

N° d'ordre : 41688

Université Sciences et Technologies de LILLE 1
Ecole Doctorale Biologie-Santé

THESE

Présentée par

Ghenima SFIHI-LOUALIA

Pour l'obtention du grade de

Docteur de l'Université de Lille 1

Aspects moléculaires et cellulaires de la Biologie

Spécialité : Biochimie et Biologie moléculaire

**Caractérisation de l'activité enzymatique des
 β -1,2mannosyltransférases CaBmt1 et CaBmt3,
enzymes d'initiation et d'élongation de la
 β -mannosylation du phosphopeptidomannane de
*Candida albicans***

Soutenue le 19/02/ 2015 devant la commission d'examen

Président :	Pr. Tony LEFEBVRE
Rapporteurs :	Dr. Thierry FONTAINE Dr. Jérôme NIGOU
Examineurs :	Dr. Anne HARDUIN-LEPERS Dr. Jean-Maurice MALLET
Directeur de thèse :	Dr. Florence DELPLACE

Ces travaux ont été réalisés sous la direction scientifique du Dr Florence DELPLACE au sein de l'Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, UMR 8576 CNRS Université de Lille1 (Directeur : Pr Christophe D'Hulst) dans l'équipe « Glycobiologie structurale des interactions hôte-pathogène » dirigée par le Dr Yann Guerardel.

Nous avons bénéficié d'une allocation de Recherche du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche

DEDICACES

A mes très chers parents

A mes frères et sœurs

A mon mari et ma fille

Remerciements

Avant tout, Je tiens à remercier l'ensemble de membres de mon jury d'avoir accepté d'évaluer les travaux de thèse. Je remercie plus particulièrement le Dr Jérôme Nigou et le Dr Thierry Fontaine d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse en qualité de rapporteurs. Je remercie également la Dr Anne Harduin-Lepers et le Dr Jean-Maurice Mallet pour avoir accepté d'examiner mon travail de thèse. J'adresse toute ma gratitude au Pr Tony LEFEBVRE qui me fait le plaisir de présider la commission d'examen de ma thèse.

Je remercie sincèrement et chaleureusement ma directrice de thèse le Dr Florence DELPLACE pour la confiance qu'elle m'a accordée, pour son encadrement scientifique durant les quatre années que j'ai passées au laboratoire, pour son soutien et ses conseils.

Je tiens à remercier tout particulièrement le Dr Yann Guérardel de m'avoir accueillie dans son équipe « Glycobiologie de l'interaction hôte-pathogène » et pour ses nombreux conseils.

Je remercie également les ingénieurs de recherche de la plateforme PAGES et plus particulièrement les Drs Emmanuel Maes et Bernadette Coddeville pour leur formation et leur aide précieuse en résonance magnétique nucléaire et en spectrométrie de masse.

De même, j'adresse mes remerciements au Dr. Frédéric Krzewinski, pour son excellente formation aux différentes techniques chromatographiques.

Un grand merci aux Drs Emeline FABRE, Julie Bouckaert, ainsi qu'aux Drs Chantal FRADIN et Jean-Maurice MALLET et leurs équipes, pour leur apport collaboratif qui nous a permis de bien mener ces travaux.

Je remercie l'ensemble du personnel du groupe « Glycobiologie structurale des interactions hôte-pathogène » et plus particulièrement Elisabeth Ellass, Thomas Hurtaux, Nao Yamakawa, Ossarath Kol ainsi que les stagiaires. Une équipe avec qui j'ai eu la chance de travailler et qui m'a énormément apporté tant sur le plan humain que professionnel.

Enfin je remercie toute ma famille et mes amis pour leurs soutien et encouragements. Ma sœur Hayet et mon beau frère Brahim pour leur aide dans la mise en page.

Avant propos

Résumé

Candida albicans est une levure de la flore digestive normale humaine, pouvant dans certaines conditions s'avérer être un pathogène opportuniste responsable d'infections sévères notamment dans un contexte nosocomial. Le contact entre *C. albicans* et les cellules-hôtes se fait *via* différents glycoconjugués de la paroi de la levure, en particulier le phosphopeptidomannane (PPM) et le phospholipomannane (PLM). La spécificité structurale de ces glycoconjugués réside dans la présence de beta-1,2 oligomannosides (β -Mans) terminaux connus pour être des facteurs majeurs de virulence de la levure. Des travaux antérieurs ont permis de mettre en évidence chez *C. albicans* une nouvelle famille de neuf gènes nommés (CaBMT1-9), codant pour des β -1,2 mannosyltransférases. Quatre β -1,2 mannosyltransférases (CaBmt1-4) sont impliquées dans la biosynthèse du PPM et deux (CaBmt5-6) dans la β -mannosylation du PLM. Ces travaux de thèse s'intègrent dans le cadre d'un projet plus large visant à mieux comprendre les voies de biosynthèse des β -mannosides par la caractérisation individuelle des activités enzymatiques des CaBmts.

La première enzyme étudiée a été CaBmt1, impliquée dans l'initiation de la β -mannosylation du PPM et choisie comme modèle pour l'étude des autres CaBmts. La production de CaBmt1 sous forme recombinante nommée Bmt1p chez *Pichia Pastoris* a été réalisée dans notre équipe. Dans la première partie de ce travail, nous avons constitué, par isolement et purification à partir des PPMs de levures, un panel important de substrats accepteurs de nature oligomannosidique dont l'analyse structurale a été réalisée par spectrométrie de masse et RMN. Ensuite, nous avons utilisé ces substrats naturels après couplage à un fluorophore ainsi que des substrats synthétiques préparés par l'équipe du Dr. Mallet (ENS Paris) pour la caractérisation biochimique de l'activité β -1,2 mannosyltransférase de Bmt1p. Nous avons démontré que Bmt1p était capable *in vitro* de transférer successivement deux résidus de mannose en β -1,2 sur un tri-ou tétramannoside lié en α -1,2. Dans la seconde partie, nous nous sommes intéressés à la caractérisation de l'activité de CaBmt3, enzyme impliquée dans l'élongation des β -Mans du PPM ; la même démarche a été retenue pour l'étude. Les résultats obtenus montrent que Bmt3p transfère *in vitro* un seul résidu mannose en β -1,2 sur un tétramannoside constitué d'une chaîne en α -1,2 avec un mannose terminal lié en β -1,2. Au cours de ces travaux, nous nous sommes ensuite orientés vers la détermination du rôle de CaBmt7 qui est une β -mannosyltransférase de *C. albicans* dont la fonction demeure inconnue, par une approche purement structurale. Pour ce faire, nous avons purifié des PPMs de souches de *C. albicans* déficiente dans la synthèse de CaBmt7 et d'une souche sauvage utilisée comme référence (SC5314). Les résultats préliminaires d'analyse de ces PPMs ont mis en évidence la présence de profils glycaniques différents entre les deux souches. Les travaux en cours pour leur caractérisation structurale contribueront à déterminer le rôle de CaBmt7.

En conclusion, ces travaux de thèse ont permis une meilleure compréhension de la spécificité et de la séquence d'action des CaBmt1 et CaBmt3 dans les voies de biosynthèse des β -mannosides de *C. albicans*, notamment par la caractérisation structurale des produits formés et l'identification du substrat accepteur minimal reconnu par les enzymes recombinantes Bmt1p et Bmt3p. L'ensemble de ces travaux sont un préalable à l'élaboration de nouvelles drogues anti-fongiques ciblant la synthèse de la paroi.

Mots clés : *Candida albicans*, mannosyltransférases, activité enzymatique, phosphopeptidomannane, β -mannosylation, analyse structurale, spectrométrie de masse MALDI-TOF, RMN.

Summary

Candida albicans is a commensal yeast of the human digestive and vaginal tracts. Nevertheless, this opportunistic pathogen may cause severe infections, particularly nosocomial infections. *C. albicans* – host cells interplay is mediated by different cell wall components. In particular, beta-1,2 linked oligomannosides (β -Mans), expressed on numerous cell wall glycoconjugates, including phosphopeptidomannan (PPM) and phospholipomannan (PLM), are involved in host-pathogen interaction and virulence mechanisms. Previous studies identified a new family of nine genes, named CaBMT1-9, encoding for β -1,2 mannosyltransferases (Bmts) in *C. albicans*. Four of these β -1,2 mannosyltransferases (CaBmt1-4) are involved in the β -mannosylation of cell wall PPM and two (CaBmt5-6) act specifically on β -mannosylation of the PLM. The objective of our work is to characterize CaBmts individual activities in order to better understand biosynthetic pathways of β -mannosides.

The first enzyme to be studied was CaBmt1, the enzyme responsible for the initiation of β -mannosylation of PPM, chosen as a model for other CaBmts. A recombinant soluble form of CaBmt1, named Bmt1p was produced in *Pichia pastoris* in our team. In the first part of the thesis, we have obtained a variety of potential acceptor substrates after isolation and purification from yeast PPMs and established their structure by MALDI-TOF mass spectrometry and NMR spectroscopy. Then, we used these natural substrates after coupling to a fluorescent tag as well as synthetic substrates prepared by the team of Dr. Mallet (ENS Paris) for the biochemical characterization of the activity of β -1,2 mannosyltransferase Bmt1p. We established that Bmt1p can sequentially transfer *in vitro* two β -1,2-mannosyl units onto a α 1-2 linked tri-or tetramannoside. The second enzyme to be studied was CaBmt3 that is involved in the elongation of the β -Mans chain on the PPM; the same approach was used for the study. Our results demonstrated that Bmt3p can catalyse the *in vitro* transfer of one β -1,2-mannosyl unit onto a tetramannoside containing a terminal β -1,2-Man linked to a α (1-2)Man chain. Finally, the last part of the thesis focused on the determination of the role of CaBmt7 which is a putative β -mannosyltransferase of *C. albicans* whose activity remains unknown. In this context, we compared the structure of PPMs purified from *C. albicans* Δ BMT7 mutant strain and reference strain (SC5314). Preliminary results indicated the presence of different glycan profiles in the two strains. Experiments in progress will contribute to determine the role of CaBmt7.

In conclusion, this work led to a better understanding of the specificity and the sequential action of CaBmt1 and CaBmt3 in biosynthetic pathways of β -mannosides of *C. albicans* through the structural characterization of the reactions products and the identification of the minimal acceptor substrate recognized by Bmt1p and Bmt3p. These data are a prerequisite for the design of new potential antifungal drugs that target the biosynthesis of cell wall.

Key words : *Candida albicans*, mannosyltransferases, enzymatic activity, phosphopeptidomannan, β -mannosylation, structural analysis, MALDI-TOF mass spectrometry, NMR.

LISTE DES ABREVIATIONS

2 AP : 2-AminoPyridine

β -Mans : β -1,2 oligoMannosides

Ca Δ BMT3 : souche de *Candida albicans* délétée en BMT3

CaBmt1 : Beta-Mannosyltransférase 1 de *Candida albicans*

CaBMT1 : Gène codant pour la Beta-MannosylTransférase1 de *Candida albicans*

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

COSY : COrrélation SpectroscopY

DC-SIGN : Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin

Dectin-1/2 : DC-Associated C-type lectin-1/2

DHB : acide 2,5- DiHydroxyBenzoïque

Dol : Dolichol

DP : Degré de Polymérisation

GDP : Guanosine DiPhosphate

HPLC: Chromatographie Liquide Haute Performance

HSQC: Heteronuclear Single Quantum Coherence

IFI: Infections Fongiques Invasives

IL : InterLeukin

MALDI-TOF: Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation Time of Flight

Man : Mannose

NG : *N*-glycanes

NLR : Nod-Like Receptor

NOD : Nucleotide Oligomerization Domain

OLD : Observatoire Des Levures

PAMPs : Pathogen-Associated Molecular Pattern

PLM : Phospholipomannane

PNGase F : Peptide-*N*-Glycosidase F

PPM : Phosphopeptidomannane

PRR: Pattern Recognition Receptor

RE : Réticulum Endoplasmique

RMN: Résonance Magnétique Nucléaire

ROESY : Rotating Overhauser Effect SpectroscopY

SC5314 : Souche Sauvage de *Candida albicans*

SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis

Th1/Th17 : T helper 1/17

TLR : Toll-Like Receptor

TNF : Tumor Necrosis Factor

TOCSY : TOtal Correlation SpectroscopY

Liste des publications

1- Marilyne Pourcelot, Laurent Cattiaux, **Ghenima Sfihi-Loualia**, Emeline Fabre, Frédéric Krzewinski, Chantal Fradin, Daniel Poulain, Florence Delplace, Yann Guérardel et Jean-Maurice Mallet. Mantyl tagged oligo α (1-> 2) mannosides as *Candida albicans* β -mannosyltransferases substrates: a comparison between synthetic strategies, *RSC Adv.*, (2013) **3**, 22560-22571.

2- **Ghenima Sfihi-Loualia**[§], Emeline Fabre[§], Marilyne Pourcelot, Bernadette Coddeville, Frédéric Krzewinski, Julie Bouckaert, Emmanuel Maes, Thomas Hurtaux, Romaric Dubois, Chantal Fradin, Jean-Maurice Mallet, Daniel Poulain, Florence Delplace et Yann Guerardel. Characterization of the recombinant *Candida albicans* β -1,2 mannosyltransferase that initiates the β -mannosylation of cell-wall phosphopeptidomannan, *Biochem. J.*, (2014), **457**, 347-360

3-**Ghenima Sfihi-Loualia**[§], Thomas Hurtaux[§], Emeline Fabre, Anaïs Mée, Marilyne Pourcelot, Emmanuel Maes, Julie Bouckaert, Frédéric Krzewinski, Chantal Fradin, Jean-Maurice Mallet, Boualem Sendid, Daniel Poulain, Florence Delplace and Yann Guérardel. Characterization of the recombinant *Candida albicans* β -1,2 mannosyltransferase Bmt3p involved in the β -mannosylation of cell-wall phosphopeptidomannan (en preparation).

[§] *Co-auteurs à contribution équivalente.*

Liste des figures

Figure 1 : Evolution des taux annuels d'incidence (A) et de létalité (B) des candidémies et des aspergilloses invasives en France depuis 2001 à 2010.....	26
Figure 2 : Structure de la paroi de <i>C. albicans</i>	28
Figure 3 : Structure du phosphopeptidomannane PPM (A) et du phospholipomannane PLM (B) de <i>C. albicans</i> et implication des β -1,2 mannosyltransférases dans la biosynthèse des β -Mans.....	30
Figure 4 : Schéma des différentes étapes d'invasion des tissus par <i>C. albicans</i>	34
Figure 5 : Les populations cellulaires impliquées dans la reconnaissance de <i>C. albicans</i>	35
Figure 6 : Les principaux PRRs impliqués dans la reconnaissance des PAMPs de <i>C. albicans</i> et résumé des voies de signalisations intracellulaires activées.....	38
Figure 7 : Voie de biosynthèse et de maturation de l'oligosaccharide précurseur (Glc ₃ Man ₉ GlcNAc ₂ -PP-Dol) sur la face cytosolique et dans la lumière du réticulum endoplasmique	45
Figure 8 : Voie de biosynthèse des N-glycanes (PPM) de <i>C. albicans</i>	47
Figure 9 : Schéma représentatif de la biodiversité des O-mannosyl glycanes chez les levures	50
Figure 10 : Voie de biosynthèse des glycosphingolipides chez les levures (A) et du phospholipomannane (PLM) chez <i>C. albicans</i> (B).	51
Figure 11 : Organisation modulaire des glycosyltransférases de type II (A) et de type III (B).	57
Figure 12 : Le repliement global observé chez les glycosyltransférases	59
Figure 13 : Analyse phylogénique de différentes familles de mannosyltransférases de <i>C. albicans</i> . ..	63
Figure 14 : Schéma de la stratégie expérimentale suivie pour l'obtention d'une « glycobanque » d'oligomannosides.....	72
Figure 15 : Analyse par CCM des oligomannosides provenant de l'acétolyse du PPM de <i>S. cerevisiae</i> après fractionnement sur Bio-gel P6.	73
Figure 16 : Analyse par CCM des oligomannosides neutres extraits à partir du PPM de <i>C. albicans</i> de la souche délétée de CaBMT1	75
Figure 17 : Structure des oligomannosides neutres après couplage à la 2-Aminopyridine.....	76
Figure 18 : Analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF de la sous-fraction de FIIN composée de (DP6 à DP12) avant (A) et après marquage à la 2-AP (B).	78
Figure 19 : Analyse RMN du trimannoside (DP3sc) isolé du PPM de <i>S. cerevisiae</i>	79
Figure 20 : Analyse RMN du tétramannoside (DP4sc) isolé du PPM de <i>S. cerevisiae</i>	80
Figure 21 : Spectres ¹ H- ¹³ C HSQC des oligomannosides neutres (noir) et acides (rouge) isolés à partir de la fraction FII du mannane de <i>S. cerevisiae</i>	82
Figure 22 : Analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF des oligomannosides neutres purifiés de la partie acido-stable du PPM de <i>C. albicans</i> (Δ BMT1)	84
Figure 23 : Analyse RMN du tétramannoside (DP4ca) isolé de la partie acido-stable du PPM de <i>C. albicans</i> Δ BMT1.	85
Figure 24 : Analyse RMN du tétramannoside (DP4 β) isolé de la partie acido-labile du PPM de <i>C. albicans</i> Δ BMT1..	86
Figure 25 : Structure des substrats de synthèse (DP3M) et (DP4M) couplés au mantyl.	89
Figure 26 : Représentation schématique de la séquence protéique codée par le gène CaBMT1 et de sa forme tronquée juste en aval du segment transmembranaire produite chez <i>Pichia Pastoris</i>	91
Figure 27 : Les étapes de la production recombinante de Bmt1p chez <i>Pichia pastoris</i>	92
Figure 28 : Production de Bmt1p chez <i>Pichia pastoris</i>	93
Figure 29 : Etude de la cinétique enzymatique de Bmt1p en présence du DP3-Mantyl	96

Figure 30 : Purification de Bmt1p par chromatographie d'échange de cation.....	136
Figure 31 : Schéma de la stratégie expérimentale suivie pour l'obtention des substrats oligomannosidiques à partir des PPMs de souches de <i>C. albicans</i> déficientes de CaBmt3.....	141
Figure 32 : Analyse par CCM des fractions acido-stable (AS) et acido-labile (AL) obtenues après hydrolyse acide et fractionnement sur Bio gel P2 des PPMs de souche de <i>C. albicans</i> déficiente de CaBmt3.....	142
Figure 33 : Analyse par CCM des oligomannosides neutres issus des PPMs de souche Δ BMT3.....	143
Figure 34 : Analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF. A ; Oligomannosides purifiés des PPMs de <i>C. albicans</i> Δ BMT3 cultivée à 37°C. Fraction composée d'oligomannosides de degré de polymérisation 5 à 8 avant (B) et après (C) traitement aux α -exomannosidases.	145
Figure 35 : Spectres protons ^1H des oligomannosides neutres DP3 et DP4 issus des PPMs de souche Δ BMT3 cultivée à 28°C.	146
Figure 36 : Analyse par CCM des substrats purifiés des PPMs de <i>C. albicans</i> Δ BMT3 cultivée à 28°C avant (T) et après (E) action des α -mannosidases.	147
Figure 37 : Structure du substrat de synthèse (DP4M-b) couplé au mantyl.....	149
Figure 38 : Analyse RMN du tétramannoside (DP4M-b)..	150
Figure 39 : Stratégie expérimentale adoptée pour la caractérisation de l'activité de CaBmt3.....	152
Figure 40 : Représentation schématique de la séquence protéique codée par le gène CaBMT3 et de sa forme tronquée juste en aval du segment transmembranaire produite chez <i>Pichia Pastoris</i>	153
Figure 41 : Analyse HPLC ; A : Substrat de synthèse (DP4M-b), B : Produit formé DP4+1 après 30 min d'incubation en présence de Bmt3p, du DP4M-b et du GDP-Man à 28°C. C : DP4+1 après action des α -mannosidases.	155
Figure 42 : Chromatogramme FPLC illustrant la purification de Bmt3p par chromatographie d'échange de cation.	156
Figure 43 : Stratégie expérimentale suivie lors de l'étude du rôle de CaBmt7.....	190
Figure 44 : Analyse des PPMs par SDS-PAGE.	192
Figure 45 : Analyse par CCM du fractionnement des parties acido-stable et acido-labile issues des PPMs de la souche de référence de <i>C. albicans</i> SC5314 cultivée à 37°C.	193
Figure 46 : Comparaison du profil des parties acido-labiles issues des PPMs Δ BMT7 et SC5314 par CCM.....	194
Figure 47 : Analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF de la fraction acido-labile issue des PPMs de la souche Δ BMT7 de <i>C. albicans</i> cultivée à 37°C.....	195
Figure 48 : Analyse RMN des parties acido-stables purifiées des PPMs des souches de <i>C. albicans</i> Δ BMT7 cultivée à 37°C (bleu) et SC5314 (noir)	196

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les principaux ligands (PAMPs) de <i>C. albicans</i> et leurs récepteurs (PRRs).	36
Tableau 2 : Les mannosyltransférases de levures impliquées dans la biosynthèse des N- et O-glycanes (PPM), qui ne présentent pas d'homologues chez l'Homme.	48
Tableau 3 : Les phénotypes exprimés par les différents mutants de N-mannosylation.	54
Tableau 4 : Les phénotypes exprimés par les différents mutants de O-mannosylation et du PLM chez <i>C. albicans</i>	55
Tableau 5 : Composition en oligomannosides neutres et phosphorylés des fractions FI à FIV.	77
Tableau 6 : Déplacements chimiques des protons et carbones (en ppm) des résidus mannosyls de quelques oligomannosides isolés.	81
Tableau 7 : Déplacements chimiques (ppm) des protons et carbones anomères des résidus mannosyls impliqués dans les diverses liaisons.	82
Tableau 8 : Structure de quelques oligomannosides phosphatés isolés à partir du PPM de <i>S. cerevisiae</i>	83
Tableau 9 : Valeurs des déplacements chimiques des protons (^1H) et carbones (^{13}C) en ppm des résidus de mannose constituant le tétramannoside (DP4 β).	87
Tableau 10 : Structure des α -oligomannosides neutres isolés à partir du PPM de <i>S. cerevisiae</i> et de la partie acido-stable du PPM de <i>C. albicans</i> de la souche déficiente en CaBmt1.	88
Tableau 11 : Valeurs des déplacements chimiques des protons (^1H) et carbones (^{13}C) (en ppm) des résidus de mannose constituant le tétramannoside synthétique (DP4M-b).	151

Table des Matières

Table des matières

Avant propos.....	5
Introduction générale.....	18
Généralités	21
Chapitre I : Les candidoses	22
I.1. Introduction.....	22
I.2. Les candidoses superficielles	22
I.3. Les facteurs de colonisation	23
I.4. Les candidoses profondes	23
I.5. Données épidémiologiques.....	24
I.6. Méthodes de diagnostic des candidoses	24
I.7. Place des candidoses au niveau des infections fongiques invasives (IFI).....	25
Chapitre II : Candida albicans.....	27
II.1. Introduction.....	27
II.2. Composition de la paroi de Candida albicans	27
II.2.1. Le phosphopeptidomannane	28
II.2.2. Les glycolipides : Phospholipomannane	29
II.2.3. La chitine et les β -glucanes	30
II.2.4. Les mannoprotéines.....	31
II.2.5. Importance des beta-mannosides.....	31
II.3. Facteurs de virulence chez C. albicans	32
II.3.1 Dimorphisme	32
II.3.2. Formation de biofilm : Résistances des levures.....	34
II.4. Reconnaissance de C. albicans par le système de l'immunité innée	34
II.4.1. Les Toll-like receptors (TLRs).....	36
II.4.2. les lectines de type C (CLRs)	38
II.4.3. Les NOD-like-receptors (NLRs)	40
Chapitre III : Glycosylation chez les levures, biosynthèse et rôle des glycoconjugués pariétaux de C. albicans	42
III.1. La Glycosylation	42
III.2. Biosynthèse des N-glycanes chez les levures.....	43
III.2.1. Introduction.....	43
III.2.2. N-glycosylation dans le réticulum endoplasmique (RE).....	43
III.2.2.1. Biosynthèse de l'oligosaccharide précurseur (Glc3Man9GlcNAc2-PP-Dol)	43
III.2.2.2. Mise en conformation des protéines néo-synthétisées	44
III.2.3. Maturation Golgienne des N-glycanes	45
III.3. Biosynthèse des O-glycanes chez les levures.....	48
III.3.1. Introduction.....	48
III.3.2. Biosynthèse des O-glycanes dans le RE et l'appareil de Golgi.....	49
III.4. Biosynthèse du phospholipomannane (PLM).....	50
III.5. Importance et rôle des N- et O-Glycanes et du PLM chez C. albicans	52
Chapitre IV : Les glycosyltransférases de levures.....	56
IV.1. Introduction	56
IV.2. Classification des glycosyltransférases : CAZY	57
IV.3. Les mannosyltransférases de levures	60

IV.3.1. Les α -mannosyltransférases	60
IV.3.2. Les β -mannosyltransférases	61
Présentation des travaux	65
Les objectifs et la stratégie de la thèse.....	66
RESULTATS	68
PARTIE A : Caractérisation de l'activité β1.2 mannosyltransférasique de CaBmt1.....	69
Introduction	70
Chapitre 1 : Obtention des substrats potentiels	70
I.1. Isolement et purification des substrats.....	70
I.1.1. Stratégie d'obtention des substrats naturels.....	71
I.1.2. Extraction des oligomannosides :.....	72
I.1.3. Purification des oligomannosides :.....	73
I.1.4. Dérivation des oligomannosides neutres	75
I.2. Caractérisation structurale :	76
I.2.1. Substrats issus de <i>S. cerevisiae</i> :.....	77
I.2.2. Substrats issus de <i>C. albicans</i> (Δ BMT1) :.....	83
I.2.3. Conclusion.....	87
I.3. Substrats de synthèse.....	89
Chapitre II : Bmt1 ; activité enzymatique <i>in vitro</i>	90
II.1. Introduction : Stratégie expérimentale	90
II.2. Production et expression de Bmt1	90
II.2.1. Choix du système d'expression : système eucaryote (<i>Pichia pastoris</i>)	90
II.2.2. Structure de CaBmt1	91
II.2.3. Etapes de production de Bmt1p	91
II.3. Etude de l'activité enzymatique de Bmt1p.....	93
II.3.1. Présentation des tests d'activité réalisés.....	93
II.3.2. Substrats synthétiques et premiers essais de cinétique enzymatique	94
II.3.3. Résumé de l'article N°2	96
II.3.4. Article N°2	98
II.4. Tests de purification de Bmt1p.....	134
II.5. Conclusion et discussion sur Bmt1p.....	137
PARTIE B : Caractérisation de l'activité β1.2 mannosyltransférasique de CaBmt3	139
Introduction : Choix de Bmt3.....	140
Chapitre I : Obtention des substrats potentiels	140
I.1. Introduction	140
I.2. Substrats naturels issus du PPM de <i>C. albicans</i> Δ BMT3.....	140
I.2.1. Isolement et purification.....	140
I.2.2. Analyse structurale des substrats naturels	143
I.2.2.1. Par spectrométrie de masse MALDI-TOF	143
I.2.2.2. Par résonance magnétique nucléaire	145
I.2.3. Analyse par CCM des substrats résistants à l'action des α -mannosidases	146
I.2.4. Conclusion.....	147
I.3. Substrat de synthèse.....	148
Chapitre II : Activité enzymatique de Bmt3p <i>in vitro</i>	152
II.1. Introduction	152
II.2. Structure de CaBmt3	153

II.3. Etude de l'activité enzymatique de Bmt3p.....	154
II.4. Purification de Bmt3	155
II.5. Résumé de l'article N°3	157
II.6. Article N°3	159
II.7. Conclusion et discussion sur Bmt3p.....	187
PARTIE C : Investigation de l'activité CaBmt7, une β-mannosyltransférase putative.....	188
1. Introduction	189
2. Stratégie expérimentale	189
3. Analyse des PPMs par SDS-PAGE.....	191
4. Purification et fractionnement des PPMs	192
5. Comparaison de la structure des PPMs	193
5.1. Parties acido-labiles	193
5.1.1. Par chromatographie sur couche mince	193
5.1.2. Par spectrométrie de masse MALDI-TOF	194
5.2. Parties acido-stables	195
6. Conclusion et perspectives de cette étude préliminaire.....	196
Discussion générale et perspectives	199
Annexe	205
Matériels et Méthodes	223
Bibliographie.....	232

Introduction générale

Introduction générale

Les infections fongiques graves identifiées à l'hôpital ont considérablement augmenté depuis les années 80, elles sont devenues aujourd'hui une préoccupation importante pour les établissements de soin étant donnés les moyens relativement pauvres de diagnostic et de traitement accessibles aux praticiens. Le nombre croissant de patients immunodéficients, dû au virus du SIDA, aux greffes ou aux interventions chirurgicales lourdes, est à l'origine de l'émergence de certains organismes pathogènes comme le champignon *Candida albicans* qui est le premier pathogène fongique de l'homme et quatrième organisme isolé le plus fréquemment dans les cas d'infections nosocomiales.

Candida albicans est un pathogène opportuniste, c'est-à-dire qu'une grande partie de la population ayant un système immunitaire fonctionnel est porteuse avec peu ou pas de symptômes. Cette levure, habituellement commensale, peut être à l'origine d'infections profondes mettant en jeu le pronostic vital.

La virulence de *C. albicans* s'explique par sa capacité à coloniser puis à envahir de nombreux tissus de l'organisme qui constituent autant de microenvironnements différents. En effet, les mécanismes sur lesquels repose son caractère pathogène font l'objet de très nombreuses études dont beaucoup concernent la paroi, siège des régulations moléculaires entre la levure et son hôte. Une bonne compréhension des mécanismes de virulence pourrait aider au traitement des infections par *C. albicans*.

La paroi de *C. albicans* est son point d'adhérence et de communication avec l'hôte. Elle a ainsi un rôle déterminant dans la pathogénicité de la levure. En effet, une des spécificités de la paroi de *C. albicans* est d'exprimer de grandes quantités de résidus mannose liés en β -1,2 : des beta-1,2 oligomannosides (β -Mans) qui sont associés à des glycoconjugués pariétaux : le phosphopeptidomannane (PPM) et le phospholipomannane (PLM) et qui sont impliqués dans l'interaction hôte-pathogène et dans les mécanismes de virulence.

En 2008, Mille *et al* ont identifié une nouvelle famille de neuf gènes (CaBMT1-9), codant pour des beta-1,2 mannosyltransférases (CaBmts) chez *C. albicans* et qui sont donc à l'origine de la biosynthèse de ces (β -Mans). L'objectif principal de mes travaux de thèse est de mieux comprendre les voies de biosynthèse de ces beta-mannosides par la caractérisation des activités enzymatiques des CaBmts et notamment la détermination de leur spécificité. A long terme, la caractérisation complète de l'activité des CaBmts sera un préalable pour la conception de nouveaux agents antifongiques ciblant la synthèse de la paroi de la levure.

La première partie de cette thèse est consacrée à une recherche bibliographique organisée en quatre chapitres afin de mieux présenter et situer les parties importantes de ce travail. Dans un premier temps, nous allons définir la nature des infections fongiques nosocomiales, les candidoses, ainsi que leurs méthodes de diagnostic. Dans un deuxième temps, nous allons présenter la levure la plus pathogène du genre *Candida*, *C. albicans*, qui est à l'origine d'environ 50% à 60% de cas de candidoses invasives et nous allons nous intéresser plus particulièrement à la composition de sa paroi cellulaire, à ses facteurs de virulence ainsi qu'à la réponse immunitaire résultante de la reconnaissance des différentes fractions glycaniques pariétales. Le troisième chapitre sera consacré à la glycosylation chez les levures, les voies de biosynthèses et le rôle des glycoconjugués pariétaux (N- et O-Glycanes et le PLM) chez *C. albicans*. Dans le dernier chapitre des généralités, nous allons évoquer les glycosyltransférases et la classification CAZy puis nous focaliser sur les β -1,2-mannosyltransférases responsables de la β -mannosylation chez *C. albicans*.

Mes travaux personnels sont présentés en trois parties. La partie A décrit la caractérisation *in vitro* de l'activité enzymatique de la β 1,2-mannosyltransférase : CaBmt1 ou Bmt1p : enzyme initiateur de la voie de biosynthèse des beta-mannosides (β -mans) du PPM de *Candida albicans*. CaBmt1 a été choisie comme modèle pour les autres CaBmts. Dans ce contexte, des oligomannosides extraits à partir du PPM de *Saccharomyces cerevisiae*, ainsi que du PPM de souche de *C. albicans* déficiente en CaBmt1 ont été purifiés et leurs structures ont été déterminées par spectrométrie de masse MALDI-TOF et par RMN. Les composés ont été utilisés, après couplage à un fluorophore, comme accepteurs potentiels pour l'enzyme recombinante Bmt1p produite au laboratoire sous forme soluble chez *Pichia pastoris*. Cette enzyme a été également testée en présence de substrats synthétiques couplés à un fluorophore. Les résultats des tests d'activités enzymatiques montrent la formation d'oligomannosides de taille supérieure, résistants à l'action d' α -mannosidases. Certains produits formés sous l'action de Bmt1p ont été purifiés et caractérisés après leurs analyses par spectrométrie de masse en mode MALDI-TOF et RMN.

La partie B de mes travaux porte sur l'étude de l'activité enzymatique de CaBmt3, une β 1,2-mannosyltransférase responsable de l'élongation des β -Mans sur les parties acido-stable et acido-labile du PPM de *C. albicans*. En effet, la caractérisation de l'activité enzymatique de CaBmt1 nous a servi de modèle car nous avons utilisé des protocoles similaires pour la caractérisation de l'activité enzymatique de CaBmt3p.

Finalement, dans la partie C, nous nous sommes intéressés à l'identification du rôle de CaBmt7 qui est une β -mannosyltransférase dont la fonction demeure inconnue, par une

approche purement structurale. En effet nous avons purifié des PPMs à partir de souches de *C. albicans* déficiente en CaBmt7 et de souche sauvage utilisée comme référence (SC5314). L'analyse de ces PPMs par spectrométrie de masse en mode MALDI-TOF et par RMN nous a permis de mettre en évidence des profils glycaniques différents entre les deux souches. Les travaux sont en cours pour l'identification de ces composants ce qui va nous orienter vers la compréhension du rôle de CaBmt7.

Une partie des travaux personnels ont fait l'objet d'articles scientifiques, rédigés en anglais, publiés ou en cours de préparation. Les manuscrits correspondants sont présentés dans les parties A (article 2) et B (article 3 en préparation) ou mis en annexe (article 1).

Généralités

Chapitre I : Les candidoses

I.1. Introduction

L'incidence des infections fongiques invasives (IFI) a nettement augmenté au cours des trois dernières décennies. Les micro-organismes fongiques opportunistes les plus souvent rencontrés lors des IFI sont les levures du genre *Candida*. Parmi les 200 espèces de *Candida* connues, les espèces pathogènes les plus fréquemment rencontrées chez l'homme sont *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei* (Odds, 2000). Cependant, l'espèce la plus pathogène est *C. albicans* qui peut provoquer des infections fongiques graves essentiellement au niveau des muqueuses digestive et gynécologique (Del Palacio *et al*, 2009). Les facteurs de risque des candidoses sont nombreux et bien connus, ils sont associés à certaines populations de patients à risque : les patients en réanimation, en particulier si leur pathologie est sévère ou la durée de séjour en unité de soins intensifs (USI) est prolongée, les grands prématurés, les transplantés, les grands brûlés et les patients ayant subi une chirurgie lourde, en particulier digestive ou urologique. Chez ces patients à risque, l'équilibre établi par la levure *C. albicans* avec la flore bactérienne et les mécanismes de défense de l'hôte est rompu ce qui peut se manifester par plusieurs formes de candidoses allant des candidoses cutanéomuqueuses aux formes invasives regroupant d'une part les septicémies et les candidoses profondes.

L'importance et la gravité des candidoses ont été sous-estimées jusqu'à ce que les grandes études épidémiologiques réalisées dans les années 1990-2000 révèlent que les levures du genre *Candida* occupaient le quatrième rang des agents infectieux en milieu hospitalier pour la fréquence, et le premier pour la mortalité (Pfaller *et al*, 1999 ; Marchetti *et al*, 2004). Selon les données de l'ODL (Observatoire des levures en Île-de-France), 40 % des cas surviennent chez des patients hospitalisés en réanimation et 18 % chez des patients ayant une hémopathie (Toubas, 2013).

I.2. Les candidoses superficielles

Les *Candida* peuvent infecter la peau ainsi que différentes muqueuses : la cavité buccale, la muqueuse vaginale et l'œsophage favorisant ainsi la survenue des candidoses superficielles qui sont des infections fongiques généralement bénignes mais récidivantes. L'une des candidoses les plus connues touchant la cavité buccale est le muguet qui affecte fréquemment le nouveau-né, les patients traités par antibiotiques à large spectre et les

personnes immunodéprimées, surtout celles atteintes du sida. Les candidoses génitales ou vulvo-vaginites sont également fréquentes et dues dans 80% des cas à l'espèce *C. albicans*.

I.3. Les facteurs de colonisation

Parmi les espèces du genre *Candida*, *C. albicans* est responsable de 50 à 60 % des candidoses invasives. La colonisation du tractus digestif par *C. albicans* et l'altération des barrières anatomiques et / ou de la flore bactérienne résidente sont d'importants facteurs favorisant (Nucci et Anaissie, 2001). La conjonction de la maladie primaire du patient et des actes médico-chirurgicaux mis en œuvre pour le traiter favorise la transition saprophyte-pathogène de la levure. La survenue des candidoses invasives s'effectue en trois étapes : l'adhésion de la levure à la surface des cellules épithéliales, l'invasion tissulaire et la dissémination hématogène. Des travaux antérieurs ont montré deux mécanismes d'invasion de cellules épithéliales buccales par *C. albicans* : un mécanisme de pénétration des levures impliquant des forces physiques liées à la filamentation, et la sécrétion par *C. albicans* d'enzymes (aspartyl protéases) (Felk *et al*, 2002), un mécanisme d'internalisation (endocytose) par la cellule impliquant les voies de la E- et N-cadhérine (Phan *et al*, 2007). Ces deux mécanismes ainsi que les étapes de la survenue des candidoses invasives seront détaillés dans la partie II.3 facteurs de virulence chez *C. albicans* (Figure 4) (Chapitre 2 pages 32-33).

I.4. Les candidoses profondes

Les candidoses profondes ou invasives sont les infections fongiques les plus graves, elles se situent actuellement au quatrième rang mondial des infections hospitalières. Elles peuvent se manifester sous plusieurs formes :

- Une candidémie : elle se définit par la mise en évidence de levures du genre *Candida* dans le sang.

- Les Candidoses invasives : c'est la colonisation d'un site anatomique stérile : un tissu ou un organe du corps tels que les reins, les poumons, le foie...

- Les candidoses disséminées : ces levures peuvent se développer et envahir plusieurs organes entraînant ainsi un taux de mortalité élevé.

1.5. Données épidémiologiques

Les études épidémiologiques concernant les candidoses profondes sont évidemment liées à l'évolution des populations de patients à risque (diabète-obésité, cancers, immunodépression liée au grand âge, etc.). De plus, les candidoses invasives surviennent généralement sur des pathologies primaires augmentant à un rythme élevé dans les pays développés. Cela donne une idée de la complexité épidémiologique.

Selon une étude réalisée par l'OLD (Observatoire des levures en Île-de-France) qui a permis de recenser et d'analyser 2 500 épisodes de candidémies dans 27 hôpitaux d'Île-de-France entre le 1er octobre 2002 et le 30 septembre 2010, 2 571 isolats ont été identifiés au cours d'un premier épisode de candidémie chez 2 507 patients. Il s'agissait majoritairement d'hommes (60%) âgés en moyenne de 60 ans et dont 48% étaient hospitalisés en unité de soins intensifs. Les 6 espèces majoritaires étaient *C. albicans* (54,1% des infections), *C. glabrata* (18%), *C. parapsilosis* (11,1%), *C. tropicalis* (9%), *C. krusei* (2,8%) et *C. kefyr* (1,7%) ; 3,3% des candidémies étaient mixtes (plusieurs espèces fongiques (**Renaudat et al, 2013**)).

Comme mentionné précédemment, *C. albicans* est considérée comme l'agent responsable globalement de la moitié des candidémies. Par ailleurs, de nombreuses études épidémiologiques soulignent l'émergence des espèces non *albicans* comme le deuxième pathogène prédominant en fonction de la localisation géographique. Par exemple, au Etats-Unis, *C. glabrata* est le deuxième agent le plus répandu (23.5%) ; en Amérique latine, les espèces prédominantes après *C. albicans* sont *C. parapsilosis* (25.6%) et *C. tropicalis* (17.0%) (**Pfaller et al, 2011**).

1.6. Méthodes de diagnostic des candidoses

Malgré les avancés thérapeutiques dans les traitements antifongiques, l'incidence et la mortalité attribuées aux candidoses invasives restent élevées en raison de la difficulté dans l'établissement d'un diagnostic précis et précoce. Dans les unités de soins intensifs, la prévalence des candidémies est de 7/1000 patients avec une mortalité attribuée de 40% alors que celui des bactériémies est de 30% (**Bougnoux et al, 2008 ; Kett et al 2011**).

Le diagnostic précoce des candidémies est essentiel pour un bon pronostic. En effet, le taux de mortalité peut passer de 10% si le traitement anti-fongique est introduit dans les 12 heures suivant le début de la candidémie à 35% lorsque le traitement est initié 48 heures après (**Garey et al 2006 ; Morrell et al 2005**). Il s'appuie sur la notion de fièvre prolongée et

résistante aux traitements antibiotiques chez des patients à risque. Initialement, le diagnostic des candidoses profondes repose sur les hémocultures qui consistent en la mise en culture d'un échantillon de sang pour l'identification de l'agent pathogène. Cependant, ce test n'est pas très sensible car 50% des cas ne sont pas détectés, de plus il faut 48h pour que la levure soit isolée (**Clancy et al, 2013**).

Les sociétés savantes d'infectiologie concernées *Infectious Diseases Society of America* (IDSA), *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* (ESCMID), *European Conference on Infection in Leukemia* (ECIL) recommandent d'utiliser les bio-marqueurs pour compenser la faible sensibilité des hémocultures ou comme alternatives à ces dernières. Actuellement ce diagnostic est basé principalement sur la détection des polysaccharides fongiques pariétaux circulants : détection des mannanes circulants par le test Platelia et des β -D-1,3-glucanes (BDG) par le test Fungitell (**Pappas et al, 2009 ; Cuenca-Estrella et al, 2012**). Platelia AgTM est une technique immuno-enzymatique indirecte en microplaque pour la détection quantitative des anticorps anti-mannane de *Candida* dans le sérum. Fungitell[®] est un dosage colorimétrique basé sur la mesure de l'activité d'enzymes, issues de la limule, en présence de BDG.

1.7. Place des candidoses au niveau des infections fongiques invasives (IFI)

La fréquence des infections fongiques a augmenté de façon considérable au cours des dernières années. Selon une étude épidémiologique conduite par **Bitar** et ses collaborateurs entre 2001 et 2010 : près de 36 000 épisodes d'IFI dus à cinq genres de champignons (*Candida*, *Aspergillus*, *Zygomycètes*, *Cryptococcus* et *Pneumocystis*) ont ainsi été identifiés. Les levures *C. albicans* et les moisissures *Aspergillus fumigatus* sont les espèces prédominantes. Cette étude a confirmé que les candidoses (candidémies) sont les infections fongiques les plus fréquentes avec une incidence moyenne de 2.5 cas pour 100 000 personnes par an et une létalité qui avoisine 40% suivie des aspergilloses invasives avec une incidence moyenne de 1.5 cas pour 100 000 personnes par an et une létalité qui avoisine 28.5% (**Figure 1**) (**Bitar et al, 2013**).

Une autre étude a montré que les infections fongiques invasives (IFI) touchent en moyenne chaque année 3 600 personnes admises à l'hôpital et que le tiers au moins en décède. La mortalité globale à 30 jours des patients atteints de candidémies est encore de 40% et, dans les aspergilloses invasives, la mortalité à 3 mois reste supérieure à 45% (**Dodds et al, 2012**).

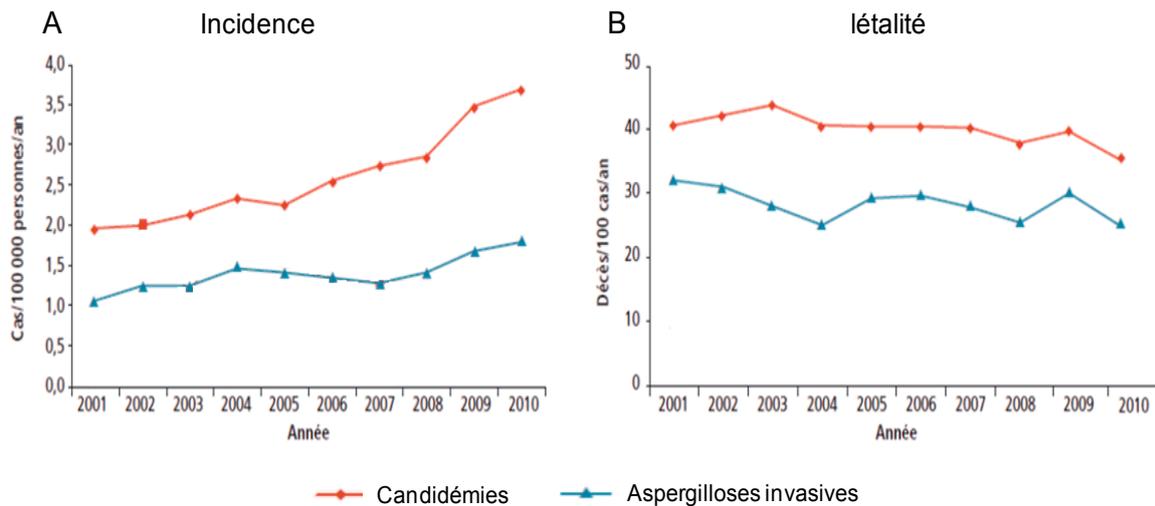


Figure 1 : Evolution des taux annuels d'incidence (A) et de létalité (B) des candidémies et des aspergilloses invasives en France depuis 2001 à 2010 (adapté de Bitar *et al*, 2013).

L'incidence croissante des IFI notamment les candidoses et aspergilloses invasives chez les patients à risque a conduit à un usage plus précoce des antifongiques. Le traitement peut ainsi être instauré avant même le développement de l'infection. Les principaux antifongiques commercialisés interfèrent avec l'ergostérol de la membrane fongique, au niveau soit de son intégrité (polyènes), soit de sa biosynthèse (azolés, allylamines), ou avec la synthèse des β -glucanes de la paroi fongique (échinocandines). L'amphotéricine B est la première molécule disponible dès 1951, elle a un très large spectre. Les premiers antifongiques azolés à usage systémique (imidazolés : kétoconazole, miconazole) ont été abandonnés avec la mise à disposition du fluconazole. La classe des échinocandines, notamment la caspofungine, est progressivement devenue la thérapeutique de référence dans le traitement des infections à *Candida*. L'itraconazole et les nouveaux triazolés (voriconazole, posaconazole) ont un spectre élargi aux champignons filamenteux, notamment *Aspergillus* (Grenouillet *et al*, 2013).

Chapitre II : *Candida albicans*

II.1. Introduction

C. albicans est une levure de la flore digestive normale humaine, pouvant dans certaines conditions s'avérer être un pathogène opportuniste responsable d'infections sévères potentiellement mortelles. Parmi les espèces les plus fréquentes du genre *Candida*, *C. albicans* est la plus pathogène, elle est responsable globalement de la moitié des candidémies.

C. albicans est un champignon unicellulaire, diploïde, asexué qui se multiplie par bourgeonnement, cette levure peut se développer sous deux formes principales : levure et mycélium (hyphe). Le génome de la souche de référence de *C. albicans* (SC5314) est séquencé et annoté, il correspond approximativement à 16Mb et code environ 6400 gènes regroupés dans huit paires de chromosomes. Il est disponible dans la base de données : (<http://www.candidagenome.org/>) (Jones *et al*, 2004). Des travaux antérieurs ont proposé de classer l'espèce *C. albicans* en deux groupes sérologiques A et B sur la base de la distribution des beta1,2-mannosides : le sérotype A représente la forme de *C. albicans* qui possède des beta1,2-mannosides sur les fractions acido-stable et acido-labile du PPM, le sérotype B possède des beta1,2-mannosides uniquement sur la partie acido-labile du PPM. Cette différence est à l'origine de la variation du degré de pathogénicité entre les sérotypes A et B et du degré de polymérisation des β -mans (Hasenclever et Mitch, 1961 ; Suzuki *et al*, 1995).

La paroi de *C. albicans* est son point d'adhérence et de communication avec l'hôte jouant un rôle déterminant dans la pathogénicité de la levure. Les composants de la paroi que nous allons décrire dans la suite de cet exposé sont impliqués dans les étapes d'invasion et dans la reconnaissance par le système immunitaire

II.2. Composition de la paroi de *Candida albicans*

La paroi de *C. albicans* est composée majoritairement de polysaccharides (90 %) et d'une faible proportion de protéine (10%). La paroi cellulaire a une distribution en deux couches principales (**Figure 2**) dans lesquelles se situent les glucides majoritaires. Les β -glucanes (polymères de D-glucose lié en β -1,3 et β -1,6) et la chitine (polymère de N-acetylglucosamine lié en β -1,4) se trouvent au niveau de la couche interne de la paroi formant ainsi un squelette microfibrillaire rigide. Différentes mannoprotéines pariétales (MP) sont liées au squelette microfibrillaire par des liaisons covalentes permettant leur association aux β -1,6 et aux β -1,3 glucanes. La surface de la paroi est recouverte de phosphopeptidomannane

(PPM), parfois abusivement appelé « mannane », constitué d'un mélange de glycopeptides hautement mannosylés (N- et O-glycosylation), et de phospholipomannane (PLM) qui est un glycolipide, dérivé du mannose-inositol-phosphocéramide. La spécificité structurale de ces mannoglycoconjugués (PPM) et (PLM) réside dans la présence de β -1,2 mannosides (β -Mans) terminaux (anométrie de liaison assez rare dans le monde vivant) impliqués dans la pathogénicité de *C. albicans*. En effet, toutes les espèces *Candida* pathogènes (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*) sont caractérisées par la présence de ces motifs de β -Mans qui sont absents chez *S. cerevisiae*. (Cantelli *et al*, 1995, Shibata *et al*, 1985 ; Kobayashi *et al*, 1992 ; Trinel *et al*, 1993 ; Fradin *et al*, 2014)

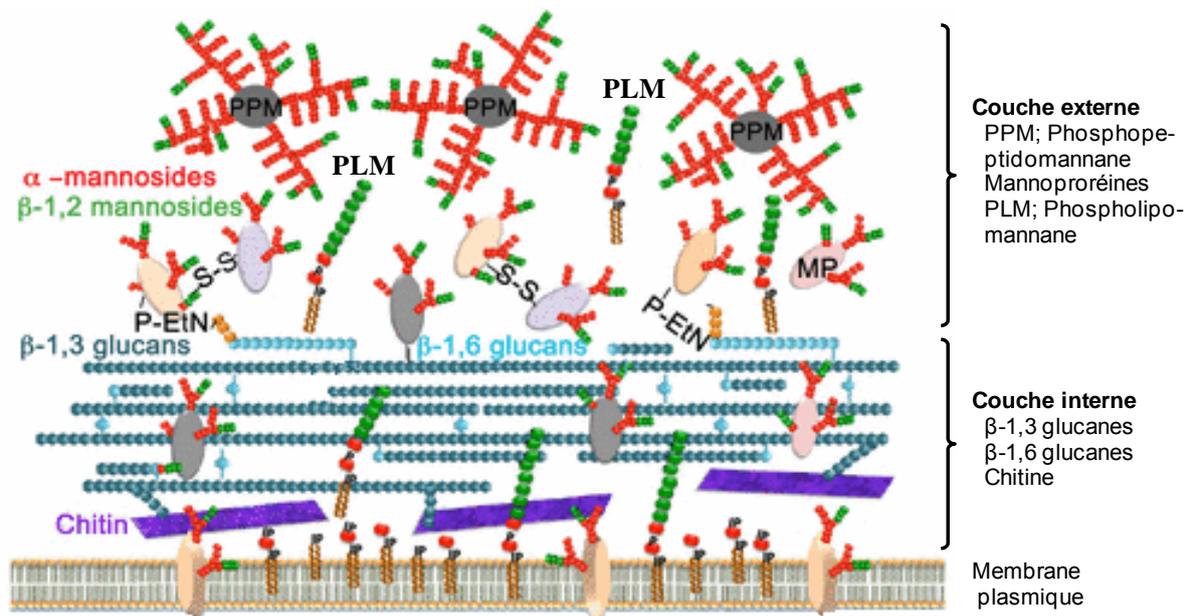


Figure 2 : Structure de la paroi de *C. albicans* (Adapté de Fradin *et al*, 2014).

II.2.1. Le phosphopeptidomannane

Le phosphopeptidomannane (PPM) est un ensemble de glycopeptides liés à la paroi de *C. albicans* d'une manière non-covalente. Le PPM est composé d'une chaîne protéique liée à un polysaccharide hautement mannosylé soit par liaison N-glycosidique sur une asparagine (N-glycane), soit par liaison O-glycosidique sur une sérine ou une thréonine (O-glycane). Au sein de la partie N-glycosylée, le PPM est composé du noyau $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ ubiquitaire chez les eucaryotes suivi d'une longue chaîne principale composée de résidus de mannose liés en α -1,6. Cette dernière est substituée par des chaînes latérales de mannoses liés en α -1,2, parfois en α -1,3 ou en β -1,2 (Shibata *et al*, 1985). Cette fraction polymannosides qui peut contenir jusqu'à 150 résidus est dite acido-stable car elle est résistante à l'hydrolyse acide

ménagée. A cette fraction stable est liée par l'intermédiaire d'une liaison phospho-di-ester, une fraction acido-labile formée d'une chaîne de mannoses liés en β -1,2 sur un résidu α -Man (**Figure 3A**) (**Trinel et al, 1997**). Par ailleurs, la partie O-glycosylée du PPM est composée uniquement de résidus mannoses liés sur une sérine ou thréonine par une liaison O-glycosidique. En effet le noyau ($\text{Man}\alpha 1\text{-2Man}\alpha 1\text{-2 Man-Ser/Thr}$) est commun à toutes les levures. Chez *C. albicans*, ce noyau peut être substitué par action des α -1,2 mannosyltransférases et des β -1,2 mannosyltransférases formant ainsi des chaînes latérales d'oligomannosides qui peuvent contenir jusqu'à 5 résidus de mannose (**Lommel et Strahl 2009 ; Fabre et al, 2014**). Quelques exemples de structure de la partie O-glycosylée du PPM vont être détaillés dans la figure N°9 du chapitre N°3 des Généralités page 50.

II.2.2. Les glycolipides : Phospholipomannane

C. albicans est également capable de synthétiser au niveau de sa paroi un glycosphingolipide complexe appelé ; le Phospholipomannane (PLM) (**Figure 3B**). La structure du PLM a été caractérisée grâce aux travaux du Dr. Trinel et de ses collaborateurs, notamment au sein de notre unité (UGSF UMR 8576) par spectrométrie de masse et par résonance magnétique nucléaire (RMN). En effet, le PLM est un glycolipide de la famille mannose-inositol-phosphocéramide (MIPC) composé d'une partie lipidique appelée « céramide » et d'une partie glycanique de type oligomannosidique. Il présente une hétérogénéité à la fois dans la partie glycanique et dans la partie céramide : la partie lipidique est composée d'un phytocéramide (phytosphingosine C18/C20 lié par son groupement hydroxyl à un acide gras (C25, C26, C24) (**Trinel et al, 1999 ; Trinel et al, 2005**). D'autre part, la partie glycanique du PLM est composée d'une chaîne de β -1,2 mannosides de degré de polymérisation pouvant aller jusqu'à 19 chez *C. albicans* de sérotype A. Les parties glycanique et lipidique sont liées *via* la séquence suivante : (Man-P-Man-inositol-P-). Le PLM de *C. albicans* de sérotype B contient des grandes quantités de phytosphingosine C20 et de β -mannotriose. La partie glycanique du PLM lui confère un caractère hydrophile qui permet au PLM de diffuser au sein de la paroi des levures (**Trinel et al, 1993 ; Trinel et al, 2002**).

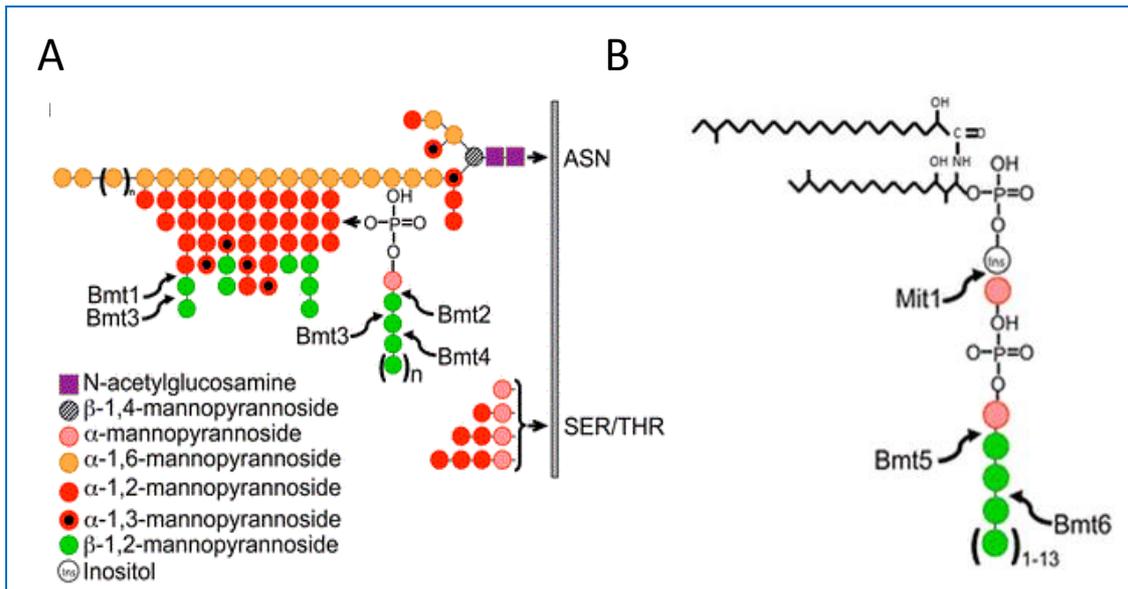


Figure 3 : Structure du phosphopeptidomannane PPM (A) et du phospholipomannane PLM (B) de *C. albicans* et implication des β -1,2 mannosyltransférases dans la biosynthèse des β -Mans (Adapté de Fradin *et al*, 2014)

La partie biosynthèse et rôle des glycoconjugués pariétaux de *C. albicans* PPM (N- et O-glycanes) et PLM sera développée dans le chapitre N°3 des généralités (**Figures 8, 9, 10**) et (**Tableaux 3 et 4**).

II.2.3. La chitine et les β -glucanes

La couche interne de la paroi de *C. albicans* est composée d'un squelette rigide de polysaccharide composé de la chitine et des β -glucanes, la chitine représente environ 2% du poids sec de la paroi tandis que les β -1,3 glucanes et les β -1,6 glucanes représentent 40% et 20%, respectivement. La chitine et les β -glucanes sont synthétisés par les chitines synthétases, les β -(1,3) et β -(1,6)-D-glucanes synthétases respectivement. Des travaux antérieurs ont montré que la quantité de chitine peut augmenter de 3 à 4 fois quand la paroi cellulaire est traitée avec la caspofongine qui est un inhibiteur de la biosynthèse des β -1,3 glucanes (**Walker *et al*, 2008**). La chitine est impliquée dans le processus de bourgeonnement des levures par son rôle dans la formation de l'anneau de constriction qui favorise la séparation de la cellule mère de la cellule fille. Les β -(1,3)-D-glucanes peuvent être libérés dans la circulation sanguine lors des infections fongiques, ils sont donc utilisés pour le diagnostic. De plus, ils peuvent être reconnus par la Dectine-1 et le récepteur du complément CR3 ce qui induit l'activation des voies de signalisation intracellulaire et la production de cytokines pro-inflammatoires.

II.2.4. Les mannoprotéines

En plus du squelette de β -glucanes et de chitine, la paroi cellulaire de *C. albicans* contient une matrice composée principalement de mannoprotéines associées à la paroi *via* des ancras GPI (glycosylphosphatidylinositol). Ces derniers sont attachés aux β -1,3 glucanes ou à la chitine par l'intermédiaire du réseau ramifié de β -1,6 glucanes. Les mannoprotéines sont hautement glycosylées par des polysaccharides contenant principalement du mannose : la partie glycanique des mannoprotéines peut représenter jusqu'à 90 % de leur poids moléculaire (**Ernst et Prill 2001**).

En plus des mannoprotéines, la paroi de *C. albicans* contient également des protéines qui sont impliquées dans la morphogénèse et le remodelage de la paroi telles que les $\text{exo-}\beta$ -(1,3)-glucanases et les chitinases, des protéases sécrétées lors de l'infection à *Candida* tels que aspartyl protéinases, des protéines associées aux changements morphologiques telles que Hwp1p, des protéines chaperones de la famille Hsp1 et des protéines indispensables pour la formation du biofilm (**Gow et al, 2013**).

II.2.5. Importance des beta-mannosides

L'analyse structurale du PPM de *S. cerevisiae* a fourni beaucoup de clefs pour comprendre la glycosylation dans les cellules eucaryotes. En effet, le PPM de *C. albicans* diffère de celui de *S. cerevisiae*, par l'existence d'un nombre plus important de chaînes latérales d' α mannosides liées en α -1,2, d'une présence très faible de mannose lié en α -1,3 ainsi que par la présence de β -1,2 mannosides (β -Mans) à la fois sur la partie acido-stable et acido-labile du PPM (**Shibata et al, 1992 ; Trinel et al, 1997 ; Cambi et al, 2008**). En effet ces caractéristiques structurales sont essentielles à la reconnaissance immunitaire.

Les β -Mans ont été décrits chez les espèces les plus pathogènes du genre *Candida* : *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii*, *C. saitoana* (**Kobayashi et al, 1992, 1994 ; Shibata et al, 1996, 2003**). De plus, le sérotype de souche de *C. albicans* est déterminé par la présence (sérotype A) ou l'absence (sérotype B) de ces résidus mannoses terminaux liés en β -1,2, appelés antigène 6 dans la fraction acide stable du PPM (**Miyakawa et al, 1992**).

