de chlorure de calcium 0,2M et de l'eau qsp 100ml. Quand le mélange est homogène, 1 g de PABA est ajouté. Pour tester le réactif PABA, un tube avec 1 ml de PABA et un tube avec 990 µl de PABA et 10 µl de solution de glucose à 1 mg/ml sont incubés 10 min à 100°C puis la DO_{405} est mesurée. Le tube contenant le glucose devient jaune et sa DO atteint environ 1,6.

Les fractions contenant l'activité enzymatique de la LamA sont rassemblées afin de doser cette activité. Pour cela, 250µl de laminarine réduite à 4mg/ml, 730µl de tampon NaOAc 0,5M, pH5,5 et 20µl de LamA diluée au 1/10è sont placé à 37°C. Une cinétique est effectuée en prélevant 100µl de ce mélange réactionnel au temps T0, T5 min, T10 min et T20 min auxquels seront ajoutés 900 µl de PABA avant une incubation de 10 min à 100°C. En parallèle, une gamme étalon de glucose est préparée : 0, 2, 5 et 10 µg de glucose.

Les DO_{405} de la gamme étalon et des échantillons sont lues sur plaque ELISA 96 puits. L'activité enzymatique sera exprimée en µmol d'équivalent glucose/min/µl d'enzyme.

III. Digestion de la Fraction AI par la LamA

Les fractions alcalino-insolubles (AI) subissent 3 cycles de digestion afin de dégrader au maximum le β1,3-glucane. Pour cela, pour 5U de LamA sont incubées avec 10mg de fraction AI pendant 4 jours à 37°C dans un tampon acétate de sodium 500 mM, pH5,5. A la fin des cycles de digestion, l'enzyme est inactivée pendant 5 min à 100°C. Les échantillons sont ensuite centrifugés pendant 5 min à 13000 rpm afin de récupérer les surnageants contenant les produits de dégradation de l'enzyme. Le culot est

© 2015 Tous droits réservés. doc.univ-lille1.fr

lavé 3 fois avec de l'H_2O, les surnageants sont rassemblés. Les surnageants sont ensuite dessalés sur une colonne Carbograph qui est équilibrée avec de l'ACN 80%-ATFA 0,1% puis avec de l'H_2O-0,1 % ATFA. L'échantillon est ensuite déposé et l'élution se fait avec 3ml d'ACN 50%-0,1% ATFA et 1ml d'ACN 80%-0,1% ATFA.

IV. Production de ChiA recombinante (ChitinaseA de *Serratia marcescens*) pour la digestion de la fraction AI

Une pré-culture de la souche *E.coli* possédant le vecteur d'expression de la ChiA est réalisée dans 50 ml de milieu LB contenant 2,5 mg d'Ampicilline et 2,5 mg de kanamycine à 37°C sous agitation pendant deux jours.

Cette pré-culture sert à ensemencer à une DO_{600}=0,4 une culture effectuée dans 500 ml de LB. La DO_{600} est monitorée jusqu'à atteindre une valeur comprise entre 0,8 et 0,9 puis l'expression de la ChiA est induite pendant 4 heures par de l'IPTG à une concentration finale de 1 mM à partir d'une solution-stock à 100 mM.

La culture d'*E.coli* est ensuite centrifugée à 12.000rpm pendant 10 min et le culot lavé deux fois à l'eau puis stocké à -20°C jusqu'à la lyse.

Le culot bactérien est resuspendu au vortex dans 25 ml de tampon de lyse (150 mM Imidazole-HCl pH7) à 4°C. La lyse est ensuite effectuée sous ultrasons à raison de quatre pulses de 30s puis du Triton X100 est ajouté à une concentration finale de 1 %. L'extrait est placé à 4°C pendant 45 min avant centrifugation à 3600 rpm pendant 10 min et transfert du surnageant en tube falcon. Un aliquot de 20 µl est alors prélevé en vue d'effectuer une détection des protéines par SDS-PAGE.

La ChiA est ensuite purifiée par colonne Ni-NTA-sépharose. Deux mL de billes sont répartis dans deux eppendorfs et centrifugés 2 min à 0,8 rpm. Le surnageant est ôté puis les billes sont lavées trois fois avec le tampon B (20mM Na_2HPO_4 + 0,5M NaCl) 2 min à 0,8 rpm. Les billes sont ensuite transférées dans l'extrait bactérien et mises sur roue pendant 3 h à 4°C puis centrifugation 10 min à 800 rpm. Le surnageant est éliminé.

Les billes sont lavées trois fois avec 1 ml de tampon de lavage pH6 (Sodium Phosphate 20mM, NaCl 500mM) avec des centrifugations intermédiaires (2 min, 0,8 rpm).

La chitinase A contenue dans chaque tube Eppendorf est éluée par 1 mL de tampon contenant 500 mM d'imidazole, sous agitation sur roue pendant 1h à 4°C. Les billes sont éliminées par centrifugation pendant 5 min à 10.000 rpm. Un aliquot de 20 µl est alors prélevé en vue d'effectuer une détection des protéines par SDS-PAGE.

V. Digestion de la fraction AI résistante à la LamA par la ChiA

Les fractions alcalino-insolubles (AI) résistantes à la LamA subissent 2 cycles de digestion afin de dégrader la chitine. Pour cela, pour 1 mg de protéines issues de la purification de la ChiA sont incubées avec 10 mg de fraction AI pendant 5 jours à 37°C dans un tampon acétate de sodium 1 M,

© 2015 Tous droits réservés. doc.univ-lille1.fr

pH5,5-6. A la fin des cycles de digestion, l'enzyme est inactivée pendant 5 min à 100°C. Les échantillons sont ensuite centrifugés pendant 5 min à 13000 rpm afin de récupérer les surnageants contenant les produits de dégradation de l'enzyme. Le culot est lavé 3 fois avec de l'H_2O, les surnageants sont rassemblés et dessalés sur une colonne Carbograph.

VI. Digestion de la fraction AI résistante à la ChiA par la Chitosanase

Les fractions AI résistantes à la ChiA sont digérées par une chitosanase de *Streptomyces griseus* commerciale (Sigma) à raison de 3µl d'enzyme pour 5 mg de paroi dans un tampon phosphate à 0,1 M, pH7,8 à 37°C pendant 24h. A la fin de la digestion, l'enzyme est inactivée pendant 5 min à 100°C. Les échantillons sont ensuite centrifugés pendant 5 min à 13000 rpm afin de récupérer les surnageants contenant les produits de dégradation de l'enzyme. Le culot est lavé 3 fois avec de l'H_2O, les surnageants sont rassemblés et dessalés sur une colonne Carbograph.

VII. Digestion de la fraction AI résistante à la Chitosanase par la lichénase

Les fractions AI résistantes à la Chitosanase sont digérées par une lichenase commerciale (Libios) à raison de 200µl d'enzyme pour 2 mg de paroi dans un tampon phosphate à 20 mM, pH 6,75 à 50°C pendant 24h. A la fin de la digestion, l'enzyme est inactivée pendant 5 min à 100°C. Les échantillons sont ensuite centrifugés pendant 5 min à 13000 rpm afin de récupérer les surnageants contenant les produits de dégradation de l'enzyme. Le culot est lavé 3 fois avec de l'H_2O, les surnageants sont rassemblés et dessalés sur une colonne Carbograph.

VIII. Carboxyméthylation des α1,3-glucanes

La taille moléculaire des polysaccharides de la fraction alcalino-soluble des conidies dormantes, gonflées et germées ainsi que celle des souches mutantes *AGS* est estimée par gel-filtration. Préalablement, les polysaccharides sont carboxyméthylés afin de les rendre solubles. Cinq mg de fraction alcalino-soluble sont suspendus dans 500 µl de NaOH à 1,6N. Puis 150 µg d'acide monochloroacétique (MCA) (dilué dans NaOH 1,6N pour être à un pH 10-11) sont ajoutés à la fraction alcalino-soluble. Les échantillons sont incubés 5 h à 75°C. Puis 300 µg de MCA sont ajoutés et les échantillons sont incubés toute la nuit à 75°C. Le lendemain, les échantillons sont neutralisés par de l'acide acétique et sont dialysés contre eau (seuil de coupure : 1000 Da) puis lyophilisés.

Les polysaccharides carboxyméthylés sont chargés sur une colonne HR500S (1.6 cm x 90 cm) préalablement calibrée avec des dextrans carboxyméthylés de divers poids moléculaires (12.000, 80.000, 410.000 et 1.100.000 Da) dont le débit est réglé à 0,5 ml/min. Des fractions de 2 ml sont collectées. L'élution se fait avec NaOH à 0,2M. Avant d'être déposés sur la colonne, 3 mg de polysaccharides carboxyméthylés sont solubilisés dans 200 µl de NaOH à

© 2015 Tous droits réservés. doc.univ-lille1.fr

0,2 M puis dilués à nouveau pour aboutir à une concentration de 0,2 M en NaOH. Les fractions contenant les sucres sont révélées à l'orcinol sulfurique. Pour cela dans une plaque 96 puits, 50 µl de chaque fraction sont déposés auxquels 200 µl de réactif sont ajoutés avant incubation à 80°C au minimum 1 h. La densité optique est lue à 405 nm.

IX. Formation de protoplastes et régénération

A partir d'un tube malt de 8 jours sur lequel la souche KU80 croît, celle-ci est remise en suspension dans de l'eau tweenée à 0,05 %. La DO_{600} est mesurée sachant qu'une DO_{600} à 0,6 correspond à $2x10^7$ spores par ml. $3x10^8$ conidies sont mises dans 24 ml de milieu de germination (Mannitol 1,2 M (12 ml), Yeast Extract à 4% (6 ml), Glucose à 12% (6 ml)). La culture est mise sous agitation à 37°C à 150 rpm pendant 8 à 9 h en suivant l'apparition de tubes germinatifs par microscopie.
Les spores germées sont ensuite récupérées par filtration sur nylon. Elles sont lavées une première fois à l'eau milliQ puis avec un tampon OM préparé extemporanément (K_2HPO_4 1M (18 ml) ; KH_2PO4 1M (2 ml) ; MgSO4 (59,2 g) qsp 200 ml) dilué au ½. Ces spores germées sont ensuite mises dans 10 ml milieu contenant de l'OM et 300 mg de glucanex (Novodisk, lot KM 629002) et mises sous agitation à 37°C à 60 rpm pendant une heure au minimum en suivant la formation de protoplastes. Pour récupérer les protoplastes, on dilue au 1/5è le milieu OM+glucanex avec du Mannitol 1M et on filtre sur du verre frité n°2. Les protoplastes sont centrifugés pendant 10 min à 3000 rpm (accélération 1-freinage 1 à température ambiante) et le culot résultant est repris par 21 ml de milieu de régénération (Mannitol 1,2 M (15 ml) ; Extrait de levure à 4% (3 ml) ; Glucose à 12% (3 ml)). Ceci-ci est incubé à 37°C sous agitation à 100 rpm. On arrête la régénération des protoplastes aux temps souhaités. Les protoplastes en régénération sont centrifugés à 3500 rpm (Accélération 0-Freinage 0) pendant 5min puis lavés avec du Mannitol 0,6M et de l'eau avant broyage pour la récupération des parois.

X. Préparation et extraction des mucines pulmonaires

Les poumons de patients humains sains, de porcs ainsi que les expectorats de patients atteints de mucoviscidose sont dilués dans un tampon d'extraction des mucines (50:50). Ce dernier est un mélange de chlorure de guanidine 4M et d'inhibiteurs de protéases. Pour 100 mL, il contient 186 mg d'EDTA, 154 mg de Benzamidine, 63 mg de N-Ethylmaléimide, 10 mg d'inhibiteur de la trypsine (Soy bean trypsin inhibitor), 17 mg de PMSF dissous dans 500 µL d'isopropanol, 144 mg de DTT et 20 mg d'azide de sodium. La densité de chaque tube est ensuite ajustée à 1,4 g/mL avec du chlorure de césium en poudre. Puis, une étape d'ultracentrifugation (Beckman Coulter, LE 80K) est réalisée pendant 72 h à 50.000 rpm à 20°C en utilisant un rotor Ti 70.1 (Beckman Coulter).
Les mucines ont une densité comprise entre 1,35 et 1,5 g/mL. Elles sont séparées des autres constituants, dont la densité est différente. Grâce à un collecteur de fractions (BioRad) et une pompe péristaltique, les différents tubes ultracentrifugés sont divisés en fractions de 1 ml.

© 2015 Tous droits réservés. doc.univ-lille1.fr

Pour déterminer quelles fractions contiennent les mucines, la densité des fractions est mesurée par pesée. La densité des mucines se situant entre 1,35 g/mL et 1,50 g/mL, 1 mL de chaque fraction est pesé. Celles se situant dans cet intervalle sont susceptibles de contenir des mucines. Les fractions contenant les mucines sont rassemblées et dialysées contre de l'eau. Les boudins de dialyses utilisés possèdent une valeur seuil de 14000 Daltons (MWCO : 14000). Le bain de dialyse est changé deux fois par jour pendant trois jours. Une fois l'échange osmotique effectué, le contenu des boudins de dialyse est récupéré et lyophilisé.

XI. Composition en monosaccharides des fractions AI, AS et des mucines par triméthylsilylation

Le 1er jour, 100 µg de parois sont prélevés auxquels un standard interne tel que le méso-mannitol est ajouté avant lyophilisation. Le 2ème jour, 500 µl de MeOH/HCl 0,5N sont ajoutés avant une incubation de 18h à 24h à 80°C. Le 3ème jour, une *N*-réacétylation est effectuée. Pour cela, une pointe de carbonate d'argent ainsi que 20µl d'anhydride acétique sont ajoutés à l'échantillon avant agitation au vortex. L'échantillon est alors laissé une nuit à température ambiante à l'obscurité. Le 4ème jour, la phase méthanolique est transvasée dans un tube propre sans prendre la phase solide. 500µl d'heptane est ajouté à cette phase méthanolique qui est alors agitée au vortex avant élimination de l'heptane. Cette opération est effectuée deux fois et permet d'éliminer les acides gras. La phase méthanolique est ensuite séchée sous azote sous flux léger afin de concentrer le produit dans le fond du tube. L'échantillon est ensuite repris par 50 µl de pyridine et 50 µl de BSTFA (Bistrimethylsilyltrifluoroacetamide), et laissé 2 heures à l'obscurité avant injection en chromatographie en phase gazeuse. Toutes les étapes de dérivation se font en conditions anhydres.

XII. Purification des O-glycannes

-β-élimination en milieu réducteur

Les extraits lyophilisés sont dissouts dans une solution de NaOH 0,1M contenant du $NaBH_4$ 1M. La solution est incubée au bain marie à 45°C pendant 20 heures. La réaction est arrêtée par addition d'une résine échangeuse de cations (Dowex 50x8, 20-50 mesh, forme H^+) à 4°C et la solution est ensuite filtrée puis évaporée à sec. L'excédent de sels de borate est éliminé par codistillation avec du méthanol. Les glycannes libérés sont alors sous forme d'oligosaccharide-alditols.

-Chromatographie échangeuse de cations

Les peptides sont éliminés du mélange par passage de la solution sur une colonne de résine échangeuse de cations (Dowex 50x2, 200-400 mesh, forme H^+). Les oligosaccharides sont élués par de l'eau désionisée tandis que les peptides restent fixés sur la résine. La solution obtenue est ensuite

© 2015 Tous droits réservés. doc.univ-lille1.fr

concentrée sous évaporateur rotatif à 40°C puis reprise dans un volume minimal d'eau désionisée et lyophilisée avant perméthylation.

XIII. Perméthylation des O-glycannes de mucines pulmonaires et des oligosaccharides résultant des digestions enzymatiques de la paroi d'*Aspergillus fumigatus*

En conditions anhydres, les échantillons sont dissous dans une solution de perméthylation (200 µl de diméthylsulfoxyde, 300 µl de iodométhane, 1g de NaOH) puis placés sous agitation pendant 2 heures. La réaction de perméthylation est arrêtée avec 1 ml d'acide acétique 5%.

Les échantillons dissous dans l'acide acétique sont filtrés sur colonne de silice HLB Oasis®. Les colonnes sont activées avec 3 ml de méthanol 100% puis équilibrées avec 3 ml d'une solution d'eau/méthanol (95:5). L'échantillon est placé dans la colonne et rincé avec 3 ml d'eau/méthanol (95:5). L'élution est effectuée avec 3 ml de méthanol 100%. L'éluat est mis à évaporer sous azote.

XIV. Analyse des O-glycannes et oligosaccharides purifiés par MALDI-TOF

Les analyses de spectrométrie de masse ont été réalisées sur un spectromètre de masse de géométrie MALDI-TOF-TOF de type Analyzer 4800 (Applied Biosystems/MDS Sciex, Toronto, Canada) équipé d'une source laser. Les échantillons ont été dissous dans un solvant méthanol/eau (50:50) et déposés sur une cible MALDI en addition avec une matrice DHB (acide 2,5-dihydroxybenzoique) à une dilution volume à volume. La puissance du laser appliquée est de 2500 V. Pour chaque structure d'intérêt, l'intensité de pics d'expériences indépendantes a été mesurée. La moyenne de ces intensités et l'écart-type ont été calculés sur cette moyenne.

XV. Perméthylation des Polysaccharides pariétaux de la fraction alcalino-insoluble

Les polysaccharides sont perméthylés pour l'étude des liaisons glycosidiques par GC-MS. Pour cela, les polysaccharides sont, dans un premier temps, peracétylés. Pour 4 mg de polysaccharides lyophilisés, 2 ml de formamide sont ajoutés. L'échantillon est alors agité au vortex et soumis à ultrasons puis 1 ml de pyridine et 1 ml d'anhydride acétique sont ajoutés avant 1h d'incubation à 100°C. L'échantillon est ensuite agité à nouveau au vortex, le tube est bouché avec du parafilm puis mis sous aluminium et sous rotation pour la nuit. Le lendemain, l'échantillon est placé en dialyse contre de l'eau pour deux jours en changeant quatre fois le bain de dialyse puis lyophilisé pour effectuer la perméthylation. Pour cela, 500 µl de DMSO anhydre sont ajoutés pour solubiliser l'échantillon ainsi que 200 µl de base butyl-lithium. L'échantillon est alors placé 1h dans un bain à sonication puis laissé sur la nuit à température ambiante à l'obscurité. Le lendemain, l'échantillon est déposé pendant 20 à 30 min à -20°C puis 500 µl d'ICH3 lui sont ajoutés avant de le placé à nouveau 2h dans le bain à ultrasons. La réaction est ensuite arrêtée par ajout de 1 à 2 ml d'eau distillée et d'une pastille de thiosulfate. Une décoloration doit alors être obtenue. Un ml de chloroforme est ensuite

© 2015 Tous droits réservés. doc.univ-lille1.fr

ajouté, l'échantillon est homogénéisé au vortex puis la phase chloroformique est récupérée. Une seconde extraction chloroforme/eau est effectuée puis les deux phases chloroformique sont rassemblées et évaporées sous azote puis lyophilisées afin d'effectuer un second cycle de méthylation.

Lorsque les deux cycles de méthylation sont effectués, les polysaccharides sont hydrolysés par de l'ATFA 4M pendant 4 h à 100°C puis évaporés à sec sous azote avant d'être réduit au $NaBD_4$ à une concentration de 10 mg/ml dans une solution de NH_4OH 2M. La réduction a lieu sur la nuit. Le lendemain, la réduction est arrêtée par l'ajout de quelques gouttes d'acide acétique. Les échantillons sont placés 30 min à 1h sous azote puis des co-évaporations MeOH/AcOH 5 % sont effectuées pour éliminer les sels de borates. A la fin de cette opération, les échantillons doivent être bien secs pour procéder à leur acétylation. Cette étape est réalisée en ajoutant 200 µl d'anhydride acétique et en effectuant une incubation d'une heure à 100°C et d'une nuit à température ambiante. Les échantillons sont ensuite évaporés sous azote. Dès qu'ils sont secs, 1,5 ml de chloroforme sont ajoutés et cinq lavages avec de l'eau distillée sont effectués. A chaque fois, la phase aqueuse est éliminée pour ne garder au final que la phase chloroformique qui sera évaporée sous azote avant d'être reprise dans du méthanol pour être injectée en CPG et GC-MS.

XVI. Marquage des bactéries au DAPI (4',6'-diamidino-2-phényl-indole)

Les bactéries sont mises en suspension dans 1 ml de PBS et incuber 15 minutes à température ambiante avec 1 µl de solution de DAPI. Le dénombrement des bactéries est obtenu par mesure de la DO à 600 nm sachant que 1 unité de DO correspond à 10^8 bactéries. La solution de bactéries ainsi marquée est lavée par deux fois par des centrifugations à 6700 rpm suivies de l'élimination du surnageant et de la remise en suspension du culot dans du PBS. Lors du dernier lavage, le culot bactérien est repris dans le tampon de blocage (PFBB) utilisé pour saturer les membranes de nitrocellulose.

XVII. Test d'adhésion bactérienne sur membrane de nitrocellulose

Une membrane de nitrocellulose (Amersham Biosciences) et quatre feuilles de papier Whattman sont hydratées dans du DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffer Saline, Gibco) puis déposées dans l'unité de microfiltration (Bio-DOT SF, Biorad). Les mucines (ou la BSA) sont déposées dans les puits à raison de 20 µL de solution de mucines à 1 µg/µL puis aspirées à travers la membrane. La membrane de nitrocellulose est ensuite saturée dans du tampon de blocage (PFBB Thermo) pendant 2 heures afin d'éviter les fixations non spécifiques. Après aspiration du tampon de blocage, les solutions de bactéries marquées sont déposées sur la membrane de nitrocellulose; celle-ci est placée à l'abri de la lumière pendant une heure. La membrane est rincée trois fois pendant 5 min à l'obscurité avec une solution de PBS-Tween 0,05% (Sigma). La mesure de la fluorescence est ensuite réalisée à l'aide d'un imageur Chemigenius (Syngene).

© 2015 Tous droits réservés. doc.univ-lille1.fr

Résultats

© 2015 Tous droits réservés.

doc.univ-lille1.fr

Partie 1 : Etude structurale de la paroi d'*Aspergillus fumigatus* au cours de la germination

A- Détermination des proportions relatives des fractions alcalino-insolubles et alcalino-solubles au cours de la germination d'*A. fumigatus.*

La paroi d'*A. fumigatus* est une barrière face aux agressions externes qu'elles soient physiques ou chimiques. La paroi mycéliale a fait l'objet de nombreuses études tandis que peu d'informations sont disponibles sur la paroi conidiale au cours de la germination. Cette paroi étant la première structure à entrer en contact avec l'épithélium muqueux pulmonaire chez l'hôte, une étude plus approfondie de l'organisation de celle-ci au cours de sa germination est indispensable.

Afin de réaliser cette étude, nous avons eu à disposition des parois d'*Aspergillus fumigatus* aux différents stades de germination. Les conidies aux différents stades ont été préparées de la façon suivante :

- Pour les conidies dormantes, la souche Ku80 a été ensemencée sur un milieu Malt à 2% solide pendant trois semaines permettant sa sporulation. Les conidies dormantes ont été récupérées après passage sur un filtre retenant le mycélium.
- Les conidies au stade gonflées ont été obtenues en plaçant des conidies dormantes sur un milieu liquide de germination adapté pendant 4h.
- Après 9h, les conidies ayant un tube germinatif étaient au stade germé.

Les conidies à ces différents stades ont ensuite été broyées afin de récupérer les parois à caractériser. L'analyse des polysaccharides pariétaux nécessite au préalable l'élimination des protéines incluses dans la paroi. Pour ce faire, un traitement au SDS/β-mercaptoéthanol a été réalisé. Celui-ci a été suivi par un traitement alcalin à chaud servant à séparer les polysaccharides alcalino-insolubles (fraction AI) des polysaccharides alcalino-solubles (fraction AS). L'histogramme suivant présente les proportions relatives des fractions AI et AS dans la paroi au cours de la germination (Fig. 24).

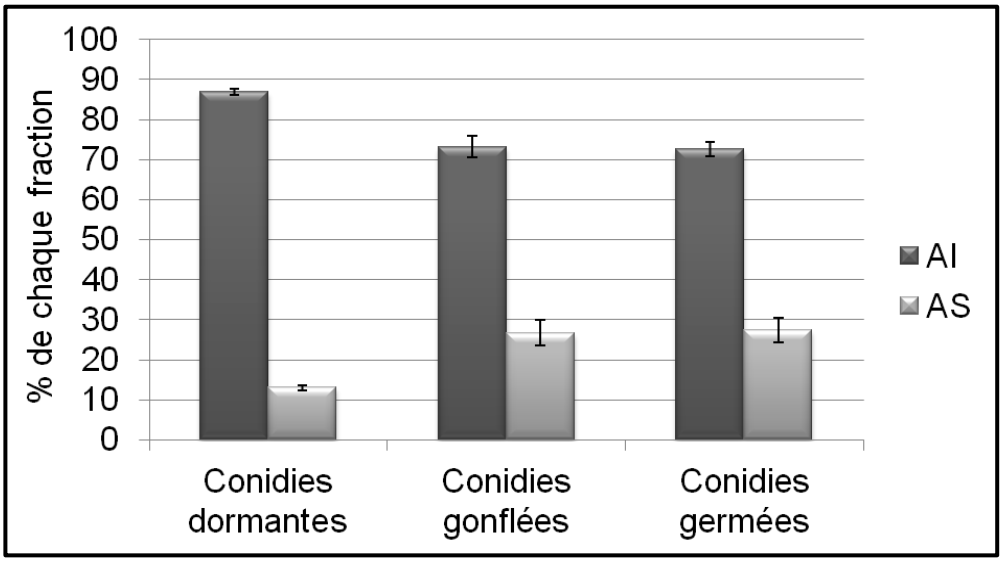


Figure 24 : Proportion relative des fractions AI et AS de la paroi au cours de la germination des conidies.

© 2015 Tous droits réservés.

doc.univ-lille1.fr

Nous pouvons observer une diminution de la part de la fraction AI corrélée à une augmentation de celle de la fraction AS au cours de la germination. Ceci suggére un remodelage pariétal par l'action des enzymes impliquées dans la synthèse et/ou la dégradation des polysaccharides alcalino-solubles et -insolubles.

Dans un premier temps, nous avons tenté de déterminer, par une analyse de la composition en monosaccharides, quels polysaccharides étaient présents dans les deux fractions obtenues. Cela avait pour objectif de déterminer l'évolution des pourcentages relatifs des polysaccharides correspondants au cours de la germination (Fig.25). En effet, certains monosaccharides peuvent être considérés comme des marqueurs spécifiques de la présence de polysaccharides donnés :

-le glucose de la fraction AI indique la présence de β-1,3 ou 1,3/1,4-glucane tandis que celui de la fraction AS indique la présence d'α1,3-glucane

-la GlcNAc est caractéristique de la présence de chitine et/ou de chitosan

-le mannose et le galactose sont présents au sein des galactomannanes des deux fractions

-on peut noter qu'un faible pourcentage du galactose peut être attribué à la présence de galactosaminogalactane.

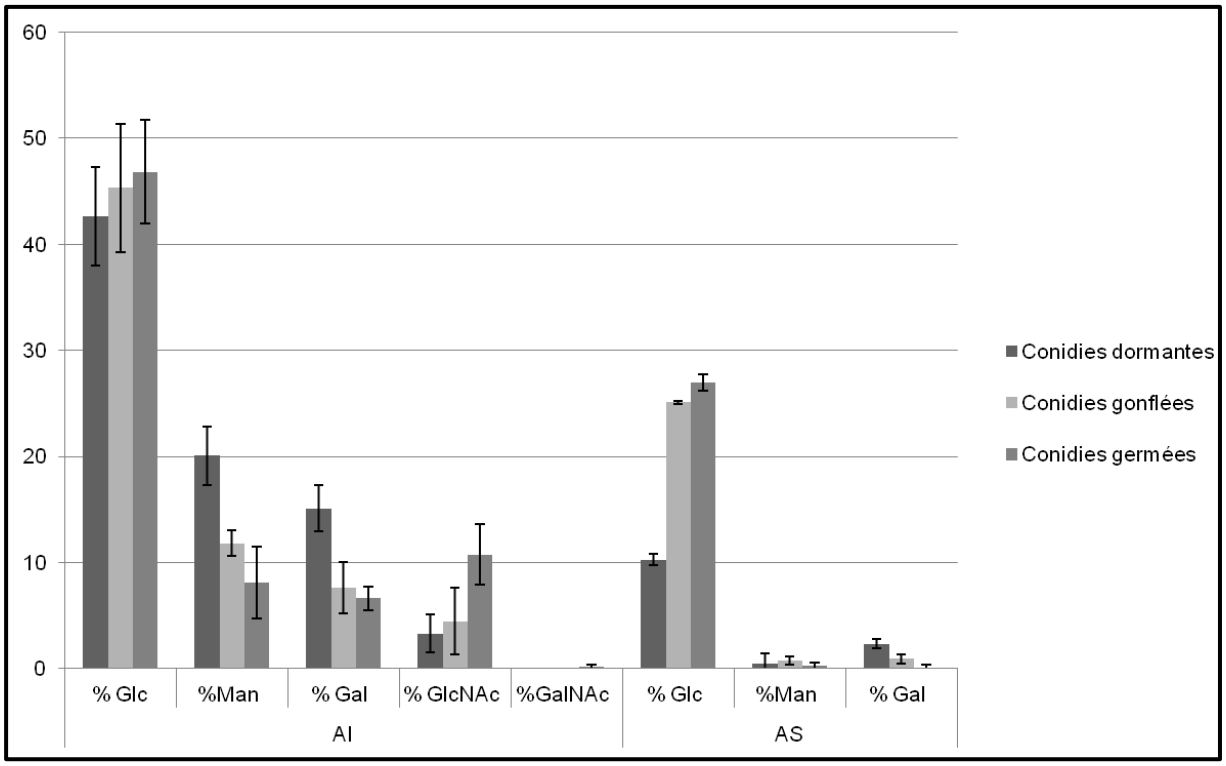


Figure 25 : Composition en monosaccharides des fractions AI et AS de la paroi des conidies au cours de la germination.

Au cours de la germination, nous observons une diminution de la proportion en mannose et galactose indiquant une diminution de la part relative des galactomannanes dans la paroi. A l'inverse, la proportion de chitine dans la fraction AI augmente au cours de la germination comme l'indique la

© 2015 Tous droits réservés.

doc.univ-lille1.fr

présence plus importante de GlcNAc chez les conidies germées. On note également la présence de GalNAc au stade « conidies germées » suggérant ainsi l'initiation de la biosynthèse de galactosaminogalactanes à partir de ce stade. Ce processus se poursuit lors du développement du mycélium par la sécrétion de ce polysaccharide dans le milieu extracellulaire.

Concernant la fraction AS, nous observons une augmentation de la proportion de glucose qui compose l'α1,3-glucane et une diminution de celle du mannose et du galactose présents au sein des galactomannanes.

B- Etude de la fraction alcalino-insoluble de la paroi d'*Aspergillus fumigatus*

I) Stratégie d'étude de la fraction AI : Digestions séquentielles

Afin de mieux caractériser la fraction AI qui constitue le squelette de la paroi fongique, nous avons effectué une série de digestions enzymatiques séquentielles. Les enzymes utilisées pour dégrader cette fraction AI sont la laminarinase A (LamA), la chitinase A (ChiA), la chitosanase et la lichénase (Fig.26). Les produits de digestion relâchés dans le surnageant ont été analysés par MALDI-TOF après perméthylation, des études de liaisons ont été réalisées par GC-MS après hydrolyse des produits perméthylés, réduction par le NaBD4 et acétylation.

Le diagramme suivant (fig.26) présente la stratégie que nous avons choisie en termes de digestion séquentielle, les enzymes utilisées ainsi que les produits libérés attendus.

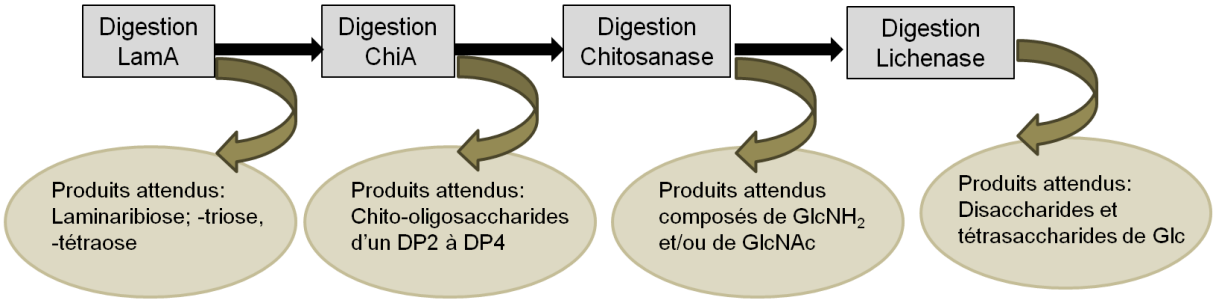


Figure 26 : Digestion séquentielle de la fraction AI par les enzymes et les produits de digestion attendus

Les rendements après digestion sont représentés dans la figure 27. La fraction AI des conidies germées semble plus facilement dégradable par les diverses enzymes utilisées. Le culot résiduel résistant à toute digestion atteint 19,7% (+/- 7%) pour les conidies germées contre plus de 33% pour les conidies dormantes.

© 2015 Tous droits réservés.

doc.univ-lille1.fr

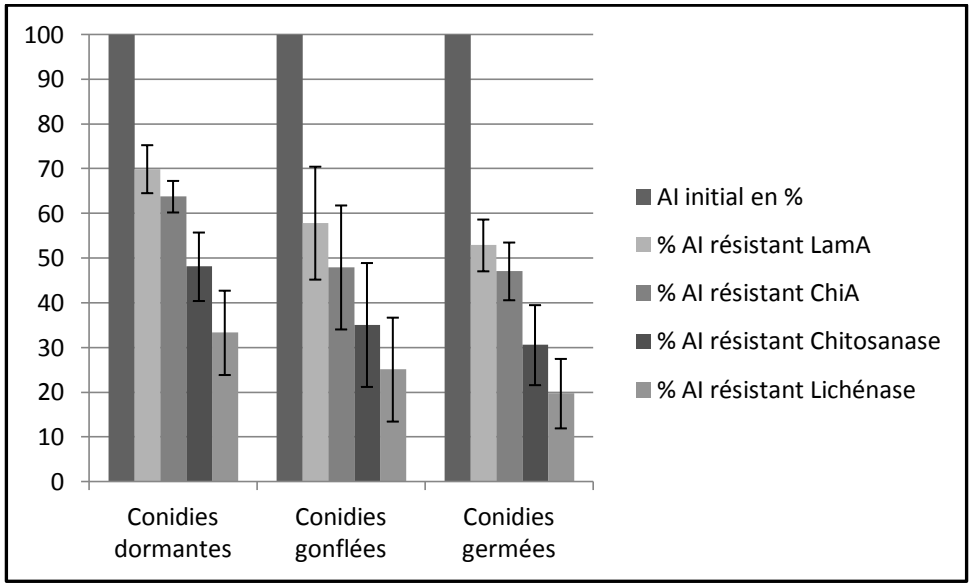
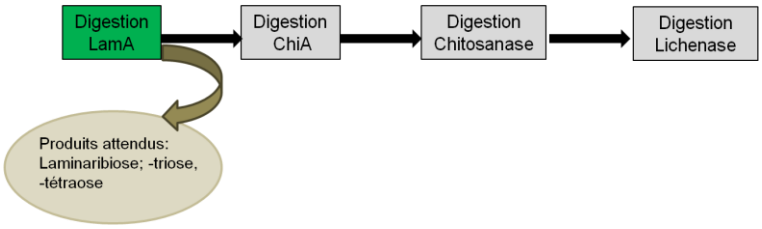


Figure 27 : Rendement en % des fractions AI résistantes aux digestions séquentielles.

Les fractions correspondant aux surnageants et les résidus résistants aux digestions ont ensuite été analysés par GC-FID afin de déterminer leurs compositions en monosaccharides et par GC-MS afin d'établir les liaisons glycosidiques.

II) Etude des oligosaccharides libérés et du culot résiduel après digestion LamA



1) Analyse des oligosaccharides libérés dans le surnageant après digestion LamA

a) Analyse des oligosaccharides libérés par spectrométrie de masse

La première enzyme que nous avons utilisée pour digérer la paroi conidiale d'*A. fumigatus* a été la laminarinase A (LamA) de *Thermogota neapolitana*. C'est une endo-β1,3-glucanase qui libère principalement des oligosaccharides composés de glucose allant d'un degré de polymérisation 2 à 5. Elle dégrade donc le β1,3-glucane de la fraction AI. Dans un premier temps, trois fractions AI issues de trois échantillons indépendants pour chacun des stades de germination ont subi deux cycles de digestion à la LamA.

La LamA a été au préalable produite sous forme recombinante chez *E.coli* puis partiellement purifiée sur une colonne échangeuse d'anions. Elle se présente sous deux formes différant par leur taille (52 kDa et 73 kDa).

Les spectres de masse des oligosaccharides relâchés lors de la digestion avec LamA puis perméthylés sont présentés ci-dessous (Fig. 28 à 30) et la proportion relative des oligosaccharides générés est présentée dans le tableau 9.

© 2015 Tous droits réservés.
doc.univ-lille1.fr

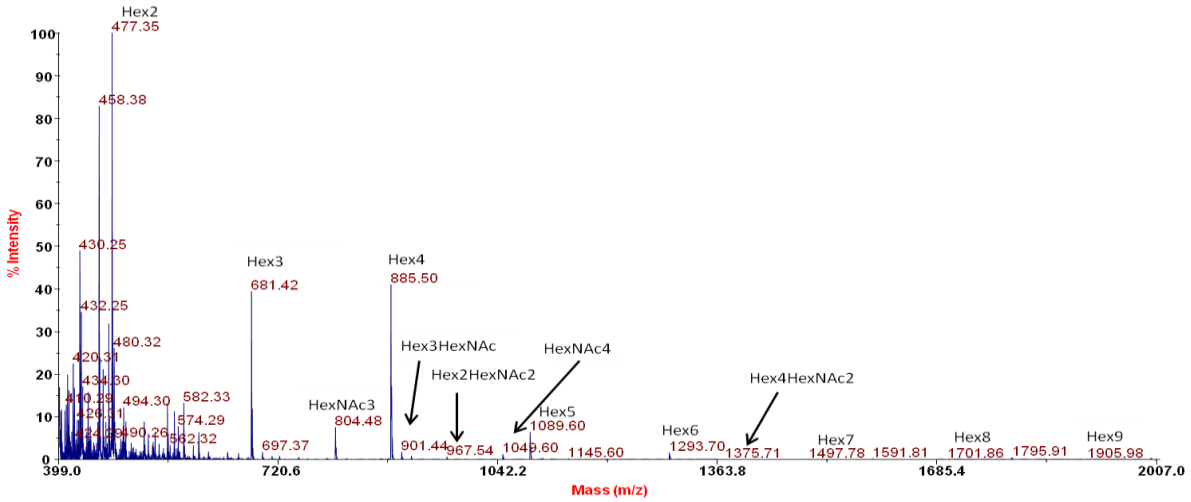


Figure 28 : Spectre de masse des oligosaccharides présents dans le surnageant après digestion LamA de la fraction AI des conidies dormantes.

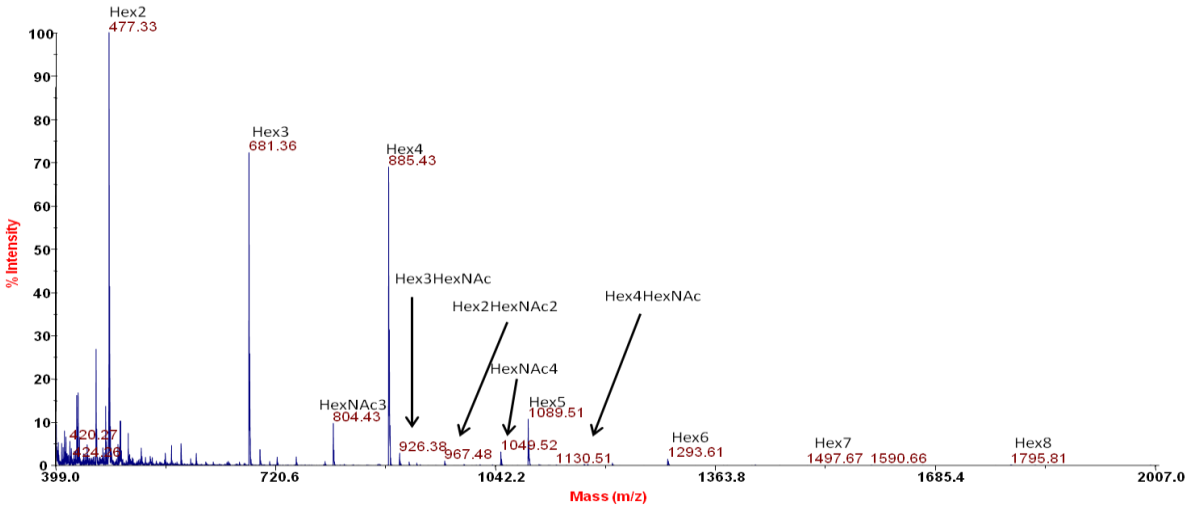


Figure 29 : Spectre de masse des oligosaccharides présents dans le surnageant après digestion LamA de la fraction AI des conidies gonflées.

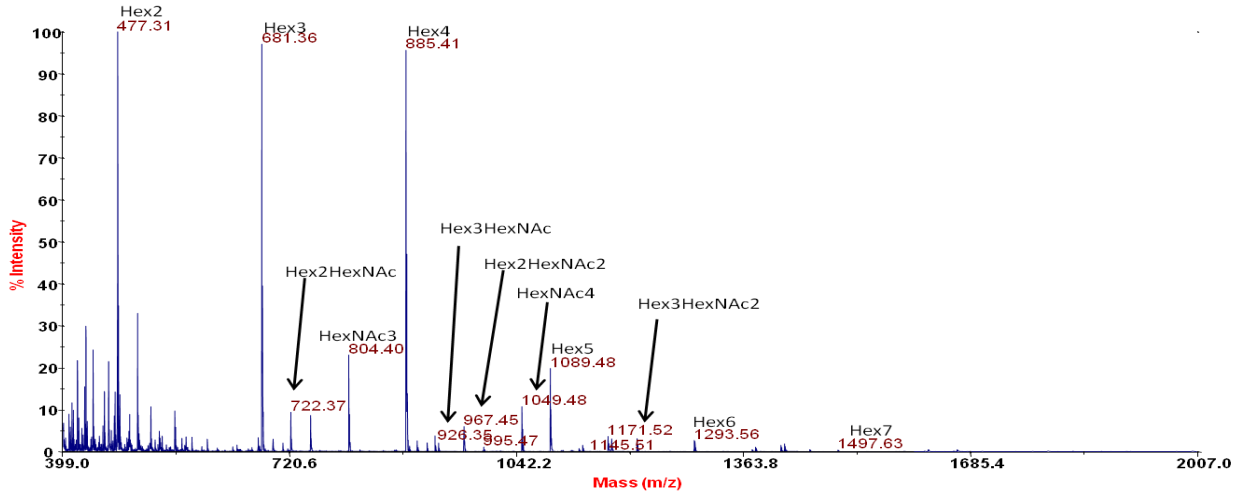


Figure 30 : Spectre de masse des oligosaccharides présents dans le surnageant après digestion LamA de la fraction AI des conidies germées.

© 2015 Tous droits réservés.

Les différents spectres montrent la présence, comme nous pouvions nous y attendre, d'oligosaccharides composés d'oses neutres correspondant à des disaccharides, tri- et tétrasaccharides composés de glucose. Des composés très minoritaires atteignent jusqu'à 9 hexoses, particulièrement dans le cas des conidies dormantes (Fig.29). De façon plus surprenante, la digestion par la LamA a permis la libération d'oligosaccharides contenant de la GlcNAc. Ces oligosaccharides restent très minoritaires dans les conidies dormantes (environ 3 %, Fig.28 et Tableau 9) mais voient leurs proportions augmenter au cours de la germination. Pour les conidies gonflées (Fig.29 et Tableau 9), cette proportion atteint environ 4% tandis qu'elle culmine à 9% chez les conidies germées (Fig.30 et Tableau 9). Chez ces dernières, on peut observer une plus grande variété d'espèces oligosaccharidiques composée de GlcNAc et de Glucose : Hex2HexNAc2, Hex3HexNAc, Hex4HexNAc, Hex3HexNAc2, Hex5HexNAc et Hex4HexNAc2. Ces différents oligosaccharides basiques suggèrent l'existence de liaison glucane-chitine entre deux chaînes polysaccharidiques. L'augmentation constatée de leur présence au cours de la germination semble indiquer un accroissement du nombre de points de branchement entre ces deux composés. Ces points de branchement au niveau desquels de petits chito-oligosaccharides sont liés au β1,3-glucane peuvent être des points d'initiation de la synthèse de chitine. Cela serait compatible avec l'augmentation de la proportion de chitine observée au cours de la germination (Fig.24). On ne peut cependant exclure qu'une dégradation partielle de certaines chaînes de chitine liées au β1,3-glucane ne résulte en une plus grande capacité de libération par la LamA de ces petits oligosaccharides basiques. La présence d'oligosaccharides composés exclusivement de GlcNAc est intrigante puisque la LamA n'est censée cliver que les liaisons β1,3 du β1,3-glucane.

© 2015 Tous droits réservés.

doc.univ-lille1.fr

Tableau 9 : Structures des oligosaccharides retrouvés dans le surnageants après digestion par la LamA

Structures	Proportion relative en % des oligosaccharides		
	Surnageant c.dormantes	Surnageant c.gonflées	Surnageant c.germées
Hex2	56,39	44,54	33,82
HexHexNH2	1,82	1,54	0,76
HexHexNAc	0,71	0,32	0,18
HexNAc2	0,00	0,95	0
Hex3	17,89	24,16	27,16
Hex2HexNAc	0,00	0,64	2,37
HexNAc3	3,04	2,99	5,15
Hex4	16,23	20,11	21,72
Hex3HexNAc	0,05	0,15	0,80
Hex2HexNAc2	0,24	0,00	0,00
HexNAc4	0,43	0,87	2,16
Hex5	2,50	3,11	4,24
Hex4HexNAc	0,01	0,04	0,14
Hex3HexNAc2	0,03	0,08	0,71
Hex6	0,55	0,42	0,56
Hex5HexNAc	0,00	0,00	0,02
Hex4HexNAc2	0,01	0,02	0,09
Hex7	0,03	0,01	0,07
Hex6HexNAc	0,00	0,00	0,01
Hex5HexNAc2	0,00	0,00	0,01
Hex8	0,01	0,00	0,00
Hex9	0,01	0,00	0,00

b) Analyse de la composition en monosaccharides du surnageant après digestion LamA

Pour aller plus loin dans la caractérisation du surnageant et confirmer que les oligosaccharides libérés contiennent bien glucose et GlcNAc, nous avons procédé à une analyse de la composition en monosaccharides par GC. Les résultats sont présentés dans l'histogramme suivant (Fig. 31) :

© 2015 Tous droits réservés.

doc.univ-lille1.fr

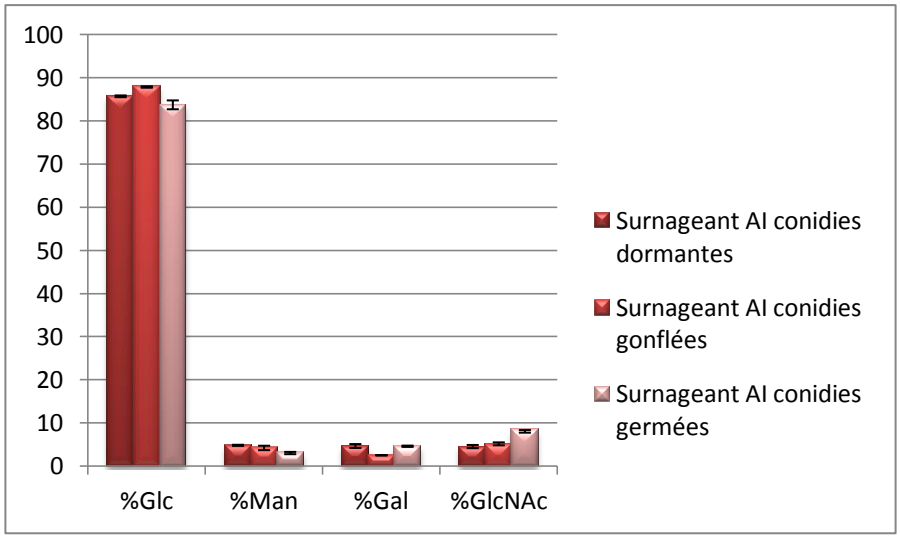


Figure 31 : Composition en monosaccharides des surnageants après digestion LamA des fractions AI des conidies au cours de la germination.

Le surnageant obtenu après digestion à la LamA contient plus de 80% de Glc (Fig. 31), conformément à ce qui était attendu de par son activité enzymatique. De la GlcNAc est également détectée en conformité avec les résultats obtenus par spectrométrie de masse. L'augmentation, au cours de la germination de la quantité de GlcNAc détectée, corrobore la proportion accrue de points de branchement durant ce processus. La détection de Gal et Man indique que du galactomannane a été libéré lors de la digestion avec LamA. Celui-ci possède manifestement une taille trop importante pour être détecté en MALDI-TOF. La libération de ce composé implique qu'il était initialement branché sur le β-glucane. Les rapports Gal/Man de ces galactomannanes ne semblent pas identiques à tous les stades de développement. Afin de mieux caractériser ces composés, nous avons entrepris de les purifier à l'aide d'une chromatographie d'affinité avec la Concanavaline A (ConA-Sépharose), lectine affine pour les structures mannosylées. L'expérience réalisée sur le surnageant obtenu à partir des conidies germées a abouti à l'obtention d'une fraction non retenue et d'une fraction éluée. Toutes deux ont été analysées par GC selon la méthode des alditols-acétates. Comme attendu, les chromatogrammes montrent une fraction non retenue majoritairement composée de glucose et une fraction éluée dont la teneur majoritaire en Gal et Man est compatible avec la présence de galactomannanes. Le glucose présent dans la fraction éluée était à priori lié aux galactomannanes. En considérant que le point de branchement des galactomannanes est constitué d'un seul résidu de glucose, on obtient une taille moyenne minimale de ce composé de 21 unités (14 unités de mannose et 7 unités de galactose), d'après le tableau 10. Cette taille est certainement sous-évaluée car il est peu probable que la LamA ait libéré exclusivement des galactomannanes branchés sur un seul résidu de Glc.

© 2015 Tous droits réservés.

doc.univ-lille1.fr

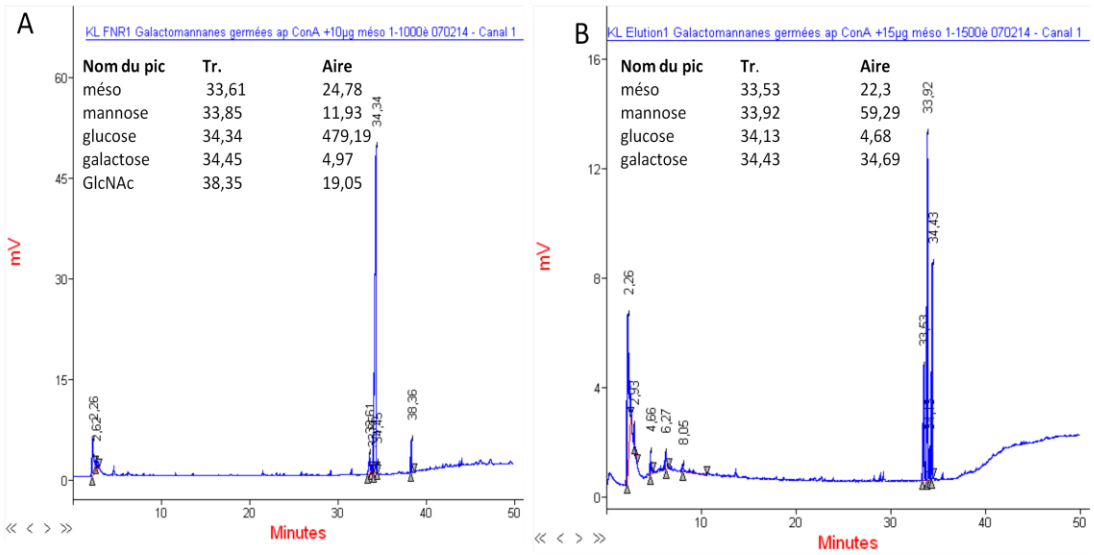


Figure 32 : Composition en monosaccharides des fractions non retenue (A) et retenue (B) sur ConA du surnageant des conidies germées après LamA.