De nombreux travaux ont mis en évidence l'implication des (β -Mans) dans les mécanismes de virulence des levures pathogènes du genre *Candida*. En effet, les β -Mans peuvent interférer avec le système immunitaire de l'hôte en jouant le rôle de ligand pour la galectine 3 qui s'associe avec le Toll Like Receptor 2 (TLR2) (**Jouault et al, 2006**). De plus, l'ingestion de β -Mans synthétiques entraîne, chez la souris, une forte protection de la

muqueuse digestive contre la colonisation (**Dromer et al, 2002**). En association avec des peptides issus de protéines de *C. albicans*, ces β -Mans peuvent induire la sécrétion d'anticorps (**Xin et al, 2008, 2012**). Par ailleurs, l'invalidation des gènes BMT ou encore les gènes agissant en amont tel que MIT1 qui initie la biosynthèse de la partie glycanique du PLM est toujours corrélée à une diminution de la virulence et donc du caractère pathogène de ces levures (**Fradin et al, 2000 ; Mille et al, 2004 ; Jawhara et al, 2012**).

Bien que la présence des β -1,2 mannosides chez *C. albicans* ait été identifiée dans les années 80 grâce aux travaux de Suzuki et de ses collaborateurs (**Shibata et al, 1985**), nos connaissances concernant les voies de biosynthèse de ces motifs antigéniques restent limitées. Dans ce contexte, mes travaux de thèse avaient pour objectifs la compréhension des voies de biosynthèse des β -Mans de *C. albicans*. La stratégie de l'étude sera détaillée dans la partie Résultats.

II.3. Facteurs de virulence chez *C. albicans*

II.3.1. Dimorphisme

Un des facteurs de virulence fondamental est la capacité de *C. albicans* à coloniser son hôte sous plusieurs formes : levures, pseudohyphes, hyphes (mycélium). Cette capacité de transformation d'une forme levure unicellulaire à une forme filamenteuse pluricellulaire (hyphes) est appelée « dimorphisme ». Le dimorphisme dépend de plusieurs facteurs environnementaux tels que la température, le pH, la présence de sérum, ou de N-acetylglucosamine. Ce mécanisme est observé également chez d'autres levures pathogènes telles que : *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis* et *Blastomyces dermatitidis* (**Gow et al, 2013**).

La forme hyphes contribue fortement à la virulence de *C. albicans*, en effet des travaux réalisés sur des souches de *C. albicans* incapables de produire des hyphes dans des modèles murins ont montré que ces dernières ne sont ni invasives ni virulentes *in vitro* (**Kamai et al, 2001 ; Rahman et al, 2007**).

Durant la transition commensal-pathogène chez *Candida albicans* on peut distinguer les trois étapes majeures suivantes (**Figure 4**) :

(a)- Adhésion à la surface des cellules épithéliales

L'adhésion de la levure *C. albicans* aux cellules épithéliales facilite la colonisation, cette étape peut être considérée comme la première étape dans la survenue de l'infection à *Candida*. *C. albicans* est capable d'adhérer et de se fixer à de nombreuses cellules et tissus de l'hôte (à la surface des cellules épithéliales buccales, vaginales ou digestives) grâce à des

adhésines de surface qui interagissent avec les cellules de l'hôte. Parmi elles on peut distinguer les adhésines de la famille Als : agglutinin like sequence (9 protéines Als1p-9p) et les adhésines de la famille Hwp1 : hyphal wall protein 1. L'adhérence à la surface des cellules épithéliales peut également s'effectuer par des mécanismes non spécifiques tels que des contacts physiques qui sont dus à des liaisons de type électrostatique. Les adhésines telles que (Hwp1p), agglutinin-like sequence 3 (Alg3p) sont exprimées en grande quantité lors de la formation de l'hyphe, ce qui rend cette forme plus adhérente aux cellules épithéliales par rapport à la forme levure.

(b)- Invasion tissulaire

La rupture des barrières mécaniques favorise l'invasion tissulaire par *C. albicans*. En effet, l'étape d'invasion est hyphe dépendante (caractérise la transition levure/hyphe) et elle fait intervenir deux mécanismes : l'induction de l'endocytose et l'activation de la pénétration. L'endocytose s'effectue principalement *via* des adhésines présentes à la surface des hyphes telles que Als3, qui interagissent avec des récepteurs présents à la surface des cellules épithéliales ou endothéliales de type E- et N- cadhérine. La pénétration dans les cellules de l'hôte se fait par l'extension des hyphes, la formation de vacuoles et par des forces de turgescence (Felk *et al*, 2002 ; Phan *et al*, 2007 ; Liu et Filler, 2011).

Cette étape est caractérisée par l'apparition de lésions tissulaires chez l'hôte ce qui est dû notamment à la sécrétion de plusieurs facteurs potentiels de virulence comme les enzymes hydrolytiques : les aspartyl protéinases (Saps : Secreted Aspartyl Proteinases) et les hydrolases qui vont dégrader plusieurs types de protéines de type : mucines, immunoglobulines et collagène (Martinez-Lopez *et al*, 2006 ; Dalle *et al*, 2010 ; Wächtler *et al*, 2011 ; Zhu et Filler 2010).

(c)-Dissémination par voie hématogène

La forme levure est la plus apte à s'infiltrer puis à disséminer par les fluides corporels (vaisseaux sanguins et lymphatiques) définissant ainsi les candidémies et les candidoses disséminées. La forme hyphe est responsable plutôt de l'envahissement des tissus et de la production du biofilm. Les lésions tissulaires causées par *C. albicans* provoquent généralement des candidoses superficielles sans gravité, cependant dans certains cas, ces lésions peuvent provoquer des candidoses profondes et dans le cas extrême une septicémie à *C. albicans* (les levures infectent les poumons et les viscères digestifs).

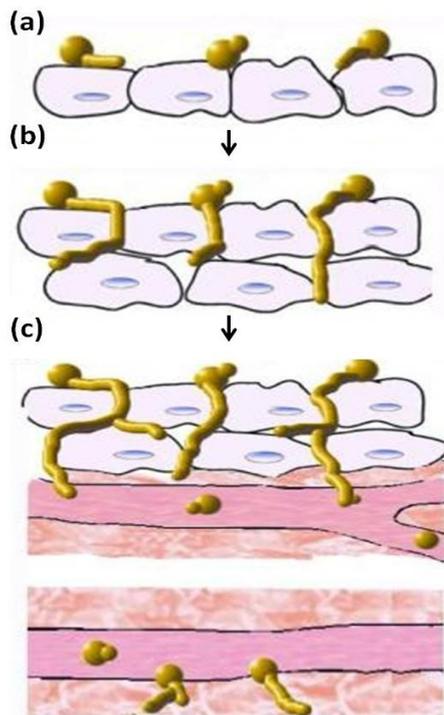


Figure 4 : Schéma des différentes étapes d'invasion des tissus par *C. albicans* :

(a) Adhésion à la surface des cellules épithéliales.

(b) Invasion tissulaire.

(c) Dissémination vasculaire et colonisation endothéliale.

(Adapté de Gow *et al*, 2013)

II.3.2. Formation de biofilm : Résistances des levures

Un autre facteur de virulence de la levure *C. albicans* est sa capacité à former le biofilm. En effet, le biofilm est composé de communautés microbiennes et fongiques, souvent symbiotiques, adhérant entre eux et à une surface. Cette structure est caractérisée par une résistance accrue aux traitements anti-fongiques, cela est dû notamment à la mauvaise diffusion des médicaments à travers la matrice adhésive et protectrice du biofilm.

De plus, les cellules organisées en biofilm expriment un phénotype différent de celui des cellules en suspension avec notamment une diminution du taux de croissance et l'expression des gènes de résistance. La combinaison des traitements antifongiques est alors nécessaire pour améliorer leur efficacité (pour exemple : chitine synthase et échinocandines) (**Ramage *et al*, 2014**).

II.4. Reconnaissance de *C. albicans* par le système de l'immunité innée

Les principales populations cellulaires impliquées dans la réponse immunitaire innée contre *C. albicans* sont les monocytes, les neutrophiles et les macrophages. Les cellules dendritiques jouent également un rôle important dans la présentation des antigènes aux lymphocytes T et donc dans l'activation de la réponse immunitaire adaptative. La reconnaissance des pathogènes se fait *via* des récepteurs appartenant à la famille des pattern

recognition receptors (PRRs) présents à la surface de ces cellules protectrices ce qui détermine ainsi la nature de la réponse immunitaire. Les principales classes de PRRs impliquées dans la reconnaissance des ligands spécifiques de *C. albicans* appelés des pathogen-associated molecular pattern (PAMPs) sont : les Toll-like receptors (TLRs) et les lectines de type C (CLRs : C-type lectin receptors) (**Figure 5**) (Netea *et al*, 2008). Par ailleurs, des travaux récents ont montré qu'un troisième type de PRRs : les NOD-like receptors (NLRs) et notamment le récepteur Nlrp3 est activé lors de l'infection par *C. albicans* (**Figure 6**).

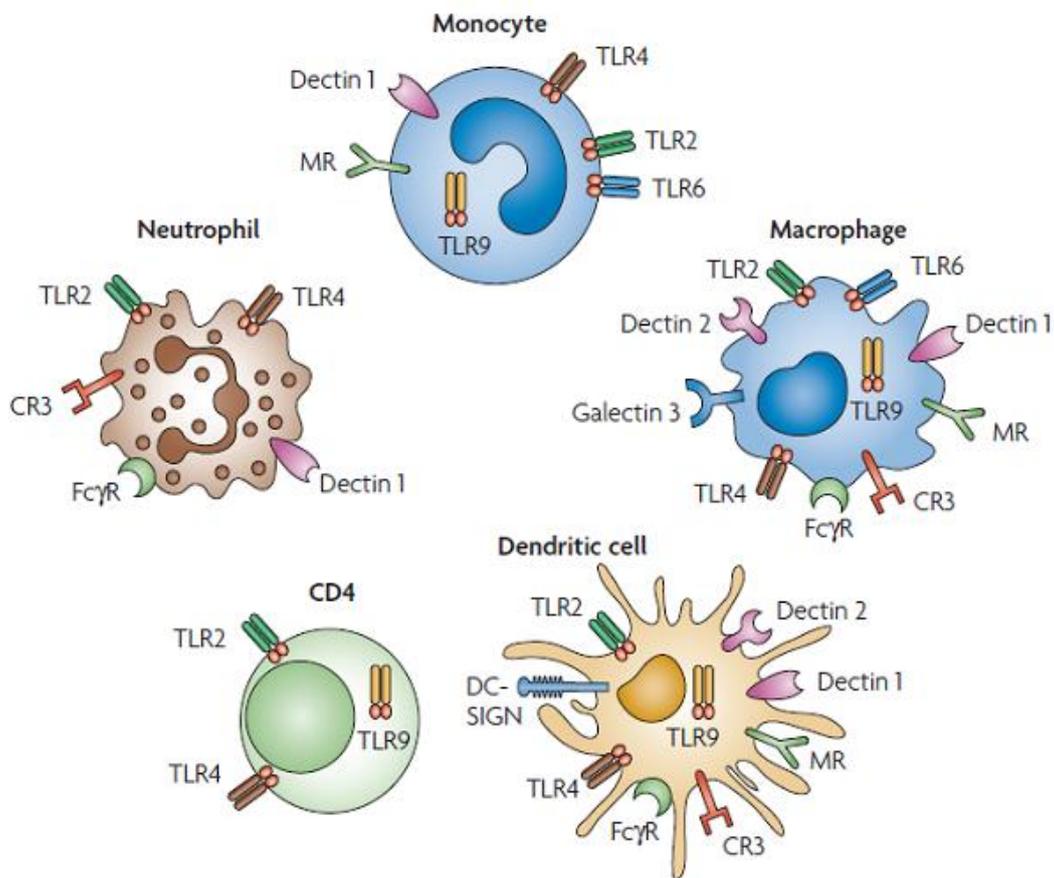


Figure 5 : Les populations cellulaires impliquées dans la reconnaissance de *C. albicans*. Ces cellules (monocytes, macrophages, cellules dendritiques, CD4 et les neutrophiles) expriment différents PRRs tels que : TLR (Toll-like receptors), les lectines de type C (telle que Dectine 1 et 2, MR (récepteur à mannose)), CR3 (récepteur du complément 3), FcγR (le récepteur Fcγ) (Netea *et al*, 2008).

Les PAMPs sont des motifs moléculaires caractéristiques des micro-organismes pathogènes. Certains composants de la paroi des bactéries et des levures pathogènes, les acides nucléiques bactériens et viraux sont les principaux PAMPs. Chez *C. albicans*, les motifs reconnus (PAMPs) par les PRRs sont majoritairement des polysaccharides : le PPM (N- et O-glycanes), le PLM, les β -Glucanes, le zymosane et les β -mannosides (**Tableau 1**).

Tableau 1 : Les principaux ligands (PAMPs) de *C. albicans* et leurs récepteurs (PRRs).

PAMPs	PRRs	références
Phospholipomannane (PLM)	TLR2	Netea <i>et al</i> , 2008 ; Cambi <i>et al</i> , 2008 ; Shibata <i>et al</i> , 2012 ; Gow <i>et al</i> , 2013 ; Jouault <i>et al</i> , 2006
PPM (O-mannane)	TLR4	
ADN fongique	TLR9	
β -1,2 mannosides	Galectine 3	Jouault <i>et al</i> , 2006 ; Devillers <i>et al</i> , 2013 ; Fradin <i>et al</i> , 2014
PPM (N-mannane)	DC-SIGN	Gow <i>et al</i> , 2013 ; Cambi <i>et al</i> , 2008
β -glucanes	Dectin-1	Netea <i>et al</i> , 2008 ; Gow <i>et al</i> , 2013
α -mannanes	Dectin-2	Sato K <i>et al</i> , 2006 ; Robinson <i>et al</i> , 2009
Des structures riches en mannose	Mincle	Wells <i>et al</i> , 2008
PPM (N-mannane)	MR	Netea <i>et al</i> , 2006 ; Van de Veerdonk <i>et al</i> , 2009

II.4.1. Les Toll-like receptors (TLRs)

Les TLR sont des récepteurs transmembranaires (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 et TLR6) ou intracellulaires (TLR3, TLR7, TLR8, et TLR9) composés d'un domaine LRR riche en leucine : (LRR : Leucine Rich Repeat Domain) responsable de la reconnaissance de ligands bactériens, fongiques (PAMPs), et d'un domaine TIR : (TIR : Toll/IL-1 receptor) responsable de l'induction de la réponse intracellulaire.

Les principaux TLRs impliqués dans la reconnaissance des PAMPs fongiques sont les : TLR2, TLR4, TLR6 et TLR 9 ils interagissent respectivement avec les Phospholipomannanes (PLM) qui sont des glycosphingolipides pariétaux, les O-Mannanes ou

(PPM) qui sont des O-glycanes oligomannosylés, le zymosane qui est un complexe de protéines et de glucides extrait de la paroi des levures contenant notamment des β -1,3 glucanes et l'ADN fongique. Ces interactions sont à l'origine de l'activation du facteur de transcription nucléaire NF- κ B par la voie de transduction MyD88 dépendante et de la production de cytokines pro-inflammatoires telles que les interleukines : IL-1, IL-6, IL-8, et IL-12 et le TNF α qui orientent le système immunitaire vers une réponse pro-inflammatoire de type Th1 (**Figure 6**) (**Gow et al, 2013**).

La reconnaissance TLR 4/ O-glycanes oligomannosylés peut également activer le facteur de transcription IRF3 (Interferon regulatory Factor 3) *via* la voie de signalisation dépendante de TRIF (Tumor necrosis factor (TNF) receptor associated factor 6) pour la transcription de gènes codants pour les interférons de type 1 (IFN- α , IFN- β et IFN- ω) (**Figure 6**).

Le rôle de TLR2 et TLR4 dans l'induction d'une réponse immunitaire anti-*C. albicans* a été mis en évidence *in vitro* chez des souris KO pour les gènes TLR2 et TLR4. Par ailleurs, le rôle des TLR6 et TLR9 dans la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires est moins important (**Netea et al, 2008 ; Cambi et al, 2008 ; Jouault et al, 2006 ; Shibata et al, 2012**)

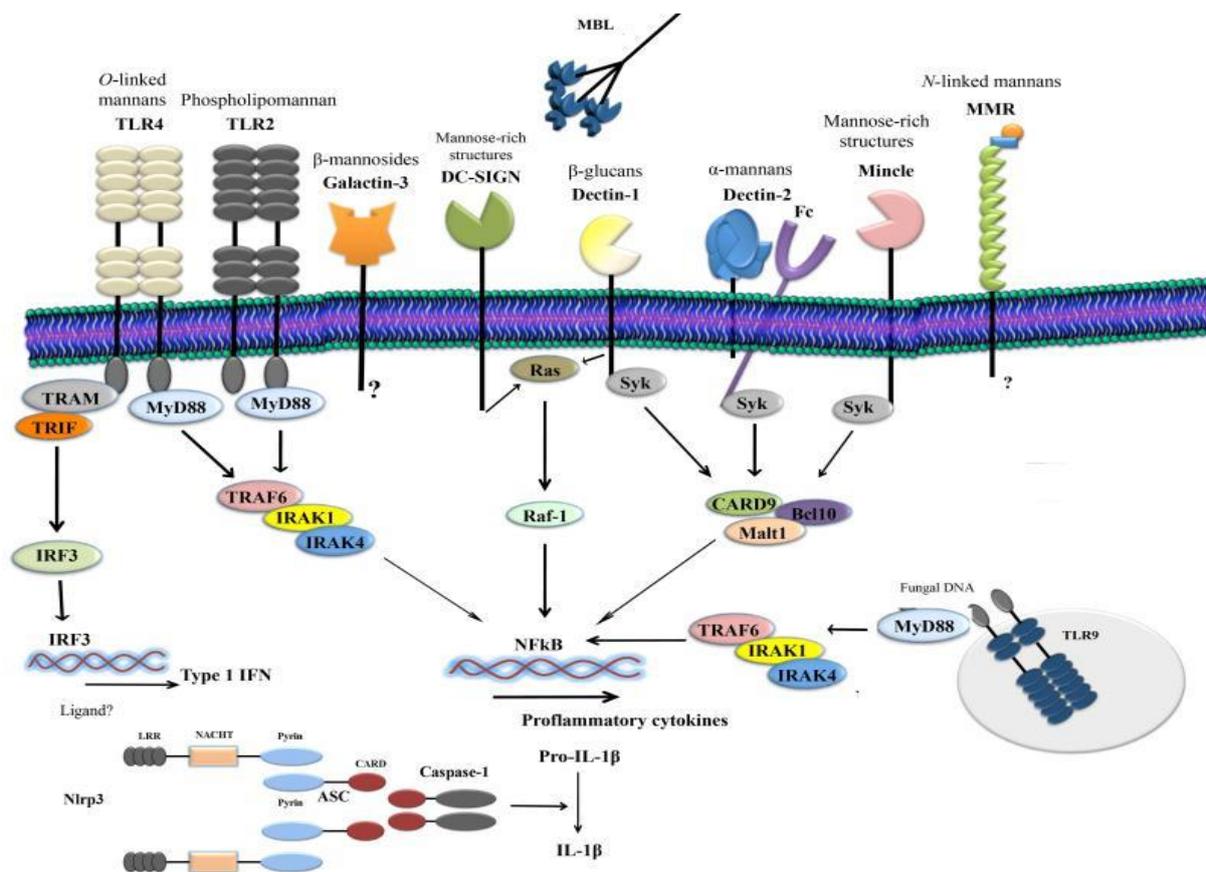


Figure 6 : Les principaux PRRs impliqués dans la reconnaissance des PAMPs de *C. albicans* et résumé des voies de signalisations intracellulaires activées (Gow *et al*, 2013).

II.4.2. les lectines de type C (CLRs)

Les lectines de type C sont des récepteurs membranaires calcium-dépendants, caractérisés par la présence d'un domaine de reconnaissance des carbohydrates ou glycanes (CRD : Carbohydrate recognition domain). Les polysaccharides pariétaux fongiques de *C. albicans* sont reconnus par plusieurs lectines de type C tel que : Dectin-1, Dectin-2, le récepteur à mannose (MR) appelé parfois (MMR), le récepteur DC-SIGN (dendritic-cell-specific intercellular adhesion molecule-3 (ICAM-3)-grabbing non-integrin), le récepteur Mincle et MBL (Mannose Binding lectin) (**Figure 5 ; Figure 6**).

La lectine dectin-1 « DC-Associated C-type lectin-1 » est exprimée au niveau des cellules myéloïdes, elle reconnaît les β -1,3-Glucanes pariétaux (polymère de D-glucose lié en β -1,3). La signalisation intracellulaire s'effectue par l'activation de la voie de signalisation NF- κ B à travers les adaptateurs moléculaires Raf-1 et CARD9. L'activation de ces voies de signalisation a pour conséquence la production de nombreuses cytokines et chimiokines pro-

inflammatoires telles que IL- 2, IL- 6, IL- 10, IL- 17, TNF- α (Netea *et al*, 2008 ; Gow *et al*, 2013).

La lectine dectin-2 « DC-Associated C-type lectin-2 » se trouve principalement à la surface des cellules myéloïdes et des monocytes. Elle reconnaît des structures riches en mannose (α -mannanes) et interagit avec le récepteur membranaire Fc gamma (Fc γ R) pour la l'activation de la voie de signalisation intracellulaire : Syk-CARD9-NF- κ B. L'activation de Dectine-2 favorise ainsi la différenciation des cellules Th17 et la production de IL-17 qui induit le recrutement des neutrophiles sur le site de l'inflammation et l'activation des lymphocytes T et B (Sato K *et al*, 2006 ; Robinson *et al*, 2009)

Le récepteur DC-SIGN : (dendritic-cell-specific intercellular adhesion molecule-3 (ICAM-3)-grabbing non-integrin) est exprimé à la surface des cellules dendritiques, il peut reconnaître les PPM (N-mannanes) de *C. albicans*. Cambi et ces collaborateurs ont montré que cette reconnaissance (DC-SIGN/PPM) est importante pour la fixation et la phagocytose de *C. albicans* par les cellules dendritiques et pour la production de cytokine pro-inflammatoire telle que IL-6 (Cambi *et al*, 2008).

La Galectine-3 :

Elle est exprimée principalement par les macrophages et considérée comme le récepteur principal des β -1,2 mannosides. En effet, par la reconnaissance spécifique des β -1,2 mannosides, la Galectine-3 est capable de distinguer *C. albicans* de *S. cerevisiae* qui n'exprime pas ces ligands. Cette reconnaissance est dépendante de l'association de la Galectine-3 avec TLR2 pour une meilleure opsonisation et endocytose des levures *C. albicans* (Jouault *et al*, 2006).

Des travaux récents ont montré que les β -1,2 mannosides du PLM de *C. albicans* de sérotype A (contenant de longues chaînes de β -1,2 mannosides jusqu'à DP19) jouent un rôle crucial dans l'activation des macrophages et la production de cytokines pro-inflammatoires telles que TNF- α et que le PLM de *C. albicans* de sérotype B (contenant des chaînes de β -1,2 mannosides jusqu'à DP10) est incapable de stimuler la production du TNF- α (Devillers *et al*, 2013).

De plus, il a été montré que le PLM de *C. albicans* de sérotype A *via* sa partie glycanique (β -Mans) favorise la formation de l'inflammasome au sein des macrophages. Ce qui est à l'origine de l'activation du processus inflammatoire (Fradin *et al*, 2014).

Le mannose récepteur (MR) :

Le mannose récepteur (MR) est exprimé à la surface des macrophages, il est impliqué dans la reconnaissance des PPM (N-mannanes) de *C. albicans*. Le MR reconnaît également du fucose et de la GlcNAc (N-Acetyl-Glucosamine). Des études *in vitro* ont montré que le MR reconnaît préférentiellement des α -oligomannosides branchés par rapport aux structures linéaires. Le MR est impliqué dans la phagocytose de *C. albicans* et dans l'activation de la réponse T_H17 ; sécrétion de IL-17 qui va activer les cellules épithéliales et les fibroblastes pour la production de peptides antimicrobiens, des métalloprotéases et les chimiokines qui vont permettre le recrutement et l'activation des neutrophiles (Netea *et al*, 2006 ; Van de Veerdonk *et al*, 2009).

Autres récepteurs :

Plusieurs autres récepteurs de la famille des C-lectines peuvent participer à la défense contre *C. albicans* tels que le récepteur Mincle et la lectine soluble MBL (Mannose-binding-lectin) qui peuvent reconnaître des structures pariétales riches en mannose (Wells *et al*, 2008). Par ailleurs, le récepteur du complément 3 (CR3) interagit avec les β -Glucanes. L'activation de l'ensemble de ces PRRs favorise ainsi l'opsonisation et la phagocytose des levures *C. albicans* (Romani *et al*, 2011).

II.4.3. Les NOD-like-receptors (NLRs)

Les NLRs (Nucleotide-binding and Oligomerization Domain (NOD)-like Receptors) sont des récepteurs intracellulaires composés de trois domaines principaux : un domaine N-terminal effecteur suivi d'un domaine NOD puis d'un domaine LRR C-terminal riche en motifs Leucine (LRR : Leucin-Rich Repeats). Les récepteurs de type NLRs ont deux fonctions principales : la reconnaissance du peptidoglycane des bactéries (NOD1 et NOD2) et l'activation de l'inflammasome.

Bien que les PRRs cytoplasmiques impliqués dans la reconnaissance des PAMPs fongiques n'aient pas encore été décrits, des études récentes ont montré que Nlrp3 qui est un récepteur de type NLRs (NOD-like-receptors) est activé lors de l'infection par *C. albicans* (Figure 6). En effet Nlrp3 favorise la formation de l'inflammasome qui est un complexe protéique macromoléculaire au sein des cellules phagocytaires telles que les macrophages et les cellules dendritiques. Lors de l'infection par *C. albicans* l'inflammasome active la caspase 1 qui va favoriser la maturation et la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires : interleukine-1 β (IL1- β) et interleukine 18 (IL18). Cette sécrétion va permettre de recruter et

d'activer les neutrophiles effecteurs de la réponse immunitaire innée (**van de Veerdonk *et al*, 2008 ; Joly *et al*, 2009 ; Said-Sadier *et al*, 2010**).

Chapitre III : Glycosylation chez les levures, biosynthèse et rôle des glycoconjugués pariétaux de *C. albicans*

III.1. La Glycosylation

La glycosylation est une modification post-traductionnelle qui consiste en un transfert d'un oligosaccharide ou d'un monosaccharide sur des protéines membranaires ou secrétées formant ainsi des glycoprotéines. La glycosylation se déroule dans deux compartiments cellulaires, l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique (RE), en plusieurs étapes qui impliquent la présence de nombreuses glycosyltransférases spécifiques. En fonction de la nature de liaison N- ou O-glycosidique, on peut distinguer deux grands types de glycosylations : La N-Glycosylation, et la O-Glycosylation. Pendant longtemps, on croyait que les N- et O-Glycosylations étaient spécifiques des eucaryotes. Cependant, des études récentes ont montré que les bactéries sont également capables de synthétiser des protéines N- et O- glycosylées (**Lommel et Strahl, 2009**).

Chez les mammifères, *Caenorhabditis elegans*, les amphibiens et les oiseaux, un autre type de glycosylation a été décrit : la C-Glycosylation qui est l'unique modification post-traductionnelle de protéines dans laquelle le résidu mannose (α -mannopyranose) est lié directement sur le carbone N°2 (C2) du tryptophane (Trp) *via* une liaison carbone-carbone (C-C) (**Hofsteenge et al, 1994**). Elle se produit au niveau du premier tryptophane d'une séquence consensus (W-X-X-W) ou (Trp-x-x-Trp) de la protéine (**Furmanek et Hofsteenge, 2000**). La C-mannosylation n'a pas été décrite chez les levures, les bactéries et les insectes (**Doucey et al, 1998**).

Contrairement aux mammifères qui synthétisent différents types de structures N- et O-glycaniques, les levures sont capables de synthétiser un seul type de structures N- et O-glycaniques de nature N- et O-oligomannosidique. *C. albicans* est capable de synthétiser des glycoconjugués pariétaux polymannosylés : les phosphopeptidomannanes (PPM) et le phospholipomannane (PLM). La spécificité de ces glycoconjugués réside dans la présence de beta-1,2 oligomannosides terminaux considérés comme des facteurs de virulence spécifiques des espèces les plus pathogènes du genre *Candida*.

Dans ce chapitre, nous allons détailler dans un premier temps les voies de biosynthèse des N- et O-glycanes (PPM) chez *C. albicans*. Dans un deuxième temps, nous allons décrire la voie de biosynthèse du PLM qui suit la voie de biosynthèse des glycosphingolipides de nature mannose-inositol-phosphocéramide (MIPC) chez les levures. Dans la troisième partie

de ce chapitre, nous allons exposer l'importance et le rôle de ces différents glycoconjugués (PPM et PLM) chez la levure *C. albicans*.

III.2. Biosynthèse des N-glycanes chez les levures

III.2.1. Introduction

Chez les levures, la voie de biosynthèse des N-glycanes (NG) a été parfaitement identifiée et caractérisée chez *Saccharomyces cerevisiae* (Lehle *et al*, 2006). Les principales étapes de la biosynthèse de NG sont conservées chez *C. albicans*. La biosynthèse des N-glycanes est initiée dans le réticulum endoplasmique (RE) et leur maturation est effectuée au niveau de l'appareil de Golgi. Ces deux étapes vont être bien détaillées dans la suite de cet exposé.

III.2.2. N-glycosylation dans le réticulum endoplasmique (RE)

Les étapes de biosynthèse des NG dans le RE sont bien conservées chez les eucaryotes, et permettent l'obtention de protéines bien conformées portant la séquence glycanique suivante : $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$. Ces processus consistent d'une part à la synthèse d'un oligosaccharide précurseur ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$) d'autre part à son transfert en bloc sur l'asparagine (Asn) d'une séquence consensus de N-glycosylation (-Asn-X-Ser/Thr-) d'une chaîne peptidique naissante par l'oligosaccharyl transférase (OST) dans la lumière du RE (Figure 7) et la mise en conformation des protéines néo-synthétisées.

III.2.2.1. Biosynthèse de l'oligosaccharide précurseur ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$)

La biosynthèse de l'oligosaccharide précurseur fait intervenir une série de glycosyltransférases codées par les gènes ALG (Asparagine Linked Glycosylation). Les premières étapes se déroulent sur la face cytosolique de la membrane du réticulum endoplasmique (RE) et impliquent la construction de l'intermédiaire ($\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$) : les monosaccharides (deux résidus N-acétylglucosamine (GlcNAc), cinq mannoses (Man)) sont ajoutés séquentiellement sur un ancrage lipidique : le dolichol-phosphate (dol-P) sous l'action des glycosyltransférases Alg7, Alg13 / 14, Alg1, Alg2, et Alg11 qui utilisent comme nucléotides sucres l'UDP-N-acétylglucosamine (UDP-GlcNAc) et le GDP-Mannose (GDP-Man) (Figure 7).

Cet intermédiaire ($\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$) subit ensuite une translocation dans la lumière du RE sous l'action de flippases (Rft1) (Hauptle *et al*, 2008 ; Rush *et al*, 2009) où

il continue sa maturation qui consiste à l'ajout de quatre mannoses et trois glucoses grâce à l'action des glycosyltransférases suivantes : Alg3, Alg9, Alg12, Alg6, Alg8, et Alg10 qui utilisent le dolichol phospho-mannose (dol-P-Man) et le dolichol phospho-glucose (dol-P-Glc) comme substrats donneurs (**Figure 7**).

III.2.2.2. Mise en conformation des protéines néo-synthétisées

Cette étape fait intervenir d'abord l'oligosaccharyl transférase (OST) qui transfère en bloc l'intermédiaire glycanique ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$) sur l'asparagine (Asn) d'une séquence consensus de N-glycosylation (-Asn-X-Ser/Thr-) d'une chaîne peptidique naissante *via* une liaison N-glycosidique (**Figure 7**). Puis le « système de contrôle qualité » se met en place afin d'assurer la bonne mise en conformation des protéines néo-synthétisées. Ce dernier fait appel dans un premier temps à deux glucosidases (Cwh41) et (Rot2) qui retirent successivement les deux glucoses terminaux ((a) et (b) dans la figure 7). Ensuite, dans un deuxième temps l'intermédiaire résultant ($\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$) va interagir avec le système Calnexine/Calréticuline (CNX/CRT) qui est associé à ERp57 jusqu'à l'acquisition d'une conformation correcte. A ce stade, on obtient la structure $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ après action de la glucosidase (Rot2) qui intervient une deuxième fois pour retirer le dernier résidu de glucose ((c) dans la figure 7) et l' α -1,2 mannosidase (Mns1) qui retire un mannose ((d) dans la figure 7).

Les protéines bien repliées portant la séquence ($\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$) vont ensuite passer dans l'appareil de Golgi *via* un transport vésiculaire afin de subir l'étape d'élongation et l'étape de glycosylation terminale.

Chez *C. albicans*, les protéines mal repliées sont reglycosylées par la glycosyltransférase (Kre5) (**Herrero et al 2004**) avant d'interagir avec les lectines réticulaires calnexine / calréticuline pour subir ensuite une nouvelle étape de déglycosylation par la glucosidase (Rot2). Ce cycle se poursuit jusqu'à ce que la protéine se replie correctement. Si ce n'est pas le cas, la protéine est dégradée *via* la voie ERAD pour (Endoplasmic Reticulum Association Degradation of Proteins (**Ellgaard et Helenius, 2003**)).

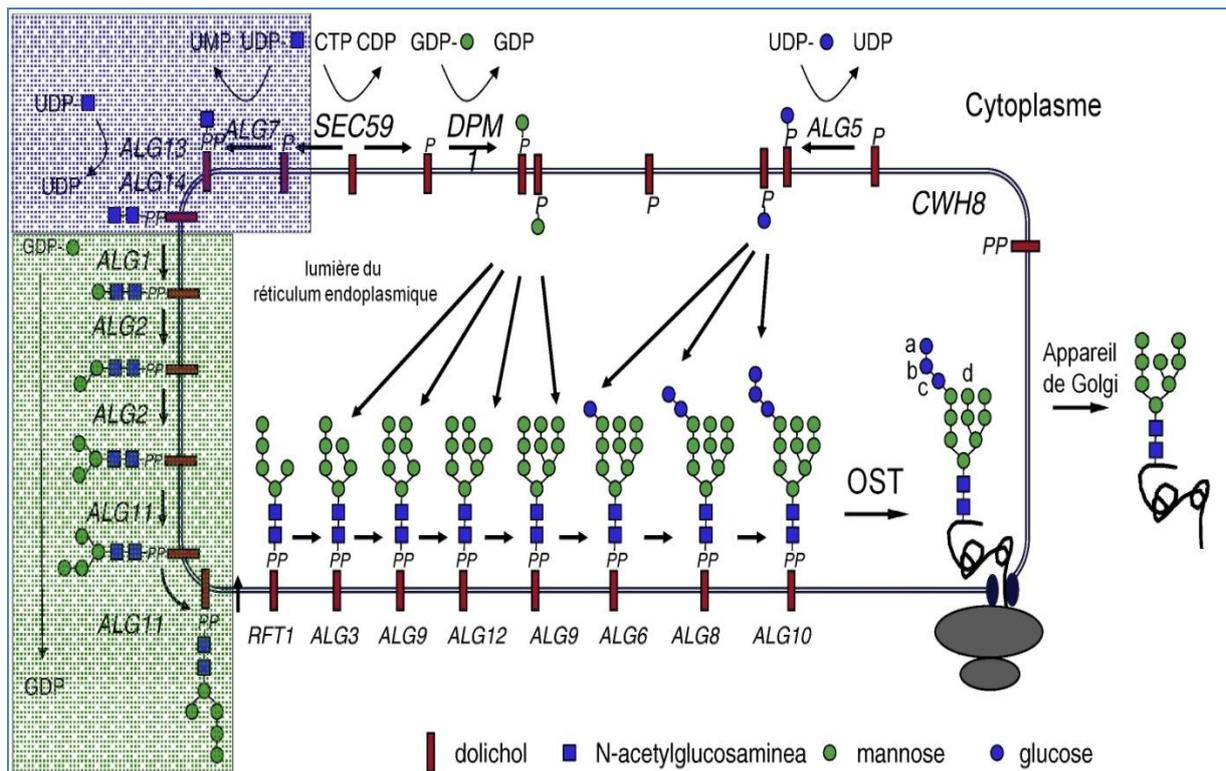


Figure 7 : Voie de biosynthèse et de maturation de l'oligosaccharide précurseur ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$) sur la face cytosolique et dans la lumière du réticulum endoplasmique (Adapté de Aebi *et al*, 2013).

III.2.3. Maturation Golgienne des N-glycanes

Chez *C. albicans* le NG $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ est modifié par des enzymes qui ne présentent pas d'orthologues chez l'Homme (**Tableau 2**). Dans un premier temps le noyau $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ est reconnu par une α -1,6 mannosyltransférase (Och1) qui ajoute le premier résidu mannose (**Bates *et al*, 2006**). Ce dernier sert de point de départ pour la synthèse de la chaîne principale d'oligomannoside qui peut contenir jusqu' à 50 résidus de mannose liés en α -1,6. Deux complexes enzymatiques, M-Pol I et M-Pol II (Mannan polymérase I et II) sont impliqués dans la biosynthèse de cette chaîne principale. M-Pol I (hétérodimère composé de Mnn9 et Van1) ajoute 3 à 7 résidus de mannose (**Rodionov *et al*, 2009**), ensuite M-Pol II (complexe multimérique composé de Mnn9, Anp1, Mnn10, Mnn11 et Hoc1) allonge la chaîne principale par l'ajout de plusieurs résidus de mannose liés en α 1-6 (**Jungmann et Munro 1998 ; Jungmann *et al* 1999**) (**Figure 8**).

Une fois la chaîne principale de mannoses liés en α -1,6 formée, la biosynthèse des chaînes latérales d'oligomannosides liés en α -1,2 et α -1,3 se fait d'une manière séquentielle sous l'action des α -1,2 mannosyltransférases Mnn2, Mnn5, Mnt5, Mnt4 et de l' α -1,3

mannosyltransférase Mnn1 (**Figure 8**). La partie acido-stable du PPM est liée à la partie acido-labile par formation des liaisons phosphodiester catalysées par deux phosphomannosyltransférases Golgiennes Mnt3 et Mnt5 (**Figure 8**) (**Mora-Montes et al, 2010**). Contrairement à *S. cerevisiae* dont la biosynthèse du PPM s'arrête à cette étape, chez *C. albicans* une étape supplémentaire de β -mannosylation caractéristique des espèces pathogènes du genre *Candida* intervient sous l'action des β -1,2 mannosyltransférases CaBmt1 et CaBmt3 sur la partie acido-stable du PPM et de CaBmt2, CaBmt3 et CaBmt4 au niveau de la partie acido-labile (**Mille et al, 2008**).

Chez les levures, l' α -1,6 mannosylation se déroule dans deux compartiments Golgiens : cis-Golgi et Golgi-médian, l' α -1,2 mannosylation s'effectue exclusivement dans le Golgi-médian, quant à l' α -1,3 mannosylation, elle a lieu également dans deux saccules Golgiens Trans-Golgi et le Trans-Golgi network (TGN) (**Brigance et al, 2000**).

La maturation golgienne des NG est à l'origine de la glycosylation terminale. En effet, c'est lors de cette étape que se produit la divergence entre les NG de levures et ceux des mammifères. Chez les mammifères, on trouve principalement des NG de types complexes, hybrides et oligomannosidiques composés d'un noyau penta-saccharidique commun ($\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$) et des antennes formées de N-acétylglucosamine, de galactose, de fucose, de mannose et d'acide sialique. Chez les levures on trouve uniquement des NG de type oligo- et polymannosidiques dont les antennes sont composées uniquement de résidus de mannoses.

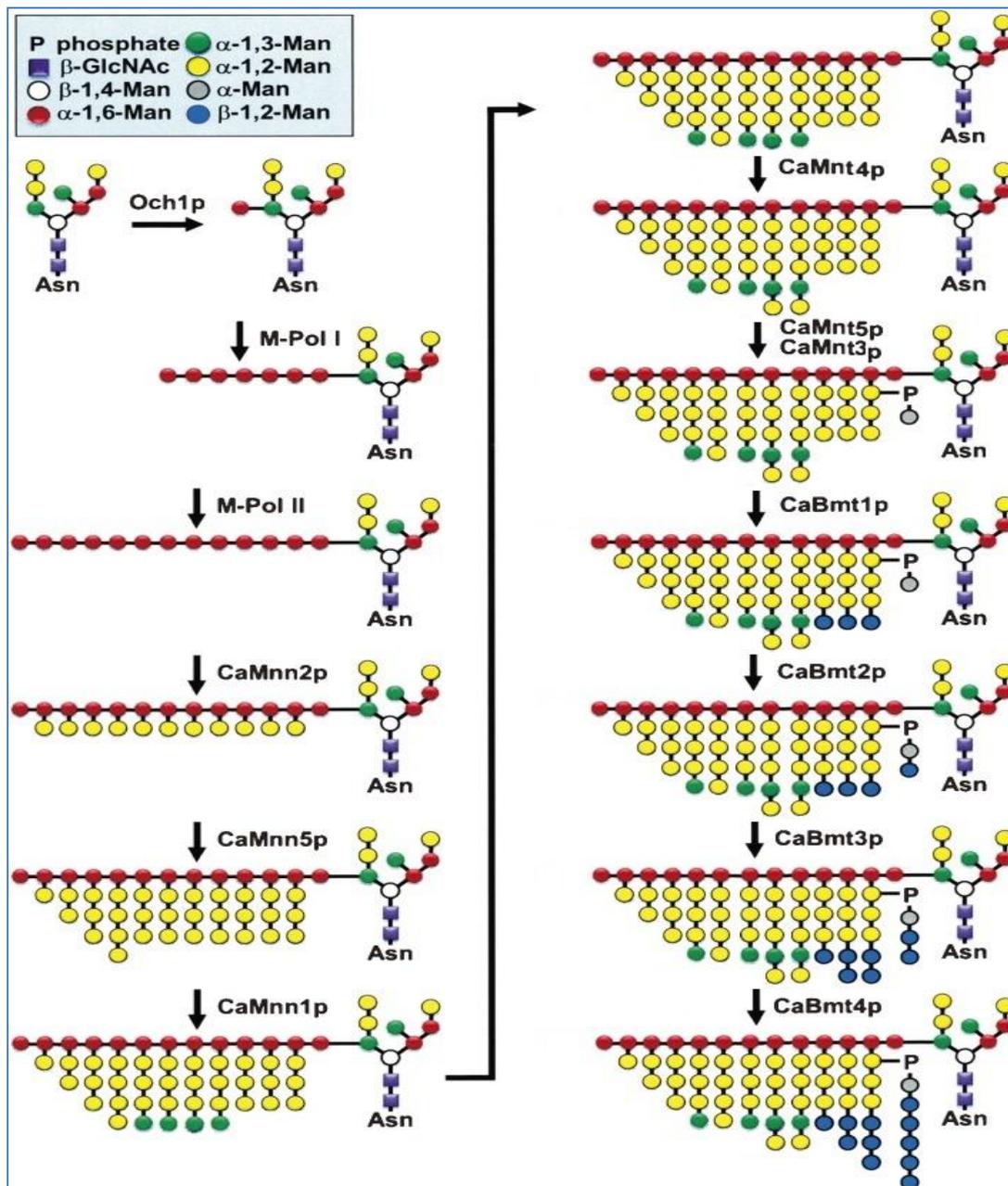


Figure 8 : Voie de biosynthèse des N-glycanes (PPM) de *C. albicans*. La partie gauche est similaire à la voie de biosynthèse du PPM de *S. cerevisiae* et la partie droite caractérise uniquement *C. albicans* (Adapté de Shibata *et al*, 2012).

Tableau 2 : Les mannosyltransférases de levures impliquées dans la biosynthèse des N- et O-glycanes (PPM), qui ne présentent pas d'homologues chez l'Homme (Adapté de Martinez-Duncker *et al*, 2014).

Fonction des protéines		Protéines
N-glycosylation	Localisation	
α 1,6-mannosyltransférase	Golgi	Och1
α 1,6-mannosyltransférase complex M-Pol I	Golgi	Mnn9 Van1
α 1,6-mannosyltransférase complex M-Pol II	Golgi	Mnn9 Anp1 Mnn10 Mnn11 Hoc1
α 1,2-mannosyltransférases	Golgi	Mnn5 Mnt4 Mnt5
α 1,3-mannosyltransférases	Golgi	Mnn1
β 1,2-mannosyltransférases	Golgi	Bmt1 Bmt2 Bmt3 Bmt4
phosphomannosyltransférase	Golgi	Mnt3 Mnt5
O-glycosylation	Localisation	Protéines
Protein O-mannosyltransférase	RE	Pmt1
Protein O-mannosyltransférase	RE	Pmt5
protein O-mannosyltransférase	RE	Pmt6
α 1,2-mannosyltransférases	Golgi	Mnt1
α 1,2-mannosyltransférases	Golgi	Mnt2

III.3. Biosynthèse des O-glycanes chez les levures

III.3.1. Introduction

La O-glycosylation est une modification post-traductionnelle bien conservée au cours de l'évolution, elle est initiée dans le réticulum endoplasmique par le transfert d'un résidu de mannose (Man) sur un groupement hydroxyl d'une serine (Ser) ou d'une thréonine (Thr) formant ainsi une liaison O-glycosidique. Les étapes d'élongations sont effectuées dans l'appareil de Golgi.

III.3.2. Biosynthèse des O-glycanes dans le RE et l'appareil de Golgi

Ce type de liaison (glycanes O-mannosylés) a été mis en évidence pour la première fois chez *S. cerevisiae* dans la fin des années 1960 grâce aux travaux de **Sentandreu et Northcote** (**Sentandreu et Northcote, 1968**), puis la voie de biosynthèse des O-glycanes a été parfaitement caractérisée quelques années plus tard toujours chez *S. cerevisiae* notamment grâce aux travaux de Tanner et de ses collaborateurs (**Tanner, 1969 ; Tanner W et Behrens, 1971**).

Chez *C. albicans*, l'étape d'initiation de la biosynthèse des O-glycanes se déroule dans la lumière du réticulum endoplasmique (RE), elle fait intervenir les mannosyltransférases de la famille PMT (Pmt1, 5 et 6) (**Tableau 2**) qui utilisent comme substrat donneur le dolichol-monophosphate mannose (Dol-P-Man). Les O-glycanes sont transportés ensuite vers l'appareil de Golgi grâce aux vésicules (COPII) (Coat protein complex II) (**Barlowe, 2000**), où ils vont subir les étapes d'élongation par les α -1,2 mannosyltransférases CaMnt1 et CaMnt2 qui peuvent ajouter jusqu'à cinq unités de mannose (**Figure 9**). En effet, le noyau trisaccharidique (Man α 1-2Man α 1-2Man α 1-Ser/Thr) est commun pour la majorité des levures, ensuite ce core est allongé en fonction de l'espèce. Chez *S. cerevisiae*, cette structure peut être modifiée par des α -1,3 mannosyltransférases. Chez *Pichia pastoris*, les O-glycanes peuvent être α 1-2-et/ou β -1,2 mannosylés. Chez *S. pombe*, un à deux résidus de galactose (Gal) peuvent être ajoutés à ce noyau pour former (Gal₀₋₂Man₁₋₃-Ser/Thr) (**Figure 9**) (**Lommel et Strahl, 2009**). Par ailleurs, chez les champignons du genre *Aspergillus*, des O-glycanes substitués par du glucose et du galactose ont été décrits (**Goto, 2007**).

Chez les levures, l'ajout des α -1,2 mannosides a lieu dans le Golgi-médian, quant à l' α -1,3 mannosylation, elle est initiée dans le Golgi-médian et se termine dans le compartiment Trans-Golgi (**Graham et al, 1994 ; Strahl-Bolsinger et al, 1999**).

Contrairement à la plupart des levures qui synthétisent principalement des O-glycanes de type O-mannosylés (O-Man), six autres types de glycanes O-liés sont trouvés chez les mammifères. Ils sont classés sur la base de la nature du premier monosaccharide attaché à la protéine : la N-acétylgalactosamine (GalNAc), la N-acétylglucosamine (GlcNAc), le galactose, le xylose, le glucose et le fucose (**Martínez-Duncker et al, 2014**).

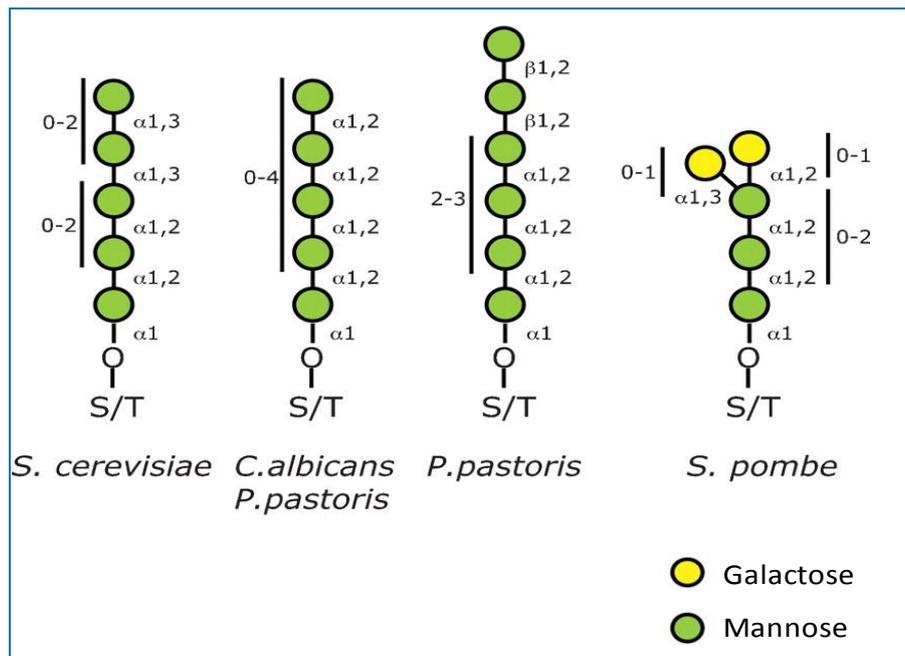


Figure 9 : Schéma représentatif de la biodiversité des O-mannosyl glycanes chez les levures (Adapté de Lommel et Strahl, 2009).

III.4. Biosynthèse du phospholipomannane (PLM)

Le phospholipomannane (PLM) de *C. albicans* est un sphingolipide composé d'une partie lipidique de type phytocéramide et d'une partie glycanique de type β -1,2 oligomannosidique reliées entre elles *via* un motif Mannose-Phosphate-Mannose-Inositol-Phosphate (Man-P-Man-Ins-P).

La partie lipidique est synthétisée dans le réticulum endoplasmique (RE). Le phytocéramide résultant est transporté vers l'appareil de Golgi par un transport antérograde qui fait intervenir les vésicules (COPII) et par un transport non vésiculaire *via* le contact entre les membranes du RE et du Golgi (Fradin *et al*, 2014). La biosynthèse de la partie glycanique s'effectue dans l'appareil de Golgi, en effet, la voie de biosynthèse du PLM suit la voie de la biosynthèse des sphingolipides chez les levures jusqu'à l'étape de l'obtention d'un mannose-inositol-phosphocéramide (MIPC) (Figure 10).

Chez la plupart des levures l'étape finale de biosynthèse des glycosphingolipides consiste en l'ajout d'un inositol-phosphate sur le (MIPC) pour former (M(IP)₂C) (Figure 10 A). Chez *C. albicans* la biosynthèse du PLM diverge par l'addition d'un mannose-phosphate (Man-P) sur le (MIPC) et d'une longue chaîne de β -1,2 oligomannosides sous l'action des β -1,2 mannosyltransférases CaBmt5 et CaBmt6 (Figure 10 B) (Trinel *et al*, 2002 ; Mille *et al*, 2004, 2012).

Le PLM est un glycosphingolipide spécifique de certaines levures du genre *Candida*, outre *C. albicans*, on le trouve également chez *C. tropicalis*, *C. stellatoidea* et *C. dubliniensis* (Cantelli *et al*, 1995 ; Trinel *et al*, 1999). Il est caractérisé en particulier par sa forte hétérogénéité structurale, à la fois dans la composition de la partie lipidique et le degré de polymérisation (DP) de la partie glycanique qui peut atteindre 19 Man. De plus, la partie glycanique est composée exclusivement de β -1,2 Mannose (Trinel *et al*, 2005).

Chez les mammifères, la voie de biosynthèse des sphingolipides diverge dès la première étape par rapport aux levures puisque la partie lipidique est composée d'une sphingosine et non pas d'une phytosphingosine comme c'est le cas chez les levures. Chez les mammifères on trouve des sphingolipides complexes de type gangliosides, cerebrosides et sphingomyeline.

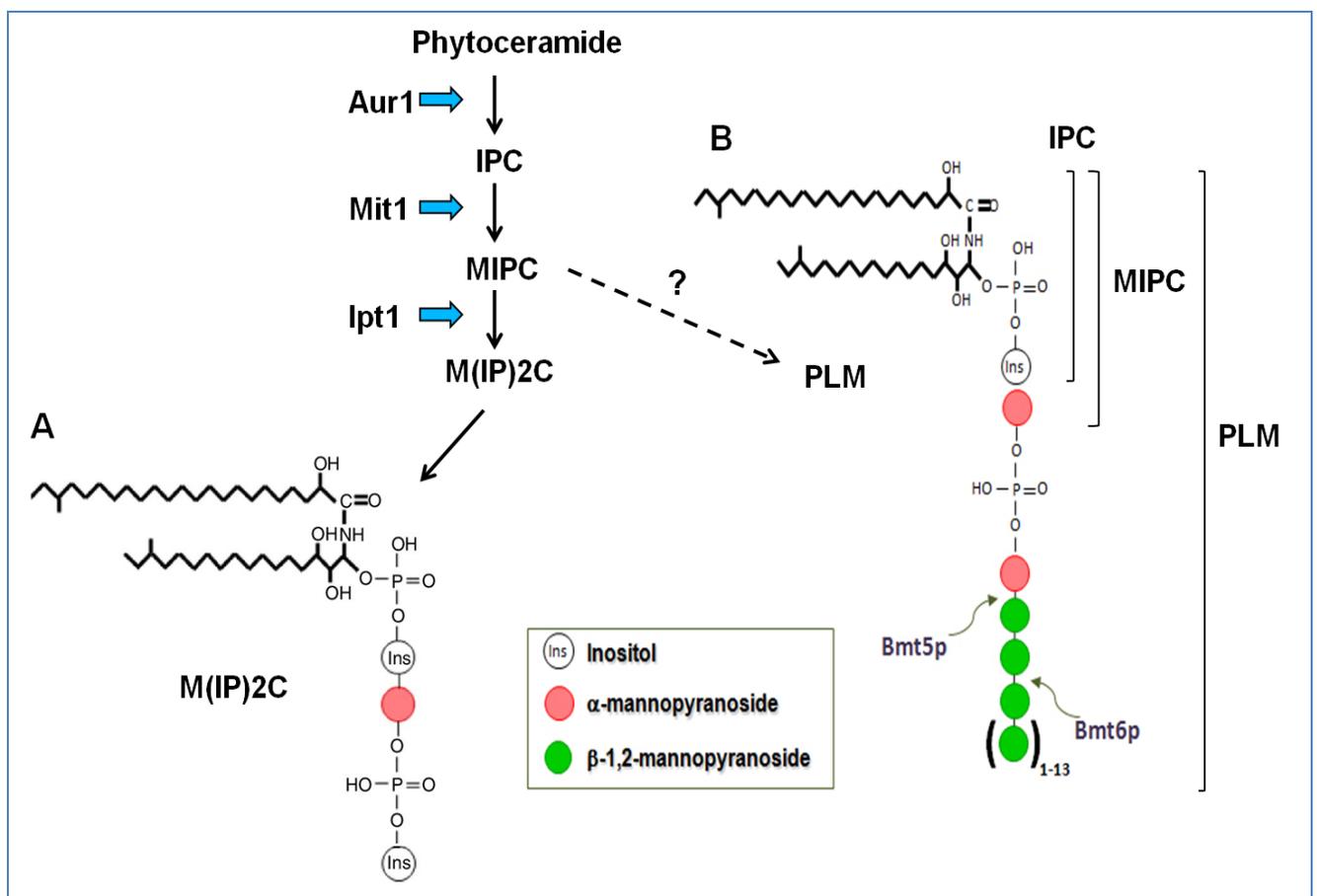


Figure 10 : Voie de biosynthèse des glycosphingolipides chez les levures (A) et du phospholipomannane (PLM) chez *C. albicans* (B). IPC ; inositol-phosphocéramide, MIPC ; mannose-inositol-phosphocéramide (Adapté de Mille *et al*, 2012).

III.5. Importance et rôle des N- et O-Glycanes et du PLM chez *C. albicans*

La construction d'une série de souches déficientes pour une ou plusieurs mannosyltransférases impliquées dans les étapes de biosynthèse des glycoconjugués pariétaux de *C. albicans* a permis de mettre en évidence les phénotypes exprimés par ces différents souches et de comprendre ainsi le rôle des PPM et PLM dans la virulence, la croissance, la composition de la paroi cellulaire, la morphologie, l'adhérence, la formation du biofilm ainsi que la réaction immunitaire résultante de l'interaction hôte-pathogène chez *C. albicans*. L'interaction des composants de la paroi de *C. albicans* avec le système immunitaire a été détaillée à la fin du chapitre 2 des généralités de la thèse. **Les tableaux 3 et 4** résument les phénotypes exprimés par les différents mutants de mannosylation chez *C. albicans*.

Les N-glycanes (PPM) sont des glycoconjugués essentiels de la paroi de la levure *C. albicans*. En effet, de nombreuses études ont montré que des défauts de glycosylation dans les étapes d'initiation de la biosynthèse ou d'élongation des PPM (Δ CWH41, Δ OCH1, Δ MNN9, Δ MNN2) peuvent engendrer une diminution du taux de croissance, l'altération de la capacité à subir un dimorphisme, une modification de la composition de la paroi de la levure (diminution de la teneur en PPM et augmentation de la quantité de β -glucanes et de chitine) ainsi qu'une virulence atténuée dans des modèles murins (**Tableau 3**) (**Mora-Monte et al, 2007 ; Bates et al, 2006 ; Murciano et al, 2011 ; Sheth et al, 2011 ; Southard et al, 1999 ; Bai et al, 2006 ; Hall et al, 2013**).

Par ailleurs, la délétion des gènes responsables de la β -mannosylation terminale (Δ BMT1-9) n'a pas d'effet significatif sur la croissance et la morphologie des levures (**Tableau 3**). L'importance des β -1,2-mannosides dans la virulence attribuée à *C. albicans* a été exposée dans la partie II.2.5 du chapitre 2 des Généralités.

De plus, des travaux antérieurs sur des souches de *C. albicans* mutantes en (Δ MNT3, 5), gènes codant pour des phosphomannosyltransférases responsables de l'initiation de la biosynthèse de la partie acido-labile des PPM et (Δ MNT4), gène codant pour une α -1,2 mannosyltransférase responsable de l'élongation des chaînes latérales des PPM, ont montré que l'absence de ces enzymes affecte directement la composition de la paroi, la virulence et la croissance des levures. En effet, ces souches de *C. albicans* (Δ MNT3-5) présentent une augmentation de la teneur en chitine et une exposition des β -glucanes à la surface de la paroi ce qui affecte la reconnaissance de la surface cellulaire par le système immunitaire et donc la production des cytokines. L'inactivation de ces enzymes engendre également des taux de

croissances faibles et une virulence atténuée de la levure *C. albicans* (**Tableau 3**) (**McKenzie et al, 2010 ; Mora-Montes et al, 2010**).

Chez l'homme, au niveau de la cavité buccale les micro-organismes forment des communautés appelées biofilms. *C. albicans* est un champignon qui se trouve souvent au sein de ces biofilms. Des études récentes ont montré que la délétion des gènes (Δ PMT1-4), responsables de l'initiation de la O-mannosylation, et des gènes (Δ MNT1 et Δ MNT2), responsables de l'élongation des O-Glycane, affecte d'une part la capacité de ces levures à former le biofilm, et d'autre part leur capacité d'adhésion aux cellules épithéliales ainsi que leur virulence (**Tableau 4**) (**Murciano et al, 2011 ; McKenzie et al, 2010 ; Sheth et al, 2011**).

Le PLM n'est pas essentiel à la survie de *C. albicans*, en effet l'inactivation du gène *MIT1* impliqué dans la voie de biosynthèse du PLM n'a pas d'effet apparent sur la survie et la croissance de la levure *in vivo*. Cependant, l'absence du PLM et notamment ses β -1,2 mannosides diminue la virulence de *C. albicans* dans des modèles animaux (**Tableau 4**) (**Mille et al 2004**). Cependant, le PLM est capable de moduler le système immunitaire en favorisant la survie des levures *C. albicans* après phagocytose par la dérégulation de la phosphatase MKP-1 (mitogen-activated protein kinase-1) qui contrôle cette voie de transduction du signal ERK1/2, activée lors de la phagocytose des levures par les macrophages. En effet, le PLM inhibe la voie ERK ce qui induit l'apoptose des macrophages et la survie de *C. albicans* (**Ibata-Ombetta et al, 2003**).

Tableau 3 : Les phénotypes exprimés par les différents mutants de N-mannosylation chez *C. albicans*. Adapté de Hall et Gow, 2013.

	Gènes	Activité	Phénotype des mutants					Références
			Croissance	Composition de la paroi	Morphologie	Adhésion	Virulence	
N-mannane	CWH41	Retrait du premier résidu Glc dans le RE	↓ croissance	↓NG (PPM) ↓ β-Glucanes ↑Chitine ↑Protéines	↓ hyphe		↓modèle murin	Mora-Monte <i>et al</i> , 2007
	OCH1	Addition du premier Man α1-6	↓ croissance ↑Taille des levures ↓Division cellulaire	↓NG (PPM) ↑Chitine ↑β-Glucanes	↓ hyphe	↓Adhésion aux cellules épithéliales	↓ modèle murin	Bates <i>et al</i> , 2006; Murciano <i>et al</i> , 2011; Sheth <i>et al</i> , 2011.
	MNN9	Elongation de la chaîne principale de Man α1-6	↓ croissance	↓NG (PPM)	↓ hyphe	↓Adhésion aux cellules épithéliales		Southard <i>et al</i> , 1999; Murciano <i>et al</i> , 2011.
	MNN2	Addition du premier Man α1-2 sur le core Man α1-6	↓ croissance	↓NG (PPM) ↑Chitine	↓ hyphe		↓ modèle murin	Bai <i>et al</i> , 2006; Hall <i>et al</i> , 2013
	MNN1	Addition des Man α1-3 terminaux	Normal	Normal	Normal		Normal	Bates <i>et al</i> , 2013
	BMT1-9	β-mannosylation terminale	Normal	Normal	Normal	↓Adhésion aux cellules épithéliales	↓ modèle murin	Mille <i>et al</i> , 2008, 2012 Jouault <i>et al</i> , 1995, 2006 Fradin <i>et al</i> , 2000
	MNT3-5	-Initiation de la phospho-mannosylation et élongation des chaînes latérales en α-1,2	↓ croissance	↓NG (PPM) ↑Chitine ↑β-Glucanes	Normal	↓Adhésion aux cellules épithéliales	↓modèle murin	McKenzie <i>et al</i> , 2010 ; Mora-Montes <i>et al</i> , 2010

Tableau 4 : Les phénotypes exprimés par les différents mutants de O-mannosylation et du PLM chez *C. albicans*. Adapté de Hall et Gow, 2013.

	Gènes	Activité	Phénotype des mutants					Références
			Croissance	Composition de la paroi	Morphologie	Adhésion	Virulence	
O-mannane	PMT1-4	Initiation de la O-mannosylation	↓Formation de biofilm ↓croissance	↓NG (PPM) ↑β-Glucanes	↓ hyphe	↓Adhésion aux cellules épithéliales	↓modèle murin	Murciano <i>et al</i> , 2011
	MNT1-2	Elongation par ajout de Man α-1,2	Incapacité d'effectuer la division cellulaire ↓Formation de biofilm	↓O-Glycanes (dans le cas du double mutant)	↓ hyphe (dans le cas du double mutant)	↓Adhésion aux cellules épithéliales	↓modèle murin (dans le cas du double mutant)	McKenzie <i>et al</i> , 2010; Sheth <i>et al</i> , 2011
PLM	MIT1	Ajout du premier α-Man sur la partie lipidique	Normal	Pas de PLM ↓β-Mans sur le N-mannane	Normal	↑ Sensibilité à la phagocytose	↓modèle murin	Mille <i>et al</i> , 2004 Ibata-Ombetta <i>et al</i> , 2003

Chapitre IV : Les glycosyltransférases de levures

IV.1. Introduction

Les glycosyltransférases (GTs) sont des enzymes qui catalysent le transfert d'un résidu monosaccharidique vers un substrat accepteur formant ainsi une liaison glycosidique. Le substrat donneur est souvent un nucléotide-diphosphate sucre tel que le (GDP-Mannose ou l'UDP-galactose). Néanmoins des nucléotides monophosphate sucres (CMP-NeuAc) et des lipides phosphates (dolichol-phosphate-oligosaccharides) peuvent aussi être utilisés comme substrat donneur. Le substrat accepteur peut être de nature chimique variable tel que les oligosaccharides, lipides, acide nucléiques et de nombreuses petites molécules comme les antibiotiques, flavonoïdes, stéroïde. Le produit de la réaction peut être à l'origine de nombreuses fonctions biologiques allant de la structure jusqu'à la signalisation. Les GTs sont ubiquitaires, elles sont présentes chez les procaryotes et chez les eucaryotes au sein de différents compartiments cellulaires. Chez les eucaryotes, les réactions de glycosylation s'effectuent principalement dans le RE et l'appareil de Golgi.

La majorité des GTs sont des glycoprotéines transmembranaires de type II localisées au niveau de l'appareil de Golgi, composées d'un court domaine cytoplasmique du côté N-terminal suivi d'un domaine transmembranaire hydrophobe puis d'une tige peu structurée et enfin d'un domaine catalytique globulaire du côté C-terminal golgien (**figure 11 A**) (**Breton et Imberty, 1999**). Il existe également des GTs de type III avec des domaines transmembranaires multiples, situées dans le RE et utilisant comme substrat donneur le Dol-P-monosaccharide, telles que les enzymes qui participent à la N-glycosylation (Alg 12, Alg 9, Alg3,...) (**figure 11B**). Chez les champignons, il existe des GTs de type III au niveau de la membrane plasmique ex : les glucan-synthase et chitine synthase.

Les gènes codant pour ces enzymes représentent environ 1 à 2 % du génome des organismes. Chez l'homme, il y a environ 230 gènes qui codent pour les GTs (**Lairson *et al*, 2008**)

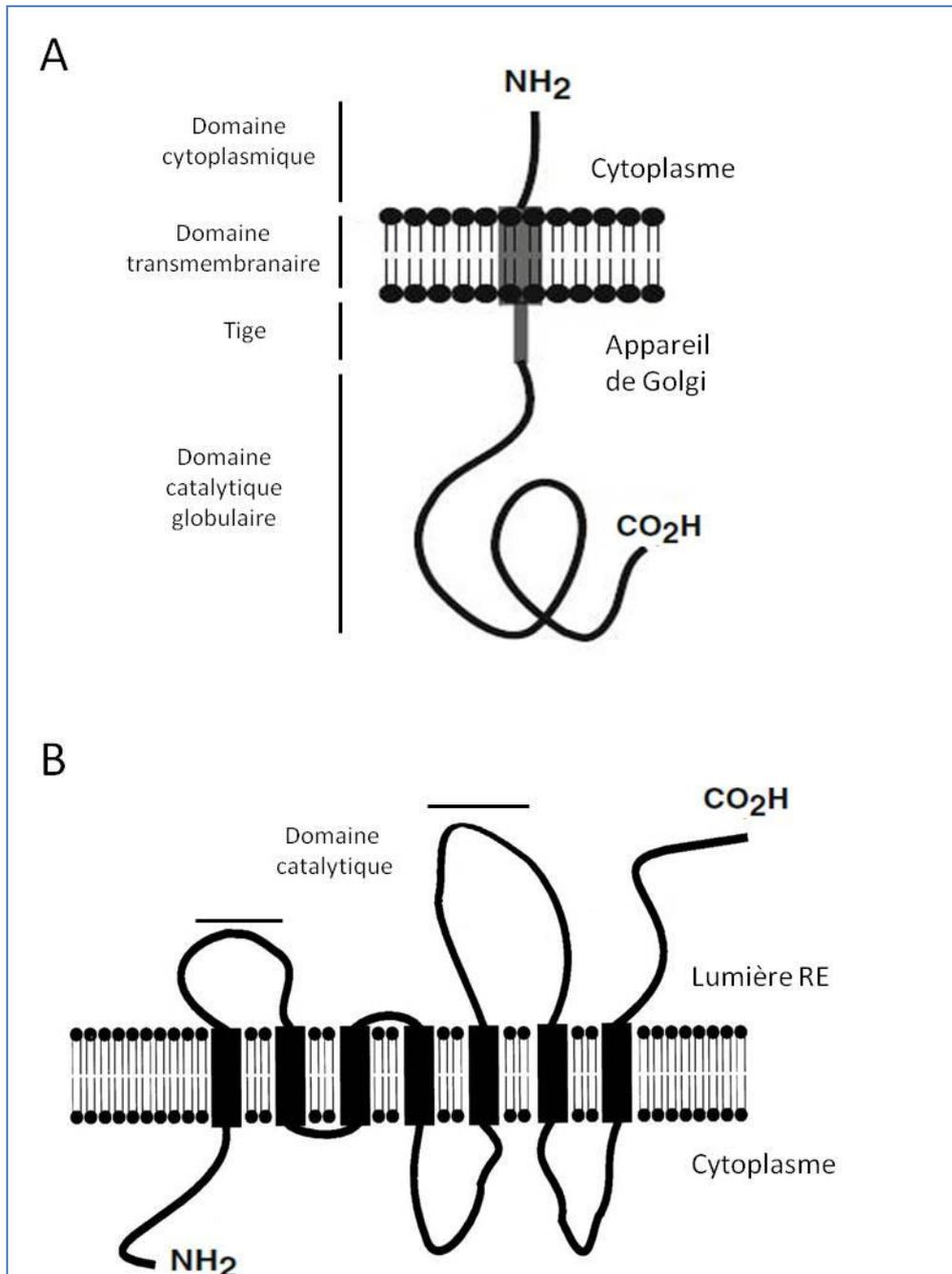


Figure 11 : Organisation modulaire des glycosyltransférases de type II (A) et de type III (B). Adapté de Breton et Imberty, 1999.

IV.2. Classification des glycosyltransférases : CAZY

De nombreuses GTs ont été identifiées au cours des deux dernières décennies grâce notamment aux avancées dans les domaines de la bio-informatique, les stratégies de clonage et le séquençage de nombreux génomes.

Les GTs sont classées en familles en fonction des similitudes dans leur séquence d'acides aminés, le type de repliement et le mécanisme enzymatique (**Campbell et al 1997**) ; (**Coutinho et al 2003**). Cette classification est tenue à jour dans la banque de données CAZy (Carbohydrate Active enZYmes) disponible sur le site web (<http://www.cazy.org/>). Au moment de la rédaction de ce manuscrit, c'est-à-dire dix-sept ans après les travaux de Campbell et de ses collaborateurs le nombre des familles de GTs est passé de 27 à 96 nommées GT1 à GT96, avec environ 157196 séquences composant cette base de données et 3118 séquences qui ne sont pas encore classées. Le nom des GTs est dépendant de la nature du monosaccharide transféré et de la nature du substrat accepteur qu'elles reconnaissent.

a-Le repliement des GTs

Les informations structurales disponibles actuellement pour 38 familles de GTs ont révélé la présence de deux types de repliements majeurs chez les GTs nommés GT-A et GT-B qui ont été observés chez toutes les GTs nucléotides-phospho-sucres dépendantes dont la structure 3D a été résolue (**Unligil et Rini, 2000** ; **Hu et Walker, 2002**). De plus, l'utilisation de logiciels de prédiction du repliement des enzymes a montré que la majorité des GTs non caractérisées sont prédites pour adopter un de ces deux repliements (**Bourne et Henrissat, 2001**)

Le repliement GT-A a été décrit pour la première fois chez l'enzyme SpsA (GT2) de *Bacillus subtilis* dont la structure 3D a été résolue (**Charnock et Davies, 1999**). Il est formé par l'association de deux domaines Rossmann-like $\beta/\alpha/\beta$ (feuillet β / hélice α / feuillet β) juxtaposés et étroitement liés (**Figure 12a**) (**Gloster, 2014**). La plupart des enzymes GT-A possèdent le motif Asp-X-Asp ou (DXD) connu pour interagir avec les cations divalents : principalement Mn^{2+} , Mg^{2+} (**Wiggins et Munro, 1998** ; **Breton et al, 1998**).

Le repliement GT-B consiste en deux domaines Rossmann-like $\beta/\alpha/\beta$ séparés, liés par une région « linker » flexible, le site catalytique se situant entre les deux domaines. Ce type de repliement a été mis en évidence initialement chez la β -glucosyltransferase du phage T4 (**Vrielink et al, 1994**), les membres de cette famille présentent des séquences bien conservées notamment au niveau du domaine C-terminal où se trouve le domaine de liaison aux nucléotides (**Figure 12b**).

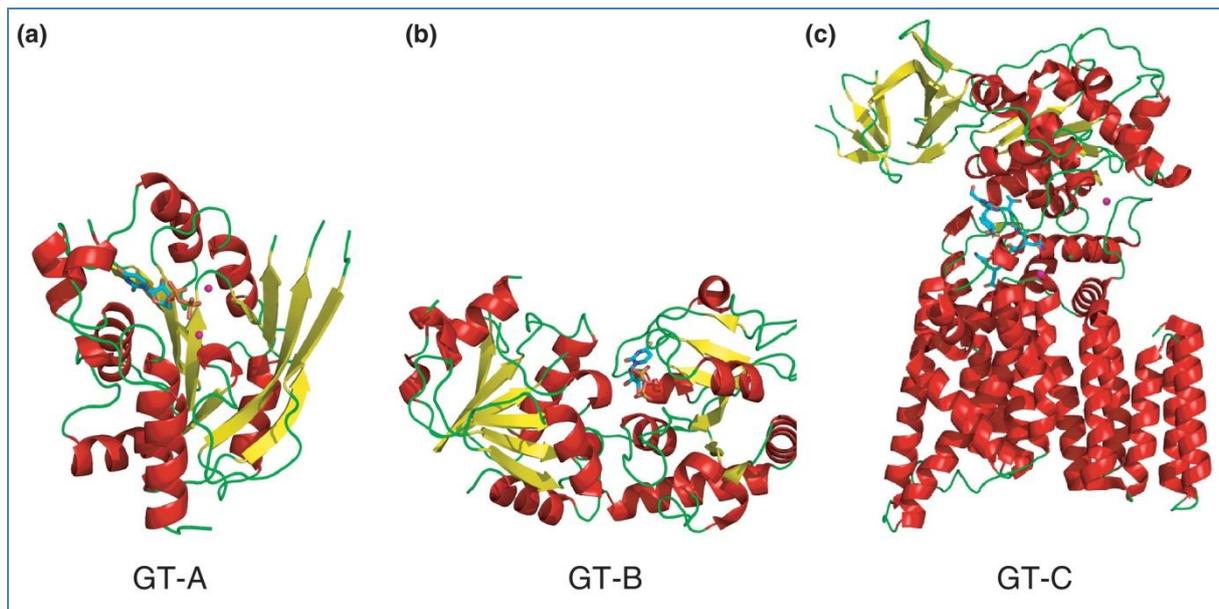


Figure 12 : Le repliement global observé chez les glycosyltransférases : a ; GT-A, b ; GT-B, c ; GT-C (Adapté de Gloster, 2014). Les hélices α sont indiquées en rouge, les feuillets β en jaune, les boucles en vert. Les ions métalliques, lorsqu'ils sont présents, sont représentés par sphères rose et les ligands dans la représentation de boule-et-bâton en bleu et marron.

Récemment un troisième type de repliement nommé GT-C a été prédit pour certaines GTs par l'utilisation des programmes d'alignement de séquence comme BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Liu et Mushegian, 2003). C'est le cas notamment pour les protéines membranaires hydrophobes intégrales localisées au niveau du RE et de la membrane plasmique avec des domaines transmembranaires multiples (8 à 13 hélices transmembranaires) (Figure 11B) (Strahlbolsinger *et al*, 1993 ; Takahashi *et al*, 1996 ; Maeda *et al*, 2001).

La première enzyme membranaire qui présente un repliement de type GT-C dont la structure 3D a été résolue est l'oligosaccharyltransférase de *Campylobacter lari*. Cette structure est composée de plusieurs domaines transmembranaires en hélice α et d'un mixte α/β (hélice α - feuillet β) (Figure 12c) (Lizak *et al*, 2011).

b-La conformation anomérique

Les GTs sont classées également en fonction de l'anométrie stéréochimique du groupement glycosyle transféré à partir d'un substrat donneur. Par analogie avec les glycosidases, deux mécanismes moléculaires (deux résultats stéréochimiques) existent chez les GTs : « retaining » avec rétention de la configuration anomérique ou « inverting » avec

inversion de la configuration anomérique. Le type de repliement des GTs n'a pas d'influence sur le résultat stéréochimique de la réaction catalysée (**Lairson et al, 2008**).

IV.3. Les mannosyltransférases de levures

Les mannosyltransférases de levures sont pour la plupart des enzymes Golgiennes de type II (**Figure 11A**) regroupées dans cinq familles de GTs selon la classification CAZy (GT-15, GT-32, GT-62, GT-71 et GT-91) : trois familles qui fonctionnent avec un mécanisme de rétention de configuration (GT-15, GT-32 et GT-71), une famille avec un mécanisme d'inversion de configuration (GT-91) et une famille avec un mécanisme qui demeure inconnu (GT-62). Au sein des familles GT-15 et GT-76, on peut distinguer la présence de trois types de mannosyltransférases : α -1,2, α -1,3 et phosphomannosyltransférases (**Figure 13**), ce qui suggère que les GT-15 et GT-76 ont un mécanisme catalytique très proche. Les familles GT-32 et GT-62 contiennent deux types de mannosyltransférases : l'inositol-phosphorylceramide α -mannosyltransférase et α -1,6 mannosyltransférases (**Fabre et al, 2014**).

Au cours de ma thèse nous nous sommes intéressés uniquement aux β -1,2 mannosyltransférases de *C. albicans* qui ont été identifiées en 2008 par génétique inverse (**Mille et al, 2008**) et classées récemment dans la famille GT-91.

IV.3.1. Les α -mannosyltransférases

Chez les levures, les protéines qui composent la paroi cellulaire subissent dans la plupart des cas des modifications post-traductionnelles notamment la N-mannosylation, la O-mannosylation et la phosphomannosylation. De nombreuses glycosyltransférases réticulaires et Golgiennes interviennent dans ce processus. A titre d'exemple, chez *C. albicans*, les mannosyltransférases de la famille Mnt1/Kre2, membre de la famille GT-15 sont impliquées dans trois types de mannosylation des protéines pariétales (la N-mannosylation, la O-mannosylation et la phosphomannosylation), cette famille est composée de cinq membres (Mnt1, Mnt2, Mnt3, Mnt4 et Mnt5). Les enzymes Mnt1 et Mnt2 sont impliquées dans la O-mannosylation, elles jouent ainsi un rôle important dans la virulence des levures pathogènes (**Figure 13**) (**Mille et al, 2012**). Mnt3 et Mnt5 interviennent dans la phosphomannosylation, elles initient la biosynthèse des parties acido-labiles des PPM en catalysant la formation des liaisons phospho-diester. Quant à Mnt4, c'est une α -1,2 mannosyltransférase qui participe à la biosynthèse des N-glycannes de *C. albicans* (**Figure 8**) (**Schibata et al, 2012**).

Chez *S. cerevisiae*, la structure tridimensionnelle de l'enzyme Mnt1/Kre2 a été résolue par des études cristallographiques et son mécanisme catalytique est partiellement élucidé (**Lobsanov et al, 2004**). Plus récemment, une deuxième α -mannosyltransférase de *S. cerevisiae* a été cristallisée ; il s'agit de ScMnn9 membre de la famille GT-62 (**Striebeck et al, 2013**). La comparaison des structures tridimensionnelle des enzymes Mnt1/Kre2 et ScMnn9 révèle que ces dernières présentent une même organisation structurale c'est-à-dire un repliement de type GT-A autour du site catalytique.

IV.3.2. Les β -mannosyltransférases

Contrairement aux α -mannosyltransférases, la structure tridimensionnelle des β -1,2 mannosyltransférases n'a pas encore été résolue. Les gènes codant pour ces β -1,2 mannosyltransférases (BMT) ont été mis en évidence initialement chez *Pichia pastoris* (PpBMT1 à 4). Chez *C. albicans*, cette famille d'enzyme est codée par un répertoire de 9 gènes (Ca BMT1 à 9). Ils codent pour des enzymes capables de transférer un résidu mannose, à partir d'un nucléotide-sucré activé (GDP-Mannose), sur un résidu glucidique de nature oligomannosidique ou mannose. Les gènes BMT ne présentent pas d'homologue chez *S. cerevisiae*.

Mille et ses collaborateurs ont mis en évidence l'implication des gènes CaBMT1 à 4 dans l'addition des β -Mans terminaux du PPM. En effet CaBmt1et CaBmt2 initient la β -mannosylation sur la partie acido-stable et acido-labile du PPM respectivement. La CaBmt3 est impliquée dans l'addition du 2^{ème} β -man sur les deux fractions ; la CaBmt4 serait impliquée dans l'élongation de la chaîne de β -Mans de la fraction acide labile (**Figure 3A**). CaBmt5 et CaBmt6 sont impliquées respectivement dans l'initiation et dans l'élongation de la β -mannosylation du PLM. Les rôles des gènes CaBMT 7, 8 et 9 demeurent inconnus. (**Figure3B**) (**Mille et al, 2008 ; Mille et al, 2012**).

L'analyse bioinformatique des séquences protéiques des CaBmts a permis d'établir les prédictions suivantes :

- Il s'agit d'enzymes Golgiennes de type II, composées d'un court segment transmembranaire hydrophobe de 20 résidus, puis d'une tige peu structurée et enfin d'un domaine catalytique C-terminal golgien (**Figure 11A**).
- Un deuxième segment transmembranaire très hydrophobe de 20 acides aminés a été identifié côté C-terminal pour CaBmt1 et CaBmt2.
- Une région conservée de 60kDa, présentant 50% d'homologie parmi les 9 CaBmts (83 %

pour CaBmt1-4) a été observée côté C-terminal, et identifiée comme domaine catalytique probable.

La comparaison de l'analyse phylogénétique des séquences codantes pour les 9 CaBmts avec leurs actions potentielles suggère une forte homologie de séquence entre les CaBmts 2 et 5 et entre les CaBmts 6 et 4 (**Figure 13**). En effet, CaBmts 2 et 5 sont des enzymes d'initiation de la β -mannosylation sur la partie acido-labile du PPM et sur le PLM respectivement, CaBmts 4 et 6 sont des enzymes d'élongation des β -Mans.

Chez *C. glabrata*, les analyses bio-informatiques par BLAST ont révélé la présence de sept gènes (BMT1-7) codant pour des β -mannosyltransférases similaires à celle de *C. albicans* (**Jawhara et al, 2012**). Les gènes BMT codent pour des β -mannosyltransférases responsables de la biosynthèse des β -Mans connus pour être des facteurs majeurs de virulence chez les levures les plus pathogènes du genre *Candida*.

Au cours de ma thèse nous nous sommes intéressés à la compréhension des voies de biosynthèse de ces antigènes pariétaux (β -Mans) chez *C. albicans* par la caractérisation biochimique des β -mannosyltransférases responsables de leurs synthèses. Dans ce contexte, nous avons décidé de commencer la caractérisation biochimique de ces enzymes *in vitro* par CaBmt1, enzyme initiatrice de la β -mannosylation sur la partie acido-stable du PPM de *C. albicans*.

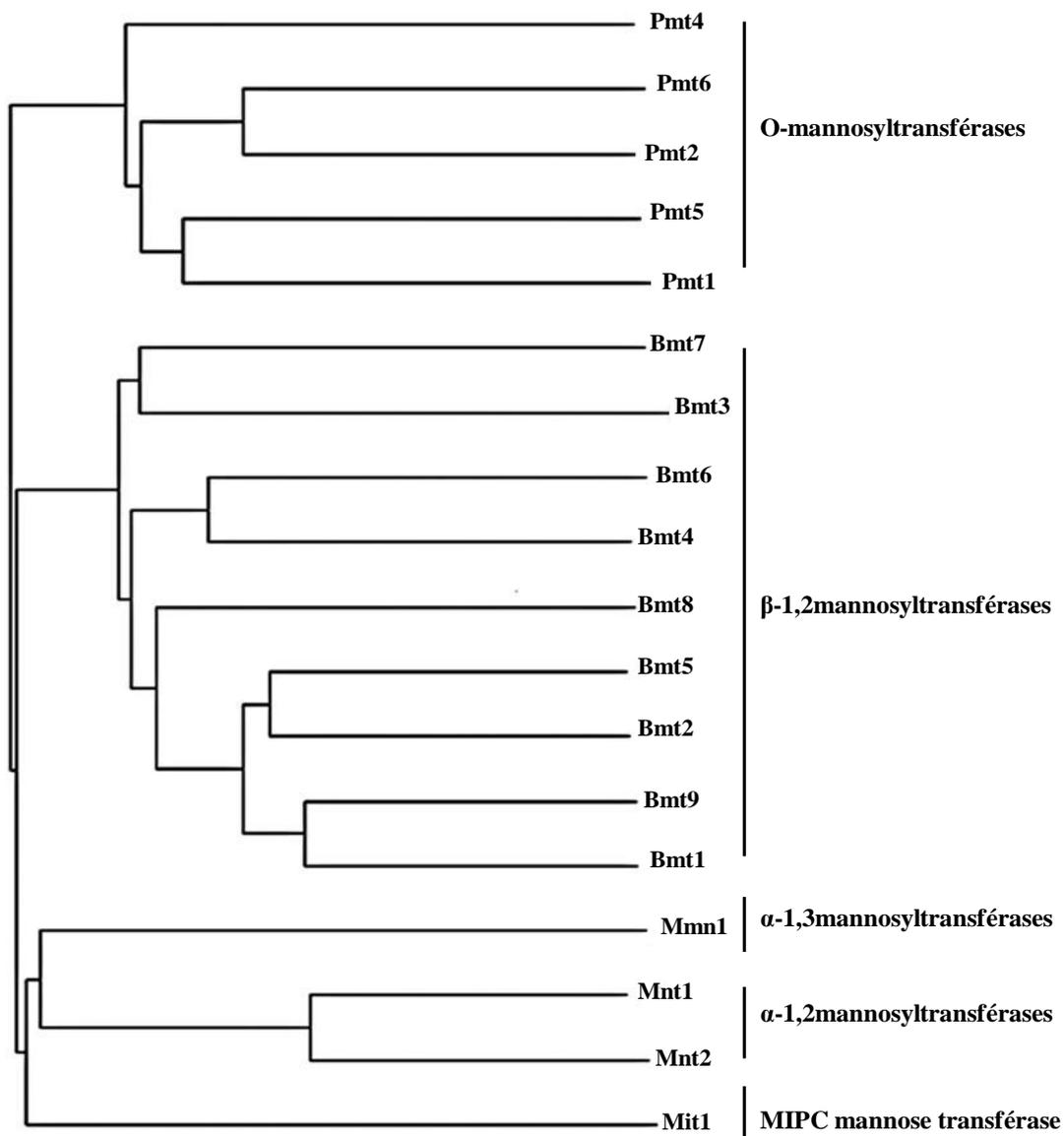


Figure 13 : Analyse phylogénique de différentes familles de mannosyltransférases de *C. albicans*. L'arbre phylogénique est basé sur les séquences entières des enzymes (Mille *et al*, 2012).

Présentation des travaux

Présentation des travaux

Le contact entre *C. albicans* et les cellules hôtes se fait au niveau de la paroi de la levure. Cette paroi est composée majoritairement de glycoconjugués, en particulier le phosphopeptidomannane et le phospholipomannane qui présentent à leurs extrémités des β -Mans (anomérie de liaison rare dans le monde vivant) considérés comme des facteurs de virulence chez les levures pathogènes du genre *Candida*. Une nouvelle famille de neuf gènes (CaBMT1-9), codant pour les β -mannosyltransférases, a été récemment identifiée chez *Candida albicans* (Mille *et al*, 2008). Quatre β -1,2 mannosyltransférases (CaBmt1-4) sont impliquées dans la β -mannosylation du PPM et deux (CaBmt5-6) dans la β -mannosylation du PLM (cf figure 3). Ces différents aspects ont été développés dans la partie Généralités.

Les travaux de ma thèse s'intègrent dans le cadre d'un projet plus large concernant la caractérisation structurale et biochimique des β -1,2-mannosyltransférases de *C. albicans* pour la conception de nouvelles drogues anti-fongiques. Ce projet a été soutenu par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR) pour une durée de trois ans (2010-2013), et a impliqué trois équipes de recherche aux compétences complémentaires : l'équipe du Pr Daniel Poulain (*Candida* et Candidoses, Inserm U995, Lille2), l'équipe du Dr Jean-Maurice Mallet (Ecole Normale Supérieure, Paris) et l'équipe du Dr Yann Guérardel, (Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, UMR CNRS 8576, Lille1). Notre équipe de recherche (au sein de l'Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, UMR CNRS 8576, Lille1) dirigée par le Dr. Yann Guérardel, s'intéresse depuis de nombreuses années à l'étude de la relation structure/fonction chez les micro-organismes pathogènes (Bactéries, levures,...), elle est reconnue pour son expertise dans l'étude de la biodiversité structurale de nombreux glycoconjugués pariétaux, en particulier par résonance magnétique nucléaire et spectrométrie de masse. Notre équipe a eu en charge d'une part, la préparation d'une « glycobanque » par l'isolement, la purification, et l'identification de substrats potentiels à partir d'extraits pariétaux de levures (*S. cerevisiae* et *C. albicans*), et d'autre part, l'expression et la production des β -1,2 mannosyltransférases de *C. albicans* sous forme recombinante chez *P. Pastoris* afin de caractériser leurs activités enzymatiques *in vitro*. L'équipe du Pr Daniel Poulain (*Candida* et Candidoses, Inserm U995, Lille2) avec laquelle notre équipe collabore depuis de nombreuses années a notamment eu en charge la culture des différentes souches de *C. albicans* pour l'extraction et la préparation des phosphopeptidomannanes (PPM) que nous avons utilisés pour la préparation des substrats naturels, alors que l'équipe du Dr Jean-

Maurice Mallet (Ecole Normale Supérieure, Paris) a réalisé la synthèse chimique de substrats accepteurs testés en présence des enzymes étudiées.

De nombreuses mannosyltransférases Golgiennes fongiques n'étant pas présentes dans des cellules de mammifères, l'étude de ces enzymes permettrait de comprendre les voies de biosynthèse des glycoconjugués pariétaux. La caractérisation complète des activités des β -1,2 mannosyltransférases de *C. albicans* permettra de mieux comprendre la séquence d'action de ces enzymes et leur spécificité. Il serait alors possible de concevoir de nouveaux agents antifongiques capables d'inhiber la synthèse des β -1,2 oligomannosides qui contribuent à la virulence de *C. albicans*.

Les objectifs et la stratégie de la thèse

Dans le but de comprendre les voies de biosynthèse des β -Mans présents à la surface du phosphopeptidomannane (PPM) de *C. albicans* nous avons décidé de caractériser individuellement les activités enzymatiques des β -1,2-mannosyltransférases responsables de la biosynthèse de ces motifs antigéniques. Dans ce contexte, et afin de contribuer à ce projet global, les objectifs des travaux de ma thèse ont été dans un premier temps, la caractérisation de l'activité β -1,2-mannosyltransférasique *in vitro* de CaBmt1, 1^{ère} enzyme dans la voie de biosynthèse des β -mannosides du PPM de *C. albicans*. Puis dans un deuxième temps, nous avons entrepris la caractérisation de l'activité β -1,2-mannosyltransférasique *in vitro* de CaBmt3, enzyme intervenant dans l'élongation des β -Mans du PPM de *C. albicans*.

La stratégie globale de l'étude a consisté d'abord en la préparation d'un panel important de substrats accepteurs et leur caractérisation structurale par spectrométrie de masse et RMN. Les produits de départ utilisés pour l'obtention de ces substrats oligomannosidiques sont les PPM des levures *Saccharomyces cerevisiae* et *C. albicans*. Ensuite mes travaux de thèse ont porté sur la réalisation des différents tests d'activité enzymatique avec les formes recombinantes Bmt1p et Bmt3p des enzymes CaBmt1 et CaBmt3 produites au laboratoire chez *P. Pastoris*, en présence des différents substrats après leur couplage à un fluorophore (la 2-Aminopyridine). Ces enzymes ont été également testées en présence des substrats de synthèse qui sont couplés à un autre fluorophore (le mantyl). Ainsi, les produits formés par ces enzymes ont été détectés par chromatographie liquide haute performance (HPLC) en fluorimétrie puis certains ont été isolés et caractérisés par spectrométrie de masse (MALDI-TOF) et RMN. De plus, nous avons déterminé les conditions optimales d'activité

enzymatique, ainsi que la spécificité de substrat par l'identification de la structure minimale de substrat accepteur reconnue par les enzymes recombinantes Bmt1p et Bmt3p en termes de liaisons et de degré de polymérisation.

L'ensemble des résultats concernant la caractérisation de l'activité β -1.2 mannosyltransférase de CaBmt1, enzyme d'initiation, et de CaBmt3, enzyme d'élongation de la β -mannosylation sur le PPM de *C. albicans*, vont être présentés dans les parties A et B respectivement.

Durant la troisième année de la thèse, nous avons initié une étude dans le but de déterminer le rôle de CaBmt7, une β -mannosyltransférase de *C. albicans* dont la fonction demeure inconnue. Dans cette perspective, nous avons utilisé une approche purement structurale qui a consisté en la purification des PPMs d'une souche de *C. albicans* déficiente dans la synthèse de CaBmt7 et d'une souche sauvage utilisée comme référence (SC5314). D'une part, nous avons récupéré les parties acido-stables et acido-labiles des PPMs des deux souches, la comparaison de leur structure notamment par RMN est en cours. D'autre part, les résultats préliminaires d'analyse des PPMs initiaux ayant mis en évidence la présence de profils glycaniques différents entre les deux souches, il serait alors intéressant de poursuivre ce travail qui contribuera à la compréhension du rôle de CaBmt7. Les premiers résultats obtenus lors de cette étude vont être exposés dans la partie C.

RESULTATS

PARTIE A

Caractérisation de l'activité β 1.2 mannosyltransférase de CaBmt1

Introduction

Nous avons décidé de commencer ce projet par la caractérisation de l'activité enzymatique de CaBmt1 car il s'agit de l'enzyme initiateur de la β -mannosylation sur la partie acido-stable du PPM de *C. albicans*. De plus la caractérisation complète de CaBmt1 va nous servir de modèle pour l'étude des autres CaBmts. Mes travaux personnels ont consisté d'une part à la création d'une « glycobanque » via l'isolement, la purification et la caractérisation structurale de substrats potentiels de nature oligomannosidique à partir des PPM des levures *Saccharomyces cerevisiae* et *C. albicans* (partie A, chapitre 1) et d'autre part, à la réalisation des différents tests d'activité enzymatique avec les formes recombinantes de l'enzyme Bmt1p produites au laboratoire chez *P. Pastoris*, en présence de différents substrats (partie A, chapitre 2). En effet, après couplage des substrats naturels à un fluorophore (2-Aminopyridine), les produits formés ont été détectés par Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC) en fluorimétrie. Nous avons également utilisé des substrats synthétiques fluorescents préparés par une équipe collaboratrice. L'un de ceux-ci nous a permis de caractériser les produits formés par Bmt1p, après leur isolement par une HPLC préparative, purification sur colonne de charbon et analyse structurale par spectrométrie de masse (MALDI-TOF) et RMN, et de déterminer les conditions optimales d'activité enzymatique de Bmt1p. L'étude de la spécificité de substrat de Bmt1p a été réalisée grâce à l'ensemble des substrats disponibles naturels et synthétiques

Il est à noter que la « glycobanque » constituée lors de cette étude a également servi pour la suite de nos travaux de thèse portant sur la 2^{ème} enzyme CaBmt3 (partie B).

Chapitre I : Obtention des substrats potentiels

I.1. Isolement et purification des substrats

Afin de caractériser l'activité β 1.2 mannosyltransférase de CaBmt1 *in vitro*, nous avons préparé un panel de substrats potentiels à partir des phosphopeptidomannanes (PPM) de *S. cerevisiae* et d'une souche de *C. albicans* déficiente en CaBmt1. En effet, le PPM de *S. cerevisiae* présente une structure centrale similaire à celle du PPM de *C. albicans* sans les liaisons β -1,2 mannosidiques, et est de plus disponible en grande quantité (mannanes commercialisés par SIGMA). Ainsi nous avons dans un premier temps, mis au point un protocole qui nous a permis d'obtenir des substrats de nature α -oligomannosides. Dans un

deuxième temps, le PPM de *C. albicans* (souche déficiente en CaBmt1) a été utilisé dans le but d'avoir l'équivalent des substrats endogènes (α -oligomannosides) ainsi que des substrats de nature β -oligomannosides.

I.1.1. Stratégie d'obtention des substrats naturels

Le traitement des phosphopeptidomannanes a consisté en plusieurs étapes : acétylyse, extraction, désacétylation, échange d'ions et gel-filtration. Ainsi grâce à ces étapes d'isolement et de purification deux familles d'oligomannosides : neutres et phosphatés ont été mises en évidence. Au préalable à ces différentes étapes, le PPM de *C. albicans* de la souche délétée de CaBMT1 a été séparé en deux fractions : la fraction acido-stable que nous avons traitée de la même manière que le phosphopeptidomannane de *S. cerevisiae* afin d'obtenir des α -mannosides et la fraction acido-labile que nous avons fractionnée et purifiée par gel filtration pour l'obtention des β -mannosides de degré de polymérisation (DP) variable.

Afin de séparer, d'analyser, de caractériser et d'identifier l'ensemble des substrats, nous avons eu accès aux différentes techniques de purification couramment utilisées au laboratoire ainsi qu'à l'ensemble des méthodes analytiques telles que l'HPLC, la spectrométrie de masse et la RMN.

Les α -oligomannosides neutres et les β -oligomannosides ont été couplés à un fluorophore qui est la 2-Aminopyridine (2AP) avant d'être testés en présence des différentes formes recombinantes de Bmt1p. L'ensemble des étapes qui composent la stratégie expérimentale sont effectuées d'une manière indépendante sur les oligomannosides issus soit du PPM de *S. cerevisiae* soit du PPM de *C. albicans* Δ BMT1 (**Figure 14**).

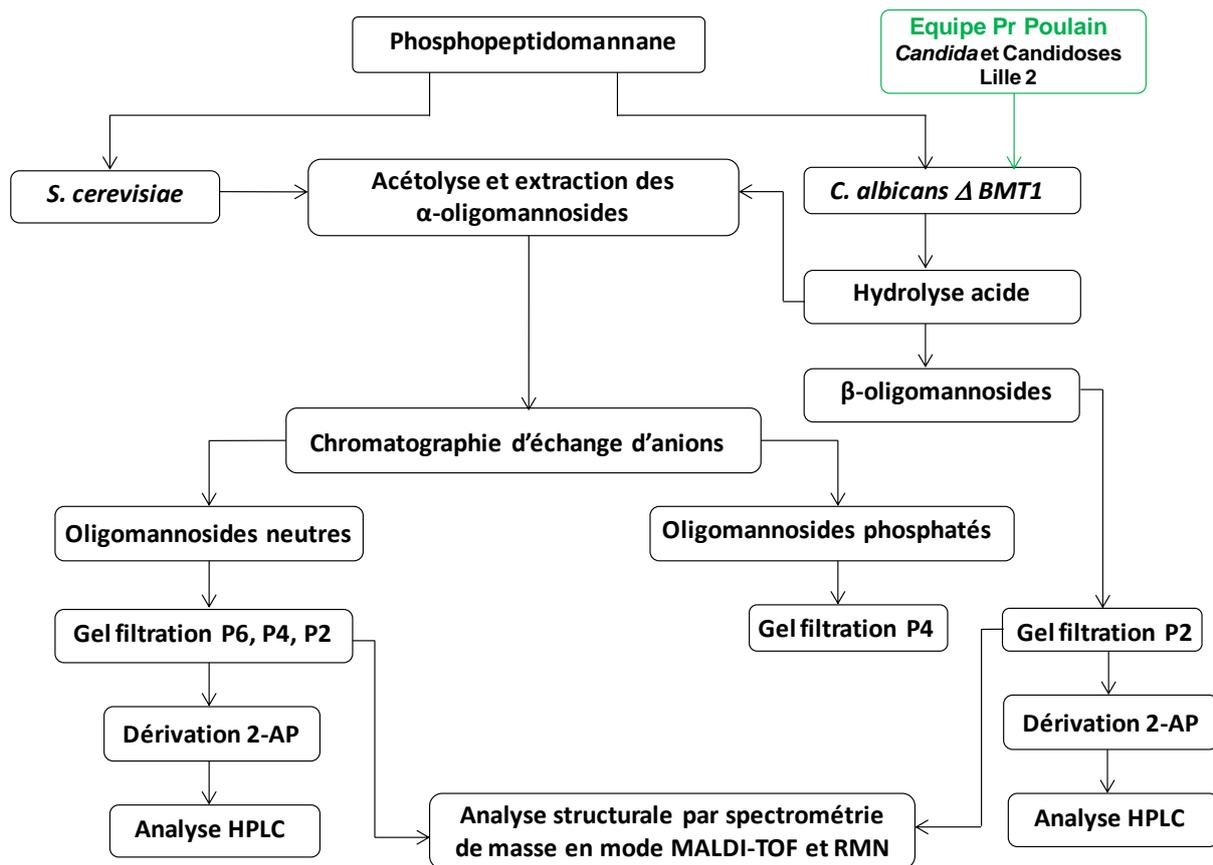


Figure 14 : Schéma de la stratégie expérimentale suivie pour l'obtention d'une « glycobanque » d'oligosaccharides.

I.1.2. Extraction des oligosaccharides :

Les α -oligosaccharides ont été extraits dans un premier temps à partir des mannanes (PPM) de *S. cerevisiae* et dans un deuxième temps à partir de la partie acido-stable du PPM de *C. albicans* Δ BMT1 (la fraction acido-labile étant conservée pour obtenir les β -mannosides). Le protocole utilisé a consisté en plusieurs étapes ; la première étape est une acétylyse qui coupe préférentiellement les liaisons α -1,6 oligosaccharidiques de la chaîne principale du PPM ; elle a permis d'obtenir des chaînes de taille variable d' α -oligosaccharides plus ou moins phosphorylés comportant essentiellement des liaisons α 1,2 et α 1,3. Ensuite nous avons procédé à deux extractions avec le chloroforme des oligosaccharides acétylés (apolaires). Finalement, nous avons effectué une désacétylylation par l'addition de la soude (pH 11) et du méthanol à la phase chloroformique concentrée au préalable à l'aide d'un évaporateur rotatif. Avant de réaliser les différentes étapes de purification, l'échantillon est concentré une deuxième fois. La désacétylylation permet d'obtenir des oligosaccharides hydrosolubles pour les étapes de purification ultérieures (Stewart *et al*, 1968).

I.1.3. Purification des oligomannosides :

a-Substrats issus de *S. cerevisiae*

La séparation et la purification des oligomannosides ont été effectuées principalement par l'utilisation des techniques biochimiques classiques en particulier la chromatographie d'échange d'ions (cationique et anionique) et la chromatographie de filtration sur gel (Bio-gel P6, P4 et P2). L'efficacité a été vérifiée après chaque étape par chromatographie sur couche mince (CCM) avec repérage des oligomannosides à l'orcinol sulfurique. Ainsi, après purification des oligomannosides provenant des PPM de *S. cerevisiae* sur résine échangeuse de cation afin d'enlever des contaminants et séparation par gel filtration sur Bio-gel P6, nous avons pu mettre en évidence quatre fractions nommées FI à FIV. La fraction FI contient des oligomannosides de grande taille (pas de migration sur CCM). La fraction FII est la fraction la plus importante en termes de complexité, elle contient des oligomannosides de DP (degré de polymérisation) variables. Les fractions FIII et FIV contiennent des oligomannosides de DP inférieur à 10. Le témoin de taille déposé lors de la migration en CCM est le glucidex 12, il comporte des saccharides de DP différents allant de DP 1 à 12. Ainsi une estimation des degrés de polymérisation des différentes fractions est effectuée (**figure 15**)

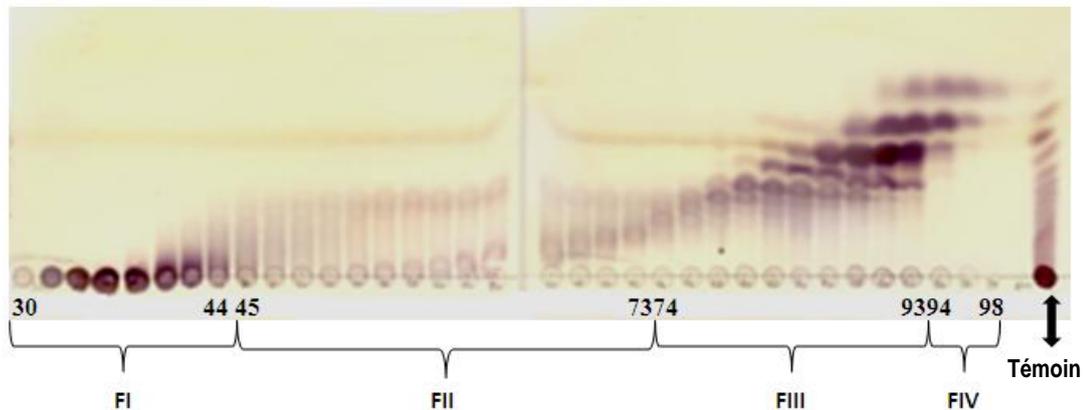


Figure 15 : Analyse par CCM des oligomannosides provenant de l'acétolyse du PPM de *S. cerevisiae* après fractionnement sur Bio-gel P6. La migration a été effectuée dans un solvant composé d'un mélange de n-butanol/acide acétique/ eau (2 : 1 : 1,5). La révélation des oligomannosides a été réalisée par pulvérisation d'orcinol sulfurique suivie du chauffage de la CCM pendant 5 minutes à 110°C.

Suite à ces résultats, nous avons choisi d'utiliser dans un premier temps la fraction FIII afin de préparer des oligomannosides de DP inférieur à dix et de structure définie dans le but d'étudier l'activité enzymatique de CaBmt1. Dans cette perspective, la fraction FIII a été séparée en deux fractions : une neutre (FIIIN) et une acide (FIIIA) sur colonne d'échangeur

d'anions. FIII N correspond aux composés non retenus par l'échangeur et élués par l'eau ; FIII A correspond aux oligomannosides phosphorylés retenus par la colonne puis élués avec l'acétate de pyridine 0,2 M. La chromatographie de gel-filtration sur Bio-gel P2 de la fraction neutre FIIIN a permis de séparer ses composants (de DP inférieur à 10) en fonction de leur taille.

De la même manière, les fractions FI, FII et FIV ont été séparées en deux familles d'oligomannosides en fonction de leur charge : neutres et phosphorylés.

Dans un deuxième temps, la fraction neutre de FII obtenue après chromatographie d'échange d'anions a été reprise. Deux sous fractions d'oligomannosides de DP hétérogènes ont été choisies après purification par chromatographie de gel-filtration sur Bio-gel P4 pour être analysées.

b-Substrats issus de *C. albicans* (Δ BMT1) :

D'autre part, des substrats naturels contenant des chaînes d' α -mannosides linéaires et branchés se terminant préférentiellement par des liaisons α -1,2 ont été préparés à partir du PPM de souche de *C. albicans* déficiente en CaBmt1 dans le but d'avoir l'équivalent des substrats endogènes de l'enzyme. L'analyse par CCM des composés obtenus après une hydrolyse acide du PPM et purification par chromatographie sur Bio-Gel P2 nous a permis d'identifier deux fractions selon leur profil de migration, une fraction « lourde » qui ne migre pas sur CCM et qui correspond à la partie acido-stable du PPM et une fraction sensible à l'hydrolyse acide qui migre sur CCM et comporte des oligomannosides de petite taille correspondant à la partie acido-labile (**Faille *et al*, 1991**). Après acétylyse de la partie acido-stable du PPM, les oligomannosides neutres provenant de la partie acido-stable et obtenus après colonne échangeur d'anions ont été séparés individuellement par gel-filtration sur Bio-gel P2 (DP inférieur à 10) en fonction de leur taille. L'analyse par CCM des oligomannosides obtenus a confirmé leur degré de polymérisation ainsi que leur pureté (**Figure 16**). Les analyses en spectrométrie de masse et RMN décrites dans la suite de cet exposé ont permis de définir la structure exacte de ces substrats qui seront présentés dans le tableau N°10 page 88.

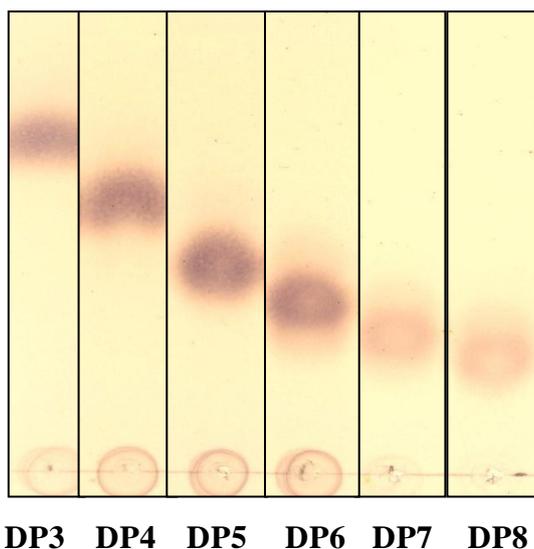


Figure 16 : Analyse par CCM des oligomannosides neutres extraits à partir du PPM de *C. albicans* de la souche délétée de CaBMT1 après hydrolyse acide, acétolyse, chromatographie échangeuse d'anions et purification sur Bio-gel P2. Pour les conditions de migration et de révélation se référer à la figure 15.

Dans un deuxième temps, nous avons purifié les β -mannosides qui composent la partie acido-labile du PPM de *C. albicans* de la souche Δ BMT1 par chromatographie de gel-filtration sur Bio-gel P2 et leur analyse structurale (décrite ci-après) a montré que leur degré de polymérisation varie de DP2 à DP8.

I.1.4. Dérivation des oligomannosides neutres

Afin de pouvoir étudier l'activité enzymatique de CaBmt1 par chromatographie liquide haute performance (HPLC), nous avons choisi de coupler nos substrats potentiels à un marqueur fluorescent dans le but d'augmenter la sensibilité de détection des produits formés. L'ensemble des oligomannosides issus des fractions neutres de FII et FIII (**Figure 15**) provenant du PPM de *S. cerevisiae* et des parties acido-stable (**Figure 16**) et acido-labile du PPM de *C. albicans* Δ BMT1 ont été couplés à la 2-Aminopyridine (2-AP) (**Figure 17**) selon le protocole décrit par (**Hase et al, 1994**) puis analysés par HPLC en phase normale avec détection par fluorimétrie. Nous avons cherché grâce à cette analyse à différencier les oligomannosides marqués ainsi que les produits formés après action des β -1,2 mannosyltransférases étudiées (CaBmt1 dans la partie A et CaBmt3 dans la partie B). En effet chaque oligomannoside de DP défini est élué à un temps de rétention qui le caractérise. Les

temps de rétention des principaux substrats marqués à la 2-AP sont illustrés dans l'article N°2 (caractérisation de Bmt1p) dans le tableau S1 (supplemental table) page 132.

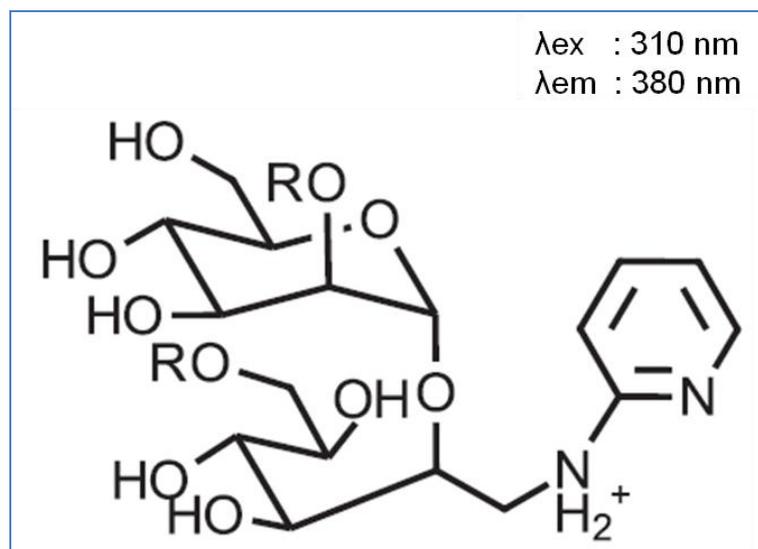


Figure 17 : Structure des oligomannosides neutres après couplage à la 2-Aminopyridine.
R : H ou mannose.

I.2. Caractérisation structurale :

La caractérisation structurale des substrats disponibles a été effectuée d'abord par spectrométrie de masse en mode MALDI-TOF afin de confirmer leur taille puis par RMN pour l'identification de leur structure exacte. En effet, ces analyses structurales ont nécessité l'utilisation de diverses expériences de résonance magnétique nucléaire homo- ^1H et hétéronucléaire (^1H - ^{13}C), telles que ^1H -COSY 90, ^1H -TOCSY, ^1H - ^{13}C /HSQC et le ^1H -ROESY. La réalisation des spectres protons à une dimension (^1H) nous a permis de connaître les déplacements chimiques (δ) de chaque proton identifiable et de vérifier l'anomérie des oligomannosides. Par ailleurs, de manière à identifier la configuration des oligomannosides, des spectres COSY 90, un relai, deux relais et TOCSY ont été enregistrés. La lecture des déplacements chimiques et des constantes de couplage vicinales (3J) a permis de déterminer les systèmes de spin des résidus. De manière à identifier formellement les constantes de couplages directes $^1J_{\text{H,C}}$ et la nature des substitutions de chacun des monosaccharides, des spectres ^1H - ^{13}C /HSQC, ont été enregistrés. Une attribution systématique des carbones a été réalisée sur les spectres hétéronucléaires ^1H - ^{13}C /HSQC sur la base des déplacements chimiques des protons. Finalement les corrélations spatiales (couplage dipolaire) entre certains protons très proches dans l'espace soit d'un même monosaccharide (effet nOe intra-

résidu) ou de deux monosaccharides (effet nOe inter-résidu) ont été identifiées grâce à des expériences RMN de type ROESY ce qui nous a permis de déterminer la séquence complète des oligomannosides. Ainsi, l'ensemble de ces analyses ont apporté des informations supplémentaires sur la structure, la conformation, les substitutions et les ramifications des substrats disponibles. L'identification des signaux a été réalisée à l'aide de nombreuses références disponibles (**Kobayashi et al, 1990 ; Kobayashi et al, 1993 ; Shibata et al, 1993 ; Suzuki et al, 1997**).

Dans la suite de cet exposé, des exemples d'analyse par spectrométrie de masse et RMN de quelques substrats seront détaillés afin d'illustrer la démarche analytique suivie pour la caractérisation de l'ensemble des substrats naturels disponibles.

I.2.1. Substrats issus de *S. cerevisiae* :

a. Analyse par spectrométrie de masse :

L'analyse MALDI-TOF des quatre fractions (FI à FIV) a permis de préciser les DP des saccharides qui composent chaque fraction et les masses. Chaque fraction est analysée séparément en mode positif (matrice DHB ; acide 2,5-dihydroxybenzoïque) et en mode négatif (matrices DHB et AQ ; l'aminoquinoline). Ces matrices ont été préalablement analysées. **Le tableau 5** résume la composition des différentes fractions en oligomannosides neutres et phosphorylés, obtenue après l'ensemble des analyses MALDI-TOF.

Tableau 5 : Composition en oligomannosides neutres et phosphorylés des fractions FI à FIV.

Fraction	Oligomannosides neutres	Oligomannosides phosphorylés
FI	DP 4 à DP19	DP 5 à DP29
FII	DP6 à DP19	DP 5 à DP16
FIII	DP3 à DP8	DP 3 à DP8
FIV	DP2 à DP3	DP 2 à DP3

Afin de vérifier l'efficacité du couplage à la 2-AP, les principaux substrats d'intérêt ont été analysés par spectrométrie de masse MALDI-TOF avant et après couplage à la 2-AP. A titre d'exemple, **la figure 18** illustre la comparaison des spectres MALDI-TOF avant et

après marquage d'une sous-fraction composée de DP6 à DP12 obtenue après fractionnement de FIIN par gel-filtration sur Bio-gel P4. Cette analyse indique que les ions majoritaires sont détectés sous la formes $[M+Na]^+$ avec un incrément de masse de 78 ($2AP-H_2O+2H$) pour les produits marqués.

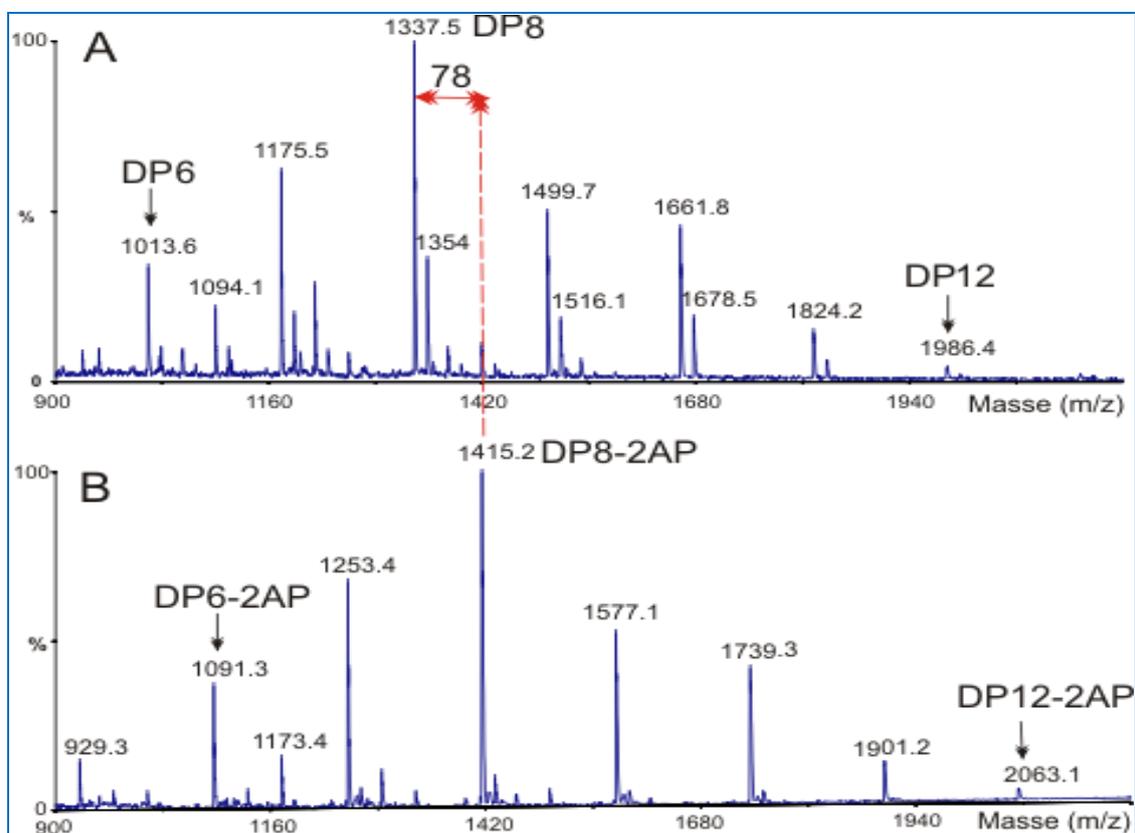


Figure 18 : Analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF de la sous-fraction de FIIN composée de (DP6 à DP12) avant (A) et après marquage à la 2-AP (B).

Par ailleurs, l'analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF des α -oligomannosides neutres isolés et purifiés à partir de la fraction FIII montre que cette dernière est composée d'oligomannosides de DP 3 à 8. Ces derniers ont été analysés en HPLC après couplage à la 2-AP avant d'être utilisés comme accepteurs lors des premiers essais d'activité enzymatique en présence de CaBmt1. Les informations complémentaires concernant les masses et les temps de rétention sont décrites dans les données supplémentaires de l'article N°2 sur la caractérisation de Bmt1p (Table S1).

b. Analyse par résonance magnétique nucléaire

Afin de déterminer la structure exacte des oligomannosides (DP3 à DP8) isolés de la fraction neutre FIII du PPM de *S. cerevisiae*, nous avons procédé à des expériences RMN. Deux exemples illustrant la démarche de la caractérisation structurale des substrats sont décrits dans les **figures 19 et 20**. Ainsi l'analyse du spectre protons ^1H (**Figure 19 A**) de l'oligomannoside DP3 nous a permis d'identifier trois signaux ^1H majoritaires dans la région anomérique et qui correspondent à des résidus (αMan). La réalisation d'un spectre ^1H - ^{13}C HSQC (**Figure 19 B**) a permis de visualiser la nature des substitutions des résidus mannosyls, cette expérience montre bien que les mannoses (A) et (B) sont substitués en 2 et que la structure de l'oligomannoside de DP3 est : **Man α 1-2Man α 1-2Man**.

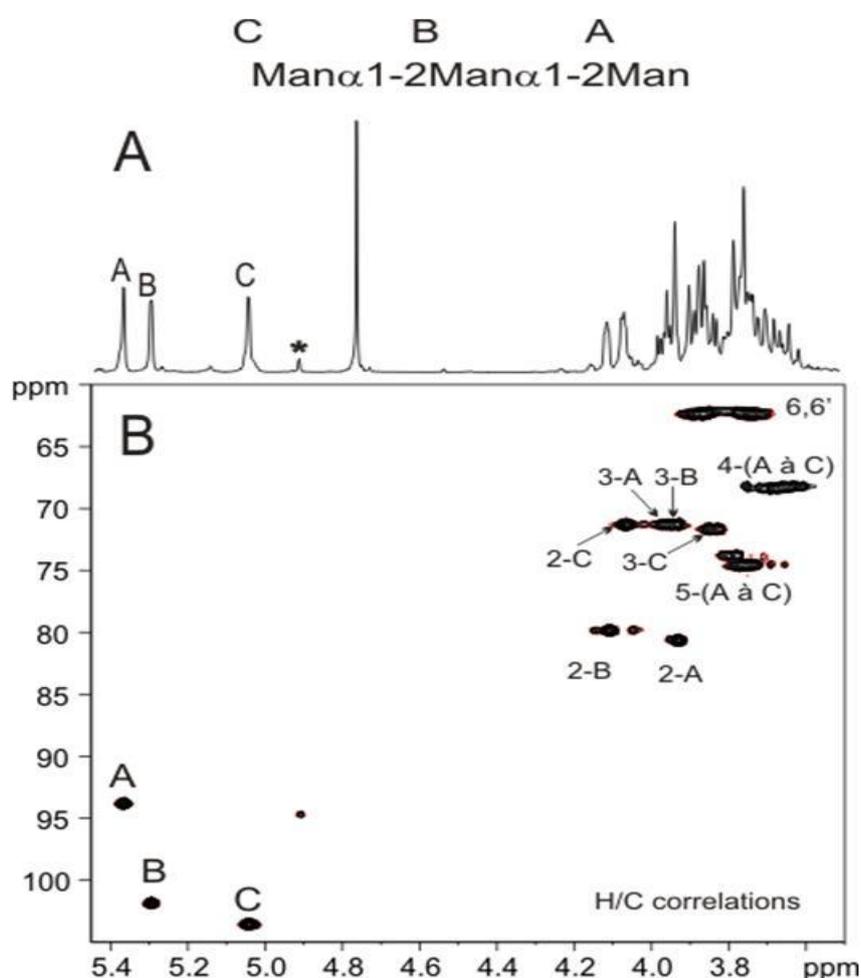


Figure 19 : Analyse RMN du trimannoside (DP3sc) isolé du PPM de *S. cerevisiae*. **A** spectre protons ^1H , **B** spectre ^1H - ^{13}C /HSQC. Le signal * est attribué au proton anomère β (Man β). Les expériences ont été effectuées à 300°K dans le D2O en utilisant l'acétone comme standard interne. Les valeurs des déplacements chimiques sont indiquées dans le tableau ci-dessous (Tableau 6).

De la même manière, l'analyse du spectre protons ^1H (**Figure 20 A**) de l'oligomannoside DP4 montre la présence de quatre protons anomères H1 (A ; 5.37 , B ; 5.29 , C ; 5.03, D ; 5.14) ; l'analyse de ces derniers avec un spectre COSY90 (**Figure 20 B**) a montré une corrélation avec quatre protons H-2 à (2-A ; 3.49), (2-B ; 4.11), (2-C ; 4.22) et (2-D ; 4.07). Une attribution systématique des carbones a été réalisée sur les spectres hétéronucléaires $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ HSQC (**Figure 20 C**) sur la base des déplacements chimiques des protons ce qui nous a permis de mettre en évidence deux types de substitutions : les mannoses (A) et (B) sont substitués en position 2, le mannose (C) est substitué en position 3. Ces analyses ont permis d'identifier l'oligomannoside de DP4 comme étant : **Man α 1-3Man α 1-2Man α 1-2Man**.