Tableau 10 : Rapport molaire des monosaccharides de chaque fraction par rapport au mannose

Monosaccharides	Galactomannanes Conidies Germées	
	FNR	Elution
Mannose	1	1
Galactose	0,3868	0,5433
Glucose	36,68	0,0724
GlcNAc	3,3663	

c) Analyse des liaisons glycosidiques des oligosaccharides du surnageant libérés par la LamA par GC-MS

Nous avons effectué cette analyse afin de vérifier que les oligosaccharides de glucose libérés ét aient liés en 1,3 ; la GlcNAc en 1,4 et observer les points de branchement du β1,3-glucane substitué sur le carbone 6. Pour cela, les oligosaccharides libérés par la LamA ont été hydrolysés par de l'ATFA, réduits au $NaBD_4$ puis acétylés pour ainsi obtenir des PMAA (Alditol-Acétates Partiellement Méthylés). La caractérisation des constituants se fait en fonction du temps de rétention qui permet de déterminer la nature du monosaccharide et des ions caractéristiques issus de la fragmentation de celui-ci qui permettra de déterminer les carbones impliqués dans les liaisons glycosidiques.

Concernant le β1,3-glucane, le résultat de cette analyse montre comme attendu que les oligosaccharides relâchés sont composés de glucose liés en 1,3 comme l'atteste la détection de 2,4,6-triméthyl 1,3,5 triacétylglucitol (3-Glc). De plus, on observe des points de branchement comme l'atteste la présence de 2,4-diméthyl-1,3,5,6-tétraacétylglucitol. La présence de 2,3,6-triméthyl-1,4,5 triacétylglucitol (4-Glc) suggére aussi la libération de fragments de β1,3/1,4glucane.

© 2015 Tous droits réservés. doc.univ-lille1.fr

On retrouve également des éléments caractéristiques de la chitine : le terminal-GlcNAc et N-AcétylGlucosaminitol-1-D-2,3,6-triméthyl 1,4,5 triacétate (t-GlcNAc et 4-GlcNAc).

Concernant les galactommannanes, on observe la présence de : 2,3,4,6-tétraméthyl 1,5diacétylGalactitol, 2,3,4,6-tétraméthyl 1,5 diacétylmannitol, 2,3,4-triméthyl-1,5,6 triacétylmannitol et 4,6-diméthyl-1,2,3,5-tétraacétylmannitol (t-Gal ; t-Man ; 6-Man ; 2,3-Man) ce qui est compatible avec ce qui est connu de la structure des galactomannanes. (Fig.33)

Figure 33 : Analyse des liaisons glycosidiques des oligosaccharides présents dans les surnageants après digestion LamA.

© 2015 Tous droits réservés.

doc.univ-lille1.fr

2) Analyse du culot résiduel après la digestion LamA

La composition en monosaccharides de la fraction résistante à la LamA a été effectuée. Nous pouvons noter que ces fractions sont encore majoritairement constituées de glucose notamment chez les conidies germées (Fig.34)

De surcroît, la quantité de mannose et de galactose diminue plus fortement que celle du glucose.

La digestion à la LamA a permis d'éliminer respectivement 30% de la fraction AI des conidies dormantes, 42% de celle des conidies gonflées et 47% de celle des conidies germées, laissant respectivement 70, 58 et 53 % du matériel initial. Si l'on calcule la quantité de chacun des monosaccharides dans les culots résiduels de digestion à la LamA ramenée à la quantité initiale dans la fraction AI avant digestion, le calcul à faire est le suivant :

$$\frac{\text{Proportion de AI résistante à la digestion X \% du monosaccharide dans la fraction digérée}}{\text{\% du monosaccharide dans la fraction avant digestion}}$$

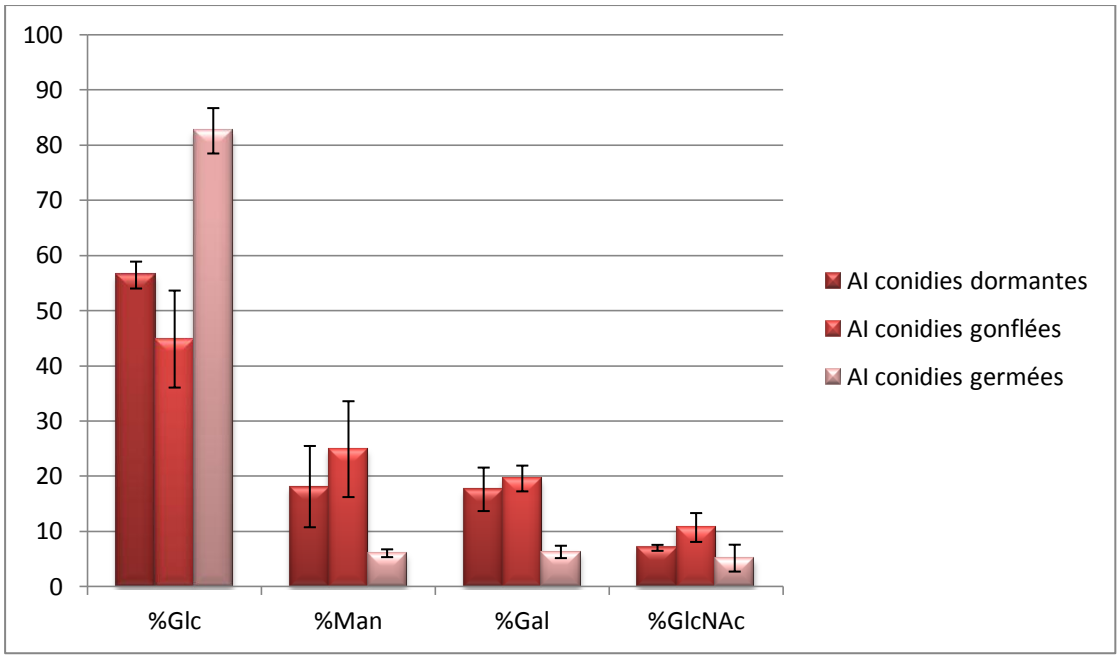


Figure 34 : Composition en monosaccharides des fractions AI résistantes à la digestion LamA des conidies au cours de la germination.

Suite à ce calcul, les résultats sont résumés le tableau suivant :

Tableau 11 : Pourcentage résiduel des monosaccharides de la fraction AI après la digestion par la LamA

	% résiduel des monosaccharides de la fraction AI après digestion LamA			
	Glc	Man	Gal	GlcNAc
C. dormantes	81,2	55,2	71,6	130,5
C. gonflées	42,0	89,1	109,3	101,7
C. germées	67,9	28,4	36,3	18,1

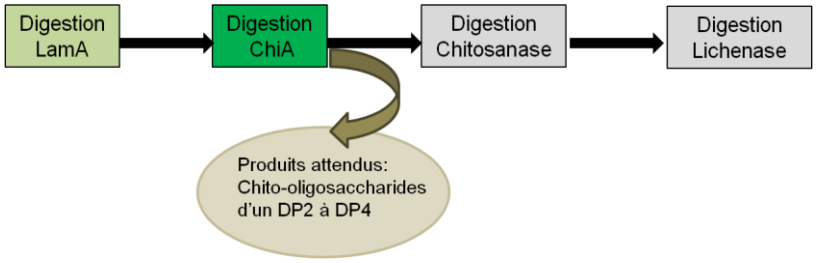
© 2015 Tous droits réservés.

doc.univ-lille1.fr

Ces données nous permettent de déterminer que le β-glucane est beaucoup plus accessible au stade conidies gonflées, auquel 58 % du glucose est éliminé par LamA, qu'aux autres stades de développement. Au stade « conidies dormantes », moins de 20 % du glucose est accessible à la LamA. Les galactomannanes ne sont presque pas libérés par la LamA au stade « conidies gonflées » tandis qu'au stade « conidies germées », près de 70 % de ce composé est éliminé par la digestion à la LamA. Le stade « conidies dormantes » est intermédiaire. Cela suggère une profonde réorganisation pariétale entre ces deux stades de développement.

Quant à la chitine, si elle n'est pour ainsi dire pas affectée par la digestion à la LamA aux stades « conidies dormantes et gonflées », elle est en revanche éliminée à plus de 80 % par ce même procédé au stade « conidies germées ». Combinés aux résultats de spectrométrie de masse, ces données suggèrent qu'une grande proportion de la chitine des conidies germées est en fait constituée de chito-oligosaccharides liés aux β-glucanes.

III) Etude des oligosaccharides libérés et du culot résiduel après digestion ChiA sur le culot résiduel après LamA



1) *Analyse des oligosaccharides libérés dans le surnageant après digestion ChiA*

Le culot issu de la digestion à la LamA de la fraction AI a été soumis à une digestion à la Chitinase A de *S. marescens*. Cette enzyme que nous avons produite sous forme recombinante chez E. coli puis partiellement purifiée libère des chito-oligosaccharides de 2 à 4 unités de GlcNAc. Ensuite, nous avons effectué deux cycles de digestion à 37°C par la Chitinase A recombinante produite chez *E. coli*. Cette enzyme relâche des chito-oligosaccharides de 2 à 4 unités de GlcNAc.

a) *Analyse des oligosaccharides libérés par spectrométrie de masse*

Les oligosaccharides libérés ont été analysés par spectrométrie de masse (Fig. 35 à 37). De façon surprenante, les chito-oligosaccharides (HexNAc2, HexNAc3, HexNAc4) ne représentent qu'une faible part des structures libérées. Nous observons principalement des oligosaccharides composés de 2 à 4 hexoses qui sont du glucose comme peut le suggérer la composition en monsaccharides effectuée ultérieurement (Fig. 38). Nous pouvons également observer des oligosaccharides composés d'hexoses et d'HexNAc même si leur proportion relative est faible ainsi que des oligosaccharides composés d'$HexNH_2$ (Tableau 12).

© 2015 Tous droits réservés. doc.univ-lille1.fr

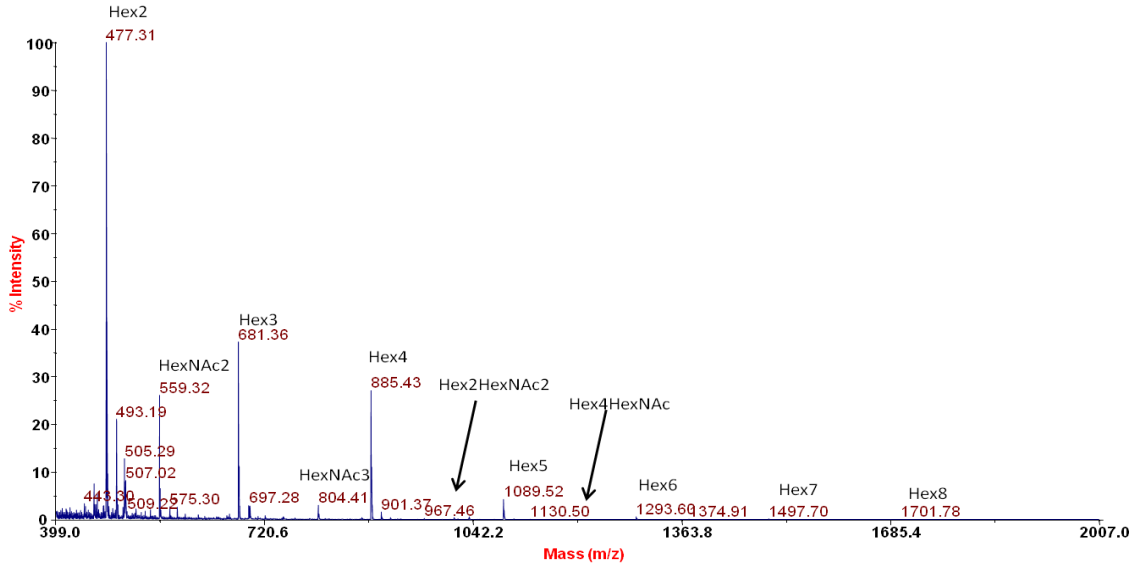


Figure 35 : Spectre de masse des oligosaccharides présents dans le surnageant après digestion ChiA de la fraction AI des conidies dormantes.

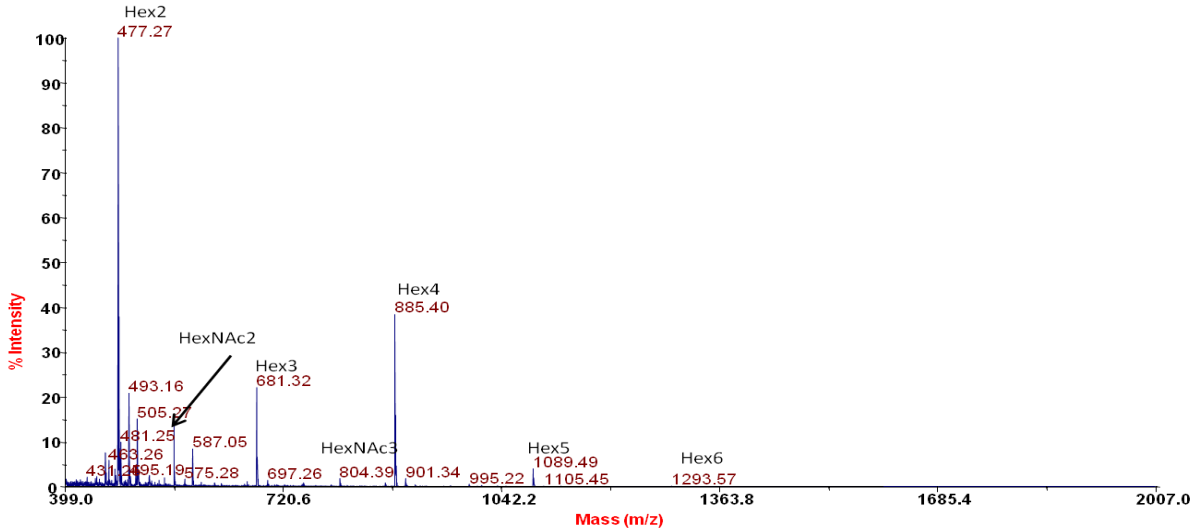


Figure 36 : Spectre de masse des oligosaccharides présents dans le surnageant après digestion ChiA de la fraction AI des conidies gonflées.

© 2015 Tous droits réservés.

doc.univ-lille1.fr

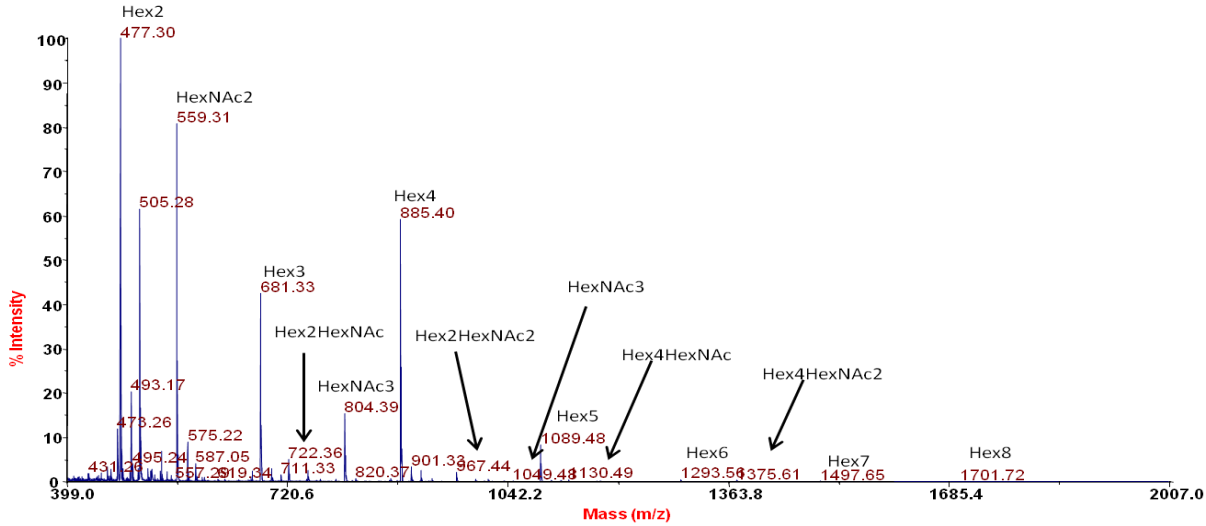


Figure 37 : Spectre de masse des oligosaccharides présents dans le surnageant après digestion ChiA de la fraction AI des conidies germées.

La proportion relative des différentes structures retrouvées dans les surnageants sont présentées dans le tableau suivant :

Tableau 12 : Structures des oligosaccharides retrouvés dans le surnageant après digestion par la ChiA du culot résistant LamA. Le deuxième tableau ne prend en compte que les oligosaccharides composés d'HexNAc et HexNH2.

Structures	Proportion relative en % des oligosaccharides		
	Surnageant c.dormantes	Surnageant c.gonflées	Surnageant c.germées
Hex2	57,90	59,41	40,39
(HexNH2)2	1,21	1,34	1,70
HexNAc2	14,12	9,27	22,58
Hex3	15,09	11,85	11,57
Hex(HexNH2)2	0,15	0,12	0,00
Hex2HexNAc	0,34	0,28	0,99
HexNAc3	1,18	0,96	3,03
Hex4	8,45	14,77	16,69
Hex3HexNAc	0,04	0,03	0,03
Hex2HexNAc2	0,06	0,06	0,28
HexNAc4	0,01	0,01	0,03
Hex5	1,19	1,73	2,33
Hex4HexNAc	0,02	0,03	0,16
Hex3HexNAc2	0,01	0,07	0,02
Hex6	0,13	0,07	0,08
Hex5HexNAc	0,00	0,00	0,01
Hex4HexNAc2	0,00	0,00	0,05
Hex7	0,04	0,01	0,03
Hex8	0,01	0,00	0,01
Hex9	0,00	0,00	0,00

© 2015 Tous droits réservés.

En ne se focalisant que sur les structures contenant de l'HexNAc, on obtient le tableau suivant :

Structures	Proportion relative en % des oligosaccharides		
	Surnageant c. dormantes	Surnageant c. gonflées	Surnageant c. germées
(HexNH2)2	7,07	11,05	5,89
HexNAc2	82,28	76,47	78,20
Hex(HexNH2)2	0,88	0,99	0,00
Hex2HexNAc	1,98	2,37	3,41
HexNAc3	6,90	7,93	10,49
Hex3HexNAc	0,26	0,24	0,11
Hex2HexNAc2	0,37	0,49	0,99
HexNAc4	0,05	0,12	0,10
Hex4HexNAc	0,12	0,24	0,56
Hex3HexNAc2	0,06	0,04	0,06
Hex5HexNAc	0,00	0,02	0,03
Hex4HexNAc2	0,04	0,03	0,16

Ces résultats montrent une faible quantité de points de branchement β-glucane-chitine, plus abondants chez les conidies germées. Par ailleurs, une proportion de chito-oligosaccharides déacétylés a été libérée lors du traitement. Globalement, les résultats obtenus après digestion par la ChiA sont surprenants du fait de la faible libération de chito-oligosaccharides et de la grande proportion d'oligosaccharides neutres libérés.

b) Analyse de la composition en monosaccharides du surnageant après digestion ChiA

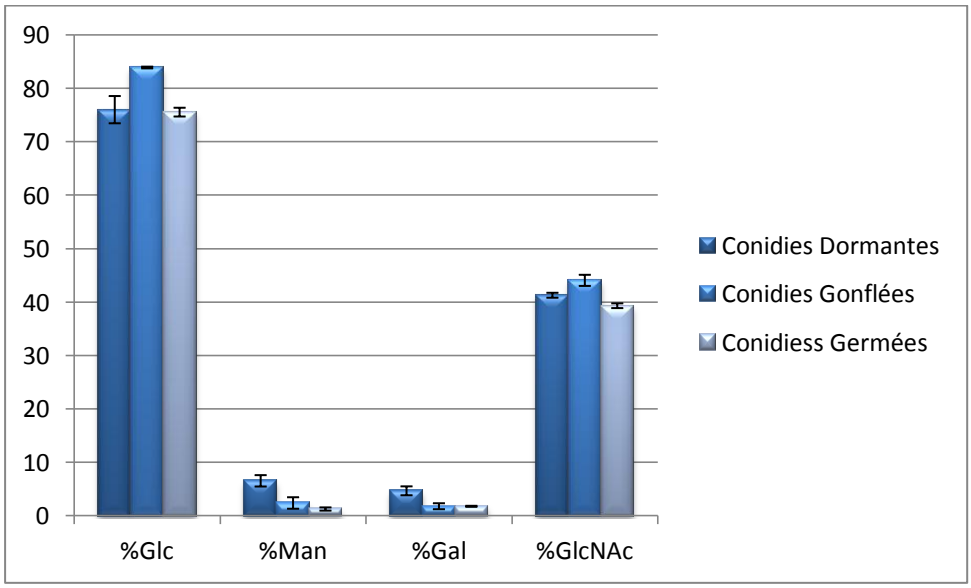


Figure 38 : Composition en monosaccharides des surnageants après digestion ChiA des fractions AI des conidies au cours de la germination.

c) Analyse des liaisons glycosidiques des oligosaccharides du surnageant libérés par la ChiA par GC-MS

Nous avons également effectué une analyse des liaisons glycosidiques par la méthode des PMAA des oligosaccharides libérés lors de cette digestion. Les oligosacharides composés de glucose sont liés en 3

© 2015 Tous droits réservés.

doc.univ-lille1.fr

(3-Glc) et en 4 (4-Glc) ce qui signifie donc un relâchement de β1,3-glucane et de β1,3/1,4-glucane probablement dûe à une activité enzymatique résiduelle lors la purification de la ChiA. On observe également une libération de galactommannanes par la présence de 6-Man. La chitine est caractérisée par la présence de t-GlcNAc et de 4-GlcNAc (Fig.39).

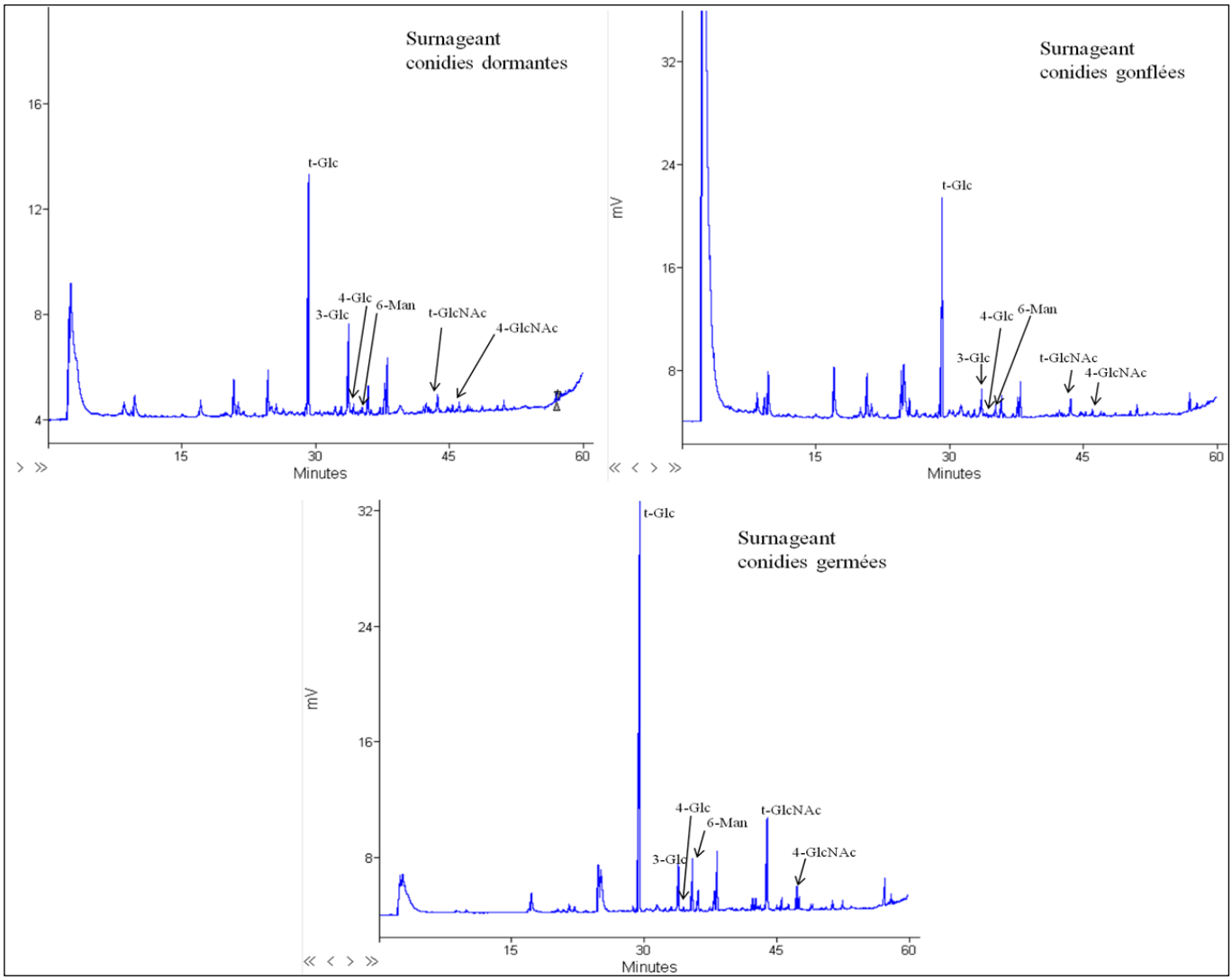


Figure 39 : Analyse des PMAA du surnageant des fractions AI digérées par la ChiA

2) Analyse du culot résiduel après la digestion par la ChiA

La digestion à la ChiA nous fournit relativement peu d'informations sur la structure de la fraction AI des conidies. Seule une dizaine de pourcents de cette fraction est dégradée par la ChiA, quelque soit le stade de développement. La majorité de la chitine présente semble donc peu accessible à la digestion.

© 2015 Tous droits réservés.

doc.univ-lille1.fr

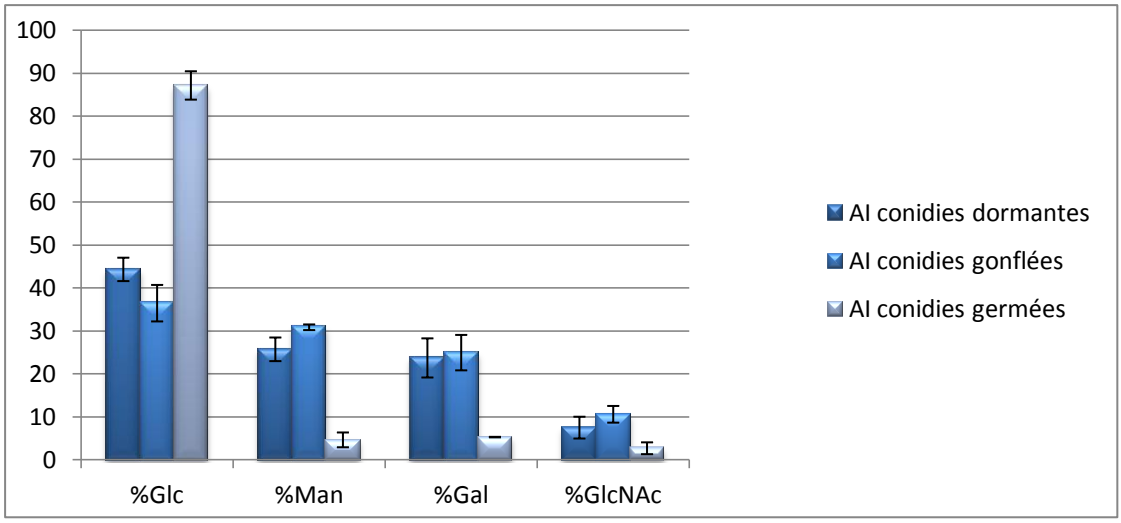
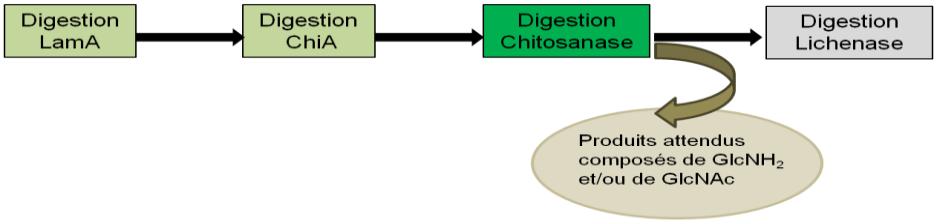


Figure 40 : Composition en monosaccharides des fractions AI résistantes à la digestion ChiA des conidies au cours de la germination.

Tableau 13 : Pourcentage résiduel des monosaccharides de la fraction AI après la digestion par la ChiA

	% résiduel des monosaccharides de la fraction AI après digestion ChiA			
	Glc	Man	Gal	GlcNAc
C. dormantes	70,8	103,0	98,2	72,1
C. gonflées	70,2	96,3	94,4	84,6
C. germées	86,4	77,7	124,3	91,5

IV) Etude des oligosacharides libérés et du culot résiduel après digestion Chitosanase



1) Analyse des oligosaccharides libérés dans le surnageant après digestion Chitosanase

La chitosanase de *S. griseus* clive les liaisons glycosidiques en β1,4 entre deux glucosamines mais il a aussi été décrit qu'elle pouvait cliver la liaison glycosidique entre une glucosamine et une GlcNAc.

a) Analyse des oligosaccharides libérés par spectrométrie de masse

L'étude des spectres des oligosaccharides relâchés après cette digestion montre peu de structures constituées de glucosamine et ce quelque soit le stade de développement. Les oligosaccharides contenant de la glucosamine représentent moins de 1% du surnageant après la digestion par la chitosanase de la fraction AI des conidies germées et jusqu'à seulement 2,7 % chez les conidies germées. Les chitooligosaccharides sont particulièrement libérés au stade « conidies gonflées » où ils

© 2015 Tous droits réservés.
doc.univ-lille1.fr

représentent 44 % du total des oligosaccharides libérées ainsi qu'au stade « conidies dormantes » avec plus de 30 % des oligosaccharides libérés. La proportion de ces oligosaccharides reste également importante au stade « conidies germées » (17 %). Mais on observe une large proportion encore une fois de structures composées de 2 et 3 hexoses ainsi que des chito-oligosaccharides à hauteur de 32% (Fig.41 et Tableau 14).

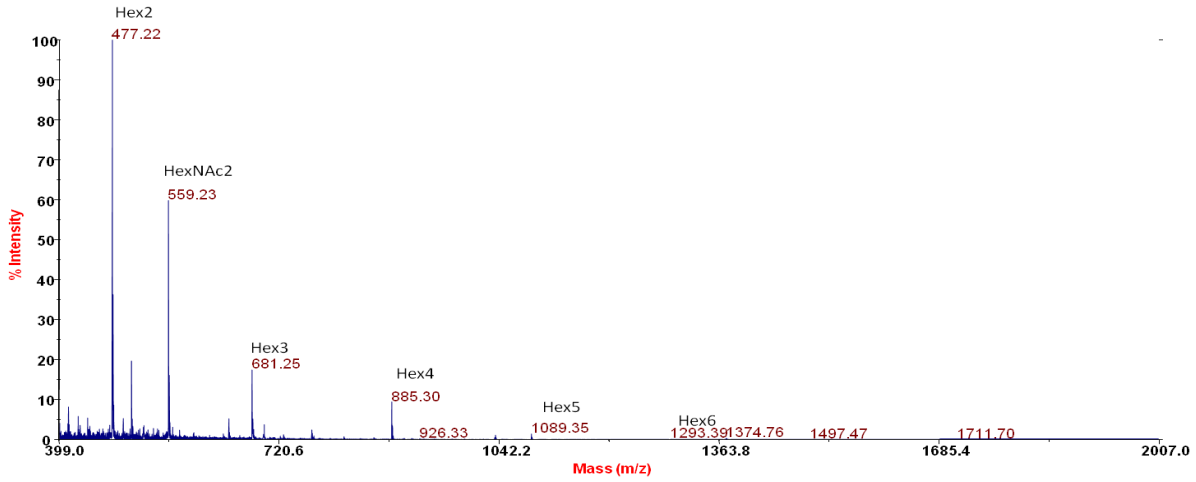


Figure 41 : Spectre de masse des oligosaccharides présents dans le surnageant après digestion Chitosanase de la fraction AI des conidies dormantes.

La chitosanase est théoriquement spécifique des liaisons $GlcNH_2$-$GlcNH_2$ mais est également capable d'hydrolyser partiellement la chitine. Elle semble en l'occurrence être plus efficace que la chitinase dans la dégradation de ce composé. Cela peut être dû à une plus grande accessibilité des chaînes de chitine après la rupture de leur lien avec le reste de la fraction AI par l'hydrolyse de points de branchement constitués de $GlcNH_2$ ou de $GlcNH_2Glc$ particulièrement présent au stade « conidies gonflées » dans lequel l'hydrolyse de la chitine est plus importante avec la chitosanase.

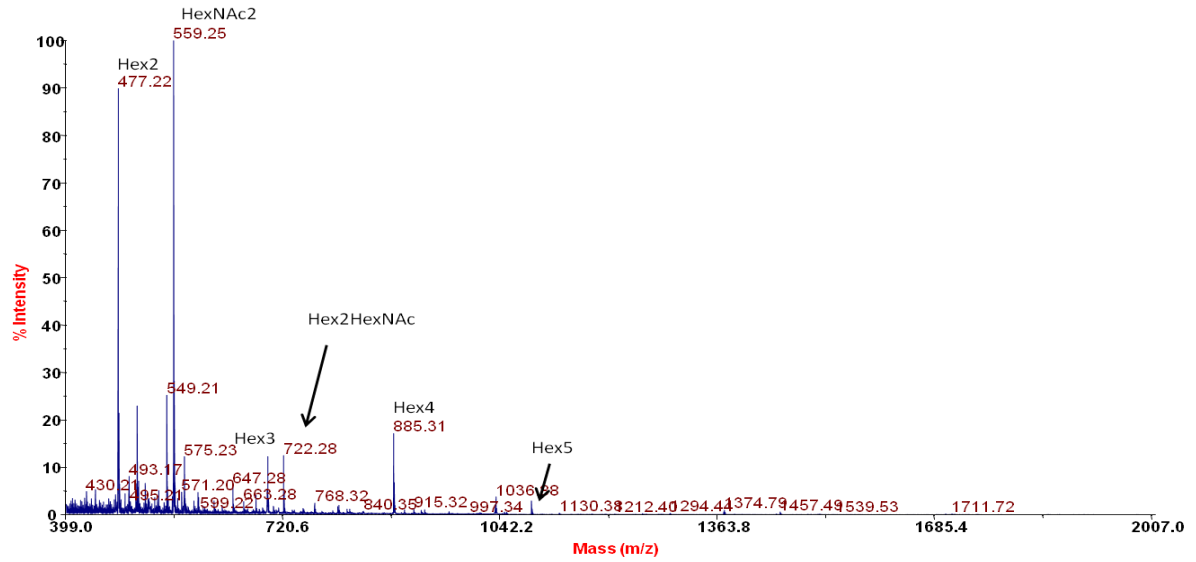


Figure 42 : Spectre de masse des oligosaccharides présents dans le surnageant après digestion Chitosanase de la fraction AI des conidies gonflées.

© 2015 Tous droits réservés.

doc.univ-lille1.fr

Enfin, concernant les conidies germées, on observe également un profil hétérogène composé pour la plupart de structures similaires à celles retrouvées dans le surnageant des conidies gonflées mais avec des proportions relatives différentes (Fig.42 et Tableau 14). En effet, la proportion de structures composées d'HexNAc est moindre par rapport à celles constituées d'hexoses, on est à un ratio d'environ 1/4 (une structure avec HexNAc pour quatre structures avec des hexoses). On note également la présence en faible proportion de structrures composées de glucosamine (<1,5%).

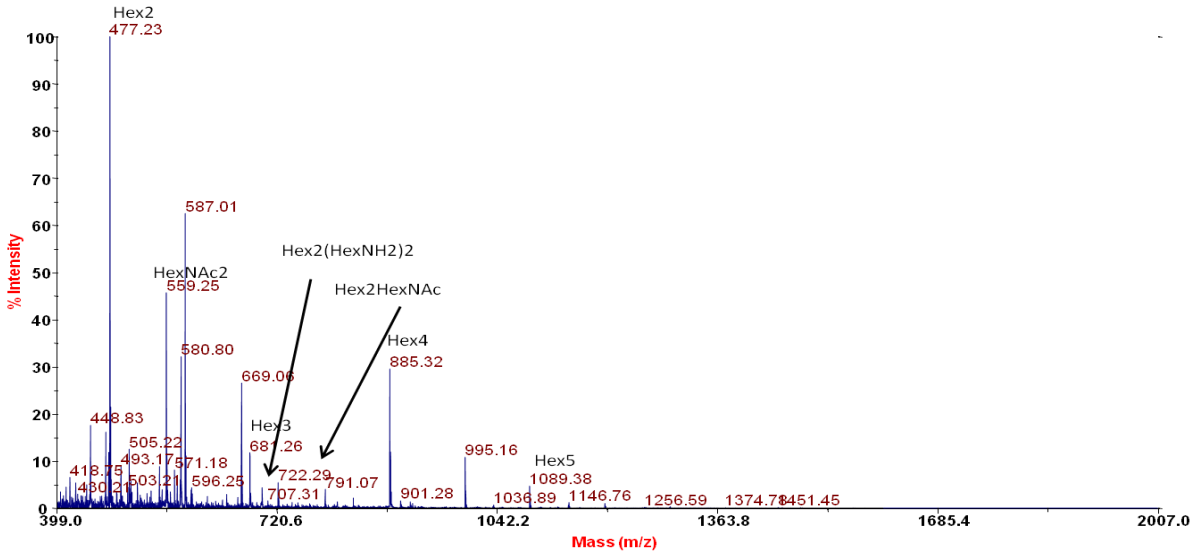


Figure 43 : Spectre de masse des oligosaccharides présents dans le surnageant après digestion Chitosanase de la fraction AI des conidies germées.

© 2015 Tous droits réservés.

doc.univ-lille1.fr

Tableau 14 : Structures des oligosaccharides retrouvés dans le surnageant après digestion par la chitosanase du culot résistant ChiA. Le second tableau fournit les proportions relatives des oligosaccharides composés d'HexNAc et d'HexNH2.

Structures	Proportion relative en % des oligosaccharides		
	Surnageant c.dormantes	Surnageant c.gonflées	Surnageant c.germées
Hex2	52,21	41,55	61,52
HexHexNH2	0,00	1,32	0,00
(HexNH2)2	0,66	1,45	1,33
HexNAc2	32,84	44,38	17,86
Hex3	7,14	2,82	5,74
Hex(HexNH2)2	0,00	0,00	0,30
Hex2HexNAc	0,36	2,51	1,13
HexHexNAc2	0,00	0,11	0,00
HexNAc3	0,09	0,46	0,12
Hex4	5,83	4,47	10,26
Hex3HexNAc	0,09	0,12	0,07
HexNAc4	0,00	0,07	0,00
Hex5	0,71	0,58	1,49
Hex4HexNAc	0,03	0,05	0,06
Hex3HexNAc2	0,00	0,02	0,00
Hex6	0,02	0,02	0,06
HexNAc5	0,00	0,05	0,00
Hex4HexNAc2	0,00	0,01	0,00
Hex7	0,01	0,01	0,02
HexNAc6	0,00	0,01	0,00

Structures	Proportion relative en % des oligosaccharides basiques		
	Surnageant c. dormantes	Surnageant c. gonflées	Surnageant c. germées
HexHexNH2	0,00	2,61	0,00
(HexNH2)2	1,93	2,87	6,39
HexNAc2	96,37	87,81	85,48
Hex(HexNH2)2	0,00	0,00	1,43
Hex2HexNAc	1,07	4,97	5,43
HexHexNAc2	0,00	0,21	0,00
HexNAc3	0,28	0,91	0,61
Hex3HexNAc	0,27	0,23	0,35
HexNAc4	0,00	0,13	0,00
Hex4HexNAc	0,08	0,00	0,31
Hex3HexNAc2	0,00	0,03	0,00
HexNAc5	0,00	0,09	0,00
Hex4HexNAc2	0,00	0,02	0,00
HexNAc6	0,00	0,02	0,00

© 2015 Tous droits réservés.

doc.univ-lille1.fr

b) Analyse de la composition en monosaccharides du surnageant et des liaisons glycosidiques après digestion par la chitosanase

La composition en monosaccharides du surnageant montre encore une fois une proportion importante de glucose relâché, nous n'observons pas de mannose et galactose dans le surnageant des conidies dormantes. Les polyhexoses seraient donc composés de Glucose (Fig. 44). Les structures composées de glucose ne semblent pas être une contamination extérieure puisqu'elles sont liées principalement en 1,3 (3-Glc) comme le montre l'analyse des PMAA. On confirme également le relargage de chitine avec la présence de t-GlcNAc et 4-GlcNAc (Fig.45).

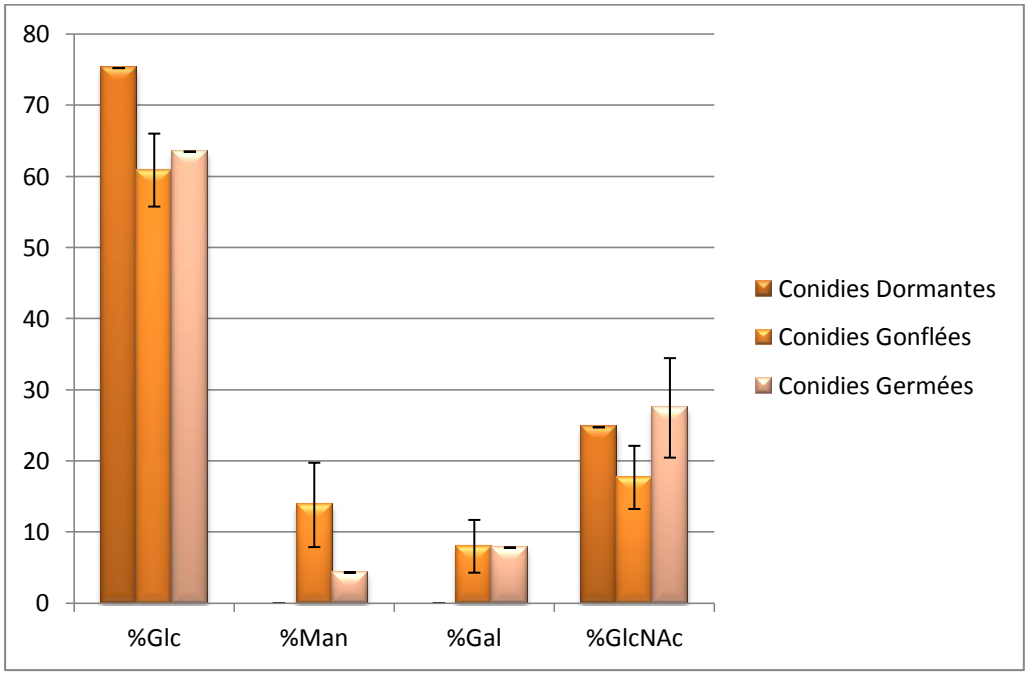


Figure 44 : Composition en monosaccharides des surnageants après digestion par la chitosanase des fractions AI des conidies au cours de la germination.

© 2015 Tous droits réservés.

doc.univ-lille1.fr

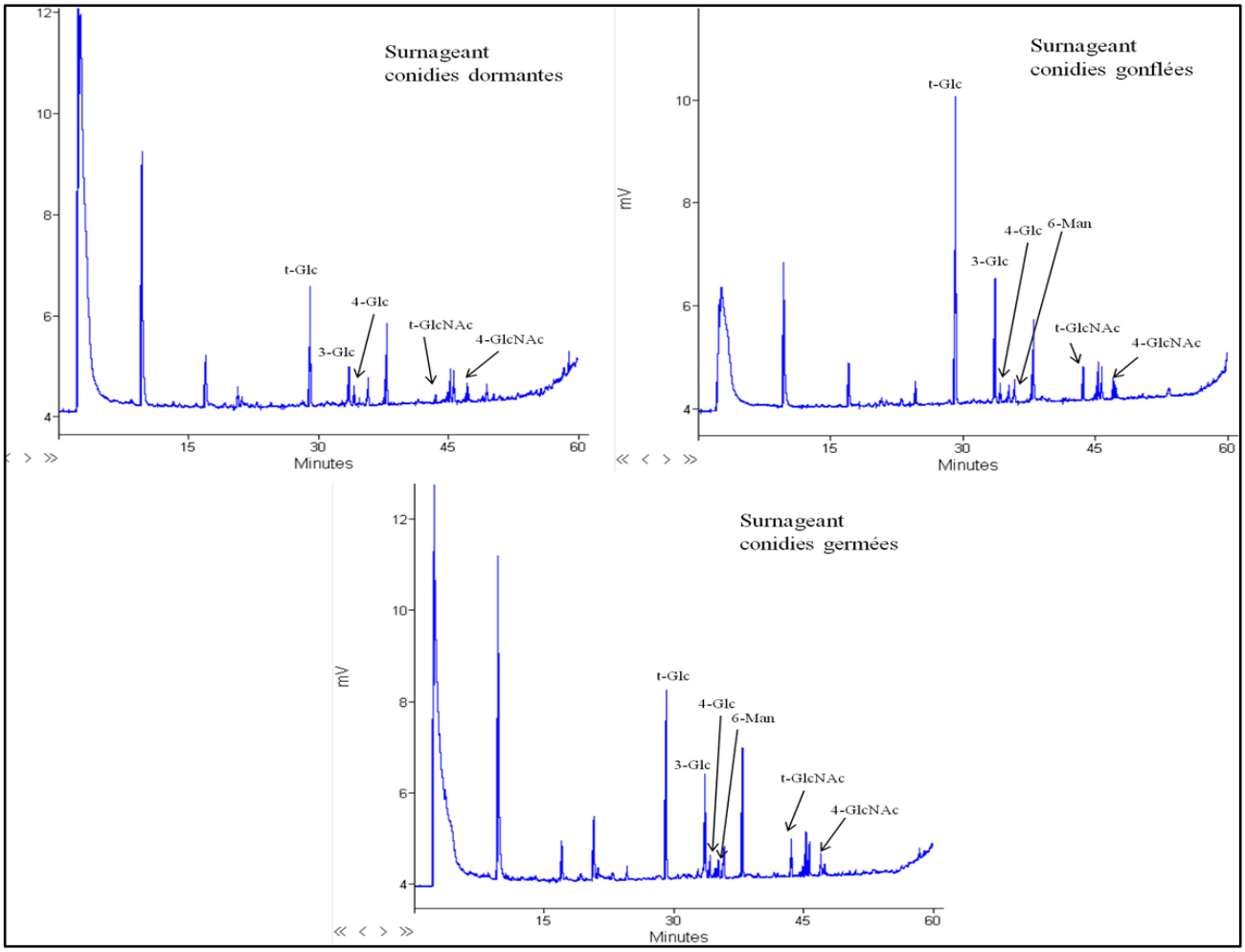


Figure 45 : Analyse des PMAA des surnageants des fractions AI après digestion par la chitosanase

2) *Analyse du culot résiduel après digestion par la chitosanase*

Le profil en monosaccharides après digestion à la chitosanase est proche de celui obtenu avant la digestion par cette enzyme (Fig. 46). La paroi des conidies dormantes n'est quasiment pas affectée par ce traitement. En revanche, comme le montre le tableau 15, la paroi des conidies germées, et dans une moindre mesure celle des conidies gonflées est fortement dégradée par ce processus. Les taux de GlcNAc et des constituants des galactomannanes sont fortement diminués, ainsi que le glucose dans une moindre proportion.

Tableau 15 : Pourcentage résiduel des monosaccharides de la fraction AI après digestion par la chitosanase

	% résiduel des monosaccharides de la fraction AI après digestion Chitosanase			
	Glc	Man	Gal	GlcNAc
C. dormantes	75,0	93,1	92,6	101,1
C. gonflées	70,5	78,1	81,8	71,3
C. germées	69,9	57,6	38,7	33,1

© 2015 Tous droits réservés.

doc.univ-lille1.fr

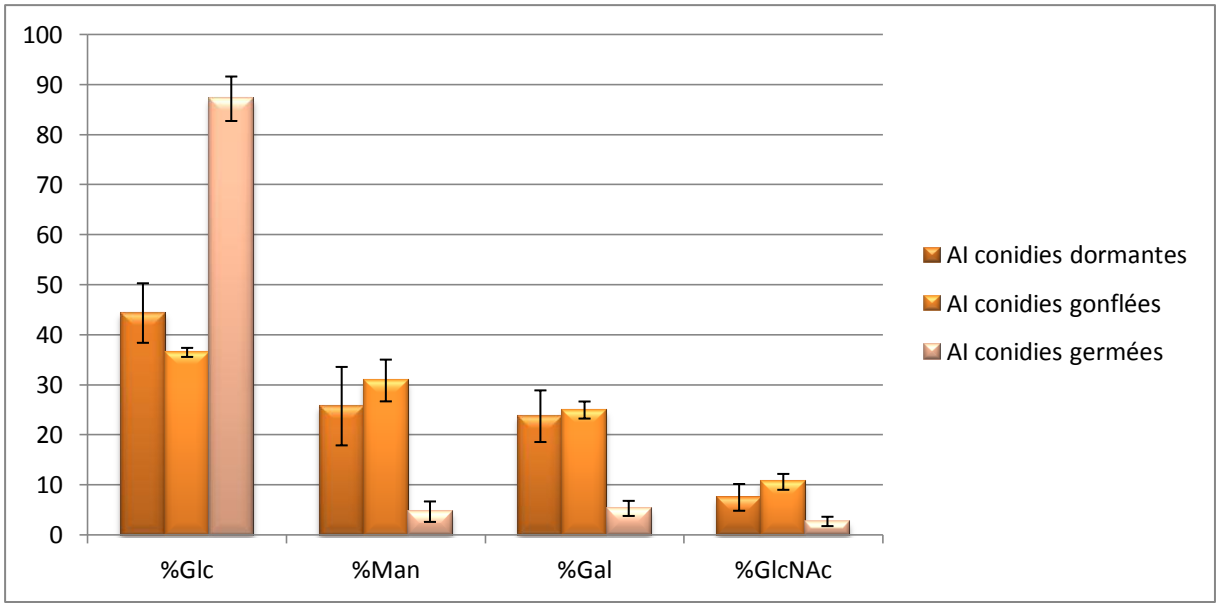
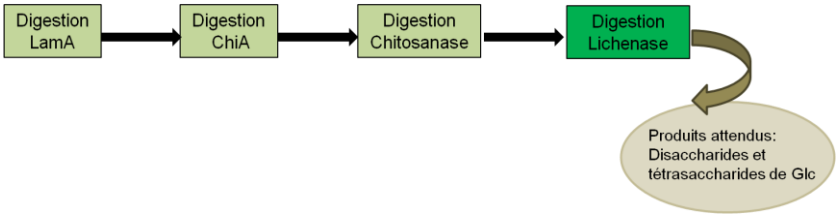


Figure 46 : Composition en monosaccharides des fractions AI résistantes à la digestion par la chitosanase des conidies au cours de la germination.

V) Etude des oligosaccharides libérés et du culot résiduel après digestion Lichénase



1) Analyse des oligosaccharides libérés dans le surnageant après digestion par la lichénase

a) Analyse des oligosaccharides libérés par spectrométrie de masse

La lichénase utilisée issue de *Bacillus subtilis* est une 1,3-1,4-β-D-glucan-4-glucanohydrolase (EC.3.2.1.73). C'est une enzyme qui clive spécifiquement les liaisons glycosidiques en β1,4 dans les chaînes de β-glucanes mélangeant des liaisons β1,3/ β1,4. Les produits de dégradation attendus sont principalement des disaccharides et des tétrasaccharides.

Comme attendu, nous observons des disaccharides et des tétrasaccharides mais également des trisaccharides. Les trois spectres présentent des masses correspondant à des chito-oligasaccharides, modestement dans le cas des conidies dormantes (moins de 3% des oligosaccharides) (Fig.47) mais de façon plus conséquente à partir des conidies gonflées (≈ 20 %) (Fig.48) et plus encore dans les conidies germées (≈ 50 % des oligosaccharides) (Fig.49).