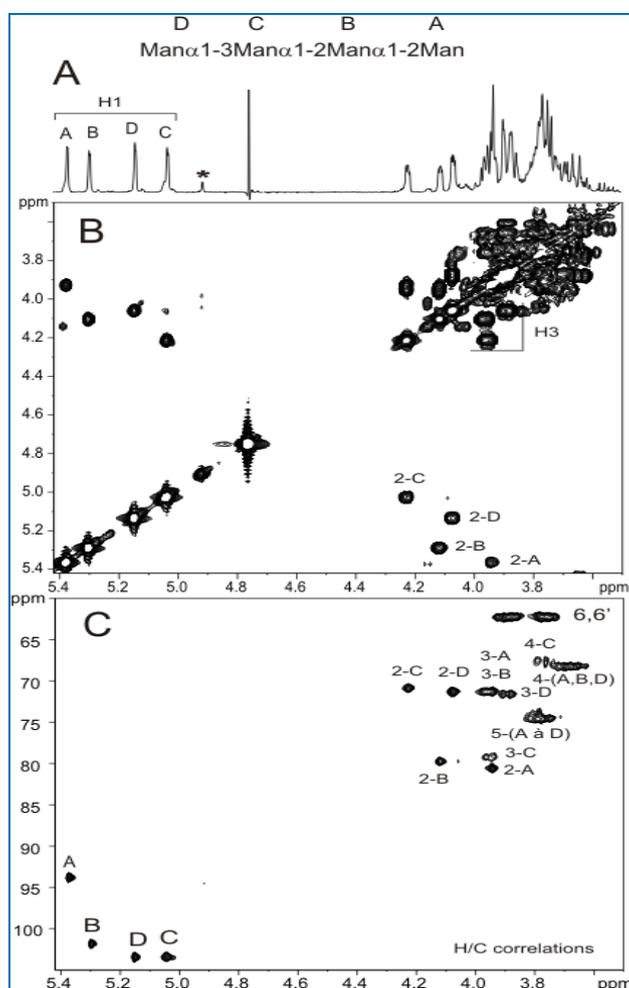


Figure 20 : Analyse RMN du tétramannoside (DP4sc) isolé du PPM de *S. cerevisiae*. A spectre protons ^1H , B spectre COSY 90 $^1\text{H}/^1\text{H}$, C spectre $^1\text{H}-^{13}\text{C}/\text{HSQC}$. Le signal * est attribué au proton anomère β (Man β). Les expériences ont été effectuées à 300°K dans le D2O en utilisant l'acétone comme standard interne. Les valeurs des déplacements chimiques sont indiquées dans le tableau ci-dessous (Tableau 6).

Ainsi de la même manière la structure des oligomannosides neutres de DP 5 à 8 a été déterminée (**Tableau 10**). Les informations complémentaires d'analyse par RMN sont décrites dans les données supplémentaires de l'article N°2 sur la caractérisation de Bmt1p (Figure S2 et table S1).

Le tableau N°6 regroupe les valeurs des déplacements chimiques des protons et carbones des oligomannosides de DP 3 à 6 isolés du PPM de *S. cerevisiae*.

Tableau 6 : Déplacements chimiques des protons et carbones (en ppm) des résidus mannosyls de quelques oligomannosides isolés.

DP3	H1/C1	H2/C2	H3/C3	H4/C4	H5/C5	H6-6'/C6
2->M α	5.37/93.8	3.93/ 80.6	3.95/71.1	3.69/68.4	3.79/73.8	3.88-3.75/62.3
2->M->2	5.29/101.8	4.11/ 79.8	3.96/71.3	3.67/68.3	3.7/74.5	3.88-3.75/62.3
M->2	5.04/103.6	4.06/71.3	3.84/71.6	3.63/68.1	3.7/74.5	3.88-3.75/62.3
DP4	H1/C1	H2/C2	H3/C3	H4/C4	H5/C5	H6-6'/C6
2->M α	5.37/93.8	3.94/ 80.6	3.95/71.3	3.69/68.4	3.80/73.7	3.88-3.75/62.3
2->M->2	5.29/101.8	4.11/ 79.8	3.96/71.3	3.68/68.3	3.8-3.7/74.6	3.88-3.75/62.3
3->M->2	5.03/103.5	4.22/70.9	3.94/ 79.2	3.75/67.5	3.8-3.7/74.6	3.88-3.75/62.3
M->3	5.14/103.5	4.07/71.4	3.88/71.6	3.64/68.2	3.8-3.7/74.6	3.88-3.75/62.3
DP5						
2,6->M α	5.37/93.8	3.94/ 80.6	3.92/71.8	3.7/68.1	3.68/74.1	4.00-3.67/ 67.3
2->M->2	5.30/101.8	4.11/ 79.9	3.93/71.8	3.68/68.3	3.8-3.7/74.6	3.88-3.75/62.3
M->2->M->2	5.05/103.6	4.07/71.4	3.85/71.6	-	-	-
2->M->6	5.11/99.4	4.03/ 79.9	3.94/71.5	-	-	-
M->2->M->6	5.04/103.6	4.07/71.4	3.85/71.6	-	-	-
DP6						
2,6->M α	5.36/93.9	3.94/ 80.6	3.91/71.8	3.7/68.1	3.68/74.1	3.99-3.68/ 67.1
2->M->2	5.30/101.8	4.11/ 79.8	3.93/71.8	3.68/68.3	3.8-3.7/74.6	3.89-3.76/62.3
3->M->2	5.04/103.6	4.22/70.9	3.95/ 79.2	3.75/67.5	3.8-3.7/74.6	3.88-3.75/62.3
2->M->6	5.12/99.3	4.03/ 79.8	3.94/71.5	-	-	-
M->2	5.05/103.5	4.07/71.3	3.84/71.6	3.63/68.1	3.7/74.5	3.88-3.75/62.3
M->3	5.14/103.5	4.07/71.4	3.88/71.6	3.64/68.2	3.8-3.7/74.6	3.88-3.75/62.3

Par ailleurs, des oligomannosides phosphorylés provenant de la fraction FII ont été également purifiés par chromatographie sur Bio-gel P4 puis analysés par spectrométrie de masse en mode MALDI-TOF et par RMN. La réalisation de spectre phosphore (expérience non incluse) a confirmé les résultats de l'analyse MALDI-TOF : absence de groupement phosphate dans la fraction FIIN et charge acide due à la présence d'un groupement phosphate dans la fraction FIIA. De plus, la réalisation d'un spectre ^1H - ^{13}C HSQC des oligomannosides neutres et acides de la fraction FII (**Figure 21**) a permis de visualiser la nature des substitutions des résidus mannosyls. Cette expérience montre bien que les mannoses peuvent être substitués en 2, en 3 ou en 6. Il est à noter que deux nouvelles corrélations de protons

anomères sont bien identifiables à (δ) 5.43/93.5 et 5.24 /102.1 et correspondent à des résidus de mannose portant le groupement phosphate ou proche de celui-ci.

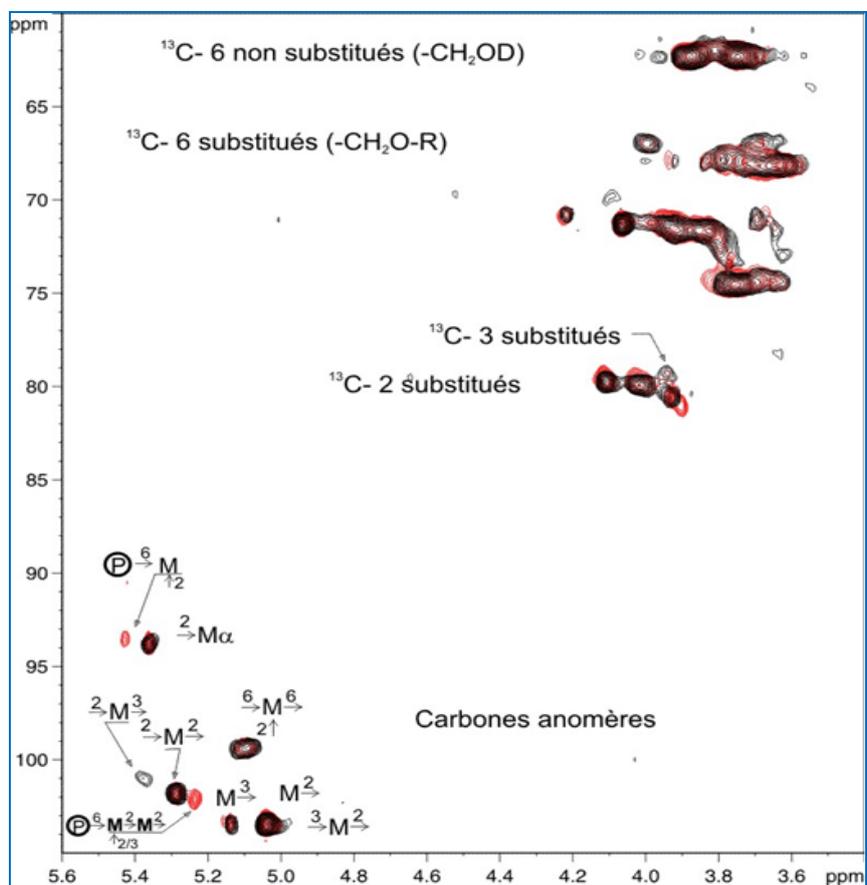


Figure 21 : Spectres ^1H - ^{13}C HSQC des oligomannosides neutres (noir) et acides (rouge) isolés à partir de la fraction FII du mannane de *S. cerevisiae*. Les valeurs des déplacements chimiques sont indiquées dans les tableaux 6 et 7.

Le tableau N°7 résume les déplacements chimiques des protons et carbones anomères de quelques résidus mannosyls neutres et phosphatés.

Tableau 7 : Déplacements chimiques (ppm) des protons et carbones anomères des résidus mannosyls impliqués dans les diverses liaisons.

	M→6	2→M→3	2→M→2 6↑	P→6M 2↑	P→6M→2M→ 2↑
^1H	4.90	5.36	5.07-5.16	5.43	5.24
^{13}C	n.d.	100.9	99.3	93.5	102.1

Ainsi grâce à l'ensemble de ces analyses structurales, nous avons pu identifier quelques structures d'oligomannosides phosphatés isolés à partir de la fraction FIIA issue du PPM de *S. cerevisiae* (**Tableau 8**).

Tableau 8 : Structure de quelques oligomannosides phosphatés isolés à partir du PPM de *S. cerevisiae*.

DP	α -Oligomannosides phosphatés
DP5	$\begin{array}{c} \textcircled{\text{p}} \\ \\ \text{6} \\ \text{Man}\alpha\text{1-2Man}\alpha\text{1-3Man}\alpha\text{1-2Man}\alpha\text{1-2Man} \end{array}$
DP6	$\begin{array}{c} \textcircled{\text{p}} \\ \\ \text{6} \\ \text{Man}\alpha\text{1-2Man}\alpha\text{1-2Man}\alpha\text{1-2Man}\alpha\text{1-2Man} \end{array}$
DP8	$\begin{array}{c} \textcircled{\text{p}} \\ \\ \text{6} \\ \text{Man}\alpha\text{1-2Man}\alpha\text{1-2Man}\alpha\text{1-2Man}\alpha\text{1-2Man}\alpha\text{1-2Man} \\ \alpha\text{1-6} \\ \alpha\text{1-6} \\ \text{Man} \end{array}$

I.2.2. Substrats issus de *C. albicans* (Δ BMT1) :

a- Analyse par spectrométrie de masse

L'analyse des oligomannosides neutres issus de la partie acido-stable du PPM de *C. albicans* (Δ BMT1) par spectrométrie de masse MALDI-TOF en mode positif avec la matrice DHB a confirmé leur degré de polymérisation (DP2 à DP8) et montre qu'ils sont relativement purs. Les ions majoritaires sont détectés sous forme $[M+Na]^+$ (**Figure 22**).

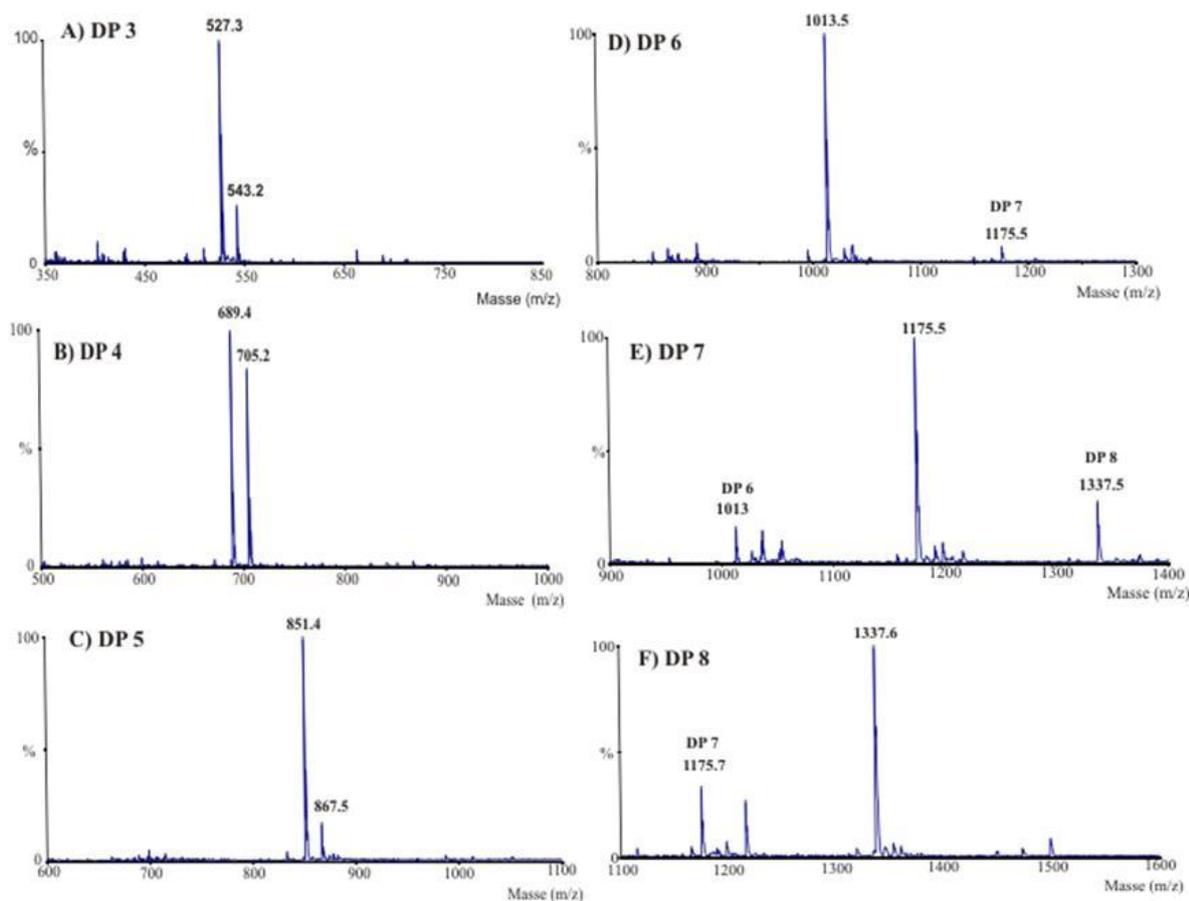


Figure 22 : Analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF des oligomannosides neutres purifiés de la partie acido-stable du PPM de *C. albicans* (Δ BMT1) ; DP3 (A), DP4 (B), DP5 (C), DP6 (D), DP7 (E), DP8 (F).

Les β -oligomannosides, isolés de la partie acido-labile ont été également analysés par spectrométrie de masse MALDI-TOF en mode positif avec la matrice DHB, avant et après couplage à la 2-AP, ce qui nous a permis de déterminer leur DP qui varie entre (DP2 à DP8). Ils ont également fait l'objet d'analyses en HPLC (détermination des temps de rétention) et par RMN (voir ci-dessous).

b- Analyse par résonance magnétique nucléaire

Nous avons établi la structure des oligomannosides issus des parties acido-stable et acido-labile du PPM de *C. albicans* (Δ BMT1) par plusieurs expériences RMN. Des spectres COSY90, TOCSY, HSQC et ROESY ont été enregistrés. A titre d'exemple nous allons détailler l'interprétation de quelques spectres RMN obtenus après analyse de deux oligomannosides de DP4 : le premier est issu de la partie acido-stable (**Figure 23**), le deuxième est issu de la partie acido-labile (**Figure 24**).

Concernant le 1^{er} composé nommé DP4ca, la région anomérique du spectre ¹H (**Figure 23A**) montre la présence de quatre signaux (A ; 5.37) (B ; 5.29), (C ; 5.28) et (D ; 5.04) qui ont été attribués aux protons anomères des monosaccharides (mannoses) identifiés. Cette observation est confirmée sur le spectre TOCSY (**Figure 23B**) où on peut distinguer le système de spin ainsi que les constantes de couplage de tous les résidus monosaccharidiques (A, B, C et D) (³J_{1,2} G, ³J_{2,3} G, ³J_{3,4} P, ³J_{4,5} P). Cette expérience nous a permis d'affirmer sans ambiguïté la nature des monosaccharides ainsi que leurs anoméries (α-mannose). L'identification des substitutions a été réalisée à l'aide de nombreuses références disponibles ainsi cet oligomannoside DP4ca est défini comme étant : **Manα1-2Manα1-2Manα1-2Man**.

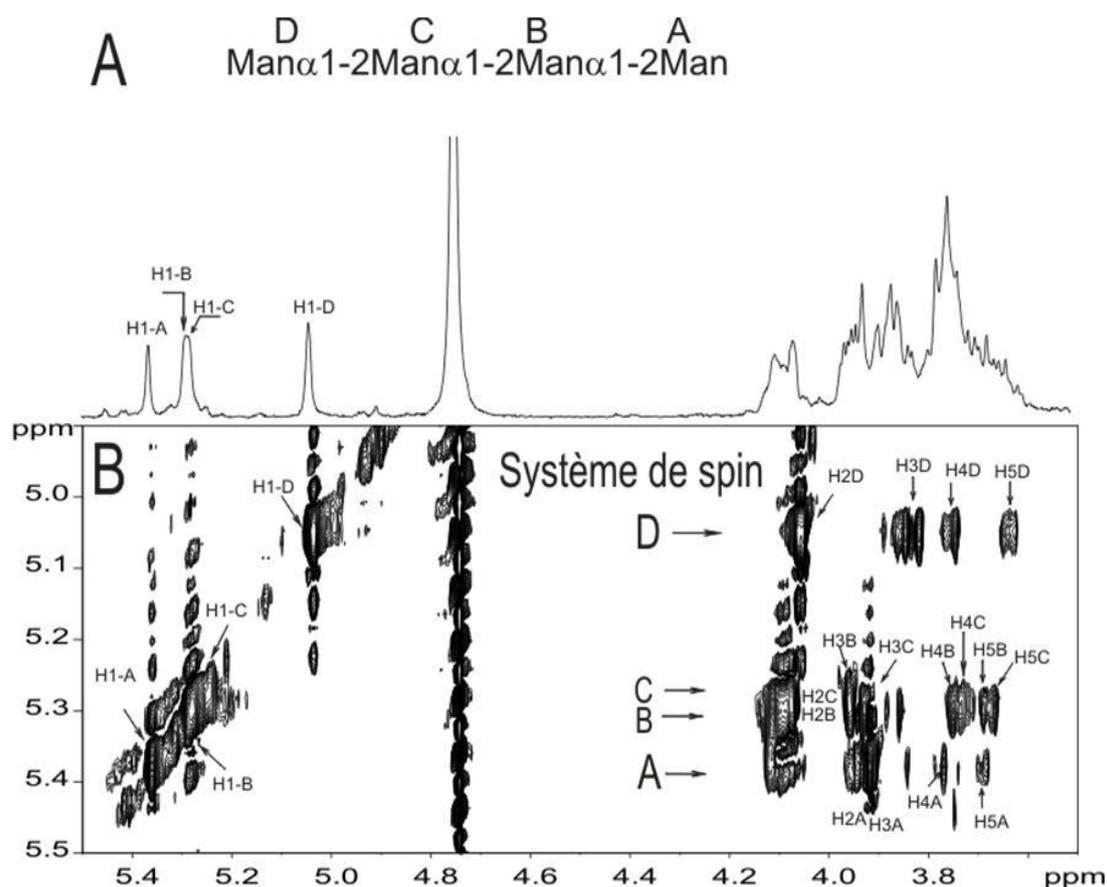


Figure 23 : Analyse RMN du tétramannoside (DP4ca) isolé de la partie acido-stable du PPM de *C. albicans* ΔBMT1. A spectre protons ¹H, B spectre ¹H-¹H/TOCSY. Les expériences ont été effectuées à 300°K dans le D₂O en utilisant l'acétone comme standard interne.

D'autre part, l'analyse du spectre ¹H proton (**Figure 24 A**) du 2^{ème} composé nommé DP4β nous a permis d'identifier huit signaux : quatre majeurs (A, B, C, D) et quatre mineurs (a, b, c, d) correspondant aux protons anomères. En effet, dans l'eau, la forme prédominante du mannose est la forme alpha-D-mannopyranose (67%), ainsi la conformation la plus stable

en solution de l'oligomannoside (DP4 β) est représentée par les quatre signaux majeurs et la conformation la moins stable est représentée par les quatre signaux mineurs (a, b, c, d). Sur le spectre ^1H proton (**Figure 24 A**), on peut également distinguer sans ambiguïté les déplacements chimiques des protons anomères (B ; 4.84 ppm), (C ; 4.93 ppm) et (D ; 4.92 ppm) des β -mannoses qui sont inférieurs à celui de l' α -mannose (A ; 5.27 ppm) ainsi que les **H5 Man β** = 3.3 ppm qui sont très visibles. Cette observation a été confirmée sur le spectre ^1H - ^{13}C HSQC (**Figure 24 B**), en effet, le signal ^1H - ^{13}C 3.35/77 ppm est caractéristique des H-5/C-5 d'un résidu β -mannose comme décrit chez la souche NIH B-792 de *C. albicans* (Shibata *et al*, 1993). Enfin, l'observation des carbones C2 des mannoses (A, B, C) et (a, b, c) montre que les déplacements chimiques, comparés à ceux de la littérature, ont des valeurs qui correspondent à des carbones fortement déblindés, ils traduisent ainsi une substitution sur ces carbones.

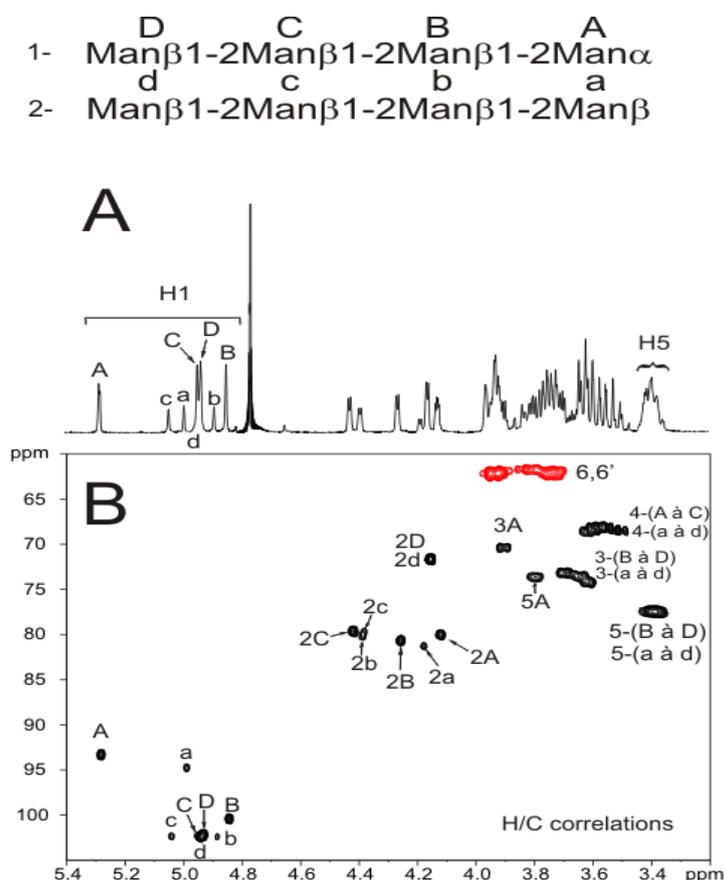


Figure 24 : Analyse RMN du tétramannoside (DP4 β) isolé de la partie acido-labile du PPM de *C. albicans* Δ BMT1. A spectre protons ^1H , B spectre ^1H - ^{13}C /HSQC. Les expériences ont été effectuées à 300°K dans le D2O en utilisant l'acétone comme standard interne. Les valeurs des déplacements chimiques sont indiquées dans le tableau ci-dessous (Tableau 9).

Le tableau N°9 résume les déplacements chimiques des protons et carbones des résidus de mannose constituant le tétramannoside (DP4 β) issu de la partie acido-labile du PPM de *C. albicans* Δ BMT1

Tableau 9 : Valeurs des déplacements chimiques des protons (^1H) et carbones (^{13}C) en ppm des résidus de mannose constituant le tétramannoside (DP4 β).

Residus	Déplacements chimiques (ppm) DP4 β					
	H1/C1	H2/C2	H3/C3	H4/C4	H5/C5	H6-6'/C6
A	5.27/93.3	4.12/80	3.89/70.3	3.59/68	3.80/73.38	3.7-3.9/61
B	4.84/100.4	4.25/80.6	3.68/72.8	3.50/68	3.39/77	3.7-3.9/61
C	4.93/100.1	4.42/79.6	3.63/73.1	3.58/68	3.35/77	3.7-3.9/61
D	4.92/102.2	4.15/71.6	4.61/73.9	3.57/68	3.38/77	3.7-3.9/62
a	4.99/94.6	4.17/81.3	3.68/71.3	3.50/68	3.39/77	3.7-3.9/61
b	4.84/100.4	4.38/80.5	3.68/72.8	3.58/68	3.35/77	3.7-3.9/61
c	5.04/102.4	4.38/79.7	3.63/73.1	3.57/68	3.38/77	3.7-3.9/61
d	4.93/102.3	4.15/71.6	3.65/73.6	3.52/68	3.38/77	3.7-3.9/62

Ainsi de la même manière la structure de tous les α et β oligomannosides provenant de *C. albicans* Δ BMT1 a été déterminée.

Les informations complémentaires concernant les analyses RMN, ainsi que les masses et les temps de rétention (en HPLC) des composés utilisés ultérieurement, sont décrites dans les données supplémentaires de l'article N°2 sur la caractérisation de Bmt1p (Table S1 et figure S3).

I.2.3. Conclusion

Nos résultats sur les oligomannosides purifiés ont suggéré quelques spécificités structurales liées au genre des levures. En effet, les analyses structurales des substrats identifiés issus des PPM de la levure *Saccharomyces cerevisiae* ont montré que ces derniers sont majoritairement de structure branchée et se terminent notamment par des mannoses liés en α -1,3 (**Tableau 10**). De plus, la taille des oligomannosides neutres issus des PPM de la levure *Saccharomyces cerevisiae* varie de DP2 à DP19. D'autre part, l'identification structurale des α - et β -oligomannosides, obtenus respectivement à partir des parties acido-stable et acido-labile du PPM de souche de *C. albicans* déficiente en CaBmt1 a montré qu'ils sont de degré de polymérisation (DP) de 2 à 8. Les structures α -mannosidiques, potentiellement équivalentes aux substrats endogènes de CaBmt1, sont composées d'un

mélange de structures linéaires et branchées et se terminent majoritairement par des mannoses liés en α -1,2 (**Tableau 10**). Par ailleurs, les structures β -mannosidiques présentent des structures linéaires formées par la répétition d'unités de mannose liées en β -1,2. Pour résumer le **tableau 10** présente un récapitulatif des principaux α -oligomannosides purifiés et caractérisés individuellement par spectrométrie de masse MALDI-TOF et par RMN, et utilisés comme substrats après couplage à la 2-AP afin de caractériser l'activité enzymatique de CaBmt1.

Tableau 10 : Structure des α -oligomannosides neutres isolés à partir du PPM de *S. cerevisiae* et de la partie acido-stable du PPM de *C. albicans* de la souche déficiente en CaBmt1.

DP	α -Oligomannosides neutres	
	PPM <i>S. cerevisiae</i>	PPM <i>C. albicans</i> (Δ BMT1)
DP2	—	Man α 1-2Man
DP3	Man α 1-2Man α 1-2Man	Man α 1-2Man α 1-2Man
DP4	Man α 1-3Man α 1-2Man α 1-2Man	Man α 1-2Man α 1-2Man α 1-2Man
DP5	Man α 1-2Man α 1-6 Man α 1-2Man α 1-2Man	Man α 1-3Man α 1-2Man α 1-2Man α 1-2Man
DP6	Man α 1-2Man α 1-6 Man α 1-3Man α 1-2Man α 1-2Man	Man α 1-2Man α 1-3Man α 1-2Man α 1-2Man α 1-2Man
DP7	Man α 1-3Man α 1-2Man α 1-6 Man α 1-3Man α 1-2Man α 1-2Man	Man α 1-2Man α 1-6 Man α 1-2Man α 1-6 Man α 1-2Man α 1-2Man
DP8	Man α 1-3Man α 1-2Man α 1-2Man α 1-6 Man α 1-3Man α 1-2Man α 1-2Man	Man α 1-6 Man α 1-2Man α 1-6 Man α 1-2Man α 1-6 Man α 1-2Man α 1-2Man

I.3. Substrats de synthèse

Nous disposons également de substrats synthétiques de degré de polymérisation DP3 et DP4 couplés à un fluorophore (mantyl) (**Figure 25**), préparés par l'équipe du Dr JM Mallet (ENS Paris) afin de compléter la caractérisation de l'enzyme CaBmt1. Ces derniers ont été séparés par chromatographie sur Bio-gel P2, analysés par HPLC en phase normale, ainsi que par spectrométrie de masse MALDI-TOF et par RMN. Les travaux portant sur les différentes étapes de synthèse des substrats mantylés sont détaillés dans l'article N°1 joint en annexe et intitulé : **Mantyl tagged oligo α (1-> 2) mannosides as *Candida albicans* β -mannosyltransferases substrates : a comparison between synthetic strategies** publié dans *RSC Advances* (**Pourcelot et al, 2013**).

Les données RMN supplémentaires du tétramannoside mantylé DP4M sont présentées dans l'article N°2 (caractérisation de Bmt1p, *Biochem. J.* 2014) en Supplementary data (Figure S4 et Table S2).

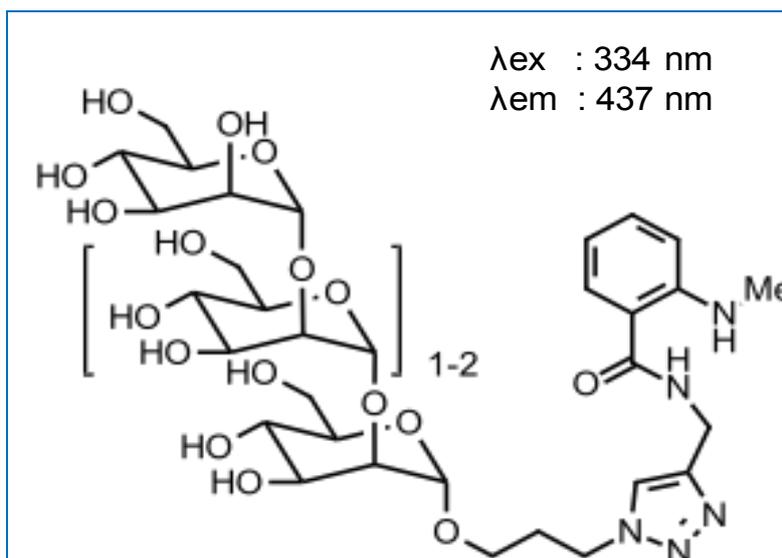


Figure 25 : Structure des substrats de synthèse (DP3M) et (DP4M) couplés au mantyl.

Chapitre II : Bmt1 ; activité enzymatique *in vitro*

II.1. Introduction : Stratégie expérimentale

La β -1,2 mannosyltransférase étudiée : CaBmt1 est impliquée *in vivo* dans l'initiation de la β -mannosylation sur la partie acido-stable du phosphopeptidomannane (PPM) de *C. albicans*. Cette enzyme constitue une cible thérapeutique car elle ne présente pas d'homologue chez l'homme. Au sein de notre équipe nous nous sommes intéressés à l'étude de son activité *in vitro* afin de comprendre son mécanisme d'action, sa spécificité de substrats, sa vitesse catalytique et à terme sa conformation. Afin de réaliser ces objectifs, CaBmt1 a été produite au laboratoire sous forme recombinante, notamment chez *Pichia Pastoris*, cette dernière est appelée Bmt1p (ce terme sera utilisé dans la suite de cette exposé). Cette forme recombinante Bmt1p a été testée en présence de tous les substrats disponibles : naturels et synthétiques. Les produits obtenus (détectés en HPLC par fluorescence) ont alors été traités par des α -mannosidases pour vérifier leur résistance à la dégradation par ces enzymes. Certains de ces produits résistants aux α -mannosidases ont été purifiés puis analysés par spectrométrie de masse MALDI-TOF pour déterminer leur degré de polymérisation, ensuite par RMN afin de caractériser leur structure exacte.

II.2. Production et expression de Bmt1

II.2.1. Choix du système d'expression : système eucaryote (*Pichia pastoris*)

L'un des systèmes eucaryotes les plus utilisés pour l'expression de protéines recombinantes est le système *Pichia Pastoris* qui a présenté de nombreux avantages dans notre étude :

- 1- La protéine d'intérêt surexprimée est excrétée par la levure dans le surnageant de culture sous forme soluble ; à cette étape, la protéine recombinante est déjà pré-purifiée.
- 2- Le fait de privilégier le système eucaryote (levure), quand il s'agit de la production d'une protéine eucaryote, a l'avantage de préserver les modifications post-traductionnelles de l'enzyme surexprimée ainsi que sa bonne mise en conformation.
- 3- Au sein de notre laboratoire, un protocole performant a été mis au point pour la production de protéines recombinantes chez *Pichia Pastoris* avec des taux de production

élevés. De plus, ce système est peu coûteux ; les souches de *Pichia pastoris* ainsi que les vecteurs utilisés sont disponibles commercialement.

4- D'autres formes recombinantes de Bmt1 ont été produites chez *E. Coli* dans notre équipe. Cependant, lors des différents tests d'activités enzymatiques en présence de Bmt1p produite chez *E. coli*, aucune activité enzymatique n'a pu être détectée.

II.2.2. Structure de CaBmt1

CaBmt1 (**Candida albicans β -1,2 mannosyltransférase 1**) est une enzyme Golgienne de type II organisée en différents domaines : un domaine N-terminal cytosolique suivi d'un segment transmembranaire hydrophobe de 20 acides aminés servant de point d'ancrage à la membrane de l'appareil de Golgi, puis une zone « tige » peu structurée enfin le domaine catalytique en C-terminal dans lequel on peut constater la présence d'un segment hydrophobe représenté en jaune (**Figure 26**).

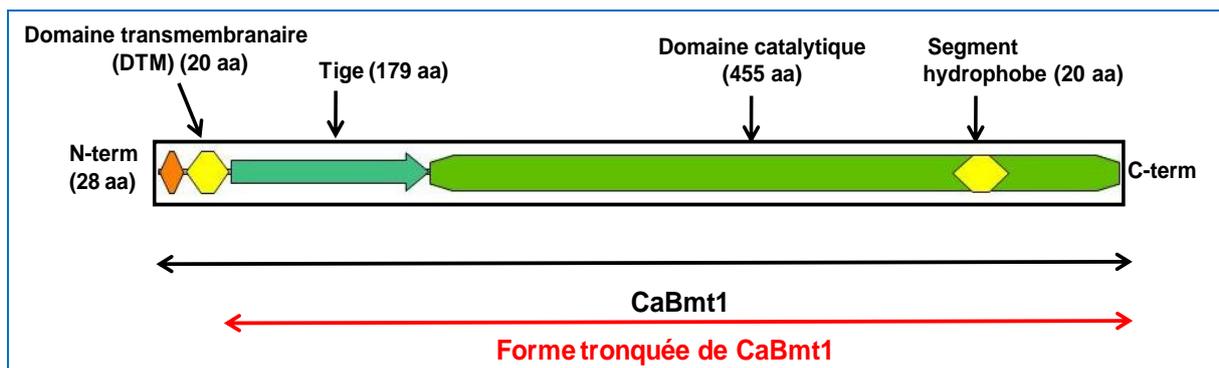


Figure 26 : Représentation schématique de la séquence protéique codée par le gène CaBMT1 et de sa forme tronquée juste en aval du segment transmembranaire produite chez *Pichia Pastoris*.

II.2.3. Etapes de production de Bmt1p

Les différentes étapes de production de Bmt1p sont résumées dans la **figure 27**. Dans un premier temps, le gène CaBMT1 codant pour une forme tronquée de l'enzyme (Bmt1p) juste en aval du segment transmembranaire (**Figure 26**) a été cloné dans le vecteur navette *E. coli-Pichia* pPICZaA, entre les sites de restriction EcoRI et XbaI (**Figure 28 A**) . Ensuite, la transformation de la souche (X-33) de *Pichia Pastoris* a été effectuée par électroporation après avoir linéarisé le vecteur par l'enzyme de restriction BstXI. L'étalement sur boîtes d'YPD-Agar + Zéocine à différentes concentrations a permis de sélectionner les meilleurs clones producteurs. En effet un clone résistant à une plus forte concentration en Zéocine est

un clone qui aura intégré un plus grand nombre de copies du gène de résistance, et donc du gène d'intérêt. Il surexprimera donc au final une plus grande quantité de la protéine d'intérêt.

Le clone donnant le meilleur niveau d'expression de la protéine d'intérêt a ensuite été cultivé dans des erlenmeyers bafflés. Le surnageant de culture contenant la protéine d'intérêt surexprimée a été récupéré ; enfin, les différents détergents utilisés (Triton X100, Tween 20) ont pu être ajoutés avant stockage d'aliquots à 4°C et -80°C. Ce protocole a permis d'obtenir avec Bmt1p une concentration protéique de l'ordre de 40 mg/L de surnageant de culture.

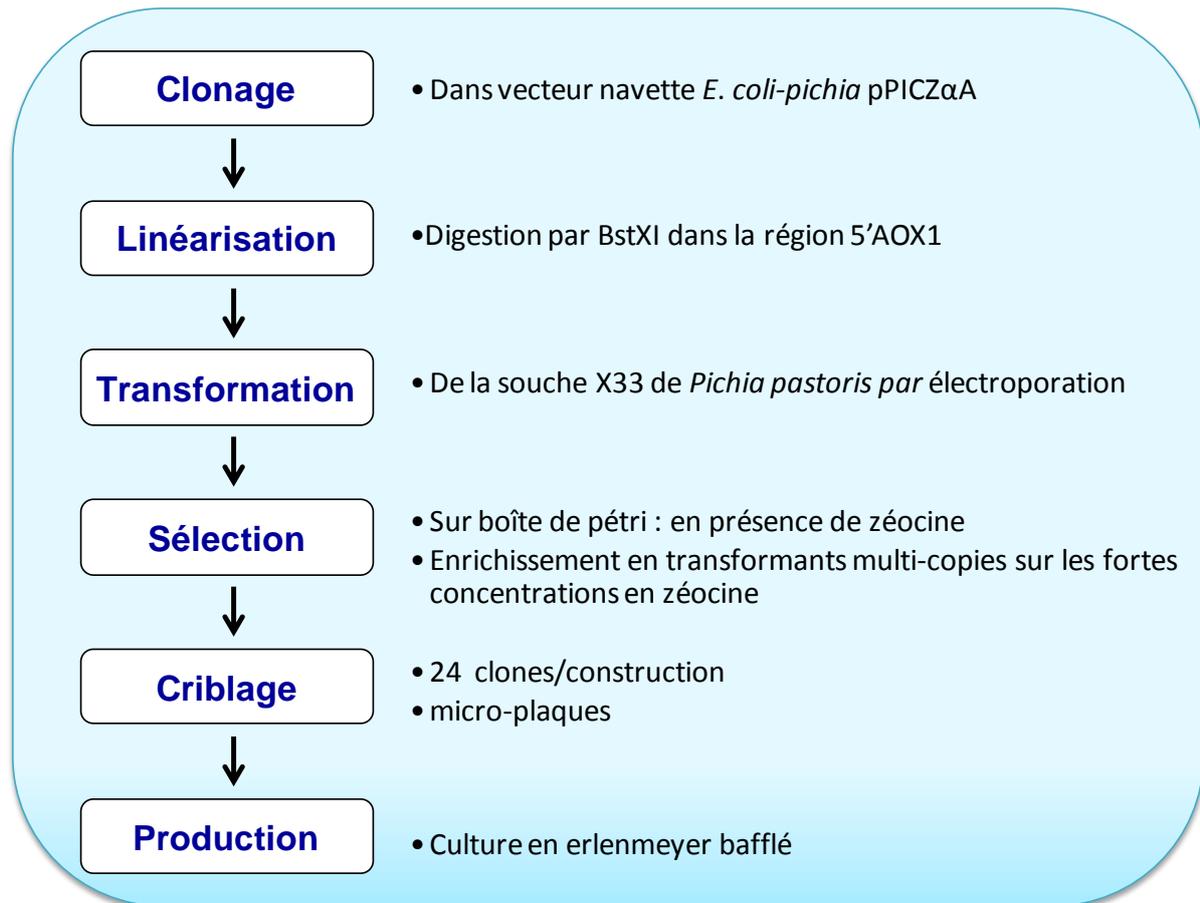


Figure 27 : Les étapes de la production recombinante de Bmt1p chez *Pichia pastoris*.

Ainsi, grâce à ce vecteur (pPICZalpha A-S1a), le gène cloné est sous le contrôle du promoteur pAox1, inductible au méthanol, et en fusion côté 5' avec la séquence codant pour l' α facteur qui permet la sécrétion de la protéine d'intérêt (**Figure 28 A**). L'ensemble des tests d'activités enzymatiques qui vont être présentés dans la suite de cet exposé ont été effectués avec l'enzyme recombinante Bmt1p qui a été produite sans étiquette 6xHis du côté N-terminal. En effet nous n'avons détecté aucune activité enzymatique avec les formes

recombinantes de Bmt1 produites avec l'étiquette 6xHis du côté N-terminal ou du côté C-terminal ; c'est pour ces raisons qu'une mutagenèse dirigée a été réalisée au sein de notre équipe afin de retirer l'étiquette 6xHis. L'analyse SDS-PAGE des surnageants de culture de *P. pastosis* montre la présence d'une forme pré-purifiée de Bmt1p (sans étiquette 6xHis) de taille 74.1 KDa (**Figure 28 B**). Préalablement aux tests d'activités enzymatiques en présence de Bmt1p, les PPM présents dans les surnageants de culture de *Pichia Pastoris* ont été éliminés par chromatographie sur ConA-Sepharose.

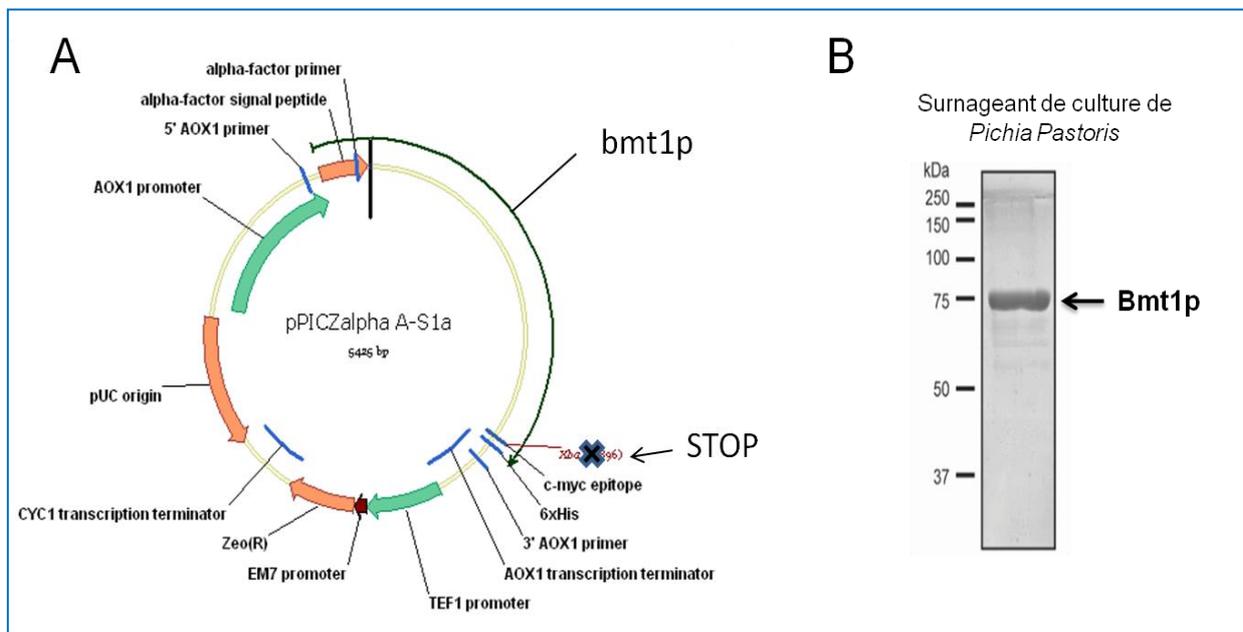


Figure 28 : Production de Bmt1p chez *Pichia pastoris*. **(A)** Représentation schématique du vecteur d'expression pPICZalpha A-S1a utilisé pour la production des formes recombinantes de Bmt1p chez *P. pastoris*. **(B)** Analyse SDS-PAGE du surnageant de culture de *P. pastoris* contenant l'enzyme sécrétée Bmt1p. Electrophorèse SDS-PAGE sur gel d'acrylamide 15%, coloration Instant Blue. Le marqueur de masse moléculaire utilisé était le Precision Plus Protein Standard (Bio-Rad) (250-37 KDa).

II.3. Etude de l'activité enzymatique de Bmt1p

II.3.1. Présentation des tests d'activité réalisés

Afin de caractériser l'activité enzymatique de Bmt1p, produite sous forme soluble chez *Pichia Pastoris*, les tests d'activité enzymatique ont été réalisés avec Bmt1p en présence des différents substrats disponibles (naturels et synthétiques) avec détection des produits formés en HPLC (par fluorimétrie). Au préalable, le milieu de culture de *Pichia Pastoris* contenant le

vecteur vide (témoin négatif) a été testé en présence des différents substrats présentés précédemment (**Tableau 10**) pour vérifier si celui-ci était capable de transférer un mannose sur les oligomannosides testés. Les résultats obtenus ont confirmé que *P. pastoris* n'excrète pas de mannosyltransférase dans le surnageant de culture.

L'ensemble des résultats obtenus à partir des tests d'activité enzymatique en présence de Bmt1p, avec des substrats naturels issus du PPM de *S. cerevisiae* (DP3 à DP8), ou des substrats endogènes issus du PPM de *C. albicans* souche Δ BMT1 (DP2 à DP6), ou des substrats de synthèse (DP3 et DP4), sont présentés dans l'article N°2 correspondant à la (Caractérisation de Bmt1, *Biochem. J.* 2014) qui est intégré dans cette thèse dans la partie II.3.4.

II.3.2. Substrats synthétiques et premiers essais de cinétique enzymatique

L'équipe du Pr. J.M. Mallet (ENS Paris) a développé différentes stratégies de synthèse d'oligomannosides couplés à un fluorophore qui est le mantyl (voir l'article n°1 mis en annexe, **Pourcelot et al. 2013**). Ces derniers présentent deux avantages majeurs : le premier réside dans la présence d'un bras espaceur entre le fluorophore et l'oligomannoside natif. Ce bras espaceur permet alors de protéger l'oligomannoside marqué et de garder ainsi sa conformation initiale, contrairement au couplage à la 2-aminopyridine qui s'effectue directement sur l'extrémité réductrice du premier mannose causant ainsi l'ouverture du cycle et une légère modification de sa conformation. Le deuxième avantage est la grande sensibilité du fluorophore (mantlyl) qui nous a permis de détecter aisément les produits de la réaction enzymatique formés en présence de Bmt1p.

Les oligomannosides mantylés de degrés de polymérisation DP3M et DP4M préparés par l'équipe du Pr. J.M. Mallet (ENS Paris) nous ont permis alors d'évaluer l'activité enzymatique de Bmt1p *in vitro*. Dans ce contexte, nous avons réalisé des études de cinétique enzymatique en présence des oligomannosides DP3M ou DP4M comme substrat accepteur, de Bmt1p et du GDP-Man comme substrat donneur. A titre d'exemple, **la figure 29** illustre les résultats de cinétique enzymatique obtenus en présence du DP3-mantlyl (composé A), de Bmt1p ainsi que du GDP-Man à quatre temps d'incubation différents compris entre 0 et 48 heures. Le suivi des produits formés au cours du temps a été réalisé par HPLC en phase normale couplée à un détecteur de fluorescence (FL-NP-HPLC). L'analyse des chromatogrammes obtenus montre que Bmt1p est capable de catalyser la formation de deux produits de taille supérieure nommés [A DP + 1] et [A DP + 2] et que le premier produit [A

DP + 1] se forme dès 4h d'incubation. Ce dernier a été caractérisé par spectrométrie de masse en mode MALDI-TOF sous forme $[M + Na]^+$ à m/z 960,8 comme un tetra-mannoside mantylé (DP4M).

Ensuite, un second produit nommé [A DP + 2] se forme après 4h d'incubation et s'accumule pendant 48h pour représenter environ 30% du substrat consommé. Ce dernier a été également identifié par spectrométrie de masse sous forme $[M + Na]^+$ à m/z 1122,7 comme un penta-mannoside mantylé (DP5M). Les produits formés sont résistants à l'action des α -exomannosidases. En revanche, le composé A est totalement dégradé après action des α -exomannosidases (ManAse) (**Figure 29**). Ces premiers résultats ont suggéré que Bmt1p était capable de transférer séquentiellement deux résidus de mannose en configuration β sur le substrat accepteur DP3M (Man α 1-2Man α 1-2Man-Mantyl). Cette hypothèse a été confirmée par la suite par la caractérisation structurale complète des produits formés sous l'action de Bmt1p sur le DP4M, décrite dans la suite de ce travail (article n°2, partie II.3.4).

Nous avons également déterminé la zone de linéarité d'action de Bmt1p grâce aux expériences de cinétique enzymatique en présence des substrats fluorescents. Les résultats obtenus montrent que l'activité enzymatique de Bmt1p est linéaire pendant 48h à 28°C.

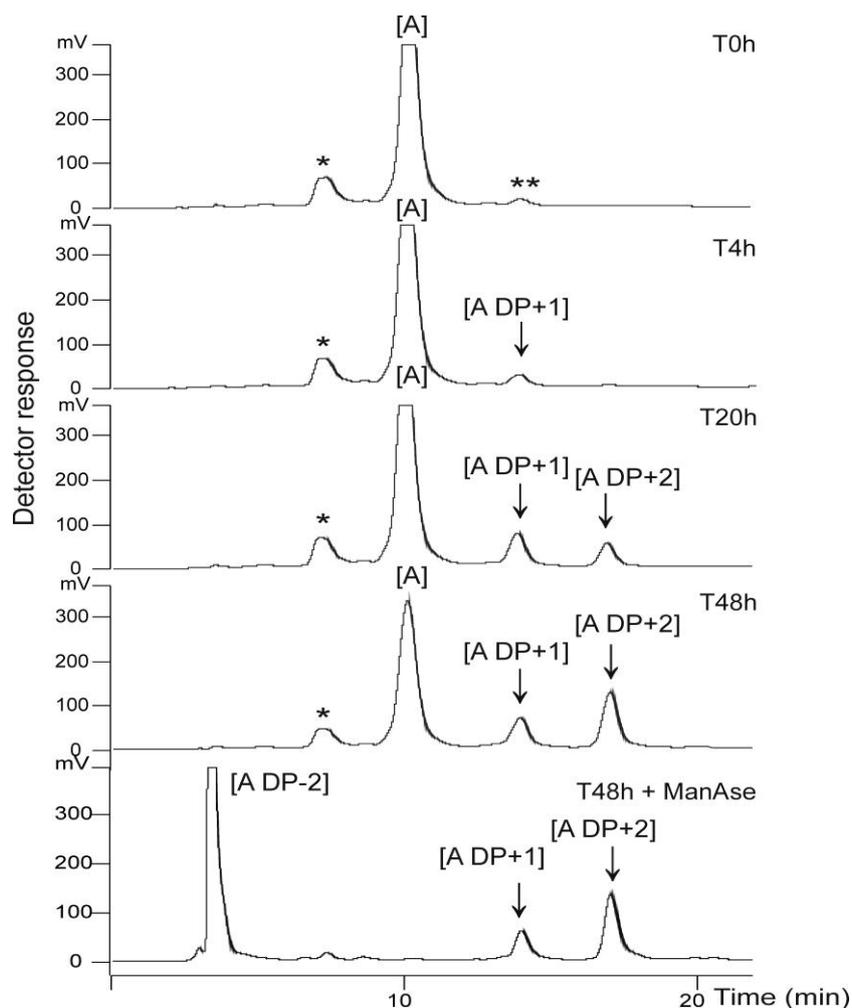


Figure 29 : Etude de la cinétique enzymatique de Bmt1p en présence du DP3-Mantyl [A] à différents temps d'incubation (0h, 4h, 20h et 48h à 28 ° C) par HPLC. [A DP + 1] et [A DP + 2] ont été produits de façon séquentielle au cours de la durée de la réaction enzymatique. Ils sont résistants à l'action des α -exomannosidases tandis que le substrat accepteur (DP3M) [A] et les contaminants (* et **) sont complètement hydrolysés après action des α -exomannosidases (Pourcelot *et al.*, 2013) : (Article N°1 en annexe).

II.3.3. Résumé de l'article N°2 (Caractérisation de Bmt1p) présenté en II.3.4

Le travail présenté dans cet article a porté sur la caractérisation de l'activité enzymatique de la β -1,2 mannosyltransférase CaBmt1 de *C. albicans*. En effet, CaBmt1 est la 1^{ère} enzyme initiatrice de la voie de biosynthèse des beta-mannosides terminaux présents sur le phosphopeptidomannane (PPM), glycoconjugué pariétal de *C. albicans*. L'objectif de cet article était d'une part, la préparation de plusieurs substrats potentiels, distincts en termes de liaisons et de longueur de chaînes, dans le but de mieux comprendre la spécificité de reconnaissance de cette enzyme, et d'autre part la production d'une forme recombinante de

CaBmt1 dite Bmt1p afin de caractériser son activité enzymatique. Dans ce contexte, comme il a été développé dans le chapitre I de cette partie A, un panel d'oligomannosides ont été isolés et purifiés des PPM de *Saccharomyces cerevisiae* (PPM de structure similaire à celle du PPM de *C. albicans* sans les β -1,2 mannosides terminaux) et de souche de *C. albicans* déficiente en CaBmt1 afin d'avoir l'équivalent des substrats endogènes de l'enzyme. La structure de ces oligomannosides neutres, de degré de polymérisation de 2 à 8, a été déterminée précisément par spectrométrie de masse MALDI-TOF et par RMN. Ces substrats naturels, après couplage à un fluorophore (la 2-Aminopyridine), et des substrats synthétiques mantylés (mentionnés précédemment) ont été testés comme accepteurs potentiels de l'enzyme recombinante Bmt1p produite au laboratoire sous forme soluble chez *Pichia pastoris*.

L'ensemble de ces travaux nous ont permis de caractériser pour la première fois l'activité de la β -1,2 mannosyltransférase de *Candida albicans* (Bmt1p), *in vitro*, par l'identification des produits formés par spectrométrie de masse en mode MALDI-TOF et RMN, la détermination de sa spécificité de substrat, ainsi que l'établissement des conditions optimales de son activité enzymatique.

Nous avons démontré que Bmt1p peut transférer séquentiellement deux résidus de mannose en β sur l'extrémité non réductrice des DP3 et DP4 (α -1,2-oligomannosides linéaires) *in vitro*.

II.3.4. Article N°2 (*Biochem. J.*, (2014), 457: 347-360)

Characterization of the recombinant *Candida albicans* β -1,2 mannosyltransferase that initiates the β -mannosylation of cell-wall phosphopeptidomannan

Ghenima Sfihi-Loualia*†¹, Emeline Fabre*†¹, Marilyne Pourcelot‡, Bernadette Coddeville*†, Frédéric Krzewinski*†, Julie Bouckaert*†, Emmanuel Maes*†, Thomas Hurtaux*†, Romaric Dubois†, Chantal Fradin§||, J. Maurice Mallet‡, Daniel Poulain§||, Florence Delplace*† and Yann Guerardel*†².

*Université de Lille1, Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, UGSF, F-59650 Villeneuve d'Ascq, France ; †CNRS, UMR 8576, F-59650 Villeneuve d'Ascq, France ; ‡Université Paris 6, Ecole Normale Supérieure, Département de Chimie, UMR CNRS 7203, 75005 Paris, France ; §UDSL, Lille, France ; ||INSERM U995, Lille, France.

¹ These two authors contributed equally to this work

² To whom correspondence should be addressed. Yann Guérardel; e-mail: Yann.guerardel@univ-lille1.fr

SHORT TITLE: Synthesis initiation of β -mannans in yeasts

KEY WORDS

Yeast, cell wall, beta-mannose, synthesis, glycosyltransferase.

ABSTRACT

The presence of β -mannosides in their cell walls confers specific features on the pathogenic yeasts *Candida albicans* and *Candida glabrata* compared with non-pathogenic yeasts. In the present study, we investigated the enzymatic properties of Bmt1 (β -mannosyltransferase 1), a member of the recently identified β -mannosyltransferase family, from *C. albicans*. A recombinant soluble enzyme lacking the *N*-terminal region was expressed as a secreted protein from the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. In parallel, functionalized natural oligosaccharides isolated from *S. cerevisiae* and a *C. albicans* mutant strain as well as synthetic α -oligomannosides were prepared and used as potential acceptor substrates. Bmt1p preferentially utilizes substrates containing linear chains of α -1,2 linked mannotriose or mannotetraose. The recombinant enzyme consecutively transfers two mannosyl units onto these acceptors, leading to the production of α -mannosidase-resistant oligomannosides. NMR experiments further confirmed the presence of terminal β Man (β -1,2-linked mannose) unit in the first enzyme product. In the future, a better understanding of specific β -1,2 mannosyltransferases molecular requirements will help the design of new potential antifungal drugs.

INTRODUCTION

The yeast *Candida albicans* belongs to the human commensal digestive and vaginal flora. Nevertheless, immunocompromised patients may develop systemic infections by *C. albicans* that are characterized by high morbidity and mortality [1]. As is the situation in other yeasts, the *C. albicans* cell wall is a complex structure containing a network of β -1,3 and β -1,6 glucans, surrounded by a mannose-rich glycoconjugate outer layer composed of PPM (phosphopeptidomannan; sometimes referred as ‘mannan’), mannoproteins and PLM (phospholipomannan). PPM and mannoproteins contain a wide panel of polymannosylated N- and O-glycans [2,3]. The PPM Nglycosidic fraction contains a (Man)₈(GlcNAc)₂ core extended by a polymannoside core containing up to 150 residues and phosphorylated mannosides (**Figure 1**), whereas mannoproteins are replaced by shorter oligomannosylated O-linked glycans [2]. Both the N- and O-glycans of *C. albicans* are further characterized by the presence of terminal β Man (β -1,2-linked mannose) residues that are also present in PLMs [4–8]. The β -mannosylated glycoconjugates have been repeatedly suggested to contribute to *C. albicans* pathogenicity through galectin-3-specific interactions [9–15]. Indeed, *C. albicans* β -mannosylated glycoconjugates elicit strong antibody secretion [16,17] and induce an efficient protection against mucosal track colonization in mice upon ingestion [15]. In spite of these numerous advances in the understanding of the functions of β Man in *C. albicans* physiopathology, the regulation of β -mannosylation is still poorly understood.

Numerous yeast mannosyltransferases were shown to be involved in either the initiation [18] or the elongation [19–21] of α -linked O-mannan and N-glycan α -polymannosyl outer side chains. It is only in more recent years that the enzymes responsible for the synthesis of β -mannosylated chains were identified in *C. albicans* as a new family of nine *BMT* (β -mannosyltransferase) genes [22]. Surprisingly, the amino acid sequences of Bmt proteins

exhibit very low similarities to the GTs (glycosyltransferases) known already, classified according to the CAZy (<http://www.cazy.org>) and Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) databases, which preclude their assignment to the GT-A or GT-B superfamily. Notably, all Bmt proteins, except for members 5 and 7, possess an Asp-Xaa-Asp motif, frequently described as a determining characteristic of the GT-A superfamily [23]. Referred to as the DXD motif (in which none of these residues are invariant), this tripeptide is often described to be dedicated to the co-ordination of a divalent cation and/or a ribose by carboxylates. The phenotypic analysis of individual BMT-deleted strains permitted us to partially establish the substrate specificity for six out of the nine identified enzymes. BMT1 and BMT3 act on the acid-stable moiety of PPM, BMT2–4 on the acid-labile moiety of PPM, and BMT5 and BMT6 act on PLM [22,24] (**Figure 1**). Furthermore, these data established that most enzymes sequentially transfer a single residue at a given position *in vivo*. Thus the originality of the BMT family lies not only in their protein structure, but also on the strict specificity of the reactions they catalyse. Moreover, considering that this family is restricted to a very limited set of pathogenic yeasts (*C. albicans*, *Candida glabrata* and *Candida tropicalis*) that are responsible of more than 90% of life-threatening yeast hospital infections and vaginal *Candida* infections, BMTs are promising targets for a new class of very specific antifungal drugs. Thus the aim of the present study was to provide new insights into basic BMT catalytic mechanisms, with the longer-term objective to guide the design of putative inhibitors.

In the present study, Bmt1p, tentatively identified as the enzyme that transfers the first β Man unit on to the PPM acid-resistant fraction (**Figure 1**), was overexpressed in *Pichia pastoris* to determine its *in vitro* activities. Panels of endogenous oligomannosides isolated from *Saccharomyces cerevisiae* and *C. albicans* mutant PPMs and synthetic α -oligomannosides were prepared and used as potential acceptor substrates. The results demonstrate that Bmt1p is a β -1,2-mannosyltransferase that can utilize terminal α -1,2-mannotriose and -mannotetraose as substrates and can catalyse the transfer of two consecutive β -mannosyl units. The present study provides essential clues to the exclusive requirements of this novel enzyme.

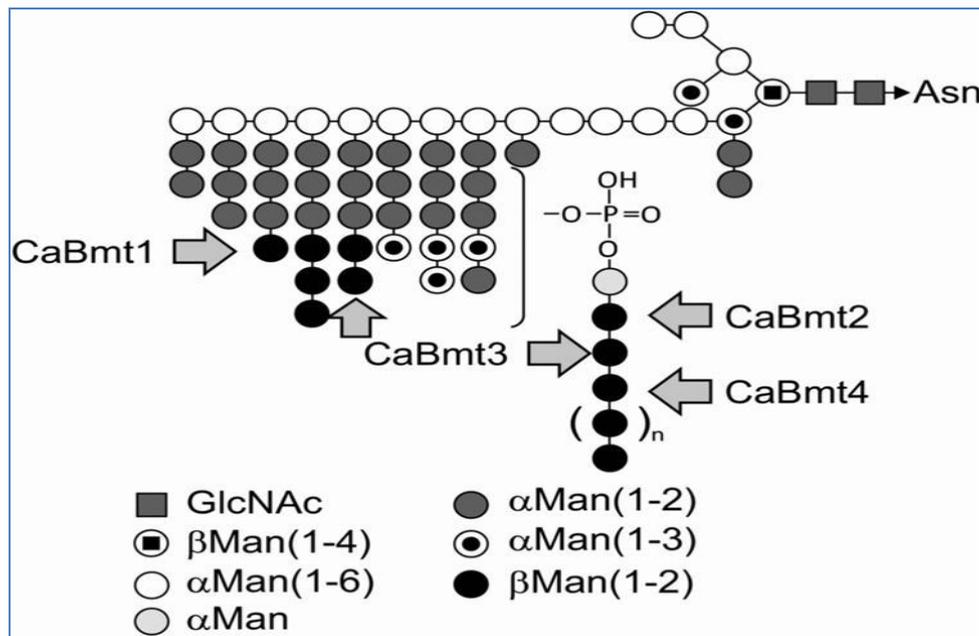


Figure 1: Schematic representation of N-glycan moiety from *C. albicans* PPM.

The arrows indicate the putative activity of the Bmt enzymes identified by Mille et al. [22]. CaBmt, *C. albicans* Bmt.

RESULTS

Production of recombinant Bmt1p in P. pastoris

BMT1 was predicted to encode a type II membrane protein (http://ccb.imb.uq.edu.au/golgi/golgi_predictor.shtml) [31a] of 79.786 kDa (Vector NTI Advance 11.0, Invitrogen) with a short cytoplasmic N-terminus (28 residues), followed by a membran spanning domain ([http://mobylye.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py# forms::toppred](http://mobylye.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py#forms::toppred), residues 29–49) [31b]. A second hydrophobic region (residues 561–581), interpreted as a ‘putative transmembrane segment’ by the TopPred software was localized at the C-terminal end of the protein (**Figure 2**). Alignment with Bmt1–4p permitted us to identify a large conserved C-terminal domain as the catalytic domain (AlignX, Vector NTI Advance 11.0, Invitrogen, residues 230–685). The remaining sequence, which was less conserved, was considered as the stem region (**residues 50–229, Figure 2C**).

To characterize the enzymatic activity of Bmt1p, we identified the most soluble and stable constructs on the basis of their domain organization. Three distinct truncated forms of Bmt1p were designed as proteins to be expressed in *P. pastoris* (results not shown). Out of those, only a single truncated protein, lacking the cytoplasmic N-terminus and the membrane-spanning domain, could finally be expressed and a soluble recombinant protein produced (**Figure 2D**). Its DNA coding sequence was cloned into the pPICZαA expression vector fused with a c-Myc epitope and a His6 C-terminal tag. The N-terminal cytoplasmic and transmembrane domains were replaced with the cleavable signal sequence α factor from *S.*

cerevisiae and the fusion protein was placed under the control of the *AOX1* (alcohol oxidase 1) promoter.

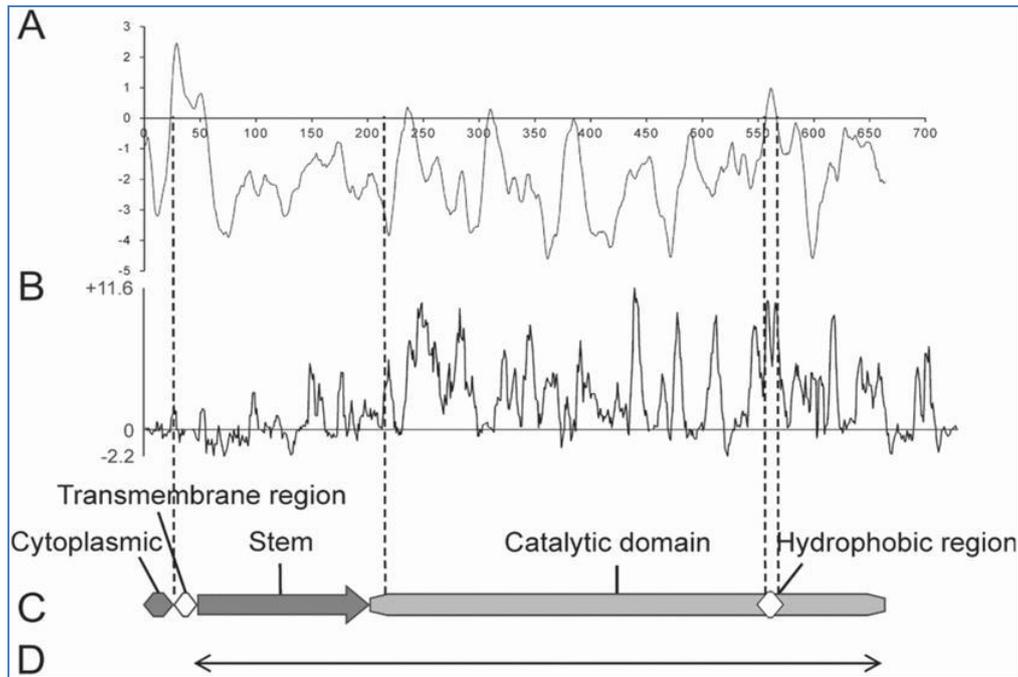


Figure 2: Functional domains of *Bmt1p*.

A- TopPred hydrophobicity profile of the entire *Bmt1p* sequence (<http://mobylye.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py#forms::toppred>). **B-** Profile of the multiple alignments obtained from *Bmt1-4p* sequences (AlignX, Vector NTI Advance 11.0, Invitrogen). This plot was calculated as the sum of all of the pairwise residue substitution scores at a given alignment position divided by the number of pairs in the alignment. **C-** Predicted *Bmt1p* functional domains. **D-** The truncated form of *Bmt1p* expressed in *P. pastoris*.

The size of the recombinant protein band was close to the predicted molecular mass of 76.3 kDa for the unglycosylated truncate and the protein was absent from the medium of the control cells (results not shown). Aliquots of culture supernatants (20 μ l) obtained at different times of induction (up to 72 h) were subjected to SDS/PAGE analysis, but no increase in the produced quantities was observed (**Figure 3A**). Several buffers were tested as potential induction mediums [Tris/maleate (pH 7.5), Tris/HCl (pH 7.5) or no buffer], without affecting the concentration of the secreted recombinant protein. Similar levels of expression were obtained with the *P. pastoris* strains KM71H and SMD1168H (**Figure 3A**).

In order to improve stability and to restore the *Bmt1p* native sequence, the three CUG codons (corresponding to amino acid residues 267, 369 and 662 of the native sequence) were mutated to encode serine residues. Although this codon is translated as a leucine residue in most organisms, in *C. albicans* and other *Candida* species the CUG codon is translated as both serine (95–97% of the time) and leucine (3–5% of the time) [31]. The C-terminal tags were then removed to introduce the native stop codon. A total of 24 new X-33 transformants

were screened for their expression using either BMMY or BMM as the induction medium. The latter, devoid of yeast extract (and consequently PPM), is considered less inhibitory for mannosyltransferase activity. Almost all the transformants exhibited significant expression of Bmt1p in BMMY medium (detected using Instant Blue staining). One clone in particular showed a high level of expression both in BMMY and BMM medium. This transformant was therefore cultivated in an Erlenmeyer flask containing BMM medium. When subjected to SDS/PAGE, the mobility of the protein band obtained was close to that for the predicted molecular mass of untagged Bmt1p (**74.1 kDa; Figure 3B**). The amount of protein produced was determined by densitometry of the Instant Blue staining of the SDS/PAGE gels. It was estimated that approximately 40 mg of Bmt1p per litre of BMM medium was produced

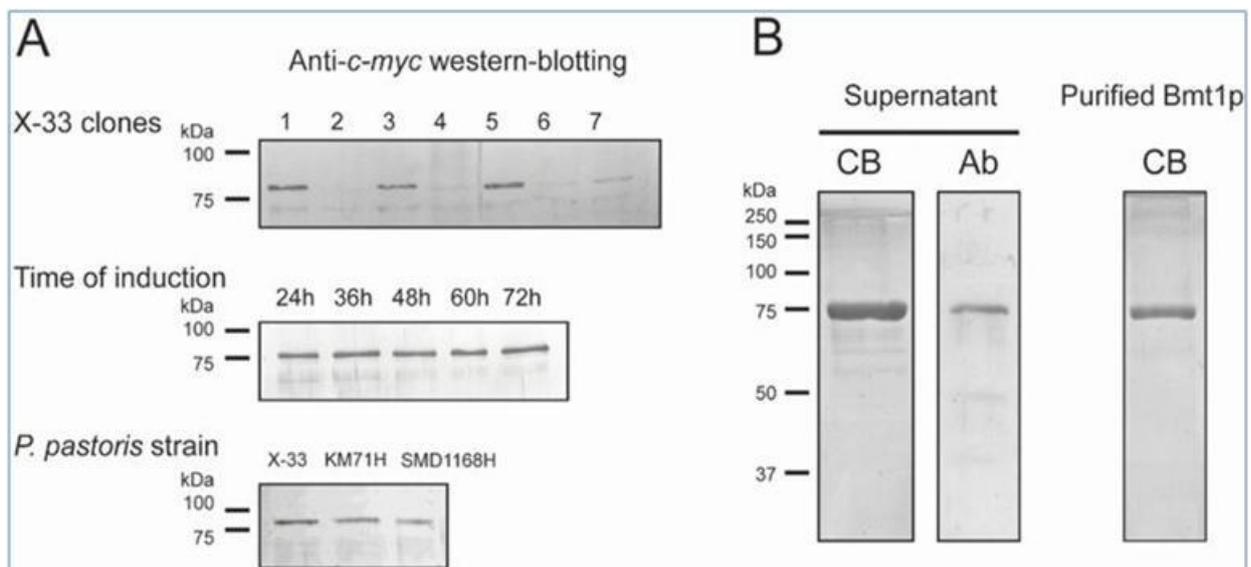


Figure 3: SDS/PAGE and western blot analysis of recombinant Bmt1p production.

A- Western blotting analysis of culture supernatants using the anti-c-myc antibody to detect positive clones in the X-33 *P. pastoris* strain. Aliquots obtained at different induction times (up to 72h) did not allow the observation of any increase in Bmt1p production. Similar levels of expression were obtained with *P. pastoris* strains KM71H and SMD1168H. **B-** Culture supernatants or purified Bmt1p corresponding to the untagged protein were detected either with Coomassie blue (CB) or by western blotting using the anti-Bmt1p antibody (Ab). Molecular mass is given on the left-hand side in kDa.

Bmt1p solubilization

Although produced at a good yield in the culture supernatant, it appeared that the solubility of Bmt1p decreased drastically when kept at 4°C. DLS analysis of final culture supernatants revealed the presence of aggregates with diameters varying from 20–1000 nm (**Figure 4C**), whereas a theoretical radius of 4 nm was expected for soluble Bmt1p monomers [26].

Therefore, before the activity assays, we first established the best conditions for the long-term solubilization of Bmt1p. In order to prevent the formation of Bmt1p aggregates during its accumulation in the culture medium, either 0.1% CHAPS or 0.05% Tween 20 was added at the beginning of the induction period. Nevertheless, DLS still showed the presence of aggregates with an average size of 40 or 60 nm for the medium with the added CHAPS or Tween 20 respectively. As a first attempt, we tested the addition of PEG at 2–6% (v/v) to the supernatants previously obtained in the presence of 0.1%CHAPS in order to stabilize the putative hydrophobic regions. Distinct average-molecular-mass PEGs were assayed, ranging from 250 to 8000 and containing monomethylether or dimethylether groups, but aggregates from 16 to 250 nm were still observed. Detergents were then tested, including Triton X-100, LDAO (*N,N*-dimethyldodecylamine-*Noxide*), DDM (n-dodecyl- β -D-maltoside), OBG (n-octyl- β -Dglucoside), HM (heptyl mannose) and CHAPS, at two distinct concentrations: 20% above their respective CMC (critical micellar concentration) or 0.5%. Figure 4 shows that after LDAO (0.08% and 0.5%), HM (0.67%), Triton X-100 (0.5%) and DDM (0.5%) treatment, 4 nm monomers could be obtained, as shown by DLS size-distribution analysis ‘in volume’, whereas the enzymatic assays revealed negative effects on Bmt1p activity from 0.5%LDAO and 0.67%HM, probably due to denaturation and mannose-competitive inhibition respectively (**Figures 4A and 4B**).

In conclusion, 0.5% Triton X-100 and 0.5% DDM were shown to be the best solubilizing agents that conserved enzyme activity. Triton X-100 was thus chosen as the standard condition for production of active Bmt1p.

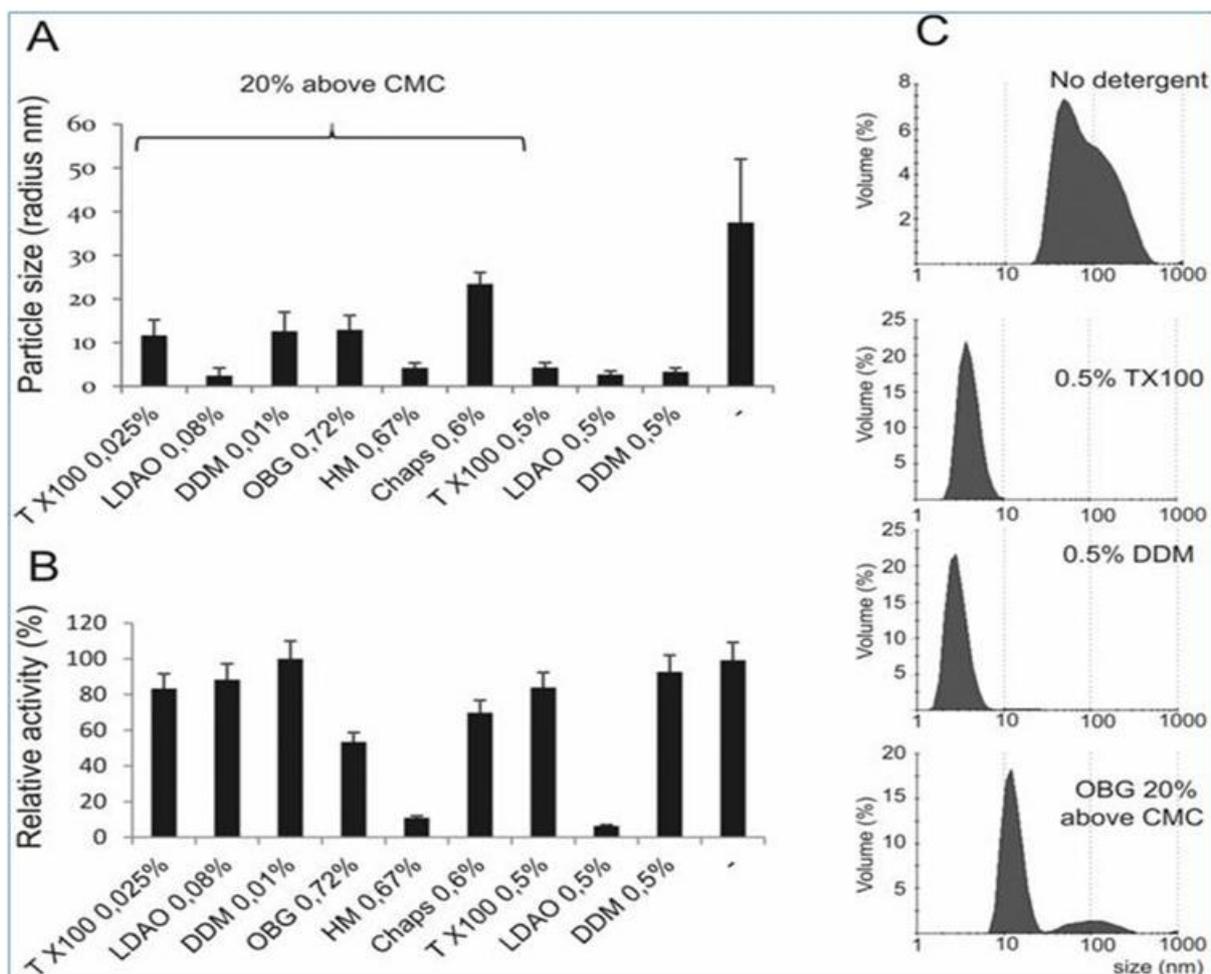


Figure 4: Bmt1p detergent requirement for monomerization.

A range of detergents were added to the supernatants of the cultures that had been induced by 0.1% Chaps. Two concentrations were assayed: 20 % above their respective CMC or 0.5%. **A-** The size of the predominant particles as determined by DLS analysis (by volume). **B-** Relative activities after 48h reaction time at 28°C using 100 μM oligoMan3 as acceptor substrate. **C-** DLS spectra in volume. OBG, *n*-octyl-β-D-glucoside.

Identification of Bmt1p and study of N-glycosylation

To further identify the protein detected by Coomassie Blue staining, the constituents of the medium were detected by Western blotting with antibodies prepared against synthetic peptides derived from Bmt1p. The results indicate that the band detected by Coomassie Blue is specific for Bmt1p (**Figure 3B**).

BMT1 encodes a protein presenting a single N-glycosylation consensus sequence (N²⁹⁷IS, Supplementary Figure S1 at <http://www.biochemj.org/bj/457/bj4570347add.htm>). To test whether this site is used, the culture supernatant was digested with either PNGase F or EndoH and analysed by SDS/PAGE. The apparent molecular mass of Bmt1p did not decrease following enzyme digestion (results not shown), indicating the absence of N-glycosylation from *P. pastoris*. The identification of an asparagine residue in the native sequence of Bmt1p

by LC–MS/MS sequencing (see below) instead of aspartic acid established that the protein was not enzymatically deglycosylated *in vivo*. The absence of recognition by ConA in lectin-blotting experiments was in agreement with this conclusion (results not shown). Similar results were obtained for Bmt1p purified by affinity chromatography using ConA–Sephareose.

In order to further confirm the identity of the antibody-reactive protein, and also to define precisely its N- and C-terminal extremities, the purified Bmt1p band was excised from the Coomassie Blue-stained band and digested with trypsin before analysis by nano-LC–nano-ESI–MS/MS. The band was identified as Bmt1p from *C. albicans* by 34 tryptic peptides corresponding to a 60% of sequence coverage for the recombinant construct (**Supplementary Figure S1**). Surprisingly, the first peptide identified along the sequence was TIIFPNNFNHVHDK, beginning 42 residues after the expected glutamic acid. It is noteworthy that N-terminal Edman sequencing was performed in parallel, but failed to identify any peptide. This result suggests that the N-terminal extremity of Bmt1p is blocked by a formyl, an acetyl or a pyroglutamic acid group [32], precluding the identification of the actual N-terminus of the recombinant protein. The presence of the peptide IYGETF at the C-terminus was also shown, confirming the absence of the terminal His₆ tag. Furthermore, as shown by the deglycosylation experiments, the identification of the peptide ELDNVELIVPDPENISTTNK at m/z [785.4020]³⁺ strongly suggested the absence of Nglycosylation in native Bmt1p.

Production of natural and synthetic acceptor substrates

On the basis of previous data concerning the putative activity of BMT1 [22], α -mannosides were chosen as potential acceptor substrates for the characterization of the activity of the Bmt1p produced in *P. pastoris*. Natural α -oligomannosides were obtained by chemical degradation of PPM isolated from *S. cerevisiae*, whose structure is close to *C. albicans* PPM but it lacks the β Man linkages, and from the *C. albicans* Δ Bmt1 mutant strain, which contains the endogenous putative acceptors for Bmt1p.

Short α -oligomannosides were generated by acetolysis of PPM from *S. cerevisiae* and the *C. albicans* mutant strain and purified by ion-exchange and gel-filtration chromatography. Individual molecules were separated according to their sizes by gel filtration on a Bio-Gel P2 column irrigated with water and pooled in homogeneous fractions on the basis of their mobility during TLC. The primary structures of individual compounds were established by MALDI–TOF–MS and NMR spectroscopy on the basis of previously established ¹H chemical shifts of oligomannosides [33,34]. A total of 11 major oligosaccharides differing in size and linkage type were finally chosen as potential substrates (**Table 1**). Details of the spectroscopic analyses of these oligomannosides are shown in Supplementary Figures S2 and S3 and in Supplementary Table S1 (<http://www.biochemj.org/bj/457/bj4570347add.htm>). The chosen compounds were linear and branched oligosaccharides containing from two to eight α Man (α -linked mannose) or β Man residues linked at the 1-2, 1-3 or 1-6 positions. Glycans isolated from *S. cerevisiae* were branched and linear α -mannosides capped by either α Man(1-2) residues (DP3 and DP5_{SC}), α Man(1-3) residues (DP4_{SC}, DP7_{SC} and DP8_{SC}) or both (DP6_{SC}). By contrast, those isolated from the *C. albicans* Δ Bmt1 strain were exclusively linear

oligosaccharides constituted by α Man(1-2) residues (DP2_{CA}, DP3 and DP4_{CA}) or containing a α Man(1-3) residue in the terminal or penultimate position (DP5_{CA} and DP6_{CA}). Finally, a β Man(1-2) oligomer (DP4_{βCA}) was purified from the acid-labile moiety of *C. albicans* ΔBmt1 strain PPM. After purification, all 11 oligosaccharides were coupled with a fluorescent tag (2-aminopyridine) in order to be used as substrates for the mannosyltransferase assays. Two mantyl-tagged α -1,2-oligomannosides (DP3M and DP4M; **Figure 5B and Table 1**) were synthesized to use as potential substrates, as they have been shown recently to be valuable tools for enzymatic studies [30]. NMR analyses of DP4M by homo- and hetero-nuclear NMR experiments established that it contained a major oligosaccharide Man(α 1-2)Man(α 1-2)Man(α 1-2)Man(α)-Mantyl (Figure 6A, and Supplementary Figure S4 and Supplementary Table S2 at <http://www.biochemj.org/bj/457/bj4570347add.htm>). The observation of a distinct set of minor signals established that DP4M also contained a minor compound Man(α 1-3)Man(α 1-2)Man(α 1-2)Man(α)-Mantyl that did not interfere with activity assays (**Supplementary Figure S4 and Supplementary Table S2**).

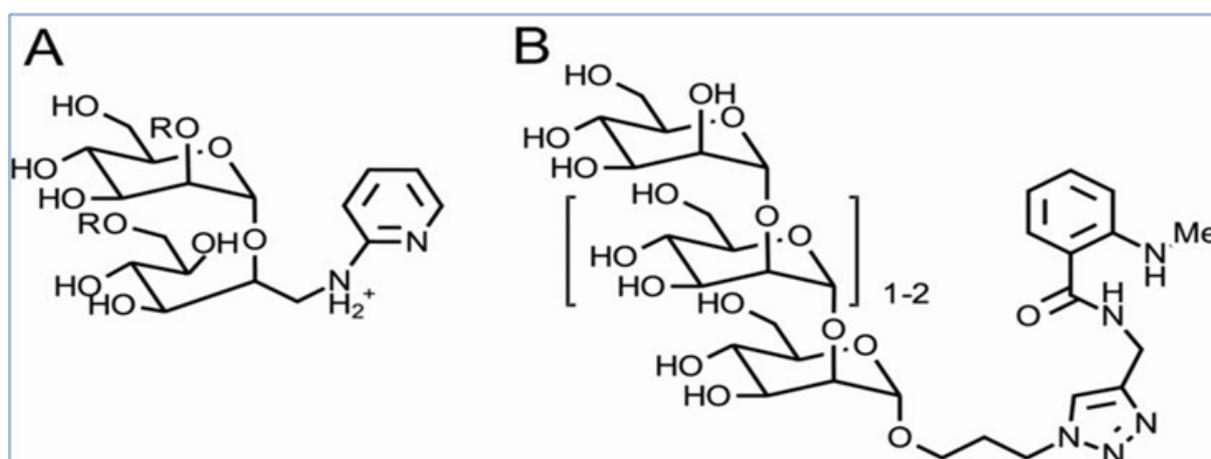


Figure 5: Structure of semi-synthetic 2-aminopyridyl substrates generated by acetolysis of PPMs (A) and synthetic fluorescent mantylated α Man (DP3M and DP4M) (B)

R, H or mannose

Determination of the enzymatic activity

The fluorescent PA derivatives of natural α - and β - oligomannosides, as well as the fluorescent synthetic α -oligomannosides, were assayed as substrates with the Bmt1p-containing culture supernatant from *P. pastoris* (in Tween 20/Triton X-100). Initially, assays were conducted using Ni²⁺ - affinity-chromatography-purified Bmt1p, but these did not provide sufficient data (results not shown). Further analyses established that NiCl₂ totally inhibited the mannosyltransferase activity of Bmt1p, which strongly suggests that the interaction with the affinity chromatography resin has a deleterious effect on the activity. The use of cobalt-affinity chromatography did not show significant improvement. Thus, considering the high purity of the Bmt1p, the final culture supernatant was used as the source of the enzyme. However, before the assays, traces of PPMs were removed from the enzyme fraction by affinity chromatography on ConA–Sepharose in order to eliminate their potential inhibitory effect towards BMT activity. The reaction mixtures were incubated over 48 h at

28°C in order to achieve maximal enzymatic activity. The reaction products were followed by NP-FL-HPLC.

Incubation of Bmt1p extract with synthetic mantylmannotetraose DP4M [Man(α 1,2)Man(α 1,2)Man(α 1,2)Man(α)-Mantyl] and GDP–Man generated two products with higher retention times than DP4M (18.3 and 20.9 min), suggesting that Bmt1p transfers one or several mannose residues from GDP–Man on to DP4M (**Figure 6B**). A control experiment using the supernatant from *P. pastoris* transformed with the empty vector did not show any transferase activity for DP4M (results not shown). Increments in the retention times between the substrate and the Bmt1p reaction products suggest that peaks observed at 18.3 and 20.9 min are penta- and hexa-saccharides respectively. Both reaction products were resistant to α -exomannosidase treatment, whereas DP4M was totally degraded to Man-mantyl, which strongly suggests that Bmt1p transferred mannose residues in β -anomery (**Figure 6B**). Altogether, these observations led us to propose that Bmt1p synthesizes DP5M [Man(β)Man(α 1,2)Man(α 1,2)Man(α 1,2)Man(α)-Mantyl] and DP6M [Man(β)Man(β)Man(α 1,2)Man(α 1,2)Man(α 1,2)Man(α)-Mantyl] from DP4M.

In order to precisely identify the enzyme activity of Bmt1p, the two reaction products resulting from the activity of Bmt1p on DP4M were isolated by preparative HPLC from a large-scale enzyme reaction mixture and purified before their structural analysis by MS and $^1\text{H-NMR}$. The two reaction products exhibited $[M+\text{Na}]^+$ m/z values at 1122.7 and 1284.7 respectively by MALDI–TOF-MS analysis, which confirmed their attributions to Hex₅-mantyl and Hex₆-mantyl (**Figure 6C**).

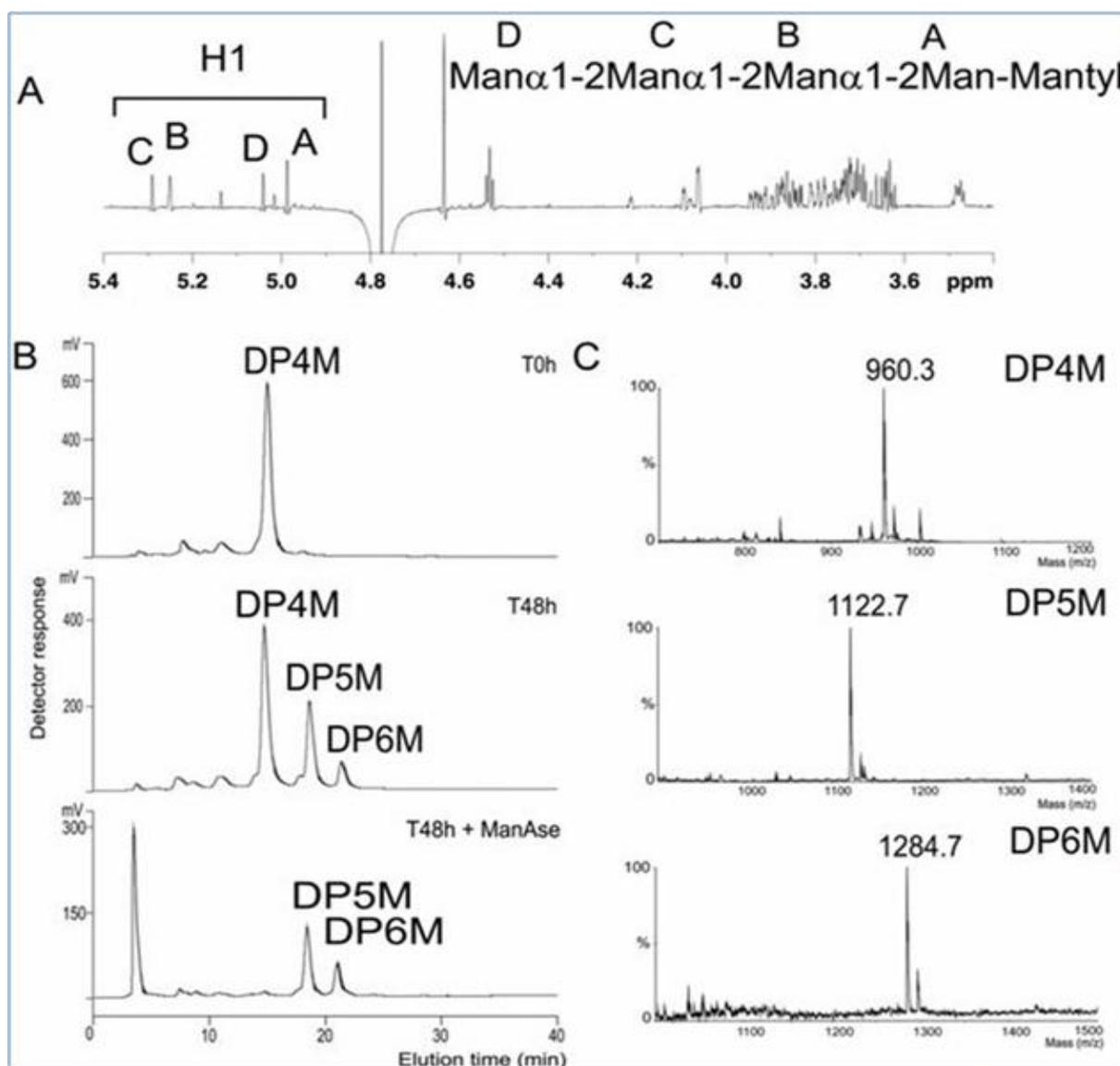


Figure 6: Enzymatic synthesis of two reaction products using *Bmt1p* (*P. pastoris* culture supernatant in tween 20/Triton X100) with mantyl-mannotetraose (DP4M) as substrate under standard assay conditions (48h at 28°C).

(A) ¹H-NMR spectrum of synthetic DP4M. (B) NP-FL-HPLC analysis of acceptor substrate (DP4M) at zero time (T0h) and the reaction mixture at 48h before and after α -exomannosidase treatment (ManAse). (C) MALDI-TOF-MS analysis of acceptor substrate (DP4M) and reaction products DP5M and DP6M. Spectra display $[M+Na]^+$ adducts.

Table 1: Conversion rates of mantylated and 2-aminopyridyl oligomannosides in β -Man capped mannosides by Bmt1p under optimal conditions (48h at 28°C).

Substrates and enzyme activity products were detected by NP-FL-HPLC. The Residual substrate and the products formed (DP+1) and (DP+2) were quantified as a percentage of the sum of the fluorescent compounds areas. The activity represents the percentage of converted acceptor substrates. Each value is representative of three experiments. AP, 2-aminopyridine; CA, *C. albicans*; My, mantyl; RT, retention times of reaction products; SC, *S. cerevisiae*.

Types	Sbst	Structures	% S	% DP + 1	RT	% DP + 2	RT	% Activity
Mantyl derivatives	DP3	[Ma1-2] ₂ Ma1-My	55.4	28.9	15	15.7	18.4	44.6
	DP4	[Ma1-2] ₃ Ma1-My	50	33.3	18.3	16.7	20.9	50
ZAP-derivatives	DP2 _{CA}	Ma1-2 Ma1-AP	99.4	0.26	15	0.33	17.1	0.59
	DP3	[Ma1-2] ₂ Ma1-AP	82.5	10.2	19.7	7.3	22.2	17.5
	DP4 _{SC}	Ma1-3 [Ma1-2] ₂ Ma1-AP	91.6	6.9	23.3	0.8	25.8	7.7
	DP4 α _{CA}	[Ma1-2] ₃ Ma1-AP	76.7	11.9	23.2	9.6	25.7	21.5
	DP4 β _{CA}	M β 1-2 [M β 1-2] ₂ Ma1-AP	100	0	-	0	-	0
	DP5 _{SC}	Ma1-2 Ma1-6 ↓ [Ma1-2] ₂ Ma1-AP	97.3	2.6	26.8	0	-	2.6
	DP5 _{CA}	Ma1-3 [Ma1-2] ₃ Ma1-AP	98.4	1.6	27.9	0	-	1.6
	DP6 _{SC}	Ma1-2 Ma1-6 ↓ Ma1-3 [Ma1-2] ₂ Ma1-AP	100	0	-	0	-	0
	DP6 _{CA}	Ma1-2 Ma1-3 [Ma1-2] ₃ Ma1-AP	96.4	3.6	27.9	0	-	3.6
	DP7 _{SC}	Ma1-3 Ma1-2 Ma1-6 ↓ Ma1-3 [Ma1-2] ₂ Ma1-AP	98.3	1.2	30	0.5	31.5	1.7
DP8 _{SC}	Ma1-3 [Ma1-2] ₂ Ma1-6 ↓ Ma1-3 [Ma1-2] ₂ Ma1-AP	96	2.4	30	1.6	31.1	4	

DP5M, the first reaction product resulting from the activity of Bmt1p on DP4M, was also analysed by NMR. As shown in **Figure 7**, we observed an additional anomeric proton (E) at 4.78 p.p.m. presenting an integration value very close to A–D anomer protons that were tentatively attributed to a supplemental mannosyl residue transferred on to the DP4M major glycan. Starting from the shielded H5 signal (δ , 3.38 p.p.m.), a ^1H - ^1H TOCSY experiment (**Figure 7B**) permitted us to identify the associated H4 (δ , 3.58 p.p.m.), H3 (δ , 3.92 p.p.m.) and H2 (δ , 4.04 p.p.m.) signals, the latter being correlated with H1 (δ , 4.78 p.p.m.) of residue E. This spin system and the pattern of vicinal coupling constants ($^3J_{1,2}$ S, $^3J_{2,3}$ S, $^3J_{3,4}$ L, $^3J_{4,5}$ L) typified residue E as having a β -manno configuration. Finally, observation of the strong downfield shifts of D-H1 ($\Delta\delta$, +0.12 p.p.m.) and H2 ($\Delta\delta$, +0.22 p.p.m.) signals compared with DP4M (**Supplementary Table S2**) established that the supplementary β Man residue is linked in position C-2 on residue D, whereas all others anomeric protons are not affected, to form DP5M [Man(β 1,2)Man(α 1,2)Man(α 1,2)Man(α 1,2)Man(α)-Mantyl].

Although the substitution position of the terminal non-reducing β Man residue of DP6M could not be formally established by NMR because of low quantities, MS analysis and enzymatic digestion strongly suggest that DP6M differs from DP5M by the addition of a terminal β Man at the C-2 position of this residue. Altogether, the combination of chromatographic behaviour, enzymatic digestion, MS and NMR demonstrated that Bmt1p sequentially transfers two β Man residues at the C-2 position of the terminal non-reducing position of initial DP4M [Man(α 1,2)Man(α 1,2)Man(α 1,2)Man(α)-Mantyl] acceptor substrate. After a 48 h incubation under standard conditions, approximately 30% of DP5M and 16% of DP6M were produced (**Table 1**) from DP4M, leaving 50% of the residual acceptor substrate.

Similarly, the incubation of the Bmt1p extract with α -1,2 mannotriose (DP3M) [Man(α 1,2)Man(α 1,2)Man(α)-Mantyl] and GDP–Man generated two reaction products (HPLC retention times, 15 min and 18.4 min) resistant to α -exomannosidase enzymatic digestion and attributed by MALDI–TOF–MS analysis to Hex₄-mantyl and Hex₅-mantyl (results not shown). Bmt1p produced approximately 30% of DP+1 and 15% of DP+2, which establishes that Bmt1p exhibits a similar activity on DP3M as on DP4M (**Table 1**). Similar results were obtained using PA derivatives of natural α -1,2 tri- and tetra-mannosides (DP3-AP and DP4 α_{CA} -AP), albeit a lower yield of production of both DP+1 and DP+2 (**Table 1**). This difference of activity may be easily explained by both the modification of the reducing monosaccharide during the coupling with 2-aminopyridine and by the absence of spacer group between the oligosaccharide and fluorescent group compared with the mantyl group. Overall, GT activity assays on the synthetic and semi-synthetic substrates demonstrated that Bmt1p can sequentially transfer two β Man residues at the non-reducing terminal extremity of α -1,2-oligomannosides *in vitro*.

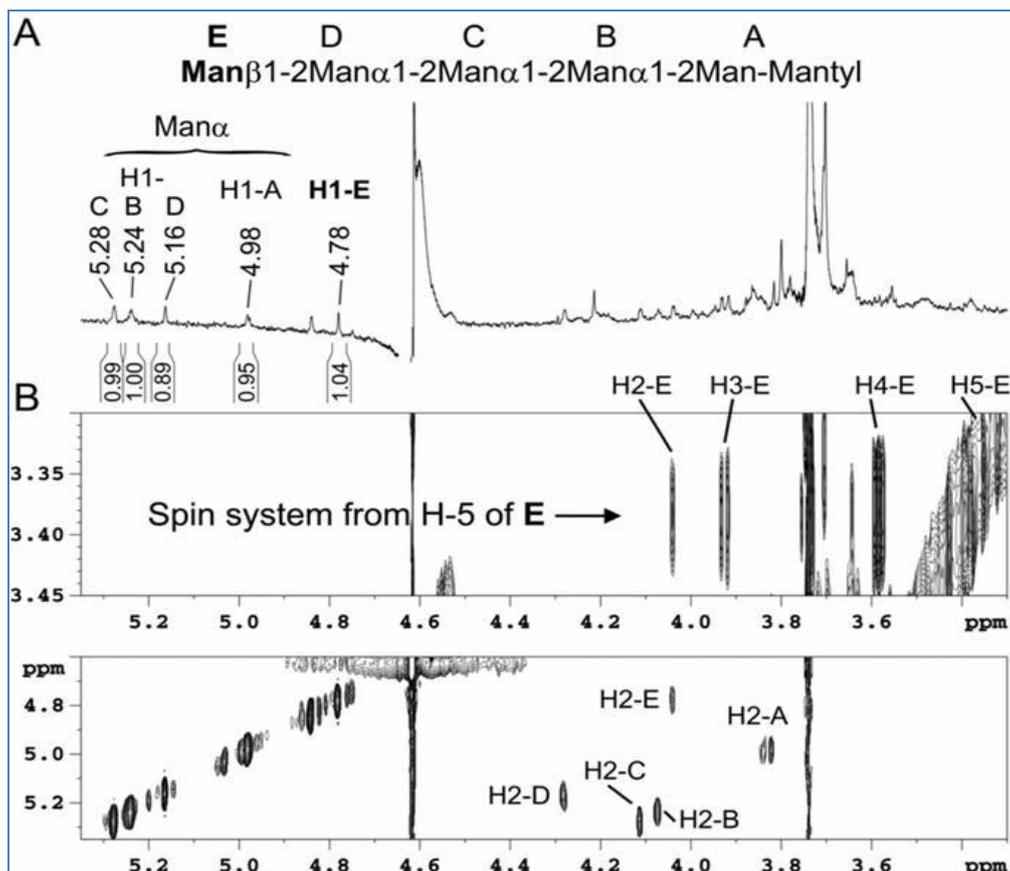


Figure 7: NMR analysis of the purified reaction product DP5M.

(A) ^1H -NMR spectrum of DP5M-mantylated glycan. (B) Extended sections of the 120 ms TOCSY spectrum of DP5M-mantylated glycan.

Enzymatic parameters

The activity of Bmt1p was investigated under different experimental conditions in order to establish the optimal reaction conditions. After the testing described above, the synthetic mantyl-mannotetraose DP4M was selected as an appropriate substrate for these experiments. The temperature- and pH-dependence, the metal requirement, and the enzyme kinetics were studied under standard assay conditions [35] except for the parameter studied. The pH-dependence of the enzyme activity was determined in two buffers: 160 mM sodium citrate/citric acid between pH 4 and pH 6, and 160 mM Tris/maleate between pH 6 and pH 9.5. Bmt1p exhibited maximum activity at pH 6–6.5 (**Figure 8A**). The temperature-dependence study showed that maximal activity occurred at 28°C (**Figure 8B**).

The incubation of Bmt1p with DP4M led to a linear time-dependent reaction (sum of DP5M and DP6M) for at least 48 h at 28°C. However, the NP-FL-HPLC profiles of the reaction mixture at different incubation times showed the successive formation of the two reaction products. After 4 h, the first reaction product DP+1 (DP5M) appeared, with the second reaction product DP+2 (DP6M) appearing after 24 h and becoming prominent only

after at least 65 h of incubation (results not shown). This experiment confirmed that Bmt1p can use the mantylated tetramannoside to give longer oligomannosides, successively adding the two mannose units.

The effect of several divalent cations, i.e. Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ni^{2+} and Zn^{2+} , on the Bmt1p activity was assessed with the use of their respective chloride salts. As shown in **Figure 8(C)**, Bmt1p activity was equivalent in the presence of Mg^{2+} or Ca^{2+} , and only slightly affected by Mn^{2+} , but was completely inhibited by Zn^{2+} and Ni^{2+} . The presence of EDTA alone did not affect their activity. Thus this enzyme does not require a specific divalent cation to perform its duty.

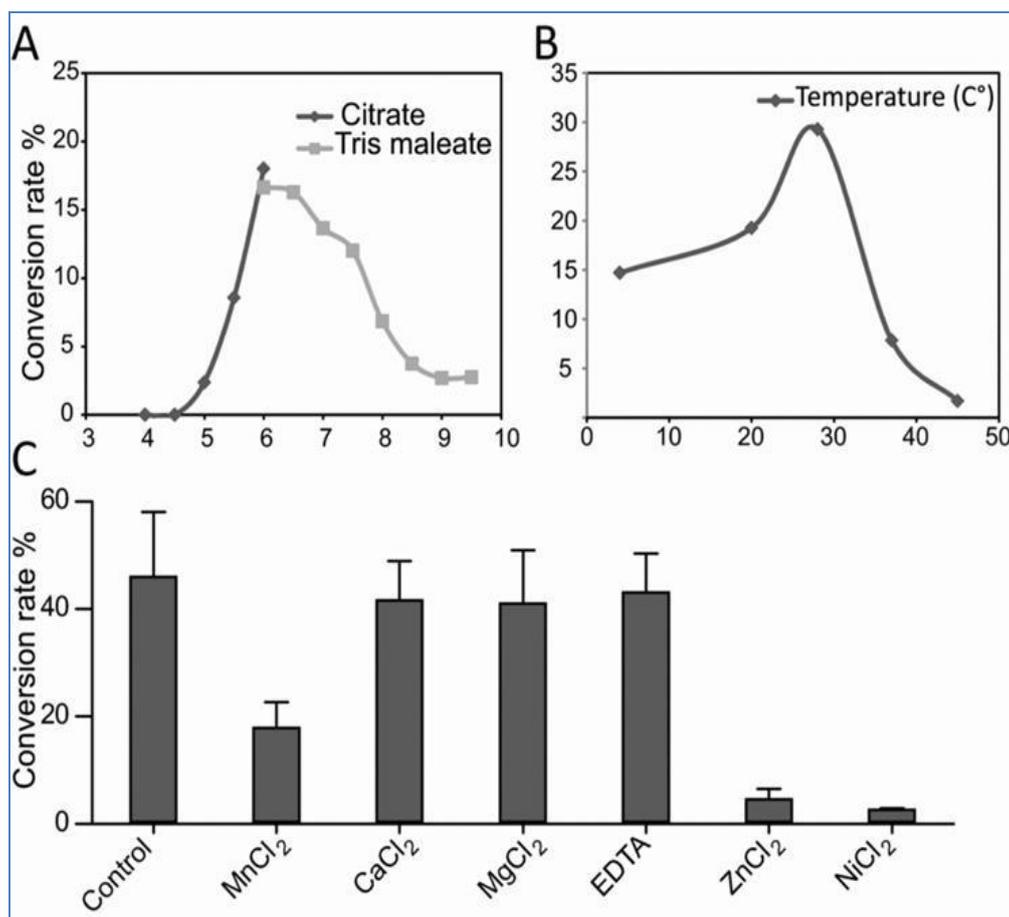


Figure 8: Influence of reaction parameters on Bmt1p activity on DP4M substrate in standard conditions (48h). The activities were quantified by NP-FL-HPLC. Substrate transformation was quantified as the percentage of the sum of the fluorescent intensities of the DP+1 and DP+2 products compared with the total fluorescence. **(A)** pH-dependence at 28°C. Sodium citrate (160 mM) or Tris/maleate buffers were used for pH 4-6 and 6-9.5 respectively. Each data point represents the mean of two experiments. **(B)** Effect of temperature in 50 mM Tris-maleate buffer pH 7. **(C)** Effect of metal ions and EDTA (mean of three experiments). The incubation was achieved in the presence of 20 mM ions or EDTA at pH 7 and 28°C.

Determination of the acceptor substrate specificity

In order to establish the substrate specificity of Bmt1p, we used a variety of PA derivatives of oligomannosides generated from the PPM of *S. cerevisiae* and the *C. albicans* Δ Bmt1 strain (**Table 1**). Optimal incubation conditions were used, as established above, i.e. 48 h, 28°C and pH 6.5 with 20 mM CaCl₂. The yield of the conversion was calculated by integrating the HPLC signals of the remaining substrate and of the reaction products. α -Mannosidase treatment was then used in order to discard possible contamination from the α -mannosyltransferase activities (results not shown). As shown in **Table 1**, linear stretches of α -1,2-linked mannose residues exhibited the highest activities with total conversion rates of acceptor substrates of 17.5% for DP3 (DP3–2 aminopyridine) and 21.5% for DP4 (DP4 α _{CA}–2-aminopyridine). Furthermore, only these two acceptors induced the generation of DP+2 α -mannosidase-resistant oligomers.

Replacement of the terminal α Man(1-2) residue by a α Man(1-3) residue from a DP4 (as seen in DP4_{SC}) led not only to a dramatic decrease in the total conversion rate of the acceptor (7.7%), but also to the almost complete disappearance of the DP+2 product. Further addition of a α Man(1-2) residue (as seen in DP6_{CA}) did not increase the conversion rate, demonstrating that Bmt1p requires two α Man(1-2) residues in the terminal non-reducing end to initiate the β -mannosylation process. Further assays using (1-6) branched α -mannosides capped by α Man(1-2) or α Man(1-3) residues resulted in very low (<4%) or null BMT activities. Similarly, Bmt1p showed no activity on a β Man(1-2) tetramer (DP4 β _{CA}–2-aminopyridine).

Altogether, these data established that Bmt1p requires at least two α Man(1-2) residues in the terminal non-reducing end to initiate β -mannosylation and shows a preference for tetrasaccharide compared with trisaccharide. Furthermore, branching of the reducing mannose residue of trimannoside dramatically impairs its activity (DP5_{SC}–2-aminopyridine). *In vitro*, Bmt1p may also further elongate β -mannoside by a single β Man(1-2) residue, but exclusively using substrates capped by a β Man(1-2) α Man motif and not those capped by β Man(1-2) β Man.

DISCUSSION

Candida species are nowadays the third most prevalent causes of hospital-borne bloodstream infections [36]. In this context, yeast molecules involved into the variability of the humoral or lectinic recognition by the host are considered as possible virulence factors. The presence of β -mannosides in *C. albicans* cell wall was established by Suzuki and collaborators about three decades ago [4]. In particular, β -1,2-linked mannose units were shown to be directly connected to the PPM α -1,2-linked mannoside side chains of the PPM acid stable fraction, which defines the antigen factor 6 [5,37]. This antigen was directly shown to play a role in fungal adherence to epithelial cells [38]. Since then, β -mannosides from both PPM (acid stable and acid labile fractions) and PLM were shown to be involved into *C. albicans* antigenicity and fine-tuning of host innate response [10,13,17,39–41]. However, the initiation mechanisms leading to the transfer of the first β -1,2-linked mannose

unit onto the α -1,2-linked side chain of PPM in *C. albicans* were until recently unknown. The enzymes responsible for the biosynthesis of β -mannosides were recently identified as a family of nine putative β -1,2 mannosyltransferases genes that constitute a new structural enzyme family among glycosyltransferases [22,24]. On the Basis on structural analysis of PPM isolated from BMT deleted-strains, Bmt1 (encoded by BMT1 gene and also called β -1,2-ManTaseI by Suzuki and co-workers [35]) was tentatively identified as the enzyme initiating the β -mannosylation on acid resistant fraction of PPM. Despite the identification of these enzymes, no initiating activity of β -mannosylation could be directly detected from *C. albicans* micromal enzymes [35]. To explain this result, authors hypothesized that the enzyme required an acceptor substrate containing α -1,6-mannoside backbone unit, as for native PPM. Thus, the objective of the present work was to characterize the Bmt1p enzymatic activity and molecular requirements in order to examine β -mannosylation initiation and open up new perspectives for antifungal therapy or prophylaxis.

In the initial trials for producing an active soluble enzyme in the *P. pastoris* model system, the truncate lacking the cytoplasmic N-terminus and the membrane-spanning domain was the only one to be produced at a good yield. Other truncates, including one beginning at the last third of the stem region that was designed on the basis of the Kre2p/Mnt1p 3D structure [42] and one devoid of the C-terminal hydrophobic region, were not produced (results not shown). On the basis of the observation of the two proteolytic degradation products within the *P. pastoris* supernatant (results not shown), we tentatively identified Asp¹⁹⁷ and Glu⁴⁰⁶ as the N-terminal extremities of the N- and C-terminal catalytic subdomains respectively as has been generally described for GTs [23]. In order to optimize the activity assays and enzyme storage, Bmt1p solubility and stability were examined using DLS analysis under multiple experimental conditions. Protein aggregates containing 5–250 Bmt1p monomers were detected in the culture supernatant in the absence of detergent. The use of 0.05% Tween 20 during induction and the final addition of 0.5% of either DDM or Triton X-100 finally enabled Bmt1p monomerization and optimal activity. The presence of the Cterminal 20-amino-acid-long hydrophobic region (residues 561–581) may explain its autoaggregative properties.

Altogether, we have demonstrated that Bmt1p can sequentially transfer *in vitro* two β Man residues at the non-reducing terminal extremity of the linear DP3 and DP4 α -1,2-linked oligomannoside residues. Thus in the present paper, we describe for the first time the initiation activity leading to the transfer of the first β Man unit to the α -1,2-linked side chains of PPM. Although Bmt1p showed a relatively low catalysis velocity of PA–oligomannoside derivatives (20% of conversion yield corresponding to 40 nmol/h per mg of protein) it is in the same range as those established previously for the native enzyme fractions of *Candida* cells (approximately 30 and 50 nmol/h per mg of protein for *C. albicans* serotype A and *Candida guilliermondii* β -1,2 mannosyltransferases respectively) [36]. It is noteworthy that the transfer of a second β -mannose was not expected as it was not observed during the deletion phenotyping analyses [22]. To explain this discrepancy, one may hypothesize that this secondary activity is inhibited *in vivo* by the physical proximity of other β -mannosyltransferases that exhibit a higher affinity for the β Mancapped oligomannosides. This

observation clearly highlights the necessity of studying the other identified β -mannosyltransferases and how they interact in order to decipher the whole chain reaction that controls β -mannoside elongation.

The analysis of acceptor–substrate specificity showed that Bmt1p presents the highest activity on the α Man(1-2) tetrasaccharide, irrespective of the fluorescent tag used. It should be noted, however, that after coupling with 2-aminopyridine, the native α Man(1-2)-linked tetrasaccharide is transformed into a trisaccharide due to the reduction of the terminal reducing residue. Thus, on the basis of the panel of oligosaccharides that we used, we established that the conversion rate increased with the increasing length of α Man(1-2) oligosaccharides with a minimum requirement of a α Man(1-2) disaccharide. Furthermore, the different efficiencies of DP3–2-aminopyridine and DP5_{SC}–2-aminopyridine as acceptor substrates established that α -1,6 branching of the reducing mannose residue dramatically impairs the transfer activity (with conversion rates decreasing from 17.5 to 2.6). This result contradicts the initial hypothesis of Suzuki and co-workers that interpreted the impossibility to detect the β -mannosylation initiation activity as a lack of α -1,6 branching in their substrates [43]. Furthermore, Bmt1p may also further elongate β -mannoside by a single β Man(1-2) residue, but exclusively uses substrates capped by β Man(1-2) α Man motif and not those capped by β Man(1-2) β Man.

The *in vitro* acceptor–substrate specificity of Bmt1p fits well with the structure of PPM isolated from the *C. albicans* Bmt1 strain [8,22]. Indeed, deletion of *C. albicans* Bmt1 from the *C. albicans* BWP17 strain completely abrogated the transfer of β Man residues on to the acid-stable polymannoside moiety of PPM, which suggested that this enzyme initiated the capping of α -mannoside by β Man residues without redundancy from other *C. albicans* Bmt family members. Furthermore, the very low *in vitro* transfer activity of Bmt1p on to α Man (1-3)-substituted oligomannosides is also in agreement with the fact that *C. albicans* PPM is not elongated by β Man(1-2) α Man(1-3) terminal motifs, unlike the one isolated from *C. guillermondi* [44,45].

Finally, the fact that the presence of EDTA in the reaction medium did not affect Bmt1p activity established that the enzyme activity is independent from the presence of divalent cations. This finding was at first a surprise considering the presence of a D⁴⁷⁴ND motif in the sequence of Bmt1p (**Supplementary Figure S1, indicated by a star**) that aligns almost perfectly with the Mn²⁺-co-ordinating E²⁴⁷PD motif in Kre2/Mnt1p [42]. However, the function of the so-called ‘DXD’ signature is still open to discussion considering that on one hand some GT-As do not possess the DXD signature [46] and on the other that non-GT proteins were shown to possess a DXD signature. Interestingly, the Tyr²²⁰ catalytic residue identified in the vicinity of the DXD motif of Kre2/Mnt1p [42], within the sequence E²¹⁸S \underline{Y} RH, is conserved within Bmt4p and Bmt6p (N^{319/326}S \underline{Y} HR in both elongating enzymes), but converted into a histidine residue in Bmt1p and Bmt2p (N^{362/320}S \underline{H} HR in both initiating enzymes). Kinetic analysis for Kre2/Mnt1p suggested two possible catalytic mechanisms. The first one is a double-displacement mechanism with the hydroxy group of Tyr²²⁰ as the potential nucleophile. Alternatively Tyr²²⁰ positions the substrates for catalysis using a S_Ni-like mechanism, a nucleophilic reaction allowing retention of conformation. As sequence alignment strongly suggests that His³⁶⁴ in the sequence of Bmt1p plays a key

catalytic role in this enzyme, the conversion from a tyrosine into a histidine residue (maintaining a cyclic lateral chain, but without a hydroxyl radical) strongly supports the second hypothetical mechanism by influencing the positioning of substrates.

In summary, the present study definitively identified Bmt1 as the enzyme that initiates the biosynthesis of a major pathogenic factor of *C. albicans*. By establishing the biochemical requirement of this enzyme, we paved the way towards in-depth analysis of the regulation of β -mannosylation in pathogenic yeasts. Currently, efforts are being made to establish the structure of β -mannosyltransferases which is an absolute necessity to understand the exquisite enzymatic activity that all identified members of the Bmt family exhibit toward their acceptor substrates and to rationally design potential inhibitors of their activities.

EXPERIMENTAL

Materials

The *P. pastoris* strains and plasmids were obtained from Invitrogen; GDP-Mannose was from Sigma-Aldrich, and oligonucleotides were synthesized by Eurogentec. Phosphopeptidomannan from *S. cerevisiae* was obtained from Sigma Products. Phosphopeptidomannan from the *C. albicans* Δ Bmt1 mutant strain, grown in YPD medium [1%(w/v) yeast extract/2% (w/v) peptone/2% (w/v) glucose] at 28°C, was extracted as described [25]. Briefly, cells were autoclaved in 0.02M citrate buffer at 125°C for 90 min and Fehling's solution was added to the supernatant to precipitate PPM. The PPM was then washed with methanol/acetic acid (8:1, v/v) and dried in a SpeedVac concentrator after a final wash in methanol.

Plasmid construction

DNA sequence encoding a 1910 pb truncated form of BMT1 was amplified by PCR from the genome of *C. albicans* serotype A strain (BWP17). The DNA polymerase Accuprime Pfx (Invitrogen) was used following manufacturer's recommendations, with oligonucleotides 5'-CCAATAATAATGAATTCCCTGGATTATCGGG-3' (forward) and 5'-GTTCTTGATCAATCTAGAAAAGTTTCTCCATAAAT-3' (reverse). The restriction sites EcoRI and XbaI (underlined) were inserted before and after, respectively, the start and end codons. DNA fragment was digested with EcoRI and XbaI, and ligated into the EcoRI/XbaI sites of the pPICA α A vector (Invitrogen). The encoded Bmt1p truncate begins with Asn⁵². To obtain the three leucine/serine residue mutations that restore the native serine residues, the following oligonucleotides were successively used, concomitantly with their respective inverted complemented version 5'-CGAGAAGGATCAAGGATCCCCAAAATTTTC-3' for the amino acid 267, 5'-CATCATCGGAAGATATCTGAAAAACATTTTG-3' for the amino acid 369, and 5'-CAAACCTGGATTTAAATCTGTGACTAATGTTG-3' for the amino acid 662. The pfu-Turbo Cx Hotstart DNA polymerase (Agilent technologies) was used to achieve inverse PCRs following manufacturer's recommendations. To obtain the native C-terminal

sequence of Bmt1p, devoid of C-terminal tag, the oligonucleotide 5'-GGAGAACTTTTTAAGAACA AAAACTCATCTCAGAAGAGG-3' was used concomitantly with its respective inverted complemented version. The complete ORF was sequenced (Genoscreen) to establish that only the desired mutations were present.

Expression of Bmt1p in Pichia pastoris

The pPICZ α A vectors were digested with BstXI, and the linearized fragments were used to transform the *P. pastoris* strain (X-33) by electroporation. Mut^s transformants were obtained by selecting clones that grew well in minimal medium containing glucose but poorly in minimal medium containing methanol. A total of 24 transformants were screened for the level of secretion of Bmt1p into the culture supernatant. Clones were grown in a 10 mL deep well microplate at 28°C (225 rev./min) in medium containing 1% (w/v) yeast extract, 2% (w/v) peptone, 1.34% (w/v) yeast nitrogen base, 0.00004 % biotin and 1% (v/v) glycerol buffered at pH6 with 100 mM potassium phosphate (BMGY medium) until a D₆₀₀ of 40 was reached. The medium was removed by centrifugation (1500g for 10 min at 22 °C) and the cells were suspended at 5-fold their original density in BMMY medium, which are similar to BMGY medium except that it contains 0.5% methanol instead of glycerol as the inducer and the protease inhibitors pepstatin and leupeptin at 1 μ M and 10 μ M respectively. Alternatively, BMM medium was used, differing from BMMY by the absence of yeast extract. The medium was collected after 2 days of culture at 28°C during which methanol and protease inhibitors were added every 12h. The clone showing the highest level of expression was then cultivated under the same growing and expression conditions, scaling-up volumes 50-fold in baffled erlenmeyer flasks. Either 0.05% tween 20 or 0.1% CHAPS was added during the expression. Cells were eliminated by centrifugation at 3000 g for 10 min at 4°C after which 0.5% of Triton X-100 was added to the supernatant containing the protein.

Purification of recombinant Bmt1p

Culture medium was filtrated and concentrated 1-fold. To remove PPM contamination, the concentrate was incubated for 16h at 4°C with 10% (v/v) ConA (Concanavalin A)- sepharose 4B gel (GE Healthcare), washed with 20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, and 1 mM MnCl₂. The suspension was centrifugated at 1000 g for 3 min at 4 °C, and the supernatant dialyzed against 20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) and 100 mM NaCl containing 0.5% triton X-100 and protease inhibitors. This extract was used for all solubilization experiments and enzymatic assays.

For LC-MS/MS sequence analysis, Bmt1p was further purified by Ni²⁺-affinity chromatography. This was achieved using a 1 mL HisTrap HP column (GE Healthcare) and a 0-500 mM Imidazole gradient elution method in the presence of 0.5% Triton X-100. Recombinant Bmt1p was eluted in the presence of 250mM imidazole, and finally desalted using Zeba spin columns (ThermoScientific). Purified Bmt1p was quantified by the micro BCA Protein assay (Pierce) using BSA as standard.

Analytical methods

Culture supernatants or purified Bmt1p were analysed by SDS/PAGE (12.5% gel) using a Mini-Protean 3 electrophoresis system (Bio-Rad Laboratories). The molecular mass standard used was from Bio-Rad Laboratories (Precision Plus Protein standard). Proteins were visualized with Instant Blue (Expedeon) following standard procedures. Protein concentration was determined by SDS/PAGE (12.5% gel) by densitometry with a GS-800 Calibrated Imaging densitometer (Bio-Rad Laboratories) using purified Bmt1p as a standard.

For Western blotting, proteins were transferred with the Mini Trans-Blot cell (Bio-Rad Laboratories) on to nitrocellulose membranes (Protran BA 83, Whatman). Detection was performed with the EDL⁺ detection system (GE Healthcare). Primary antibodies were alternatively mouse monoclonal anti-c-Myc (clone 9E10, Sigma) or rabbit polyclonal antisera raised against synthetic peptides containing 15 and 16 amino acid residues of the C-terminus of Bmt1p (EFVKPNNRGRTEKN+C and WTIEKDLHQKEKDKQV+C, Eurogentec).