© 2015 Tous droits réservés.

doc.univ-lille1.fr

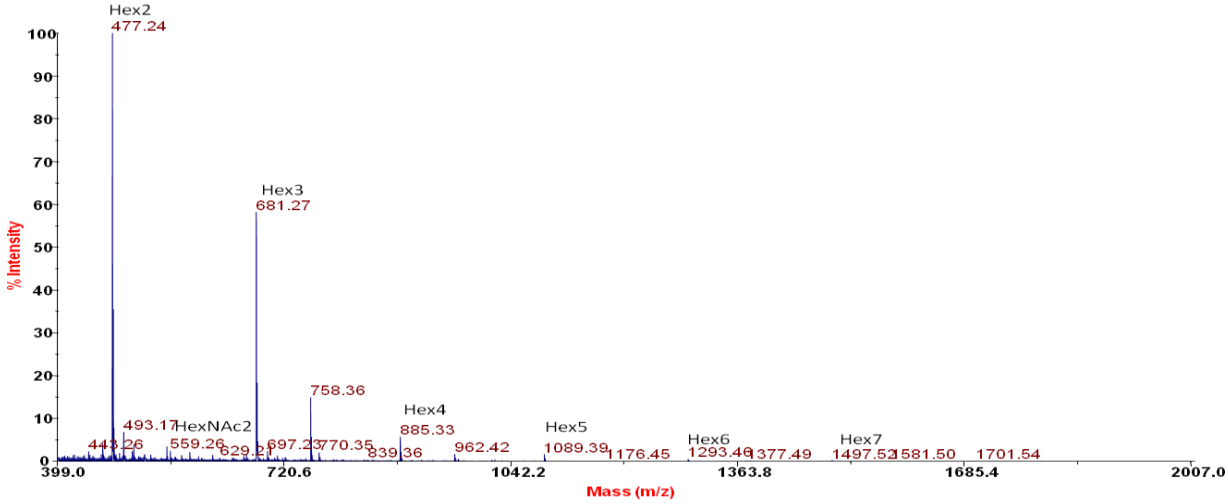


Figure 47 : Spectre de masse des oligosaccharides présents dans le surnageant après digestion Lichénase de la fraction AI des conidies dormantes.

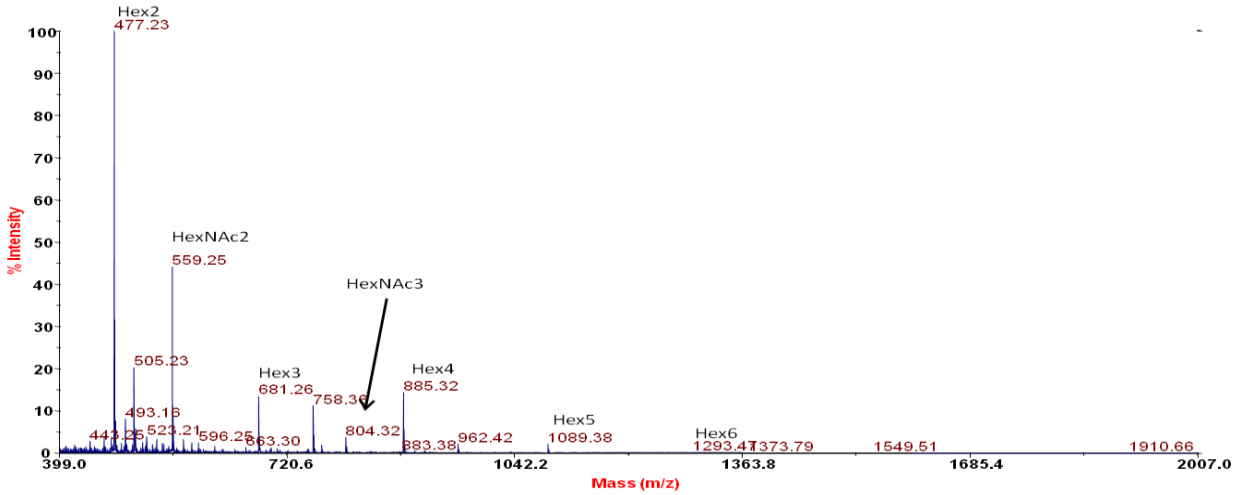


Figure 48 : Spectre de masse des oligosaccharides présents dans le surnageant après digestion Lichénase de la fraction AI des conidies gonflées.

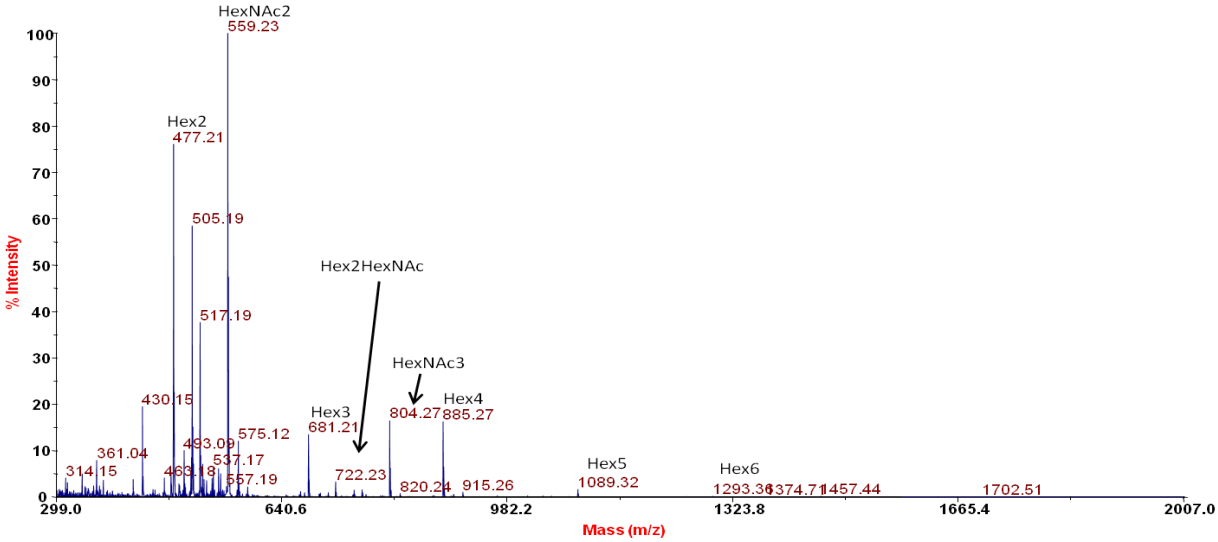


Figure 49 : Spectre de masse des oligosaccharides présents dans le surnageant après digestion Lichénase de la fraction AI des conidies germées.

© 2015 Tous droits réservés.

doc.univ-lille1.fr

Tableau 16 : Structures des oligosaccharides retrouvés dans le surnageant après digestion par la lichénase du culot résiduel après digestion par la chitosanase

Structures	Proportion relative en % des oligosaccharides		
	Surnageant c.dormantes	Surnageant c.gonflées	Surnageant c.germées
Hex2	70,33	58,69	40,72
(HexNH2)2	0,24	0,76	1,32
HexHexNAc	0,19	0,00	0,00
HexNAc2	2,63	19,27	44,92
Hex3	22,69	10,19	3,43
Hex2HexNAc	0,50	0,37	0,91
HexHexNAc2	0,23	0,04	0,00
HexNAc3	0,26	1,32	4,59
Hex4	2,10	8,06	3,57
Hex3HexNAc	0,10	0,13	0,00
Hex2HexNAc2	0,07	0,06	0,10
HexNAc4	0,00	0,00	0,04
Hex5	0,45	1,01	0,33
Hex4HexNAc	0,00	0,02	0,01
Hex3HexNAc2	0,01	0,00	0,00
Hex6	0,14	0,05	0,03
Hex4HexNAc2	0,04	0,00	0,01
Hex7	0,02	0,01	0,00

b) Analyse de la composition en monosaccharides du surnageant après digestion par la lichénase

La composition en monosaccharides des surnageants confirme ce que nous avons observé lors de l'analyse par spectrométrie de masse, c'est-à-dire la proportion importante de GlcNAc retrouvée à partir des surnageants des fractions AI digérés par la lichénase des conidies gonflées et germées ainsi que la proportion importante de glucose relâché (90%) chez les conidies dormantes. Il est à noter également que l'on n'observe pas de mannose et galactose dans ces conidies comme lors de la digestion à la chitosanase (Fig.50). La non-détection de mannose et de galactose peut-être due au fait que nous travaillons avec de faibles quantités de matériel pour ces digestions par la lichénase et chitosanase. Les proportions de glucose et de GlcNAc ont écrasé celles du galactose et du mannose.

© 2015 Tous droits réservés. doc.univ-lille1.fr

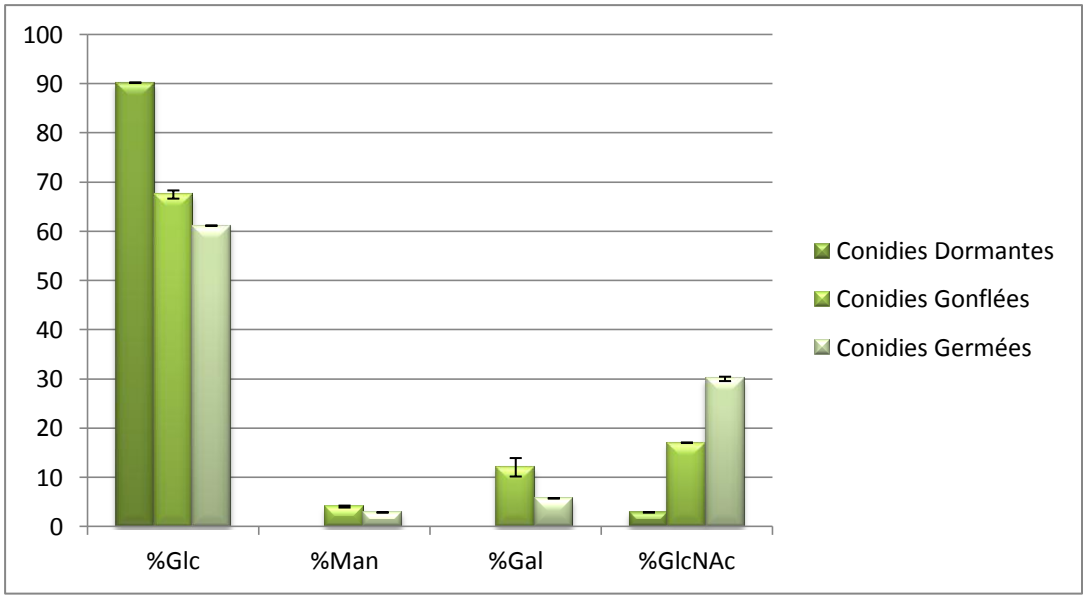


Figure 50 : Composition en monosaccharides des surnageants après digestion par la lichenase des fractions AI des conidies au cours de la germination.

c) Analyse des liaisons glycosidiques des oligosaccharides du surnageant libérés par la lichénase par GC-MS

Nous avons également effectué une analyse des liaisons glycosidiques de ces oligosaccharides libérés après cette digestion. Nous observons encore une fois le 2,4,6-triméthyl 1,3,5 triacétyl glucitol (3-Glc), t-Glc et du 2,3,6-triméthyl 1,4,5 triacétyl glucitol (4-Glc) caractéristiques de la digestion par la lichénase. Dans les conidies gonflées mais plus particulièrement dans les conidies germées, nous confirmons la présence de fragments de chitine par la présence de t-GlcNAc et 4-GlcNAc (Fig.51).

© 2015 Tous droits réservés.

doc.univ-lille1.fr

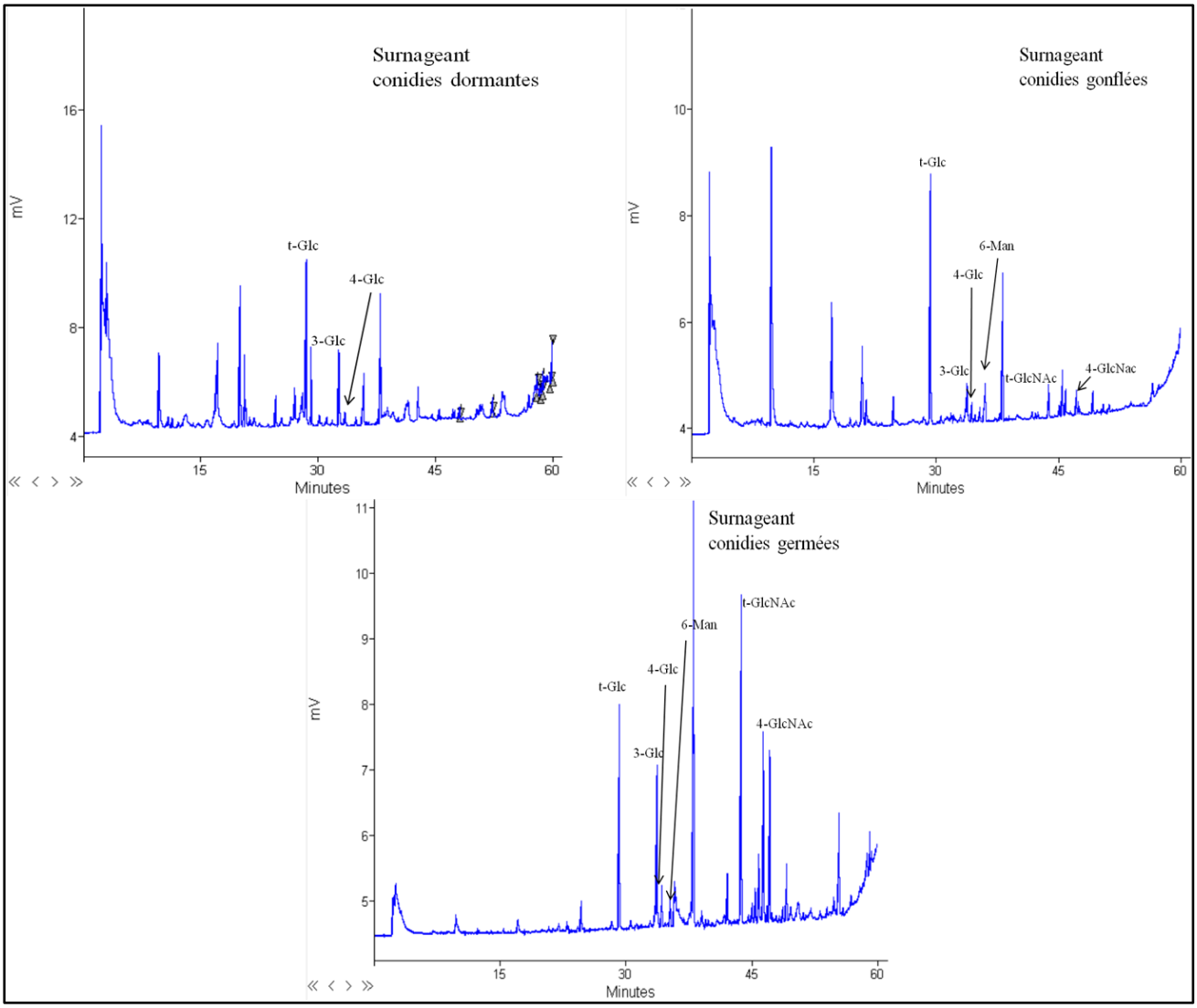


Figure 51 : Analyse des PMAA des surnageants des fractions AI digérées par la lichénase

2) Analyse du culot résiduel après la digestion par la lichénase

a) Analyse de la composition en monosaccharides du culot résiduel résistant à la digestion par la lichénase

La composition en monosaccharides du culot résistant à la lichénase montre des proportions similaires à celle suite à la digestion par la chitosanase (Fig.52). Cela est dû au fait que ce traitement élimine de façon relativement homogène tous les constituants pariétaux.

© 2015 Tous droits réservés.

doc.univ-lille1.fr

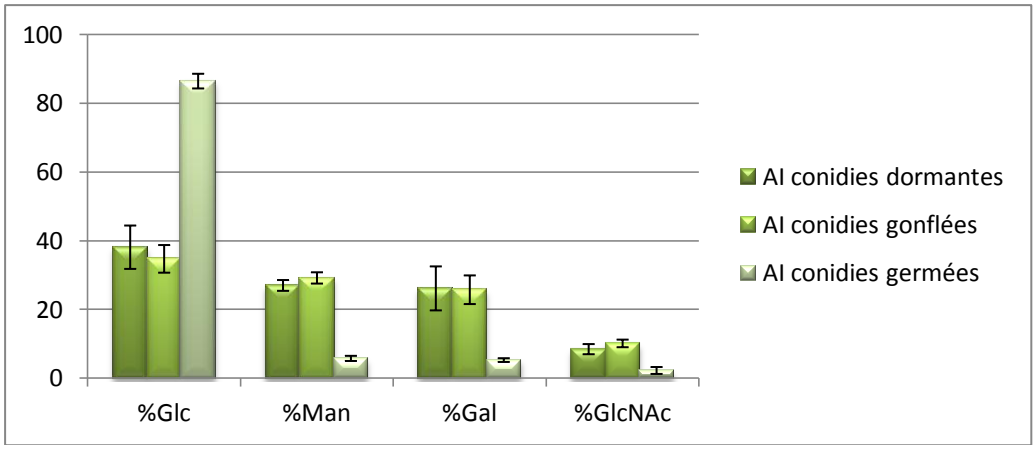


Figure 52 : Composition en monosaccharides des fractions AI résistantes à la digestion par la lichenase des conidies au cours de la germination

Tableau 17 : Pourcentage résiduel des monosaccharides de la fraction AI après la digestion par la lichénase

	% résiduel des monosaccharides de la fraction AI après digestion lichenase			
	Glc	Man	Gal	GlcNAc
C. dormantes	59,4	72,6	76,3	77,7
C. gonflées	67,3	67,1	73,3	67,3
C. germées	63,5	79,0	64,0	54,5

L'évolution des proportions en monosaccharides est récapitulée dans la figure 53. Nous avons, en majorité, dégradé le β1,3-glucane et la chitine. Le β1,3-glucane semble toujours le polysaccharide majoritaire chez les conidies germées alors les galactomannanes semblent prépondérants dans les conidies dormantes et gonflées.

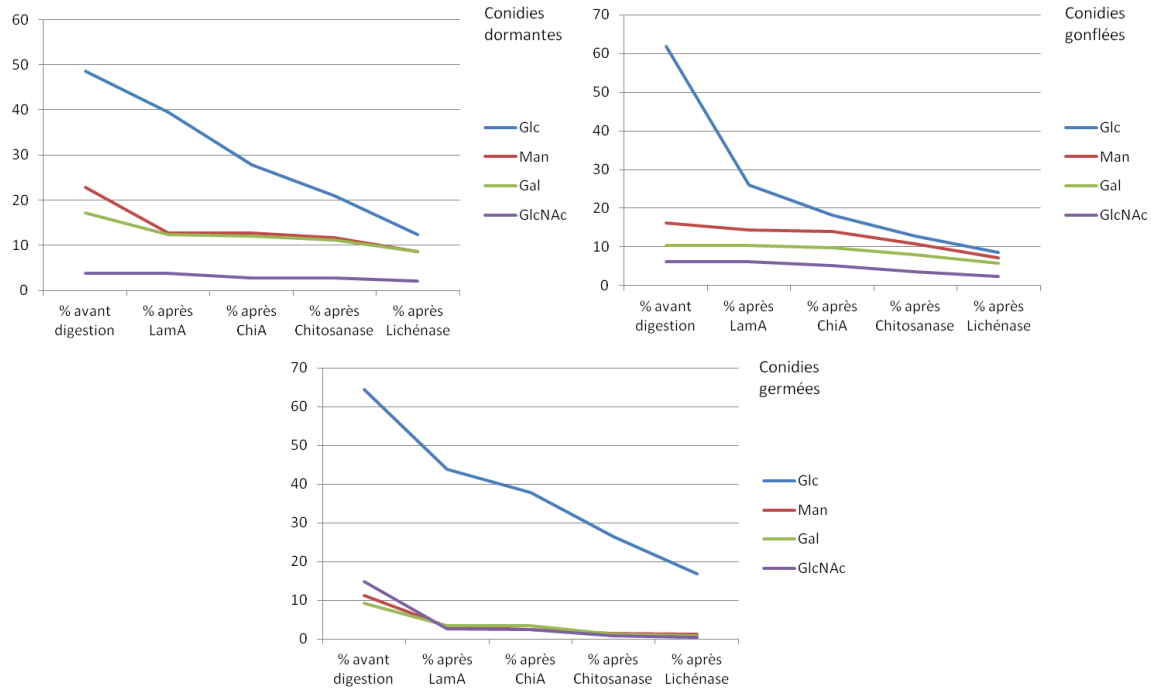


Figure 53 : Evolution des proportions en monosaccharides après chaque digestion.

© 2015 Tous droits réservés.

doc.univ-lille1.fr

b) Analyse des liaisons glycosidiques du culot résiduel résistant à la digestion par la lichénase par GC-MS

Nous avons également effectué une analyse des liaisons glycosidiques de cette fraction résistante à toutes les digestions. Les chromatogrammes résultant de cette analyse perfectible sont présentés dans les figures suivantes (Fig. 54, 55 et 56) :

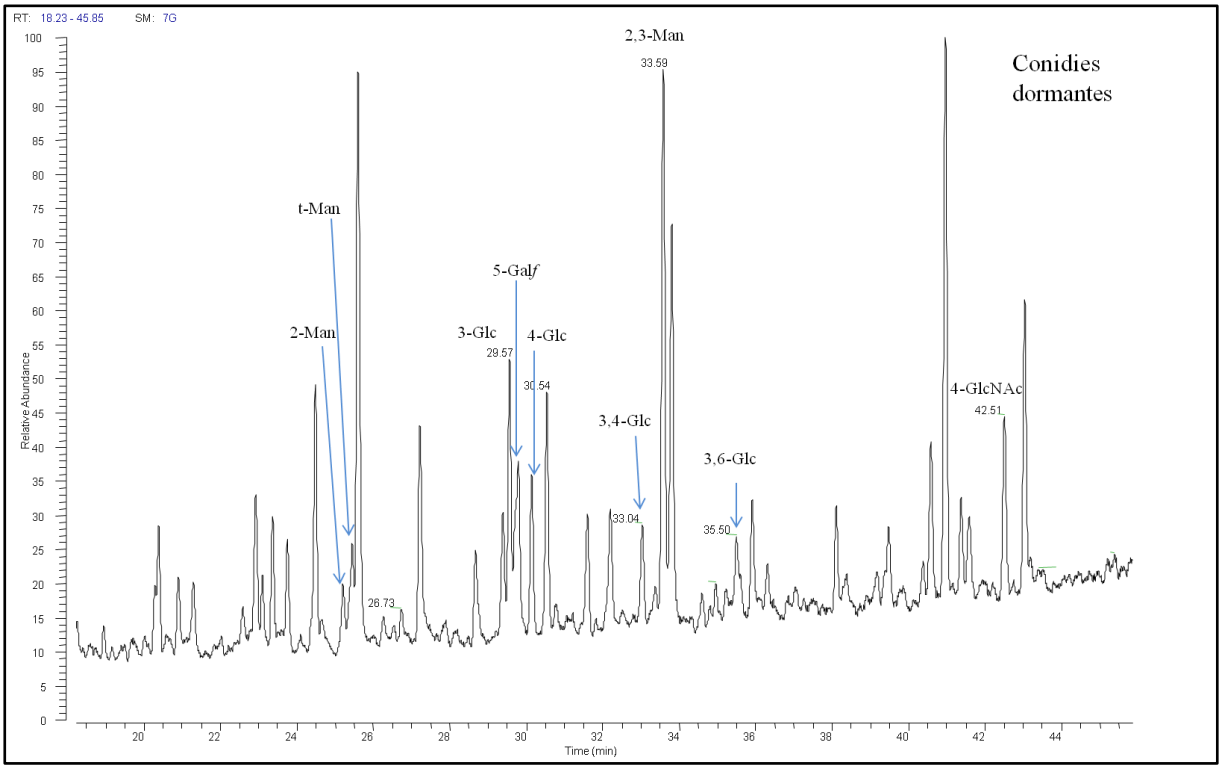


Figure 54 : Chromatogramme des PMAA de la fraction AI des conidies dormantes résistante à toute digestion

Sur ce chromatogramme, nous pouvons observer les PMAA caractéristiques des galactomannanes tels que le 4,6-diméthyl-1,2,3,5-tétraacétatyl-mannitol (2,3-Man) sur lequel se greffe les chaînes de galactofuranose en β1,5 ; 3,4,6-triméthyl-1,2,5-triacétatyl-mannitol (2-Man), le perméthyl-mannose (t-Man) et 2,3,4,6-tétraméthyl-1,5-diacétatyl galactitol (5-Gal*f*). On observe aussi le PMAA qui représente le point de branchement glucane-chitine : le 2,6-diméthyl-1,3,4,5-tétraacétatyl glucitol (3,4-Glc) ainsi que les points de branchement du β1,3-glucane avec le 2,4-diméthyl-1,3,5,6-tétraacétatyl glucitol. Enfin on observe le GlcNAcol-1-D-2,3,6-triméthyl-1,4,5-triacétate (4-GlcNAc) caractéristique de la chitine (Fig.54).

© 2015 Tous droits réservés.

doc.univ-lille1.fr

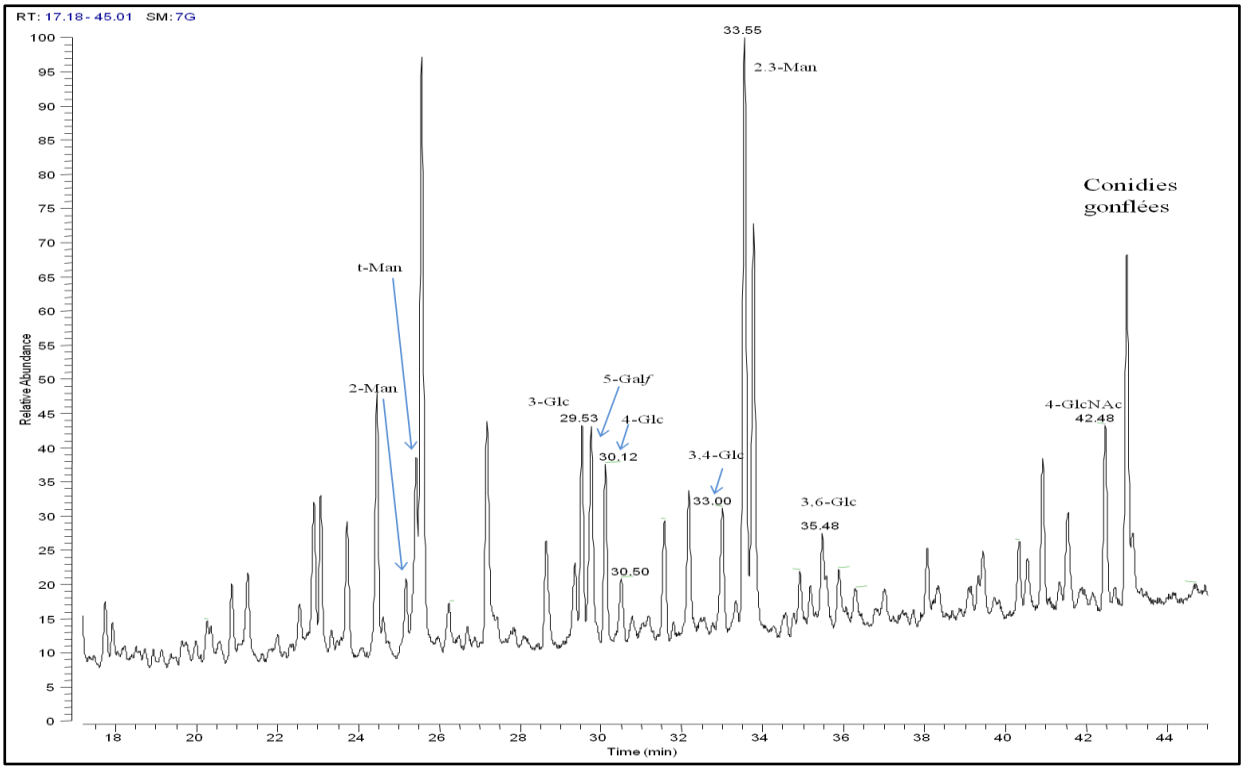


Figure 55 : Chromatogramme des PMAA de la fraction AI des conidies gonflées résistante à toute digestion

Concernant le profil obtenu pour les conidies gonflées, il est assez similaire à celui des conidies dormantes. On retrouve les différents points de branchement des polysaccharides : 3,6-Glc ; 3,4-Glc et 2,3-Man (Fig.55). Ces profils corroborent la composition en monosaccharides. Les proportions de Glc, Man, Gal et GlcNAc sont semblables entre les conidies dormantes et gonflées.

Enfin, pour les conidies germées, on observe une forte proportion de 3-Glc mais peu de 4-Glc donc les les glucanes résiduels sont majoritairement du β1,3-glucane et peu de β1,3/1,4-glucane contrairement aux conidies dormantes et gonflées où le 4-Glc était bien présent. On observe également les PMAA des points de branchement 3,6-Glc et 3,4-Glc ainsi que les PMAA issus de l'hydrolyse des galactomannanes ainsi qu'une faible proportion de 4-GlcNAc (Fig.56).

On peut donc suggérer que ces fractions non digérées sont composées de galactomannanes, de β1,3-glucane branché (3,6-Glc) ainsi que des points de branchement glucane-chitine (3,4-Glc).

© 2015 Tous droits réservés.

doc.univ-lille1.fr

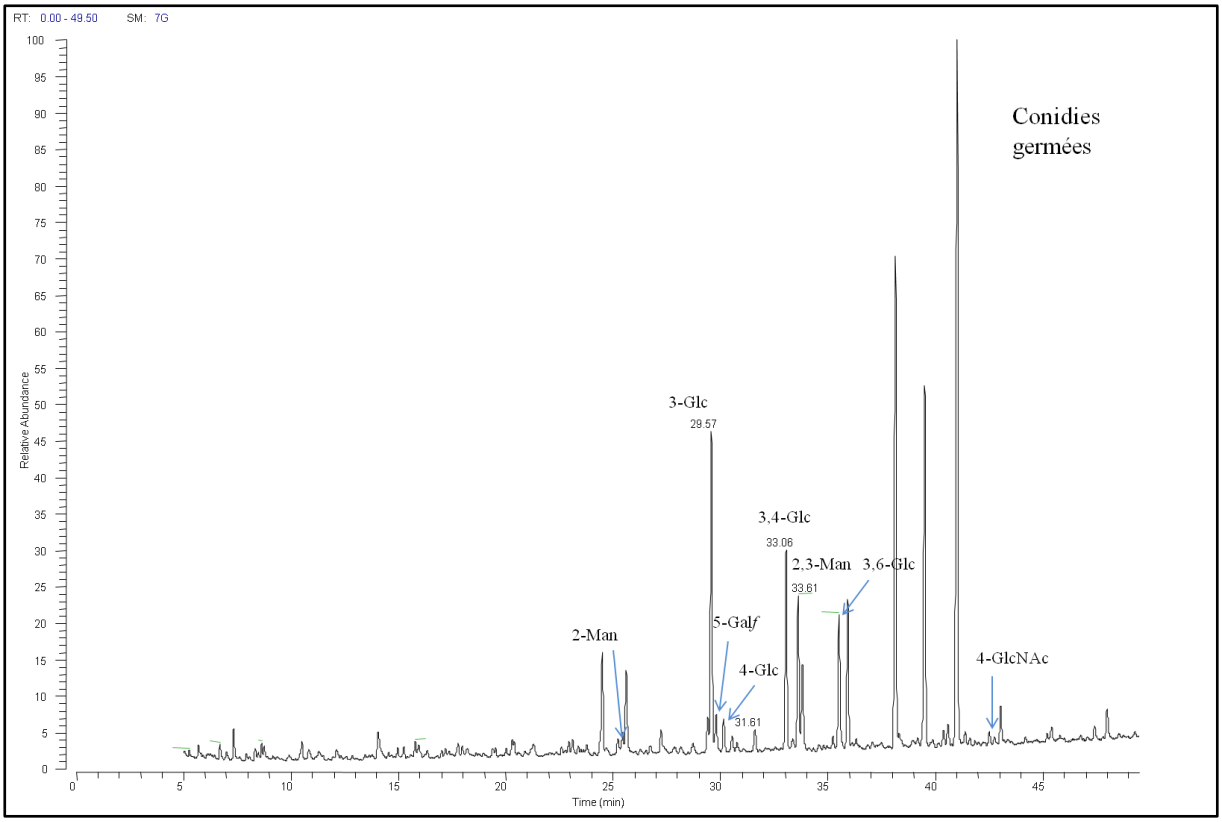


Figure 56 : Chromatogramme des PMAA de la fraction AI des conidies germées résistante à toute digestion

© 2015 Tous droits réservés.

doc.univ-lille1.fr

C-Etude de la fraction Alcalino-Soluble de la paroi d'*Aspergillus fumigatus*

La fraction alcalino-soluble est composée en majorité d'un polysaccharide, l'α1,3-glucane. La biosynthèse de ce polysaccharide est gouvernée par trois gènes AGS1, AGS2 et AGS3 codant les α1,3- glucane synthases respectives Ags1, Ags2 et Ags3. Un triple mutant a été contruit ce qui a permis de montrer que ces gènes n'étaient nécessaires ni à la survie, ni à la croissance d'*Aspergillus fumigatus*. Chez le triple mutant, l'absence d'α1,3-glucane est compensée par une augmentation de la quantité de β1,3-glucane. Contrairement à d'autres organismes pathogènes tels que *P. brasiliensis, H. capsulatum, B. dermatitidis* ou *C. neoformans* chez qui ce polysaccharide est important pour la virulence, chez *A. fumigatus*, l'α1,3-glucane aurait plutôt un rôle dans l'interaction entre hyphes ou entre conidies germées.

Le but de cette étude est de caractériser la structure de l'α1,3-glucane pendant la germination des conidies (conidies dormantes, gonflées et tubes germinatifs). Nous avons également estimé leur taille moléculaire ainsi que celles de différents mutants ags afin de déterminer le rôle de ces protéines dans la biosynthèse des α1,3-glucanes.

1) Composition en monosaccharides et Analyse des liaisons glycosidiques de la fraction AS

Comme cela a été montré précédemmement (Fig.24), la proportion de la fraction alcalino-soluble augmente au cours de la germination. Chez les conidies dormantes, elle représente 13% (+/- 0,5%) du poids pariétal, chez les conidies gonflées, le pourcentage augmente à 26,77% (+/-3,2%) pour culminer à 27,5% (+/-3%) de l'ensemble des polysaccharides de la paroi des tubes germinatifs. Parralèlement, on peut remarquer la disparition des galactomannanes dans cette fraction AS au cours de la germination.

La composition en monosaccharides a également été effectuée et est rappelée dans le tableau suivant :

Tableau 18 : Composition en monosaccharides de la fraction alcalino-soluble de la paroi de conidies au cours de la germination

AS	% Glucose	% Mannose	% Galactose
Conidies dormantes	78,275 +/-0,515	3,675 +/-0,985	17,9 +/-0,4
Conidies gonflées	93,79 +/-0,132	2,76 +/-0,412	3,4 +/-0,42
Tubes germinatifs	98,43 +/-0,777	1,17 +/-0,33	0,34 +/-0,3

Afin d'analyser plus précisement les fractions AS de la paroi des conidies d'*A. fumigatus* au cours de la germination, nous avons effectué une digestion par l'α1,3-glucanase. Les oligosaccharides solubles relâchés ont été analysés par MALDI-TOF après perméthylation (Fig. 60). Les profils de dégradation des fractions AS des conidies dormantes et gonflées semblent similaires avec la présence majoritaire d'oligosaccharides d'un dégré de polymérisation (DP) 2 et 3. Alors que pour l'AS des tubes germinatifs, les espèces majoritaires sont les oligosaccharides d'un DP 3, 4, 5, et 6. Cela suggère donc une organisation ou une structure des α1,3-glucanes différentes au cours de la germination.

© 2015 Tous droits réservés. doc.univ-lille1.fr

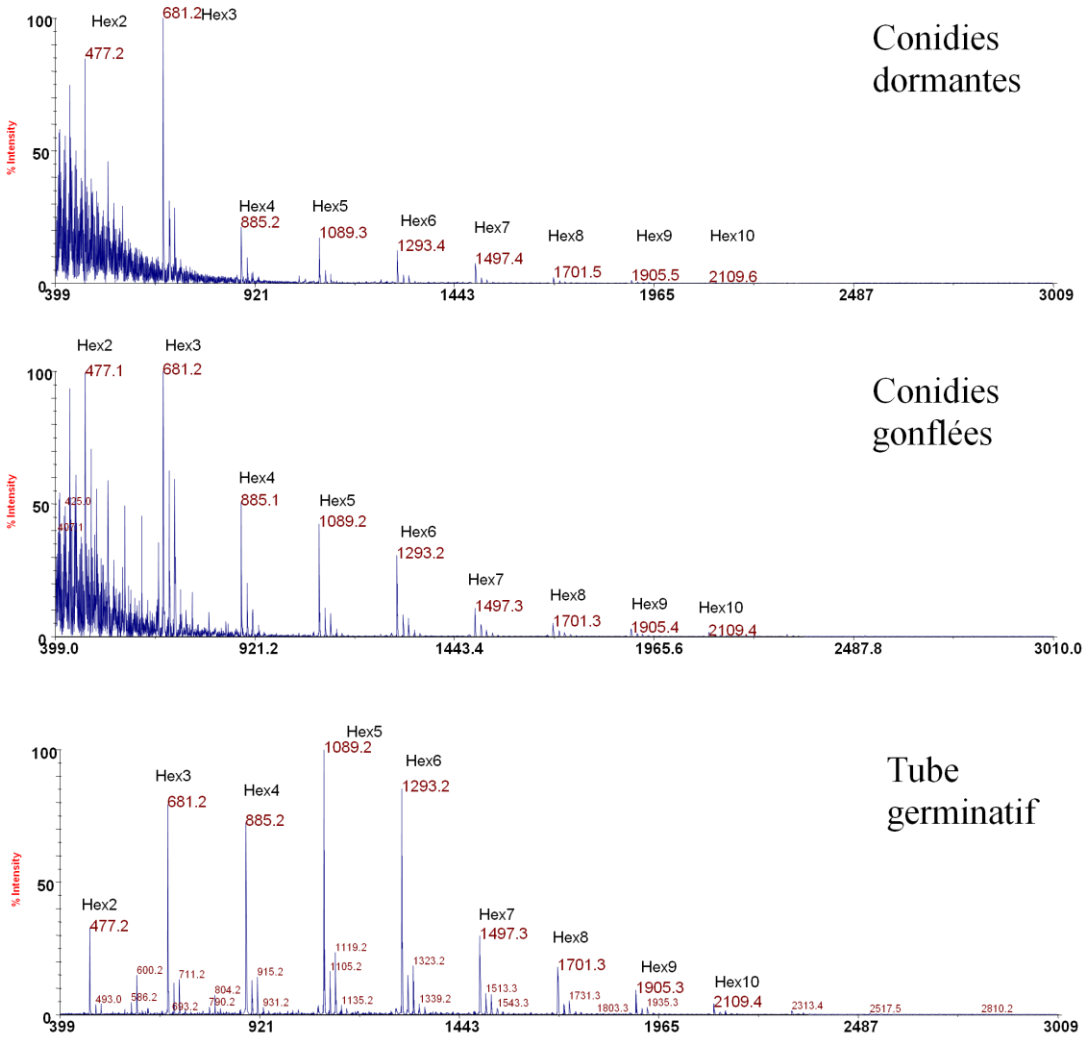


Figure 60 : Spectre de masse des oligosaccharides libérés après digestion par l'α1,3-glucanase des fractions AS au cours de la germination des conidies.

Nous avons, par la suite, effectué une analyse des liaisons glycosidiques par GC-MS des oligosaccharides relâchés par cette digestion enzymatique (Fig.62). Nous avons ainsi déterminé la présence de terminal-glucose (t-Glc), 3-Glc qui sont caractéristiques de l'α1,3-glucane ainsi que le 6-Man qui constituent les galactomannanes. Nous avons également observé la présence de 2,3,6-triméthyl-1,4,5 triacétylglucitol suggérant la présence de points de branchement en 1,4 notamment au stade « conidies gonflées » et « conidies germées ».

© 2015 Tous droits réservés.

doc.univ-lille1.fr

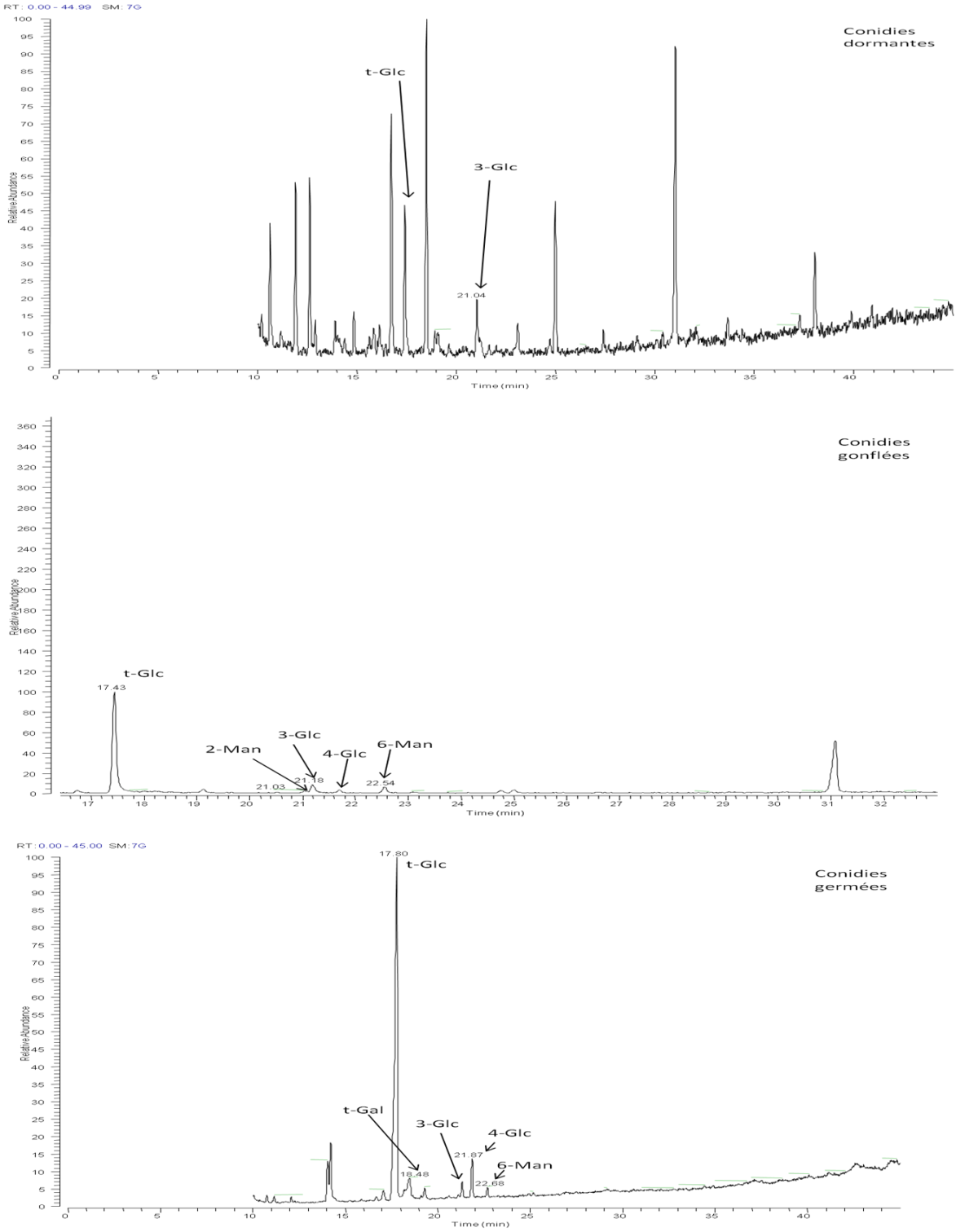


Figure 61 : Analyse des PMAA retrouvés dans les surnageants après digestion par l'α1,3glucanase

De la même manière, nous avons effectué une analyse des liaisons glycosidiques de la fraction résistante à cette digestion, nous trouvons le même type de PMAA. Nous pouvons observer la présence de 4-Glc qui pourrait correspondre à des points de branchement de l'α1,3-glucane (Fig.62).

© 2015 Tous droits réservés.

doc.univ-lille1.fr

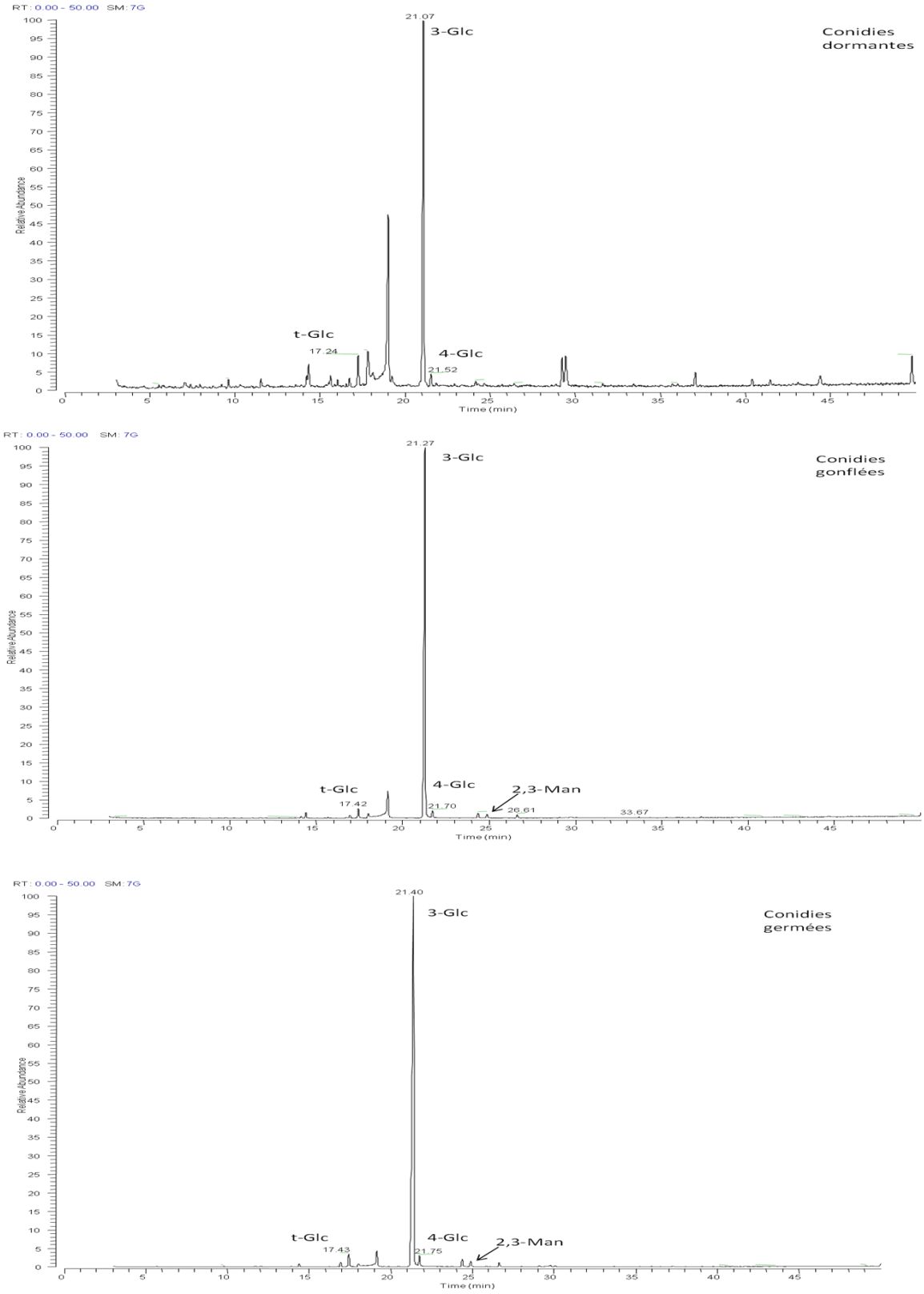


Figure 62 : Analyse des PMAA de la fraction résistante à la digestion par l'α1,3glucanase

© 2015 Tous droits réservés.

doc.univ-lille1.fr

II) Estimation de la masse moléculaire des chaînes d'α 1,3-glucanes par chromatographie d'exclusion

1) Calibration de la colonne de chromatographie d'exclusion HR 500S.

Nous avons entrepris l'étude de la taille des α1,3-glucanes dans deux contextes distincts. D'une part, l'étude a été menée pour déterminer s'il existe une variation de la taille de ces composés au cours de la germination des conidies. D'autre part, nous avons tenté de déterminer par l'analyse de mutants quelle(s) enzyme(s) est (sont) importante(s) pour la biosynthèse des α1,3-glucanes. Ce polysaccharide qui compose majoritairement la fraction AS n'étant pas soluble dans l'eau, il nous a fallu procéder à leur carboxyméthylation pour les solubiliser. La carboxyméthylation consiste en la substitution du groupe hydroxyle en C-6 par un groupement CH_2COOH dans un milieu alcalin par l'utilisation d'acide monochloroacétique. Les échantillons ont ensuite été soumis à une chromatographie d'exclusion.

La colonne HR 500S, dont le domaine de fractionnement se situe entre $4x10^4$ et $2x10^7$ Da, a été calibrée avec quatre dextrans de masses moléculaires différentes (12.000, 80.000, 410.000, 1.100.000 Da) (Fig.63). Ceci a permis d'obtenir une équation pour calculer les différentes masses moléculaires des α1,3-glucanes des conidies dormantes, gonflées, et germées ainsi que des différents mutants présentant une délétion pour les gènes codant des α-glucane synthases .

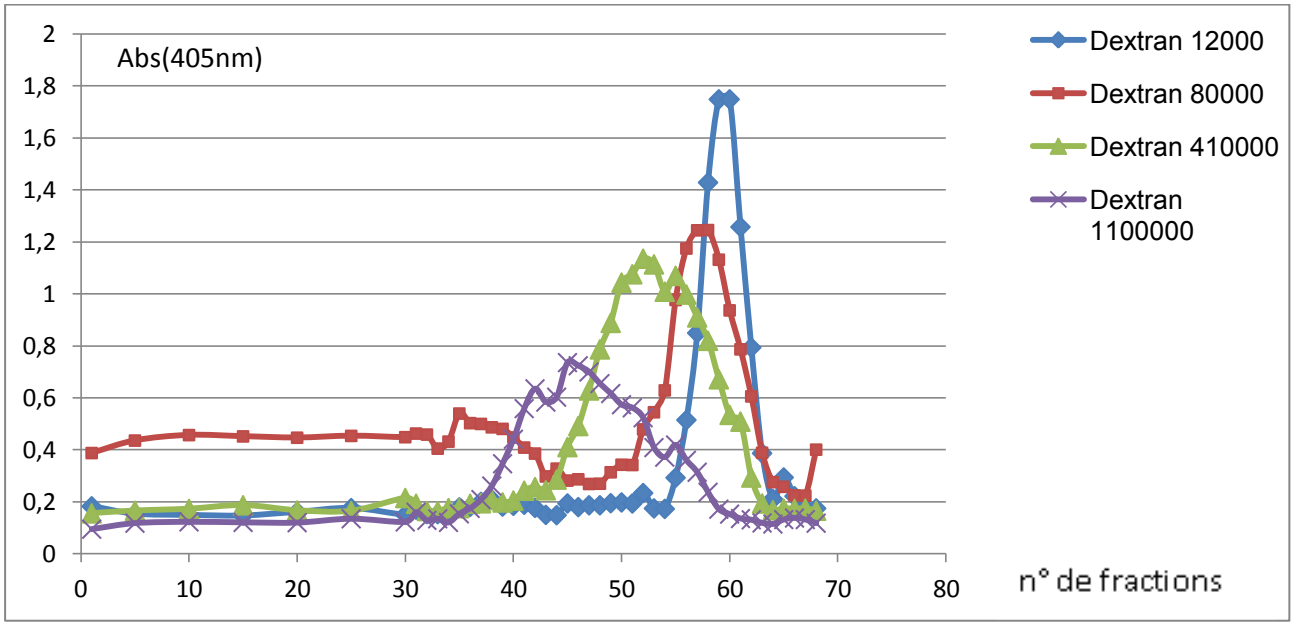


Figure 63 : Analyse des dextrans carboxyméthylés sur chromatographie d'exclusion

Pour le dextran 12.000 Da, le volume d'élution est de 129 ml. Pour le dextran 80.000 Da, le volume d'élution est de 122 ml. Pour le dextran 410 000 Da, le volume d'élution est de 115 ml. Enfin pour le dextran 1.100.000 Da, le volume d'élution est de 102 ml. Ces valeurs nous permettent de tracer la

© 2015 Tous droits réservés.

doc.univ-lille1.fr

droite d'étalonnage. L'équation ainsi obtenue nous permettra d'estimer la masse moléculaire de nos différentes fractions alcalino-solubles. (Fig.64).

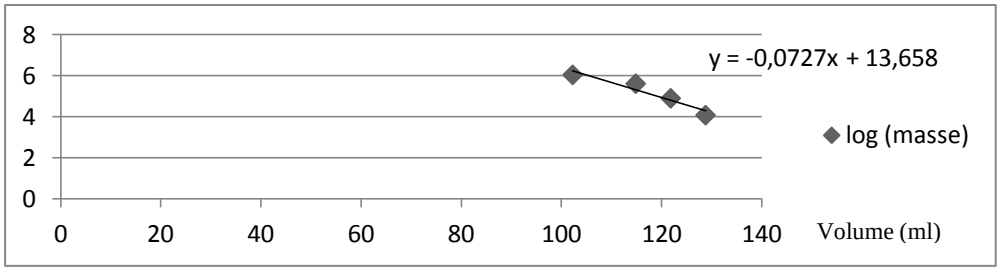


Figure 64 : Droite d'étalonnage de la chromatographie d'exclusion. Les volumes d'élution des 4 dextrans ont été reportés en abscisse en fonction du log de la masse du dextran ce qui nous a permis d'aboutir à l'équation de la droite afin de déterminer la masse moléculaire des α 1,3-glucanes.

2) Analyse des α 1,3-glucanes au cours de la germination des conidies

En utilisant l'équation de la droite d'étalonnage, nous avons déterminé la masse moléculaire des chaînes d'α1,3-glucanes aux différents stades de la germination. Chez les conidies dormantes, nous obtenons une masse de 77 000 Da. Chez les conidies gonflées, la masse moléculaire est comparable à environ 71 000 Da. En revanche, pour les conidies germées, nous obtenons unee masse de 424 575 Da. (Tableau 19)

Tableau 19 : Estimation de la masse des α1,3-glucanes au cours de la germination des conidies après chromatographie d'exclusion

	AS conidies dormantes	AS conidies gonflées	AS conidies germées
Volume d'élution	120,65 ml	121,1 ml	110,5 ml
Masse estimée	77 000 Da	71 000 Da	424 575 Da

3) Analyse des α 1,3-glucanes chez les mutants ΔAGS

Pour l'analyse des mutants, nous avons reçu les souches sauvages à partir desquelles ont été construits les différents mutants par l'unité des *Aspergillus* de l'Institut Pasteur (Paris). A partir de la souche sauvage DAL ont été construits les simples mutants ΔAGS1 et ΔAGS2 ainsi que le double mutant ΔAGS2-3. Quant au mutant ΔAGS3 il a été construit à partir de la souche G10. Les résultats de la chromatographie d'exclusion a permis d'estimer pour la souche sauvage DAL une masse moléculaire de 667 700 Da ; pour le mutant ΔAGS1, la valeur tombe dramatiquement à 79.700 Da. Concernant le mutant ΔAGS2-3, on obtient 757 000 Da, un même ordre de grandeur que pour la souche sauvage. Pour le mutant ΔAGS2, on obtient 609.000 Da. Ces résultats semblent suggérer que le gène AGS1 joue un rôle crucial dans le contrôle de la taille des α 1,3-glucanes tandis que le gène AGS2 ne semble pas impliqué dans la biosynthèse de ces composés. (Tableau 20).

© 2015 Tous droits réservés.
doc.univ-lille1.fr

Tableau 20 : Estimation de la masse des α1,3-glucanes des conidies de trois mutants et de la souche sauvage après chromatographie d'exclusion

	AS conidies DAL	**AS conidies Δags1**	**AS conidies Δags2**	**AS conidies Δags2-3**
Volume d'élution	108 ml	120,45 ml	108,3 ml	107 ml
Masse estimée	667 700 Da	79 700 Da	609 000 Da	757 000 Da

De la même manière, on a déterminé la masse moléculaire de l'α 1,3-glucane de la souche sauvage G10 et mutante ΔAGS3. En ce qui concerne la souche sauvage on obtient 132.000 Da. Pour le mutant ΔAGS3, on obtient deux valeurs, 310.000 Da et 24.000 Da. Ces deux dernières valeurs nous montrent la présence de deux familles de polysaccharides différents. (Tableau 21). Les résultats obtenus avec ΔAGS3 sont plus contrastés que ceux obtenus avec les deux autres gènes étudiés et présentent une masse supérieure à ce qui est présent chez la souche sauvage et une masse très inférieure.

Tableau 21 : Estimation de la masse des α1,3-glucanes des conidies du mutant Δags3 et de la souche sauvage G10 après chromatographie d'exclusion

	AS conidies G10	**AS conidies Δags3**
Volume d'élution	117 ml	112 ml 127 ml
Masse estimée	132 000 Da	310 000 Da 24 000 Da

© 2015 Tous droits réservés.

doc.univ-lille1.fr

D- Discussion et perspectives

L'étude des modifications pariétales des champignons au cours des étapes de germination est très peu décrite dns la littérature. En effet, la paroi mycéliale a été bien étudiée mais il est souvent trop tard pour contrecarrer le développement du champignon chez l'individu immunodéprimé. Alors qu'une meilleure connaissance de la structure de la paroi fongique au cours des stades précoces de l'infection pourrait permettre d'empêcher l'adhésion des champignons pathogènes à la matrice extracellulaire chez l'hôte. Dans ce travail de thèse, l'analyse de la paroi des conidies d'*Aspergillus fumigatus* nous a permis de montrer que celle-ci était remodelée au cours de la germination. Notamment, la proportion de la fraction AS augmente corrélée avec la diminution de celle de la fraction AI. Dans cette fraction AI qui constitue le squelette de la paroi fongique, nous avons pu observer une diminution de la part des β-glucanes et des galactomannanes au profit d'une augmentation de la part de chitine ainsi que la présence de GalNAc au stade « tube germinatif » qui est un constituant du galactosaminogalactane, un polysaccharide aux propriétés immunosuppressives (Fontaine T. *et al.,* 2011). La chitine est le polysaccharide qui assure la rigidité des parois fongiques. Au stade « conidies germées », sa proportion atteint environ 14% alors qu'elle était d'environ 4% au stade « conidies dormantes », et est quasiment équivalente à celle de la paroi du mycélium qui atteint 15% (Fontaine T. *et al.,* 2000). Cette synthèse de chitine pourrait être expliquée par la disparition progressive de la couche externe de la paroi conidiale qui est composée de mélanine et d'hydrophobines. Cette couche externe assurait jusqu'alors la protection du champignon face à son environnement. Chez *C. albicans*, il a aussi été observé une augmentation de la proportion de chitine du stade « blastospore » où elle est de 2 % et elle atteint 6 % au stade « mycélium » qui est la forme invasive de l'espèce comme *A. fumigatus* (Ruiz-Herrera J. *et al.,* 2006). La diminution des galactomannanes pourrait être expliquée par l'action d'enzymes encore inconnues les clivant de la partie glucanique à laquelle ils sont attachés de façon covalente et seraient alors sécrétés dans le milieu extracellulaire. Ces galactomannanes sont des molécules importantes du fait de leur caractère antigénique. Le ratio mannose : galactose a été déterminé lors de l'étude des galactomannanes extracellulaires sécrétés par le mycélium et était de 1 : 1,2 en moyenne (Latgé *et al.,* 1994). Nous avons commencé à étudier les galactomannanes des conidies germées notamment en passant une partie du surnageant après digestion par la LamA sur ConA qui est une lectine reconnaissant les structures mannosylées. Nous avons ainsi déterminé que la proportion de mannose est le double de celle de galactose dans la fraction alcalino-insoluble de la paroi des conidies germées. L'étude est à poursuivre par la détermination des liaisons glycosidiques par GC-MS ainsi que l'analyse des galactomannanes lors de la dormance et du gonflement des conidies.

Lors de toutes les digestions enzymatiques effectuées, outre les produits de dégradation attendus que ce soit du laminariobiose, -triose, tétraose après LamA, des chito-oligosaccharides après ChiA, des oligosaccharides composés de glucosamines et/ou de N-acétylglucosamines après chitosanase, des

© 2015 Tous droits réservés. doc.univ-lille1.fr

disaccharides ou tétrasaccharides de glucose après lichénase, nous avons pu observer par spectrométrie de masse des structures inattendues même si elles sont en faible quantité ajoutant de la complexité à la compréhension de l'architecture de cette paroi fongique. En effet, on trouve de petits oligosaccharides composés de glucose et de N-acétylglucosamine plus particulièrement au stade « tube germinatif ». On peut suggérer qu'au cours de la germination lors du remodelage de la paroi, les chitinases et les glucanases dégradent le β1,3-glucane et la chitine générant des oligosaccharides qui peuvent être ensuite transférés par des transglycosidases sur les polysaccharides résiduels ou en cours de synthèse créant de nouveaux réseaux dans cette architecture complexe (Fig.65). Par ailleurs, nous avons observé le relâchement d'oligosaccharides composés de glucose d'un DP 2 à 4 suite aux digestions par la ChiA et la chitosanase. Cela peut s'expliquer par la contamination par des activités enzymatiques résiduelles de ces enzymes produites au laboratoire ou industrielles.

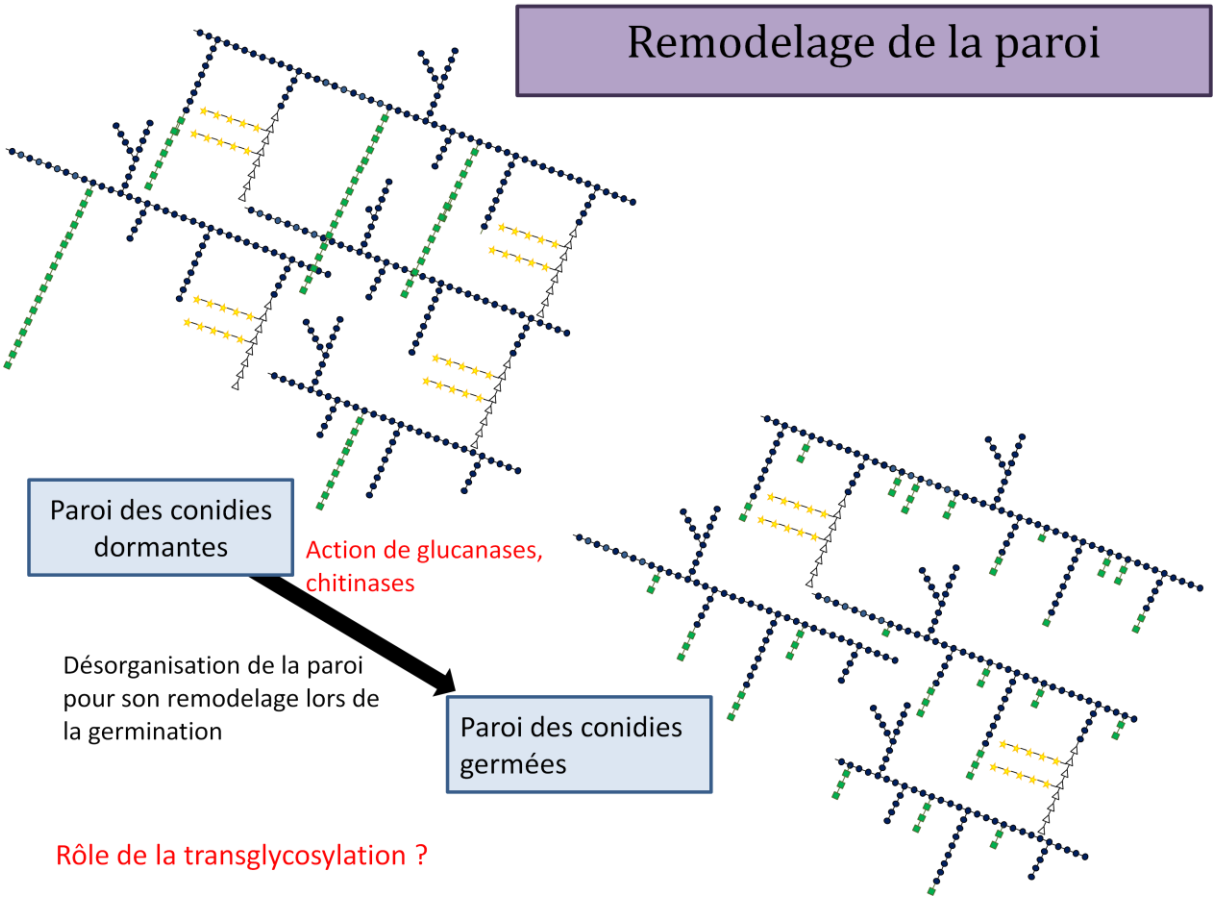


Figure 65 : Hypothèse du remodelage de la paroi au cours de la germination qui expliquerait la libération des oligosaccharides composés de GlcNAc et de Glucose

Par spectrométrie de masse, nous avons également pu observer des oligosaccharides constitués de glucosamine avec ou sans hexoses nous indiquant la présence de chitosan. Ces structures ont été plus particulièrement observées au niveau des fractions AI des conidies gonflées et germées. On peut ainsi suggérer que les chitine déacétylases agiraient à cette étape afin de rendre un peu moins rigide la paroi

© 2015 Tous droits réservés. doc.univ-lille1.fr

favorisant ainsi l'émergence du tube germinatif et son élongation à partir de l'apex. Cependant, sa quantification par GC-FID n'est pas possible par les méthodes d'analyse que nous avons utilisées à cause de la N-réacétylation. Un traitement à l'acide nitreux serait à envisager afin de déterminer la proportion de glucosamine. Ce traitement clive la liaison glycosidique entre deux glucosamines, les glucosamines sont libérées sous forme de 2,5 anhydromannose qui sera réduit en 2,5 anhydromannitol qui pourra être quantifié par chromatographie phase gazeuse.

Nous avons également analysé les fractions alcalino-solubles ce qui a permis de mettre en évidence la présence de résidus de glucose liés en 1,4. Afin d'estimer le pourcentage de points de branchement en 1,4 des unités de glucose, nous devons envisager une séparation des oligosaccharides libérés après digestion par α-glucanase par HPLC et collecter les fractions contenant ces oligosaccharides. Nous pourrons ainsi vérifier par la même occasion leur structure en étudiant leur liaison pour confirmer que les résidus de glucose liés en 1,4 sont bien des points de branchement de l'α1,3-glucane et non une contamination. Nous avons également déterminé le poids moléculaire des α1,3-glucanes, par chromatographie d'exclusion, les résultats obtenus semblent suggérer une élongation des chaînes d'α1,3-glucanes au cours de la germination. De plus, le gène essentiel à cette synthèse serait AGS1 puisque sa délétion entraîne une forte diminution du poids moléculaire de ce polysaccharide par rapport aux souches WT (DAL et G10) et mutantes Δags2, 2-3 et 3. Par ailleurs, il avait été montré que seul le mutant Δags1 présentait une diminution du contenu en α1,3-glucane (Beauvais A. *et al.*, 2005). Concernant le mutant Δags3, il semble exister deux types de chaines d'α1,3-glucane. Ags3p est une protéine membranaire de 268kDa et partage 56% d'identité avec Ags1p et Ags2p. Elle contient des domaines potentiels avec une activité synthase et transglycosidase. La présence de ces 2 polysaccharides de tailles différentes chez ce mutant pourrait être expliquée par l'absence de l'activité transglycosidase due à cette enzyme qui lierait les chaînes synthétisées par Ags1p. Chez *A. nidulans*, 2 α-glucanes synthase AgsA et AgsB ainsi que 2 amylases AmyD et AmyG sont impliquées dans la biosynthèse de l'α1,3-glucane. AgsB, AmyD et AmyG font partie d'un même cluster de gènes conservé chez toutes les espèces d'*Aspergillus* sauf *A. fumigatus*. AgsB est l'enzyme majeure de la synthèse de ce polysaccharide qui est régulée par AmyG et AmyD. AmyG promeut cette synthèse tandis qu'AmyD a un effet répressif (He X. *et al.*, 2014). AgtA, l'homologue d'AmyD chez *A. niger* a un rôle de « glucanosyltransférase » qui agit sur les liaisons glycosidiques en α1,4 (van der Kaaij R.M. *et al.*, 2007). Amy1, l'homologue d'AmyG chez *H. capsulatum* est essentiel à la synthèse des α1,3-glucanes (Marion C.L. *et al.*,2006 ; Camacho E. *et al.*,2012). Il a été suggéré que ces amylases auraient un rôle dans les liaisons en α1,4 pour générer une structure primaire nécessaire à une synthèse efficace d'α1,3-glucane. On peut ainsi émettre l'hypothèse qu'Ags3 chez *A. fumigatus* pourrait avoir un rôle similaire à ces amylases. Par ailleurs, il a aussi été montré que l'α1,3-glucane est aussi l'un des composants de la matrice extracellulaire hydrophobe qui va « coller » les hyphes entre eux et former ainsi *in vitro* un biofilm en conditions statiques aériennes. Les colonies en biofilm ont

© 2015 Tous droits réservés. doc.univ-lille1.fr

une meilleure croissance et sont souvent plus résistantes aux anti-fongiques comme l'Amphotéricine B ou la nystatine. *In vivo*, le biofilm se forme lors de l'invasion de l'hôte et sa composition varie selon la pathologie aspergillaire (Beauvais A. *et al.,* 2007). Plus récemment, il a été montré l'importance de l'α1,3-glucane puisque chez le triple mutant Δags, la paroi conidiale était restructurée ce qui entraînait l'avirulence d'*Aspergillus fumigatus*. En effet, la couche externe d'hydrophobines de la paroi conidiale est recouverte par une matrice de glycoprotéines suite à l'absence d'α1,3-glucane entraînant une reconnaissance rapide par le système immunitaire de l'hôte. Ce polysaccharide aurait également un rôle dans le masquage du β1,3-glucane et de la chitine retardant l'initiation de la réponse immunitaire (Beauvais *et al.,* 2013). Ainsi, une meilleure connaissance de la structure des α1,3-glucanes ainsi que leur biosynthèse et de leur remodelage semblent nécessaires afin de limiter l'agrégation des conidies menant la formation des biofilms plus résistants aux conditions environnementales.

© 2015 Tous droits réservés.

doc.univ-lille1.fr

Partie 2 : Analyse des protoplastes en régénération

L'enchaînement des évènements de biosynthèse de la paroi demeure inconnu ainsi que les enzymes impliquées. En effet, il existe plusieurs enzymes synthétisant le même polysaccharide et les expériences de délétion de gène entraînaient soit l'expression d'autres gènes impliqués dans la synthèse du même polysaccharide, soit l'expression de gènes favorisant la synthèse d'un autre polysaccharide par phénomène de compensation.
Dans cette 2ème partie du travail de thèse, nous avons commencé l'analyse de la paroi de protoplastes en régénération afin de déterminer quels sont les polysaccharides synthétisés en premier.

Pour cela, dans un premier temps, nous avons étudié la paroi de protoplastes en régénération à différents temps : 10 min ; 30 min ; 1h et 2h. Les conidies germées ont été récupérées au bout de 9h de culture dans un milieu de germination. Ces conidies ont ensuite subi un traitement enzymatique dans le but de dégrader leur paroi. Puis, après plusieurs lavages, les protoplastes générés ont été placés dans un milieu de régénération. Lors de la première expérience de régénération de protoplastes, nous avons récupéré une faible quantité de paroi à analyser donc nous avons simplement effectué une composition en monosaccharides par la méthode des alditols-acétates suite à une hydrolyse ATFA (Fig.66). Nous avons ainsi pu déterminer la présence majoritaire de glucose qui compose les α et β-glucanes ainsi qu'une faible proportion de galactose et de mannose. Nous n'avions pas fait d'hydrolyse HCl pensant ne pas trouver de GlcNAc. Cependant, lorsque nous avons effectué une perméthylation de ces polysaccharides afin d'analyser les liaisons glycosidiques, nous avons pu observer la présence de t-GlcNAc et de 4-GlcNAc signifiant une synthèse précoce de chitine lors de la régénération de la paroi (Fig.67).

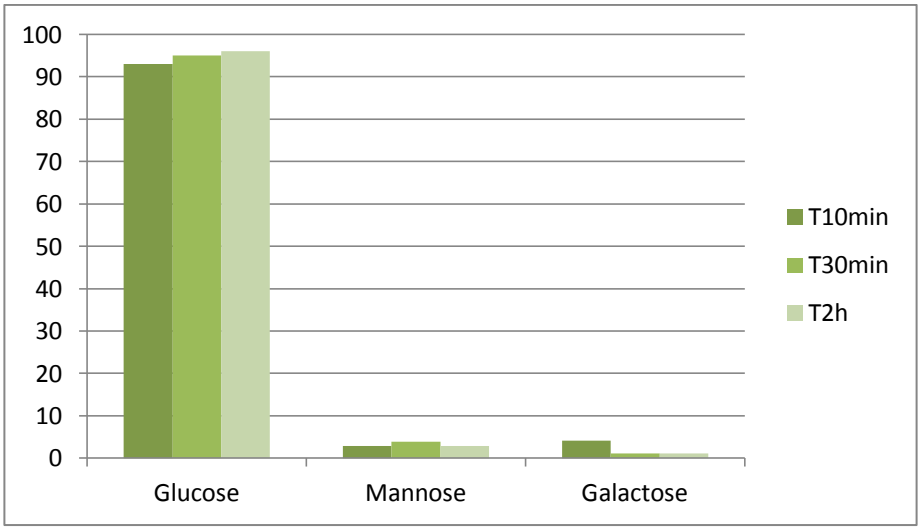


Figure 66 : Composition en monosaccharides de la paroi des protoplastes à différents temps de régénération (10min, 30min, 2h)

L'analyse des liaisons glycosidiques par les PMAA montre que les unités de glucose sont liées en 3 correspondant à l'α- ou β-1,3-glucane et en 4 qui pourrait correspondre au β1,3/1,4-glucane. On

© 2015 Tous droits réservés.
doc.univ-lille1.fr

observe également des PMAA caractéristiques de la structure des galactomannanes tels que 6-Man, le 2,3-Man et le t-Gal. (Fig.67)

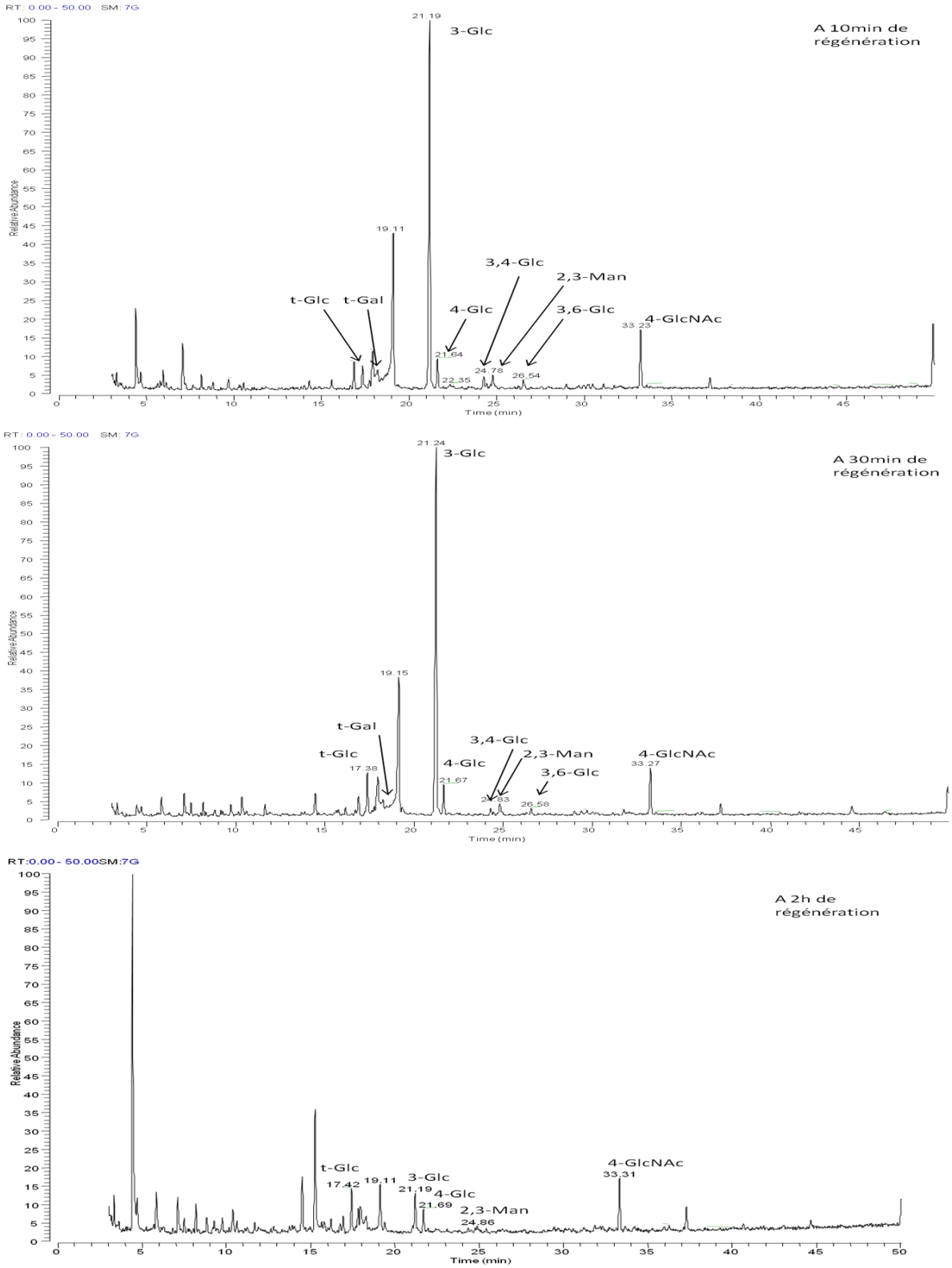


Figure 67 : Analyse des liaisons glycosidiques de la paroi totale des protoplastes en régénération d'*Aspergillus fumigatus*

© 2015 Tous droits réservés.

doc.univ-lille1.fr

Nous avons réitéré l'expérience en choisissant des temps de régénération de 1h et 2h. Nous avons récupéré une quantité suffisante de paroi afin d'effectuer un traitement alcalin pour déterminer la proportion de la fraction AI et AS. Nous avons ainsi pu déterminer que la fraction AS était majoritaire aux temps de régénération 1h et 2h et qu'elle culminait à 67% au bout de 2h (Tableau 22).

Tableau 22 : Proportion des fractions AI et AS des protoplastes en régénération à 1h et 2h

	AI protoplastes T1h	**AS protoplastes T1h**	**AI protoplastes T2h**	**AS protoplastes T2h**
Masse en mg	4,8	6,1	5,6	11,3
% paroi	44,03	55,97	33,14	66,86

Nous avons également effectué une composition en monosaccharides sur ces fractions. Concernant les fractions AS, le glucose tient une part importante, les proportions de mannose et de galactose sont inférieures à 2% et on peut noter la présence de GlcNAc. Concernant les fractions AI, les quantités de glucose, mannose, galactose et GlcNAc diminuent à 2h de régénération mais suivent le même profil de ratio par rapport au temps de régénération de 1h (Fig.68).

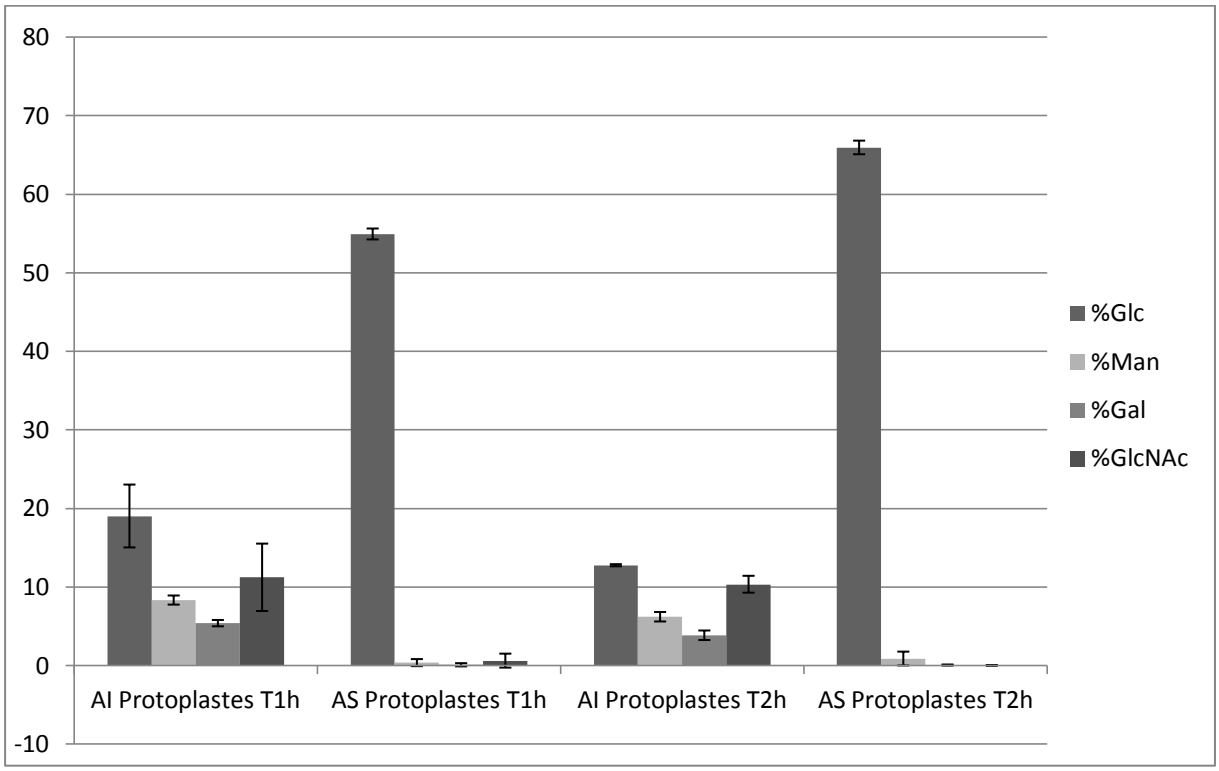


Figure 68 : Composition en monosaccharides des fractions AI et AS des protoplastes en régénération d'*A. fumigatus*.

© 2015 Tous droits réservés.

doc.univ-lille1.fr

Nous avons également effectué une analyse des PMAA des fractions AI et AS des protoplastes aux temps de régénération 1h et 2h (Fig.69). Pour les fractions AS, nous n'avons que déterminé la présence de t-Glc et 3-Glc caractéristiques de l'α1,3-glucane. Concernant les fractions AI, à 2h, on observe les points de branchement de polysaccharides avec le 3,6-Glc (Glucitol-1-D-2,4-diméthyl-1,3,5,6-tétraacétate) du β1,3-glucane et le 3,4-Glc (Glucitol-1-D-2,6-diméthyl-3,4,5-triacétate) de la liaison glucane-chitine. On aurait donc une structure plus branchée à t2h. A t1h, on peut suggérer qu'il y ait synthèse de longues chaînes de polysaccharides qui sont ensuite remodelées pour former une structure plus résistante.

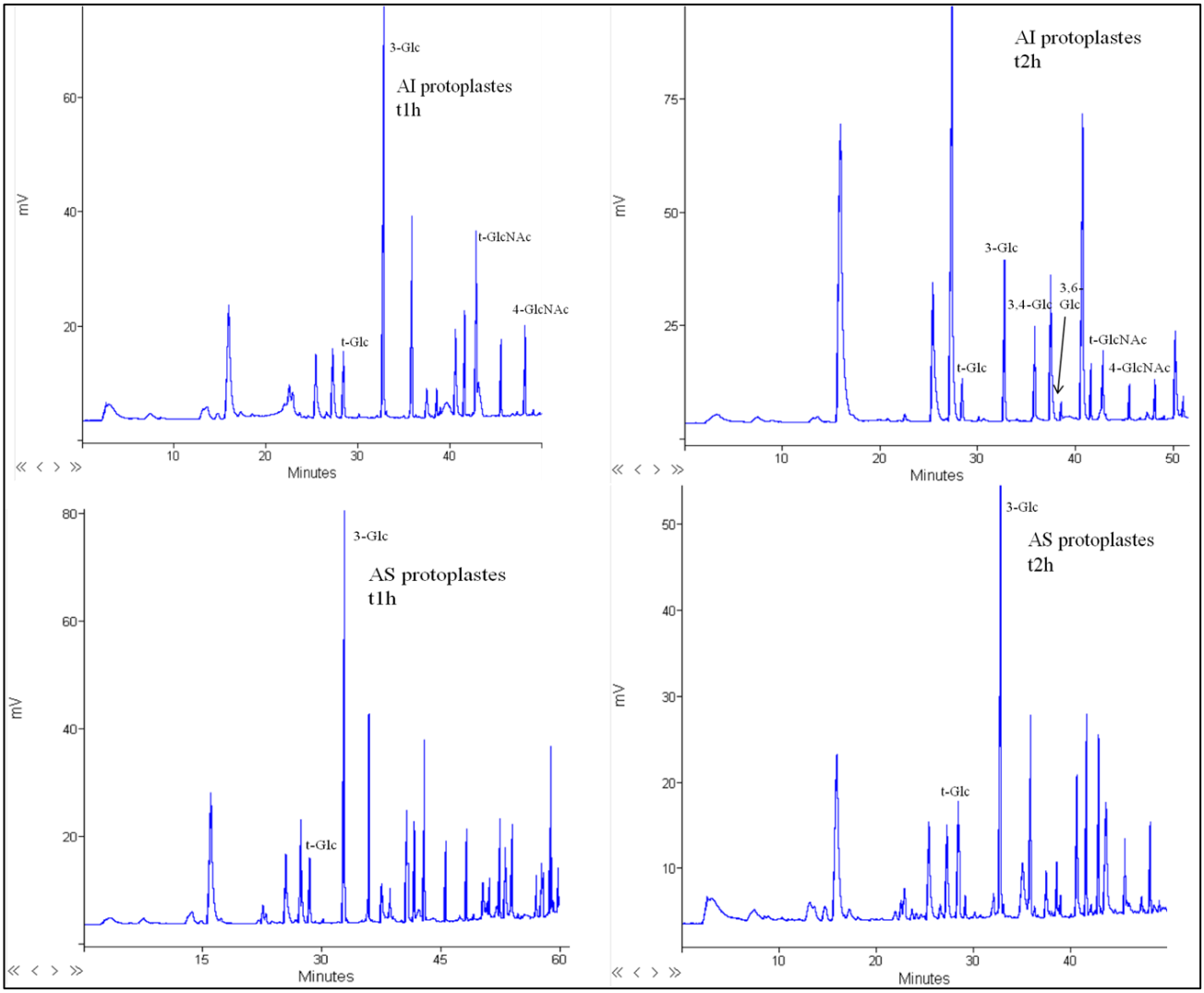


Figure 69 : Chromatogramme des PMAA retrouvés dans les fractions AI et AS des protoplastes au temps de régénération 1h et 2h.

© 2015 Tous droits réservés.

doc.univ-lille1.fr

Discussion et pespectives :

L'étude de la paroi de protoplastes en régénération d'*Aspergillus fumigatus* a mis en évidence la biosynthèse précoce de tous les polysaccharides dès 10 min de régénération que ce soit les glucanes, la chitine et les galactomannanes.

Lors d'une seconde expérience où nous avons choisi des temps de régénération de 1h et 2h, nous avons mis en évidence la prépondérance quantitative de la fraction AS sur la fraction AI. Cette prépondérance tend même à s'accroître avec le temps dans la mesure où la proportion de la fraction AS dans la paroi augmente de plus de 10 % durant le laps de temps correspondant. Ce résultat peut être paradoxal dans la mesure où la proportion de fraction AI a toujours été supérieure à celle de la fraction AS au cours de la germination des conidies. La synthèse précoce d'α1,3-glucane favoriserait l'aggrégation des protoplastes en régénération afin de résister au stress engendré par l'absence de paroi et assurer la biosynthèse correcte des polysaccharides constituant le squelette pariétal.

L'analyse structurale de la paroi des protoplastes doit être corrélée à une analyse RNAseq afin de déterminer quelles sont les enzymes impliquées dans la biosynthèse des polysaccharides.

Un modèle de l'enchaînement des évènements de biosynthèse de la paroi a été proposé par Beauvais A. et Latgé J.P. (2001) : il y aurait tout d'abord la synthèse de β1,3-glucane et de chitine puis ramification des β1,3-glucanes. Ensuite, il y aurait création des liaisons covalentes entre le core β1,3/β1,6-glucane et la chitine. Et en dernier, l'addition de chaînes polysaccharidiques particulières telles que le β1,3/β1,4-glucane et les galactomannanes. Ces évènements font intervenir des glucanes et chitine synthases, des hydrolases et des transférases.

Il reste encore bon nombre de points d'interrogation sur les enzymes impliquées dans la biosynthèse de cette paroi comme le montre le schéma récapitulatif suivant :

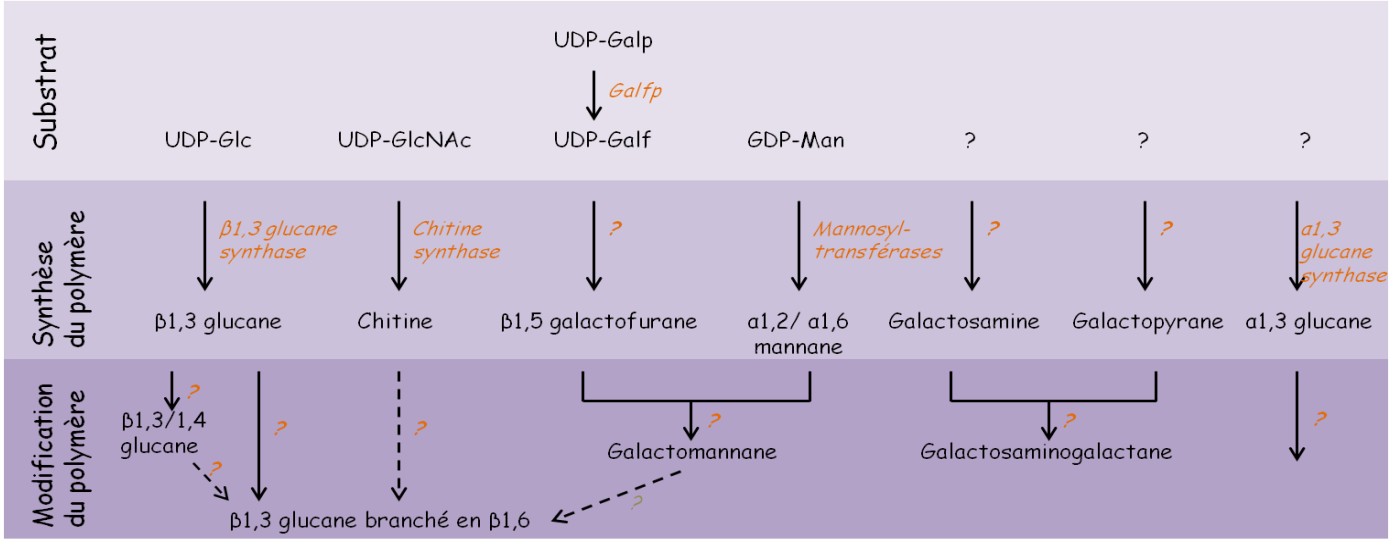


Figure 70 : Schéma récapitulatif de la biosynthèse de la paroi d'*Aspergillus fumigatus* (d'après Gastebois A. *et al.*, 2010)

© 2015 Tous droits réservés.

doc.univ-lille1.fr

Une étude d'Osumi (2012) a suivi la régénération de protoplastes de *S. pombe* par microscopie électronique. Il a montré que la présence d'α-glucanes était nécessaire pour la première étape de la formation du réseau des glucanes lors d'une nouvelle synthèse de la paroi cellulaire pendant la croissance végétative.

On peut se demander si la synthèse des polysaccharides pariétaux des protoplastes en régénération n'est pas la conséquence du « Cell Wall Integrity pathway » qui s'active lors d'un stress pariétal induisant notamment l'expression de gènes impliqués dans la biosynthèse et le remodelage de la paroi. En effet, on peut suggérer que la dégradation de la paroi des conidies germées entraîne un stress qu'il faut contrecarrer puisque *A. fumigatus* a besoin de sa paroi pour résister aux attaques de son environnement. Il faudrait vérifier l'activation de cette voie en étudiant la phosphorylation de la voie des MAPK avant et après traitement Glucanex. Si cette voie était activée, la détermination des enzymes impliquées dans la biosynthèse des polysaccharides pariétaux réflèterait l'enchaînement des évènements dans un éta t non physiologique pour le champignon. La synthèse d'α-glucane est régulée par la voie de signalisation PKC, voie centrale de la régulation de l'intégrité pariétale chez tous les champignons en réponse au stress (Levin D.E., 2005 ; Teepe A.G. *et al.,* 2007 ; Fuchs B.B. *et al.,* 2009)

© 2015 Tous droits réservés.

doc.univ-lille1.fr

Partie 3 : Glycosylation des mucines pulmonaires et implication dans le phénomène d'adhérence hôte-pathogène.

Dans la troisième partie de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés aux relations hôtes-pathogènes dans l'appareil respiratoire. Les pathogènes étudiés sont *Aspergillus fumigatus* et *Pseudomonas aeruginosa* fréquemment retrouvés chez les patients immunodéprimés et les patients atteints de mucoviscidose. L'épithélium pulmonaire des patients atteints de mucoviscidose est caractérisé par la présence d'un mucus épais, visqueux et déshydraté dont les propriétés rhéologiques sont modifiées. Les mucines, principales glycoprotéines du mucus, présentent des profils de O-glycosylation modifiés par rapport aux mucines bronchiques d'individus sains. La clairance ciliaire qui doit permettre notamment l'élimination des pathogènes est elle aussi affectée. Toutes ces altérations favorisent la colonisation des poumons par de nombreux pathogènes.

Afin de mieux comprendre la physiopathologie des infections pulmonaires, notre travail a consisté à établir les profils de glycosylation des mucines bronchiques isolées à partir d'expectorations de patients atteints de mucoviscidose. Nous avons en parallèle développé un test d'adhésion des bactéries sur mucines immobilisées. En corrélant nos résultats d'adhésion de bactéries sur mucines avec les profils de glycosylation de ces mucines, nous avons pu identifier des ligands glycanniques reconnus par les pathogènes et nécessaires à leur adhésion.

I. Mise au point d'un test d'adhésion des bactéries sur mucines immobilisées

La plupart des tests utilisés pour mesurer l'adhésion des bactéries aux mucines reposent sur l'immobilisation de celles-ci sur plaques de polystyrène (type ELISA). Cependant, les bactéries sont capables d'adhérer au plastique, et il est souvent difficile de discriminer entre l'adhésion sur le support et celle, spécifique sur les mucines.

C'est pourquoi nous avons choisi de développer un test basé sur l'immobilisation des mucines sur membranes de nitrocellulose. Les mucines sont dissoutes dans le PBS à une concentration de 0,5 mg/ml. A l'aide d'un appareil de slot blot, elles sont immobilisées sur membrane de nitrocellulose comme le montre le schéma ci-dessous (Fig.71). La membrane est saturée par du PFBB pendant 1h. Les bactéries (10^9 bactéries/ml) sont marquées à l'aide du DAPI puis incubées sur les mucines pendant une heure. Après 3 lavages au PBS/Tween 0,1%, la fluorescence de la membrane est détectée à l'aide d'un imageur de type Chemigenius et quantifiée à l'aide du logiciel Syngene.

© 2015 Tous droits réservés. doc.univ-lille1.fr

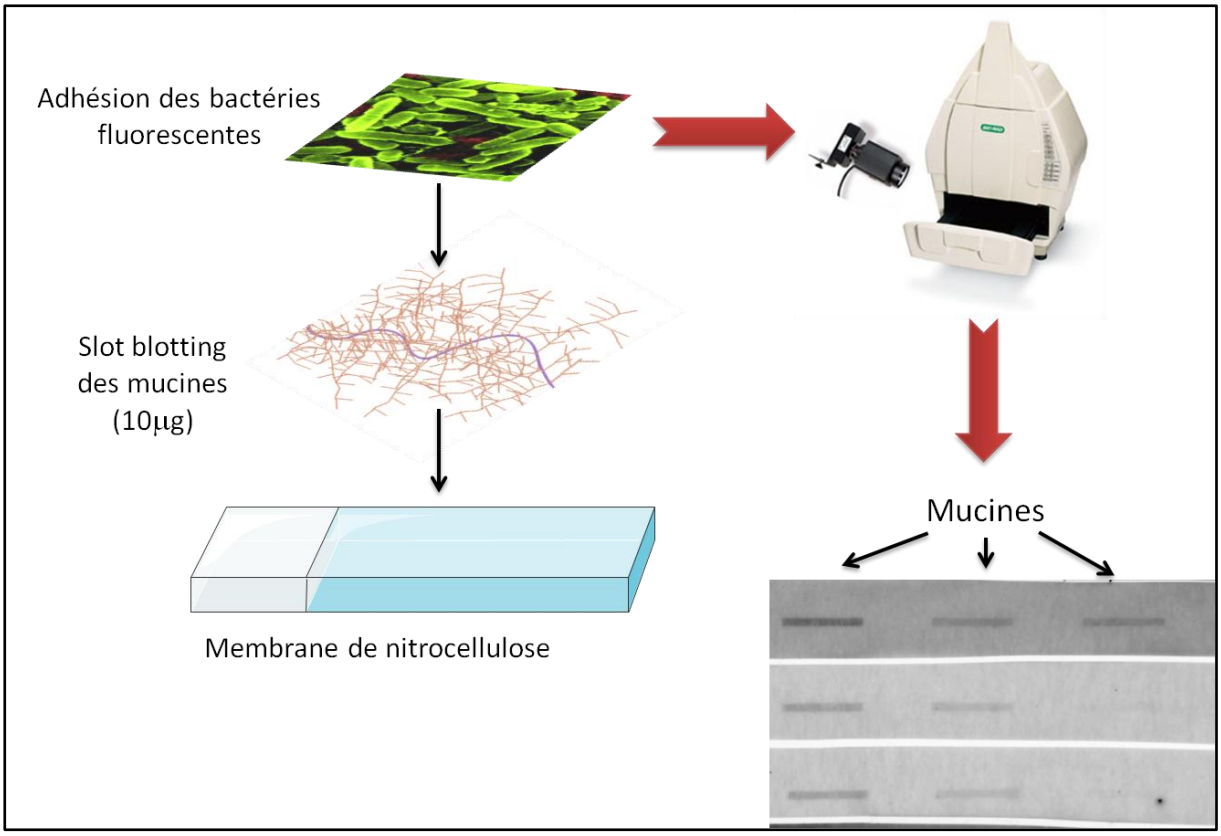


Figure 71 : Schéma du principe du test d'adhésion

Comme le montre la figure 72, les bactéries adhèrent spécifiquement aux mucines. En effet, aucune bactérie n'est détectée en dehors des « spots » correspondant aux mucines. Il n'y a pas d'adhésion sur la serumalbumine bovine. En absence de bactéries, il n'y aucun signal de fluorescence détectée.
En diminuant la quantité de bactéries, nous avons bien une diminution de l'intensité de fluorescence.

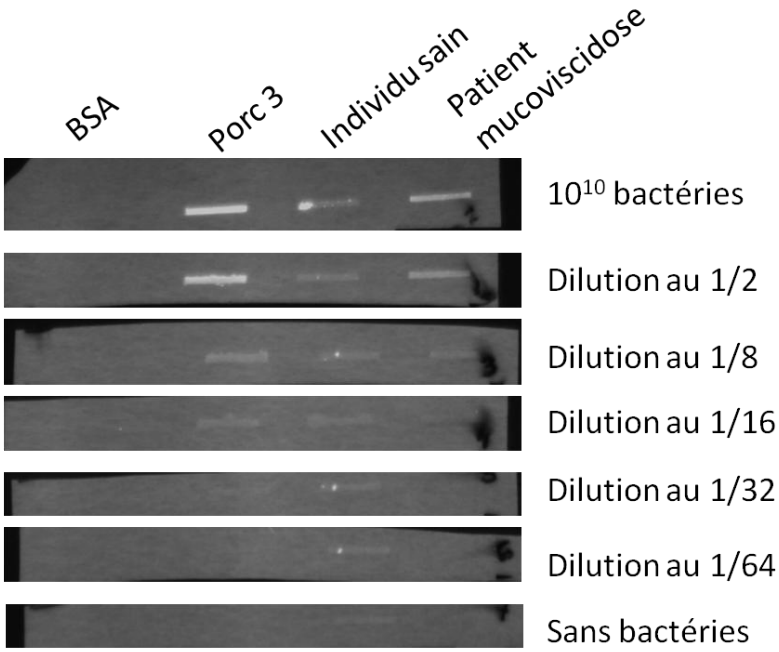


Figure 72 : Test d'adhésion de *P. aeruginosa* sur mucines immobilisées sur membrane de nitrocellulose.

© 2015 Tous droits réservés.
doc.univ-lille1.fr

Ce test semble beaucoup plus spécifique que les tests utilisés actuellement. Nous l'avons par la suite utilisé pour identifier les mucines reconnues respectivement par *P. aeruginosa* et *A. fumigatus*.

II. Glycosylation des mucines pulmonaires

En collaboration avec le CHRU de Lille et le Centre de Recherche et de Compétences pour la mucoviscidose (CRCM enfants), nous avons collecté les expectorations de 10 patients atteints de mucoviscidose. Les mucines ont été purifiées par ultracentrifugation en gradient de chlorure de césium afin d'éliminer l'ADN et les glycoprotéines ou protéines de faible poids moléculaire. Les fractions ayant une densité comprise entre 1,35 et 1,45 g/L et colorées en rose avec le réactif de Schiff ont été mélangées, dialysées contre de l'eau et lyophilisées.

Nous avons également purifié des mucines bronchiques issues d'individus sains afin d'étudier les altérations de glycosylation en lien avec la mucoviscidose. Des mucines pulmonaires de porc ont été purifiées dans notre étude et la glycosylation comparée à celle des mucines humaines. L'objectif était de pouvoir utiliser ces mucines dans nos tests car elles sont plus facilement disponibles.

Les O-glycannes de mucines ont été libérés de l'axe peptidique par β-élimination en milieu réducteur. Les oligosaccharides ont été perméthylés avant d'être analysés par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF.

1) *Comparaison de la glycosylation des mucines bronchiques humaines et porcines d'individus sains*

Les figures 73 et 74 présentent les spectres de masse obtenus pour les O-glycannes de mucines humaines d'individus sains et les mucines bronchiques porcines. Le tableau 23 résume l'ensemble des structures et/ou compositions en monosaccharides identifiées dans ces mucines.

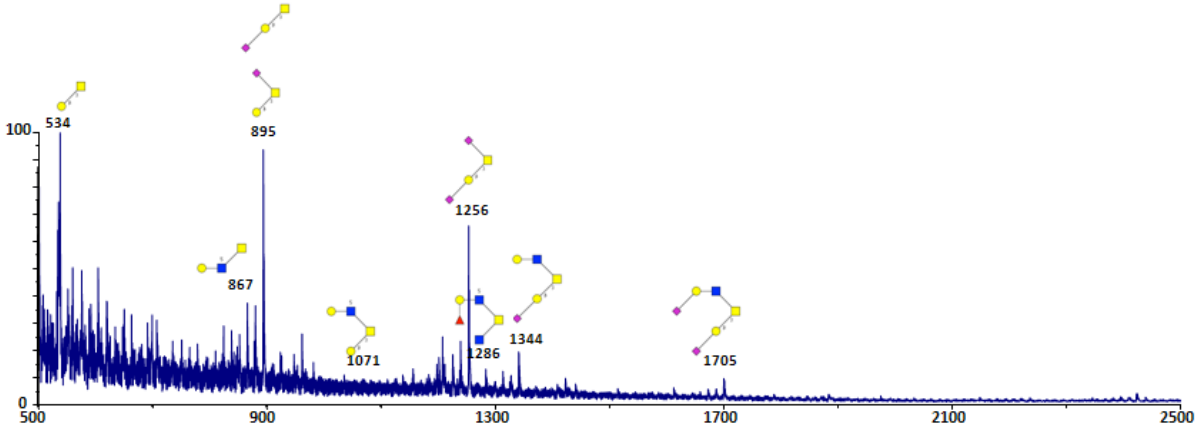


Figure 73 : Spectre MS des O-glycannes de mucines de poumons humains. Les O-glycannes perméthylés ont été analysés par spectrométrie de masse en mode réflectron positif. Les ions détectés correspondent à des ions de type $[M+Na]^+$.