PNGase F and EndoH digestions

For each digestion, protein denaturation was carried out with 9 μ l of culture supernatant mixed with 10 μ l of 10% SDS and 10% 2-mercaptoethanol, incubated at 95 °C for 20 min. Then 10 μ l of 100 mM phosphate buffer (pH 6) and either 0.25 μ l of 250 m-units/ μ l PNGase F (peptide N-glycosidase F; Roche) or 1 μ l of 5m-units/ μ l EndoH (endoglycosidase H; Roche) were added (for the PNGase F digestions, 1.5 μ l of 10% Nonidet P40 was also added). The reaction media were incubated overnight at 37°C, and 20 μ l of each were analysed by SDS/PAGE (12.5% gel). For the non-digested samples the enzymes were replaced by water. Bovine serotransferrin was concomitantly digested by EndoH as a positive control.

LC-MS/MS identification

For LC-MS/MS identification, purified Bmt1p was Coomassie Blue-stained after SDS/PAGE (12.5% gel). The band of interest was excised, discoloured, dried and submitted to in-gel trypsin digestion overnight at 37°C in 25 mM ammonium bicarbonate buffer (Porcine Mass Spectrometry Grade MSG-trypsin, GBiosciences). After sequential extraction, tryptic peptides were dried in a SpeedVac and separated by LC-MS/MS. For nano-LC-nano-ESI-MS/MS, analyses of trypsin digests were performed on a hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometer (QStar, Applied Biosystems) equipped with a nano-electrospray ion source coupled with a nano-HPLC system (LC Packings Dionex). Samples redissolved in 5 μ l of solvent A (5% acetonitrile with 0.1% formic acid) were desalted and concentrated on a reverse-phase C₁₈ precolumn of 0.3 mm internal diameterx5 mm length. Peptides were then separated on a 75 μ m internal diameterx15 cm length C₁₈ Pepmap column (Dionex) with a flow rate of 200 nl/min. Peptides were eluted using a 0–35% linear gradient of solvent B (75% acetonitrile with 0.1% formic acid) for 80 min, a 35–100% linear gradient of solvent B for 10 min and finally held at 100% of solvent B for 5 min. The mass spectrometer was operated in the positive-ion mode. Data acquisition was performed in a data-dependent mode consisting of either a full-scan MS over the range m/z 300–2000 and a fullscan MS/MS of the

ion selected over the range m/z 50–2000 in a dynamic exclusion mode with the collision energy automatically fixed by the device.

Products were identified by searching the processed MS/MS data against the NCBI and UniProtKB/Swiss-Prot databases using MASCOT, with the following parameters: other fungi, one missed cleavage site and a mass tolerance setting of 50 p.p.m. Partial chemical modifications, such as the oxidation of methionine and the carbamidomethylation of cysteine residues, were taken into consideration for the queries.

DLS

DLS (dynamic light scattering) was carried out at 20 °C with a Malvern Zetasizer Nano ZS instrument equipped with temperature control and using a 633 nm He–Ne laser for backscattering at 173°. The measurement duration was 10 s and 22 measurements were averaged for each analysis. Detergents were added directly to the culture supernatants described above and centrifuged at 18000 *g* for 40 min at 22°C. The theoretical radius of Bmt1p fitted with the calculated one for the native folded proteins [26] ($R_h = 4.75N^{0.29}$ nm, where N is the number of residues in the polypeptide chain and R_h is the hydrodynamic radius in angstroms).

Purification of acceptor substrates

Natural oligomannosides were obtained from *S. cerevisiae* and the *C. albicans* Δ Bmt1 mutant strain PPMs after acetolysis [27]. Before acetolysis, the PPM from *C. albicans* Δ Bmt1 was submitted to acid hydrolysis (10 mM HCl at 100°C for 1 h) in order to separate acid-stable and -labile parts [28]. The acid-labile fraction was collected and separated by gel-filtration chromatography. The acetolysis was performed on the remaining PPM in acetic anhydride/acetic acid/sulfuric acid (10:10:1, by vol.) at 25 °C for 24 h. The supernatant was recovered after centrifugation at 4500 *g* for 10 min at 4°C, and the reaction products were extracted with chloroform after pH neutralization, then deacetylated with methanol/0.2 M sodium hydroxide (1:1, v/v) for 1 h at 4°C. Acetolysis yields a mixture of oligosaccharides that were purified by anion-exchange chromatography and individually separated by gel-filtration chromatography (BioGel- P2, Bio-Rad Laboratories).

Coupling of oligosaccharides with 2-aminopyridine

The pyridylation of the oligosaccharides was performed as described by Hase [29]. Briefly, 100 μ g of oligomannosides were incubated at 80°C for 1 h in 20 μ l of solution A [552 mg of 2-aminopyridine (Sigma–Aldrich) in 200 μ l of acetic acid] followed by the addition of 70 μ l of solution B [250 mg of dimethylamine borane complex (Sigma–Aldrich) in 100 μ l of acetic acid and 62.5 μ l of water]. The samples were dried under nitrogen and diluted in 1 ml of water. The solution was adjusted to pH 10 with aqueous ammonia, washed ten times with chloroform and freeze-dried. The reaction mixture was diluted with 100 μ l of water, applied to a C₁₈ column (Sep-Pak Waters), and separated from the free 2-aminopyridine by elution with 5 ml of acetonitrile/water (25:75, v/v).

Synthesis of acceptor substrates

The synthesis of mantyl-tagged α -oligomannosides (DP3M and DP4M) has been described previously (respectively compounds A and B in [30]). Synthetic fluorescent DP3M and DP4M oligomannosides were separated by gel-filtration chromatography on a Bio-Gel P2 column and analysed by MALDI-TOF-MS and NMR. As established by the NMR experiments, DP4M constitutes a major mantylated α -1,2-tetramannoside and a minor mantylated Man(α 1-3)Man(α 1-2)Man(α 1-2)Man. This minor contaminant originated from our attempt to use the benzoyl and Fmoc protecting groups. The partial migration of the 3-*O*-benzoyl group to position 2 leads to the formation of this regioisomer.

Mannosyltransferase assays

The standard assay mixtures contained 25 μ l (corresponding to approximately 1 μ g of protein) of the Bmt1p-containing culture supernatant of *P. pastoris* (in Tween 20/Triton X-100), 0.1 mM PA (pyridylamino)- or mantyl-oligomannoside, 20 mM GDP- mannose donor, 0.3% Triton X-100, 50 mM Tris/maleate buffer (pH 7) and 20 mM MnCl₂ in a total volume of 100 μ l with the protease inhibitors pepstatin and leupeptin. The reaction mixture was incubated for 48 h at 28°C and stopped by boiling for 5 min. The reaction mixture was then centrifuged at 1200 g for 10 min at

20°C and analysed by NP-FL-HPLC (normal-phase HPLC with fluorimetric detection). The conditions of temperature, incubation time, divalent ion choice or pH buffer were suitably modified according to the studied parameters. The effect of several divalent cations was assayed using their respective chloride salts at a concentration of 20 mM. Sodium citrate/citric acid and Tris/maleate (160 mM) buffers were used to study the effect of pH.

Treatment with α -mannosidase

The α -mannosidase treatment of the reaction mixture after mannosyltransferase assays was carried out in 20 mM sodium acetate buffer (pH 5), containing 2 mM ZnCl₂ and 0.15 unit of α -exomannosidase from jack bean (Prozyme) at 37 °C for 24–48 h. The resulting products were analysed by HPLC. A reaction mixture containing Bmt1p without incubation was used as a control for the substrate digestion with α -mannosidase.

Analysis of fluorescent substrates and enzyme reaction products by HPLC

An Amide-80 (TSK gel) column (4.6 mm×25 cm) was used. Elution was carried out at a flow rate of 0.8 ml/min, using a gradient of two eluents, A [10% acetonitrile, 3% acetic acid and triethylamine (pH 7.3)/acetonitrile (25:75, v/v)] and B (same solutions, 50:50, v/v). Fluorimetric detection of the PA- oligosaccharides was achieved using excitation and emission wavelengths of 310 and 380 nm respectively, whereas excitation and emission wavelengths of 334 and 437 nm were used for the detection of mantyl-oligomannosides.

Isolation of enzyme products

Reaction products were collected using HPLC separation as described above and sequentially purified on 150 mg carbograph SPE columns (Grace Davison) eluted by water/acetonitrile (50:50, v/v) and a C₁₈ HPLC column using a gradient from water and 0.1% trifluoroacetic acid to water and 0.1% trifluoroacetic acid/acetonitrile (80:20, v/v). The products were then analysed by MS and NMR spectroscopy as described below.

MS analysis of native and fluorescent oligomannosides

MALDI–TOF mass spectra were acquired using a Voyager Elite DE-STR mass spectrometer (Perspective Biosystems) equipped with a pulsed nitrogen laser (337 nm) and a gridless delayed extraction ion source. The spectrometer was operated in positive reflectron mode by delayed extraction with an accelerating voltage of 20 kV, a pulse delay time of 250 ns and a grid voltage of 66%. Samples were prepared by mixing 0.5 μ l of oligomannoside solution (0.02 μ g/ μ l) with 0.5 μ l of 2,5-dihydroxybenzoic acid matrix solution (10 mg/ml in methanol/water) directly on the

target. The samples were allowed to dry for approximately 5 min at room temperature (20°C). Between 50 and 100 scans were acquired for each spectrum over the range m/z 200–2500 Da.

NMR analyses

NMR experiments were performed at 293 K and 300 K on a Bruker AVANCE spectrometer at 21.6 T where ¹H resonates at 900.11 MHz and ¹³C at 220.0 MHz. The AVANCE spectrometer was equipped with a 5-mm triple-resonance cryoprobe. Before NMR spectroscopic analyses, samples were exchanged three times with ²H₂O (99.97%; Euriso-Top) and intermediate freeze-drying, dissolved in 250 μ l of ²H₂O and then transferred into Shigemi tubes. The ¹H chemical shifts were expressed in p.p.m. related to the methyl signal of acetone as an internal standard (δ^1 H 2.225 and δ^{13} C 31.55 p.p.m.). The pulse programs used were extracted from the Bruker pulse program library where pulses and delays were optimized for each experiment. The COSY, TOCSY and ¹³C-HSQC experiments were performed using the Bruker standard sequences.

ABBREVIATIONS

Bmt, β -mannosyltransferase; CMC, critical micellar concentration; ConA, concanavalin A; DDM, n-dodecyl- β -D-maltoside; DLS, dynamic light scattering; EndoH, endoglycosidase H; GT, glycosyltransferase; HM, heptyl mannose; LDAO, N,N-dimethyldodecylamine-N-oxide; α Man, α -linked mannose; β Man, β -1,2-linked mannose; NP-FL-HPLC, normal-phase HPLC with fluorimetric detection; PA, pyridylamino; PLM, phospholipomannan; PNGase F, peptide N-glycosidase F; PPM, phosphopeptidomannan.

FUNDING

This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-Blanc-CaBMTs) [grant number ANT-09-MIEN-031-02] and the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (to G.S.-L.). The 400 MHz NMR facility was supported by the Centre Commun de Mesure RMN de l'Université de Lille 1. The 900 MHz spectrometer was funded by the Région Nord-Pas de Calais, the European Union (FEDER), the Ministère Français de la Recherche, Université Lille1-Sciences et Technologies and the CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique). Financial support from the TGE-RMN-THC Fr3050 for conducting the research on the 900 MHz spectrometer is gratefully acknowledged. The MS facility was supported by the European Community (FEDER), the Région Nord-Pas de Calais (France), CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique) and the Université Lille 1.

AUTHOR CONTRIBUTION

Ghenima Sfihi-Loualia, Emeline Fabre and Florence Delplace designed and performed experiments, interpreted the data and wrote the paper. Marilyne Pourcelot, Bernadette Coddeville, Frédéric Krzewinski and Julie Bouckaert performed experiments and interpreted the data. Thomas Hurtaux and Romaric Dubois performed experiments. Chantal Fradin designed experiments and provide materials. Jean-Maurice Mallet and Daniel Poulain designed experiments. Emmanuel Maes designed experiments, interpreted the data and wrote the paper. Yann Guerardel designed experiments, interpreted the data and wrote the paper.

REFERENCES

- 1 Sardi, J. C. O., Scorzoni, L., Bernardi, T., Fusco-Almeida, A. M. and Mendes Giannini, M. J. S. (2013) *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J. Med. Microbiol.* **62**, 10–24.
- 2 Strahl-Bolsinger, S., Gentzsch, M. and Tanner, W. (1999) Protein O-mannosylation. *Biochim. Biophys. Acta* **1426**, 297–307.
- 3 Dean, N. (1999) Asparagine-linked glycosylation in the yeast Golgi. *Biochim. Biophys. Acta* **1426**, 309–322.
- 4 Shibata, N., Ichikawa, T., Tojo, M., Takahashi, M., Ito, N., Okubo, Y. and Suzuki, S. (1985) Immunochemical study on the mannans of *Candida albicans* NIH A-207, NIH B-792, and J-1012 strains prepared by fractional precipitation with cetyltrimethylammonium bromide. *Arch. Biochem. Biophys.* **243**, 338–348.
- 5 Kobayashi, H., Shibata, N. and Suzuki, S. (1992) Evidence for oligomannosyl residues containing both beta-1,2 and alpha-1,2 linkages as a serotype A-specific epitope(s) in mannans of *Candida albicans*. *Infect. Immun.* **60**, 2106–2109.
- 6 Trinel, P.-A., Maes, E., Zanetta, J.-P., Delplace, F., Coddeville, B., Jouault, T., Strecker, G. and Poulain, D. (2002) *Candida albicans* phospholipomannan, a new member of the fungal mannose inositol phosphoceramide family. *J. Biol. Chem.* **277**, 37260–37271.
- 7 Fradin, C., Slomianny, M. C., Mille, C., Masset, A., Robert, R., Sendid, B., Ernst, J. F., Michalski, J. C. and Poulain, D. (2008) Beta-1,2 oligomannose adhesin epitopes are widely distributed over the different families of *Candida albicans* cell wall mannoproteins and are associated through both N- and O-glycosylation processes. *Infect. Immun.* **76**, 4509–4517.
- 8 Maes, E., Mille, C., Trivelli, X., Janbon, G., Poulain, D. and Guérardel, Y. (2009) Molecular phenotyping of mannosyltransferases-deficient *Candida albicans* cells by high-resolution magic angle spinning NMR. *J. Biochem. (Tokyo)* **145**, 413–419.
- 9 Dalle, F., Jouault, T., Trinel, P. A., Esnault, J., Mallet, J. M., d’Athis, P., Poulain, D. and Bonnin, A. (2003) Beta-1,2- and alpha-1,2-linked oligomannosides mediate adherence of *Candida albicans* blastospores to human enterocytes in vitro. *Infect. Immun.* **71**, 7061–7068.
- 10 Jouault, T., Fradin, C., Trinel, P. A. and Poulain, D. (2000) *Candida albicans*-derived beta-1,2-linked manno oligosaccharides induce desensitization of macrophages. *Infect. Immun.* **68**, 965–968.
- 11 Jouault, T., El Abed-El Behi, M., Martínez-Esparza, M., Breuilh, L., Trinel, P.-A., Chamailard, M., Trottein, F. and Poulain, D. (2006) Specific recognition of *Candida albicans* by macrophages requires galectin-3 to discriminate *Saccharomyces cerevisiae* and needs association with TLR2 for signaling. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **177**, 4679–4687.
- 12 Jouault, T., Lepage, G., Bernigaud, A., Trinel, P. A., Fradin, C., Wieruszeski, J. M., Strecker, G. and Poulain, D. (1995) Beta-1,2-linked oligomannosides from *Candida albicans* act as signals for tumor necrosis factor alpha production. *Infect. Immun.* **63**, 2378–2381.
- 13 Fradin, C., Poulain, D. and Jouault, T. (2000) beta-1,2-linked oligomannosides from *Candida albicans* bind to a 32-kilodalton macrophage membrane protein homologous to the mammalian lectin galectin-3. *Infect. Immun.* **68**, 4391–4398.

- 14 Han, Y., Kanbe, T., Cherniak, R. and Cutler, J. E. (1997) Biochemical characterization of *Candida albicans* epitopes that can elicit protective and nonprotective antibodies. *Infect. Immun.* **65**, 4100–4107.
- 15 Dromer, F., Chevalier, R., Sendid, B., Improvisi, L., Jouault, T., Robert, R., Mallet, J. M. and Poulain, D. (2002) Synthetic analogues of beta-1,2 oligomannosides prevent intestinal colonization by the pathogenic yeast *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 3869–3876.
- 16 Xin, H., Dziadek, S., Bundle, D. R. and Cutler, J. E. (2008) Synthetic glycopeptide vaccines combining beta-mannan and peptide epitopes induce protection against candidiasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 13526–13531.
- 17 Xin, H., Cartmell, J., Bailey, J. J., Dziadek, S., Bundle, D. R. and Cutler, J. E. (2012) Self-adjuvanting glycopeptide conjugate vaccine against disseminated candidiasis. *PloS One* **7**, e35106.
- 18 Lussier, M., Sdicu, A. M., Bussereau, F., Jacquet, M. and Bussey, H. (1997) The Ktr1p, Ktr3p, and Kre2p/Mnt1p mannosyltransferases participate in the elaboration of yeast O- and N-linked carbohydrate chains. *J. Biol. Chem.* **272**, 15527–15531.
- 19 Yip, C. L., Welch, S. K., Klebl, F., Gilbert, T., Seidel, P., Grant, F. J., O'Hara, P. J. and MacKay, V. L. (1994) Cloning and analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* MNN9 and MNN1 genes required for complex glycosylation of secreted proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 2723–2727.
- 20 Rayner, J. C. and Munro, S. (1998) Identification of the MNN2 and MNN5 mannosyltransferases required for forming and extending the mannose branches of the outer chain mannans of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **273**, 26836–26843.
- 21 Liu, B., Gong, X., Chang, S., Yang, Y., Song, M., Duan, D., Wang, L., Ma, Q. and Wu, J. (2009) Disruption of the OCH1 and MNN1 genes decrease N-glycosylation on glycoprotein expressed in *Kluyveromyces lactis*. *J. Biotechnol.* **143**, 95–102.
- 22 Mille, C., Bobrowicz, P., Trinel, P.-A., Li, H., Maes, E., Guerardel, Y., Fradin, C., Martínez-Esparza, M., Davidson, R. C., Janbon, G., et al. (2008) Identification of a new family of genes involved in beta-1,2-mannosylation of glycans in *Pichia pastoris* and *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.* **283**, 9724–9736.
- 23 Lairson, L. L., Henrissat, B., Davies, G. J. and Withers, S. G. (2008) Glycosyltransferases: structures, functions, and mechanisms. *Annu. Rev. Biochem.* **77**, 521–555.
- 24 Mille, C., Fradin, C., Delplace, F., Trinel, P.-A., Masset, A., François, N., Coddeville, B., Bobrowicz, P., Jouault, T., Guerardel, Y., et al. (2012) Members 5 and 6 of the *Candida albicans* BMT family encode enzymes acting specifically on β -mannosylation of the phospholipomannan cell-wall glycosphingolipid. *Glycobiology* **22**, 1332–1342.
- 25 Faille, C., Wieruszkeski, J. M., Michalski, J. C., Poulain, D. and Strecker, G. (1992) Complete ¹H- and ¹³C-resonance assignments for D-mannooligosaccharides of the beta-D-(1-->2)-linked series released from the phosphopeptidomannan of *Candida albicans* VW.32 (serotype A). *Carbohydr. Res.* **236**, 17–27.
- 26 Wilkins, D. K., Grimshaw, S. B., Receveur, V., Dobson, C. M., Jones, J. A. and Smith, L. J. (1999) Hydrodynamic radii of native and denatured proteins measured by pulse field gradient NMR techniques. *Biochemistry (Mosc.)* **38**, 16424–16431.

- 27 Stewart, T. S., Mendershausen, P. B. and Ballou, C. E. (1968) Preparation of a mannopentaose, mannohexaose, and mannoheptaose from *Saccharomyces cerevisiae* mannan. *Biochemistry (Mosc.)* **7**, 1843–1854.
- 28 Faille, C., Wieruszeski, J. M., Lepage, G., Michalski, J. C., Poulain, D. and Strecker, G. (1991) ¹H-NMR spectroscopy of manno-oligosaccharides of the beta-1,2-linked series released from the phosphopeptidomannan of *Candida albicans* VW-32 (serotype A). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **181**, 1251–1258.
- 29 Hase, S. (1994) High-performance liquid chromatography of pyridylaminated saccharides. *Methods Enzymol.* **230**, 225–237.
- 30 Pourcelot, M., Cattiaux, L., Sfihi-Loualia, G., Fabre, E., Krzewinski, F., Fradin, C., Poulain, D., Delplace, F., Guerardel, Y. and Mallet, J.-M. (2013) Mantyl tagged oligo α (1-2) mannosides as *Candida albicans* β -mannosyltransferases substrates: a comparison between synthetic strategies. *RSC Adv.*
- 31 Gomes, A. C., Miranda, I., Silva, R. M., Moura, G. R., Thomas, B., Akoulitchev, A. and Santos, M. A. S. (2007) A genetic code alteration generates a proteome of high diversity in the human pathogen *Candida albicans*. *Genome Biol.* **8**, R206.
- 32 Miyatake, N., Kamo, M., Satake, K., Uchiyama, Y. and Tsugita, A. (1993) Removal of N-terminal formyl groups and deblocking of pyrrolidone carboxylic acid of proteins with anhydrous hydrazine vapor. *Eur. J. Biochem. FEBS* **212**, 785–789.
- 33 Shibata, N., Suzuki, A., Kobayashi, H. and Okawa, Y. (2007) Chemical structure of the cell-wall mannan of *Candida albicans* serotype A and its difference in yeast and hyphal forms. *Biochem. J.* **404**, 365–372.
- 34 Vinogradov, E., Petersen, B. and Bock, K. (1998) Structural analysis of the intact polysaccharide mannan from *Saccharomyces cerevisiae* yeast using ¹H and ¹³C NMR spectroscopy at 750 MHz. *Carbohydr. Res.* **307**, 177–183.
- 35 Suzuki, A., Takata, Y., Oshie, A., Tezuka, A., Shibata, N., Kobayashi, H., Okawa, Y. and Suzuki, S. (1995) Detection of beta-1,2-mannosyltransferase in *Candida albicans* cells. *FEBS Lett.* **373**, 275–279.
- 36 Shibata, N., Kobayashi, H. and Suzuki, S. (2012) Immunochemistry of pathogenic yeast, *Candida* species, focusing on mannan. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* **88**, 250–265.
- 37 Kobayashi, H., Shibata, N., Nakada, M., Chaki, S., Mizugami, K., Ohkubo, Y. and Suzuki, S. (1990) Structural study of cell wall phosphomannan of *Candida albicans* NIH B-792 (serotype B) strain, with special reference to ¹H and ¹³C NMR analyses of acid-labile oligomannosyl residues. *Arch. Biochem. Biophys.* **278**, 195–204.
- 38 Miyakawa, Y., Kuribayashi, T., Kagaya, K., Suzuki, M., Nakase, T. and Fukazawa, Y. (1992) Role of specific determinants in mannan of *Candida albicans* serotype A in adherence to human buccal epithelial cells. *Infect. Immun.* **60**, 2493–2499.
- 39 Han, Y., Morrison, R. P. and Cutler, J. E. (1998) A vaccine and monoclonal antibodies that enhance mouse resistance to *Candida albicans* vaginal infection. *Infect. Immun.* **66**, 5771–5776.
- 40 Han, Y., Riesselman, M. H. and Cutler, J. E. (2000) Protection against candidiasis by an immunoglobulin G3 (IgG3) monoclonal antibody specific for the same mannotriose as an IgM protective antibody. *Infect. Immun.* **68**, 1649–1654.

- 41 Lee, J.-H., Jang, E.-C. and Han, Y. (2011) Combination immunotherapy of MAb B6.1 with fluconazole augments therapeutic effect to disseminated candidiasis. *Arch. Pharm. Res.* **34**, 399–405.
- 42 Lobsanov, Y. D., Romero, P. A., Sleno, B., Yu, B., Yip, P., Herscovics, A. and Howell, P. L. (2004) Structure of Kre2p/Mnt1p: a yeast alpha1,2-mannosyltransferase involved in mannoprotein biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **279**, 17921–17931.
- 43 Shibata, N., Ikuta, K., Imai, T., Satoh, Y., Satoh, R., Suzuki, A., Kojima, C., Kobayashi, H., Hisamichi, K. and Suzuki, S. (1995) Existence of branched side chains in the cell wall mannan of pathogenic yeast, *Candida albicans*. Structure-antigenicity relationship between the cell wall mannans of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis*. *J. Biol. Chem.* **270**, 1113–1122.
- 44 Shibata, N., Akagi, R., Hosoya, T., Kawahara, K., Suzuki, A., Ikuta, K., Kobayashi, H., Hisamichi, K., Okawa, Y. and Suzuki, S. (1996) Existence of novel branched side chains containing beta-1,2 and alpha-1,6 linkages corresponding to antigenic factor 9 in the mannan of *Candida guilliermondii*. *J. Biol. Chem.* **271**, 9259–9266.
- 45 Suzuki, A., Shibata, N., Suzuki, M., Saitoh, F., Oyamada, H., Kobayashi, H., Suzuki, S. and Okawa, Y. (1997) Characterization of beta-1,2-mannosyltransferase in *Candida guilliermondii* and its utilization in the synthesis of novel oligosaccharides. *J. Biol. Chem.* **272**, 16822–16828.
- 46 Pak, J. E., Arnoux, P., Zhou, S., Sivarajah, P., Satkunarajah, M., Xing, X. and Rini, J. M. (2006) X-ray crystal structure of leukocyte type core 2 beta1,6-N-acetylglucosaminyltransferase. Evidence for a convergence of metal ion-independent glycosyltransferase mechanism. *J. Biol. Chem.* **281**, 26693–26701.

SUPPLEMENTAL FIGURES

Figure S1: Sequence of recombinant Bmt1p obtained with plasmid 3

The sequences in bold represent the coverage by tryptic peptides obtained from a Coomassie-stained SDS/PAGE gel band and analysed by LC-MS/MS (sequence coverage, 60%). The putative N-glycosylation site (NXS) is underlined. The boxed residues indicate the C-terminal hydrophobic region identified with TopPred. The sequence of the catalytic domain is shown in italics. The putative Mn²⁺-binding site, aligning in Bmt2 and Bmt4 [(D/E)XD], is indicated by a star. The numbering corresponds to amino acid positions in the native sequence. Glu⁵³ and Phe⁵⁴ are mutations introduced by the commercial pPICZαA vector.

53	EFPGLSGISI	SSTFSDYYSN	PKQQNKFEQQ	IQDHQTTKKG	KR TIIFPNNE
103	NHVHDHKGSY	MMKDSELVKY	YVETMEQALD	PEDLIYRNRF	TYKLPNIPYT
153	EQKIEMFSDG	GGGGDTSDS	NTDMCPKLST	TIKVEASPAM	NKNGDLKKIL
203	KTFLQEDSFY	YRELSPPFFD	LKKHFDEDTI	<i>DKHWYQFIGS</i>	<i>TVWLEQYGVH</i>
253	<i>LMVSR</i> IIYTE	KDQGS <i>PKFSL</i>	<i>AYLQV</i> FDRNW	<i>KELDN</i> VELIV	PDPEN <i>ISTTN</i>
303	NKNKNK PPYG	YK SVLYPTIA	PIPVYHNSKQ	TGGR FYGIED	PRIVLIKTRH
353	GYEEP VLIYN	SHHRKISEKH	FDNDQEGKIN	FNNYRSLFIG	WIWQTQLGKI
403	HLEELPNNEF	KKNEYIKIKE	FVKPN NNRGR	TEKNWALFIN	YNQRLNQGF D
453	SHVYFANQLK	NLKILKCSIL	ND [*] NDDDCWE	FQMDDYEDAG	VLHGGTELIN
503	INQLLHQYDY	PELNSIK DLI	PNGREY WVGF	ARASLKNCGC	GSR MYRP NLI
553	VLMK DGKN NYK	FAYVSS FVGL	GIEIL PWYLD	KGLCEHYNLI	IPNGISSWTI
603	EKDLHQEKD	KQVMDYMAFT	ISR RDATVDV	VYVKGLLKAL	FTDSSSSKHL
653	LAVEQTGFKS	VTNVDCALKN	SEK FCKIYGE	TF	

Figure S2: $^1\text{H-NMR}$ spectra of purified neutral α -oligomannosides ranging from DP3 to DP8 obtained from *S. cerevisiae* PPM by acetolysis. These oligosaccharides were used as acceptor substrates for *Bmt1p* after being tagged with 2-aminopyridine.

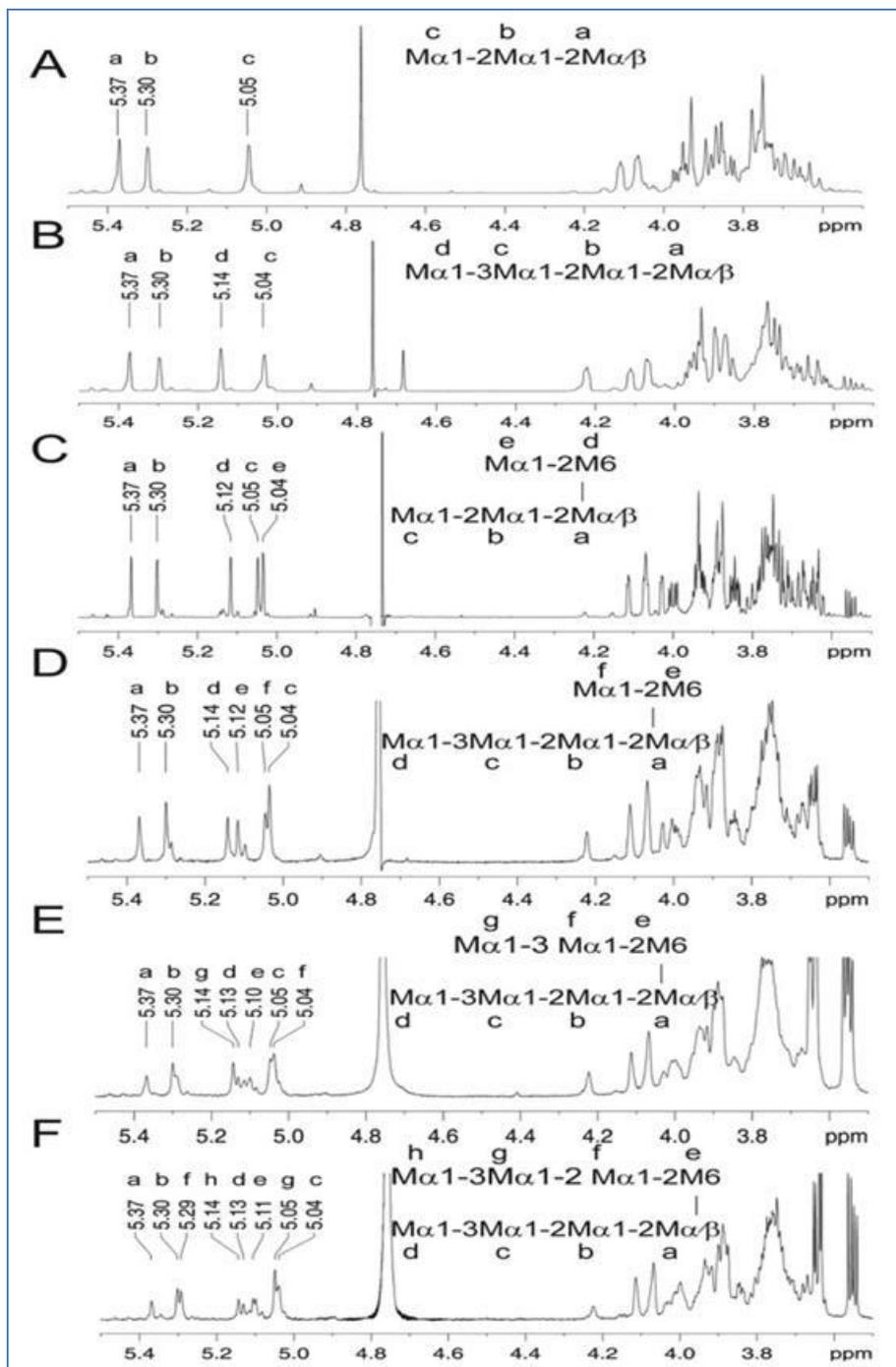


Figure S3: $^1\text{H-NMR}$ spectra of purified neutral α -oligomannosides ranging from DP2 to DP6 obtained from ΔBMT1 *C. albicans* PPM acid-stable moiety by acetolysis. These oligosaccharides were used as acceptor substrates for *Bmt1p* after being tagged with 2-aminopyridine.

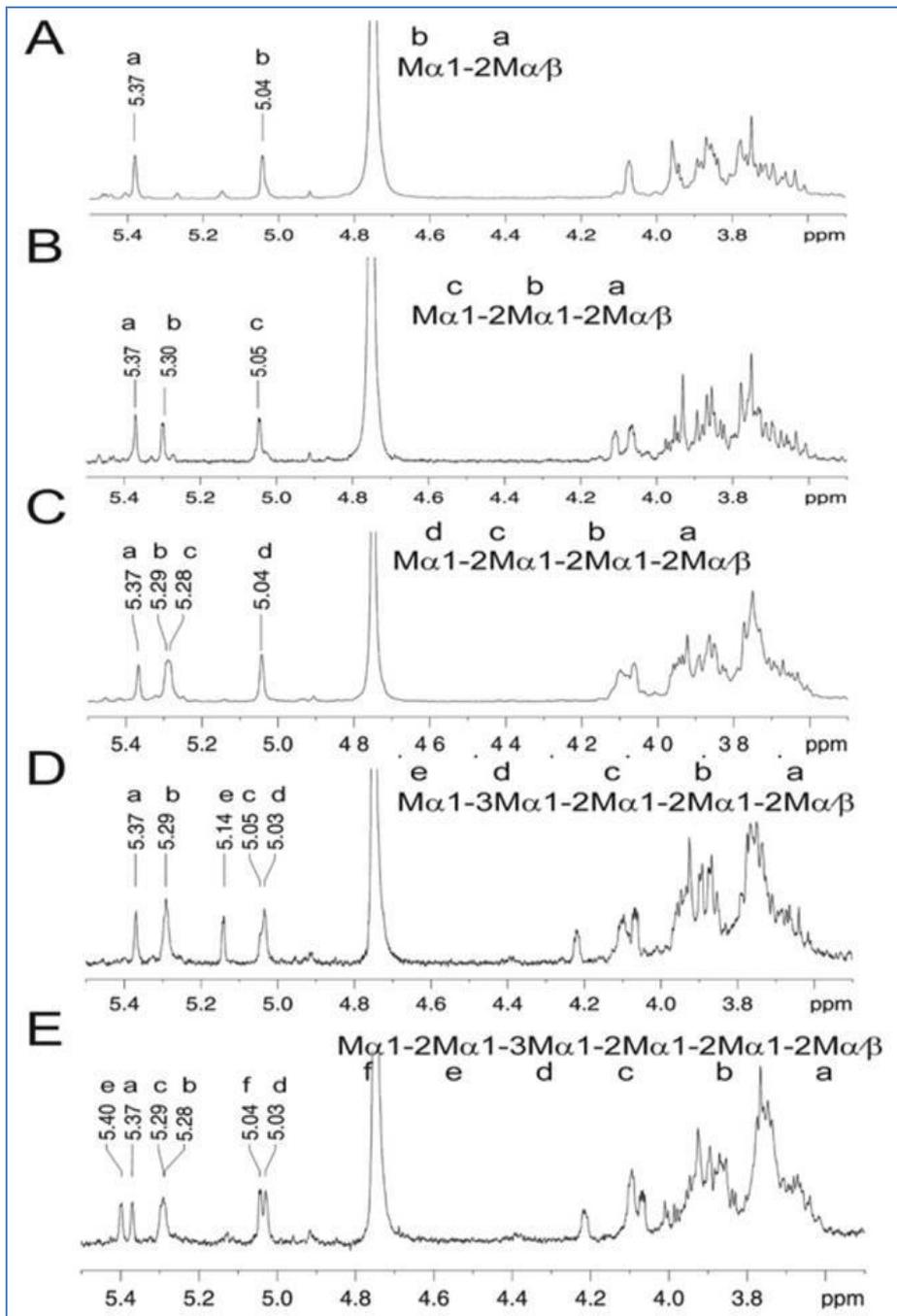
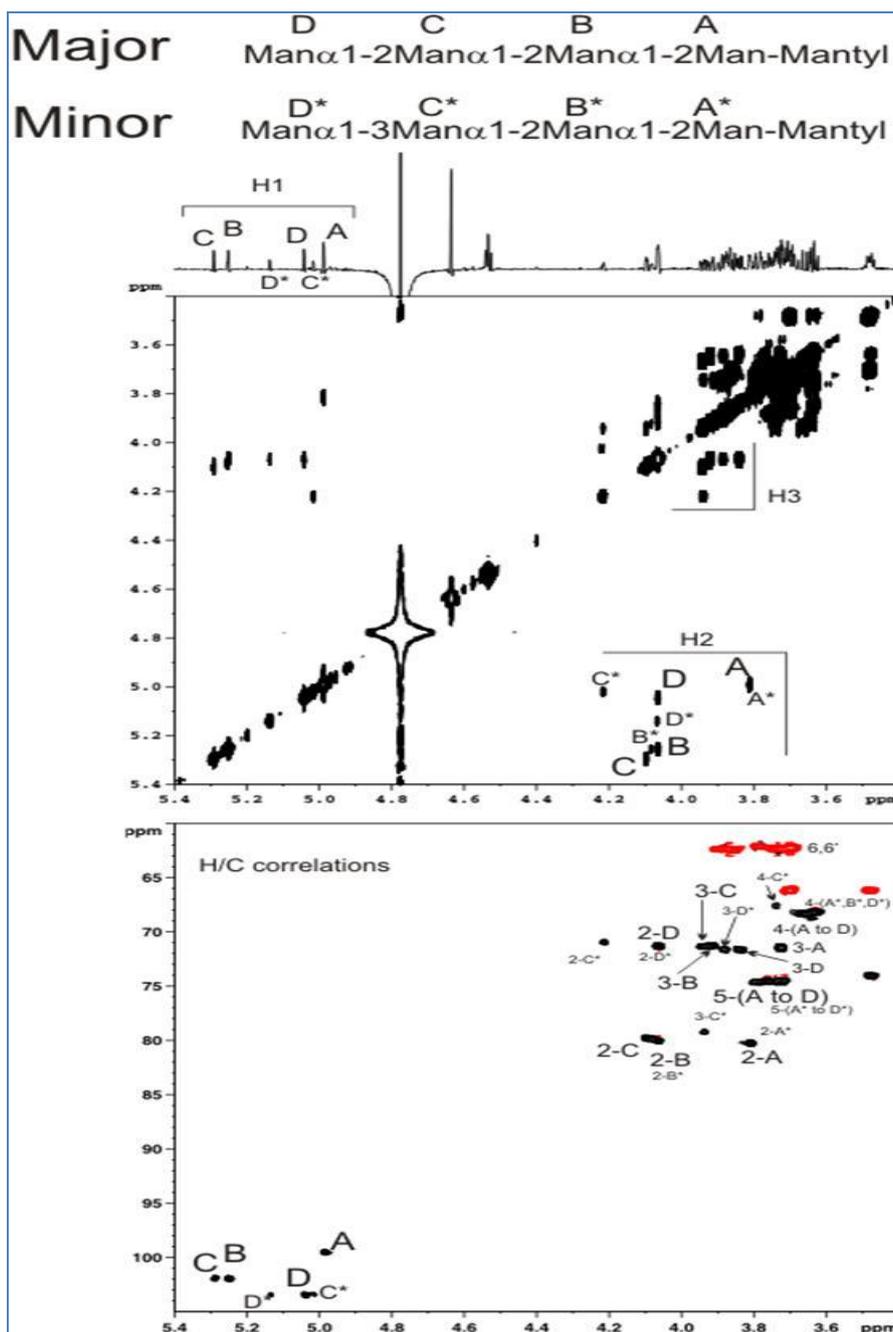


Figure S4: Detailed NMR analysis of synthetic mantylated oligomannosyl acceptor substrate DP4M. As described in the main text, DP4M comprises one major oligosaccharide and one minor oligosaccharide that could not be individually purified. Upper panel: COSY90 experiment giving ^1H - ^1H correlations through $^3J_{\text{H,H}}$ coupling constants. Lower panel: ^1H - ^{13}C HSQC experiment which gives H-C correlations $^1J_{\text{H,C}}$ proving the position of substitution.



SUPPLEMENTAL TABLES

Table S1: Structural parameters of 2-aminopyridine tagged oligomannosyl acceptor substrates. NMR parameters of purified oligosaccharides generated by chemical degradation of PPM isolated from *S. cerevisiae* (*sc*) and the *C. albicans* (*ca*) Δ BMT1 mutant strain. The $[M+Na]^+$ m/z values obtained by MALDI-TOF-MS and NP-FL-HPLC retention time (RT) of 2-aminopyridine(AP)-tagged oligosaccharides are shown. DP, degree of polymerization.

	Residues and sequences						Proton	δ (ppm)						2AP-DP	
	F	E	D	C	B	A		F	E	D	C	B	A	$[M+Na]^+$	RT (min)
DP2_{CA}					M α 1-2	M	H-1					5.04	5.37	443.2	10.1
							H-2					4.07	3.94		
DP3				M α 1-2	M α 1-2	M	H-1					5.04	5.30	605.1	15.4
							H-2					4.06	4.11		
DP4_{sc}			M α 1-3	M α 1-2	M α 1-2	M	H-1					5.14	5.04	767.1	20
							H-2					4.07	4.22		
DP4α_{CA}			M α 1-2	M α 1-2	M α 1-2	M	H-1					5.04	5.28	767.1	20
							H-2					4.05	4.08		
DP4 β_{CA}			M β 1-2	M β 1-2	M β 1-2	M	H-1					4.92	4.93	767.1	19.7
							H-2					4.15	4.42		
DP5_{sc}					M α 1-2	M	H-1					5.04	5.12	929.1	22.1
					α 1-6	↓	H-2					4.07	4.03		
				M α 1-2	M α 1-2	M	H-1					5.05	5.30		
							H-2					4.07	4.11		
DP5_{CA}		M α 1-3	M α 1-2	M α 1-2	M α 1-2	M	H-1					5.14	5.03	929.1	22.7
							H-2					4.07	4.21		
DP6_{sc}					M α 1-2	M	H-1					5.05	5.12	1091.1	24.7
					α 1-6	↓	H-2					4.07	4.03		
			M α 1-3	M α 1-2	M α 1-2	M	H-1					5.14	5.04		
							H-2					4.07	4.22		
DP6_{CA}	M α 1-2	M α 1-3	M α 1-2	M α 1-2	M α 1-2	M	H-1					5.04	5.40	1091.1	25.4
							H-2					4.06	4.09		
DP7_{sc}				M α 1-3	M α 1-2	M	H-1					5.14	5.05	1253.1	26.6
					α 1-6	↓	H-2					4.06	4.06		
			M α 1-3	M α 1-2	M α 1-2	M	H-1					5.13	5.04		
							H-2					4.06	4.22		
DP8_{sc}			M α 1-3	M α 1-2	M α 1-2	M	H-1					5.14	5.05	1415.1	28.3
					α 1-6	↓	H-2					4.06	4.06		
			M α 1-3	M α 1-2	M α 1-2	M	H-1					5.13	5.22		
							H-2					4.06	4.06		

Table S2: NMR parameters of the synthetic mantylated oligomannosyl acceptor substrate DP4M. As described in the main text, DP4M is constituted by one major oligosaccharide and one minor oligosaccharide that could not be individually purified: ^1H - ^{13}C Chemical shifts of major $\text{Man}(\alpha 1-2)\text{Man}(\alpha 1-2)\text{Man}(\alpha 1-2)\text{Man}(\alpha)\text{-Mantyl}$ (A-D) and minor $\text{Man}(\alpha 1-3)\text{Man}(\alpha 1-2)\text{Man}(\alpha 1-2)\text{Man}(\alpha)\text{-Mantyl}$ (A*- D*) oligosaccharides. Data were obtained by ^1H - ^1H COSY 90 and ^1H - ^{13}C HSQC experiments (**Figure. S4**). Bold characters correspond to position of substitution.

Residues	Chemical shifts (ppm)			
	H1/C1	H2/C2	H3/C3	H4/C4
A	4.98/99.5	3.81/ 80.2	3.72/71.4	~3.65/68
B	5.25/101.9	4.06/ 80.0	3.92/71.3	~3.65/68
C	5.29/101.9	4.09/ 79.8	3.94/71.3	~3.65/68
D	5.04/103.5	4.06/71.3	3.84/71.6	~3.65/68
A*	4.97/99.5	3.82/ 80.2	3.72/71.4	~3.65/68
B*	5.25/101.9	4.07/ 79.9	3.92/71.3	~3.65/68
C*	5.01/103.4	4.21/70.9	3.94/ 79.2	3.74/67.6
D*	5.13/103.4	4.06/71.3	3.88/71.6	~3.65/68

II.4. Tests de purification de Bmt1p

Dans la perspective de réaliser des études cristallographiques, des essais de purification de Bmt1p ont été effectués soit par chromatographie d'affinité sur colonne de Nickel ou par l'utilisation des techniques chromatographiques classiques telles la chromatographie d'échange d'ions (anionique et cationique).

Préalablement aux essais de purification, les mannanes présents dans les surnageants de culture de *Pichia Pastoris* ont été éliminés par ConA-Sepharose.

Dans un premier temps, Bmt1p a été produite chez *Pichia Pastoris* avec une étiquette 6xHis du côté C-terminal, ce qui nous a permis de réaliser les premiers tests de purification de Bmt1p par chromatographie d'affinité sur colonne de Nickel (HisTrap H, 1ml). L'élution a été effectuée avec un gradient d'imidazole (0 à 500mM) en présence de 0.5% de Triton X-100. Cette étape a permis l'obtention d'une protéine pré-purifiée bien concentrée (1 mg/mL), avec un rendement de purification de 70%. Néanmoins cette forme pré-purifiée de Bmt1p ne présente aucune activité enzymatique. En effet, la présence d'une étiquette 6xHis du côté C-terminal, adjacente au domaine catalytique, pourrait être responsable d'un mauvais repliement et par conséquent des problèmes d'agglomération et de précipitation de Bmt1p.

Afin de vérifier notre hypothèse, Bmt1p a été également produite chez *Pichia Pastoris* avec une étiquette 6xHis du côté N-terminal, cette dernière a été purifiée sur colonne de Nickel. La même démarche a été retenue, cependant Bmt1p ne présente aucune activité enzymatique avant et après purification. Ce résultat peut s'expliquer d'une part, par la présence d'une étiquette 6xHis du côté N-terminal et d'un domaine hydrophobe de 20 acides aminés du côté C-terminal de Bmt1 ce qui ne favoriserait pas alors le bon repliement de Bmt1p et d'autre part, par le fait que l'activité enzymatique de Bmt1p est totalement inhibée en présence de Nickel.

Dans un deuxième temps et afin de remédier aux problèmes de solubilité rencontrés et pour avoir une enzyme active nous avons opté pour :

- 1-La construction d'une nouvelle forme de Bmt1p, dépourvue d'étiquette 6xHis chez *Pichia Pastoris*.
- 2- La réalisation de tests d'activité enzymatique en présence de différents détergents
- 3-Le changement de méthode de purification : chromatographie d'échange d'ions

Cette nouvelle forme de Bmt1p a été produite au laboratoire et elle a été testée en présence de plusieurs détergents afin d'améliorer sa solubilité. Les résultats obtenus montrent qu'en présence des détergents : CHAPS 0.1%, triton X-100 à 0.5% et DDM à 0.5%, Bmt1p présente une activité enzymatique dans les surnageants de culture avant purification et une meilleure solubilité. Pour des raisons de coût, nous avons privilégié l'utilisation du CHAPS 0.1% et du triton X-100 à 0.5% dans les surnageants de culture de Bmt1p.

Après avoir déterminé les conditions optimales d'activité enzymatique de Bmt1p et étudié l'effet de différents ions divalents sur son activité, nous avons constaté que Bmt1p présente une activité maximale à 28°C dans la zone de pH 6-7, et que Bmt1p ne requiert pas d'ion divalent spécifique (voir article présenté en II.3.4.). Néanmoins, Bmt1p était complètement inactive en présence du NiCl₂ et ZnCl₂. Des travaux antérieurs ont montré que les levures du genre *Candida* cultivées à 28°C et à pH7 présentent une activité β -1,2 mannosyltransférase plus significative par rapport à celles cultivées à 37°C et à pH2 (**Goto et Okawa, 2008 ; Goto et al, 2009**). Après avoir observé l'effet inhibiteur du Nickel sur l'activité enzymatique de Bmt1p nous avons décidé de mettre au point une nouvelle méthode de purification de Bmt1p par chromatographie d'échange d'ions (anionique et cationique). Les premiers essais ont été réalisés par chromatographie d'échange d'anion à l'aide du système Akta FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography, GE Healthcare). Pour ce faire nous avons utilisé des colonnes de type HiTrap Q FF 1ml (GE Healthcare), le tampon A (Tris HCl 20mM pH 8, heptyl-mannose 0.5%) et le tampon B (Tris HCl 20mM pH 8, heptyl-mannose 0.5%, NaCl 1M). Comme le pHi de Bmt1p est de 6,6 nous avons décidé d'ajuster le pH du surnageant de culture contenant Bmt1p à pH 8 par ajout de la soude 1M. Dans un premier temps, la colonne a été équilibrée dans le tampon A, ensuite le surnageant de culture contenant Bmt1p a été chargé sur la colonne avec un débit de 0,5 ml / min. L'élution a été effectuée grâce au tampon B à un débit de 2 ml / min pendant 10 min.

L'analyse des différentes fractions recueillies par SDS-PAGE nous a permis de constater que le rendement de la purification était faible car Bmt1p se trouve majoritairement dans la fraction non retenue sur la colonne. De plus, les fractions contenant l'enzyme purifiée s'étalent sur plusieurs tubes ce qui est dû à une mauvaise fixation de Bmt1p sur la colonne. Cela pourrait s'expliquer également par le pH basique du surnageant qui ne favorise pas le bon repliement de la protéine.

Afin d'améliorer le rendement de la purification, nous avons également tenté de purifier Bmt1p par chromatographie d'échange de cation à l'aide du système Akta FPLC (**Figure 30B**). Dans ce contexte, nous avons utilisé la colonne HiTrap SP FF 1ml (GE Healthcare), le tampon A (Acétate de sodium 20mM pH 5, heptyl-mannose 0.5%), et le tampon B (Acétate de sodium 20mM pH 5, heptyl-mannose 0.5%, NaCl 1M). Le pH du surnageant a été ajusté à pH 5 avec de l'HCl 1M. La même démarche de purification a été appliquée.

Le rendement de la purification a été estimé à 30% par mesure de densitométrie après analyse de Bmt1p purifiée par SDS-PAGE (**Figure 30A**). Cette forme a été concentrée par ultra-filtration (vivaspin), au cours de laquelle la protéine a immédiatement précipité. Les problèmes liés à la précipitation et à la stabilité de l'enzyme Bmt1p peuvent s'expliquer par la présence d'un domaine hydrophobe de 20 acides aminés au niveau du domaine catalytique. Bmt1p a été testée pour son activité enzymatique qui s'est révélée négative après purification.

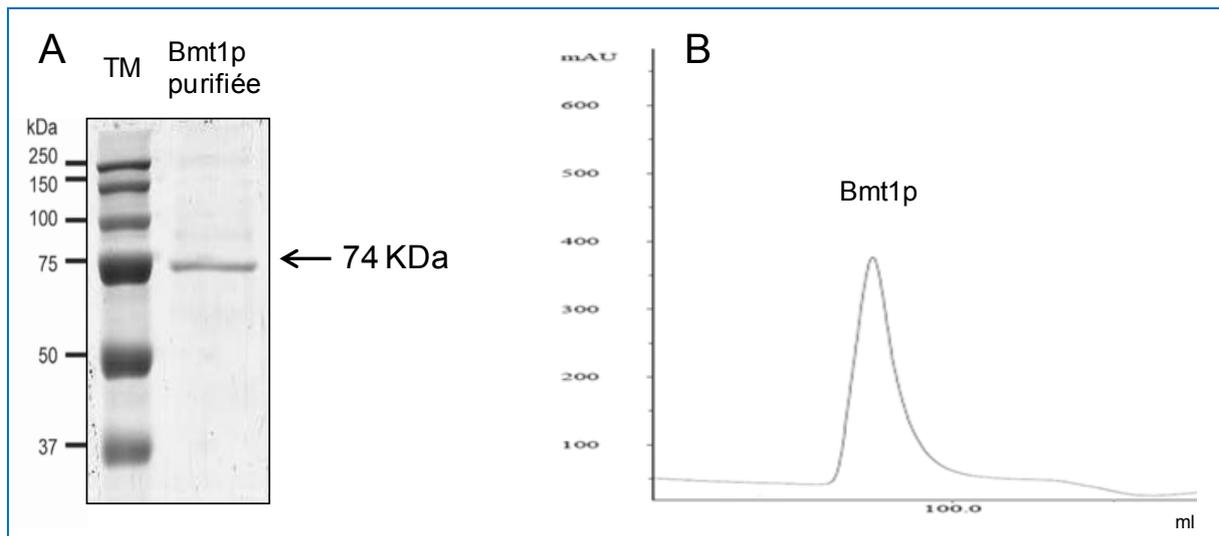


Figure 30 : Purification de Bmt1p par chromatographie d'échange de cation. A ; Analyse SDS-PAGE de Bmt1p purifiée. B ; Chromatogramme FPLC illustrant la purification de Bmt1p par chromatographie d'échange de cation. (axe des abscisses : volume des fractions récupérées en (ml), axe des ordonnées : unité arbitraire), la purification de Bmt1p a été suivie par mesure de l'absorbance à 280nm.

Bien que les essais de purification de Bmt1p n'aient pas donné les résultats souhaités, l'ensemble de ces mises au point servira comme préalable pour les étapes de purification des autres CaBmts et notamment de CaBmt3 dont les essais de purification sont détaillés dans la partie B des résultats.

II.5. Conclusion et discussion sur Bmt1p

Dans ce travail, nous avons pu mettre en évidence une activité β -1,2-mannosyltransférase propre à Bmt1p pour la première fois *in vitro* et démontré que Bmt1p était capable de transférer successivement deux résidus β -mannose sur l'extrémité non réductrice d'un substrat linéaire oligomannosidique exclusivement lié en α -1,2. Bmt1p pourrait ainsi d'une part initier la β -1,2 mannosylation de la partie acido-stable du PPM et d'autre part compenser l'absence de CaBmt3 *in vitro* en jouant également son rôle : initiation de l'élongation de la β -1,2 mannosylation par l'ajout du deuxième résidu β -mannose sur cette même partie. Ce double rôle a été également suggéré récemment pour CaBmt5 qui est la β -1,2-mannosyltransférase responsable de l'initiation de la β -mannosylation et probablement de l'addition du deuxième résidu β -mannose sur la partie glycanique du phospholipomannane (PLM) de *C. albicans in vivo* (Mille *et al*, 2012).

Grâce au panel important de substrats naturels préparés au cours de ma thèse, à partir du PPM de la levure *Saccharomyces cerevisiae* qui présente une structure similaire à celle du PPM de *C. albicans* sans les liaisons β -1,2 oligomannosidiques, et du PPM de souche de *C. albicans* déficiente en CaBmt1, nous avons donc caractérisé l'enzyme Bmt1p, par la connaissance de la structure minimale de son substrat accepteur en termes de degré de polymérisation et de liaison ainsi que par la détermination des conditions optimales de la réaction enzymatique.

L'analyse de la spécificité de substrat accepteur montre que Bmt1p présente la plus forte activité sur des oligomannosides linéaires exclusivement liés en α -1,2 de degré de polymérisation 3 et 4 avec une vitesse catalytique de l'ordre de 40 nmol/h/mg de protéine. Cette vitesse catalytique est du même ordre que celle observée pour des β -1,2 mannosyltransférases natives de *C. albicans* de sérotype A ou encore des β -1,2 mannosyltransférases de *Candida Guilliermondii* qui est estimée entre 30 et 50 nmol/h/mg de

protéine (**Shibata et al, 2012**). Par ailleurs, Bmt1p présente une activité enzymatique maximale à pH 6.5 et à 28°C.

La mise au point d'un protocole d'isolement et de purification des produits formés par Bmt1p nous a permis de caractériser structurellement ces derniers par spectrométrie de masse et pour le composé majoritaire par RMN et de confirmer ainsi l'activité β -1,2-mannosyltransférase de Bmt1p *in vitro*.

D'autre part, nous avons constaté une protéolyse spontanée de Bmt1p pendant son stockage à 4°C. Cette observation a été confirmée grâce au séquençage N-terminal qui a permis d'identifier trois sites de clivages protéolytiques naturels donnant lieu à des formes stables et plus actives. Ainsi ces différentes formes ont été produites au laboratoire chez *E. coli* mais seule la forme complète produite précédemment chez *Pichia Pastoris* a été active. L'un des sites de clivage de Bmt1p a été identifié au milieu du domaine catalytique ce qui laisse supposer que Bmt1p posséderait deux sous-domaines catalytiques, les analyses par DLS ont montré que ces derniers étaient étroitement liés. Ces observations sont en faveur de l'hypothèse que Bmt1p présente un repliement de type GT-A (**Figure 12A chapitre 4 des généralités**) comme c'est le cas d'ailleurs pour les deux α -mannosyltransférases dont la structure tridimensionnelle a été résolue à ce jour : l' α -1,2 mannosyltransférase Kre2 de *S. cerevisiae* (ScMnt1/Kre2) (**Lobsanov et al, 2004**) et l' α -1,6 mannosyltransférase Mnn9 de *S. cerevisiae* (ScMnn9) (**Striebeck et al, 2013**).

PARTIE B

Caractérisation de l'activité β 1.2 mannosyltransférase de CaBmt3

Introduction : Choix de Bmt3

Après avoir caractérisé CaBmt1, enzyme initiateur de la β -mannosylation sur la partie acido-stable du PPM de *C. albicans* et toujours dans la perspective de comprendre les voies de biosynthèse des β -1,2 mannosides pariétaux de *C. albicans*, nous nous sommes orientés vers la caractérisation biochimique de CaBmt3 car il s'agit d'une enzyme d'élongation impliquée dans l'addition du 2^{ème} beta man sur les parties acido-stable et acido-labile du PPM de *C. albicans*.

La caractérisation de Bmt1p nous a servi de modèle. En effet nous avons adapté les protocoles mis au point précédemment, d'une part pour l'obtention de l'équivalent des substrats endogènes de CaBmt3 en utilisant comme produit de départ le PPM de souche de *C. albicans* déficiente dans la synthèse de CaBmt3, et d'autre part pour l'étude d'une forme recombinante soluble de CaBmt3 produite au sein de l'équipe chez *Pichia Pastoris*, nommée Bmt3p (cette nomenclature sera utilisée dans la suite de cette partie).

Chapitre I : Obtention des substrats potentiels

I.1. Introduction

Les substrats naturels et synthétiques précédemment décrits dans la partie A des résultats ont été utilisés pour étudier l'activité enzymatique de Bmt3p *in vitro*. Par ailleurs, en collaboration avec une étudiante qui a réalisé son stage de licence au sein de notre équipe, nous avons isolé et caractérisé de nouveaux substrats naturels oligomannosidiques à partir des PPMs de *C. albicans* des souches déficientes en CaBmt3. De plus, un autre substrat de synthèse nommé DP4M-b préparé par l'équipe du Dr. Mallet a été utilisé pour compléter la caractérisation biochimique de Bmt3p *in vitro*.

I.2. Substrats naturels issus du PPM de *C. albicans* Δ BMT3

I.2.1. Isolement et purification

Une partie du travail effectué au cours de la caractérisation biochimique de Bmt3p a été axée sur l'isolement, la préparation et la purification de structures potentiellement équivalentes aux substrats endogènes de l'enzyme. Grâce à notre collaboration avec l'équipe

du Pr. Poulain (équipe Candida et Candidoses Lille 2) nous avons reçu des extraits pariétaux contenant des PPMs de souches de *C. albicans* Δ BMT3 cultivées soit à 28°C soit à 37°C ; ces derniers ont été utilisés par la suite comme produits de départ pour l'obtention de nouveaux substrats. La stratégie suivie est détaillée dans la **figure 31**.

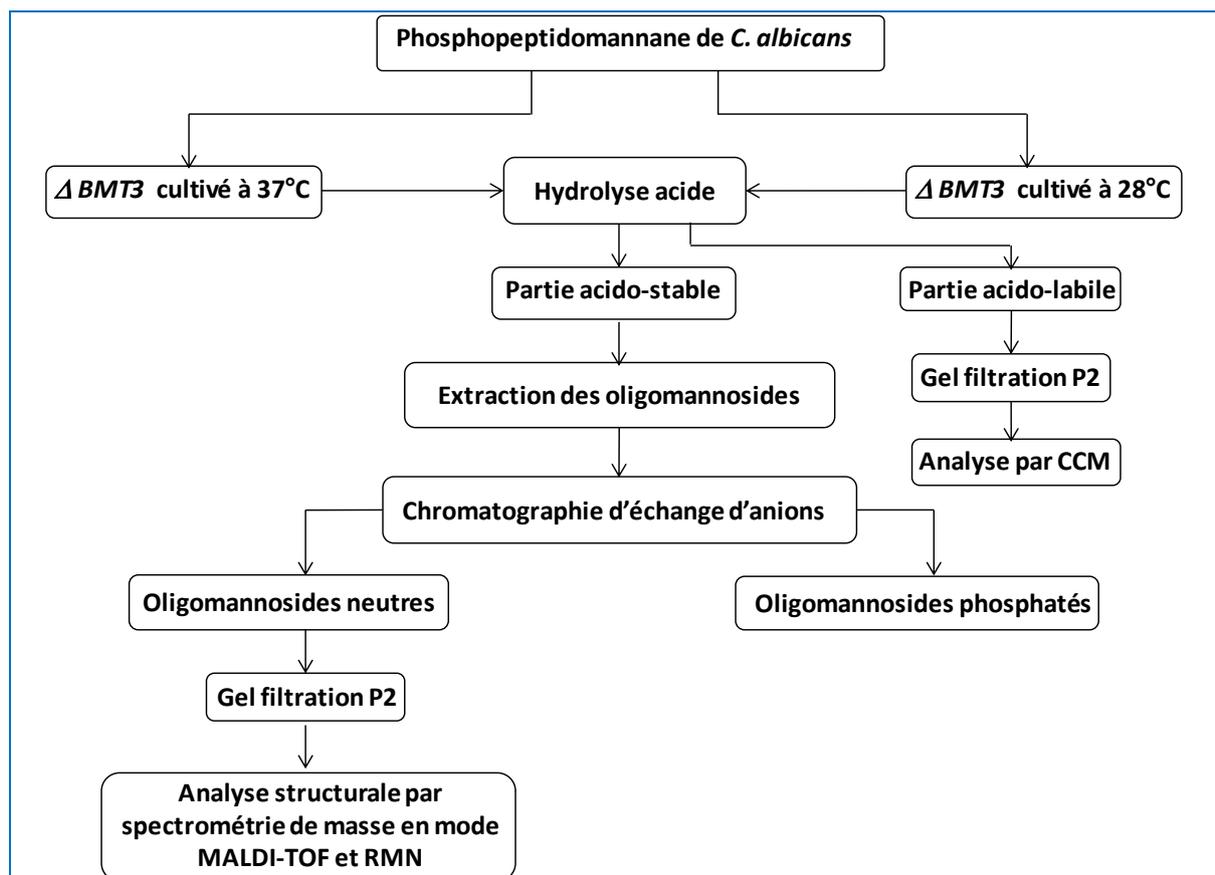


Figure 31 : Schéma de la stratégie expérimentale suivie pour l'obtention des substrats oligomannosidiques à partir des PPMs de souches de *C. albicans* déficientes de CaBmt3 cultivées soit à 28°C soit à 37°C.