© 2015 Tous droits réservés.

doc.univ-lille1.fr

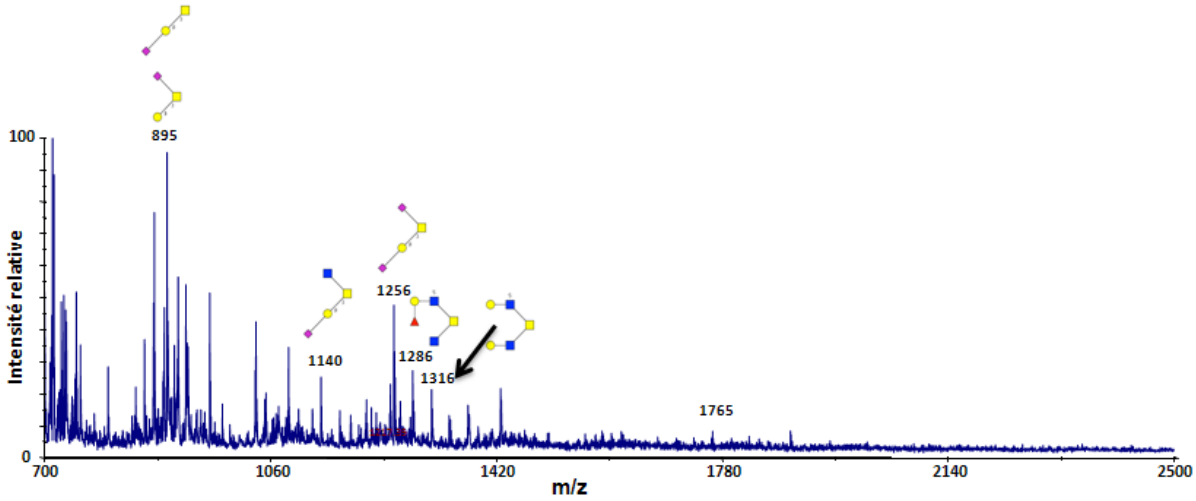


Figure 74: Spectre MS des O-glycannes de mucines de poumons de porc. Les O-glycannes perméthylés ont été analysés par spectrométrie de masse en mode réflectron positif. Les ions détectés correspondent à des ions de type $[M+Na]^+$.

Les structures des mucines bronchiques sont majoritairement acides avec une très forte proportion de motifs sialylés. Par exemple, le sialyl TF à m/z 895 représente environ 12 % des structures totales et le niveau d'expression du disialyl TF à m/z 1256 est de 6 % en moyenne.

Il existe des variations intra et inter-espèces de la glycosylation des mucines. Certains glycannes ne sont exprimés que chez l'homme ou que chez le porc, comme les glycannes portant de l'acide N-acétylglycolylneuraminique.

Tableau 23 : Composition des structures O-glycanniques des mucines pulmonaires et porcines. Le pourcentage correspond au pourcentage d'expression d'un glycanne par rapport à tous les autres O-glycannes identifiés. (Les structures neutres sont en gris ; les structures acides sont en bleu et les structures sulfatées sont en vert olive)

Composition	[M+Na]+	Homme1	Homme2	Porc1	Porc2	Porc3
1 Gal, GalNAcol	534	6,4	9,4	6,0	11,1	9,5
1 HexNAc, GalNAcol	575	0,0	6,2	0,0	1,7	0,0
1 Gal, 1 SO3, GalNAcol	622	2,1	2,9	0,0	2,0	0,0
1 HexNAc, 1 SO3, GalNAcol	663	2,6	4,2	0,0	1,3	3,0
1 Gal, 1 NeuAc, GalNAcol	691	2,4	3,8	0,0	1,1	2,1
1 Gal, 1 Fuc, GalNAcol	708	2,5	3,3	4,8	4,7	1,8
1 HexNAc, 1 Fuc, GalNAcol	749	0,0	2,0	0,0	1,0	0,0
1 Gal, 1 HexNAc, GalNAcol	779	3,3	2,8	3,1	4,2	2,1
1 Gal, 1 Fuc, GalNAcol	796	0,0	1,8	0,0	0,0	0,0
2 HexNAc, GalNAcol	820	0,0	1,8	0,0	0,8	0,0
1 HexNAc, 1 Fuc, 1 SO3, GalNAcol	837	0,0	1,8	1,3	1,1	0,0
1 Gal, 1 HexNAc, 1 SO3, GalNAcol	867	2,3	4,7	2,6	5,3	0,0
1 Gal, 1 NeuAc, GalNAcol	895	12,1	11,8	5,7	12,3	14,3
2 HexNAc, 1 SO3, GalNAcol	908	0,0	1,5	0,0	0,0	0,0

© 2015 Tous droits réservés.

doc.univ-lille1.fr

Composition	[M+Na]+	Homme1	Homme2	Porc1	Porc2	Porc3
1 Gal, 1 NeuGc, GalNAcol	925	0,0	0,0	0,0	0,0	4,9
1 HexNAc, 1 NeuAc, GalNAcol	936	0,0	1,4	0,0	0,0	0,0
1 Gal, 1 HexNAc, 1 Fuc, GalNAcol	953	1,7	1,6	2,8	2,1	2,0
2 Gal, 1 HexNAc, GalNAcol	983	4,1	2,0	5,8	2,8	2,0
1 Gal, 2 HexNAc, GalNAcol	1024	1,5	1,2	0,0	0,8	0,0
1 Gal, 1 HexNAc, 1 Fuc, 1 SO3, GalNAcol	1041	0,0	1,0	0,9	0,7	0,0
1 Gal, 1 Fuc, 1 NeuAc, GalNAcol	1069	0,0	1,2	1,5	1,0	0,0
2 Gal, 1 HexNAc, 1 SO3, GalNAcol	1071	1,5	1,2	0,0	0,9	0,0
1 Gal, 1 Fuc, 1 NeuGc, GalNAcol	1099	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0
1 HexNAc, 1 Fuc, 1 NeuAc, GalNAcol	1110	0,0	0,0	1,1	0,0	0,0
1 Gal, 2 HexNAc, 1 SO3, GalNAcol	1112	0,0	0,0	1,1	0,9	0,0
1Gal, 1 HexNAc, 2 Fuc, GalNAcol	1127	1,3	1,2	0,0	0,9	0,0
1 Gal, 1 HexNAc, 1 NeuAc, GalNAcol	1140	2,2	1,4	1,4	1,2	5,1
2 Gal, 1 HexNAc, 1 Fuc, GalNAcol	1157	1,2	1,3	2,3	2,4	2,2
3 Gal, 1 HexNAc, GalNAcol	1170	0,0	0,0	0,0	0,0	1,6
3 Gal, 1 HexNAc, GalNAcol	1187	1,1	1,3	0,0	0,0	0,0
1 Gal, 2 HexNAc, 1 Fuc, GalNAcol	1198	0,0	1,1	1,1	0,8	0,0
2 Gal, 2 HexNAc, GalNAcol	1228	1,7	2,3	3,0	3,2	2,2
2 Gal, 1 HexNAc, 1 Fuc, 1 SO3, GalNAcol	1245	0,0	0,0	0,0	1,2	0,0
1 Gal, 2 NeuAc, GalNAcol	1256	4,9	8,2	1,9	7,2	8,1
1 Gal, 3 HexNAc, GalNAcol	1269	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0
1 Gal, 2 HexNAc, 1 Fuc, 1 SO3, GalNAcol	1286	1,2	1,7	1,3	3,2	3,2
1 Gal, 1 HexNAc, 1 Fuc, 1 NeuAc, GalNAcol	1314	0,0	1,0	1,1	0,4	0,0
2 Gal, 2 HexNAc, 1 SO3, GalNAcol	1316	1,0	1,5	1,8	3,2	1,6
2 Gal, 1 HexNAc, 2 Fuc, GalNAcol	1331	0,0	1,4	0,0	2,0	1,3
2 Gal, 1 HexNAc, 1 NeuAc, GalNAcol	1344	4,2	2,4	2,0	1,5	1,7
3 Gal, 1 HexNAc, 1 Fuc, GalNAcol	1361	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
1 Gal, 2 HexNAc, 2 Fuc, GalNAcol	1372	0,9	0,0	0,0	0,3	0,0
2 Gal, 1 HexNAc, 1 NeuGc, GalNAcol ?	1374	1,1	0,9	2,4	1,5	1,5
2 Gal, 2 HexNAc, 1 Fuc, GalNAcol	1402	1,1	0,0	2,0	0,5	0,9
2 Gal, 1 HexNAc, 2 Fuc, 1 SO3, GalNAcol	1419	0,9	0,0	0,0	0,6	0,0
1 Gal, 1 Fuc, 2 NeuAc, GalNAcol	1430	0,8	0,0	0,0	0,3	0,0
3 Gal, 2 HexNAc, GalNAcol	1432	1,3	0,8	2,3	0,5	1,2
1 Gal, 3 HexNAc, 1 Fuc, GalNAcol	1443	0,0	0,0	0,9	0,0	1,2
3 Gal, 1 HexNAc, 1 Fuc, 1 SO3, GalNAcol	1449	0,0	0,0	0,0	0,0	0,8
1 Gal, 2 HexNAc, 2 Fuc, 1 SO3, GalNAcol	1460	0,8	0,7	0,9	0,0	1,1
2 Gal, 3 HexNAc, GalNAcol	1473	0,0	0,0	1,2	0,3	0,0
1Gal, 1 HexNAc, 2 Fuc, 1 NeuAc, GalNAcol	1488	0,7	0,0	0,0	0,3	0,0
2 Gal, 2 HexNAc, 1 Fuc, 1 SO3, GalNAcol	1490	0,0	0,0	0,7	0,8	0,8
1 Gal, 1 HexNAc, 2 NeuAc, GalNAcol	1501	0,0	0,0	0,0	0,0	1,1
2 Gal, 1 HexNAc, 3 Fuc, GalNAcol	1505	0,7	0,0	0,0	0,0	0,0
2 Gal, 1 HexNAc, 1 Fuc, 1 NeuAc, GalNAcol	1518	0,8	0,8	0,8	1,3	0,7
3 Gal, 2 HexNAc, 1 SO3, GalNAcol	1520	0,0	0,0	0,0	0,8	0,0
3 Gal, 1 HexNAc, 2 Fuc, GalNAcol	1531	0,0	0,0	0,0	0,0	0,6

© 2015 Tous droits réservés.

doc.univ-lille1.fr

Composition	[M+Na]+	Homme1	Homme2	Porc1	Porc2	Porc3
3 Gal, 1 HexNAc, 2 Fuc, GalNAcol	1535	0,7	0,0	0,0	0,0	0,6
1 Gal, 2 HexNAc, 3 Fuc, GalNAcol	1546	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0
3 Gal, 1 HexNAc, 1 NeuAc, GalNAcol	1548	0,8	0,0	0,8	0,6	0,8
2 Gal, 3 HexNAc, 1 SO3, GalNAcol	1561	0,0	0,0	0,0	0,3	0,0
2 Gal, 2 HexNAc, 2 Fuc, GalNAcol	1576	0,7	0,0	1,2	0,4	0,7
2 Gal, 2 HexNAc, 1 NeuAc, GalNAcol	1589	0,9	0,0	1,3	0,3	1,0
2 Gal, 1 HexNAc, 3 Fuc, 1 SO3, GalNAcol	1593	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0
3 Gal, 2 HexNAc, 1 Fuc, GalNAcol	1606	0,8	0,0	1,0	0,4	0,9
1 Gal, 3 HexNAc, 2 Fuc, GalNAcol	1617	0,8	0,8	0,0	0,0	0,0
2 Gal, 2 HexNAc, 1 NeuGc, GalNAcol	1619	0,0	0,6	1,9	0,4	1,1
3 Gal, 1 HexNAc, 2 Fuc, 1 SO3, GalNAcol	1623	0,0	0,0	0,8	0,0	0,0
1 Gal, 3 HexNAc, 1 NeuAc, GalNAcol	1630	0,6	0,0	0,6	0,0	0,0
1 Gal, 2 HexNAc, 3 Fuc, 1 SO3, GalNAcol	1634	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0
4 Gal, 2 HexNAc, GalNAcol	1636	0,0	0,0	1,8	0,0	0,9
2 Gal, 3 HexNAc, 1 Fuc, GalNAcol	1647	0,7	0,0	1,4	0,4	0,8
1 Gal, 3 HexNAc, 1 NeuGc, GalNAcol	1660	0,5	0,0	0,7	0,2	0,0
2 Gal, 2 HexNAc, 2 Fuc, SO3, GalNAcol	1664	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
1 Gal, 1 HexNAc, 1 Fuc, 2 NeuAc, GalNAcol	1675	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0
3 Gal, 3 HexNAc, GalNAcol	1677	0,9	0,7	1,2	0,4	0,7
3 Gal, 2 HexNAc, 1 Fuc, 1 SO3, GalNAcol	1694	0,6	0,5	0,7	0,3	0,0
2 Gal, 1 HexNAc, 2 NeuAc, GalNAcol	1705	1,3	1,2	0,0	0,4	0,6
3 Gal, 1 HexNAc, 3 Fuc, GalNAcol	1709	0,0	0,0	0,0	0,3	0,5
2 Gal, 4 HexNAc, GalNAcol	1718	0,0	0,0	0,9	0,0	0,0
3 Gal, 1 HexNAc, 1 Fuc, 1 NeuAc, GalNAcol	1722	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0
4 Gal, 2 HexNAc, 1 SO3, GalNAcol	1724	0,6	0,0	0,7	0,0	0,5
1 Gal, 2 HexNAc, 2 Fuc, 1 NeuAc, GalNAcol	1733	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0
2 Gal, 3 HexNAc, 1 Fuc, 1 SO3, GalNAcol	1735	0,7	0,0	0,6	0,4	0,8
1 Gal, 2 HexNAc, 2 NeuAc, GalNAcol	1746	0,0	0,0	0,7	0,1	0,6
2 Gal, 2 HexNAc, 3 Fuc, GalNAcol	1750	0,7	0,0	0,0	0,2	0,0
2 Gal, 2 HexNAc, 1 Fuc, 1 NeuAc, GalNAcol	1763	0,7	0,0	0,9	0,1	0,8
3 Gal, 3 HexNAc, 1 SO3, GalNAcol	1765	0,7	0,0	1,1	0,4	1,1
3 Gal, 2 HexNAc, 2 Fuc, GalNAcol	1780	0,0	0,0	0,7	0,0	0,0
1 Gal, 3 HexNAc, 3 Fuc, GalNAcol	1791	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0
3 Gal, 2 HexNAc, 1 NeuAc, GalNAcol	1793	0,8	0,5	1,0	0,2	1,0
3 Gal, 1 HexNAc, 3 Fuc, 1 SO3, GalNAcol	1797	0,6	0,0	0,6	0,3	0,0
1 Gal, 3 HexNAc, 1 Fuc, 1 NeuAc, GalNAcol	1804	0,5	0,0	0,8	0,0	0,0
2 Gal, 4 HexNAc, 1 SO3, GalNAcol	1806	0,6	0,0	0,0	0,0	0,6
4 Gal, 2 HexNAc, 1 Fuc, GalNAcol	1810	0,0	0,0	0,8	0,0	0,0
2 Gal, 3 HexNAc, 2 Fuc, GalNAcol	1821	0,6	0,0	0,8	0,1	0,0
3 Gal, 2 HexNAc, 1 NeuGc, GalNAcol	1823	0,6	0,0	1,1	0,3	0,7
2 Gal, 3 HexNAc, 1 NeuAc, GalNAcol	1834	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0
2 Gal, 2 HexNAc, 3 Fuc, 1 SO3, GalNAcol	1838	0,0	0,0	0,7	0,3	0,0
1 Gal, 1 HexNAc, 2 Fuc, 2 NeuAc, GalNAcol	1849	0,5	0,0	0,6	0,0	0,0
3 Gal, 3 HexNAc, 1 Fuc, GalNAcol	1851	0,7	0,0	1,1	0,2	0,8

© 2015 Tous droits réservés.

doc.univ-lille1.fr

Composition	[M+Na]+	Homme1	Homme2	Porc1	Porc2	Porc3
2 Gal, 1 HexNAc, 3 Fuc, 1 NeuAc, GalNAcol	1866	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0
3 Gal, 2 HexNAc, 2 Fuc, 1 SO3, GalNAcol	1868	0,7	0,0	0,7	0,0	0,0
2 Gal, 1 HexNAc, 1 Fuc, 2 NeuAc, GalNAcol	1879	0,5	0,0	0,5	0,1	0,6
4 Gal, 3 HexNAc, GalNAcol	1881	0,7	0,0	1,1	0,2	0,0
2 Gal, 4 HexNAc, 1 Fuc, GalNAcol	1892	0,6	0,0	0,7	0,1	0,0
4 Gal, 2 HexNAc, 1 Fuc, 1 SO3, GalNAcol	1898	0,5	0,0	0,5	0,0	0,0
1 Gal, 2 HexNAc, 3 Fuc, 1 NeuAc, GalNAcol	1907	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0
2 Gal, 3 HexNAc, 2 Fuc, 1 SO3, GalNAcol	1909	0,6	0,0	0,0	0,1	0,6
1 Gal, 2 HexNAc, 1 Fuc, 2 NeuAc, GalNAcol	1920	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0
3 Gal, 4 HexNAc, GalNAcol	1922	0,7	0,0	1,0	0,0	0,6
2 Gal, 2 HexNAc, 2 Fuc, 1 NeuAc, GalNAcol	1937	0,6	0,0	0,0	0,1	0,0
3 Gal, 3 HexNAc, 1 Fuc, 1 SO3, GalNAcol	1939	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0
2 Gal, 2 HexNAc, 2 NeuAc, GalNAcol	1950	0,0	0,0	0,7	0,0	0,7
3 Gal, 2 HexNAc, 3 Fuc, GalNAcol	1954	0,6	0,0	0,7	0,0	0,0
2 Gal, 5 HexNAc, GalNAcol	1963	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
3 Gal, 2 HexNAc, 1 Fuc, 1 NeuAc, GalNAcol	1967	0,6	0,0	0,7	0,0	0,0
4 Gal, 3 HexNAc, 1 Fuc, GalNAcol	1969	0,5	0,0	0,0	0,2	0,0
1 Gal, 3 HexNAc, 2 Fuc, 1 NeuAc, GalNAcol	1978	0,5	0,0	0,0	0,0	0,7
2 Gal, 4 HexNAc, 1 Fuc, 1 SO3, GalNAcol	1980	0,5	0,0	0,6	0,2	0,0
4 Gal, 2 HexNAc, 2 Fuc, GalNAcol	1984	0,6	0,0	0,0	0,2	0,0
2 Gal, 3 HexNAc, 3 Fuc, GalNAcol	1995	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0
4 Gal, 2 HexNAc, 1 NeuAc, GalNAcol	1997	0,5	0,0	0,6	0,3	0,5
3 Gal, 3 HexNAc, 2 Fuc, GalNAcol	2025	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5
4 Gal, 2 HexNAc, 1 NeuGc, GalNAcol	2027	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
3 Gal, 2 HexNAc, 3 Fuc, 1 SO3, GalNAcol	2042	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2 Gal, 1 HexNAc, 2 Fuc, 2 NeuAc, GalNAcol	2053	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4
4 Gal, 3 HexNAc, 1 Fuc, GalNAcol	2055	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
3 Gal, 3 HexNAc, 1 NeuGc, GalNAcol	2068	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5
		100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

Cependant, ces résultats montrent que les structures glycanniques sont assez similaires chez l'homme et le porc. On observe des pourcentages comparables pour la plupart des structures neutres, acides et sulfatées entre l'homme et le porc. Les mucines porcines pulmonaires pourraient être un bon substitut des mucines pulmonaires humaines plus compliquées à obtenir dans le but d'étudier les interactions entre mucines et pathogènes.

Nous avons ensuite calculé les rapports molaires de chacun des monosaccharides par chromatographie en phase gazeuse et nous les avons exprimés par rapport à la GalNAc (Fig.75). Ces résultats indiquent que le taux de fucosylation des mucines bronchiques est relativement faible. Ils nous permettent de confirmer la forte sialylation de ces mucines (plusieurs résidus de NeuAc par GalNAc). Les proportions des monosaccharides sont assez similaires au sein d'une même espèce. Les chaînes

© 2015 Tous droits réservés.

doc.univ-lille1.fr

d'oligosaccharides semblent plus courtes chez le porc par rapport à l'homme (deux chaînes lactosaminiques au lieu de 4).

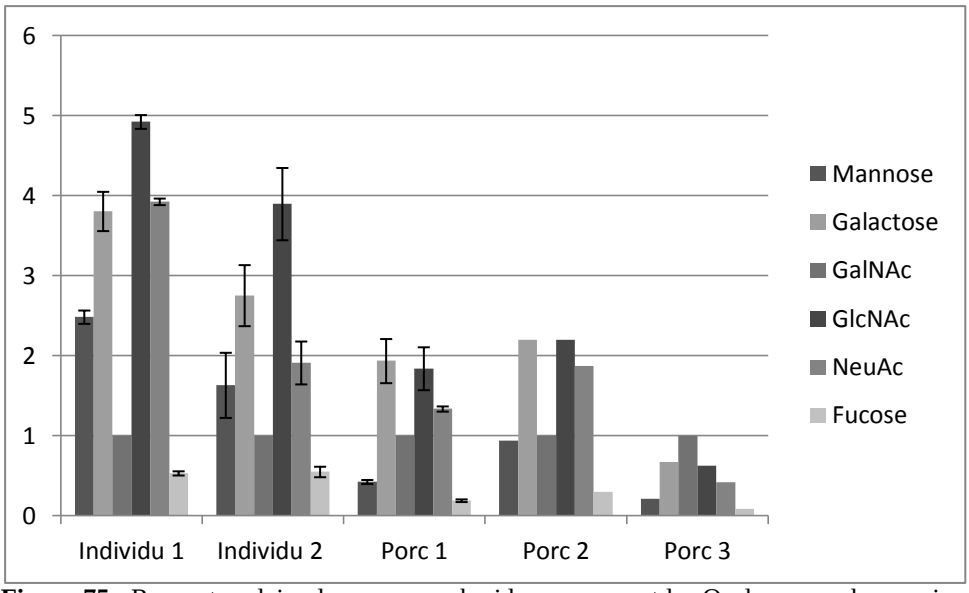


Figure 75 : Rapport molaire des monosaccharides composant les O-glycannes des mucines pulmonaires humaines et porcines par rapport à la GalNAc.

En résumé, cette première partie de travail nous indique que les mucines bronchiques humaines et porcines présentent certaines similarités et en particulier une forte sialylation. Les mucines porcines seraient donc un bon substitut aux mucines bronchiques humaines.

2) Analyse de la glycosylation des mucines bronchiques de patients atteints de mucovisdose

La physiopathologie de l'infection à *P. aeruginosa* est très variable chez les patients atteints de mucoviscidose. Certains patients seront infectés dès la plus jeune enfance alors que pour d'autres, l'infection arrivera plus tardivement. L'un des facteurs pouvant expliquer ces différences est la glycosylation des mucines pulmonaires. Les O-glycannes servent en effet de ligands permettant à la bactérie d'adhérer et de coloniser les poumons. Dans ce travail, nous avons donc tout d'abord analysé et comparé la glycosylation des mucines de 10 patients atteints de mucoviscidose. Nous avons ensuite étudié les profils d'adhésion de *P. aeruginosa* aux mucines de ces patients et nous avons cherché à établir un lien entre adhésion de *P. aeruginosa* aux mucines et profils de glycosylation.

Les figures 76 à 85 présentent les spectres de masse des O-glycannes perméthylés retrouvés dans les expectorats des 10 patients. Le tableau 17 résume l'ensemble des structures et/ou compositions en monosaccharides des O-glycannes identifiés ainsi que le pourcentage relatif de leur niveau d'expression.

© 2015 Tous droits réservés.
doc.univ-lille1.fr

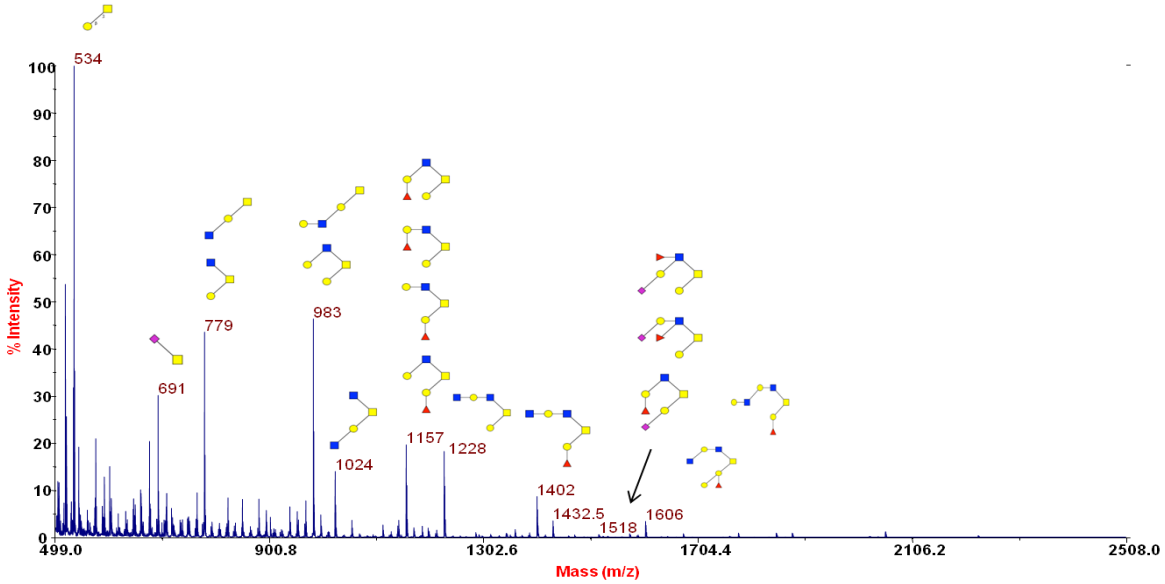


Figure 76 : Spectre MS des O-glycannes de mucines du patient 1.

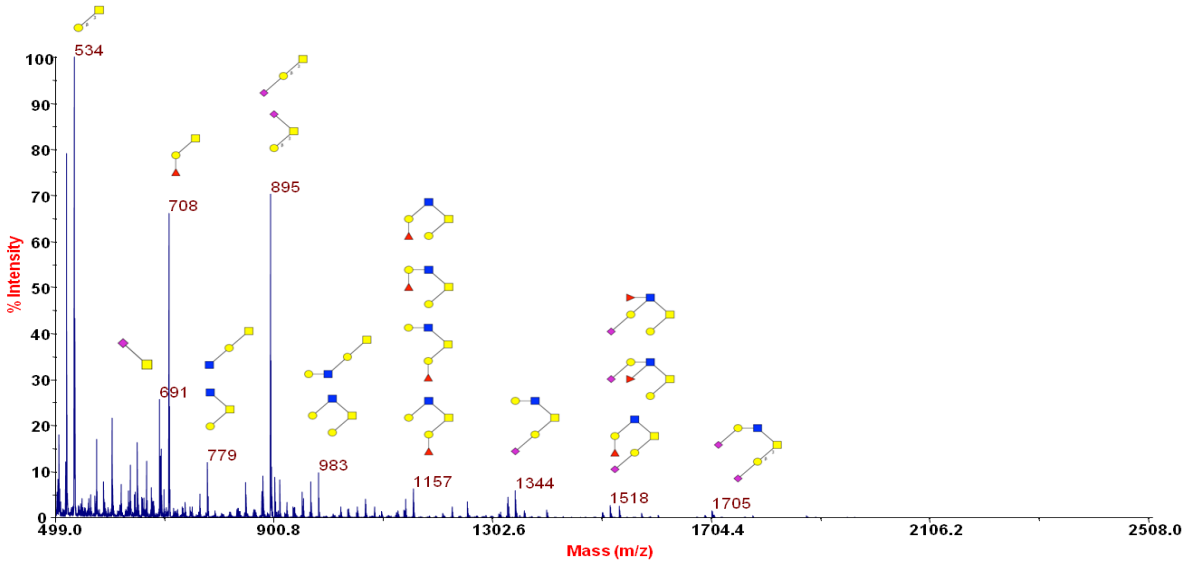


Figure 77 : Spectre MS des O-glycannes de mucines du patient 2.

© 2015 Tous droits réservés.

doc.univ-lille1.fr

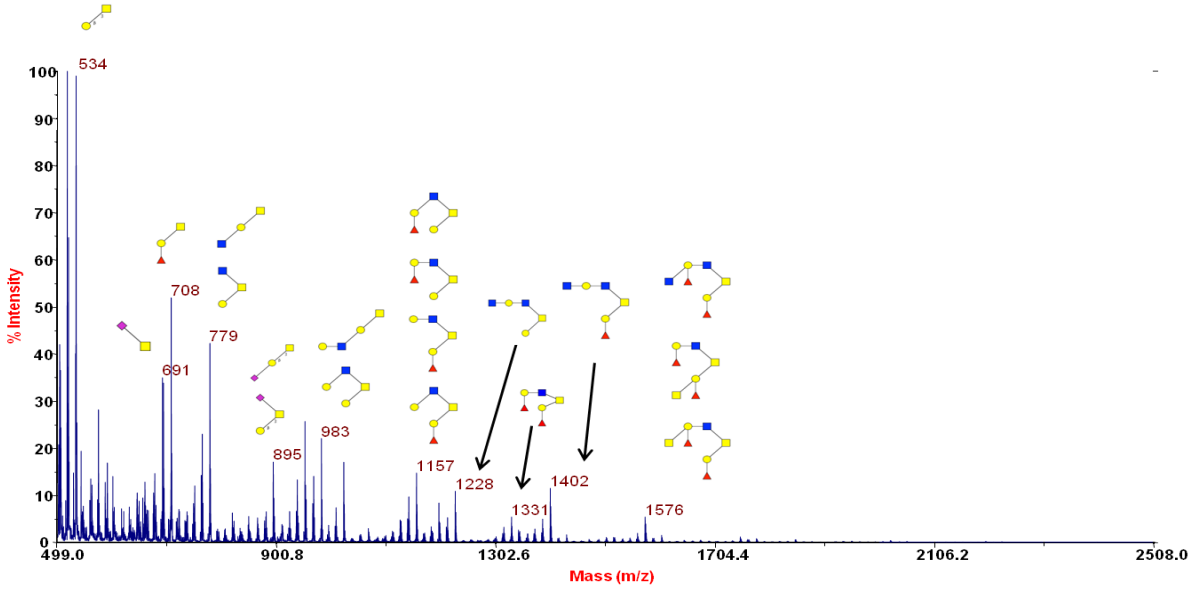


Figure 78 : Spectre MS des O-glycannes de mucines du patient 3.

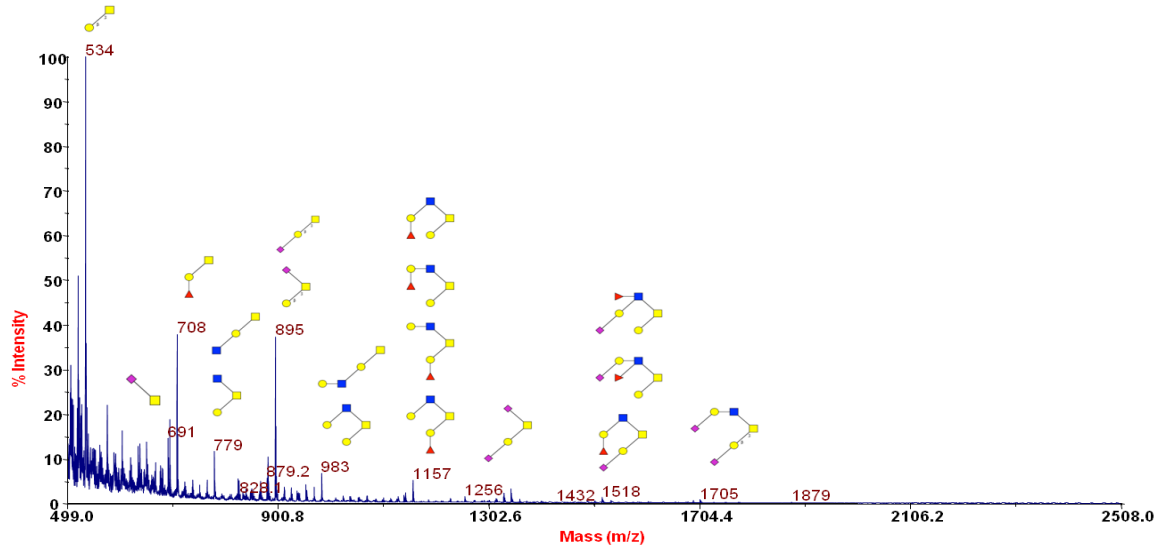


Figure 79 : Spectre MS des O-glycannes de mucines du patient 5.

© 2015 Tous droits réservés.

doc.univ-lille1.fr

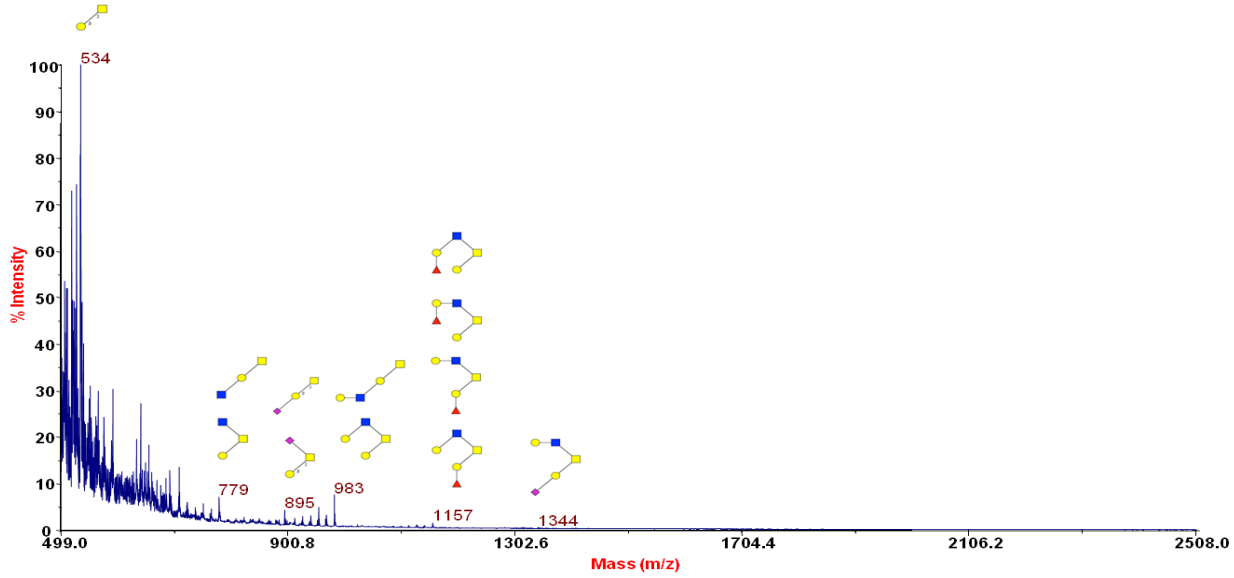


Figure 80 : Spectre MS des O-glycannes de mucines du patient 7.

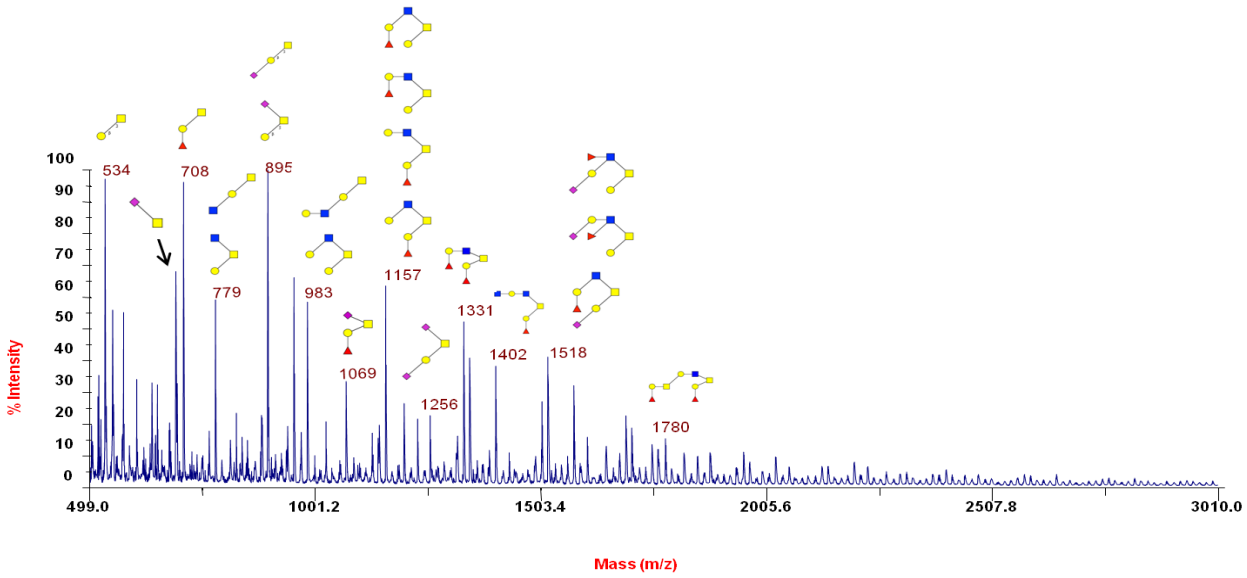


Figure 81: Spectre MS des O-glycannes de mucines du patient 8.

© 2015 Tous droits réservés.

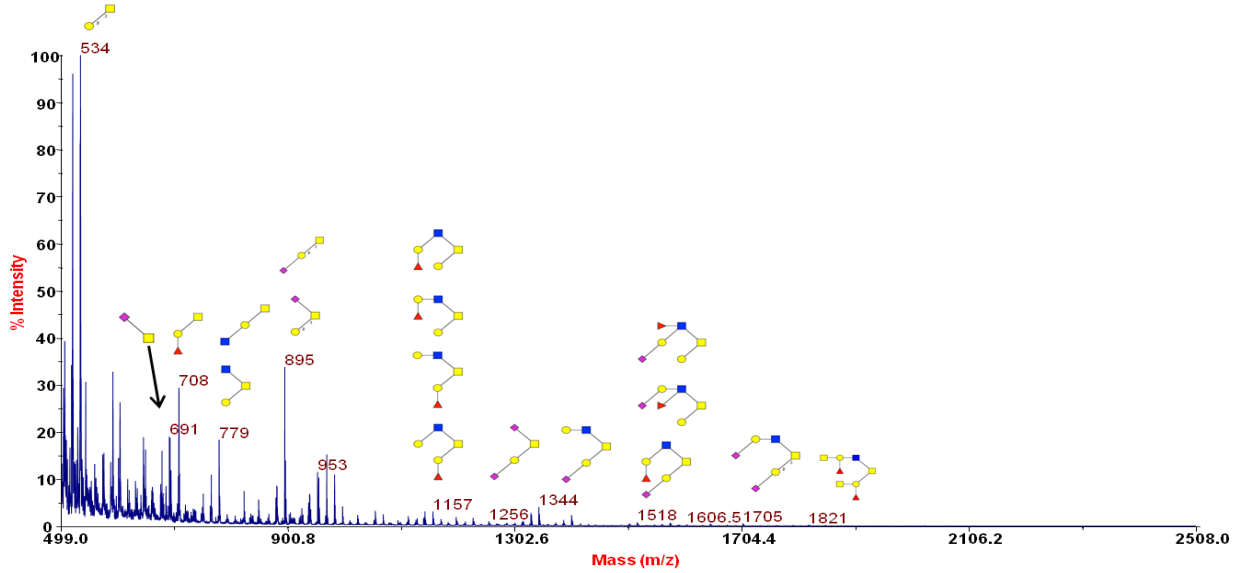


Figure 82 : Spectre MS des O-glycannes de mucines du patient 9.

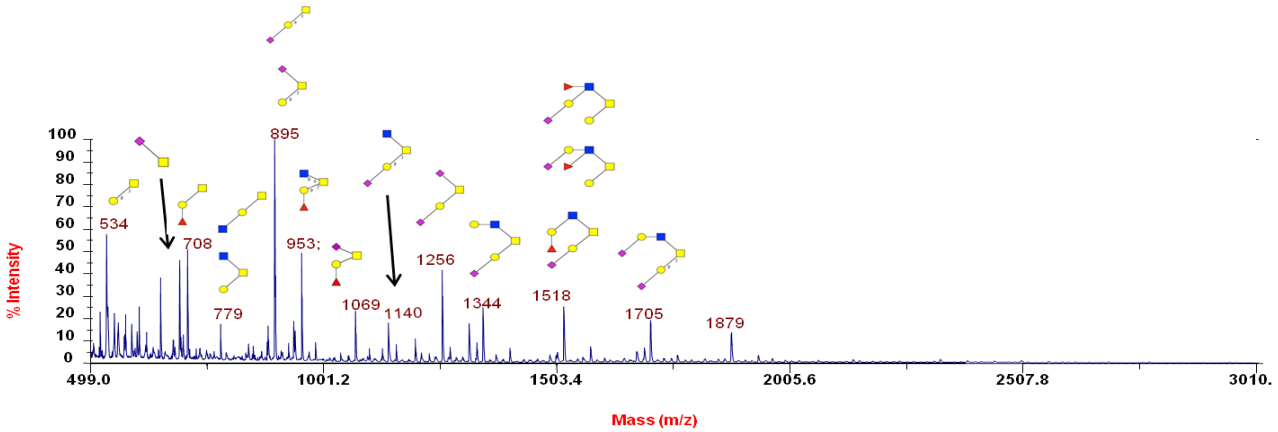


Figure 83 : Spectre MS des O-glycannes de mucines du patient 10.

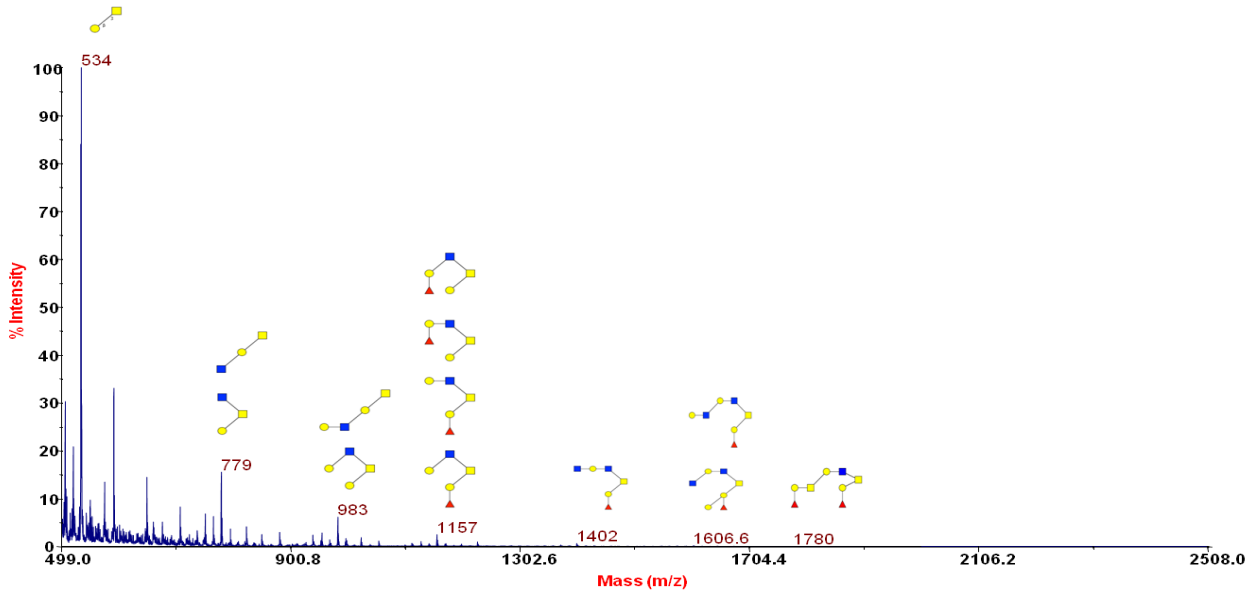


Figure 84 : Spectre MS des O-glycannes de mucines du patient 11.

© 2015 Tous droits réservés.

doc.univ-lille1.fr

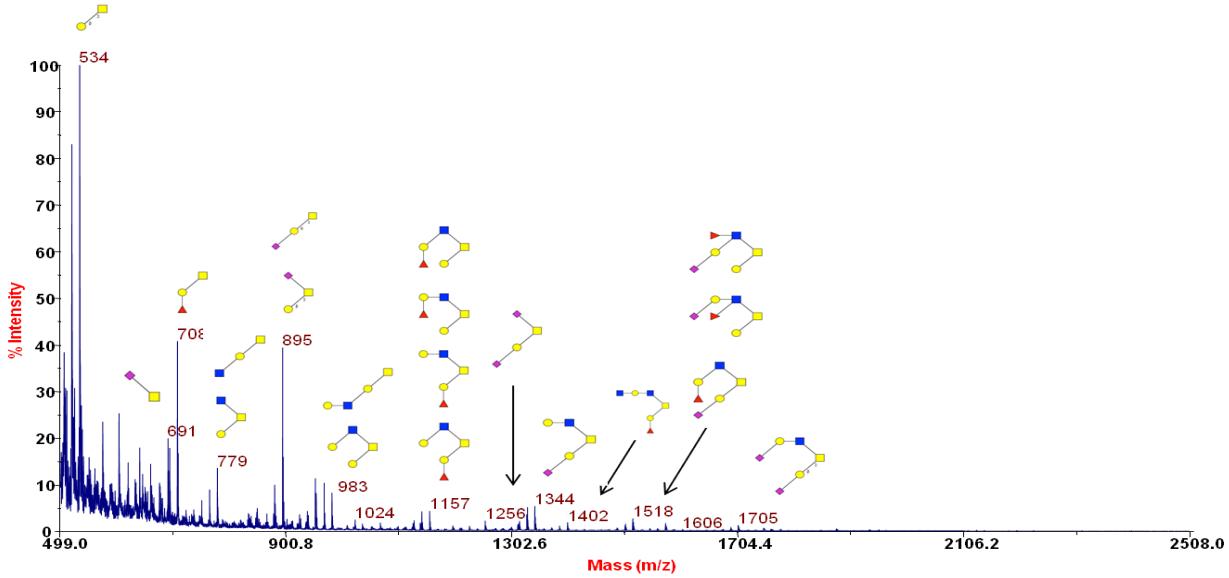


Figure 85 : Spectre MS des O-glycannes de mucines du patient 12.

© 2015 Tous droits réservés.

doc.univ-lille1.fr

Tableau 24 : Structures glycanniques retrouvées sur les sputums de différents patients atteints de mucoviscidose (en gris : les structures neutres ; en bleu : les structures acides ; en vert olive : les structures sulfatées)

Composition en monosaccharides	[M+Na]+	%Ind1	%Ind2	%Ind3	%Ind5	%Ind7	%Ind8	%Ind9	%Ind10	%Ind11	%Ind12
1 Hex, GalNAcol	534	42,6	31,9	17,6	37,8	52,9	6,4	29,0	8,1	58,8	28,1
1 HexNAc, GalNAcol	575	4,9	4,3	4,9	7,2	5,1	3,7	3,3	3,0	5,7	5,1
1 Hex, 1 SO3, GalNAcol	622	0,0	2,4	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0
1 HexNAc, 1 SO3, GalNAcol	663	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0	0,4	0,9	0,5	0,0	1,2
1 NeuAc, GalNAcol	691	0,7	5,9	1,2	5,3	3,3	4,5	6,6	6,4	0,0	6,5
1 Hex, 1 Fuc, GalNAcol	708	2,3	12,7	10,6	13,2	8,2	6,4	8,7	7,1	1,8	12,1
1 HexNAc, 1 Fuc, GalNAcol	749	0,7	0,0	1,5	0,0	0,0	0,6	0,0	0,8	0,9	0,0
1 Hex, 1 HexNAc, GalNAcol	779	11,7	2,6	9,3	3,9	5,1	3,9	6,1	2,4	14,2	4,4
2 HexNAc, GalNAcol	820	0,5	0,4	1,4	0,0	0,0	0,5	0,4	0,0	0,7	0,5
1 HexNAc, 1 Fuc, 1 SO3, GalNAcol	837	0,2	0,6	0,0	0,0	0,0	0,3	0,6	0,4	0,4	0,6
1 Hex, 1 HexNAc, 1 SO3, GalNAcol	867	0,0	0,5	0,7	1,5	1,5	0,6	0,9	0,7	0,0	1,1
1 Hex, 1 NeuAc, GalNAcol	895	1,4	20,0	4,4	16,2	5,0	6,6	14,5	14,0	0,3	14,7
1 HexNAc, 1 NeuAc, GalNAcol	936	0,2	0,6	0,4	1,0	0,0	0,8	1,0	2,6	0,0	0,6
1 Hex, 1 HexNAc, 1 Fuc, GalNAcol	953	1,3	1,4	7,2	1,5	1,8	4,4	4,5	6,9	1,0	4,3
2 Hex, 1 HexNAc, GalNAcol	983	12,1	2,2	5,5	2,1	9,5	3,9	4,4	1,3	6,1	2,6
1 Hex, 2 HexNAc, GalNAcol	1024	3,4	0,6	4,5	0,4	0,6	1,4	1,0	0,4	2,1	0,8
1 Hex, 1 HexNAc, 1 Fuc, 1 SO3, GalNAcol	1041	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0	0,2	0,2	0,3	0,0	0,1
1 Hex, 1 Fuc, 1 NeuAc, GalNAcol	1069	0,0	0,9	0,8	0,5	0,2	2,2	1,2	3,3	0,0	0,7
2 Hex, 1 HexNAc, 1 SO3, GalNAcol	1071	0,1	0,0	0,3	0,3	0,3	0,0	0,0	0,0	0,2	0,2
1 Hex, 2 HexNAc, 1 SO3, GalNAcol	1112	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	0,0	0,3	0,0	0,2
1 Hex, 1 HexNAc, 2 Fuc, GalNAcol	1127	0,1	0,3	1,2	0,2	0,3	1,1	0,6	1,0	0,2	0,5
1 Hex, 1 HexNAc, 1 NeuAc, GalNAcol	1140	0,2	0,4	0,5	0,5	0,2	1,0	0,8	2,6	0,1	0,6
2 Hex, 1 HexNAc, 1 Fuc, GalNAcol	1157	4,9	1,6	4,2	1,9	2,2	4,2	1,4	1,2	2,9	1,6
1 Hex, 2 HexNAc, 1 Fuc, GalNAcol	1198	0,5	0,1	2,6	0,0	0,2	1,8	1,0	1,6	0,3	0,5
2 Hex, 2 HexNAc, GalNAcol	1228	4,9	0,5	3,4	0,4	0,5	1,4	0,9	0,7	1,3	0,4
2 Hex, 1 HexNAc, 1 Fuc, 1 SO3, GalNAcol	1245	0,1	0,1	0,0	0,0	0,1	0,4	0,0	0,3	0,1	0,1
1 Hex, 2 NeuAc, GalNAcol	1256	0,0	1,0	0,1	0,6	0,1	1,5	0,7	5,9	0,0	0,8
1 Hex, 3 HexNAc, GalNAcol	1269	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,4	0,3	0,4	0,0	0,1
1 Hex, 2 HexNAc, 1 Fuc, 1 SO3, GalNAcol	1286	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	0,3	0,2	0,4	0,0	0,2

1 Hex, 1 HexNAc, 1 Fuc, 1 NeuAc, GalNAcol	1314	0,1	0,2	0,3	0,3	0,1	0,7	0,4	2,5	0,0	0,5
2 Hex, 2 HexNAc, 1 SO3, GalNAcol	1316	0,1	0,2	0,5	0,3	0,4	0,7	0,6	0,0	0,0	0,6
2 Hex, 1 HexNAc, 2 Fuc, GalNAcol	1331	0,1	1,4	1,7	0,8	0,4	3,5	0,0	1,3	0,0	1,7
2 Hex, 1 HexNAc, 1 NeuAc, GalNAcol	1344	0,2	1,8	0,8	1,2	0,5	2,7	2,4	3,5	0,0	2,0
3 Hex, 1 HexNAc, 1 Fuc, GalNAcol	1361	0,4	0,4	0,0	0,3	0,0	0,6	0,2	0,2	0,0	0,2
1 Hex, 2 HexNAc, 2 Fuc, GAlNAcol	1372	0,1	0,0	0,6	0,0	0,1	0,5	0,2	0,6	0,0	0,1
1 Hex, 2 HexNAc, 1 NeuAc, GalNAcol	1385	0,0	0,1	0,1	0,1	0,0	0,4	0,0	0,2	0,0	0,1
2 Hex, 2 HexNAc, 1 Fuc, GalNAcol	1402	2,5	0,5	4,4	0,2	0,2	2,5	1,3	1,0	1,3	0,7
2 Hex, 1 HexNAc, 2 Fuc, 1 SO3, GalNAcol	1419	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0
3 Hex, 2 HexNAc, GalNAcol	1432	0,8	0,1	0,5	0,1	0,3	0,7	0,3	0,3	0,3	0,1
1 Hex, 3 HexNAc, 1 Fuc, GalNAcol	1443	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,4	0,2	0,2	0,0	0,0
3 Hex, 1 HexNAc, 1 Fuc, 1 SO3, GalNAcol	1449	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	0,0	0,0	0,0	0,1
2 Hex, 3 HexNAc, GalNAcol	1473	0,1	0,0	0,2	0,0	0,0	0,4	0,2	0,0	0,1	0,0
1 Hex, 1 HexNAc, 2 Fuc, 1 NeuAc, GalNAcol	1488	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,5	0,1	0,6	0,0	0,1
2 Hex, 2 HexNAc, 1 Fuc, 1 SO3, GalNAcol	1490	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,6	0,1	0,0	0,1	0,2
1 Hex, 1 HexNAc, 2 NeuAc, GalNAcol	1501	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,5	0,0	0,1
2 Hex, 1 HexNAc, 3 Fuc, GalNAcol	1505	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0	1,8	0,0	0,0	0,0	0,5
2 Hex, 1 HexNAc, 1 Fuc, 1 NeuAc, GalNAcol	1518	0,1	0,9	0,4	0,5	0,1	2,7	0,7	3,5	0,0	1,0
3 Hex, 2 HexNAc, 1 SO3, GalNAcol	1520	0,0	0,0	0,4	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
3 Hex, 1 HexNAc, 2 Fuc, GalNAcol	1535	0,1	0,8	0,3	0,2	0,0	0,5	0,1	0,2	0,1	0,1
1 Hex, 2 HexNAc, 1 Fuc, 1 NeuAc, GalNAcol	1559	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,1	0,4	0,0	0,0
2 Hex, 2 HexNAc, 2 Fuc, GalNAcol	1576	0,2	0,3	2,2	0,1	0,1	2,1	0,6	1,0	0,1	0,6
2 Hex, 2 HexNAc, 1 NeuAc, GalNAcol	1589	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0	0,4	0,1	0,2	0,0	0,1
3 Hex, 2 HexNAc, 1 Fuc, GalNAcol	1606	0,8	0,2	0,5	0,1	0,2	1,1	0,2	0,3	0,3	0,1
4 Hex, 2 HexNAc, GalNAcol	1636	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,3	0,0	0,2	0,0	0,1
2 Hex, 3 HexNAc, 1 Fuc, GalNAcol	1647	0,1	0,0	0,2	0,0	0,0	0,7	0,4	0,3	0,1	0,0
2 Hex, 2 HexNAc, 2 Fuc, 1 SO3, GalNAcol	1664	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,4	0,1	0,2	0,0	0,1

1 Hex, 1 HexNAc, 1 Fuc, 2 NeuAc, GalNAcol	1675	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,1	0,7	0,0	0,0
3 Hex, 3 HexNAc, GalNAcol	1677	0,2	0,1	0,2	0,1	0,1	0,6	0,2	0,0	0,1	0,1
2 Hex, 1 HexNAc, 2 Fuc, 1 NeuAc, GalNAcol	1692	0,0	0,2	0,1	0,2	0,0	1,5	0,1	1,0	0,0	0,3
2 Hex, 1 HexNAc, 2 NeuAc, GalNAcol	1705	0,0	0,6	0,0	0,4	0,0	1,2	0,4	2,7	0,0	0,4
3 Hex, 1 HexNAc, 3 Fuc, GalNAcol	1709	0,0	0,2	0,1	0,1	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0	0,1
3 Hex, 1 HexNAc, 1 Fuc, 1 NeuAc, GalNAcol	1722	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,4	0,1	0,2	0,0	0,1
2 Hex, 3 HexNAc, 1 Fuc, 1 SO3, GalNAcol	1735	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,3	0,1	0,0	0,0	0,1
2 Hex, 2 HexNAc, 3 Fuc, GalNAcol	1750	0,0	0,0	0,5	0,0	0,1	0,9	0,1	0,3	0,0	0,2
3 Hex, 3 HexNAc, 1 SO3, GalNAcol	1765	0,0	0,0	0,2	0,1	0,0	0,8	0,2	0,5	0,0	0,2
3 Hex, 2 HexNAc, 2 Fuc, GalNAcol	1780	0,2	0,1	0,3	0,1	0,1	1,0	0,1	0,2	0,1	0,1
3 Hex, 2 HexNAc, 1 NeuAc, GalNAcol	1793	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,4	0,2	0,2	0,0	0,1
2 Hex, 3 HexNAc, 2 Fuc, GalNAcol	1821	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,7	0,2	0,2	0,0	0,0
3 Hex, 3 HexNAc, 1 Fuc, GalNAcol	1851	0,2	0,0	0,2	0,0	0,0	0,6	0,2	0,3	0,1	0,1
3 Hex, 2 HexNAc, 2 Fuc, SO3, GalNAcol	1868	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0
1 Hex, 3 HexNAc, 3 Fuc, SO3, GalNAcol	1879	0,0	0,2	0,0	0,1	0,0	0,7	0,1	1,8	0,0	0,2
4 Hex, 3 HexNAc, GalNAcol	1881	0,3	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0
3 Hex, 1 HexNAc, 2 Fuc, 1 NeuAc, GalNAcol	1896	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,3	0,0	0,2	0,0	0,0
2 Hex, 2 HexNAc, 4 Fuc, GalNAcol	1924	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,3	0,1	0,0	0,0	0,0
2 Hex, 2 HexNAc, 2 Fuc, 1 NeuAc, GalNAcol	1937	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,4	0,1	0,5	0,0	0,1
3 Hex, 2 HexNAc, 3 Fuc, GalNAcol	1954	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,7	0,1	0,2	0,0	0,1
3 Hex, 2 HexNAc, 1 Fuc, 1 NeuAc, GalNAcol	1967	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5	0,1	0,3	0,0	0,1
2 Hex, 3 HexNAc, 3 Fuc, GalNAcol	1995	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	0,1	0,2	0,0	0,0
3 Hex, 3 HexNAc, 2 Fuc, GalNAcol	2025	0,1	0,0	0,2	0,0	0,0	0,6	0,1	0,2	0,0	0,0
4 Hex, 3 HexNAc, 1 Fuc, GalNAcol	2055	0,4	0,0	0,1	0,0	0,0	0,4	0,0	0,1	0,1	0,0
3 Hex, 2 HexNAc, 4 Fuc, GalNAcol	2128	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0

3 Hex, 2 HexNAc, 2 Fuc, 1 NeuAc, GalNAcol	2141	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0	0,2	0,0	0,1
3 Hex, 3 HexNAc, 3 Fuc, GalNAcol	2199	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,5	0,0	0,1	0,0	0,0
4 Hex, 3 HexNAc, 2 Fuc, GalNAcol	2229	0,1	0,0	0,1	0,0	0,0	0,4	0,0	0,1	0,0	0,0
		100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

Les résultats obtenus nous montrent de profondes différences de glycosylation entre les patients. Ces différences reposent principalement sur le niveau d'expression des glycannes et sur leur structure périphérique c'est-à-dire sialylation et sulfatation. Il ne semble pas y avoir de différences au niveau des cores des glycannes. L'antigène TF (Thomssen Friedenreich) à m/z 534 est la structure la plus exprimée chez tous les patients à l'exception de l'individu 10. On note cependant de fortes variations du niveau d'expression de ce glycanne, allant de 10 à 77 %. Parmi les autres structures majoritaires dont le niveau d'expression varie d'un individu à l'autre, on retrouve des petites structures neutres telles que les ions à m/z 708, 779 et 983 qui correspondent respectivement à des structures Galβ1,3GalNAcol ; Galβ1,3[GlcNAcβ1,6]GalNAcol et Galβ1,3[Galβ1,4GlcNAcβ1,6]GalNAcol. On retrouve également trois structures sialylées, portant des acides sialiques liés en α2,6 sur la GalNAcol et en α2,3 sur le galactose. Le niveau d'expression de ces structures varie de 0 à 8,5 % pour le sialyl Tn (NeuAcα2,6 GalNAcol), de 0 à 21 % pour l'antigène sialyl TF (Galβ1,3[NeuAc α2,6]GalNAcol) et de 0 à 7 % pour le disialyl TF (NeuAcα2,3Galβ1,3[NeuAc α2,6]GalNAcol).
Comme le montre l'histogramme ci-dessous (Fig.86), les mucines des patients 2, 5, 8, 9, 10 et 12 sont beaucoup plus sialylées que celles des autres patients.

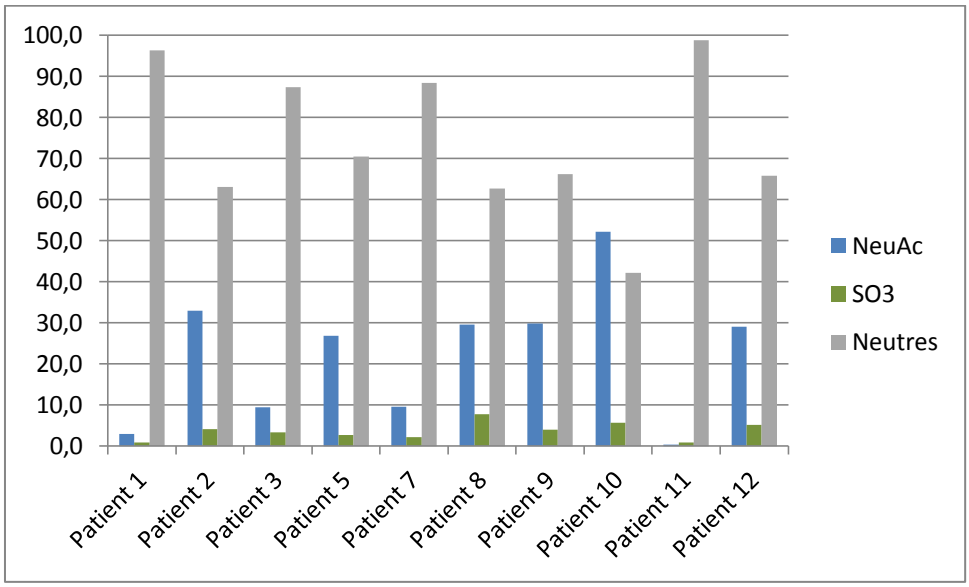


Figure 86 : Histogramme représentant les taux de O-glycannes sialylés, sulfatés et neutres chez les 10 patients atteints de mucoviscidose

L'analyse de la composition en monosaccharides nous permet de confirmer l'analyse structurale des glycannes (Fig.87). Le rapport molaire de l'acide sialique, exprimé par rapport à une GalNAc est en effet plus élevé pour les individus 2, 5, 8, 10 et 12. Le taux de fucosylation est relativement faible pour tous les individus sauf pour les mucines bronchiques de l'individu 7 qui semblent être un peu plus fucosylées (taux de un fucose pour une GalNAc)

© 2015 Tous droits réservés.
doc.univ-lille1.fr

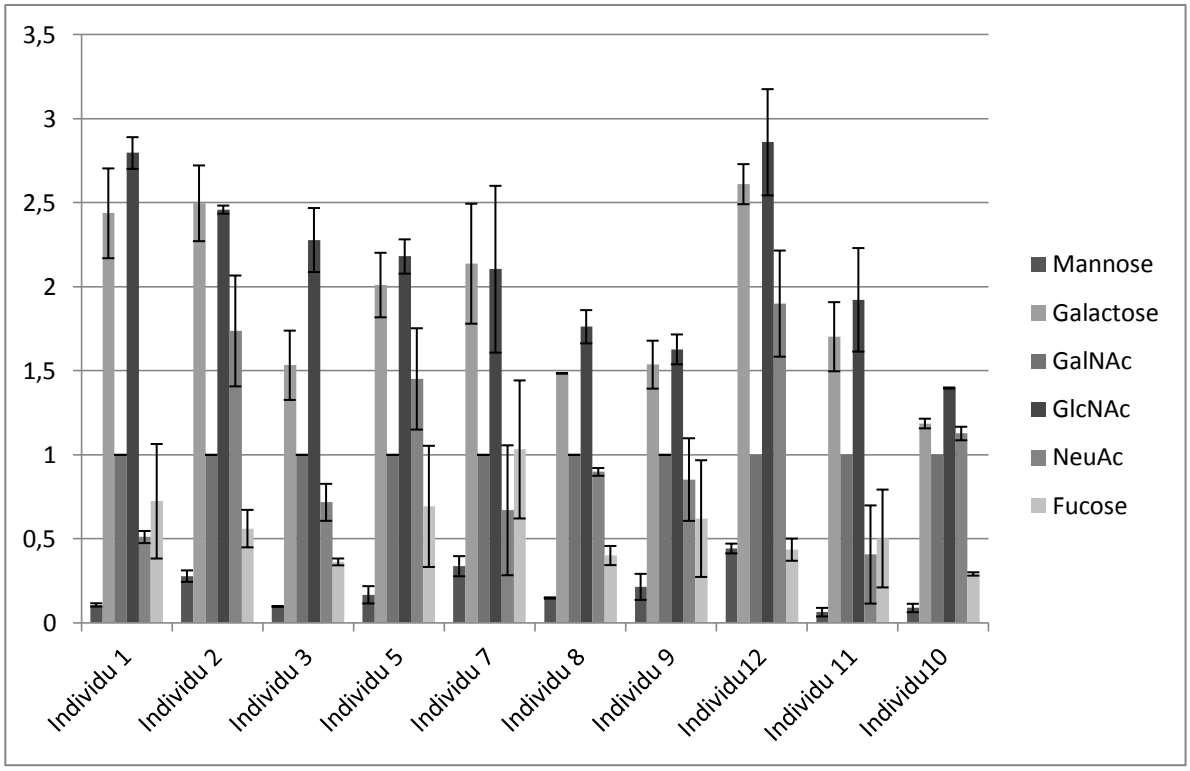


Figure 87 : Rapport molaire des monosaccharides composant les O-glycannes des mucines des différents patients atteints de mucoviscidose par rapport à la GalNAc

La densité de glycosylation des mucines a été estimée par chromatographie en phase gazeuse (Fig.88). Les mucines bronchiques des patients 1, 2, 3 et 8 ont une densité de glycosylation supérieure à 65 %, ce qui est classiquement retrouvé dans les mucines sécrétées. Le taux de glycosylation des mucines des autres individus est plus faible, avec des valeurs moyennes de 30 %. Ces résultats semblent indiquer un défaut de glycosylation des mucines ou alors une dégradation des mucines dans la lumière des épithélia.

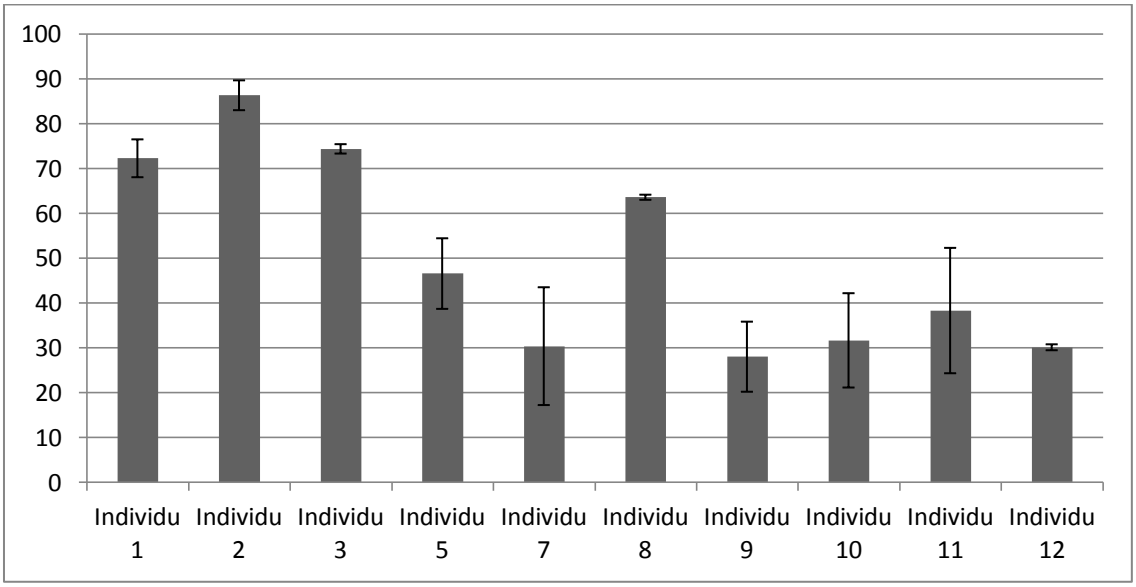


Figure 88 : Taux de glycosylation des mucines des différents patients atteints de mucoviscidose

© 2015 Tous droits réservés.

doc.univ-lille1.fr

3) Adhésion de Pseudomonas aeruginosa aux mucines pulmonaires des patients atteints de mucoviscidose

La souche PAO1 de *Pseudomonas aeruginosa* a été préalablement marquée au DAPI avant d'être incubée sur les mucines bronchiques immobilisées sur membrane de nitrocellulose. Comme le montre la figure 89, les adhésions les plus fortes sont observées pour les patients 7, 9 et 12 puis 8 et 10. Même si le nombre de patients inclus dans notre étude n'est pas suffisant, ces premiers résultats semblent indiquer que PAO1 adhère plus facilement sur des mucines moins glycosylées et présentant des structures sialylées.

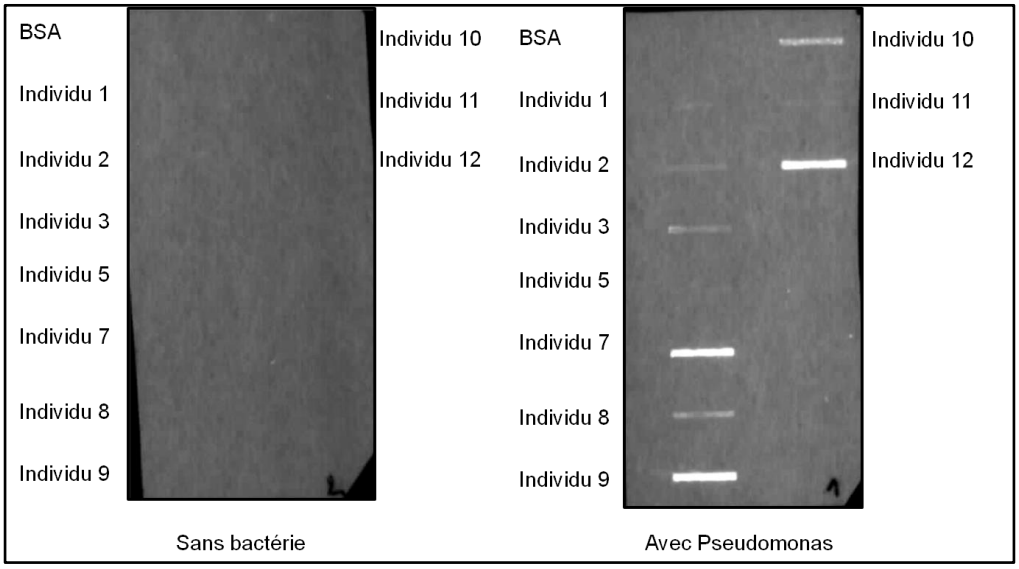


Figure 89 : Test d'adhésion sur membrane de nitrocellulose de *P. aeruginosa* sur des mucines issues d'expectorats d'individus atteints de mucoviscidose.

Afin d'étudier l'effet de l'acide sialique sur l'adhésion de *P. aeruginosa* aux mucines, nous avons pré-incubé les bactéries avec du NeuAc soluble commercial pendant 1h avant de réaliser le test d'adhésion aux mucines. Une nette diminution de l'adhésion de PAO1 aux mucines des patients 7, 8, 9, 10 et 12 a été observée (Fig.90). En revanche, la pré-incubation avec du NeuAc semble favoriser l'adhésion de PAO1 aux mucines des patients 1, 3, 5 et 11.

Ces résultats indiquent que l'acide sialique libre peut-être un bon inhibiteur de l'adhésion de PAO1 aux mucines si ces dernières sont majoritairement sialylées, ce qui suggère que *P. aeruginosa* possède des adhésines reconnaissant les motifs sialylés.

© 2015 Tous droits réservés. doc.univ-lille1.fr

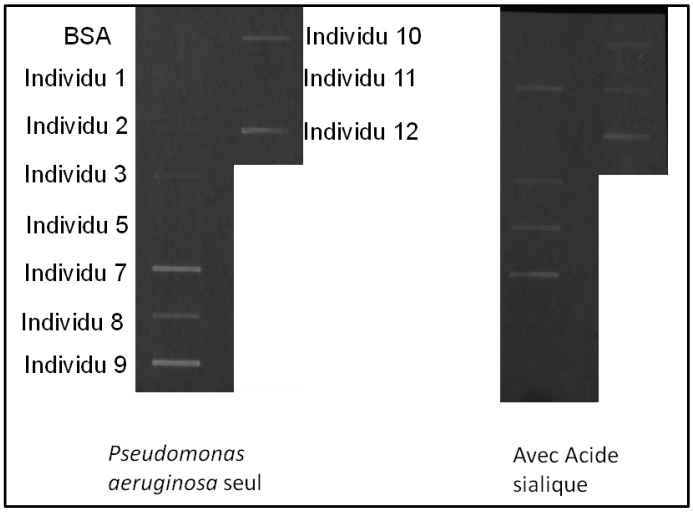


Figure 90 : Test d'inhibition de l'adhérence de *P. aeruginosa* avec co-incubation préalable soit avec de l'acide sialique.

Nous avons également pré-incubé PAO1 avec une solution de mucines issues du patient 10, à une concentration de 1mg/ml. Dans ces conditions, PAO1 n'est plus capable de se fixer aux mucines immobilisées sur la membrane de nitrocellulose (Fig.91).

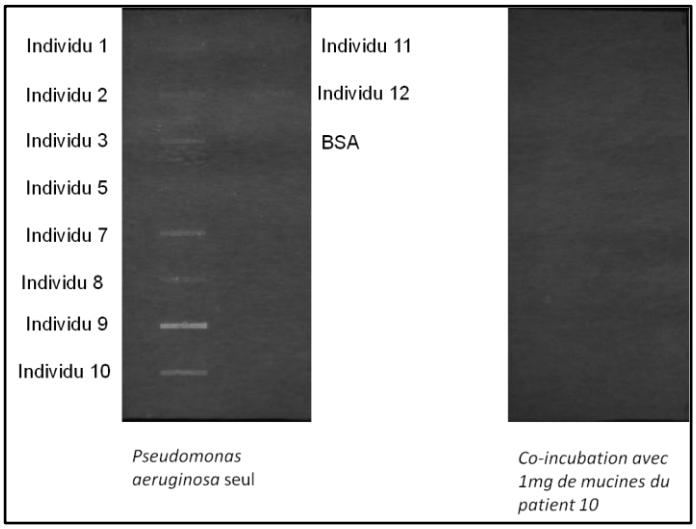


Figure 91 : Test d'inhibition de l'adhérence de *P. aeruginosa* avec co-incubation préalable avec 1 mg de mucines du patient 10

En pré-incubant PAO1, avec le mélange d'oligosaccharides libérés de l'axe peptidique des mucines du patient 10, nous avons observé une diminution de l'adhésion de la souche PAO1 (Fig.92).

© 2015 Tous droits réservés.

doc.univ-lille1.fr

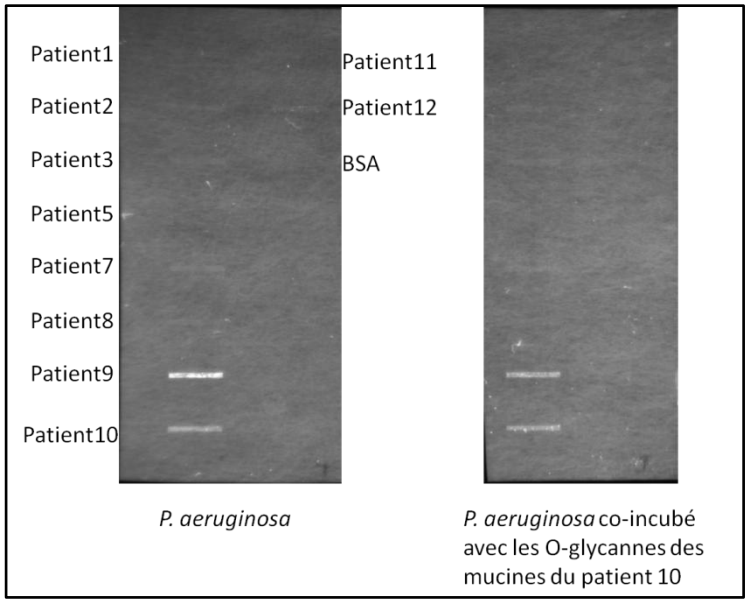


Figure 92 : Test d'inhibition de l'adhésion de *P. aeruginosa* avec incubation préalable avec les O-glycannes libérés par β-élimination de l'axe protéique des mucines.

L'inhibition de l'adhésion de PAO1 aux mucines n'est pas totale avec les glycannes seuls contrairement à ce qui a été observé avec les mucines totales. Deux hypothèses peuvent être proposées pour expliquer ces résultats :

-soit la présentation des glycannes complexes libres de l'hôte dans le site actif des adhésines de PAO1 n'est pas optimale. Dans ce cas, il faudrait peut-être coupler les glycannes à la BSA avant de faire cette inhibition. Il faudrait également digérer les mucines par une enzyme protéolytique de type pronase pour obtenir les glycopeptides et tester leur efficacité dans l'inhibition de PAO1 aux mucines.

-soit la quantité de glycannes libres testés n'était pas suffisante dans nos conditions.

Des tests d'inhibition de l'adhésion de PAO1 aux mucines ont également été réalisés en utilisant une solution de mucines pulmonaires porcines (porc n°3) à 8mg/ml. Ces mucines sont fortement acides (50 % de structures acides identifiées par spectrométrie de masse) et présentent notamment les ions à m/z 691, 895 et 1256 en quantité importante (Fig.93). Les résultats obtenus semblent indiquer que les mucines même digérées par la pronase peuvent inhiber l'adhésion de PAO1 sur les mucines immobilisées sur membrane de nitrocellulose. La partie glycannique et/ou glycopeptide semblent impliquées dans ce phénomène.

© 2015 Tous droits réservés.

doc.univ-lille1.fr

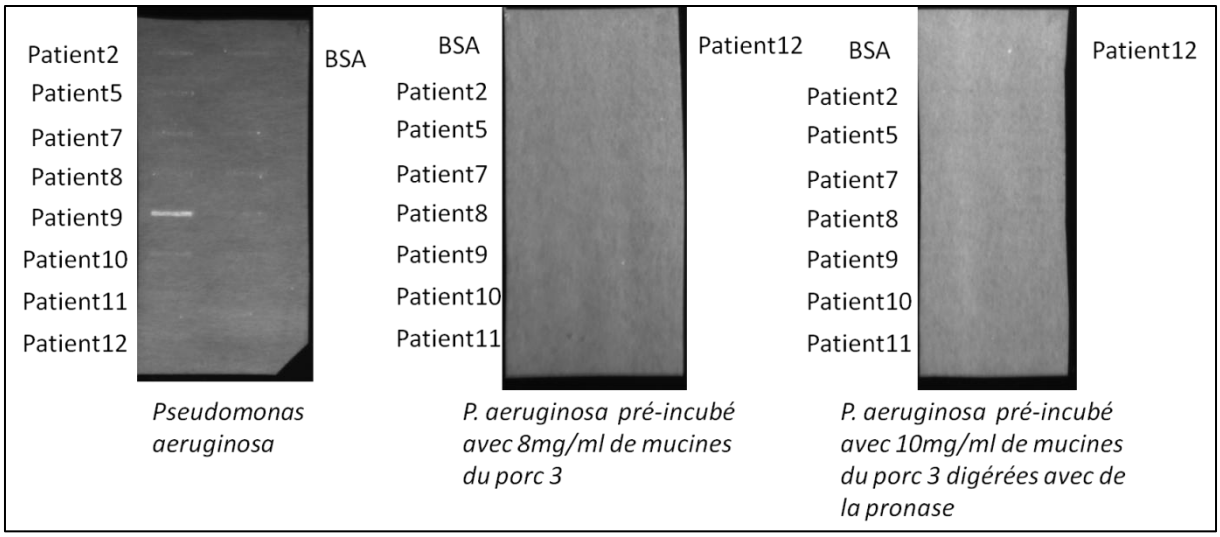


Figure 93 : Test d'inhibition de l'adhésion de *P. aeruginosa* par pré-incubation avec des mucines du porc 3 et des mucines digérées par la pronase.

4) Adhésion d'Aspergillus fumigatus aux mucines pulmonaires

Aucune étude n'a encore démontré qu'*A. fumigatus* est capable d'adhérer aux mucines pulmonaires. C'est pourquoi nous avons, de façon très préliminaire, réalisé un test d'adhésion d'une souche d'*A. fumigatus* marquée DS-Red sur les mucines utilisées précédemment. La figure 94 montre un profil d'adhésion très différent de celui obtenu avec PAO1. L'adhésion aux mucines de patients atteints de mucoviscidose est relativement faible et nous observons une plus forte adhésion sur les mucines pulmonaires humaines issues d'individus sains et sur les mucines porcines. Il semble donc qu'*A. fumigatus* reconnaît préférentiellement des mucines fortement sialylées.

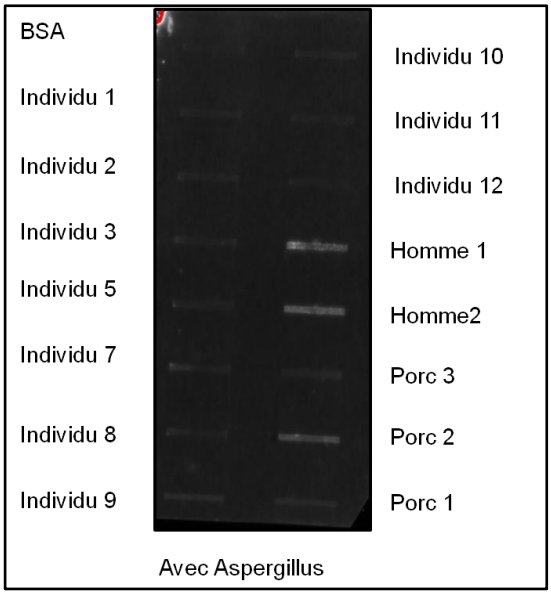


Figure 94 : Test d'adhésion sur membrane de nitrocellulose d' *A .fumigatus* sur des mucines issues de sputums d'individus atteints de mucoviscidose (Individu 1 à 12) ainsi que de poumons humains (Homme 1 et 2) et de porcs.

© 2015 Tous droits réservés.

doc.univ-lille1.fr

III. Discussion et perspectives

Dans ce travail, nous avons tout d'abord mis au point un nouveau test d'adhésion des bactéries (ou champignons) sur mucines immobilisées sur membranes de nitroellulose. Nous avons pu démontrer la spécificité de ce test, les bactéries ne se fixant que sur des mucines possédant des motifs reconnus par les adhésines bactériennes. Nous avons également démontré l'efficacité du test dans le screening de glycomimétiques capables de reduire l'adhésion des bactéries aux mucines.

Notre étude s'est concentrée sur les interactions hôte/pathogènes et plus particulièrement les relations existant entre *P. aeruginosa*, une bactérie pathogène du microbiome respiratoire et les mucines pulmonaires de patients atteints de mucoviscidose.

De nombreux travaux ont montré que *P. aeruginosa* avait une affinité particulière pour les glycoconjugués portant des motifs Le^x, sLe^x (Scharfman A. *et al.*, 2001) ou 6-sulfo-Le^x (Sharfman A. *et al.*, 2000). Il a également été montré que les mucines bronchiques d'individus atteints de mucoviscidose étaient plus sialylées et contenaient plus de sLe^x (Neu5Acα2-3Galβ1-4[Fucα1-3]GlcNAc) par rapport aux mucines d'autres individus (Davril M. *et al.*, 1999 ; Xia B. *et al.*, 2005 ; Schulz B.L. *et al.*, 2007). Notre travail a permis de mettre en évidence de profondes variations inter-individuelles de la glycosylation des mucines pulmonaires issues d'expectorats de patients. Il n'existe pas de profil-type de glycosylation propre à cette pathologie. Les niveaux de sialylation et de sulfatation sont différents d'un individu à l'autre ce qui pourrait expliquer les différences d'adhérence de *P. aeruginosa* à ces mucines. Cependant, pour qu'il y ait adhérence, il faut que ces épitopes soient accessibles aux bactéries. En effet, un taux de glycosylation important des mucines comme c'est le cas pour l'individu 2 n'est pas favorable à l'adhérence de *P. aeruginosa* bien que l'analyse structurale ait montré la présence de ligands sialylés et sulfatés. Ces ligands doivent être moins accessibles masqués par les structures neutres rendant plus difficile cette interaction hôte-pathogène. Concernant l'individu 7, le taux de sialylation et sulfatation est plus faible par rapport à l'individu mais affiche un phénomène d'adhérence important ce qui peut s'expliquer par un accès plus facile à ces structures puisque le taux de glycosylation est beaucoup plus faible. Cette étude doit être poursuivie et complétée en incluant un plus grand nombre de patients afin de confirmer l'importance de l'acide sialique et du taux de glycosylation dans les relations *P. aeruginosa* et mucines.

Nous avons pu modifier le profil d'adhérence de *P. aeruginosa* en le mettant en contact avec de l'acide sialique libre cependant cette adhérence n'est pas totalement inhibée puisque *P. aeruginosa* possèdent plusieurs protéines reconnaissant divers motifs glycanniques. FliD, qui est une protéine de la coiffe du flagelle composée de monomères de FliC reconnaît les structures de type motifs Le^x, sLe^x alors que FliC se limite au Le^x. L'acide sialique utilisé dans notre test d'inhibition d'adhérence sature ainsi les sites lectiniques de FliD et FliC. Mais *P. aeruginosa* possèdent d'autres lectines solubles impliquées dans la reconnaissance de structures contenant du galactose (LecA ou PA-IL) et du fucose (LecB ou PA-IIL). Ces lectines bien que présentes dans le cytoplasme, ont également été identifiées à

© 2015 Tous droits réservés. doc.univ-lille1.fr

la membrane externe de la bactérie (Tielker D. *et al*., 2005). Une équipe a réalisé une étude clinique en faisant inhaler du fucose et du galactose à des patients atteints de mucoviscidose dont le résultat a été de diminuer la formation de biofilm de *P. aeruginosa* (Hauber H.P. *et al.*, 2008). Il serait intéressant de pouvoir tester un mélange fucose/galactose/NeuAc (voire même GalNAc et/ou GlcNAc) chez les patients et de vérifier si la diminution de formation de biofilm et de colonisation est plus forte dans ces conditions. Pour poursuivre ce travail, il serait intéressant d'identifier d'autres lectines de P.aeruginosa capables de reconnaître les ligands glycanniques de l'hôte et de caractériser la structure de ces ligands. Cela permettra ensuite d'identifier et de développer des glycomimétiques permettant d'inhiber l'adhésion de bactéries aux mucines. La caractérisation de mutants pour les adhésines de P. aeruginosa impliquées dans la reconnaissance des mucines, tels que les mutants FliD, FliC, LecA et LecB, pourrait permettre de déterminer si la délétion d'une adhésine entraîne ou non la surexpression d'autres adhésines et si cette délétion a un impact sur l'adhérence aux mucines et la formation du biofilm.

Nous avons pu montrer qu'*Aspergillus* pouvait interagir avec les mucines respiratoires cependant les mécanismes mis en jeu restent à déterminer. L'étude doit être poursuivie afin de déterminer si ce sont les conidies dormantes, gonflées ou germées qui adhèrent aux mucines afin de déterminer quelles sont les adhésines impliquées dans cette interaction parmi celles qui ont été trouvées par analyse *in silico* (Upadhyay S.K. *et al.*, 2009).

Enfin, l'étude des mucines pulmonaires humaines et porcines nous a permis de déterminer une glycosylation comparable entre les deux espèces. Les mucines semblent être un bon substitut aux mucines humaines pour la mise au point de manipulations préalables avant de passer aux mucines humaines, matériel plus difficile à obtenir et souvent disponible en faible quantité.

La suite de ce travail serait de passer à un modèle cellulaire d'épithélium pulmonaire muqueux différencié afin de produire du mucus et de mettre en contact des pathogènes afin de déterminer s'ils modifient la glycosylation des mucines favorisant ainsi la colonisation ou s'ils s'adaptent à la glycosylation existante. Le mucus pulmonaire des patients atteints de mucoviscidose est le siège du développement de nombreux pathogènes. Il serait intéressant d'analyser leur interaction entre eux c'est-à-dire si l'un des pathogènes favorise ou non la croissance de l'autre, s'ils peuvent coopérer ensemble en formant un biofilm afin d'augmenter leur résistance vis-à-vis des antibiotiques et des antifongiques. En effet, il a été décrit que *P. aeruginosa* pouvait inhiber le développement et la formation du biofilm d'*A. fumigatus* ainsi que chez *C. albicans* (Mowat E. et al., 2010). La compréhension du dialogue moléculaire hôte-pathogènes est un enjeu essentiel pour limiter la propagation des infections.

© 2015 Tous droits réservés. doc.univ-lille1.fr

Partie 4: Glycosylation des mucines gastriques humaines en réponse à l'infection par *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori est une bactérie spiralée à Gram négatif mesurant entre 2 et 4µm de long et 0,5 à 1µm de large. C'est l'agent pathogène principal qui colonise le mucus gastrique. C'est une bactérie qui se développe facilement dans l'estomac grâce à plusieurs facteurs dont :

-la production d'uréase, une enzyme qui dégrade l'urée pour produire du carbonate et de l'ammoniac. L'ammoniac permet de créer un micro-environnement tamponné permettant la survie de la bactérie en milieu acide.

-ses flagelles unipolaires de 3µm de long environ lui confèrent sa mobilité pour se déplacer dans la couche de mucus (Kusters J.G. *et al.*, 2006)

H. pylori infecte plus de 50% de la population mondiale. La prévalence de l'infection varie en fonction du pays et du niveau socio-économique. Elle touche 25 à 50 % de la population dans les pays industrialisés pour atteindre 70 à 90 % dans les pays en développement. La transmission interhumaine d'*H. pylori* se ferait selon un mode oral-oral, au cours de l'enfance dans le milieu familial. La transmission féco-orale n'aurait lieu qu'en cas de mauvaises conditions d'hygiène (Dunn B.E *et al.*, 1997). La plupart des individus infectés sont asymptomatiques. Cependant, cette bactérie a un rôle dans plusieurs affections gastriques ou duodénales telles que les gastrites chroniques, ulcères gastro-duodénaux, cancers gastriques ou les lymphomes et adénocarcinomes gastriques.

Notre équipe travaille depuis plusieurs années sur les interactions hôte/pathogène dans la muqueuse gastrique afin d'identifier de nouveaux ligands glycanniques reconnus par *H. pylori* et portés par les mucines gastriques. Nous avons ainsi identifié un nouveau motif glycannique, le lacdiNAc (GalNAcβ1,4GlcNAc) porté spécifiquement par la mucine gastrique MUC5AC et reconnu par l'adhésine labA. Cette interaction semble participer au tropisme restreint de la bactérie pour l'estomac. Afin de mieux comprendre la physiopathologie de l'infection à *H. pylori* dans l'estomac, le travail qui m'a été confié a consisté à corréler les profils de glycosylation des mucines gastriques issues d'indvidus sains, de patients asymptomatiques infectés par *H. pylori* et de patients ayant des métaplasies intestinales causées par l'infection à *H. pylori*. Pour cela, j'ai participé, avec Marie Chevalier-Joncquel, à la caractérisation des répertoires de glycosylation des mucines gastriques par spectrométrie de masse (Publication acceptée dans Glycobiology).

Nous avons commencé les études d'adhérence de la bactérie aux mucines gastriques immobilisées sur membrane de nitrocellulose. Comme le montre la figure 95, nos premiers résultats indiquent que les souches cliniques isolées de patients présentant des ulcères gastriques ou des métaplasies adhèrent préférentiellement aux mucines provenant de patients ayant des métaplasies.

© 2015 Tous droits réservés. doc.univ-lille1.fr

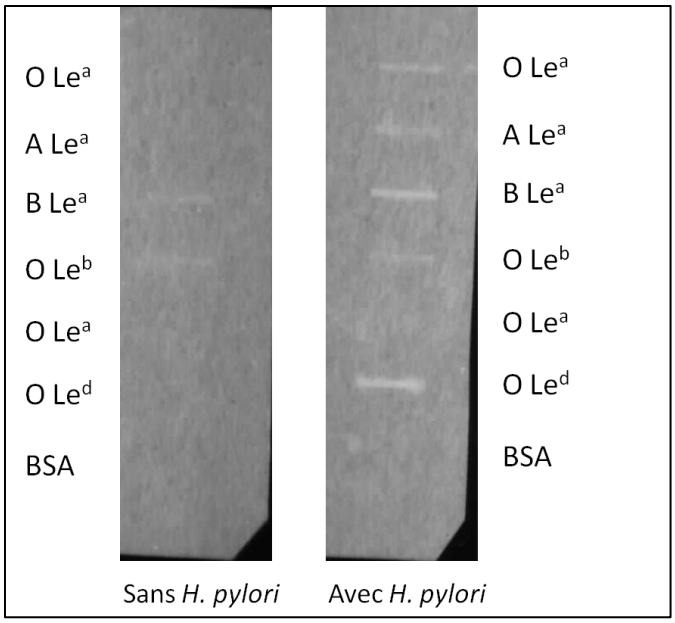


Figure 95: Test d'adhésion d'H.pylori sur des mucines gastriques portant différents antigènes de groupes sanguins issus de patients atteints ou non de métaplasies. Les dépôts de mucines 3 (B Le^a) et 6 (O Le^d) sont issus des patients ayant une métaplasie.

© 2015 Tous droits réservés.

doc.univ-lille1.fr

Alteration or adaptation, the two roads for human gastric mucin glycosylation infected by *Helicobacter pylori*

Marie Joncquel Chevalier Curt[1,2,3#], Karine Lecointe[1,2,3#], Adriana Mihalache[1,2,3,4,5], Yannick Rossez[1,2,3], Pierre Gosset[1,4,5], Renaud Léonard[1,2,3] and Catherine Robbe-Masselot[1,2,3,6]
[#] MJCC and KL contributed equally to this work.

. [1]Univ Lille Nord de France, F-59000 Lille, France
. [2]USTL, UGSF, IFR 147, F-59650 Villeneuve d'Ascq, France
. [3]CNRS, UMR 8576, F-59650 Villeneuve d'Ascq, France
. [4]UCLille, F-59000 Lille, France
. [5]Groupe Hospitalier de l'Institut Catholique Lillois/ Faculté Libre de Médecine, Service d'Anatomie Pathologie, F-59000 Lille, France
. [6]To whom correspondence should be addressed: Tel: +33-3-20-33-72-42; Fax: +333-20-43-65-55; e-mail: catherine.robbe@univ-lille1.fr

Proofs and reprints should be addressed to Catherine Robbe-Masselot.

Running title: *Human gastric mucins and Helicobacter pylori colonization*

Key words: asymptomatic patients /glycosylation /*Helicobacter pylori*/ human gastric mucins/ intestinal metaplasia

Supplementary data : Figure 1 : Purification of human gastric mucins O-glycans

Abstract

H. pylori is a gram negative bacteria that colonizes the mucus niche of the gastric mucosa and infects more than half of the world's human population. Chronic infection may cause gastritis, duodenal ulcer, intestinal metaplasia or gastric cancer. In the stomach, *H. pylori* interacts with O-glycans of gastric mucins but the mechanism by which the bacteria succeed in altering the mucosa remains mainly unknown.

To better understand the physiopathology of the infection, inhibitory adhesion assays were performed with various O-glycans expressed by human gastric mucins and topographic expression of gastric mucins MUC5AC and MUC6 was analyzed for healthy uninfected individuals, for infected asymptomatic individuals and for patients infected by *H. pylori* and having incomplete type of intestinal metaplasia. The glycosylation of gastric mucosa of asymptomatic individuals infected by *H. pylori* was determined and compared with the glycosylation pattern found for patients with incomplete type of intestinal metaplasia. Results show that *H. pylori* manages to modulate host's glycosylation during the course of infection in order to create a favorable niche whereas asymptomatic infected

© 2015 Tous droits réservés.

individuals seem to counteract further steps of infection development by adapting their mucus glycosylation.

Introduction

Throughout the gastrointestinal tract, specialized epithelial cells secrete mucus. It consists of water and mucins, which are long linear proteins carrying hundreds of oligosaccharide chains. The extreme length of these molecules, their high degree of glycosylation (more than 50% of their total weight) and their negative charges are major determinants of their ability to form gels. Under this form, mucins constitute a crucial barrier for the luminal protection of the gastrointestinal tract against bacterial infections. Previous studies in rat revealed the presence of two mucus layers: an inner stratified mucus layer that is firmly adherent to the epithelial cells and is devoid of microorganisms and an outer loosely adherent mucus layer where bacterial flora is located (Atuma *et al.* 2001). More recently, this observation was also confirmed in the mouse gastrointestinal mucus model (Ermund *et al.* 2013).

In human adult stomach, two mucins, MUC5AC and MUC6, are secreted by different categories of cell types. MUC5AC is highly expressed in mucous cells of the surface of the gastric epithelium, whereas MUC6 is expressed in mucous neck cells and principal cells of the body and in pyloric glands of the antrum (Corfield *et al.* 2001, De Bolos *et al.* 1995, Machado *et al.* 2000, Nordman *et al.* 2002). The mucus layer covering gastric mucosa acts as a physical barrier against chemical and mechanical aggression especially against acidity and colonization *by Helicobacter pylori*.
H. pylori is a gram negative spiral bacterium which colonizes human stomach and infects more than half of the world's population (Farinha and Gascoyne *et al.* 2005). Although most people are asymptomatic, persistent infection may cause different affections like gastritis, duodenal ulcer, intestinal metaplasia or gastric cancer. *H. pylori* is a highly heterogeneous bacterium which can express different virulence factors or outer membrane proteins involved in adhesion (Go *et al.* 1996, Parra Cid *et al.* 2013). This can explain the large variability of clinical presentation. However, it is now well documented that host genetics also play an important role in the outcome of infection. Adhesion of the bacteria to the gastric mucosa is a necessary prerequisite for the pathogenesis of *H. pylori*-related diseases and is mediated by bacterial adhesins, which recognize blood group antigens and other motifs carried by O-glycans of the host. The BabA (blood group antigen-binding adhesin) adhesin recognizes both H-type 1 and Lewis b blood group antigens expressed on normal gastric mucosa (Boren *et al.* 1993). The adhesin SabA (sialic-acid binding adhesin) recognizes sialyl-Lewis a and sialyl-Lewis x antigens expressed on inflamed gastric mucosa (Mahdavi *et al.* 2002). The adhesin LabA has been recently described and recognizes the lacdiNac motif present on MUC5AC gastric mucins (Rossez *et al.* 2014). The expression of these adhesins is tightly regulated, allowing a fast

© 2015 Tous droits réservés. doc.univ-lille1.fr

adaptation of the bacteria to changes of glycosylation occurring within host gastric mucosa during the course of infection (Odenbreit *et al.* 2009).

Invasive gastric carcinoma is preceded by multistep precancerous lesions from chronic gastritis, atrophic gastritis, intestinal metaplasia, dysplasia and subsequently to cancer (Correa and Piazuelo 2012). This series of changes is often initiated by *H. pylori* infection *via* the disturbance of host cell signalization, especially through its virulence factors. In this regard, atrophic gastritis and intestinal metaplasia are considered as precursors of gastric cancer, especially for the intestinal type of gastric malignancy. Even if not all individuals with intestinal metaplasia necessarily progress to gastric cancer, understanding the physiopathology of the infection will give information on the role played by host glycosylation in gastric homeostasis and in the outcome of infection.
In this work, the glycosylation of gastric mucosa of asymptomatic individuals infected by *H. pylori* was determined and compared with the glycosylation pattern found for patients with incomplete type of intestinal metaplasia. Samples from asymptomatic individuals were first treated so to separate the mucus in a water-soluble mucus fraction and an insoluble mucus fraction. This separation was in most cases impossible for samples from patients with incomplete intestinal metaplasia, which might be due to a reorganization of the mucus during the process of infection.

In a second time, the glycosylation profiles and structures of purified mucins O-glycans were determined for each sample using high performance liquid chromatography (HPLC) and tandem mass spectrometry. Results indicate that host epithelial cells predominantly govern changes of mucin glycosylation when infection remains asymptomatic whereas, in the opposite, *H. pylori* manages to control mucin glycosylation in patients with incomplete intestinal metaplasia in order to create a favorable ecological niche for its colonization.

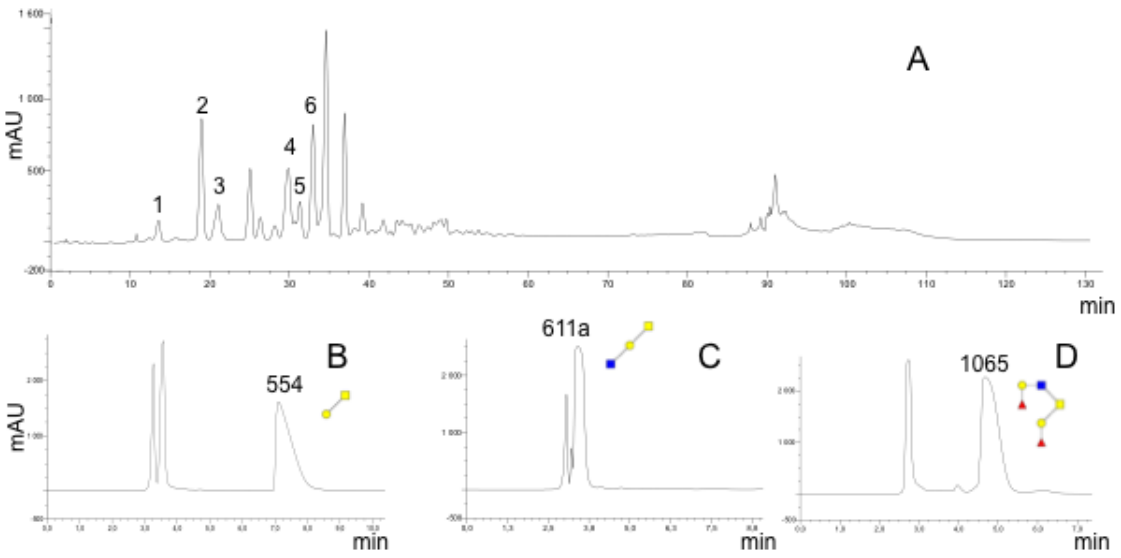
Results

Human gastric mucin O-glycans and adhesion of H. pylori to the gastric mucosa

In a previous work, we have shown that lacdiNAc motif (GalNAcβ1-4GlcNAc-) carried by MUC5AC is a target for *H. pylori* binding to the gastric mucosa (Rossez *et al.* 2014). This motif carried by free oligosaccharides was used in inhibition assays to prevent the adhesion of these bacteria to gastric mucus in tissue thin sections. Here, we have purified six other O-glycans expressed by human gastric mucins and used them in inhibitory adhesion assays. Three of these structures constituted the base motifs found on mucin O-glycans, two other glycans carried the antibiotic motif GlcNAcα1,4Gal and the last glycan carried the di-group H motif, mimicking Lewis b. O-glycans were purified and separated by two steps of chromatography, as shown in Supplemental Figure 1. The structural

© 2015 Tous droits réservés. doc.univ-lille1.fr

characterization of each glycan was performed by MALDI TOF MS/MS. For example, Figure 1 shows MS/MS spectra obtained after fragmentation of ions at m/z 1122, corresponding to two native oligosaccharides isolated respectively from peaks 5 and 6.



Supplementary Figure 1. Purification of human gastric mucin O-glycans. (A,B) HPLC chromatograms of human adult gastric mucins. Oligosaccharides alditols were separated on a primary amino-bounded column eluted with gradient described under "Materials and methods" (A). Fractions 1-6 were further refractionated on a C18 reverse phase column. HPLC chromatograms of fractions 1 (B), 2 (C) and 6 (D).