Nous avons dans un premier temps effectué une hydrolyse acide par traitement des PPMs avec de l'HCl 10mM pendant 1 heure. En effet, comme vu précédemment, l'hydrolyse acide permet de séparer les PPMs en deux parties : une partie acido-stable et une partie acido-labile. Ces deux fractions ont été analysées par chromatographie sur couche mince (CCM) après fractionnement par chromatographie sur Bio gel P2 (**Figure 32**). La fraction acido-stable (AS) ne migre pas sur la CCM vu son haut poids moléculaire. Cependant, la fraction

acido-labile (AL) migre sur la CCM. Nous avons pu y constater la présence d'un disaccharide majoritaire ce qui est dû à l'absence de CaBmt3 dans ces souches, mais également la présence d'un tri- et d'un tétra-saccharide minoritaires, qui pourrait s'expliquer par une faible activité de compensation par les autres CaBmts présentes dans les souches. Le témoin de masse utilisé est : Glucidex 12 qui est composé de saccharides de DP différents allant de DP 1 à 12.

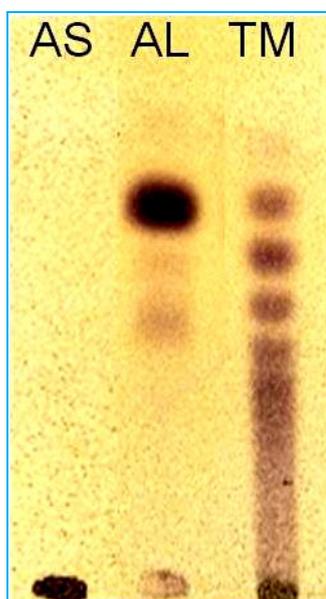


Figure 32 : Analyse par chromatographie sur couche mince des fractions acido-stable (AS) et acido-labile (AL) obtenues après hydrolyse acide et fractionnement sur Bio gel P2 des PPMs de souche de *C. albicans* déficiente de CaBmt3 cultivée à 37°C. TM : Témoin de DP pour la migration. (Pour les conditions de migration et de révélation se référer à la figure 15).

Dans un deuxième temps, les parties acido-stables ont été soumises à une acétolyse qui coupe préférentiellement les mannoses liés en α -1,6, suivie d'une désacétylation. Le mélange d'oligomannosides ainsi obtenu a été séparé en deux familles en fonction de sa charge : une fraction contenant des oligomannosides phosphatés et une fraction contenant des oligomannosides neutres. Pour la suite de ce travail, nous avons étudié les substrats neutres que nous avons isolés et purifiés par chromatographie de gel filtration P2 puis analysés par chromatographie sur couche mince. A titre d'exemple **la figure 33** représente l'analyse par chromatographie sur couche mince des oligomannosides neutres issus des PPMs de souche

Δ BMT3 cultivée à 28°C après fractionnement sur Bio-gel P2. Nous avons alors pu constater la présence d'oligomannosides neutres de degré de polymérisation de 1 à 10. Nous avons obtenu le même profil en CCM après analyse des oligomannosides neutres issus des PPMs de souche Δ BMT3 cultivée à 37°C.

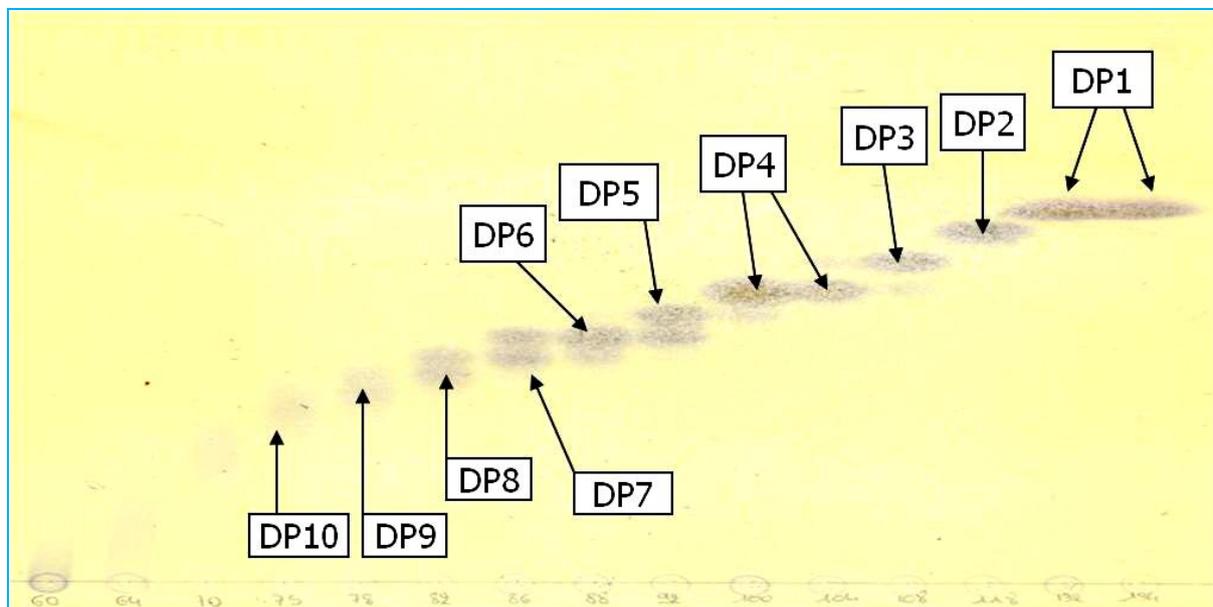


Figure 33 : Analyse par chromatographie sur couche mince des oligomannosides neutres issus des PPMs de souche Δ BMT3 cultivée à 28°C, après fractionnement sur Bio-gel P2. (Deux cycles de migration sont effectués dans le solvant (n butanol/acide acétique/ H₂O (2/1/1,5))

I.2.2. Analyse structurale des substrats naturels

I.2.2.1. Par spectrométrie de masse MALDI-TOF

Dans le but de confirmer la composition des fractions neutres issues des parties acido-stables des PPMs de *C. albicans* Δ BMT3, nous avons réalisé des analyses par spectrométrie de masse MALDI-TOF. En effet, chaque fraction est analysée séparément en mode positif (matrice DHB), les ions majoritaires sont détectés sous la forme $[M+Na]^+$. Les résultats obtenus confirment que les oligomannosides issus des PPMs de souches de *C. albicans* déficientes en CaBmt3 cultivées à 28°C et à 37°C présentent globalement le même degré de

polymérisation qui varie de 1 à 10. A titre d'exemple la **figure 34A** présente l'analyse en spectrométrie de masse de la fraction neutre issue des PPMs de souche Δ BMT3 cultivée à 37°C.

Comme CaBmt3 agit après action de CaBmt1 *in vivo*, c'est-à-dire sur un substrat qui se termine par un mannose lié en β -1,2 et donc résistant à l'action des α -mannosidases, nous avons vérifié la présence de ces substrats potentiels pour l'étude de l'activité de Bmt3p *in vitro*. Dans ce contexte nous avons soumis l'ensemble des substrats obtenus à une digestion par les α -exomannosidases. Les produits de la réaction ont été par la suite analysés par CCM (voir le paragraphe 1.2.3) et par spectrométrie de masse MALDI-TOF. **La figure 34 B et C** illustre la composition d'une sous fraction neutre (souche Δ BMT3 37°C) avant (**B**) et après (**C**) action des α -exomannosidases après analyse en spectrométrie de masse. Les résultats obtenus confirment la présence dans cette sous-fraction de substrats neutres résistant à l'action des α -exomannosidases de DP 5 à 8.

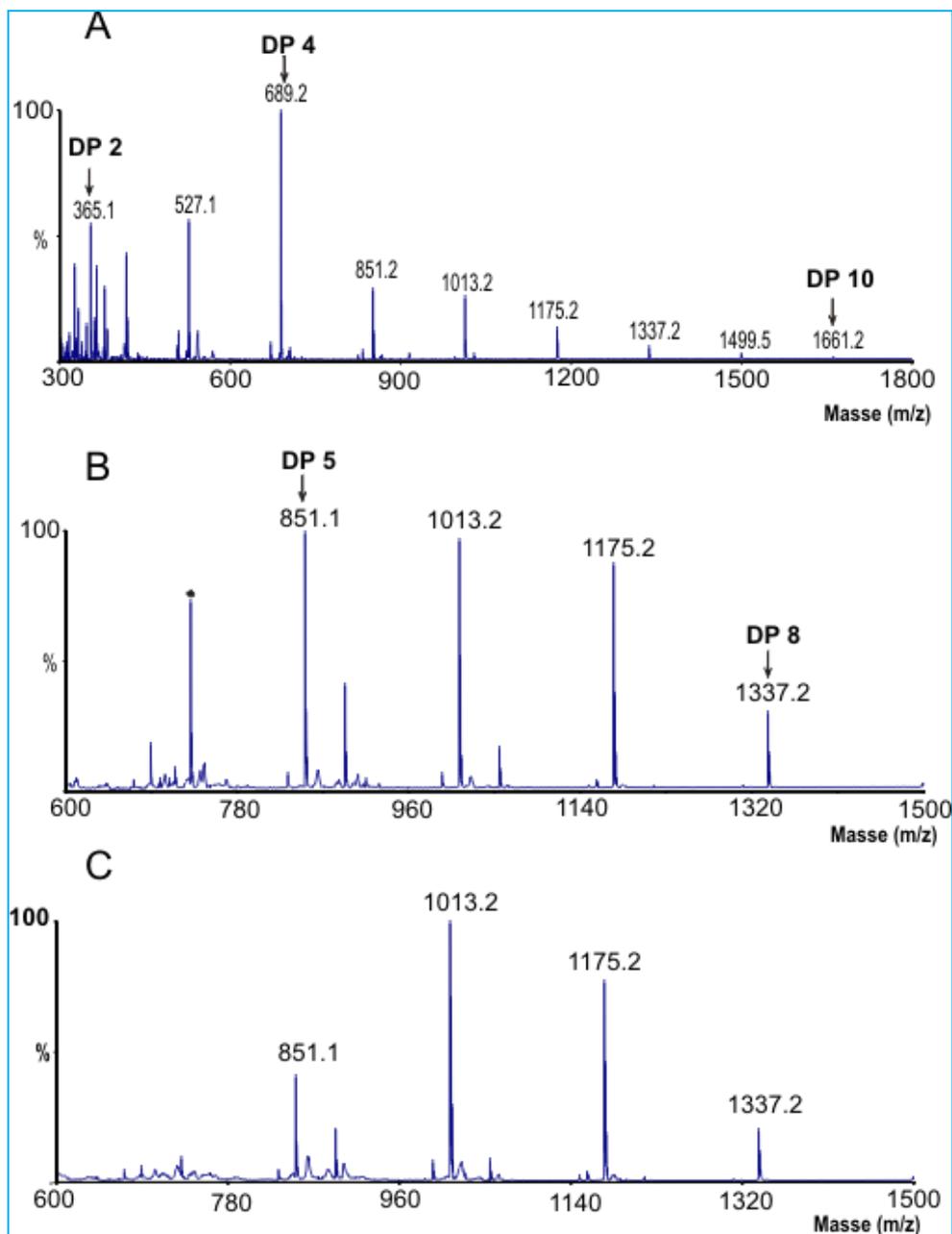


Figure 34 : Analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF. A ; Oligomannosides purifiés des PPMs de *C. albicans* Δ BMT3 cultivée à 37°C. Fraction composée d'oligomannosides de degré de polymérisation 5 à 8 avant (B) et après (C) traitement aux α -exomannosidases.

I.2.2.2. Par résonance magnétique nucléaire

La recherche de substrats potentiels pour Bmt3p a été effectuée également par la réalisation d'expériences RMN quand les quantités d'oligomannosides neutres purifiés étaient suffisantes. Les analyses RMN ont ainsi été effectuées uniquement sur les DP 3 et 4 issus des

PPMs de *C. albicans* Δ BMT3 cultivée à 28°C et les résultats obtenus indiquent que ces substrats sont composés exclusivement de Mannoses liés en α -1,2 comme le montre la **figure 35 A et B** et sont donc dépourvus de β -Man terminal.

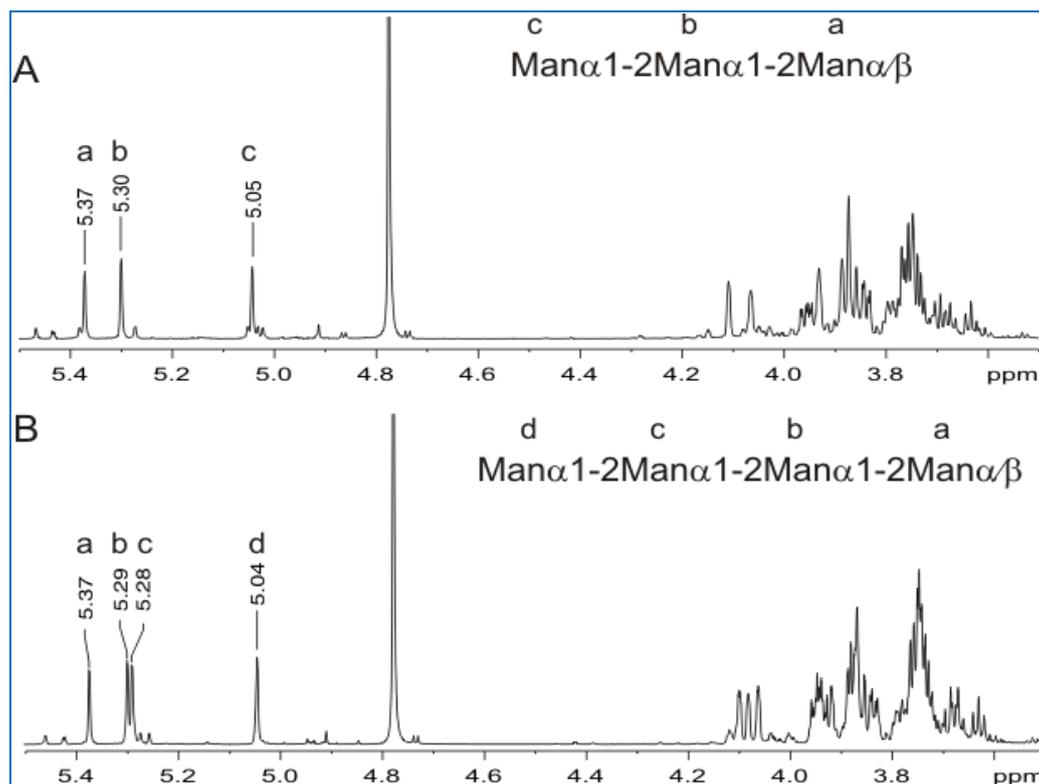


Figure 35 : Spectres protons ^1H des oligomannosides neutres DP3 et DP4 issus des PPMs de souche Δ BMT3 cultivée à 28°C.

I.2.3. Analyse par CCM des substrats résistants à l'action des α -mannosidases

Dans la même perspective, comme précisé en 1.2.2., nous avons traité les substrats neutres issus des PPMs Δ BMT3 par les α -(1-2/ 1-3 et 1-6) exomannosidases pendant 48h puis analysé les résultats obtenus par chromatographie sur couche mince. Pour exemple, la **figure 36** montre l'analyse par CCM des substrats purifiés des PPMs de *C. albicans* Δ BMT3 cultivée à 28°C avant (T) et après (E) action des α -mannosidases.

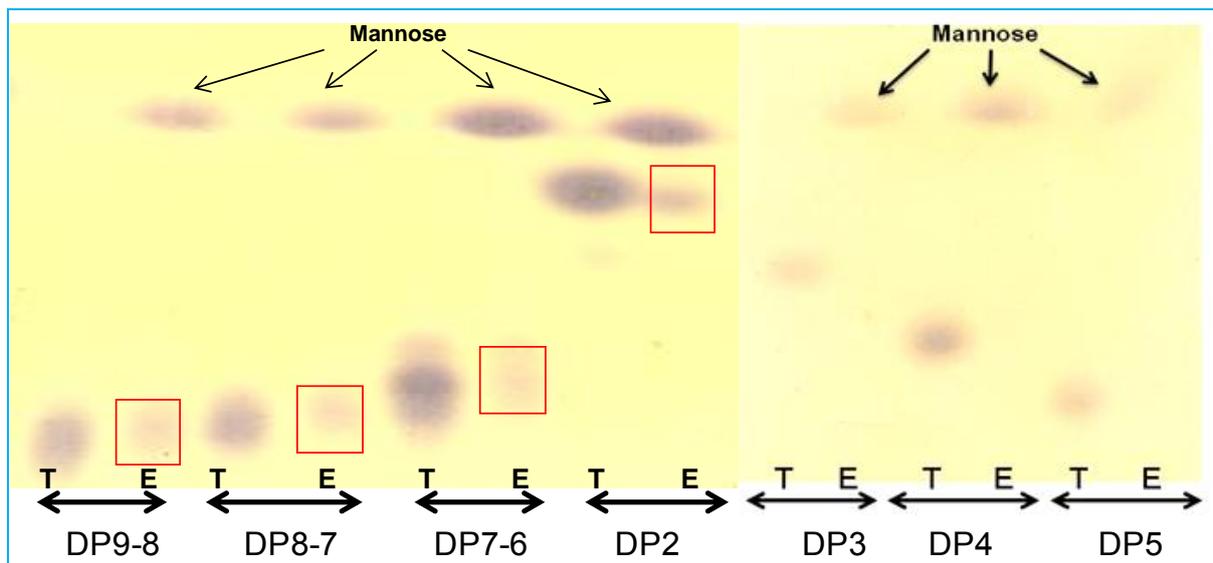


Figure 36 : Analyse par CCM des substrats purifiés des PPMs de *C. albicans* Δ BMT3 cultivée à 28°C avant (T) et après (E) action des α -mannosidases.

Les résultats obtenus montrent que les PPMs Δ BMT3 de *C. albicans* cultivés à 28°C contiennent plus de substrats résistant à l'action des α -mannosidases (DP2, DP5 à DP9) par rapport à ceux issus PPMs Δ BMT3 de *C. albicans* cultivés à 37°C (DP5 à DP8). Néanmoins ces quantités restent faibles car dans les deux souches les composés majoritaires sont des α -mannosides.

I.2.4. Conclusion

Les oligomannosides neutres isolés des PPMs de *C. albicans* Δ BMT3 cultivée à 28°C et à 37°C présentent le même degré de polymérisation, il varie globalement de DP1 à DP10. Les résultats obtenus montrent que la taille des oligomannosides ne dépend pas de la température de culture des souches. Cependant, ils suggèrent que l'expression de CaBmt1 *in vivo* pourrait être température dépendante car on constate une différence de résistance de ces oligomannosides aux α -mannosidases.

En effet, l'expression des CaBmts (1 à 4) responsables de la β -mannosylation des PPM de *C. albicans* dépend de plusieurs facteurs : le sérotype des souches de *C. albicans* (A ou B), le pH et la température ; des études récentes ont montré que les CaBmt1 à 4 sont mieux

exprimées dans les souches de *C. albicans* de sérotype A à pH 6 et à 28°C (**Fradin et al, 2014**).

Les substrats résistant à l'action des α -mannosidases ont été purifiés par chromatographie sur Bio-gel P2. Cependant en raison des quantités très faibles de substrats récupérés après les différentes étapes de purification ces derniers n'ont pas été testés en présence de Bmt3p. Il serait alors intéressant dans un premier temps de coupler ces substrats à la 2-Aminopyridine afin d'augmenter la sensibilité de détection des produits formés en HPLC. Puis dans un deuxième temps, d'optimiser le protocole de préparation de ces substrats en faisant agir d'abord les α -mannosidases avant d'entamer les différentes étapes de purification.

I.3. Substrat de synthèse

Suite à notre collaboration avec le Dr. Mallet, nous avons pu disposer d'un nouveau substrat de synthèse nommé DP4M-b. Ce dernier a été synthétisé en 10 étapes à partir d'un alkyl 3,4,6-tri-O-benzyl-2-O-Benzol 1-thio mannose et de glucose. La structure de ce substrat de synthèse a été établie par spectrométrie de masse et par RMN. En effet, il s'agit d'un oligomannoside linéaire de DP4 couplé à un fluorophore (mantyl) composé d'un trimannoside lié en α -1,2 et d'un mannose terminal lié en β -1,2 (Man β 1-2Man α 1-2Man α 1-2Man-mantyl) (**Figure 37**).

Le procédé de synthèse du DP4M-b ainsi que les tests préliminaires d'activité enzymatique en présence de la forme recombinante de Bmt3p produite chez *Pichia Pastoris* feront l'objet d'un article en collaboration avec l'équipe du Dr. Mallet (rédaction en cours).

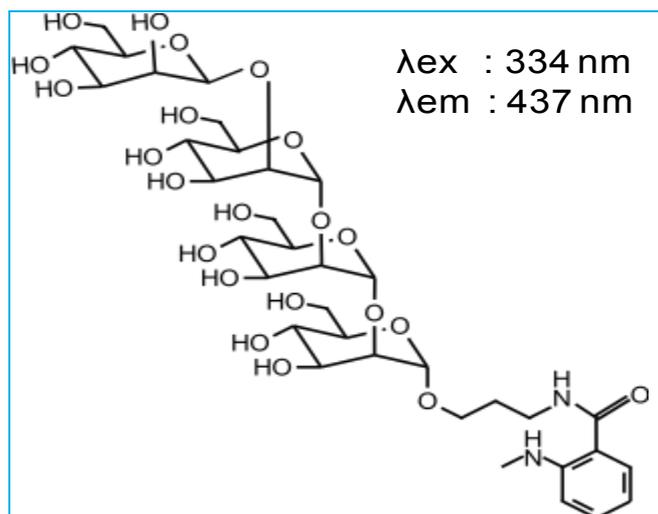


Figure 37 : Structure du substrat de synthèse (DP4M-b) couplé au mantyl.

Par ailleurs, l'analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF du DP4M-b est détaillée dans la **figure 5 C** de l'article N°3 (Caractérisation de Bmt3p) page 166. Cet article en préparation est intégré dans le chapitre 2 de cette partie B (paragraphe II.6.).

Analyse RMN du DP4M-b

Nous avons réalisé des études RMN complémentaires sur le DP4M-b. La réalisation d'un spectre proton montre la présence de quatre signaux majoritaires A à D correspondant aux déplacements chimiques des protons anomères : les signaux A, B et C correspondent aux α -mannoses, le D correspond à un résidu β -mannosyl (**Figure 38 A**). Nous avons pu attribuer tous les déplacements chimiques des protons (^1H) et carbones (^{13}C) des résidus de mannose constituant le tétramannoside synthétique (DP4M-b) grâce à la réalisation d'expériences homo et hétéronucléaires de type COSY 90 et HSQC (**Figure 38 B et C**). Les résultats RMN montrent également la présence d'un contaminant minoritaire identifié comme un trimannoside linéaire lié en α -1,2. Le DP4M-b a été purifié sur Bio-gel P2 après action des α -mannosidases afin d'enlever ce contaminant avant d'être utilisé comme substrat en présence de Bmt3p.

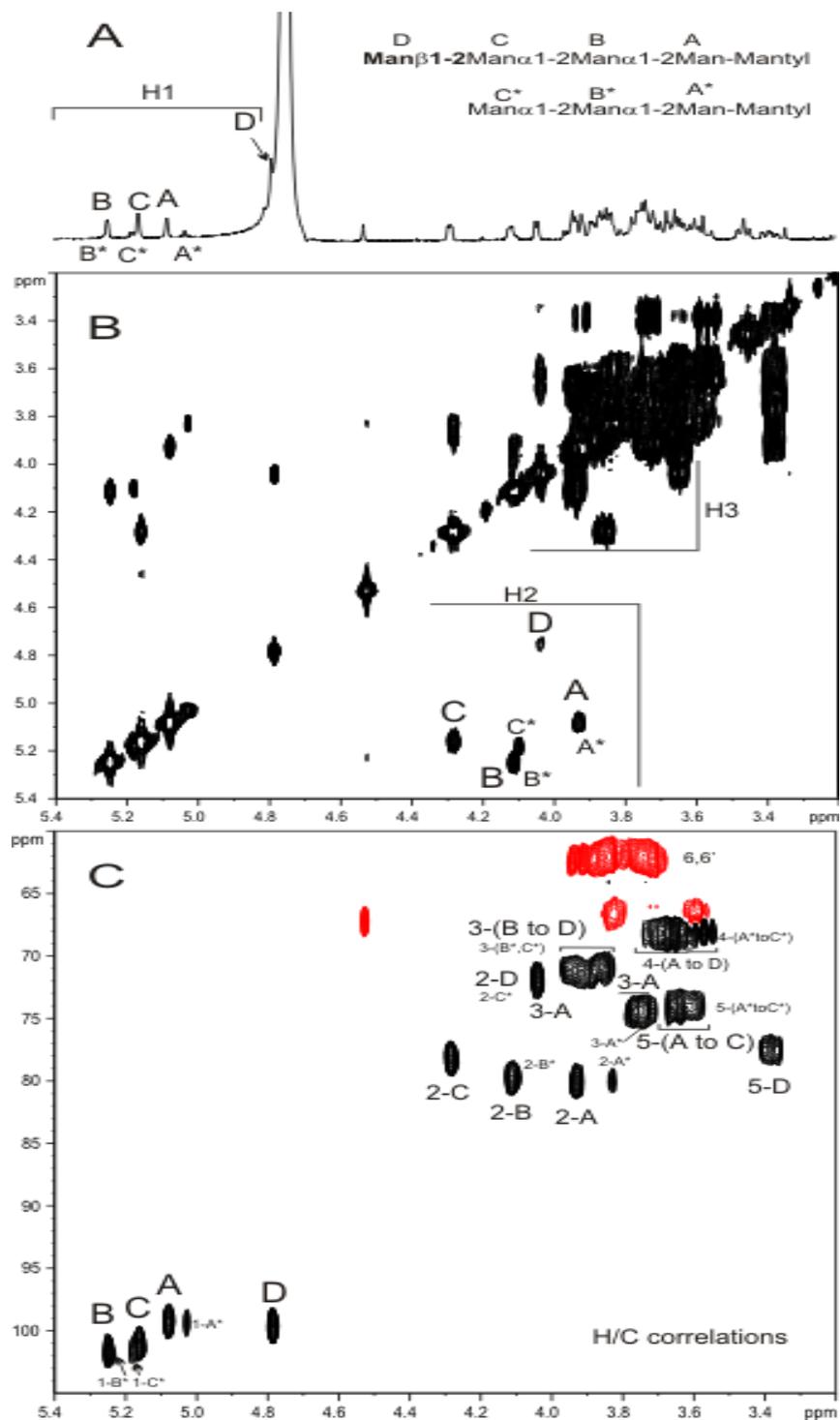


Figure 38 : Analyse RMN du tétramannoside (DP4M-b). A ; spectre protons ^1H , B spectre COSY $90^\circ \text{ } ^1\text{H}/^1\text{H}$, C spectre $^1\text{H}-^{13}\text{C}/\text{HSQC}$. (Les expériences ont été effectuées à 300°K dans le D_2O en utilisant l'acétone comme standard interne). Les valeurs des déplacements chimiques sont indiquées dans le tableau ci-dessous (Tableau 11).

Le tableau 11 résume les valeurs des déplacements chimiques des protons (^1H) et carbones (^{13}C) en ppm des résidus de mannose constituant le tétramannoside synthétique (DP4M-b).

Tableau 11 : Valeurs des déplacements chimiques des protons (^1H) et carbones (^{13}C) (en ppm) des résidus de mannose constituant le tétramannoside synthétique (DP4M-b).

Residus	Déplacements chimiques (ppm) DP4M-b					
	H1/C1	H2/C2	H3/C3	H4/C4	H5/C5	H6-6'/C6
A	5.07/99.2	3.92/80	3.74/74.4	≈ 3.66/68	≈ 3.65/74	≈ 3.80/62
B	5.25/101.6	4.11/79.7	3.95/71.11	≈ 3.66/68	≈ 3.65/74	≈ 3.80/62
C	5.16/101.1	4.28/78.2	3.84/70.8	≈ 3.66/68	≈ 3.65/74	≈ 3.80/62
D	4.78/99.6	4.04/71.8	3.92/71.11	3.56/68	3.38/77.3	≈ 3.80/62

Ce nouveau substrat synthétique (DP4M-b) a permis la détermination des paramètres de l'activité de Bmt3p comme il sera détaillé dans la suite de la partie B (chapitre 2, article n°3).

Chapitre II : Activité enzymatique de Bmt3p *in vitro*

II.1. Introduction

Comme précisé au début de la partie B de ces travaux de thèse, nous nous sommes intéressés à la caractérisation de l'activité de CaBmt3, enzyme impliquée dans l'élongation des β -Mans du PPM. La démarche retenue pour cette étude est détaillée dans la **figure 39**.

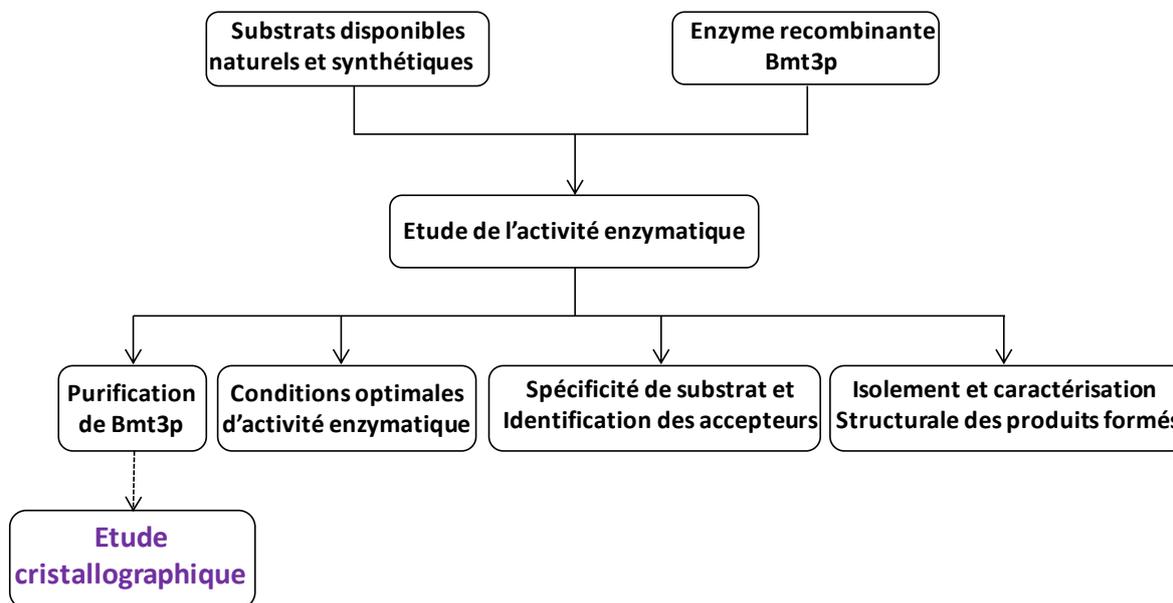


Figure 39 : Stratégie expérimentale adoptée pour la caractérisation de l'activité de CaBmt3.

Ma contribution personnelle dans ce travail a consisté à la réalisation de l'étude de l'activité enzymatique d'une forme recombinante soluble de CaBmt3 nommée Bmt3p, produite chez *Pichia pastoris* au sein de notre équipe. Nous avons pour cela utilisé les substrats naturels disponibles précédemment préparés et décrits dans la partie A, ainsi que des substrats de synthèse préparés par l'équipe du Dr. Mallet (ENS. Paris). Il est à noter que les substrats endogènes préparés à partir du PPM de *C. albicans* Δ BMT3 (décrits dans le chapitre 1 partie B) n'ont pas été utilisés car ils ont été obtenus en petite quantité et leur structure précise n'a pas encore été établie.

Préalablement à la caractérisation de Bmt3p et considérant que Bmt3p est une enzyme d'élongation des β -Mans et qu'elle agit après Bmt1p *in vitro*, nous avons testé l'activité

enzymatique de ces deux enzymes soit séquentiellement soit simultanément. Puis, grâce à la mise au point d'un protocole d'isolement et de purification des produits formés, nous avons identifié le produit final de l'action simultanée de Bmt1p et de Bmt3p sur le substrat accepteur synthétique (DP3M-a). De plus, nous avons déterminé les conditions optimales d'activité enzymatique de Bmt3p, à l'aide du nouveau substrat synthétique DP4M-b, et étudié sa spécificité de substrats. Les résultats obtenus vont être exposés dans l'article N°3 intégré à ce chapitre en II.6. (caractérisation de Bmt3p) notamment dans les figures N°4, 6, 8 et les tableaux N°1 et 2. Finalement, nous avons contribué à l'optimisation des méthodes de purification de Bmt3p pour la réalisation des études cristallographiques qui sont en cours au sein de notre équipe.

II.2. Structure de CaBmt3

CaBmt3 présente la même organisation globale que CaBmt1 en différents domaines (**Figure 40**), néanmoins la particularité de cette enzyme réside dans l'absence du domaine hydrophobe au sein du domaine catalytique qui a été décrit pour les CaBmt1 et 2, ce qui nous a permis d'éviter les problèmes de solubilité et d'agrégation rencontrés lors de l'étude de Bmt1p.

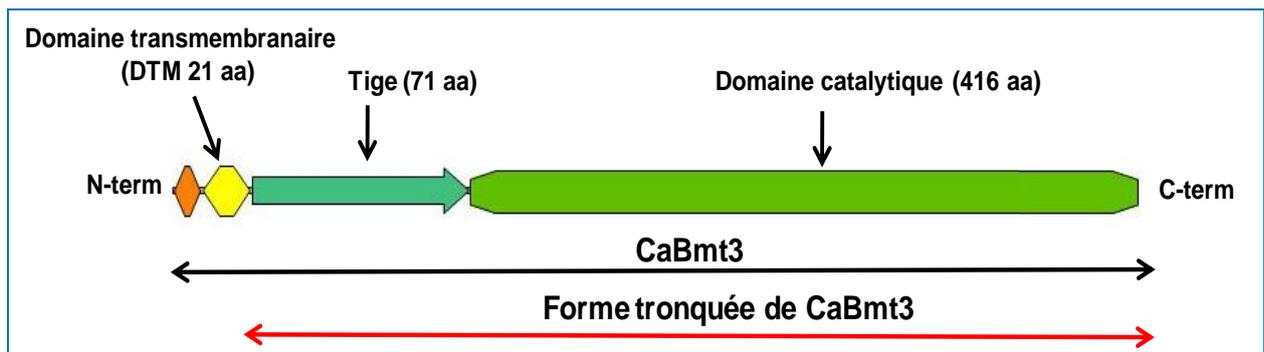


Figure 40 : Représentation schématique de la séquence protéique codée par le gène CaBMT3 et de sa forme tronquée juste en aval du segment transmembranaire produite chez *Pichia Pastoris*.

Parmi les 9 β -1,2 mannosyltransférases, CaBmt3 est l'enzyme la plus petite en taille, elle est composée de 550 acides aminés, la taille des autres CaBmts varie de 613 à 790 acides aminés (**Mille *et al*, 2008**). L'analyse SDS-PAGE de la forme recombinante de CaBmt3 produite chez *Pichia pastoris* nous a permis de constater la présence d'une bande à 53.9 kDa qui correspond à Bmt3p. (Se référer à la figure 1 de l'article N°3 page 162).

II.3. Etude de l'activité enzymatique de Bmt3p

En 1^{ère} approche pour l'étude de l'activité de Bmt3p, et comme on suppose que Bmt3p agit après l'action de Bmt1p, nous avons décidé de préparer le substrat potentiel pour Bmt3p en faisant agir Bmt1p sur l'un de ses substrats accepteurs : le substrat mantylé DP3M-a. Les produits formés sous l'action successive ou simultanée des 2 enzymes ont ainsi été étudiés. Les résultats obtenus vont être détaillés dans la figure N°4 de l'article N°3 (caractérisation de Bmt3p).

En deuxième approche, nous avons testé le nouveau substrat de synthèse DP4M-b préparé par l'équipe du Dr. Mallet en présence de Bmt3p et du GDP-Man. Les résultats obtenus montrent que Bmt3p est une enzyme plus active par rapport à Bmt1p puisque au bout de 30 min d'incubation nous avons constaté une accumulation importante d'un produit de taille supérieure résistant à l'action des α -mannosidases (**Figure 41**).

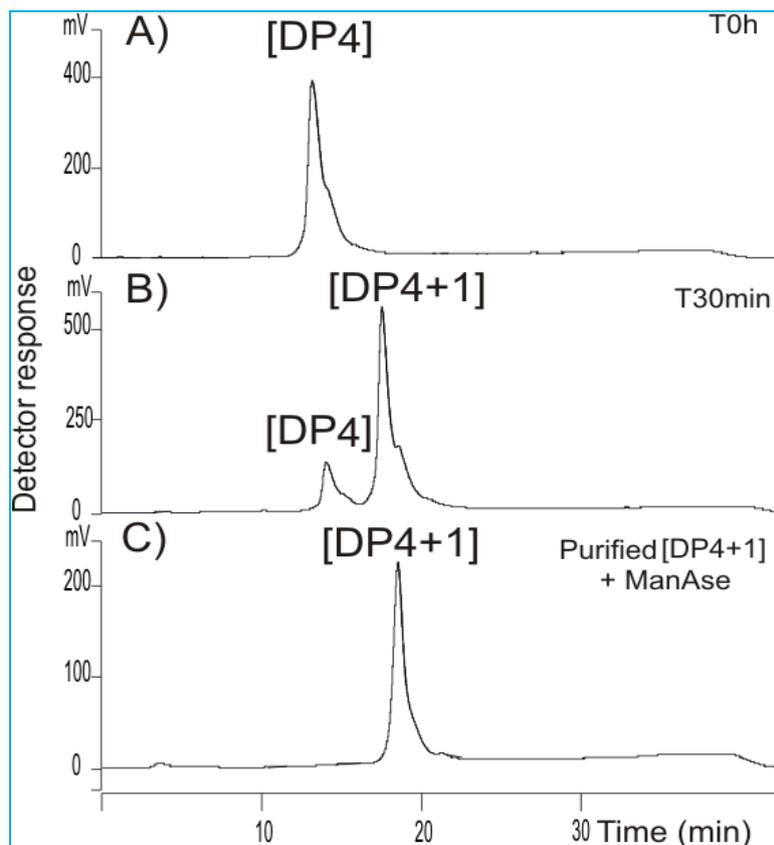


Figure 41 : Analyse HPLC ; A : Substrat de synthèse (DP4M-b), B : Produit formé DP4+1 après 30 min d'incubation en présence de Bmt3p, du DP4M-b et du GDP-Man à 28°C. C : DP4+1 après action des α -mannosidases.

Ces résultats feront partie de l'article en cours de préparation en collaboration avec l'équipe du Dr. Mallet (mentionné dans le chapitre 1 paragraphe I.3)

Pour la réalisation des études enzymatiques, nous avons décidé de se mettre dans les conditions de vitesse initiale de Bmt3p, en ajustant le rapport enzyme/substrat pour pouvoir travailler dans la zone de linéarité de Bmt3p. Les résultats de la cinétique enzymatique effectuée en présence de Bmt3p et du DP4M-b sont présentés dans l'article N°3 (caractérisation de Bmt3p) figure 7 page 169.

II.4. Purification de Bmt3p

Les essais de purification de Bmt3p ont été effectués dans un premier temps par chromatographie d'échange de cation à l'aide du système Akta FPLC. Dans ce contexte, nous

avons utilisé la colonne HiTrap SP FF 1ml (GE Healthcare), le tampon A (Acétate de sodium 20mM pH 5, Tween 0.05%), et le tampon B (Acétate de sodium 20mM pH 5, Tween 0.05%, NaCl 1M). Le pH du surnageant a été ajusté à pH 5 avec de l'HCl 1M. La même démarche que celle utilisée pour la purification de Bmt1p a été retenue. Les résultats obtenus montrent que Bmt3p est éluée entre 40 et 50% de B, néanmoins les quantités d'enzyme récupérées après purification sont insuffisantes pour la réalisation des études cristallographiques.

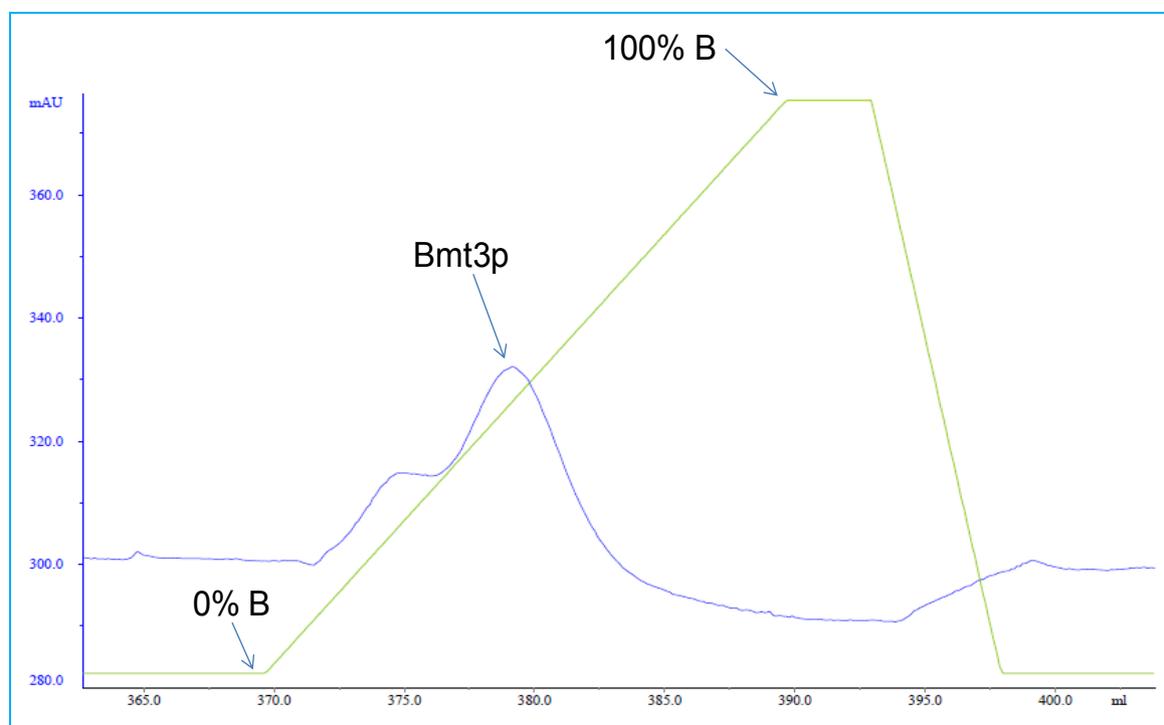


Figure 42 : Chromatogramme FPLC illustrant la purification de Bmt3p par chromatographie d'échange de cation. (axe des abscisses : volume des fractions récupérées en (ml), axe des ordonnées : unité arbitraire), la purification de Bmt3p a été suivie par mesure de l'absorbance à 280nm.

Lors de l'étude de l'effet de différents ions divalents sur l'activité enzymatique de Bmt3p (voir article N°3), nous avons constaté que contrairement à Bmt1p, l'activité enzymatique de Bmt3p n'est pas inhibée en présence de NiCl₂ d'où la possibilité de tester la purification de Bmt3p sur colonne de Nickel. La démarche de purification de Bmt3p sur colonne de Nickel est détaillée dans l'article N°3.

II.5. Résumé de l'article N°3 (caractérisation de Bmt3p) présenté en II.6

Après avoir caractérisé Bmt1p *in vitro*, l'enzyme responsable de l'initiation de la β -mannosylation du PPM, nous nous sommes orientés vers la caractérisation biochimique de CaBmt3, enzyme d'élongation dans la voie de biosynthèse des beta-mannosides du PPM. Dans ce contexte, une forme recombinante de CaBmt3 nommée Bmt3p a été produite sous forme soluble chez *Pichia pastoris*. Afin d'étudier son activité enzymatique, Bmt3p a été testée d'une part en présence des substrats naturels et synthétiques précédemment décrits (dans la partie A des résultats), et d'autre part, en présence d'un nouveau substrat de synthèse nommé DP4M-b. Comme première approche, nous avons étudié l'activité enzymatique couplée Bmt1p/Bmt3p en présence d'un α -1,2 trimannoside couplé au mantyl (DP3M-a). Les résultats obtenus montrent l'accumulation d'un pentasaccharide (DP5M-a). Ce produit a été isolé, purifié et caractérisé par spectrométrie de masse MALDI-TOF et par RMN ce qui nous a permis de mettre en évidence l'activité β -1,2-mannosyltransférase de Bmt3p *in vitro*.

Ensuite les tests d'activité enzymatique réalisés en présence du substrat de synthèse DP4M-b ont confirmé que Bmt3p transfère *in vitro* un seul résidu mannose en β -1,2 sur un tétramannoside constitué d'une chaîne en α -1,2 avec un mannose terminal lié en β -1,2 (DP4M-b). De plus les études de spécificité de substrat ont montré que Bmt3p reconnaît la séquence (Man β 1-2Man α 1-2) pour pouvoir transférer un résidu mannose lié en β -1,2.

L'étude de la cinétique enzymatique de Bmt3p montre que la vitesse catalytique de Bmt3p est beaucoup plus importante par rapport à celle de Bmt1p. Par ailleurs, les conditions optimales d'activité enzymatique (28°C, pH6-7) sont identiques pour les deux enzymes (Bmt1p et Bmt3p).

Contrairement à l'activité enzymatique de Bmt1p qui est inhibée en présence du NiCl₂ et du ZnCl₂, Bmt3p n'est pas inhibée en présence du NiCl₂ ce qui nous a permis alors de réaliser des tests de purification de Bmt3p présente dans le surnageant de culture de *Pichia pastoris* par chromatographie d'affinité sur colonne de Nickel. Les résultats obtenus montrent que Bmt3p est retenue sur la colonne de Nickel même en absence d'étiquette 6xHis ce qui pourrait s'expliquer par des interactions non spécifiques entre la colonne de Nickel et une

séquence de Bmt3p chargée négativement présente au niveau de la tige. Bmt3p conserve environ (70%) de son activité enzymatique après purification.

L'optimisation des étapes de purification de Bmt3p permettra d'envisager l'obtention de cristaux afin de déterminer la structure tridimensionnelle de Bmt3p. C'est dans ce contexte que la production d'une nouvelle forme de Bmt3p en présence d'une étiquette 6xHis chez *E. coli* a été entreprise au laboratoire par un étudiant actuellement en thèse. La purification sur colonne de Nickel a permis l'obtention des quantités d'enzyme satisfaisantes pour la réalisation des études cristallographiques qui sont en cours.

II.6. Article N°3 (en préparation)

Characterization of the recombinant *Candida albicans* β -1,2 mannosyltransferase Bmt3p involved in the β -mannosylation of cell-wall phosphopeptidomannan

Ghenima Sfihi-Loualia*†¹, Thomas Hurtaux*†¹, Emeline Fabre*†, Anaïs Mée‡, Marilyne Pourcelot‡, Emmanuel Maes*†, Julie Bouckaert*†, Frédéric Krzewinski*†, Chantal Fradin§||, Jean-Maurice Mallet‡, Boualem Sendid§||, Daniel Poulain§||, Florence Delplace*† and Yann Guérardel*†².

*Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle (UGSF), Université Lille 1, F-59650 Villeneuve d'Ascq, France ; †CNRS, UMR 8576, F-59650 Villeneuve d'Ascq, France ; ‡Département de chimie, Ecole Normale Supérieure, Université Paris 6, UMR CNRS 7203, 75005 Paris, France ; §Université Droit et Santé Lille 2, France ; ||INSERM U995, Lille, France

¹ These authors contributed equally to this work

² To whom correspondence should be addressed. Yann Guérardel; e-mail: Yann.guerardel@univ-lille1.fr

SHORT TITLE: Elongation of β -mannans in *Candida albicans*

KEY WORDS

Yeast, cell wall, beta-mannose, synthesis, glycosyltransferase, *Candida albicans*

ABSTRACT

Several studies evidenced the implication of β -1,2 linked mannosides, expressed on numerous cell wall glycoconjugates of the opportunistic pathogen yeast *Candida albicans*, in the host-pathogen interaction and virulence mechanisms. In the present study, we characterize the *in vitro* activity of CaBmt3, a the β -1,2 mannosyltransferase potentially involved in the addition of the second β Man unit onto the acid-stable and acid-labile parts of the cell-wall phosphopeptidomannan. A recombinant soluble enzyme Bmt3p was produced in *Pichia Pastoris* and its enzyme activity was investigated using natural and synthetic oligomannosides as potential acceptor substrates. Bmt3p showed a high activity on a tetramannoside composed of a α Man (1-2) trisaccharide capped by a β Man(1-2) unit, adding a terminal β -mannosyl residue on this acceptor substrate. This specificity fits well with the presumed role of Bmt3 in the first step of the β Man chain elongation of the phosphopeptidomannan acid-stable moiety.

INTRODUCTION

The yeast *Candida albicans* is yeast from the normal human microbial flora that may cause severe opportunistic infections in immunocompromised individuals [1]. The interaction between the invading fungal pathogen and the host cells is mediated by the yeast cell wall. The outer layer of the *C. albicans* cell wall consists of mannoproteins, and phosphopeptidomannan (PPM), both containing N- and O-glycans, and phospholipomannan (PLM). Previous studies demonstrated that *Candida albicans*, in contrast to most non-pathogenic yeast species such as *Saccharomyces cerevisiae*, expressed β -1,2 oligomannosides (β -Mans) associated with its cell wall components [2]. The β -1,2-linked oligomannosides were found to display stronger antigenicity than the α -linked ones in the humoral antibody response of mammals, corresponding to the antigenic epitope factor 5 [3].

Numerous yeast mannosyltransferases are known to be involved in the initiation or the elongation of α -mannosylated outer side chains [4]. The enzymes responsible for the synthesis of β -mannosylated chains were only recently identified in *C. albicans*. Indeed, a family of nine genes, named *CaBMT1-9*, encoding for β -1,2 mannosyltransferases (Bmts) was identified by a mutant phenotyping approach [5]. Four of these genes, *CaBMT1* to 4, encode enzymes involved in the β -mannosylation of cell wall PPM. CaBmt1 and CaBmt2 are responsible for the addition of the first β -mannose unit onto the PPM acid-stable and acid-labile fractions, respectively, whereas CaBmt3 and CaBmt4 are involved in the elongation of β -Man chains of PPM. The involvement of CaBmt5 and CaBmt6 enzymes was recently evidenced in the PLM β -mannosylation process [6]. The CaBmt 7 to 9 enzymes activity remains unknown. Surprisingly, the amino acid sequences of Bmt proteins (Bmtps) exhibit very low similarities with the already known glycosyltransferases, which put them out of any

known family of glycosyltransferases. Bmtps have been recently classified in the GT-91 mannosyltransferases family according to the CAZy database (<http://www.cazy.org/>).

The aim of our studies is to characterize CaBmts activities in order to better understand biosynthetic pathways of β -Mans. The *in vitro* activity of Bmt1p, identified as the enzyme that transfers the first β -mannose unit onto the PPM acid-resistant fraction, was first characterized [7]. In the present study, a recombinant form of Bmt3p was overexpressed in *Pichia pastoris* to determine its *in vitro* activity. Endogenous oligomannosides isolated from *S. cerevisiae* and *C. albicans* mutant PPMs and synthetic oligomannosides were used as potential acceptor substrates. The results demonstrate that Bmt3p can catalyse the *in vitro* transfer of one β -1,2-mannosyl unit onto a tetramannoside containing a terminal β -1,2-Man linked to α (1-2)Man chain, according to its presumed function in the first step of β -Man chain elongation of PPM acid-resistant moiety.

RESULTS

Production of recombinant Bmt3p in P. pastoris

As described previously with BMT1 [7], BMT3 was also predicted to encode for a Golgi type II membrane protein of 63.084 kDa (Vector NTI Advance 11.0, Invitrogen), presenting a short cytoplasmic N-terminus followed by a transmembrane domain of 21 residues (38-58). Contrary to Bmt1, there was no additional “putative transmembrane domain” predicted by the TopPred software (**Supplementary Figure S1 A**). Using the protein fold recognition server Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>), the sequence covering residues 61 to 132 was predicted as a disordered one and could be assigned as the stem region of the protein (**Figure S1 B**).

Based on previous work on Bmt1p, we designed a truncated form of Bmt3p expressed in *P. pastoris*. Basically, it was lacking the N-terminal cytoplasmic region, as well as the membrane-spanning domain (**Figure S1 C**). The cleavable signal sequence α factor from *S. cerevisiae* was placed at the N-terminus and the fusion protein was placed under the control of the *AOX1* (alcohol oxidase 1) promoter. One CUG codon encoding for a serine was identified in the Bmt3p native sequence (in position 460). In most organisms, a CUG codon is translated as a leucine residue. But in *Candida* species, it is almost always translated as a serine residue (95 to 97% of the time). In order to restore its native sequence, this CUG codon was mutated to encode a serine residue.

Using the production protocol of Bmt1p, the recombinant Bmt3p was produced at the expected molecular mass of 53.9 kDa (**Figure 1**) and was absent from the medium of the control cells. The BMM induction medium was preferred, as its lack of yeast extract is considered less inhibitory for mannosyltransferase activity. The production rate was

determined by densitometry of the SDS/PAGE gels, stained by ProteoStain. It was estimated that approximately 35 mg of Bmt3p per litre of BMM medium was produced. This good yield of production was similar to that previously obtained for Bmt1p.

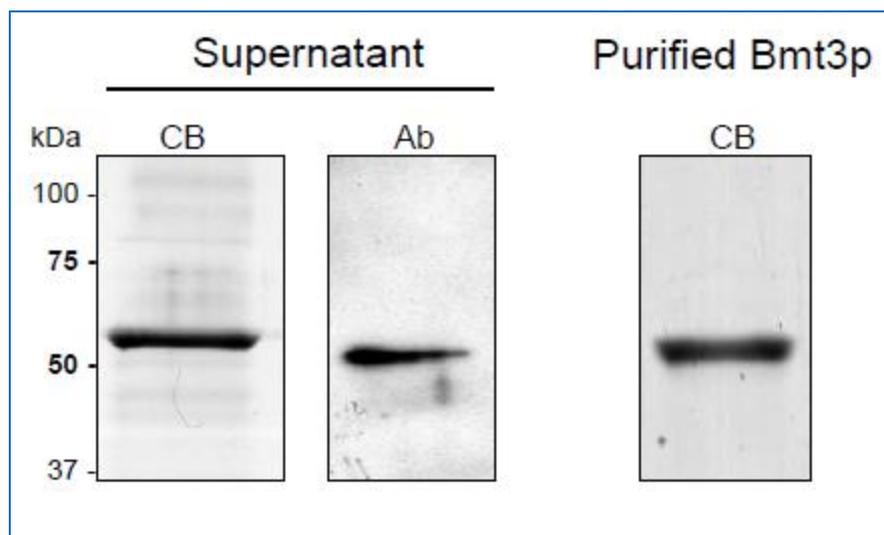


Figure 1 : SDS/PAGE and Western Blot analysis of recombinant Bmt3p production and purification. Culture supernatant or purified Bmt3p were detected either by Coomassie Blue staining (CB) or by western blotting using the anti-Bmt3 antibody (Ab). Molecular mass is specified on the left (kDa).

Bmt3p solubilization

As previously reported [7], detergents were required to solubilize Bmt1p, probably due to the presence of a second hydrophobic region located at the C-terminal end of the protein. But interestingly, no similar hydrophobic region was identified in the Bmt3p sequence. This structural difference allowed the production of the recombinant Bmt3p without any additional detergent, except for the introduction of 0.05% Tween 20 at the beginning of the induction period. This difference of solubilization properties has been visualized using DLS analysis, by comparison of Bmt1p and Bmt3p particle size, with or without the addition of 0.5% Triton X-100 (**Figure 2**). Indeed, without detergent, Bmt1p forms 20-1000 nm aggregates in solution. In order to obtain 4 nm Bmt1p monomers, the addition of detergent like Triton X-100 at 0.5% is thus mandatory. On the contrary, 5 nm monomers of Bmt3p can be observed in the absence of any additional detergent, without impeding enzyme activity. However, in order to ensure a long-term solubilization of Bmt3p, the presence of 0.5% Triton X-100 in the culture supernatant was preferred for enzymatic experiments.

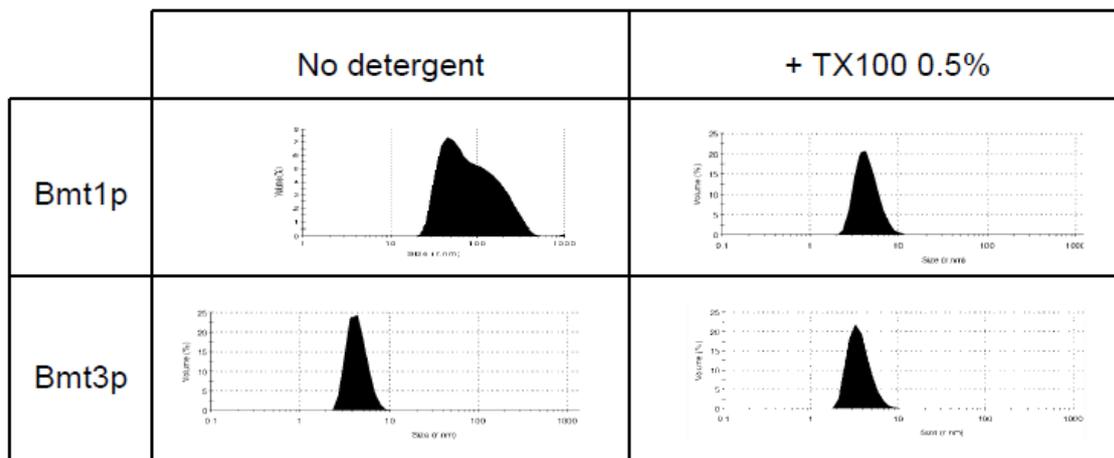


Figure 2 : Comparison of DLS spectra in volume between *Bmt1p* (data from [7]) and *Bmt3p*, with or without Triton X-100 at 0.5% (v:v). Contrary to *Bmt1p*, *Bmt3p* remains in a monomeric form even when no detergent is added (except the detergent used for the induction).

Production of natural and synthetic acceptor substrates

A variety of oligomannosides differing in size and sequences were chosen as potential acceptor substrates for the characterization of the activity of the *Bmt3p* produced in *P. pastoris*. As previously described [7], the natural α -oligomannosides were obtained by acetolysis of PPM of *S. Cerevisiae* and *C. albicans* Δ BMT1 mutant strain, purified by ion exchange and separated by gel filtration chromatography, whereas the β -1,2-oligomannosides were purified from the acid-labile moiety of *C. albicans* Δ BMT1 strain PPM. The primary structures of individual compounds were previously established by MALDI-TOF mass spectrometry and NMR spectroscopy [7]. These oligosaccharides were used as substrates for mannosyltransferase assays after coupling with a fluorescent tag (2-aminopyridine). Three mantyl tagged oligomannosides [DP3M-a, DP4M-a and DP4M-b] were synthesized to be used as potential substrates. DP3M-a and DP4M-a were mantylated α -1,2-tri- and tetra-mannosides respectively, whereas DP4M-b contained a non-reducing terminal β Man(1-2) residue linked to a α -1,2 mannotriose (**Figure 3**).

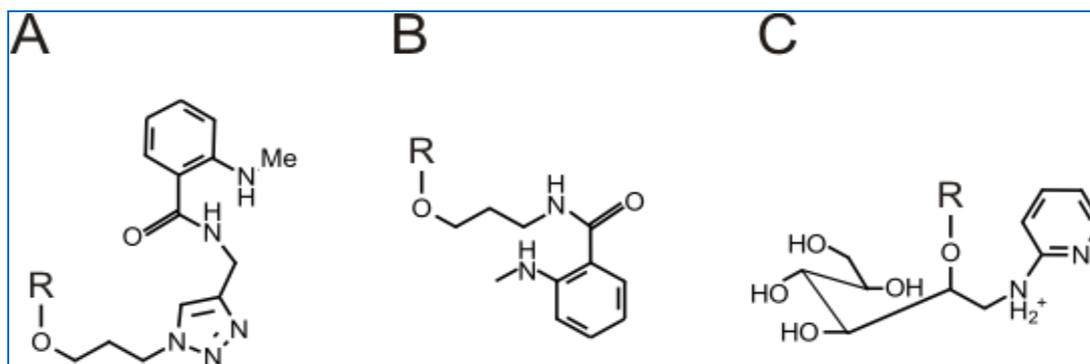


Figure 3: Structure of synthetic mantylated α -oligomannosides DP3M-a and DP4M-a (A) and tetramannoside DP4M-b (B), and of semi-synthetic 2-aminopyridyl oligomannosides from PPMs (C). R: mannoside.

Determination of the enzymatic activity

Based on the *in vitro* activity of Bmt1 in the initiation of PPM acid-resistant moiety β -mannosylation [7] and on the putative role of Bmt3 in the first step of PPM β Man chain elongation [5], we hypothesized that Bmt1p and Bmt3p could sequentially add two β -Man residues on a stretch of α -1,2-linked mannan. This hypothesis was tested by incubating the two enzymes sequentially or simultaneously with the synthetic mantyl-tagged α -1,2-mannotriose DP3M-a [Man(α 1,2)Man(α 1,2)Man(α)-Mantyl]. Culture supernatants of *P. pastoris* were used as enzyme sources for both Bmt1p and Bmt3p [see [7] for the production of Bmt1p]. The reaction mixtures were incubated over different times at 28°C and pH 6.5 under the standard assay conditions, and the generation of reaction products was followed by NP-FL-HPLC. As shown in **Figure 4**, 48h incubation of Bmt1p extract with DP3M-a and GDP-Man generated two α -mannosidase resistant products P1 and P2 in the ratio 2:1. P1, the major product of Bmt1p activity, and P2 were previously described as extensions of DP3M-a with one or two β -Man residues respectively. This was expected since Bmt1p was shown to catalyse the *in vitro* transfer of up to two consecutive β Man units onto this substrate DP3M-a [7]. After the inactivation of Bmt1p by heating 10 min at 100°C, reaction mixture containing P1 and P2 was used as acceptor substrate for Bmt3p in the standard reaction procedure. The respective amounts of P1 and P2 were then assessed by HPLC for each incubation time. From 1 h, the second product P2 became prominent (P1 and P2 approximately in the ratio 1:2). Longer incubation times with Bmt3p strongly decreased the quantity of P1 and concomitantly increased the P2 quantity. Incubation time of 48h showed the total disappearance of the first product P1 (**Figure 4**). However, we could not observe the appearance of a third product and the decrease of initial DP3M-a substrate, which demonstrated that neither P2 nor DP3M-a can be used by Bmt3p as acceptor substrates.