Within the first glycan (assigned as 1122a), the core 2 was unambiguously identified by the two diagnostic ions at m/z 408 ($Y_{1\alpha/2\beta}$, corresponding to a Gal linked to the GalNAcol) and m/z 449 ($Y_{1\beta/2\alpha}$, corresponding to a GlcNAc linked to the GalNAcol) (Figure 1A). The $Y_{1\alpha}$ fragment ion at m/z 554 indicated the presence of a blood group H antigen in the lower branch (Fucα1-2Galβ1-3GalNAcol). In the upper branch, a series of B_i ions at m/z 226 ($B_{1\alpha}$), 388 ($B_{2\alpha}$) and 591($B_{3\alpha}$) indicated a sequence composed of three monosaccharides: HexNAc-Gal-GlcNAc. The exact structure of this first O-glycan was previously confirmed by NMR experiments (Rossez *et al.* 2012). It is a core 2 O-glycan capped with a terminal GlcNAc linked in α1-4 to the Gal residue. Its structure is Fucα1-2Galβ1-3(GlcNAcα1-4Galβ1-4GlcNAcβ1-6)GalNAcol.

The fragmentation of the second structure (assigned as 1122b) gives rise to a $B_{2\alpha}$ ion at m/z 331 corresponding to a disaccharide Fucα1-2Gal and a $B_{3\alpha}$ ion at m/z 534 corresponding to a trisaccharide Fucα1-2Galβ1-3GlcNAc (Figure 1B), allowing the structural characterization of the upper branch. The two ions at m/z 408 and 449 assess, like for the first analyzed glycan in Figure 1A, that the second oligosaccharide is based on a core 2. The sequence of the lower branch was determined by two Y_i ions at m/z 408 ($Y_{1\alpha/2\beta}$) and 611 ($Y_{1\alpha}$), indicating a terminal GlcNAc residue linked to the Gal residue

© 2015 Tous droits réservés.

doc.univ-lille1.fr

constituting the core 2. The full glycan structure is GlcNAcβ1-3Galβ1-3(Fucα1-2Galβ1-3GlcNAcβ1-6)GalNAcol.

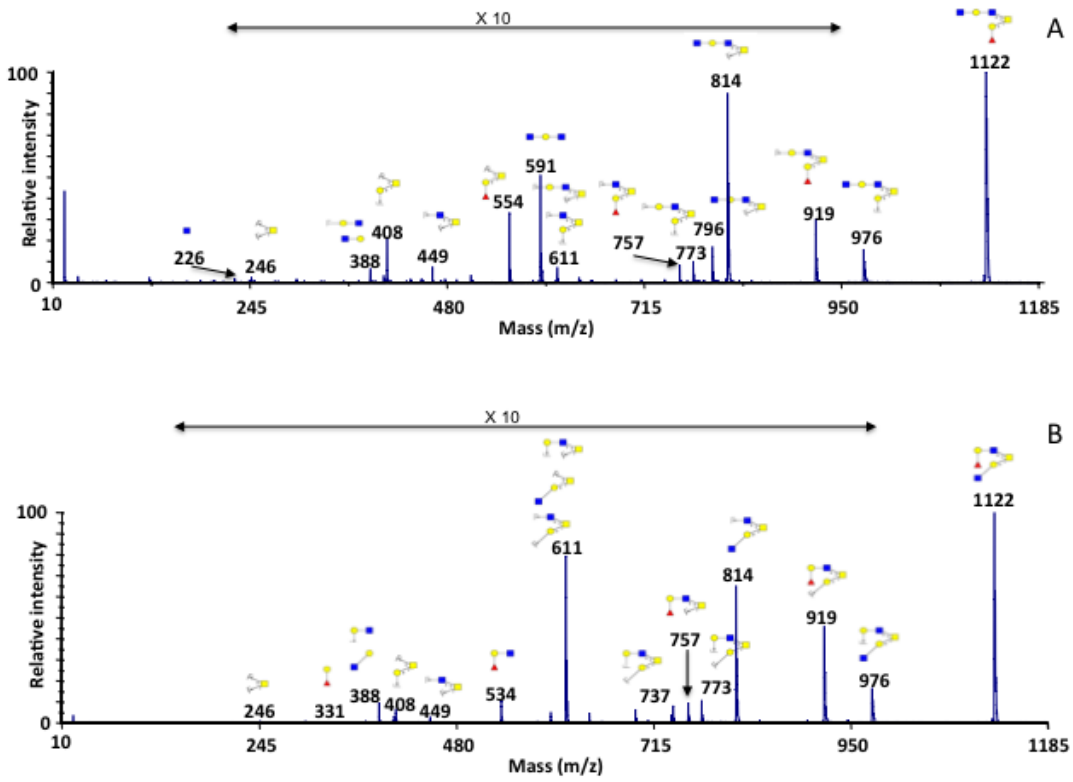


Figure ***1. Structural characterization of human gastric mucins O-glycans.*** MS/MS spectra, acquired in the positive ion mode, of the pseudomolecular ions at m/z 1122, isolated from fractions 5 (A) and 6 (B) after fractionation of the pool of gastric mucin O-glycans by HPLC.

In the same way, fragmentation analysis of the four other gastric mucin O-glycans used in this study confirmed that their structures were respectively: Galβ1-3GalNAcol (the Thomsen Friedenreich antigen, at m/z 554), GlcNAcβ1-3Galβ1-3GalNAcol at m/z 611a, Galβ1-3[GlcNAcβ1-6]GalNAcol at m/z 611b and Fucα1-2Galβ1-3[Fucα1-2Galβ1-4GlcNAcβ1-6]GalNAcol at m/z 1065.

The binding specificities of three *H. pylori* strains (two clinical strains and the J99 strain) to gastric mucosa of healthy individuals were assessed in competition assays on tissue thin sections, using the purified natural glycans described above, at a concentration of 0.5 mM. Short oligosaccharides (corresponding to ions at m/z 554, 611a and 611b) did not significantly inhibit adhesion of *H. pylori*, whatever the concentration of glycans used or the strain tested (Figure 2A-D). A significant inhibition of *H. pylori* binding was observed when using the two O-glycans corresponding to ions at m/z 1122, ranging from 52% to 89% of inhibition for 1122a (Figure 2G) and from 46% to 85% for 1122b

© 2015 Tous droits réservés.

doc.univ-lille1.fr

(Figure 2H). Inhibition of *H. pylori* adhesion by the core 2 glycan carrying two blood group H determinants (ion at m/z 1065) varied among strains and patient mucosae (Figure 2E-F and 2I-J).

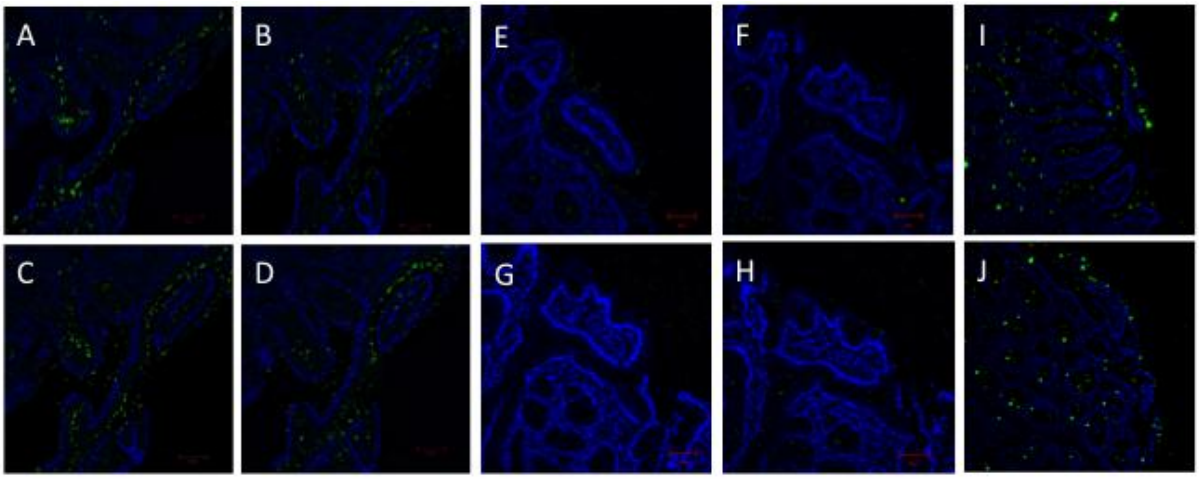


Figure 2. Inhibitions of bacterial binding in situ. *H. pylori* strains were overlayed on gastric tissue sections (magnification ×400)in absence or presence of potential inhibitors. Microscopy data are representative of 10 gastric tissue sections per condition. Pre-treatment with gastric mucin O-glycans at m/z 554 (B), 611a (C) and 611b (D) did not affect binding of *H. pylori* to gastric mucosa compared to untreated conditions (A). In the opposite, O-glycans at m/z 1122a (G) and 1122b (H) significantly reduced binding of the bacteria compared to the mock (E). Pre-incubation with the O-glycan at m/z 1065 reduced (F compared to E) or not (J compared to I) the binding of the bacteria to gastric mucosa, depending on the patients considered.

Percentage of adherent bacteria is calculated so: (number of bacteria adhering to the gastric mucosa after preincubation with soluble glycans relative to the number of bacteria adhering to the gastric mucosa without preincubation with soluble glycans) ×100.

© 2015 Tous droits réservés.

doc.univ-lille1.fr

Purification of human gastric mucins

To determine whether the three *H. pylori* binding glycans studied above were differently expressed on human mucins during the course of *H. pylori* infection, mucins were purified from gastric juice or gastric tissues of 25 infected asymptomatic individuals, 10 healthy uninfected individuals and 5 infected patients with incomplete type of intestinal metaplasia in the gastric mucosa.

It has been shown that, in asymptomatic infected individuals, *H. pylori* colonization is restricted to the loose outer gastric mucus layer (Lu *et al.* 2004). Thus, we have undertaken a study to verify whether mucin glycosylation upon infection may be altered in both layers or not. The two mucus layers were separated based on the insolubility of mucins from the inner layer in water and so to assess the efficiency of this separation method, the mucins contained in the resulting fractions were compared with the mucin localization patterns obtained by immunohistochemistry. As determined by slot blot, the outer layer exclusive hydrosoluble mucin was MUC5AC whereas the inner layer was composed of both insoluble MUC5AC and MUC6. This is in agreement with observations performed by immunohistochemistry: double immunostaining was carried out with polyclonal MUC5AC antibody (LUM5-1) and a monoclonal anti MUC6 (CLH5). MUC5AC was expressed on the surface epithelium, neck glands and sometimes in the deep glands (Figure 3A) whereas MUC6 was mainly expressed in the deep glands and never detected in the surface epithelium (Figure 3B). No alteration in the localization of these two mucins was observed in infected asymptomatic patients (Figure 3D-F).

Samples from people infected by *H. pylori* and having incomplete type of intestinal metaplasia were fully water soluble, except for one patient. In this patient, some MUC6 was detected by slot blot in the hydrosoluble mucins together with MUC5AC and some MUC2 was recovered in the insoluble mucin fractions. These results are in agreement with immunodetection of MUC5AC, MUC6 and MUC2 in gastric mucosa of patients with incomplete type of intestinal metaplasia (Figure 3G-O). Localization of MUC5AC remained unchanged and a coexpression with MUC2 was observed in the surface of the epithelium and in the neck glands (Figure 3M-O). In gastric mucosa of patients with intestinal metaplasia, a clear delocalization of MUC6 was detected: expression of MUC6 was not limited to deep glands but was also recovered in the surface epithelium and neck glands, colocalizing with MUC5AC.

© 2015 Tous droits réservés.

doc.univ-lille1.fr

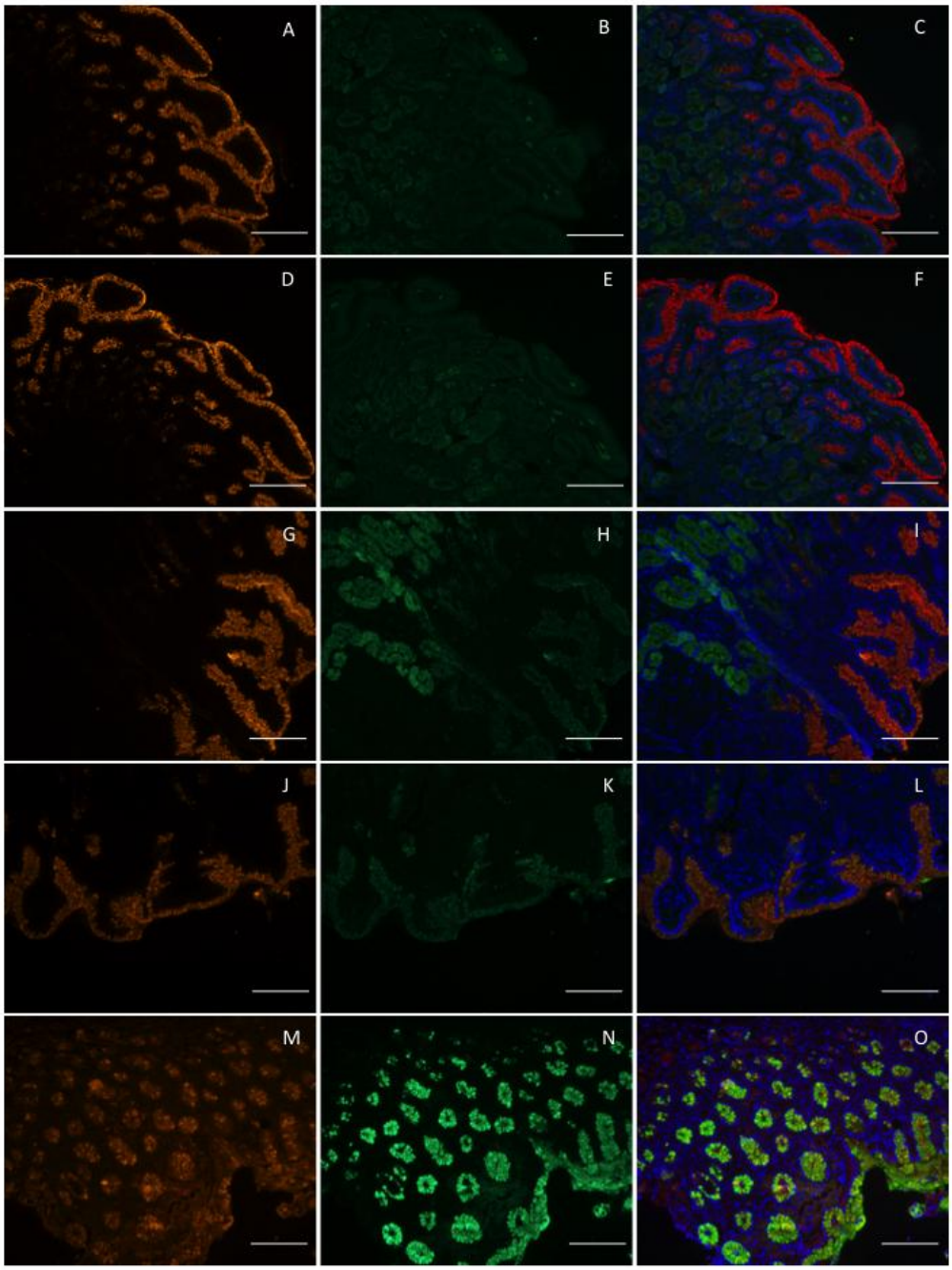


Figure 3. Immunohistochemical analysis of MUC5AC, MUC6 and MUC2 expression and localization in human stomachs. Double immunostaining for MUC5AC detected by LUM5-1 in red (A, D, G and J) and MUC6 in green detected by CLH-5 (B, E, H and K). Double immunostaining for MUC2 detected by LUM2-3 in red (M) and MUC5AC detected by 45M1 in green (N). C, F, I, L and O are merged images of the corresponding line. In healthy individuals (A-C) and asymptomatic patients infected by *H. pylori* (D-F), MUC5AC is exclusively observed at the surface of the gastric epithelium whereas MUC6 is only recovered in the deep glands and never detected at the surface. In patients with incomplete type of intestinal metaplasia (G-O), localization of MUC5AC remained unchanged whereas MUC6 was recovered both in the deep glands and in the surface mucous cells. Colocalization of MUC2 and MUC5AC was observed in the surface epithelium and neck glands. Scale bar corresponds to 50 µm.

© 2015 Tous droits réservés.

doc.univ-lille1.fr

Modification of the glycosylation profile of gastric mucins in asymptomatic infected individuals: a host defense against infection?

Purified mucins were analyzed for their glycan compositions and sequences. Oligosaccharides were released by base/borohydride treatment followed by desalting. The pool of oligosaccharide alditols obtained from each sample was thus permethylated before analysis by MALDI TOF tandem mass spectrometry and nano ESI Q-TOF MS/MS as previously published (Robbe *et al.* 2004). Fragment annotations applied in this study were based on the suggested nomenclature (Domon and Costello 1988, Karlsson *et al.* 1996). The fragment ions obtained were mainly A_i, B_i, Y_j and Z_j ions. Moreover, a α suffix was used to designate cleavages in the 6-linked branch and a β suffix for cleavage in the 3-linked branch from the GalNAcol. The relative abundance of oligosaccharides was calculated based on integration of peaks on MS spectra.

As shown in Figure 4 and Table I, the glycosylation profile of both hydrosoluble and adherent mucus mucins were modified upon infection by *H. pylori*. However the two mucus were not affected in the same ways. Among the prominent alterations of mucin O-glycans from adherent mucus (Figure 4B), we have identified a strong increase in the level of expression of short permethylated glycans at m/z 534, 575, 708, 749, 779, 953 and 983 (corresponding respectively to negatively charged glycans at m/z 408, 449, 554, 595, 611, 757 and 773) compared to non-infected people (Figure 4A). The percentage of expression of these short oligosaccharides ranged from 4.9% in uninfected individuals to 52.7% in asymptomatic patients. This was correlated to the high decrease in the level of expression of complex oligosaccharides containing several lactosaminic chains and/or Lewis determinants and blood group antigens. Indeed Figure 4B shows a clear absence of structures at a mass higher than 1900 Da. The level of expression of the lacdiNAc carrying O-glycan (at m/z 1198 for the permethylated glycan or at m/z 960 for the native form) remained unchanged upon infection. The rate of two core 2 capped O glycans with a terminal GlcNAcα1-4 linked to the Gal residue, known to be natural antibiotics against *H. pylori*, at m/z 1228 and 1402 (or ions at m/z 976 and 1122 for the native glycans) were significantly increased after infection.

Compared to adherent mucin O-glycans, fewer differences in the level of expression of mucin O-glycans purified from hydrosoluble mucus of uninfected (Figure 4C) and asymptomatic patients (Figure 4D) could be observed. Short oligosaccharides were increased (from 6.2% in uninfected individuals to 28.1% in asymptomatic patients) but complex oligosaccharides were still expressed after asymptomatic infection. No alteration in the level of expression of antibiotic glycans was observed and a low decrease in the lacdiNAc glycan was shown, from 4.9% in uninfected to 3.1% in asymptomatic patients.

In summary, glycosylation of hydrosoluble mucins, which are colonized by *H. pylori* in asymptomatic patients, are not profoundly modified after infection whereas significant alterations in the repertoire of

© 2015 Tous droits réservés. doc.univ-lille1.fr

glycosylation of adherent mucins were detected with increased expression of antibiotic glycans and short oligosaccharides not implicated as ligands for bacterial adhesion. These results suggest that epithelial cells modify overall glycosylation of adherent mucins to prevent their colonization.

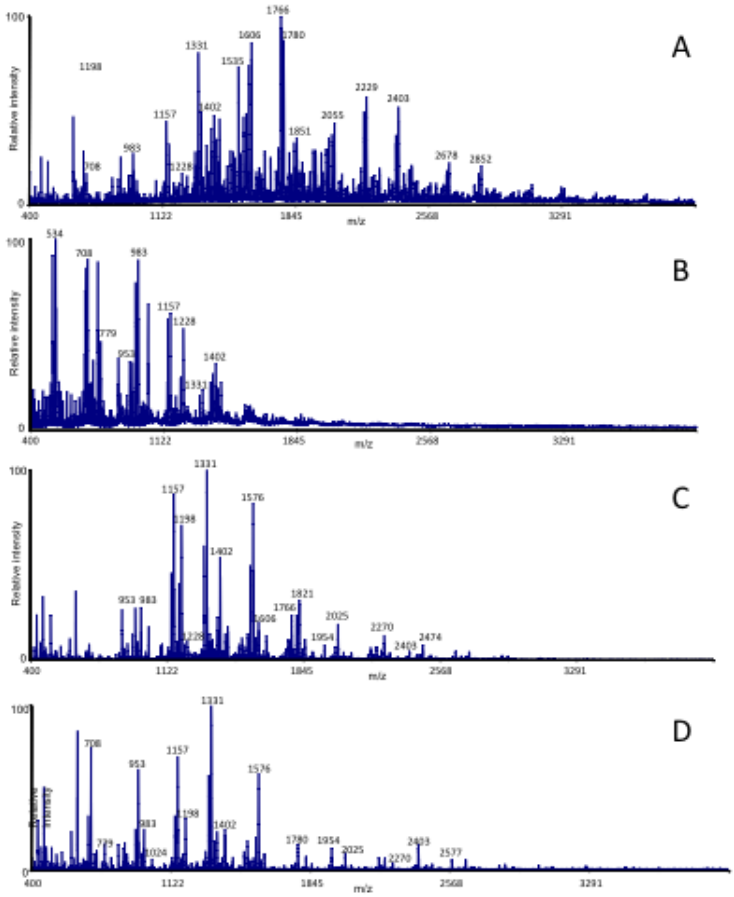


Figure 4. MS spectra of human gastric permethylated mucin *O-glycans, acquired in the positive ion mode.* (A) and (B): O-glycans from adherent mucus. (C) and (D): O-glycans from hydrosoluble mucus. Gastric mucin O-glycans were purified from mucosae of healthy non infected individuals (A and C) or asymptomatic infected patients (B and D).

Alterations in the glycosylation profile of gastric mucins in patients with incomplete type of intestinal metaplasia: a bacterial manipulation?

To determine whether gastric mucin glycosylation is altered differently in patients suffering of intestinal metaplasia than in asymptomatic individuals during the course of infection by *H. pylori*, we next investigated the repertoire of mucin O-glycans in metaplastic tissues. However, in contrast to healthy individuals and asymptomatic infected patients, it was just possible to separate the hydrosoluble and adherent mucins for one patient. For others, as shown in Table I, the mucus was

© 2015 Tous droits réservés.

doc.univ-lille1.fr

integrally solubilized in water and the established repertoire of O-glycans corresponded to all secreted mucins, without any separation.

Immunohistochemical studies have previously demonstrated that gastric mucins from incomplete type of intestinal metaplasia were characterized by a significant increase in acidic mucins with neoexpression of sulfomucins (Bodger *et al.* 2003, Segura and Montero 1983). Our results, obtained by mass spectrometry analysis, confirmed these data. We identified several O-glycans carrying sulfate residues, for example at m/z 663, 867 and 1041. Most of the time, sulfate groups were linked to the GlcNAc residue of the upper branch implicated in the core 2 structure. Around 7% of total O-glycans carried sulfate residues. Based on results obtained for the only patient with separated adherent and hydrosoluble mucins, it seems that sulfomucins are preferentially found in the hydrosoluble mucins.

In a precedent study, we have demonstrated that gastric mucins from healthy individuals were slightly sialylated: around 10% of sialylated glycans for individuals of blood group A and 9% for individuals of blood group B and H (Rossez *et al.* 2012). In the present study of gastric mucins from patients with intestinal metaplasia, sialylated O-glycans represented around 20% of total O-glycans identified, which constituted a significant increase in the sialylation of mucins. NeuAc residues were mainly carried by the Gal residues of the lower branch implicated in the core 2 structure. It could be noticed that O-glycans carrying di-blood group H, B or A antigens (corresponding to ions at m/z 1331, 1739 and 1821 respectively) were mainly expressed on healthy gastric mucins (Table 1). In patients with intestinal metaplasia, the blood group epitopes in the lower branch were substituted by a NeuAc residue linked to the Gal residue. This result suggests a potential competition between sialyltransferase and fucosyltransferase for the substitution on the galactose.

A strong increase of expression of the signal at m/z 1518 was observed, ranging from 1.6% in healthy patients to 5.5% in metaplasia (Table 1). Interestingly, among the isomeric structures corresponding to this m/z ratio, there are the sialyl Lewis a and the sialyl Lewis x O-glycans, which are known to be ligands of the SabA adhesin of *H. pylori*.

Expression of short oligosaccharides slightly increased in metaplasia (26.4% of total oligosaccharides) compared with non-infected patients (5.5%). However, this result seemed to be patient-dependent since only 8.1% of short oligosaccharides were detected in the patient with metaplasia and separated mucus layers (Table I).

Expression of antibiotic glycans at m/z 1228 and 1402 decreased in metaplastic tissues in comparison with healthy mucosa. For example, expression of the ion at m/z 1402 was 3.5% in healthy mucosa, 5.2% in asymptomatic infected patients and only 2.3% in patients with metaplasia. The lacdiNAc carrying glycan was more expressed in intestinal metaplasia, with 8.5% of total glycan expression instead of 3.4% in healthy mucosa and 2.3% in asymptomatic patients (Table I).

© 2015 Tous droits réservés. doc.univ-lille1.fr

Taken together, these data seem to indicate that during the course of infection, *H. pylori* is able to take the control, at least partially, on the host mucin glycosylation. This is an important step in the process of bacterial infection to create a favorable niche for colonization.

Discussion

Numerous studies emphasize the role and importance of specific mucin O-glycans during *H. pylori* colonization of the stomach. In particular, blood group A, B, H and Lewis b antigens were shown to interact with BabA adhesins (Aspholm-Hurtig *et al.* 2004, Boren *et al.* 1993) and SabA recognizes the sialyl Le^a and sialyl Le^x antigens (Ilver *et al.* 1998, Mahdavi *et al.* 2002). More recently, we have demonstrated that labA binds to O-glycans carrying a lacdiNac motif (Rossez *et al.* 2014). In this study, we have investigated which oligosaccharides, among various families of purified human gastric mucin O-glycans, can serve as new ligands for *H. pylori* binding to gastric mucosa. Using inhibitory adhesion assays, we demonstrated that short oligosaccharides, such as di-and trisaccharides of the O-glycan cores, were not implicated in the binding of the bacteria to mucins. The core 2 O-glycan carrying two blood group H determinants was also purified and used in inhibition assays. Its binding capacity to *H. pylori* is not only strains-dependant but also patient's gastric mucosa-dependant. Interestingly, we had previously shown that this O-glycan is a major component of human gastric mucins in healthy individuals, representing from 18% in blood group A and B individuals to 30% of total glycans in blood group H patients (Rossez *et al.* 2012). As mentioned above, blood group H epitope is recognized by BabA adhesins. Thus, variation in the inhibition of *H. pylori* adhesion to the gastric mucosa for a given strain certainly originates from the quantity of available epitopes on the various human gastric tissues.

Two other isomeric core 2 O-glycans were purified and used in this study. One of them is a α1-4 GlcNAc capped mucin O-glycan. This specific oligosaccharide, expressed by gastric MUC6 mucins (Nakayama *et al.* 1999), was demonstrated to function as a natural antibiotic by inhibiting *H. pylori* growth and decreasing formation of the cell wall component cholesteryl-α-D-gucopyranoside (Karasawa *et al.* 2012, Kawakubo *et al.* 2004). The second one is a core 2 O-glycan carrying a blood group H epitope in the upper branch. Both of them strongly inhibit adhesion of *H. pylori* to gastric mucosa. As both glycans carry blood group H on the upper or lower branch, we can speculate that binding occurs between BabA and this antigen. It is noteworthy that *H. pylori* can bind to glycans with an antibiotic function. This result indicates that attachment of the bacteria to mucins is not only important for bacterial colonization but may also help the hosts to fight infection more efficiently.

Altogether, our data demonstrated that not all glycans expressed by gastric mucins can be recognized by *H. pylori*. Therefore, it is reasonable to consider that alterations in the glycosylation profile of

© 2015 Tous droits réservés. doc.univ-lille1.fr

mucins during the course of infection will profoundly affect the binding capacity of *H. pylori* to mucosa.

To better understand the relationships and dialogue between *H. pylori* and host gastric mucins during infection, we further characterized modification of mucin glycosylation in gastric mucosa of asymptomatic infected individuals and patients with intestinal metaplasia, in comparison to healthy uninfected individuals. Several studies have previously dealt with alteration of mucin glycosylation after infection with *H. pylori*. However most of them relied on immunohistochemistry or Western-blotting analysis using lectins or antibodies and concerned mainly infection in animal models (Byrd *et al.* 1997, Kobayashi *et al.* 2009, Linden *et al.* 2008, Marcos *et al.* 2008, Ota *et al.* 1998, Radziejewska *et al.* 2011, Teixeira *et al.* 2002). Major findings from these studies drew the conclusion that most of the changes in expression, glycosylation and spatial distribution of mucins related to *H. pylori* infection are crucial for the establishment of a successful infection. In 2009, Cooke et al. demonstrated using the rhesus macaque model a dramatic decrease in diversity and abundance of oligosaccharides during the acute phase of infection which returns to preinoculation levels during chronic infection. They speculated that these changes are critical for bacterial colonization and persistence (Cooke *et al.* 2009). However, these studies did not solve fundamental questions such as understanding the diverse pathogenicity of *H. pylori* strains among individuals and why only some *H. pylori* infected individuals will develop disease.

In this work, we compared human gastric mucin glycosylation in two physiologically divergent status of *H. pylori* infection: an asymptomatic infection with no medical need to eradicate bacteria and a precancerous stage relative to infection with metaplastic lesions for which the Maastrich IV/Florence consensus report recommends a treatment (Malfertheiner *et al.* 2012). Purified secreted mucins from gastric juice or gastric tissues were separated in two fractions: hydrosoluble mucins and water insoluble mucins. In asymptomatic infected patients, hydrosoluble mucins were exclusively composed of MUC5AC and water insoluble mucins comprised both MUC5AC and MUC6. Moreover, no alteration in the localization of these two mucins was observed in gastric mucosa of these patients in comparison to healthy mucosa. In patients with intestinal metaplasia, almost all MUC5AC and MUC6 mucins were hydrosoluble. This result seems to indicate modification in the hydrosolubility of mucins. Since oligosaccharide chains contribute to the viscosity of mucins (Sellers and Allen 1989, Slomiany *et al.* 1987), the alteration of mucin glycosylation observed in this study may be directly correlated with the changes in hydrosoluble properties of mucins. Moreover, charged residues such as sulfate and sialic acid, which significantly increased in patients with intestinal metaplasia in comparison to healthy individuals, are also implicated in viscoelastic properties of mucins. Such changes in the expression, localization and viscosity of gastric mucins in *H. pylori* infected stomach have previously been reported (Markesich *et al.* 1995, Slomiany and Slomiany 1992).

© 2015 Tous droits réservés. doc.univ-lille1.fr

In asymptomatic infected patients, we have demonstrated that whereas glycosylation of hydrosoluble mucins was not significantly affected by *H. pylori* infection, a strong increase in the level of expression of short oligosaccharides correlated with a profound decrease in complex oligosaccharides was observed in adherent mucins. Moreover, expression of natural antibiotics against *H. pylori* based on αGlcNAc capped glycans was significantly increased.

On the contrary, for patients with incomplete type of intestinal metaplasia, expression of antibiotic glycans decreased and the level of expression of short oligosaccharides slightly increased. A strong expression of complex oligosaccharides carrying blood group and Lewis antigens was recovered, as well as was observed an increase in the level of lacdiNac glycans. Mucins from mucosa with meaplastic lesions were also characterized by an increase in their charge density (sialylation and sulfatation) leading to new binding targets for the bacteria such as sialyl Le^a or sialyl Le^x antigens (Mahdavi *et al.* 2002).

Altogether these findings emphasize that *H. pylori's* presence differently alters the pattern of gastric mucins glycosylation from individual to individual. When infection remains asymptomatic for the patient, the decreased number of binding sites for the bacteria correlated with increased expression of antibiotic glycans in the inner areas of the mucus barrier. This indicates that alterations of mucin glycosyation are then mainly governed by the host in order to limit the niche available for *H. pylori* and to protect the underlying epithelium by restricting bacteria to the outer mucus layer. In the opposite, when infection progresses to precancerous stages, it seems that alterations of mucin glycosylation are more beneficial for the bacteria with an increase in bacterial binding sites. This suggests that *H. pylori* manages to modulate host's glycosylation in order to create a favorable environment.

Materials and methods

Human samples and mucin preparation

Gastric tissues from 10 healthy uninfected individuals, 25 infected asymptomatic individuals and 5 infected patients with incomplete type of intestinal metaplasia in the gastric mucosa were collected by Dr Bara according to the protocols approved by the National Ethical Committee. The human adult stomachs were obtained from France Transplant Association from kidney donors. Samples of mucosa were scraped and snapfrozen in liquid nitrogen and stored in liquid nitrogen until used. Samples collected both included the inner firmly adherent and the outer loosely adherent mucus gel layers. After thawing, the tissue was kept at 4°C, homogenized in distilled water (Ultra-turrax, Jankee and Kunkel, Stauffer, Germany) and centrifuged (1 h at 48,000 ×g). The resultant supernatant was dialyzed against distilled water for 2 days at 4°C and lyophilized (Lesuffleur *et al.* 1995).

© 2015 Tous droits réservés. doc.univ-lille1.fr

Detection of H. pylori by using PCR technique

Phenol/chloroform method was used to for DNA isolation from the tissue samples. The urease gene of *H. pylori* was amplified using the PCR method with primers sens HPU1 (5'-GCC-AAT-GGT-AAA-TTA-GTT-3') or HPUI1 (5'-ATT-GAC-ATT-GGC-GGT-AAC-3') and antisens HPU2 (5'-CTC-CTT-AAT-TGT-TTT-TAC-3'). The premix reaction was prepared to include 5 µL Taq 5x Promega® buffer, 0,2 µL primer sens 10 µM, 0,2 µL primer antisens 10 µM, 0,5 µL dNTP 10 mM Promega®, 0.125 µL Taq polymerase Promega® 5UI/ µL and H2O qsp 23 µL. Reaction mixture was made with 23 µL of premix and 2 µL of bacterial DNA. Conditions for PCR were 5 min at 95°C for 1 cycle. Then 1 min at 94°C, 1min at 45°C and 1 min at 72°C; it was performed for 34 cycles. The last cycle was performed at 72°C during 7 min. The PCR products were detected after agarose gel electrophoresis (100 V, 45 min) and coloration with ethidium bromide.

Isolation and purification of mucins from gastric tissues

Mucins were solubilized in 4 M guanidine chloride solution containing 5 mM ethylenediaminetetraacetic acid, 10 mM benzamidine, 5 mM N-ethylmaleimide, 0.1 mg/mL soy bean trypsin inhibitor and 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride.
CsCl was added to an initial density of 1.4 g/mL and mucins were purified by isopycnic density-gradient centrifugation (Beckman Coulter LE80K ultracentrifuge; 70.1 Ti rotor,
417 600 g at 15°C for 72 h). Fractions of 1 mL were collected from the bottom of the tube and analyzed for periodic acid-Schiff (PAS) reactivity and density. The mucin-containing fractions were pooled, dialyzed into water, and lyophilized.
Mucins were then separated in two fractions: hydrosoluble mucins and water insoluble mucins. For that, the mucin-containing fractions were resuspended in water and submitted to centrifugation at 12 100 g during 30 min.

Slot-blotting of mucin proteins

Polyclonal antibodies (LUM6-1 and LUM2-3) used in this study were kind gifts from Dr Ingemar Carlstedt, University of Lund, Sweden. One monoclonal antibody recognizing MUC5AC, kindly provided by Dr Jacques Bara (45M1), was also used. Aliquots of purified mucins were slot-blotted onto polyvinylidene fluoride membranes. The membranes were then blocked with 0.5% (w/v) skimmed milk in tris-buffered saline containing 0.1% (v/v) Tween 20 (blocking solution) for 1 h and incubated with mono- or polyclonal antibodies at a dilution of 1:1000 in blocking solution. Mono- or polyclonal antibodies used in this study were 45-M1, LUM6-1 and LUM 2-3 antisera recognizing MUC5AC, MUC6 and MUC2 respectively. Bound antibody was detected by incubation with

© 2015 Tous droits réservés. doc.univ-lille1.fr

horseradish peroxidase- conjugated anti-rabbit (1:10,000) antibody in blocking solution for 1 h followed by the ECL Western detection kit. All incubations were carried out at room temperature. Total carbohydrate was determined using a PAS assay after slot blotting of mucins onto nitrocellulose (Thornton *et al.* 1989).

Release of oligosaccharides from mucin by alkaline borohydride treatment

The gastric mucins were submitted to β-elimination under reductive conditions (0.1 M KOH, 1 M KBH4 for 24 h at 45°C. The mixture of oligosaccharides alditols was purified by size exclusion chromatography on a column of Bio-Gel P2 (85 cm x 2 cm ID, 400 mesh, Bio-Rad, Richmond, CA) equilibrated and elutued with water (10 mL/h) at room temperature. The oligosaccharide fractions, detected by UV absorption at 206 nm, were pooled for structural analysis.

Permethylation and mucin glycosylation analysis by MALDI-TOF mass spectrometry

Permethylation of the mixture of oligosaccharide alditols was carried out with the sodium hydroxide procedure described by Ciucanu and Kerek. After derivatization, the reaction products were dissolved in 200 µL of methanol and further purified on a C18 Sep-Pak column (Waters, Milford, MA). Permethylated oligosaccharides were analyzed by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry (MS) in positive ion reflective mode as $[M+Na]^+$. Quantification through the relative percentage of each oligosaccharide was calculated based on integration of peaks on MS spectra.

Electrospray mass spectrometry (nano-ESI-MS/MS)

All analyses were performed on a Q-STAR Pulsar Q-TOF mass spectrometer (Applied Biosystems/MDS Sciex, Toronto, Canada) fitted with a nano-electrospray ion source (Protana, Odense, Denmark). Oligosaccharides dissolved in water (60 pmol/µL) were acidified by addition of an equal volume of methanol/0.1% formic acid and sprayed from gold-coated “medium length” borosilicate capillaries (Protana). A potential of −800 V was applied to the capillary tip and the focusing potential was set at −100 V, the declustering
potential varying between −60 and −110 V. For the recording of conventional mass spectra, TOF data were acquired by accumulation of 10 multiple channel acquisition scans over mass ranges of m/z 400–2000. In the collision-induced dissociation (CID) tandem MS analyses, multiple charged ions were fragmented using nitrogen as collision gas (5.3 × 10−5 Torr), the collision energy varying between −40 and −90 eV to obtain optimal fragmentation. The CID spectra were recorded on the orthogonal TOF analyzer over a range of m/z 80– 2000. Data acquisition was optimized to supply the highest possible resolution and the best signal-to-noise ratio even in the case of low-abundance signals.

© 2015 Tous droits réservés. doc.univ-lille1.fr

Typically, the full width at half maximum was 7000 in the measured mass ranges. External calibration was performed prior to each measure using a 4-pmol/µL solution of taurocholic acid in acetonitrile/water (50:50, v/v) containing 2 mM of ammonium acetate.

Fractionation of the oligosaccharide alditols by HPLC

The mixture of oligosaccharide alditols released from each sample was subjected to fractionation by HPLC (Dionex Chromeleon System, Sunnyvale, CA) on a primary amino-bonded silica column (Supelcosyl, LC-NH2, 4.6 × 250 mm, Supelco, Bellefonte, CA). The column was equilibrated with the initial solvent using a mixture of acetonitrile/H2O (80:20, by vol) with a flow rate of 1 mL/min. After the injection, a linear gradient from 80:20 to 40:60 (acetonitrile/H2O, by vol) for 80 min was applied followed by isocratic conditions [40:60 (acetonitrile/ H2O, by vol)] for 20 min. A second step of HPLC on a C18 reverse-phase column was conducted for the fraction containing several oligosaccharides in one peak. The column was equilibrated with H2O at a flow rate of 1 mL/min and oligosaccharides were eluted with H2O. Oligosaccharides were detected by UV spectroscopy at 200 nm using an UVD 170U detector (Dionex Chromeleon System).

Immunohistochemical analysis

Human biopsies were formalin fixed and paraffin embedded. Sections of 3 μm thickness were prepared from paraffin block of formalin-fixed. Heat pre-treatment during 10 minutes was realized in citrate buffer pH 4.0 for all antibodies. Slides incubated without primary antibodies were performed for negative control. Sections were incubated overnight with primary antibodies against : MUC5AC (1:100), MUC6 (1:10), or MUC2 (1:100). After washing, either the appropriate Alexa Fluor® conjugated secondary antibody anti-mouse (1:500) or anti-rabbit (1:500) was added and incubated for 60 min. Slides were counterstained with DAPI.

Bacterial strains and growth media

Helicobacter pylori strain J99 (Alm *et al.* 1999) was cultivated on blood agar plates with 10% of decomplemented fetal calf serum, supplemented with an antibiotic-antifungal mix (0.31µg/mL of polymyxin B, 2.5 µg/mL of amphotericin B, 12.5 µg/mL of vancomycin and 6.25 µg/mL of trimethoprim) and appropriated antibiotics (20 µg/mL of kanamycin, 5 µg/mL of apramycin or 5 µg/mL of chloramphenicol), at 37°C in a microaerophilic atmosphere. Clinical isolates of *H. pylori* were subcultured in Agar Columbia Chocolate along with 0.1 ml of Brain Heart Infusion broth and incubated in microaerobic conditions, stored at 37°C, during three days.

© 2015 Tous droits réservés. doc.univ-lille1.fr

H. pylori adhesion assays to gastric mucosa

H. pylori was labeled with fluorescein isothiocyanate and adhesion assays were performed as previously described (Falk *et al.* 1993). For inhibition assays, the bacteria (50 µl of the suspension containing 10^8 bacteria/ml diluted 2.5 fold in PFBB) were preincubated 2h with 50 µl of glycans at 1mM. Evaluation of bacterial binding was estimated by the number of adherent bacteria under 400×magnification. Each value represents the mean of at least five different fields quantified.

Funding

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS; Unité mixte de Recherche CNRS/USTL 8576) and the Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

We are grateful to Dr. Carlstedt for the anti MUC2 (LUM2-3), anti MUC5AC (LUM5-1) and anti MUC6 (LUM6-3) antibodies. We appreciate the gift of gastric tissues collected by Dr. Bara. We thank Dr Dessein from The Centre de Biologie et Pathologie du CHRU de Lille for kindly supplying clinical *H. pylori* strains.

Abbreviations

BabA: blood group antigen-binding, CID: collision-induced dissociation, CsCl: cesium chloride, DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole, ECL: electrochemiluminescence, Le: lewis, PAS: periodic acid Schiff, PFBB: protein free blocking buffer, SabA: sialic-acid binding adhesin

References

Alm R A, Ling L S, Moir D T, King B L, Brown E D, Doig P C, Smith D R, Noonan B, Guild B C, deJonge B L, et al. 1999. Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen Helicobacter pylori. *Nature*. 397. 176-180.

Aspholm-Hurtig M, Dailide G, Lahmann M, Kalia A, Ilver D, Roche N, Vikstrom S, Sjostrom R, Linden S, Backstrom A, et al. 2004. Functional adaptation of BabA, the H. pylori ABO blood group antigen binding adhesin. *Science*. 305. 519-522.

Atuma C, Strugala V, Allen A and Holm L. 2001. The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state in vivo. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 280. G922-929.

© 2015 Tous droits réservés. doc.univ-lille1.fr

Bodger K, Campbell F and Rhodes J M. 2003. Detection of sulfated glycoproteins in intestinal metaplasia: a comparison of traditional mucin staining with immunohistochemistry for the sulfo-Lewis(a) carbohydrate epitope. *J Clin Pathol*. 56. 703-708.

Boren T, Falk P, Roth K A, Larson G and Normark S. 1993. Attachment of Helicobacter pylori to human gastric epithelium mediated by blood group antigens. *Science*. 262. 1892-1895.

Byrd J C, Yan P, Sternberg L, Yunker C K, Scheiman J M and Bresalier R S. 1997. Aberrant expression of gland-type gastric mucin in the surface epithelium of Helicobacter pylori-infected patients. *Gastroenterology*. 113. 455-464.

Cooke C L, An H J, Kim J, Canfield D R, Torres J, Lebrilla C B and Solnick J V. 2009. Modification of gastric mucin oligosaccharide expression in rhesus macaques after infection with Helicobacter pylori. *Gastroenterology*. 137. 1061-1071, 1071 e1061-1068.

Corfield A P, Carroll D, Myerscough N and Probert C S. 2001. Mucins in the gastrointestinal tract in health and disease. *Front Biosci*. 6. D1321-1357.

Correa P and Piazuelo M B. 2012. The gastric precancerous cascade. *J Dig Dis*. 13. 2-9.

De Bolos C, Garrido M and Real F X. 1995. MUC6 apomucin shows a distinct normal tissue distribution that correlates with Lewis antigen expression in the human stomach. *Gastroenterology*. 109. 723-734.

Domon B and Costello C E. 1988. Structure elucidation of glycosphingolipids and gangliosides using high-performance tandem mass spectrometry. *Biochemistry*. 27. 1534-1543.

Ermund A, Schutte A, Johansson M E, Gustafsson J K and Hansson G C. 2013. Studies of mucus in mouse stomach, small intestine, and colon. I. Gastrointestinal mucus layers have different properties depending on location as well as over the Peyer's patches. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 305. G341-347.

Falk P, Roth K A, Boren T, Westblom T U, Gordon J I and Normark S. 1993. An in vitro adherence assay reveals that Helicobacter pylori exhibits cell lineage-specific tropism in the human gastric epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90. 2035-2039.

Farinha P and Gascoyne R D. 2005. Helicobacter pylori and MALT lymphoma. *Gastroenterology*. 128. 1579-1605.

Go M F, Kapur V, Graham D Y and Musser J M. 1996. Population genetic analysis of Helicobacter pylori by multilocus enzyme electrophoresis: extensive allelic diversity and recombinational population structure. *J Bacteriol*. 178. 3934-3938.

Ilver D, Arnqvist A, Ogren J, Frick I M, Kersulyte D, Incecik E T, Berg D E, Covacci A, Engstrand L and Boren T. 1998. Helicobacter pylori adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. *Science*. 279. 373-377.

© 2015 Tous droits réservés. doc.univ-lille1.fr

Karasawa F, Shiota A, Goso Y, Kobayashi M, Sato Y, Masumoto J, Fujiwara M, Yokosawa S, Muraki T, Miyagawa S, et al. 2012. Essential role of gastric gland mucin in preventing gastric cancer in mice. *J Clin Invest*. 122. 923-934.

Karlsson N G, Karlsson H and Hansson G C. 1996. Sulphated mucin oligosaccharides from porcine small intestine analysed by four-sector tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom*. 31. 560-572.

Kawakubo M, Ito Y, Okimura Y, Kobayashi M, Sakura K, Kasama S, Fukuda M N, Fukuda M, Katsuyama T and Nakayama J. 2004. Natural antibiotic function of a human gastric mucin against Helicobacter pylori infection. *Science*. 305. 1003-1006.

Kobayashi M, Lee H, Nakayama J and Fukuda M. 2009. Roles of gastric mucin-type O-glycans in the pathogenesis of Helicobacter pylori infection. *Glycobiology*. 19. 453-461.

Lesuffleur T, Roche F, Hill A S, Lacasa M, Fox M, Swallow D M, Zweibaum A and Real F X. 1995. Characterization of a mucin cDNA clone isolated from HT-29 mucus-secreting cells. The 3' end of MUC5AC? *J Biol Chem*. 270. 13665-13673.

Linden S K, Florin T H and McGuckin M A. 2008. Mucin dynamics in intestinal bacterial infection. *PLoS One*. 3. e3952.

Lu X L, Qian K D, Tang X Q and Zhu Y L. 2004. Distribution of H.pylori antigens in gastric mucosa and its significance. *J Zhejiang Univ Sci*. 5. 242-245.

Machado J C, Nogueira A M, Carneiro F, Reis C A and Sobrinho-Simoes M. 2000. Gastric carcinoma exhibits distinct types of cell differentiation: an immunohistochemical study of trefoil peptides (TFF1 and TFF2) and mucins (MUC1, MUC2, MUC5AC, and MUC6). *J Pathol*. 190. 437-443.

Mahdavi J, Sonden B, Hurtig M, Olfat F O, Forsberg L, Roche N, Angstrom J, Larsson T, Teneberg S, Karlsson K A, et al. 2002. Helicobacter pylori SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation. *Science*. 297. 573-578.

Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C A, Atherton J, Axon A T, Bazzoli F, Gensini G F, Gisbert J P, Graham D Y, Rokkas T, et al. 2012. Management of Helicobacter pylori infection--the Maastricht IV/ Florence Consensus Report. *Gut*. 61. 646-664.

Marcos N T, Magalhaes A, Ferreira B, Oliveira M J, Carvalho A S, Mendes N, Gilmartin T, Head S R, Figueiredo C, David L, et al. 2008. Helicobacter pylori induces beta3GnT5 in human gastric cell lines, modulating expression of the SabA ligand sialyl-Lewis x. *J Clin Invest*. 118. 2325-2336.

Markesich D C, Anand B S, Lew G M and Graham D Y. 1995. Helicobacter pylori infection does not reduce the viscosity of human gastric mucus gel. *Gut*. 36. 327-329.

Nakayama J, Yeh J C, Misra A K, Ito S, Katsuyama T and Fukuda M. 1999. Expression cloning of a human alpha1, 4-N-acetylglucosaminyltransferase that forms GlcNAcalpha1-->4Galbeta-->R, a glycan specifically expressed in the gastric gland mucous cell-type mucin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96. 8991-8996.

© 2015 Tous droits réservés.

Nordman H, Davies J R, Lindell G, de Bolos C, Real F and Carlstedt I. 2002. Gastric MUC5AC and MUC6 are large oligomeric mucins that differ in size, glycosylation and tissue distribution. *Biochem J*. 364. 191-200.

Odenbreit S, Swoboda K, Barwig I, Ruhl S, Boren T, Koletzko S and Haas R. 2009. Outer membrane protein expression profile in Helicobacter pylori clinical isolates. *Infect Immun*. 77. 3782-3790.

Ota H, Nakayama J, Momose M, Hayama M, Akamatsu T, Katsuyama T, Graham D Y and Genta R M. 1998. Helicobacter pylori infection produces reversible glycosylation changes to gastric mucins. *Virchows Arch*. 433. 419-426.

Parra Cid T, Fernandez M C, Benito Martinez S and Jones N L. 2013. Pathogenesis of Helicobacter pylori infection. *Helicobacter*. 18 Suppl 1. 12-17.

Radziejewska I, Borzym-Kluczyk M, Namiot Z and Stefanska E. 2011. Glycosylation of mucins present in gastric juice: the effect of helicobacter pylori eradication treatment. *Clin Exp Med*. 11. 81-88.

Robbe C, Capon C, Coddeville B and Michalski J C. 2004. Diagnostic ions for the rapid analysis by nano-electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry of O-glycans from human mucins. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 18. 412-420.

Rossez Y, Gosset P, Boneca I G, Magalhaes A, Ecobichon C, Reis C A, Cieniewski-Bernard C, Joncquel Chevalier Curt M, Leonard R, Maes E, et al. 2014. The LacdiNAc-Specific Adhesin LabA Mediates Adhesion of Helicobacter pylori to Human Gastric Mucosa. *J Infect Dis*.

Rossez Y, Maes E, Lefebvre Darroman T, Gosset P, Ecobichon C, Joncquel Chevalier Curt M, Boneca I G, Michalski J C and Robbe-Masselot C. 2012. Almost all human gastric mucin O-glycans harbor blood group A, B or H antigens and are potential binding sites for Helicobacter pylori. *Glycobiology*. 22. 1193-1206.

Segura D I and Montero C. 1983. Histochemical characterization of different types of intestinal metaplasia in gastric mucosa. *Cancer*. 52. 498-503.

Sellers L A and Allen A. 1989. Gastrointestinal mucus gel rheology. *Symp Soc Exp Biol*. 43. 65-71.

Slomiany B L, Sarosiek J and Slomiany A. 1987. Role of carbohydrates in the viscosity and permeability of gastric mucin to hydrogen ion. *Biochem Biophys Res Commun*. 142. 783-790.

Slomiany B L and Slomiany A. 1992. Mechanism of Helicobacter pylori pathogenesis: focus on mucus. *J Clin Gastroenterol*. 14 Suppl 1. S114-121.

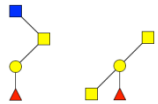
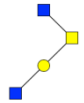
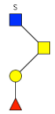
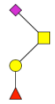
Teixeira A, David L, Reis C A, Costa J and Sobrinho-Simoes M. 2002. Expression of mucins (MUC1, MUC2, MUC5AC, and MUC6) and type 1 Lewis antigens in cases with and without Helicobacter pylori colonization in metaplastic glands of the human stomach. *J Pathol*. 197. 37-43.

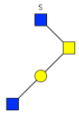
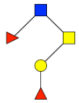
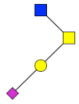
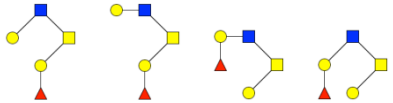
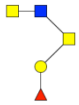
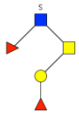
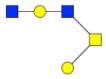
Thornton D J, Holmes D F, Sheehan J K and Carlstedt I. 1989. Quantitation of mucus glycoproteins blotted onto nitrocellulose membranes. *Anal Biochem*. 182. 160-164.

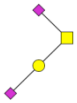
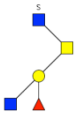
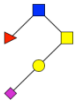
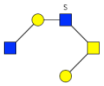
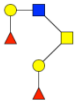
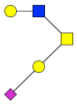
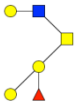
© 2015 Tous droits réservés. doc.univ-lille1.fr

Table 1. Proposed neutral and acidic oligosaccharide structures or sequences identified in human gastric mucins upon infection by *Helicobacter pylori.* The relative percentage of each oligosaccharide was calculated based on the integration of peaks on MS spectra. Results are presented as the mean ± SD of percentage of each oligosaccharide for a same condition. NI : non infected ; HP : *H. pylori* infected patients.

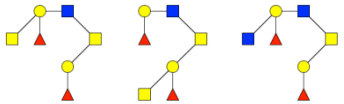
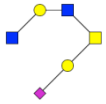
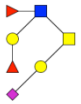
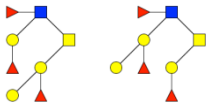
Proposed structures or sequences of oligosaccharides	$[M+Na]^+$	Hydrosoluble mucins, NI	Hydrosoluble mucins, HP	Adherent mucins, NI	Adherent mucins , HP	Metaplasia	Metaplasia Hydrosoluble mucins	Metaplasia Adherent mucins
	534	0.4±0.2	2.7±2.1	0.4±0.5	16.5±6.1	2.9±4.3	0.8	1.9
	575	0.8±1.2	1.3±1.5	0.9±1.1	3.2±3	2.2±2	2.1	0
	663	0	0	0	0	1.8±1.1	2	0.4
	691	0.3±0.3	0.2±0.3	0.8±0.8	1±1.4	2.2±1.7	0.9	O.6
	708	1±0.8	8.6±3.4	0.6±0.5	9.9±1.8	6±5.5	2.6	2.7
	749	0.1±0.2	0	0.1±0.1	1.9±1.8	0.7±1	0	0
	779	0.4±0.5	3.6±1.1	0.7±0.3	7.5±2.1	3.3±2.6	1.1	0

	867	0	0	0	0	1±1.1	0.7	0.8
	895	1.1±0.8	1.4±0.7	1.5±0.6	0.7±0.8	3.3±2.9	1.3	1.8
	953	2.3±1.7	6.9±2.4	1.7±2.3	4.4±1.7	3.3±1.7	2.1	1.3
	983	1.2±1.4	5±2.6	0.5±0.4	9.3±2.5	8±9.4	1.7	0
	1024	1.3±0.4	1.4±0.6	0.5±1.2	1.3±1.2	1.6±0.7	0	1.2
	1041	0	0	0	0	0.3±0.7	0	0
	1069	0	0	0.1±0.2	0	0.7±0.7	0.6	0.8
	1071	0	0	0	0	0.3±0.6	0.7	0

	1112	0	0	0	0	0.4±0.9	0.3	0
	1127	0.6±0.4	1±0.8	0.9±1.2	0.7±0.5	1±0.7	0.9	0
	1140	1.3±0.4	0.8±0.4	0.4±0.6	0.1±0.2	1±1.7	0	3.3
	1157	6.7±2.8	9.8±2.2	1.9±1.4	6±0.9	5±2.6	3.3	4.5
	1198	4.9±0.6	3.1±1.3	1.8±1.2	1.4±0.6	8.5±1.5	4.5	4.3
	1215	0	0	0	0	0.6±1.4	0.8	0.5
	1228	0.6±1	0.4±1	1.7±1.3	5.8±1.7	2.3±1.9	1	1.2

	1256	1.6±0.4	1.1±0.3	0.4±0.5	0	2±0.9	3	1.6
	1286	0	0	0	0	0.5±0.8	0.9	0.5
	1314	0	0	0.3±0.4	0	0.4±0.5	1.8	0.4
	1316	0	0	0	0	0.4±1	2.2	0
	1331	12.6±2.8	12.7±3.2	5.2±3.4	3.5±2.8	6.5±5.1	8.5	6.1
	1344	0.8±1.1	1.1±0.5	1.1±1.4	0.4±0.4	1±1.4	1.6	0.7
	1361	2.1±1.8	2.7±1.9	1.5±1.4	1.7±1.4	2.7±2	0	0

	1402	4.4±2.2	3.1±1.5	2.6±2.3	7.4±0.9	2.3±1.5	1.6	1.9
	1402	0.3±0.2	0	0.6±0.4	0.4±0.3	1.3±0.5	0.6	0.8
	1419	0	0	0	0	0.8±0.8	1.6	0.5
3 Hex, 2 HexNAc, GalNAcol	1432	1.3±1.7	1±0.8	1.7±1.2	1.8±1.6	1.2±1.3	1.1	1
1 Hex, 3 HexNAc, 1 Fuc, GalNAcol	1443	1.4±1	0.3±0.5	1±1.1	0.1±0.2	0	O	O
2 Hex, 3 HexNAc, GalNAcol	1473	0.9±0.7	0.7±0.8	1.1±0.8	0.9±0.7	1±0.3	0	1.5
	1505	2.4±0.5	1.3±1.4	0.6±0.9	0	0.5±0.8	0	2.1
	1518	0.6±0.8	1±1.1	2.7±1.6	0.2±0.4	5.5±3	2.4	7.9
	1535	0.2±0.5	0.6±0.6	0.4±0.5	0	0.1±0.3	0.3	0.6

1 Hex, 2 HexNAc, 3 Fuc, GalNAcol	1546	0.5±0.6	0	0.2±0.4	0	0	0.9	0
	1576	8.5±1.8	3.3±3.3	5±4.4	1.1±0.8	2.3±2.1	2.7	6.4
	1589	0.3±0.6	0.3±0.5	0.2±0.4	0.3±0.4	0.7±0.7	0.9	1.4
	1606	2.5±0.5	1.7±0.6	3±2.2	1.5±0.9	1.5±0.9	1.8	2.9
4 Hex, 2 HexNAc, GalNAcol	1636	0.5±0.6	0.1±0.2	0.5±0.8	0.1±0.3	0.2±0.3	0.9	1
2 Hex, 3 HexNAc, 1 Fuc, GalNAcol	1647	1.3±0.4	0.4±0.3	1.1±0.6	0.2±0.3	0.6±0.7	O.9	1.5
3 Hex, 3 HexNAc, GalNAcol	1677	0.3±0.4	0.4±0.5	0.9±0.9	0.8±0.6	0.4±0.5	0.7	0.6
	1692	0	0	0	0	O.1±0.2	0.3	0
3 Hex, 2 HexNAc, 1 Fuc, 1 SO3, GalNAcol	1694	0	0	0	0	0.1±0.2	0.3	0.3
	1709	0.5±0.8	0.4±0.2	0.1±0.1	0	0	0	0

	1722	0	0	0.1±0.2	0	1.8±0.9	0	0
	1739	3.1±1.6	0.9±0.4	1.1±0.9	0.5±0.4	0.8±0.7	0	0
2 Hex, 2 HexNAc, 3 Fuc, GalNAcol	1750	0.2±0.4	0.1±0.2	0.2±0.4	0	0	0	0
	1763	0	0	0	0	1.6±0.9	2.5	1.9
	1780	2.4±1	1.9±1.3	3.2±2.3	0.3±.4	1.3±1.8	2.4	5.3
3 Hex, 2 HexNAc, 1 NeuAc, GalNAcol	1793	0.4±0.3	0.6±1	0.7±0.9	0.2±0.3	2±1.7	1	4.2
4 Hex, 2 HexNAc, 1 Fuc, GalNAcol	1810	0.3±0.7	0.4±0.6	1.1±0.9	0.1±0.3	0.2±0.3	1.2	0
	1821	2.7±1.3	0.7±0.6	1.4±1.3	0.4±0.3	0.4±0.7	2.7	1.6
3 Hex, 3 HexNAc, 1 Fuc, GalNAcol	1851	1.2±0.2	1.3±0.8	1.6±1.1	0.5±0.4	0.9±0.7	1.6	2.5
2 Hex, 1 HexNAc, 3 Fuc, 1 NeuAc, GalNAcol	1866	0	0	0	0	0.4±0.2	0	0

4 Hex, 3 HexNAc, GalNAcol	1881	0.5±0.7	0.4±0.5	0.8±0.7	0.3±0.4	0.3±0.4	1	0
2 Hex, 4 HexNAc, 1 Fuc, GalNAcol	1892	0.3±0.4	0	0.3±0.6	0	0	0	0
4 Hex, 2 HexNAc, 1 Fuc, 1 SO3, GalNAcol	1898	0	0	0	0	0.2±0.1	0	0
3 Hex, 4 HexNAc, GalNAcol	1922	0.3±0.3	0.4±0.5	0.9±0.5	0.1±0.2	0.2±0.4	0.9	1
4 Hex, 1 HexNAc, 1 Fuc, 1 NeuAc, GalNAcol	1926	0.1±0.3	0.1±0.2	0.7±0.7	0	0.4±0.6	0.9	0.9
3 Hex, 3 HexNAc, 1 Fuc, 1 SO3, GalNAcol	1939	0	0	0	0	0.1±0.2	0.8	0
3 Hex, 2 HexNAc, 3 Fuc, GalNAcol	1954	1±0.1	0.8±0.7	1.5±0.9	0	0.5±0.9	1.5	2.4
4 Hex, 3 HexNAc, 1 SO3, GalNAcol	1969	0	0	0	0	0.1±0.1	0.9	0
4 Hex, 2 HexNAc, 2 Fuc, GalNAcol	1984	0	0.1±0.2	0.6±1	0	0.2±0.5	0	0
4 Hex, 2 HexNAc, 1 NeuAc, GalNAcol	1997	0.6±0.5	0.2±0.3	0.6±0.5	0	0.3±0.7	1.3	1.8
3 Hex, 3 HexNAc, 2 Fuc, GalNAcol	2025	1.4±1	1.1±0.6	2.1±0.3	0	1±0.8	2.6	2
5 Hex, 3 HexNAc, GalNAcol	2055	0.5±0.3	0.6±0.4	1.1±1.2	0.1±0.3	0.3±0.4	1.7	0.8
3 Hex, 1 HexNAc, 3 Fuc, 1 NeuAc, GalNAcol	2070	0	0	0	0	0.1±0.3	0	0
3 Hex, 1 HexNAc, 1 Fuc, 2 NeuAc, GalNAcol	2083	0	0	0	0	0	0.8	1
3 Hex, 4 HexNAc, 1 Fuc, GalNAcol	2096	0.3±0.2	0.4±0.3	0.5±0.5	0.1±0.3	0.3±0.4	1.2	1.8
4 Hex, 4 HexNAc, GalNAcol	2126	0	0.1±0.2	0.2±0.3	0	0	0.9	1

3 Hex, 2 HexNAc, 4 Fuc, GalNAcol	2128	0.4±0.2	0.1±0.2	0.1±0.2	0	0	0	0
4 Hex, 2 HexNAc, 3 Fuc, GalNAcol	2158	0	0	0.2±0.4	0	0	0	0
3 Hex, 5 HexNAc, GalNAcol	2167	0	0	0	0	0	0.7	0
3 Hex, 3 HexNAc, 3 Fuc, GalNAcol	2199	0.2±0.5	0.3±0.3	0.2±0.2	0	0.2±0.4	0.9	0.8
4 Hex, 3 HexNAc, 2 Fuc, GalNAcol	2229	0.3±0.5	0.5±0.4	1.4±2	0	0.3±0.6	2.4	2.5
5 Hex, 3 HexNAc, 1 Fuc, GalNAcol	2259	0	0	0	0	0	1.2	0
3 Hex, 4 HexNAc, 2 Fuc, GalNAcol	2270	0	0.1±0.2	0.2±0.5	0	0.1±0.3	1.4	0.7
4 Hex, 4 HexNAc, 1 Fuc, GalNAcol	2300	0	0.1±0.2	0	0	0.1±0.2	1.2	1.5
5 Hex, 4 HexNAc, GalNAcol	2330	0.1±0.2	0	0	0	0	0.8	0
5 Hex, 2 HexNAc, 3 Fuc, GalNAcol	2362	0	0	0	0	0	0	0
4 Hex, 5 HexNAc, GalNAcol	2371	0	0	0.1±0.2	0	0	0	0
4 Hex, 3 HexNAc, 3 Fuc, GalNAcol	2403	0	0	0	0	0.3±0.6	1.9	2.4
2 Hex, 4 HexNAc, 4 Fuc, GalNAcol	2414	0.1±0.2	0	0	0	0	0	0
5 Hex, 3 HexNAc, 2 Fuc, GalNAcol	2433	0	0	0	0	0.1±0.3	0	0.6
3 Hex, 3 HexNAc, 4 Fuc, 1 SO3, GalNAcol	2461	0	0	0	0	0.2±0.5	0	1.3
4 Hex, 4 HexNAc, 2 Fuc, GalNAcol	2474	0	0	0	0	0	1.2	0

Références bibliographiques

© 2015 Tous droits réservés.

doc.univ-lille1.fr

-A-

-Abad A., Victoria Fernández-Molina J., Bikandi J., Ramírez A., Margareto J., Sendino J., Luis Hernando F., Pontón J., Garaizar J., Rementeria A., 2010, What makes *Aspergillus fumigatus* a successful pathogen? Genes and molecules involved in invasive aspergillosis, *Rev. Iberoam Micol*., 27(4):155-82

-Alcazar-Fuoli L., Clavaud C., Lamarre C., Aimanianda V., Seidl-Seiboth V., Mellado E., Latgé J.P., 2011, Functional analysis of the fungal/plant class chitinase family in *Aspergillus fumigatus*, *Fungal Genet. Biol.* 48(4):418-29

-Allen L., Dockrell DH, Pattery T, Lee DG, Cornelis P, Hellewell PG, Whyte MK., 2005, Pyocyanin production by *Pseudomonas aeruginosa* induces neutrophil apoptosis and impairs neutrophil-mediated host defenses in vivo, *J. Immunol*.;174(6):3643-9.

-Aimanianda V. and Latgé JP., 2010, Fungal hydrophobins form a sheath preventing immune recognition of airborne conidia, *Virulence* 1:3, 185-187

-Aimanianda V., Bayry J., Bozza S., Kniemeyer O., Perruccio K., Elluru S.R., Clavaud C., Paris S., Brakhage A.A., Kaveri S.V., Romani L., Latgé J.P., 2009, Surface hydrophobin prevents immune recognition of airborne fungal spores, *Nature*, 460(7259):1117-21

-Andersen D.H., Hodges R.G.,1946, Celiac syndrome; genetics of cystic fibrosis of the pancreas, with a consideration of etiology, *Am. J. Dis. Child*.;72:62-80

-Andrianifahanana M., Moniaux N., Batra S.K., 2006, Regulation of mucin expression: mechanistic aspects and implications for cancer and inflammatory diseases, *Biochim. Biophys. Acta*.; 1765(2):189-222

-B-

-Baladrón V., Ufano S., Dueñas E., Martín-Cuadrado A. B., del Rey F., Vázquez de Aldana C. R., 2002, Eng1p, an endo-1,3-β-glucanase localized at the daughter side of the septum, is involved in cell separation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell*, 1, 774–786

-Banerjee B., Greenberger P.A., Fink J.N., Kurup V.P., 1998, Immunological Characterization of Asp f 2, a Major Allergen from *Aspergillus fumigatus* Associated with Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis, *Infect. Immun.*, 66(11):5175-82

-Barasch J., al-Awqati Q., 1993, Defective acidification of the biosynthetic pathway in cystic fibrosis, *J. Cell Sci. Suppl.*; 17:229-33

-Beauvais A., Schmidt C., Guadagnini S., Roux P., Perret E., Henry C., Paris S., Mallet A., Prévost M.C., Latgé J.P., 2007, An extracellular matrix glues together the aerial-grown hyphae of *Aspergillus fumigatus*, *Cellular Microbiology*,9(6):1588-600

-Beauvais A., Maubon D., Park S., Morelle W., Tanguy M., Huerre M., Perlin D.S., Latgé J.P., 2005, Two alpha(1-3) glucan synthases with different functions in *Aspergillus fumigatus*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(3):1531-8

© 2015 Tous droits réservés. doc.univ-lille1.fr

-Beauvais A., Bruneau J.M., Mol P.C., Buitrago M.J., Legrand R., Latgé J.P., 2001, Glucan Synthase Complex of *Aspergillus fumigatus*, *J. Bacteriol.*, 183(7): 2273-79

-Bell S.L., Xu G., Khatri I.A., Wang R., Rahman S., Forstner J.F.,2003, N-linked oligosaccharides play a role in disulphide-dependent dimerization of intestinal mucin Muc2, *Biochem J.* ; 373(Pt 3):893-900

-Bernard M., Mouyna I., Dubreucq G., Debeaupuis J.P., Fontaine T., Vorgias C., Fuglsang C., Latgé J.P., 2002, Characterization of a cell-wall acid phosphatase (PhoAp) in *Aspergillus fumigatus*, *Microbiology.***,** 148(Pt 9):2819-29

-Boat T.F., Cheng P.W., 1980, Biochemistry of airway mucus secretions, *Fed Proc.*; 39(13):3067-74

-Bouchara J.P. and Tronchin G., 1999, Adhésion et Pathogénicité dans les infections aspergillaires, *Médecine et Maladies Infectieuses*, 29(11) :705–11

-Brakhage A.A., Bruns S., Thywissen A., Zipfel P.F., Behnsen J., 2010, Interaction of phagocytes with filamentous fungi, *Curr. Opin.Microbiol.*, 13(4):409-15

-Briel M., Greger R., Kunzelmann K., 1998, Cl- transport by cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) contributes to the inhibition of epithelial Na+ channels (ENaCs) in Xenopus oocytes co-expressing CFTR and ENaC, *J. Physiol.*; 508 (Pt 3):825-36

-Brockhausen I., Schachter H., Stanley P., O-GalNAc Glycans, In: Varki A., Cummings R.D., Esko J.D., Freeze H.H., Stanley P., Bertozzi C.R., Hart G.W., Etzler M.E., editors. Essentials of Glycobiology. 2nd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009. Chapter 9.

-C-

-Camacho E., Sepulveda V.E., Goldman W.E., San-Blas G., Nino-Vega, G.A., 2012, Expression of *Paracoccidioides brasiliensis* AMY1 in a *Histoplasma capsulatum* amy1 mutant, relates an alpha-(1,4)-amylase to cell wall alpha-(1,3)-glucan synthesis. *PLoS ONE* **7:** e50201

-Cant N., Pollock N., Ford R.C., 2014, CFTR structure and cystic fibrosis, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*; 52:15-25

-Chabane S., Sarfati J., Ibrahim-Granet O., Du C., Schmidt C., Mouyna I., Prevost M.C., Calderone R., Latgé JP, 2006, Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Ecm33p Influences Conidial Cell Wall Biosynthesis in *Aspergillus fumigatus, Applied Env. Microbiol.*, 3259-3267

-Chace K.V., Leahy D.S, Martin R., Carubelli R., Flux M., Sachdev G.P., 1983, Respiratory mucous secretions in patients with cystic fibrosis: relationship between levels of highly sulfated mucin component and severity of the disease, *Clin. Chim. Acta*.;132(2):143-55

-Chai L.Y.A., Vonk A.G. , Kullberg B.J. , Verweij P.E. , Verschueren I. , van der Meer J.W.M. , Joosten L.A.B. , Latgé J.P. , Netea M.G., 2010, *Aspergillus fumigatus* cell wall components differentially modulate host TLR2 and TLR4 responses, *Microbes Infect.*,13(2):151-9

-Chaudhuri R., Ansari F.A., Raghunandanan M.V., Ramachandran S., 2011, Fungal RV: adhesin prediction and immunoinformatics portal for human fungal pathogens, *BMC Genomics.***,** 12:192

© 2015 Tous droits réservés. doc.univ-lille1.fr

-Colomb F., Krzewinski-Recchi M.A., El Machhour F., Mensier E., Jaillard S., Steenackers A., Harduin-Lepers A., Lafitte J.J., Delannoy P., Groux-Degroote S., 2012, TNF regulates sialyl-Lewis^{x} and 6-sulfo-sialyl-Lewis^{x} expression in human lung through up-regulation of ST3GAL4 transcript isoform BX, *Biochimie*. ; 94(9):2045-53

-D-

-Davril M., Degroote S., Humbert P., Galabert C., Dumur V., Lafitte J. J., Lamblin G., Roussel P., 1999, The sialylation of bronchial mucins secreted by patients suffering from cystic fibrosis or from chronic bronchitis is related to the severity of airway infection, *Glycobiology*, 9: 311-321

-Dekker N., van Rijssel J., Distel B., Hochstenbach F., 2007, Role of the alpha-glucanase Agn2p in ascus-wall endolysis following sporulation in fission yeast, *Yeast.*, 24(4):279-88

-Dekker N., Speijer D., Grün C.H., van den Berg M., de Haan A., Hochstenbach F., 2004, Role of the alpha-glucanase Agn1p in fission-yeast cell separation, *Mol. Biol.Cell.*, 15(8):3903-14

-Di Sant'Agnese P., Darling R.C., Perara G.A., Shea E.,1953,
Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas, *AMA Am. J. Dis. Child.*;86(5):618-9; discussion, 619

-Dichtl K.., Helmschrott C., Dirr F., Wagener J., 2012, Deciphering cell wall integrity signaling in *Aspergillus fumigatus*: identification and functional characterization of cell wall stress sensors and relevant Rho GTPases, *Mol. Microbiol.*, 83(3):506-19

-Dirr F., Echtenacher B., Heesemann J., Hoffmann P., Ebel F., Wagener J., 2010, AfMkk2 is required for cell wall integrity signaling, adhesion and full virulence of the human pathogen *Aspergillus fumigatus*, *Int. J. Med. Microbiol.*, 300(7):496-502

- Dunn B.E., Cohen H., Blaser M.J., 1997, *Helicobacter pylori*, *Clin. Microbiol. Rev.*, 10(4):720-41

-E-

-Engel J., Schmalhorst P.S., Routier F.H., 2012, Biosynthesis of the fungal cell wall polysaccharide galactomannane requires intraluminal GDP-mannose, *J. Biol. Chem.* [Epub ahead of print]

-Engel J., Schmalhorst P.S., Dörk-Bousset T., Ferrières V., Routier F.H., 2009, A single UDP-Galactofuranose transporter is required for galactofuranosylation in *Aspergillus fumigatus*, *J. Biol. Chem.*, 284(49):33859-68

-F-

-Fang W., Ding W., Wang B., Zhou H., Ouyang H., Ming J., Jin C., 2010, Reduced expression of O-mannosyltransferase 2 (AfPmt2) leads to deficient cell wall and abnormal polarity in *Aspergillus fumigatus*,*Glycobiology*, 20(5):542-52

-Feng X., Krishnan K., Richie D.L., Aimanianda V., Hartl L., Grahl N., Powers-Fletcher M.V., Zhang M., Fuller K.K., Nierman W.C., Lu L.J., Latgé J.P., Woollett L., Newman S.L., Cramer R.A.

© 2015 Tous droits réservés. doc.univ-lille1.fr

Jr., Rhodes J.C., Askew D.S., 2011, HacA-independent functions of the ER stress sensor IreA synergize with the canonical UPR to influence virulence trais in *Aspergillus fumigatus*, *PLoS Pathog*., 7(10):e1002330

-Fontaine T., Delangle A., Simenel C., Coddeville B., van Vliet S.J., van Kooyk Y., Bozza S., Moretti S., Schwarz F., Trichot C., Aebi M., Delepierre M., Elbim C., Romani L., Latgé J.P., 2011, Galactosaminogalactan, a New Immunosuppressive Polysaccharide of *Aspergillus fumigatus*, *PLoS Pathog.*, 7(11) : e1002372

-Fontaine T., Beauvais A., Loussert C., Thevenard B., Fulgsang C.C., Ohno N., Clavaud C., Prevost M.C., Latgé J.P., 2010, Cell wall α1,3glucans induce the aggregation of germinating conidia of *Aspergillus fumigatus*,*Fungal Genet. Biol.*, 47(8):707-12

-Fontaine T., Simenel C., Dubreucq G., Adam O., Delepierre M., Lemoine J., Vorgias C.E., Diaquin M., Latgé J.P., 2000, Molecular organization of the alkali-insoluble fraction of *Aspergillus fumigatus* cell wall, *J. Biol. Chem.*, 275(36):27594-607

-Fontaine T., Hartland R.P., Diaquin M., Simenel C., Latgé J.P., 1997, Differential patterns of activity displayed by two exo-β1,3-glucanases associated with the *Aspergillus fumigatus* cell wall, *J. Bacteriol*., 179(10):3154-63

-Fontaine T., Hartland R.P., Beauvais A., Diaquin M., Latge J.P., 1997, Purification and characterization of an endo-1,3-beta-glucanase from *Aspergillus fumigatus*, *Eur. J. Biochem.*, 243(1-2):315-21

-Freeze H.H., 2006, Genetic defects in the human glycome, *Nat. Rev. Genet.*7(7):537-51

-Fuchs B.B., Mylonakis E. ,2009, Our paths might cross: the role of the fungal cell wall integrity pathway in stress response and cross talk with other stress response pathways, *Eukaryot. Cell*, 8: 1616–1625

-G-

-Galili U., 2006, Xenotransplantation and ABO incompatible transplantation: the similarities they share, *Transfus. Apher. Sci.*; 35(1):45-58

-Gastebois A., Mouyna I., Simenel C., Clavaud C., Coddeville B., Delepierre M., Latgé J.P., Fontaine T., 2010, Characterization of a new beta(1-3)-glucan branching activity of *Aspergillus fumigatus*,*J. Biol.Chem.*, 285(4):2386-96

-Gastebois A., Clavaud C., Aimanianda V., Latgé J.P., 2009, *Aspergillus fumigatus*: cell wall polysaccharides, their biosynthesis and organisation, *Future Microbiol.*, 4(5), 583-95

-Gastebois A, Fontaine T, Latgé J.P., Mouyna I.,2010, beta(1-3)Glucanosyltransferase Gel4p is essential for *Aspergillus fumigatus*, *Eukaryot. Cell.*, 9(8):1294-8

-Gil M.L., Peñalver M.C., Lopez-Ribot J.L., O'Connor J.E., Martinez J.P., 1996, Binding of Extracellular Matrix proteins to *Aspergillus fumigatus* conidia, *Infect. Immun.*,64(12):5239-47

© 2015 Tous droits réservés. doc.univ-lille1.fr

-H-

-Hammond, C., Helenius, A., 1995, Quality control in the secretory pathway, *Curr. Opin. Cell. Biol.;* 7(4):523-9

-Hang H.C., Bertozzi C.R., 2005, The chemistry and biology of mucin-type O-linked glycosylation, *Bioorg. Med. Chem.*; 13(17):5021-34

-Hartl L., Gastebois A., Aimanianda V., Latgé J.P., 2011, Characterization of the GPI-anchored endo b-1,3-glucanase Eng2 of *Aspergillus fumigatus,Fungal Genet. Biol.*, 48(2):185-91

-Hauber H.P., Schulz M., Pforte A., Mack D., Zabel P., Schumacher U.,2008, Inhalation with fucose and galactose for treatment of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients, *Int. J. Med. Sci.*;5(6):371-6

-He X., Li S., Kaminskyj S.G., 2014, Characterization of *Aspergillus nidulans* α-glucan synthesis: roles for two synthases and two amylases,*Mol. Microbiol.*; 91(3):579-95

-Hearn V.M. and Sietsma J.H., 1994, Chemical and immunological analysis of the *Aspergillus fumigatus* cell wall, *Microbiology*, 140, 789-795

-Henry C., Latgé J.P., Beauvais A., 2012, α1,3 glucans are dispensable in *Aspergillus fumigatus*, *Eukaryot.Cell.*, 11(1):26-9

-Higgins C.F., 1992, ABC transporters: from microorganisms to man, *Annu. Rev. Cell. Biol.*; 8:67-113

-Hohl T.M.,Rivera A., Pamer E.G., 2006, Immunity to fungi, *Curr. Opin.Immunol.*, 18(4):465-72

-Hounsell EF, Lawson AM, Feeney J, Cashmore GC, Kane DP, Stoll M, Feizi T., 1988, Identification of a novel oligosaccharide backbone structure with a galactose residue monosubstituted at C-6 in human foetal gastrointestinal mucins, *Biochem. J.* ;256(2):397-401

-Hovenberg H.W., Davies J.R., Herrmann A., Lindén C.J., Carlstedt I.,1996, MUC5AC, but not MUC2, is a prominent mucin in respiratory secretions, *Glycoconj. J.*;13(5):839-47

-J-

-Jaques A.K., Fukamizo T., Hall D., Barton R.C., Escott G.M., Parkinson T., Hitchcock C.A., Adams D.J., 2001, Disruption of the gene encoding the ChiB1 chitinase of *Aspergillus fumigatus* and characterization of a recombinant gene product, *Microbiology*., 149(Pt 10):2931-9

-Jain R., Valiante V., Remme N., Docimo N., Heinekamp T., Hertweck C., Gershenzon J., Haas H., Brakhage A.A., 2011, The MAP kinase MpkA controls cell wall integrity, oxidative stress response, gliotoxin production and iron adaptation in *Aspergillus fumigatus*, *Molecular Microbiology*, 82(1), 39–53

-K-

-van der Kaaij R.M., Yuan X.L., Franken A., Ram A.F.,Punt P.J., van der Maarel M.J., Dijkhuizen L., 2007, Two novel, putatively cell wall-associated and glycosylphosphatidylinositol-anchored alpha-glucanotransferase enzymes of *Aspergillus niger*. *Eukaryot Cell* 6: 1178–1188

© 2015 Tous droits réservés. doc.univ-lille1.fr

-Kaliner M., Marom Z., Patow C., Shelhamer J., 1984, Human respiratory mucus, *J. Allergy Clin. Immunol.* ; 73(3):318-23

-Khatri I.A., Wang R., J.F. Forstner J.F., 2003, SEA (sea-urchin sperm protein, enterokinase and agrin)-module cleavage, association of fragments and membrane targeting of rat intestinal mucin Muc3, *Biochem. J.*; 372, pp. 263–270

-Kirkham S., Sheehan JK, Knight D, Richardson PS, Thornton DJ., 2002, Heterogeneity of airways mucus: variations in the amounts and glycoforms of the major oligomeric mucins MUC5AC and MUC5B, *Biochem. J.* ; 361 (Pt 3):537-46

-Kornfeld, R., Kornfeld, S. , 1985, Assembly of asparagine-linked oligosaccharides, *Annu. Rev. Biochem.;* 54:631-64.

-Kusters J.G., van Vliet A.H., Kuipers E.J., 2006, Pathogenesis of Helicobacter pylori infection, *Clin. Microbiol. Rev.*, 19(3):449-90

-L-

-Langfelder K., Streibel M., Jahn B., Haase G., Brakhage A.A., 2003, Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi, *Fungal Genet. Biol.*, 38(2):143-58

-Latgé J.P., 2010, Tasting the fungal cell wall, *Cellular Microbiology*, 12(7), 863–872

-Latgé JP., 2007, The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell, *Molecular Microbiology*, 66(2), 279–290

-Latgé JP., 2001, The pathobiology of *Aspergillus fumigatus, Trends Microbiol.*,9(8):382-9

-Latgé J.P., 1999, *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis, *Clin. Microbiol. Rev.*, 12(2):310-50

-Latgé J.P., Kobayashi H., Debeaupuis J.P., Diaquin M., Sarfati J., Wieruszeski J.M., Parra E., Bouchara J.P., Fournet B., 1994, Chemical and immunological characterization of the extracellular galactomannan of *Aspergillus fumigatus, Infect Immun.*, 62(12):5424-33

-Levdansky E., Kashi O., Sharon H., Shadkchan Y., Osherov N.,2010, The *Aspergillus fumigatus* cspA gene encoding a repeat-rich cell wall protein is important for normal conidial cell wall architecture and interaction with host cells, *Eukaryot. Cell.*,9(9):1403-15

-Levin D.E., 2005, Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 69(2):262-91

-Levitz S.M., 2010, Innate recognition of fungal cell walls, *PLoS Pathog.*, 6(4):e1000758

-Linsdell P., 2006, Mechanism of chloride permeation in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel, *Exp. Physiol.*; 91(1):123-9

-Loussert C., Schmitt C., Prevost M.C., Balloy V., Fadel E., Philippe B., Kauffmann-Lacroix C., Latgé J.P., Beauvais A., 2010, *In vivo* biofilm composition of *Aspergillus fumigatus*, *Cell Microbiol.*, 12(3):405-10

© 2015 Tous droits réservés. doc.univ-lille1.fr

-M-

-Marion C.L., Rappleye C.A., Engle J.T., Goldman W.E.,2006, An alpha-(1,4)-amylase is essential for alpha-(1,3)-glucan production and virulence in *Histoplasma capsulatum*, *Mol Microbiol* 62: 970–983.

-Maubon D., Park S., Tanguy M., Huerre M., Schmitt C., Prévost M.C., Perlin D.S., Latgé J.P., Beauvais A., 2006, AGS3, an alpha(1-3)glucan synthase gene family member of *Aspergillus fumigatus*, modulates mycelium growth in the lung of experimentally infected mice, *Fungal Genet Biol.*, 43(5):366-75

-Martín-Cuadrado A. B., Dueñas E., Sipiczki M., Vázquez de Aldana C. R., del Rey F., 2003, The endo-*β*-1,3-glucanase eng1p is required for dissolution of the primary septum during cell separation in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Cell Sci.* 116, 1689–1698

-Mellado E., Dubreucq G., Mol P., Sarfati J., Paris S., Diaquin M., Holden D.W., Rodriguez-Tudela J.L., Latgé J.P., 2003, Cell wall biogenesis in a double chitin synthase mutant (chsG-/chsE-) of *Aspergillus fumigatus*, *Fungal Genet. Biol.*, 38(1):98-109

-Momany M and Taylor I., 2000, Landmarks in the early duplication cycles of *Aspergillusfumigatus* and *Aspergillus nidulans*: polarity, germ tube emergence and septation, *Microbiology*, 146 Pt 12:3279-84

- Mononen, I., Karjalainen, E., 1999, Structural comparaison of protein sequences around potential N-glycosylation sites, *Biochem.Biophys.Acta*, 788:364-367

-Mouyna I., Morelle W., Vai M., Monod M., Léchenne B., Fontaine T., Beauvais A., Sarfati J., Prévost M.C., Henry C., Latgé J.P., 2005, Deletion of GEL2 encoding for a beta(1-3)glucanosyltransferase affects morphogenesis and virulence in *Aspergillus fumigatus*, *Mol. Microbiol.*, 56(6):1675-88

-Mouyna I., Sarfati J., Recco P., Fontaine T., Henrissatz B., Latge J.P., 2002, Molecular characterization of a cell wall-associated β(1-3) endoglucanase of *Aspergillus fumigatus,Med Mycol.*, 40(5):455-64

-Mouyna I., Fontaine T., Vai M., Monod M., Fonzi W.A., Diaquin M., Popolo L., Hartland R.P., Latgé J.P., 2000, Glycosylphosphatidylinositol-anchored glucanosyltransferases play an active role in the biosynthesis of the fungal cell wall, *J. Biol. Chem.*,275(20):14882-9

-Mouyna I., Hartland R.P., Fontaine T., Diaquin M., Simenel C., Delepierre M., Henrissat B., Latgé J.P.,1998, A 1,3-beta-glucanosyltransferase isolated from the cell wall of *Aspergillus fumigatus* is a homologue of the yeast Bgl2p, *Microbiology*, 144 (Pt 11):3171-80

-Mowat E.,Rajendran R.,Williams C.,McCulloch E.,Jones B.,Lang S., Ramage G., 2010, *Pseudomonas aeruginosa* andtheir small diffusible extracellular molecules inhibit *Aspergillus fumigat us* biofilm formation, *FEMS Microbiol. Lett.*, 313(2):96-102

-Mutsaers J.H., van Halbeek H., Vliegenthart J.F., Wu A.M., Kabat E.A., 1986, Typing of core and backbone domains of mucin-type oligosaccharides from human ovarian-cyst glycoproteins by 500-MHz 1H-NMR spectroscopy, *Eur. J. Biochem.* ; 157(1):139-46

© 2015 Tous droits réservés. doc.univ-lille1.fr

-N-

-Nivens D.E., Ohman D.E., Williams J., Franklin M.J.,2001, Role of alginate and its O acetylation in formation of Pseudomonas aeruginosa microcolonies and biofilms, *J. Bacteriol.* ;183(3):1047-57

-O-

-O'Gorman CM, Fuller HT, Dyer PS., 2009, Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*, *Nature*,457(7228):471-4

-Offner G.D., Nunes D.P., Keates A.C., Afdhal N.H., Troxler R.F., 1998, The amino-terminal sequence of MUC5B contains conserved multifunctional D domains: implications for tissue-specific mucin functions, *Biochem. Biophys. Res. Commun.;* 251: 350–355

-Osumi M., 2012, Visualization of yeast cells by electron microscopy, *J. Electron. Microsc. (Tokyo)*.; 61(6):343-65

-P-

-Paris S., Wysong D., Debeaupuis J.P., Shibuya K., Philippe B., Diamond R.D., Latgé J.P., 2003, Catalases of *Aspergillus fumigatus, Infect. Immun.* 71(6):3551-62

-Paris S., Debeaupuis JP., Crameri R., Carey M., Charles F., Prévost M.C., Schmitt C., Philippe B., Latgé JP, 2002, Conidial hydrophobins of *Aspergillus fumigatus, Applied Env. Microbiol.*, 1581-1588

-Peñalver M.C., O'Connor J.E., Martinez J.P., Gil M.L., 1996, Binding of human fibronectin to *Aspergillus fumigatus* conidia, *Infect. Immun*.**,** 64(4):1146-53

-Peñalver M.C., Casanova M., Martínez J.P., Gil M.L., 1996, Cell wall protein and glycoprotein constituents of *Aspergillus fumigatus* that bind to polystyrene may be responsible for the cell surface hydrophobicity of the mycelium, *Microbiology*,142, 1597-1604

-Pihet M., Vandeputte P., Tronchin G., Renier G., Saulnier P., Georgeault S., Mallet R., Chabasse D., Symoens F., Bouchara J.P., 2009, Melanin is an essential component for the integrity of the cell wall of *Aspergillus fumigatus* conidia, *BMC Microbiology*, 9:177

-Prickett M., Jain M., 2013, Gene therapy in cystic fibrosis, *Transl Res.*;161(4):255-64

-Q-

-Quinton PM., 1999, Physiological basis of cystic fibrosis: a historical perspective, *Physiol Rev.* ; 79(1 Suppl):S3-S22.

-R-

-Reyes G., Romans A., Nguyen C.K., May G.S., 2006, Novel mitogen-activated protein kinase MpkC of *Aspergillus fumigatus* is required for utilization of polyalcohol sugars, *Eukaryot. Cell.*,5(11):1934-40

© 2015 Tous droits réservés.

-Rogg L.E.,Fortwendel J.R., Juvvadi P.R., Lilley A., Steinbach W.J., 2011, The chitin synthase genes *chsA* and *chsC* are not required for cell wall stress responses in the human pathogen *Aspergillus fumigatus,Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 411(3):549-54

-Roncero C., 2002, The genetic complexity of chitin synthesis in fungi,*Curr. Genet*., 41(6):367-78

-Ronen R., Sharon H., Levdansky E., Romano J., Shadkchan Y., Osherov N., 2007, The *Aspergillus nidulans* pkcA gene is involved in polarized growth, morphogenesis and maintenance of cell wall integrity, *Curr. Genet.*, 51(5):321-9

-Rose M.C., Voynow J.A., 2006, Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease, *Physiol Rev.;*86(1):245-78

-Rose M.C., Nickola T.J., Voynow J.A., 2001, Airway mucus obstruction: mucin glycoproteins, MUC gene regulation and goblet cell hyperplasia, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*;25(5):533-7

-Ruiz-Herrera J., Elorza M.V., Valentín E., Sentandreu R., 2006, Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity, *FEMS Yeast Res*.,6(1):14-29

-S-

-Scharfman A., Arora S.K., Delmotte P., Van Brussel E., Mazurier J., Ramphal R., Roussel P. , 2001, Recognition of Lewis x derivatives present on mucins by flagellar components of *Pseudomonas aeruginosa*, *Infect. Immun.*; 69(9):5243-8

-Scharfman A., Delmotte P., Beau J., Lamblin G., Roussel P., Mazurier J., 2000, Sialyl-Le(x) and sulfo-sialyl-Le(x) determinants are receptors for *P. aeruginosa*, *Glycoconj. J.*;17(10):735-40

-Schmaler-Ripcke J., Sugareva V., Gebhardt P., Winkler R., Kniemeyer O., Heinekamp T., Brakhage A.A., 2009, Production of pyomelanin, a second type of melanin, via the tyrosine degradation pathway in *Aspergillus fumigatus*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 75(2):493-503

-Schmalhorst P.S., Krappmann S., Vervecken W., Rohde M., Müller M., Braus G.H., Contreras R., Braun A., Bakker H., Routier F.H., 2008, Contribution of Galactofuranose to the Virulence of the Opportunistic Pathogen *Aspergillus fumigatus, Eukaryot.Cell.*, 7(8):1268-77

-Schreiber R., Nitschke R., Greger R., Kunzelmann, K., 1999, The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator activates aquaporin 3 in airway epithelial cells, *J. Biol. Chem.*, 274, 11811-11816

-Schubert, U., Anton, L.C., Bacik, I., Cox J.H., Bou, S., Bennink, J.R., Orlowski, M., Strebel, K., Yewdell, J.W. ,1998, CD4 glycoprotein degradation induced by human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein requires the function of proteasomes and the ubiquitin-conjugating pathway. *J. Virol.* ;72 : 2280-8

-Schulz B.L., Sloane A.J., Robinson L.J., Prasad S.S., Lindner R.A., Robinson M., Bye P.T., Nielson D.W., Harry J.L., Packer N.H., Karlsson N.G., 2007, Glycosylation of sputum mucins is altered in cystic fibrosis patients, Glycobiology. ;17(7):698-712

© 2015 Tous droits réservés. doc.univ-lille1.fr

-Segal B.H., 2007, Role of macrophages in the host defense against Aspergillosis and strategies for immune augmentation, *Oncologist.*, 12 Suppl 2:7-13

-Sheehan J.K., Howard M., Richardson P.S., Longwill T., Thornton D.J., 1999, Physical characterization of a low-charge glycoform of the MUC5B mucin comprising the gel-phase of an asthmatic respiratory mucous plug, *Biochem.. J.*; 338, 507–513

-Sheppard D.C., 2011, Molecular mechanism of *Aspergillus fumigatus* adherence to host constituents,*Curr.Opin.Microbiol.*,14(4):375-9

-Soong G., Muir A., Gomez M.I., Waks J., Reddy B., Planet P., Singh P.K., Kaneko Y., Wolfgang M.C., Hsiao Y.S., Tong L., Prince A., 2006, Bacterial neuraminidase facilitates mucosal infection by participating in biofilm production, *J. Clin. Invest.* ; 116(8):2297-2305

-Stanley P., Schachter H., Taniguchi N., 2009, Chapter 8, N-Glycans, Essentials of Glycobiology. 2nd Edition. Varki A, Cummings RD, Esko JD, *et al.*, editors.

-Stover C.K., Pham X.Q., Erwin A.L., Mizoguchi S.D., Warrener P., Hickey M.J., Brinkman F.S., Hufnagle W.O., Kowalik D.J., Lagrou M., Garber R.L., Goltry L., Tolentino E.,Westbrock-Wadman S., Yuan Y., Brody L.L., Coulter S.N., Folger K.R., Kas A., Larbig K., Lim R., Smith K., Spencer D., Wong G.K., Wu Z., Paulsen I.T., Reizer J., Saier M.H., Hancock R.E., Lory S., Olson M.V., 2000, Complete genome sequence of Pseudomonas aeruginosa PAO1, an opportunistic pathogen, *Nature*.; 406(6799):959-64

-Sturtevant J.E. and Latgé J.P., 1992, Interactions between conidia of *Aspergillus fumigatus* and human complement component C3, *Infect. Immun.*, 60(5):1913-8

-Sugita M., Yue Y., Foskett J.K., 1998, CFTR Cl- channel and CFTR-associated ATP channel: distinct pores regulated by common gates, *Embo J.*; 17, 898-908

-Sugui J.A., Losada L., Wang W., Varga J., Ngamskulrungroj P., Abu-Asab M., Chang Y.C., O'Gorman C.M., Wickes B.L., Nierman W.C., Dyer P.S., Kwon-Chung K.J., 2011, Identification and characterization of *Aspergillus fumigatus* “supermater” pair, MBio.,2(6). pii: e00234-11

-T-

-Teepe A.G., Loprete D.M., He Z., Hoggard T.A., Hill T.W. (2007) The protein kinase C orthologue PkcA plays a role in cell wall integrity and polarized growth in *Aspergillus nidulans*, *Fungal Genet. Biol.*, 44: 554–562

-Tefsen B., Ram A.F., van Die I., Routier F.H., 2012, Galactofuranose in eukaryotes: aspects of biosynthesis and functional impact, *Glycobiology*, 22(4):456-69

-Thau N., Monod M., Crestani B., Rolland C., Tronchin G., Latgé J.P., Paris S., 1994, Rodletess mutants of *Aspergillus fumigatus, Infection and Immunity*, 4380-4388

© 2015 Tous droits réservés. doc.univ-lille1.fr

-Thornton D.J., Howard M., Khan N., Sheehan J.K., 1997, Identification of two glycoforms of the MUC5B mucin in human respiratory mucus. Evidence for a cysteine-rich sequence repeated within the molecule, *J Biol Chem.*; 272(14):9561-6

- Tielker D., Hacker S., Loris R., Strathmann M., Wingender J., Wilhelm S., Rosenau F., Jaeger K.E., 2005, *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecB is located in the outer membrane and is involved in biofilm formation, *Microbiology*.;151(Pt 5):1313-23.

-Tronchin G., Esnault K., Sanchez M., Larcher G., Marot-Leblond A., Bouchara J.P., 2002, Purification and Partial characterization of a 32-kilodalton Sialic acid specific lectin from Aspergillus fumigatus, *Infect Immun.*, 70(12):6891-5

-Tronchin G., Chabasse D., Bouchara J.P., 1997, Expression and identification of a laminin-binding protein in *Aspergillus fumigatus* conidia, *Infect. Immun.*, 65(1):9-15

-U-

-Upadhyay S.K., Mahajan L., Ramjee S., Singh Y., Basir S.F., Madan T., 2009, Identification and characterization of a laminin-binding protein of *Aspergillus fumigatus*: extracellular thaumatin domain protein (AfCalAp), *J. Med. Microbiol.*, 58(Pt 6):714-22

-V-

-Valiante V., Jain R., Heinekamp T., Brakhage A.A., 2009, The MpkA MAP kinase module regulates cell wall integrity signaling and pyomelanin formation in *Aspergillus fumigatus,Fungal Genetics and Biology*, 46: 909–918

-Valiante V., Heinekamp T., Jain R., Härtl A., Brakhage A.A., 2008, The mitogen-activated protein kinase MpkA of *Aspergillus fumigatus* regulates cell wall signaling and oxidative stress response, *Fungal Genetics and Biology*, 45: 618–27

-Van Goor F., Straley K.S., Cao D., González J., Hadida S., Hazlewood A., Joubran J., Knapp T., Makings L.R., Miller M., Neuberger T., Olson E., Panchenko V., Rader J.,Singh A., Stack J.H., Tung R., Grootenhuis P.D., Negulescu P., 2006, Rescue of DeltaF508-CFTR trafficking and gating in human cystic fibrosis airway primary cultures by small molecules, *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* ; 290(6):L1117-30

-van Klinken B.J., Einerhand A.W., Buller H.A., Dekker J., 1998, The oligomerization of a family of four genetically clustered human gastrointestinal mucins, *Glycobiology*; 8, pp. 67–75

-Vinall L.E., Hill A.S., Pigny P., Pratt W.S., Toribara N., Gum J.R., Kim Y.S., Porchet N., Aubert J.P., Swallow D.M., 1998, Variable number tandem repeat polymorphism of the mucin genes located in the complex on 11p15.5., *Hum. Genet.* ; 102(3):357-66

© 2015 Tous droits réservés. doc.univ-lille1.fr

-W-

-Warwas M.L., Watson J.N., Bennet A.J., Moore M.M., 2007, Structure and role of sialic acids on the surface of *Aspergillus fumigatus* conidiospores, *Glycobiology.*,17(4):401-10

-Wasylnka J.A., Moore M.M., 2000, Adhesion of *Aspergillus* species to extracellular matrix proteins: evidence for involvement of negatively charged carbohydrates on the conidial surface,*Infect. Immun.*, 68(6):3377-84

-X-

-Xia B., Royall J.A., Damera G., Sachdev G.P., Cummings R.D., 2005, Altered O-glycosylation and sulfation of airway mucins associated with cystic fibrosis, Glycobiology. ; 15(8):747-75

-Xue T., Nguyen K., Romans A., May G.S., 2004, A mitogen-activated protein kinase that senses nitrogen regulates conidial germination and growth in *Aspergillus fumigatus, Eukaryot. Cell.*, 3(2):557-60

© 2015 Tous droits réservés.

doc.univ-lille1.fr

Résumé

Chaque jour, nous inhalons des organismes pathogènes ou non tels que des bactéries ou des champignons. Chez l'individu sain, l'infection est évitée grâce à l'action conjuguée du mucus pulmonaire sécrété qui empêche la colonisation des pathogènes et par le battement des cils de l'épithélium pulmonaire permettant ainsi la clairance des poumons. Si cette barrière ne suffit pas, les cellules du système immunitaire entrent alors en jeu et vont reconnaître les pathogènes via une famille de récepteurs particuliers, les PRR. Chez les personnes immunodéprimées ou atteintes de mucoviscidose, ces mécanismes ne sont plus fonctionnels favorisant le développement de pathogènes tels que *Pseudomonas aeruginosa* ou *Aspergillus fumigatus*. Afin de mieux comprendre la pathogénèse des infections pulmonaires, mon travail de thèse a consisté d'une part à caractériser la paroi d'*A. fumigatus* au cours de la germination des conidies et d'autre part à identifier les motifs glycanniques portés par les mucines et reconnus par les pathogènes.

Lors de la germination des conidies, nous avons observé une augmentation de la proportion de β1,3-glucane, α1,3-glucane et de chitine corrélée à une diminution en galactomannanes. Nous avons également estimé la taille des α1,3-glucanes au cours de la germination ainsi que de divers mutants afin d'avoir une idée plus précise du rôle des 3 Alpha-Glucane Synthases (AGS) présentes chez *A. fumigatus*. Dans un deuxième temps, nous avons purifié les mucines pulmonaires de patients atteints de mucoviscidose et caractérisé leurs profils de glycosylation. Nous avons pu démontrer de très fortes variations inter-individuelles avec pour certains patients la présence de mucines essentiellement neutres alors que pour d'autres les mucines étaient presque exclusivement acides. Ces résultats sont certainement le reflet d'un niveau d'inflammation, d'infection et d'avancée de la maladie différent. Nous avons ensuite développé un test d'adhésion de bactéries fluorescentes sur mucines déposées sur des membranes de nitrocellulose. En analysant les profils de glycosylation des mucines sur lesquelles les bactéries ont adhéré, nous avons pu démontré que *P. aeruginosa* adhère préférentiellement sur les structures sialylées et sulfatées. Nous avons également montré qu'*A. fumigatus* adhérait aux mucines pulmonaires humaines et de porc.

Ce travail devrait permettre à terme d'identifier de nouvelles molécules permettant d'inhiber l'adhésion de pathogènes et ainsi lutter plus efficacement contre les infections.

© 2015 Tous droits réservés.