In parallel, we simultaneously incubated Bmt1p and Bmt3p extracts with DP3M-a. As for sequential incubation of Bmt1p and Bmt3p, simultaneous incubation led to the accumulation after 48h of a single product with a similar chromatographic behavior than P2,

suggesting the conversion of P1 as and when it is formed. A long incubation time (96 h) enabled the conversion of 75% of the initial substrate into the α -mannosidase resistant P2 product (**Figure 4**). These experiments evidenced that Bmt3p can use as substrate the product resulting from the *in vitro* activity of Bmt1p.

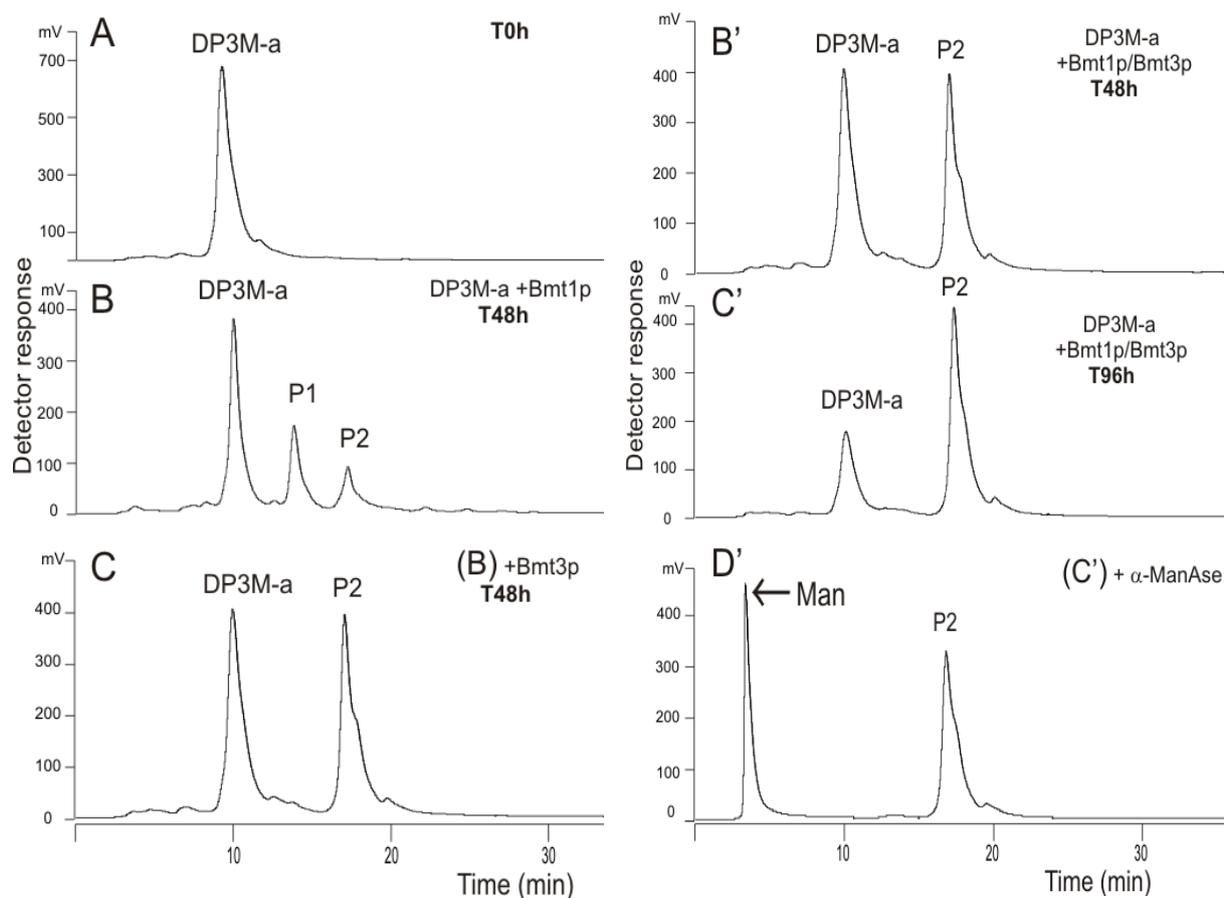


Figure 4: Enzymatic synthesis of reaction products (detected by NP-FL-HPLC analysis) using the two enzymes Bmt1p and Bmt3p sequentially or simultaneously, with DP3M-a as substrate under standard assay conditions (28°C). (A) acceptor substrate DP3M-a at zero time (T0h). (B) reaction mixture after 48h incubation of DP3M-a with Bmt1p. (C) reaction mixture resulting from B after inactivation of Bmt1p and 48h incubation with Bmt3p. (B') reaction mixture after 48h incubation of DP3M-a with the both enzymes Bmt1p and Bmt3p. Reaction mixture at 96h with the both enzymes before (C') and after (D') α -exomannosidase (α -ManAse) treatment.

In order to precisely identify the product resulting from the both enzymes activity on DP3M-a, the final reaction product P2 was isolated by preparative HPLC from a large-scale enzyme reaction mixture containing both Bmt1p and Bmt3p and purified before its structural analysis by MS and NMR. In MALDI-TOF MS analysis, the final P2 product exhibited

$[M+Na]^+$ m/z value at 1122.6 (**Figure 5**), which confirmed its attribution to Hex₅-mantyl (possibly named DP5M-a). A control experiment showed that it was resistant to α -exomannosidase treatment, which strongly suggests that the terminal non-reducing mannose residue has a β -anomery.

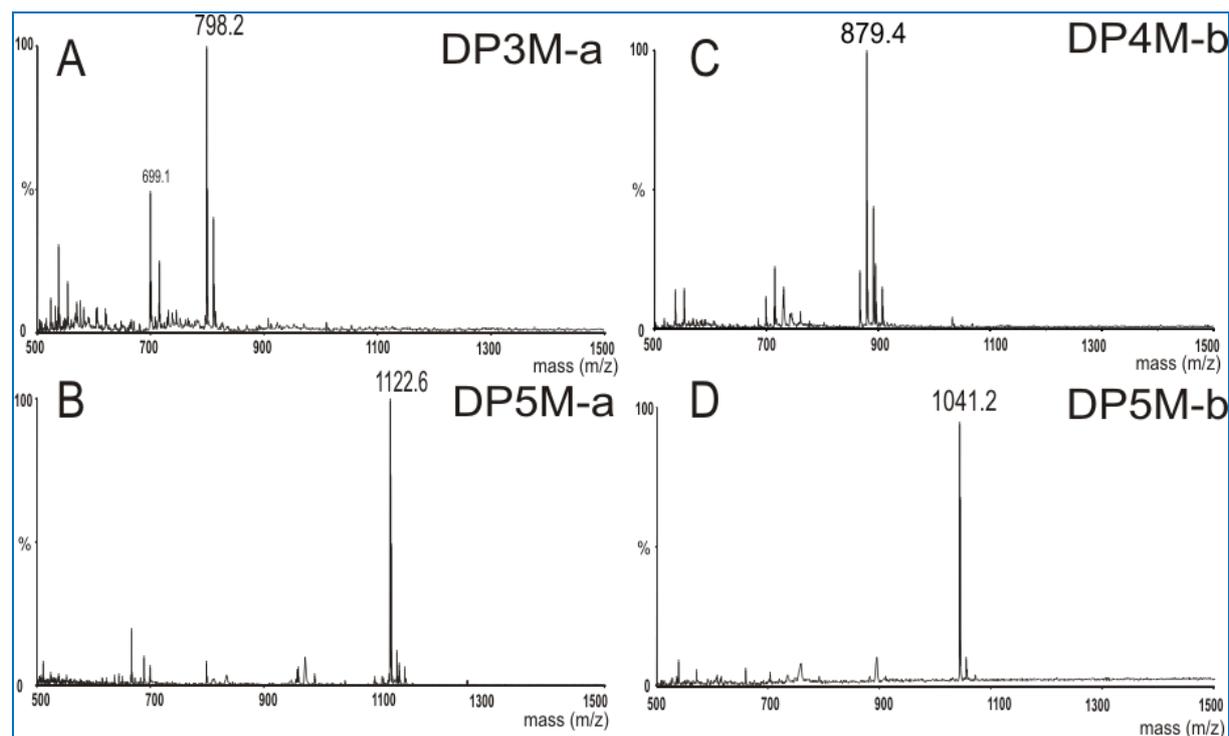


Figure 5 : MALDI-TOF MS analysis of the mantylated acceptor substrates and reaction products. (A) DP3M-a substrate. (B) DP5M-a reaction product (resulting from Bmt1p/Bmt3p activity on DP3M-a). (C) DP4M-b substrate. (D) DP5M-b reaction product (resulting from Bmt3p activity on DP4M-b). Spectra display $[M + Na]^+$ adducts.

The one-dimensional ^1H NMR spectrum of P2 showed five anomeric signals A to E. Compared to DP3M-a, two additional shielded anomeric protons (D) and (E) at 4.86 and 4.84 ppm were observed in P2 spectrum and tentatively attributed to two supplementary mannosyl residues transferred on to the DP3M-a glycan. The integration values of H1-D and H1-E (1.11 and 1.13) were very close to those of H1-A, H1-B and H1-C (1.00, 1.05 and 0.96), which strongly suggested that they are part of the same oligosaccharide. The complete spin systems of the five residues were established by ^1H - ^1H COSY, TOCSY, ROESY and ^1H - ^{13}C HSQC NMR experiments. These established that (1) A, B and C were α -Man residues; (2) D and E were β -Man residues; (3) A, B, C and D residues were substituted in position C2; (4) E residue was not substituted. The identification of β -anomery was confirmed by (1) the observation of strong internal H1/H3 and H1/H5 nuclear Overhauser effects (nOe) for both D (H1/H3 at δ 4.86/3.65 and H1/H5 at δ 4.86/3.39) and E (H1/H3 at δ 4.84/3.62 and H1/H5 at

δ 4.84/3.34) on ROESY spectrum (**Figure 6**); (2) the strong downfield shifts of D-H5/C5 at 3.39/77.4 ppm and E-H5/C5 at 3.34/77.5 ppm compared with α -Man, as observed on ^1H - ^{13}C HSQC spectrum (**Figure 6**) [11]. In addition, the observation of (1) the strong downfield shifts of C-H1 ($\Delta\delta$, +0.10 p.p.m.) and C-H2 ($\Delta\delta$, +0.19 p.p.m.) signals compared with DP3M-a (**Table 1 and Supplementary Figure S2**) and (2) external H1-C/H1-D nuclear Overhauser effect (nOe) (**Figure 6**) established that D was linked to C in position C-2.

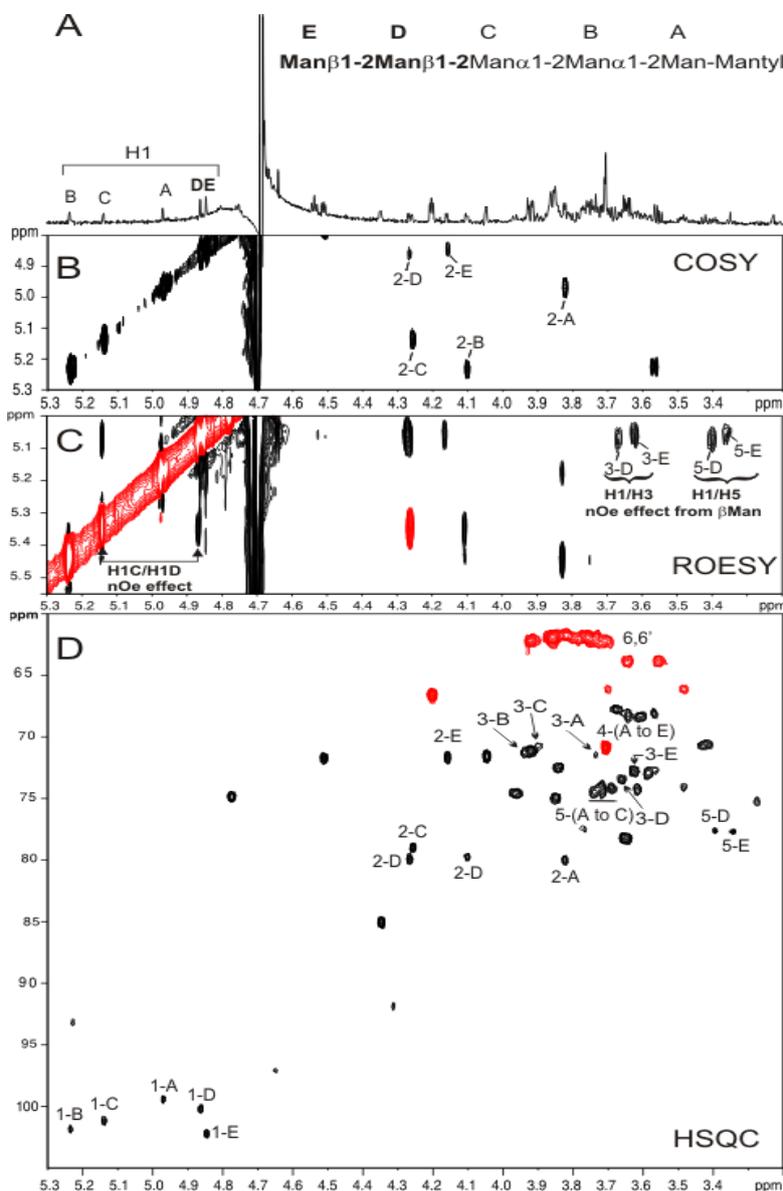


Figure 6 : Detailed NMR analysis of the purified reaction product P2 (named DP5M-a). (A) ^1H NMR spectrum of DP5M-a mantylated glycan. (B) COSY spectrum. (C) ^1H -ROESY spectrum showing the internal H1/H3 and H1/H5 nuclear Overhauser effects. (D) ^1H - ^{13}C HSQC experiment.

Altogether, MS and NMR demonstrated that P2 product was a mantylated pentasaccharide $\text{Man}(\beta 1,2)\text{Man}(\beta 1,2)\text{Man}(\alpha 1,2)\text{Man}(\alpha 1,2)\text{Man}(\alpha)\text{-Mantyl}$. Thus we clearly demonstrated that Bmt1p and Bmt3p sequentially transferred two β Man residues at the C-2 position of the terminal non-reducing position of initial DP3M-a [$\text{Man}(\alpha 1,2)\text{Man}(\alpha 1,2)\text{Man}(\alpha)\text{-Mantyl}$] acceptor substrate to form DP5M-a [$\text{Man}(\beta 1,2)\text{Man}(\beta 1,2)\text{Man}(\alpha 1,2)\text{Man}(\alpha 1,2)\text{Man}(\alpha)\text{-Mantyl}$]. When incubated together, it is thus expected that Bmt1p transfers the first β -Man residue onto the α -mannan stretch, whereas Bmt3p transfers the second β -Man residue onto the first one to synthesize the $\text{Man}(\beta 1,2)\text{Man}(\beta 1,2)\text{Man}(\alpha 1,2)[\text{Man}(\alpha 1,2)]_n$ motif.

Table 1 : ^1H - ^{13}C Chemical shifts of DP3M-a and DP5M-a (P2). Bold characters correspond to position of substitution, italic bold characters correspond to typical chemical shifts of H5/C5 of β -mannose configuration.

Glycans	Residues	Chemical shifts (ppm)					
		H1/C1	H2/C2	H3/C3	H4/C4	H5/C5	H6-6'/C6
DP3M-a	A	4.98/99.9	3.82/ 80.4	3.71/71.7	~3.65/68	~3.74/74	~3.73/62
	B	5.25/102.4	4.08/ 80.0	3.93/71.5	~3.65/68	~3.74/74	~3.73/62
	C	5.03/104.1	4.06/71.4	3.83/71.9	~3.65/68	~3.74/74	~3.73/62
DP5M-a	A	4.96/99.3	3.82/ 79.93	3.72/71.4	~3.65/68	~3.74/74	~3.73/62
	B	5.23/101.8	4.10/ 79.60	3.92/71.06	~3.68/68	~3.62/74	~3.73/62
	C	5.13/101.1	4.25/ 78.93	3.89/70.54	~3.67/68	~3.61/74	~3.73/62
	D	4.86/100.1	4.26/ 79.78	3.65/73.30	~3.60/68	~ 3.39/77.4	~3.73/62
	E	4.84/102.2	4.15/71.59	3.62/74.06	~3.56/68	~ 3.34/77.5	~3.73/62

Enzymatic parameters

In order to study the enzymatic parameters of Bmt3p, we synthesized a β -1,2-mannosyl- α -1,2-mannotriose derivative to serve as specific substrate for Bmt3p that we called DP4M-b. As shown in **Figure 7**, the incubation of Bmt3p extract under the standard assay conditions (28°C, pH 6.5) with DP4M-b and GDP-Man generated very quickly (from 10 min) only one product detected by HPLC analysis with a higher retention time than DP4M-b (18.8 min versus 14.4 min). This compound, named DP5M-b, appeared resistant to α -exomannosidase treatment and showed the same chromatographic behavior than DP5M-a (data not shown). The analysis of DP5M-b by MALDI-TOF MS confirmed that it was a Hex₅-mantyl owing to its observed $[\text{M}+\text{Na}]^+$ value at m/z 1041.2, as expected (**Figure 5**). Although

the addition of the terminal β Man residue at C-2 position of β Man unit of DP4M-b could not be formally established by NMR because of low quantity, MS analysis and enzymatic digestion strongly suggest that Bmt3p transferred one β Man(1-2) residue on to this initial substrate, as it performed on the product resulting from Bmt1p activity.

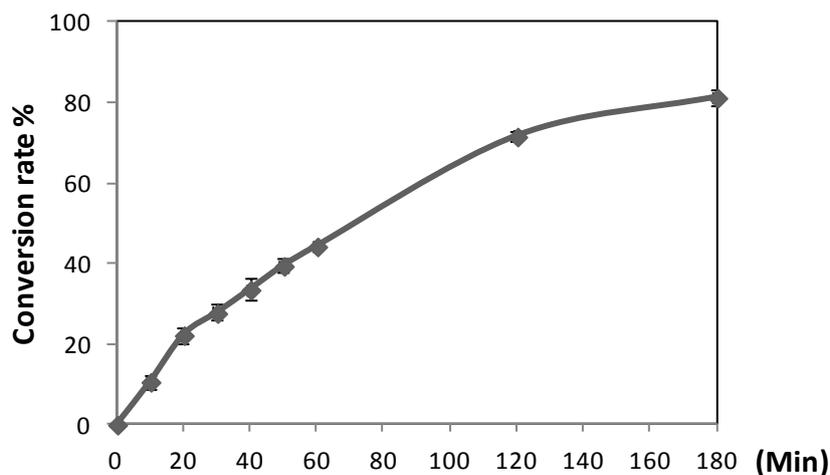


Figure 7 : Time-dependent production of DP5M-b, expressed as percentage of converted DP4M-b substrate after incubation with Bmt3p under standard assay conditions.

The incubation of Bmt3p with DP4M-b under standard assay conditions led to a time-dependent reaction (production of DP5M-b) for at least 3h at 28°C (**Figure 7**). In these incubation time conditions, a control experiment using the supernatant from *P. pastoris* transformed with the empty vector did not show any transferase activity on to DP4M-b (results not shown). It is noteworthy that Bmt3p exhibited a high reaction velocity in comparison with Bmt1p.

The activity of Bmt3p was investigated under different experimental conditions using DP4M-b as acceptor substrate in order to establish by NP-FL-HPLC the optimal reaction conditions for the formation of DP5M-b. The temperature- and pH- dependence and the metal requirement were studied under the standard assay conditions except for the parameter studied. The pH dependence of the enzyme activity was determined in two buffers: sodium citrate/citric acid 100 mM between pH 4 and pH 6.5, and Tris/maleate 100 mM between pH 6.5 and pH 9.5. Bmt3p exhibited maximum activity at pH 6.5 (**Figure 8A**). The temperature dependence study showed that maximal activity occurred at 28°C (**Figure 8B**). The effect of several divalent cations, Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} and Zn^{2+} , on the Bmt3p activity was assessed with the use of their respective chloride salts. As shown in **Figure 8C**, the Bmt3p activity was equivalent in presence of Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} or Ca^{2+} , and only slightly reduced by Ni^{2+} but completely inhibited by Zn^{2+} . The presence of EDTA alone did not affect their

activity. Thus, Bmt3p does not require a specific divalent cation to perform its duty. Moreover, it is noteworthy that, contrary to Bmt1p, Bmt3p activity is not inhibited by Ni^{2+} , but only slightly affected.

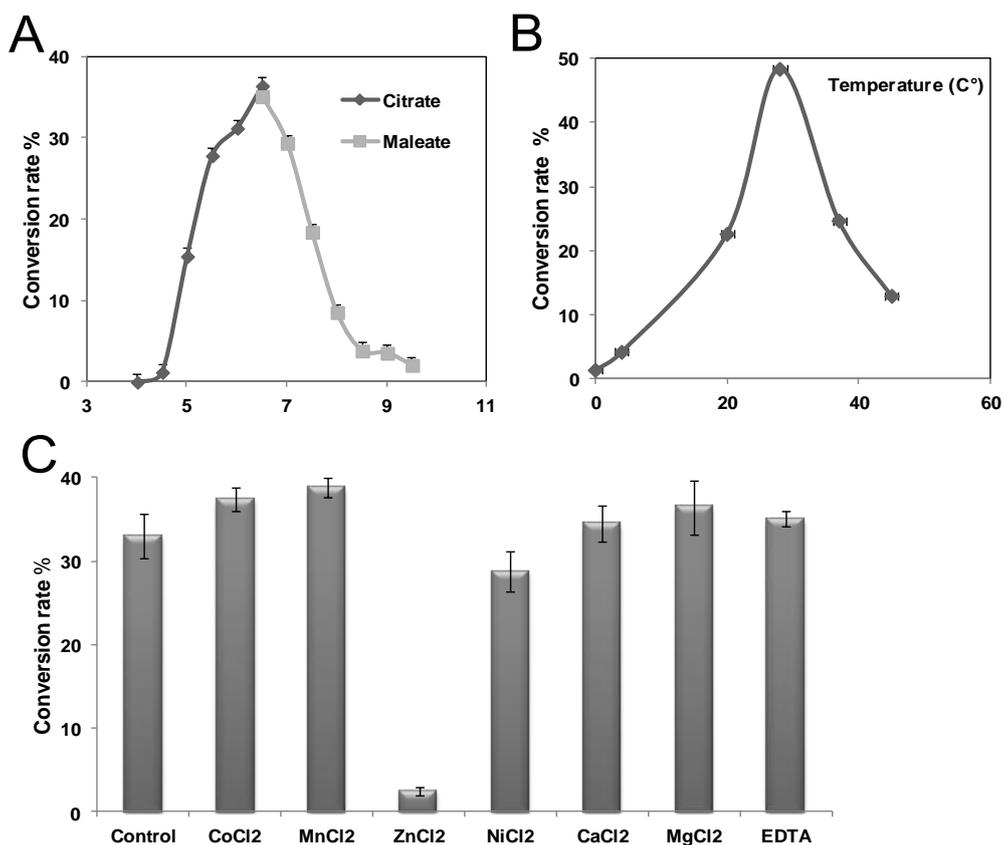


Figure 8 : Influence of reaction parameters on Bmt3p activity on DP4M-b substrate under standard conditions (30 min). The activity (substrate conversion rate) was quantified by NP-FL-HPLC, as the percentage of the product fluorescence compared with the total fluorescence. Each data point represents the mean of three experiments. (A) pH-dependence at 28°C. Sodium citrate or Tris/maleate buffers (100 mM) were used for pH 4-6.5 and 6.5-9.5 respectively. (B) Effect of temperature in sodium citrate buffer pH 6.5. (C) Effect of metal ions and EDTA. The incubation was achieved in the presence of 20 mM ions or EDTA at pH 6.5 and 28°C.

Determination of the acceptor substrate specificity

In order to study the substrate specificity of Bmt3p, we used pyridylamino-labeled oligomannosides generated from PPMs of *S. cerevisiae* and ΔBMT1 *C. albicans* and synthetic mantyl-tagged oligomannosides. Optimal incubation conditions were used, as established

above *i.e.* 30 min, 28°C, pH 6.5 with 20 mM CaCl₂. When a transferase activity was observed, the yield of conversion was calculated by integrating the HPLC signals of the remaining substrate and of the reaction product.

As shown in **Table 2**, the only acceptor substrate inducing the generation of α -mannosidase-resistant higher DP product was the mantylated DP4M-b [DP4 $\alpha\beta$] that generated a DP+1 product with a conversion rate of about 35% in 30 min. None of the assays using the pyridylamino- or mantyl-tagged α -1,2-tri- and tetra-mannosides [DP3 α and DP4 α 2] or the pyridylamino derivatives of α -1,2- or β -1,2-mannobiose [DP2 α and DP2 β] generated a higher DP product. Similarly, Bmt3p showed no activity toward pyridylamino derivatives of a β Man(1-2) tetramer [DP4 β 2] and of a α -1,2-trimannoside capped with a α Man(1-3) unit [DP4 α 3]. These data established that *in vitro* Bmt3p requires a β Man(1-2) α Man motif in the terminal non-reducing end to elongate a tetramannoside by a single β Man(1-2) residue.

Table 2 : Activity of *Bmt3p* on pyridylamino- or mantyl-tagged oligomannosides (expressed as percentage of converted substrate). 1: pyridylamino derivatives; 2: mantyl derivatives.

Oligomannosides	Substrate	Structure	Activity (%)
α -1,2-Mannobiose	DP2 α ¹	M α 1-2 M	0
β -1,2-Mannobiose	DP2 β ¹	M β 1-2 M	0
α -1,2-Mannotriose	DP3 α ^{1,2}	M α 1-2 M α 1-2 M	0
α -1,2-Mannotetraose	DP4 α 2 ^{1,2}	M α 1-2 M α 1-2 M α 1-2 M	0
α -1,3-Mannosyl- α -1,2-Mannotriose	DP4 α 3 ¹	M α 1-3 M α 1-2 M α 1-2 M	0
β -1,2-Mannotetraose	DP4 β 2 ¹	M β 1-2 M β 1-2 M β 1-2 M	0
β -1,2-Mannosyl- α -1,2-Mannotriose	DP4 $\alpha\beta$ ²	M β 1-2 M α 1-2 M α 1-2 M	~ 35

Purification and enzymatic activity of purified Bmt3p

As shown in **Figure 1**, Bmt3p is by far the major protein of the culture supernatant of *P. pastoris*. As established above, culture supernatant of Bmt3p expressing *P. pastoris* exhibits a specific β -mannosyltransferase activity that was not observed from untransfected strain. However, in order to confirm that the observed activity is borne by Bmt3p, the recombinant enzyme was purified and assayed. Despite the fact that no polyhistidine tag had been inserted in the plasmid, we noticed that Bmt3p could bind to a certain extent to a Ni²⁺ affinity column, as we previously observed for Bmt1p. Bmt3p was eluted from the column with 250 mM imidazole which permitted us to achieve a much higher degree of purity than

the supernatant, and still kept a satisfying concentration (**Figure 1**). Interestingly, mannosyltransferase assay performed with DP4M-b substrate under optimal incubation conditions before and after the purification process gave positive results in both cases. Bmt3p retained its ability to transfer a β -mannosyl residue on its substrate, admittedly with a decrease of approximately 20% in efficacy. In addition, DLS analysis showed that purified Bmt3p retained monomeric form (not shown).

Bmt1p and Bmt3p activity on Hwp1 protein

Activity assays on purified and synthetic oligosaccharides established that Bmt1p and Bmt3p can efficiently β -mannosylate (α 1,2)mannans to generate Man(β 1,2)Man(β 1,2)[Man(α 1,2)]_n epitopes. We further assessed the capacity of these enzymes to modify glycoproteins by using the endogenous mannoprotein Hwp1 as a model target. To achieve this, recombinant Hwp1 was overexpressed as excreted soluble proteins both in a WT strain (rHwp1WT) and in a BMT1 deleted strain (rHwp1 Δ Bmt1), the latter being used for activity assay. As shown in **Figure 9** (lanes 1 and 2), both rHwp1WT and rHwp1 Δ Bmt1 are recognized by the mannose non-specific lectin concanavalin A (ConA) as bands respectively around 70 and 50 kDa. It is noteworthy that rHwp1 Δ Bmt1 exhibits a slightly higher mobility in gel electrophoresis, probably due to the shorter mannosylation induced by the lack of β -mannosylation. However, only rHwp1WT is detected by the antibody MAb B6.1 (lanes 7 and 8) that is known to be specific to β -mannosylated epitopes, which confirms the absence of β -mannosylation on rHwp1 Δ Bmt1. Considering the contents of the Bmt1p/Bmt3p supernatants in terms of mannosylated structures, inevitably present in *P. pastoris* expression, neither ConA (lanes 3 and 4) nor MAb B6.1 (lanes 9 and 10) have detected anything in the area of interest corresponding to rHwp1 Δ Bmt1, around 50 kDa. The mannosylated structures detected by ConA around 70 kDa and by MAb B6.1 around 40 and 70 kDa can thus be discarded from interpretation in regards to the state of β -mannosylation of rHwp1 Δ Bmt1. Time course incubation (12 and 48h) of rHwp1 Δ Bmt1 with Bmt1p and Bmt3p in standard conditions observed by ConA staining (lanes 5 and 6) showed that rHwp1 Δ Bmt1 can still be detected around 50 kDa. Consequently, this incubation did not notably modify the overall mannosylation status of rHwp1 Δ Bmt1. However, when probed with MAb B6.1 (lanes 11 and 12), it induced a clear detection of β -mannosylation of rHwp1 Δ Bmt1. This experiment established that Bmt1p and Bmt3p can also β -mannosylate mannoproteins produced by *C. albicans*.

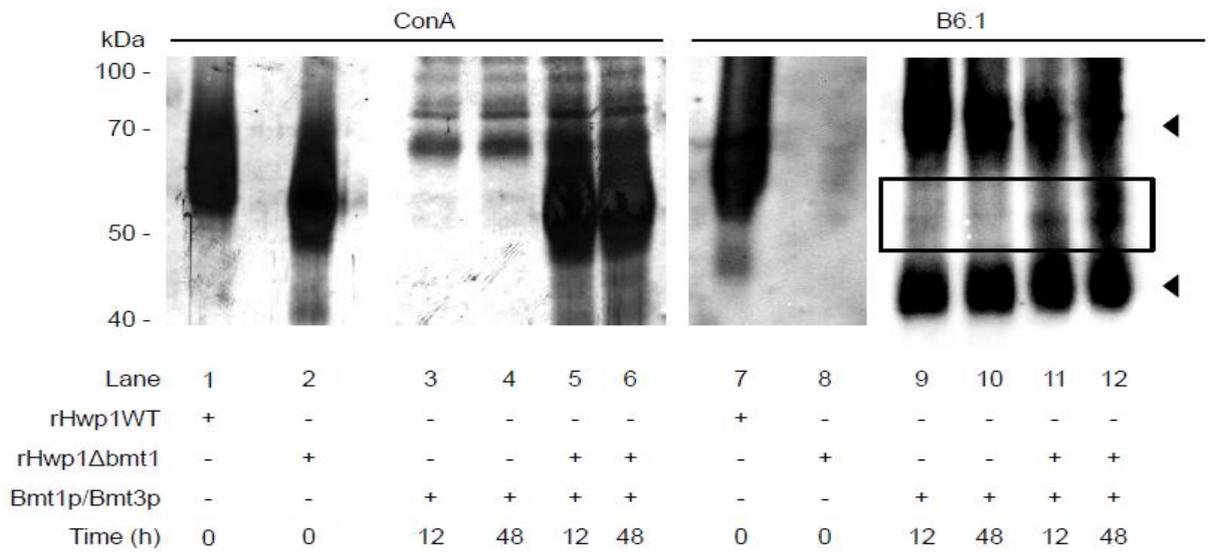


Figure 9 : Detection of specific epitopes on rHwp1, a recombinant glycoprotein of *Candida albicans* cell wall, following the action (for 12 and 48h) of the two recombinant enzymes *Bmt1p* and *Bmt3p*, through the use of a lectin, concanavalin A (ConA), or a monoclonal antibody (MAb) B6.1. Black arrowheads represent random mannosylated structures inevitably found in supernatants when overexpressing in *P. pastoris* and thus ignored from interpretation. Black rectangle represents the area of interest, showing β -mannosylation of rHwp1Δ*Bmt1*.

DISCUSSION

The human pathogen yeast *Candida albicans* is the most frequent cause of invasive candidiasis with a high level of mortality. Its cell wall plays an essential role in host-pathogen interaction, in particular β -1,2-linked mannose units that were shown to be directly connected to both PPM acid stable and acid labile fractions and correspond to the antigenic factor 6 and antigenic factor 5 of serotype A *C. albicans* [3, 12]. The β -1,2-linked oligomannosides moieties were found to display stronger antigenicity than the α -linked mannosides. The factor 6 antigen of *C. albicans* serotype A was reported to play a role in fungal adherence to epithelial cells [13] and the factor 5 antigen was shown to induce tumor necrosis factor (TNF)- α production through binding to macrophages *via* galectin-3 [14-15]. Despite the fact that the presence of β -mannosides in *C. albicans* cell wall was established in 1980s by Shibata and co-workers [2], the identification of the family of genes encoding for enzymes involved in the transfer of β -Mans was only performed in 2008 by Mille and co-workers [5]. This work allowed the characterization of a new family of nine genes, named CaBMT1-9, encoding for β -1,2 mannosyltransferases (Bmts) in *C. albicans*. Four of these β -1,2 mannosyltransferases (CaBmt1-4) are involved in the β -mannosylation of cell wall PPM and two (CaBmt5-6) act specifically on β -mannosylation of the PLM [5]. In order to better understand biosynthetic pathways of β -mannosides, the *in vitro* activity of a recombinant form (Bmt1p) of CaBmt1, the enzyme responsible for the initiation of β -mannosylation of PPM acid stable fraction, was recently characterized [7].

In the present study, we characterized the *in vitro* activity of a recombinant CaBmt3 that is presumably involved *in vivo* in the elongation of the β -Mans chain on the phosphopeptidomannan (PPM). Like CaBmt1, CaBmt3 harbors a type II membrane protein arrangement. We used the *P. pastoris* protein expression system to obtain a soluble Bmt3p lacking the cytoplasmic N-terminus and the membrane spanning domain. This protocol permitted us to obtain high concentrations of the desired protein. In addition, the absence in Bmt3p of the hydrophobic region located at the C-terminal end in Bmt1p allowed us to produce the recombinant Bmt3p without any additional detergent, except for the introduction of 0.05% Tween 20 at the beginning of the induction period.

Using a synthetic substrate named DP4M-b, we first established that Bmt3p can transfer *in vitro* one β -1,2-mannosyl unit onto this tetramannoside containing a terminal β -1,2-Man linked to a α (1-2)Man chain. The enzymatic activity of Bmt3p was then compared with the previously described Bmt1p activity. Surprisingly, we observed that Bmt3p showed a high reaction velocity on its synthetic substrate DP4M-b (5-10 μ mol/ h per mg of protein) in comparison with Bmt1p that exhibited a relatively low catalysis velocity on pyridylamino-oligomannoside derivatives (about 40 nmol/h per mg of protein) [7] and also with the native enzyme fractions of *Candida* cells (approximately 30 and 50 nmol/h per mg of protein for *C. albicans* serotype A and *Candida guilliermondii* β -1,2 mannosyltransferases respectively) [1, 17].

In this study, we used a variety of substrates to analyze the specificity of the enzyme. We found that Bmt3p showed a specificity for the acceptor substrate DP4M-b. We also observed that Bmt3p is unable to transfer a Man residue to other tested substrates like α -1,2-tri- and tetra-mannosides [DP3 α and DP4 α 2] or α -1,2- or β -1,2-mannobiose [DP2 α and DP2 β] (**Table2**). These findings established that *in vitro* Bmt3p requires a **β Man(1-2) α Man motif** in the terminal non-reducing end to elongate a tetramannoside by a single β Man(1-2) residue. On the one hand, our experiments evidenced that Bmt1p and Bmt3p act sequentially for the β -mannosylation of PPM acid stable fraction as previously predicted for *in vivo* activity of CaBmt1 and CaBmt3 [5]. On the other hand, we demonstrated that Bmt1p and Bmt3p can also β -mannosylate mannoproteins *in vitro* like a recombinant form of Hwp1 which is an endogenous mannoprotein produced by *C. albicans*.

Then, we identified the optimal reaction conditions for Bmt3p activity and we found that like Bmt1p, Bmt3p exhibited a maximal activity at 28°C and at pH 6,5. Furthermore, the addition of EDTA does not affect activity of Bmt3p indicating that divalent cations do not contribute to the reaction. Moreover, unlike Bmt1p, Bmt3p activity is not inhibited by Ni²⁺, but only slightly affected.

Surprisingly, despite the absence of 6xHis tag, Bmt3p can bind to a Ni²⁺ affinity column that allowed its purification. Bmt3p conserved about 80% of its enzymatic activity after purification. The purification protocol presented here appears reproducible and appropriate to produce milligram quantities of stable protein, which will be useful in future experiments to establish the structure and mechanism of action of Bmt3p and extend our understanding of how precisely this GT functions.

EXPERIMENTAL

Materials

The *Pichia pastoris* strains and plasmids were obtained from Invitrogen; GDP-Mannose was from Sigma-Aldrich; oligonucleotides were synthesized by Eurogentec. Phosphopeptidomannan from *S. cerevisiae* was obtained from Sigma Products. Phosphopeptidomannan from the *C. albicans* ΔBMT1 mutant strain, grown in YPD medium at 28°C, was extracted as described previously [8]. Briefly, cells were autoclaved in 0.02M citrate buffer at 125°C for 90 min and Fehling's solution was added to the supernatant to precipitate PPM. The PPM was then washed with methanol/acetic acid (8:1, v/v) and dried in a Speed Vac concentrator after a final wash in methanol.

Plasmid construction

The gene BMT3 was amplified by PCR from the genome of *C. albicans* serotype A strain (BWP17) using the oligonucleotides 5'-**CACCACGTGGGACTACACACCTATAAAAGTTTCC** and 5'-**AATGGCGGCCGCTCATCTTGATAATTTATC** that contain the restriction sites PmlI and NotI (in bold) before and after the ATG and STOP codons respectively. The 1401 bp long DNA fragment was then digested with PmlI and NotI, and ligated into the PmlI/NotI sites of the pPICZalphaA vector (Life Technologies). The encoded Bmt3p truncate begins with Asp90. To obtain the leucine/serine residue mutation that restores the native serine in position 460 of the amino acid sequence, the following oligonucleotide was used concomitant with its inverted complemented version 5'-**GCAGTGATGGTAAATCTGTATTAATTCCAAATAGTG** to perform an Inverse PCR. The AseI restriction site (in bold) allowed the selection of correctly mutated clones. The Pfu-Turbo Cx Hotstart DNA polymerase (Agilent Technologies) was used to achieve all PCRs following the manufacturer's recommendations. The complete ORF was sequenced (GATC) to establish that only the desired mutations were present.

Expression of Bmt3p in Pichia pastoris

The protocol used to express Bmt3p is adapted from our previous work on Bmt1p [7]. The pPICZαA vectors were digested with SacI, and the linearized fragments were used to transform the *P. pastoris* strain (X-33) by electroporation. Mut^s transformants were obtained by selecting clones that grew well in minimal medium containing glucose, but poorly in minimal medium containing methanol. A total of 6 transformants were screened for their level of secretion of Bmt3p into the culture supernatant. Clones were grown in 5 ml deep-well microplates at 28°C (200 rpm) in medium containing 1% (w/v) yeast extract, 2% (w/v) peptone, 1.34% (w/v) yeast nitrogen base, 0.00004% biotin and 1% (v/v) glycerol buffered at pH 6 with 100 mM potassium phosphate (BMGY medium) until a D₆₀₀ of 40 was reached. The medium was removed by centrifugation (1500g for 10 min at room temperature) and the

cells were re-suspended at 5-fold their original density in BMMY medium, which is similar to BMGY medium except that it contains 0.5% methanol instead of glycerol as the inducer and the protease inhibitors pepstatin A and leupeptin at 1 μ M and 10 μ M respectively. Alternatively, BMM medium was used, differing from BMMY by the absence of yeast extract. The medium was collected after 2 days of culture at 28°C during which methanol and protease inhibitors were added every 12 h. The clone showing the highest level of expression was then cultivated under the same growing and expression conditions, scaling-up volumes 50-fold in baffled Erlenmeyer flasks. 0.05% Tween 20 was added during the expression. Cells were removed by centrifugation at 3000g for 10 min at 4°C after which 0.01% azide was added to the protein-containing supernatant with or without 0.5% Triton X-100. The culture supernatant was used as Bmt3p source for enzymatic assays. In parallel, X-33 strain was transformed in the same conditions as described above, using the empty pPICZ α A vector. The supernatant collected at the end of the process was used as a control in the mannosyltransferase assays described below.

Purification of recombinant Bmt3p

To purify the over-expressed protein (Bmt3p), nickel-affinity chromatography was performed using an Akta Purifier FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography, GE Healthcare) running the analysis program Unicorn 5.20. HisPur Ni-NTA Chromatography 1 mL column (Thermo Scientific) was washed with Buffer A (20 mM sodium phosphate buffer, 100 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 1 μ M Pepstatin A, 10 μ M Leupeptin, pH 7.4) and loaded with culture supernatant at 0.5 mL/min. Then, the column was washed with Buffer A' (20 mM sodium phosphate buffer, 100 mM NaCl, 1 μ M Pepstatin A, 10 μ M Leupeptin, pH 7.4). Then, the column was irrigated with Buffer B (20 mM sodium phosphate buffer, 100 mM NaCl, 250 mM imidazole, 1 μ M Pepstatin A, 10 μ M Leupeptin, pH 7.4) at 2 mL/min for 10 min. Eluted fractions were collected and analyzed by SDS-PAGE (15% gel).

Analytical methods

Culture supernatant or purified Bmt3p were run on SDS/PAGE (15% gel) using a Mini-Protean 3 electrophoresis system (Bio-Rad Laboratories). Proteins were visualized with Coomassie Blue ProteoStain (Proteomics Consult). Protein concentration was determined from SDS/PAGE (15% gel) by densitometry with a GS-800 Calibrated Imaging densitometer (Bio-Rad Laboratories) and software Quantity One, using purified Bmt1p as a standard (see ref [7] for the quantification of Bmt1p).

For Western blotting, proteins were transferred with the Mini Trans-Blot cell (Bio-Rad Laboratories) on to nitrocellulose membranes (Protran BA 83, Whatman). Detection was performed with the ECL2 detection system (GE Healthcare).

Dynamic light scattering

Dynamic light scattering (DLS) was carried out at 20°C with a Malvern Zetasizer Nano ZS instrument equipped with temperature control and using a 633 nm He-Ne laser for backscattering at 173°. The measurement duration was 10s and 15 measurements were averaged for each analysis. The culture supernatants containing Bmt3p (described above) or Bmt1p (previous study), with or without 0.5% Triton X-100, were centrifuged at 18000 g for 45 min at 4°C prior to analysis.

Purification of acceptor substrates

Natural oligomannosides were obtained from *S. cerevisiae* and *C. albicans* mutant strain phosphopeptidomannans as previously described [7]. Briefly, the acid-labile oligosaccharides were released from Δ BMT1 *C. albicans* PPM by acid hydrolysis and individually separated by gel-filtration chromatography. Then the remaining PPM as well as the PPM from *S. cerevisiae* were submitted to acetolysis yielding a mixture of oligosaccharides that were purified by anion-exchange chromatography and individually separated by gel filtration chromatography (BioGel-P2 BioRad).

Coupling of oligosaccharides with 2-Aminopyridine

The pyridylation of the oligosaccharides was performed as described by Hase *et al.* [9]. Briefly 100 μ g of oligomannosides were incubated at 80°C for 1 h in 20 μ L of solution A (552 mg of 2-aminopyridine (Aldrich) in 200 μ L of glacial acetic acid) followed by the addition of 70 μ L of solution B (250 mg of dimethylamine boran complex (Aldrich) in 100 μ L of acetic acid and 62.5 μ L H₂O) and 1 h incubation at 80°C. The samples were dried under nitrogen and diluted in 1 mL of water. The solution was adjusted to pH 10 with aqueous ammonia, washed ten times with chloroform and freeze-dried. The reaction mixture was diluted with 100 μ L of water and applied to a C18 cartridge (Sep-Pak Waters), and separated from free 2-aminopyridine by elution with 5 mL acetonitrile/water (25/75).

Synthetic acceptor substrates

Three synthetic fluorescent acceptor substrates were prepared. The synthesis of mantyl-tagged α -oligomannosides (DP3M-a and DP4M-a) has been previously described [10]. Another mantyl-tagged oligomannoside (DP4M-b) [Man(β 1,2)Man(α 1,2)Man(α 1,2)Man(α)-Mantyl] was synthesized using a different mannoside-to-mantyl linker. This derivative was prepared in 10 steps from alkyl 3,4,6-tri-O-benzyl-2-O-Benzoyl 1-thio mannose and glucose (Publication to be submitted) and fully characterized by NMR (supplementary data) and mass spectrometry.

Mannosyltransferase Assays

The standard assay mixtures contained 25 μ L (corresponding to about 1 μ g of protein) of the Bmt1p- or Bmt3p-containing culture supernatant of *P. Pastoris* (in Tween 20/Triton X-100),

0.1mM pyridylamino- or mantyl-oligomannoside, 20mM GDP-mannose donor, 0.3 % Triton X-100, 50 mM sodium citrate buffer pH 6.5, 20 mM CaCl₂, in a total volume of 100 µL with the protease inhibitors pepstatin A and leupeptin. The reaction mixture was incubated over different times at 28°C and stopped by boiling for 5 min. Reaction mixtures were centrifuged for 10 min at 12,100 x g and analysed by normal phase HPLC fitted with fluorimetric detection (NP-FL-HPLC).

The conditions of temperature, incubation time, divalent ions choice or pH buffer were suitably modified according to the studied parameters. The effect of several divalent cations was assayed using their respective chloride salts at a concentration of 20 mM. Sodium citrate/citric acid and Tris/maleate 100 mM buffers were used for the study of pH effect.

Treatment with α -mannosidase

The α -mannosidase treatment of the reaction mixture after mannosyltransferase assays was carried out in 20 mM sodium acetate buffer pH 5, containing 2 mM ZnCl₂ and 0.15 units of α -exomannosidase from Jack Bean (Prozyme) at 37°C for 24-48h. After centrifugation, the resulting products were analysed by HPLC.

Analysis of fluorescent substrates and enzyme reaction products by NP-FL-HPLC

The reaction mixtures were analysed by normal phase HPLC on an Amide-80 (TSK gel) column (4.6 mm x 25 cm) irrigated at a flow rate of 0.8 mL/min, using a gradient of two eluents, A (10% acetonitrile, 3% acetic acid, triethylamine pH 7.3/acetonitrile, 25:75, v/v) and B (10% acetonitrile, 3% acetic acid, triethylamine pH 7.3/acetonitrile, 50:50, v/v). The fluorimetric detection of the PA-oligosaccharides was achieved using excitation and emission wavelengths of 310 and 380 nm respectively, whereas excitation and emission wavelengths of 334 and 437 nm were used for the detection of mantyl-oligomannosides.

Isolation of enzyme products

Reaction products were collected from HPLC separation as described above and purified on 150 mg carbograph SPE columns (Grace Davison) eluted by water/acetonitrile (50:50, v/v). The products were then analysed by mass spectrometry and NMR spectroscopy as described below.

Mass spectrometry analysis of native and fluorescent oligomannosides

MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Time of Flight) mass spectra were acquired on a Voyager Elite DE-STR mass spectrometer (Perspective Biosystems, Framingham, MA) equipped with a pulsed nitrogen laser (337 nm) and a gridless delayed extraction ion source. The spectrometer was operated in positive reflectron mode by delayed extraction with an accelerating voltage of 20 kV, a pulse delay time of 250 ns and a grid voltage of 66%. Samples were prepared by mixing 0.5 µL of oligomannosides solution (0.02 µg/µL) with 0.5 µL of 2,5-dihydroxybenzoic acid matrix solution (10 mg/mL in

methanol/water, v/v) directly on the target. The samples were allowed to dry for about 5 min at room temperature. Between 50 and 100 scans were acquired for each spectrum over the range m/z 200 to 2500 Da.

NMR Analyses

NMR experiments were performed at 300 K on a Bruker Avance 400 and an Bruker Avance III 900 spectrometers equipped with a 5 mm TBI (Triple resonance Broad-band Inverse probehead), and 5 mm cryoprobe head respectively. Before NMR spectroscopic analyses, samples were exchanged three times with $^2\text{H}_2\text{O}$ (99.97% deuterium atoms, Euriso-Top, Saclay, France) and intermediate freeze-drying, then dissolved in 250 μL of $^2\text{H}_2\text{O}$ and transferred in standard or Shigemi tubes (Allison Park, USA). ^1H chemical shifts were expressed in ppm related to the methyl signal of acetone as internal standard ($\delta^1\text{H}$ 2.225 and $\delta^{13}\text{C}$ 31.55 ppm). The COSY, TOCSY, ROESY, ^1H - ^{13}C HSQC pulse programs used were extracted from the Bruker pulse programs library but pulses and delays were optimized for each experiment.

Hwp1 experiments

Expression and purification of recombinant Hwp1

According to the protocol described by Courjol *et al.* [submitted], recombinant Hwp1 was expressed in *Candida albicans*. Briefly, various *C. albicans* cells (CAI-4, *bmt1Δ*) expressing 6xHis Hwp1 were generated *via* the use of *Escherichia coli* strains DH5 α for cloning. The culture supernatants containing the expressed 6xHis Hwp1 were purified using His GraviTrap column (GE Healthcare). Two forms of Hwp1 were obtained: Hwp1WT expressed in CAI-4, presenting the totality of its β -mannosylation, and Hwp1 Δ Bmt1 expressed in *bmt1Δ*, presenting no β -mannosyl residue since the initiation of β -mannosylation was impossible in the absence of BMT1

Mannosyltransferase assays on Hwp1

Assay mixtures contained 50 μL of the culture supernatant of *P. pastoris* (containing either no Bmtp, or a mixture of 1.5 μg of Bmt1p and 0.5 μg of Bmt3p, in Tween 20 0.05%/Triton X-100 0.5%), 80 μL of Hwp1 Δ Bmt1, 20 mM GDP-mannose donor, 0.3 % Triton X-100, 50 mM sodium citrate buffer pH 6.5, 20 mM CaCl_2 , in a total volume of 200 μL with protease inhibitors pepstatin A and leupeptin. The reaction mixture was divided in two parts, incubated for 12 or 48h at 28°C and stopped by boiling for 5 min. Reaction mixtures were then centrifuged for 10 min at 13400 rpm and analysed by Western-blotting.

Western blotting analysis of Hwp1 assays

Loading buffer was added to each sample in order to get to the following final concentrations: 2% sodium dodecyl sulfate (SDS), 50 mM Tris pH 6.8, 10% glycerol and 2% β -mercaptoethanol. Samples were boiled for 10 min and analysed by SDS/PAGE on 15%

acrylamide gels. After transfer, nitrocellulose membranes were probed with biotinylated concanavalin A (ConA) or MAb B6.1 diluted 1:1000 and 1:2000 respectively. ConA is specific for terminal α -D-mannosyl and α -D-glucosyl residues and was purchased from Sigma. MAb B6.1 (mouse immunoglobulin M [IgM]) used in western-blot assays is specific for β -1,2-linked oligomannosides.

Then, ConA-probed membrane was incubated with HRP-labeled Streptavidin (1:1000), and MAb B6.1-probed membrane was incubated with alkaline phosphatase-labeled anti-mouse IgM (1:2000). Peroxidase activity was detected by chemiluminescence using SuperSignal West Pico (Pierce). Alkaline phosphatase activity was detected by colorimetry using NBT/BCIP substrates (Pierce).

ABBREVIATIONS

PPM, Phosphopeptidomannan ; PLM, Phospholipomannan ; Bmt, β -1,2 mannosyltransferase; β -Man, β -1,2-linked mannose; BMT, β -1,2 mannosyltransferase gene ; Δ BMT1, *C. albicans* BMT1 gene deleted mutant strain ; MALDI-TOF MS, matrix assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry ; DP, degree of polymerization ; NMR, Nuclear magnetic resonance ; TOCSY, total correlation spectroscopy ; COSY, correlation spectroscopy ; ROESY, rotating-frame nuclear Overhauser effect correlation spectroscopy; HSQC, heteronuclear single quantum coherence ; NP-FL-HPLC, normal-phase HPLC with fluorimetric detection; PA, pyridylamino.

FUNDING

The work was supported by the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (to G.S-L and T.H). The 400 MHz NMR facility was funded by the Centre Commun de Mesure RMN de l'Université de Lille 1. The 900 MHz spectrometer was funded by Région Nord-Pas de Calais, European Union (FEDER), Ministère Français de la Recherche, Université Lille1-Sciences et Technologies and CNRS. Financial support from the TGE RMN THC Fr3050 for conducting the research on the 900 MHz spectrometer is gratefully acknowledged. The mass spectrometry facility used in this study is funded by the European Community (FEDER), the Région Nord-Pas de Calais (France), the CNRS and the Université Lille1.

REFERENCES

- [1] Shibata, N., Kobayashi, H., Suzuki, S. (2012) Immunochemistry of pathogenic yeast, *Candida* species, focusing on mannan. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* 88, 250–265.
- [2] Shibata, N., Ichikawa, T., Tojo, M., Takahashi, M., Ito, N., Okubo, Y., and Suzuki, S. (1985) Immunochemical study on the mannans of *Candida albicans* NIH A-207, NIH B-792, and J-1012 strains prepared by fractional precipitation with cetyltrimethylammonium bromide. *Arch. Biochem. Biophys.* 243, 338-348.
- [3] Shibata, N., Arai, M., Haga, E., Kikuchi, T., Najima, M., Satoh, T., Kobayashi, H. and Suzuki, S. (1992) Structural identification of an epitope of antigenic factor 5 in mannans of *Candida albicans* NIH B-792 (serotype B) and J-1012 (serotype A) as O-1,2-linked oligomannosyl units. *Infect. Immun.* 60, 4100–4110.
- [4] Mora-Montes HM., Bates S., Netea MG., Castillo L., Brand A., Buurman ET. Díaz-Jiménez DF., Jan Kullberg B., Brown AJ., Odds FC and Gow NA. (2010) “A multifunctional mannosyltransferase family in *Candida albicans* determines cell wall mannan structure and host fungusinteractions,” *Journal of Biological Chemistry*, vol.285, no.16, pp.12087–12095.
- [5] Mille, C., Bobrowicz, P., Trinel, P.A., Li, H., Maes, E., Guerardel, Y., Fradin, C., Martínez-Esparza, M., Davidson, R. C., Janbon, G., et al. (2008) Identification of a new family of genes involved in beta-1,2-mannosylation of glycans in *Pichia pastoris* and *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.* 283, 9724–9736.
- [6] Mille, C., Fradin, C., Delplace, F., Trinel, P. A., Masset, A., François, N., Coddeville, B., Bobrowicz, P., Jouault, T., Guerardel, Y., et al. (2012) Members 5 and 6 of the *Candida albicans* BMT family encode enzymes acting specifically on β -mannosylation of the phospholipomannan cell-wall glycosphingolipid. *Glycobiology* 22, 1332–1342.
- [7] Fabre, E., Sfihi-Loualia, G., Pourcelot, M., Coddeville, B., Krzewinski, K., Bouckaert, J., Maes, E., Hurtaux, T., Dubois, R., Fradin, C., Mallet, JM., Poulain, D., Delplace, F and Guerardel, Y. (2014) Characterization of the recombinant *Candida albicans* β -1,2 mannosyltransferase that initiates the β -mannosylation of cell-wall phosphopeptidomannan. *Biochem.J.*457, 347-360.
- [8] Faille, C., Wieruszkeski, J. M., Michalski, J. C., Poulain, D. and Strecker, G. (1992) Complete ¹H and ¹³C-resonance assignments for D-mannooligosaccharides of the beta-D-(1-->2)-linked series released from the phosphopeptidomannan of *Candida albicans* VW.32 (serotype A). *Carbohydr. Res.* 236, 17–27.
- [9] Hase, S. (1994) High-performance liquid chromatography of pyridylaminated saccharides. *Methods Enzymol.* 230, 225–237.

- [10] Pourcelot, M., Cattiaux, L., Sfihi-Loualia, G., Fabre, E., Krzewinski, F., Fradin, C., Poulain, D., Delplace, F., Guérardel, Y., and Mallet, JM. (2013) Mantyl tagged oligo α (1- \rightarrow 2) mannosides as *Candida albicans* β -mannosyltransferases sub strates: a comparison between synthetic strategies, *RSC Adv.*, 3, 22560-2257.
- [11] Shibata, N., Hisamichi, K., Kobayashi, H. and Suzuki, S. (1993) Complete assignment of ^1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance chemical shifts of O-1,2-linked manno oligosaccharides isolated from the phosphomannan of the pathogenic yeast *Candida albicans* NIH B-792 strain. *Arch. Biochem. Biophys.* 302, 113–117.
- [12] Kobayashi, H., Shibata, N. and Suzuki, S. (1992) Evidence for oligomannosyl residues containing both β -1,2 and α -1,2 linkages as a serotype A-specific epitope(s) in mannans of *Candida albicans*. *Infect. Immun.* 60, 2106–2109
- [13] Miyakawa, Y., Kuribayashi, T., Kagaya, K., Suzuki, M., Nakase, T. and Fukazawa, Y. (1992) Role of specific determinants in mannan of *Candida albicans* serotype A in adherence to human buccal epithelial cells. *Infect. Immun.* 60, 2493–2499.
- [14] Fradin, C., Jouault, T., Mallet, A., Mallet, J.M., Camus, D., Sinaÿ, P. and Poulain, D. (1996) O-1,2-Linked oligomannosides inhibit *Candida albicans* binding to murine macrophage. *J. Leukoc. Biol.* 60, 81–87.
- [15] Fradin, C., Poulain, D. and Jouault, T. (2000) O-1,2-Linked oligomannosides from *Candida albicans* bind to a 32-kilodalton macrophage membrane protein homologous to the mammalian lectin galectin-3. *Infect. Immun.* 68, 4391–4398.
- [16] Goto, K., et Okawa, Y. (2008) Activity and Stability of α - and β -Mannosyltransferases in *Candida albicans* Cells Cultured at High Temperature and at Low pH, *Biol. Pharm. Bull.* 31, 1333-1336.

SUPPLEMENTARY DATA

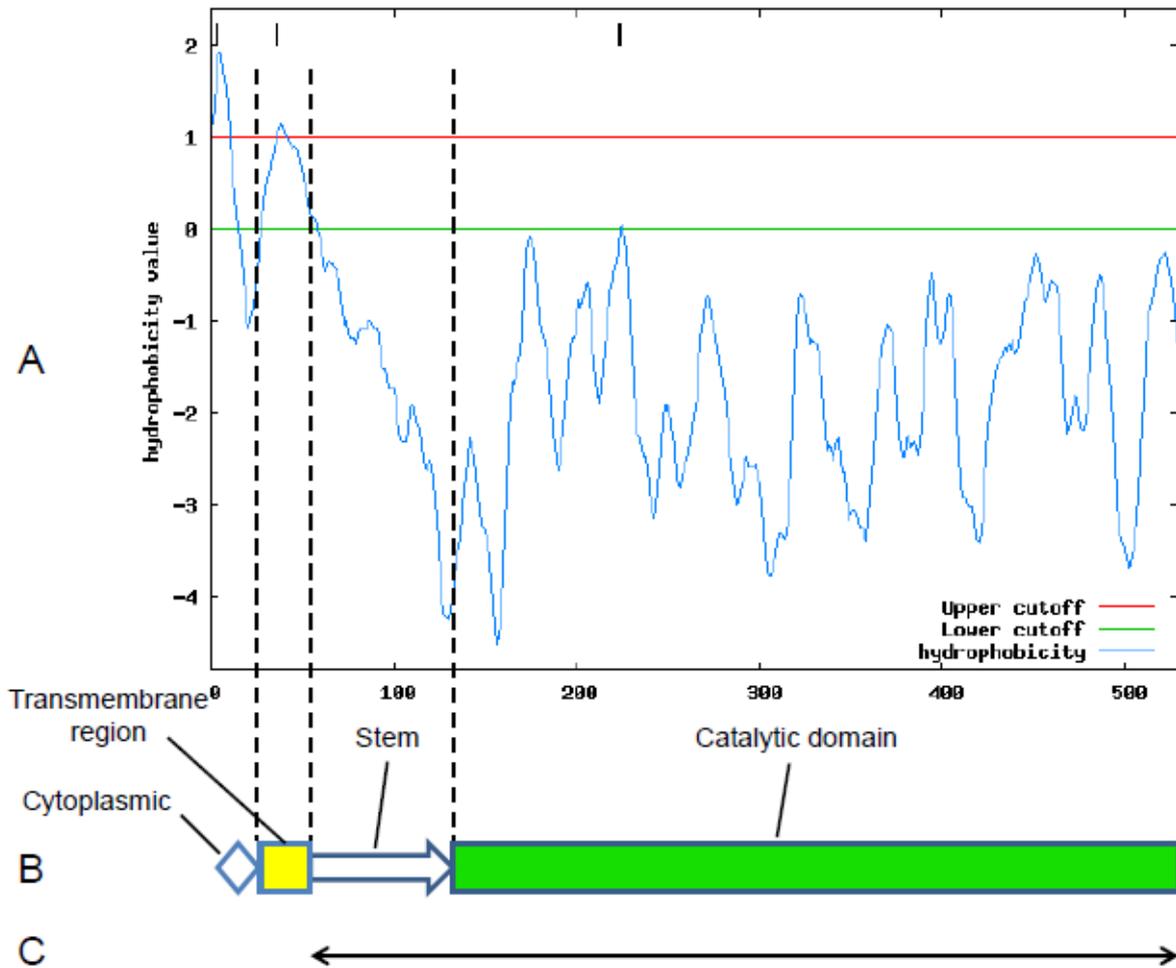


Figure S1 : Functional domains of Bmt3p. (A) Hydrophobicity profile of the whole Bmt3p sequence (<http://mobylye.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py#forms::toppred>). (B) Predicted Bmt3p functional domains. (C) Truncated form of Bmt3p expressed in *P. pastoris*.

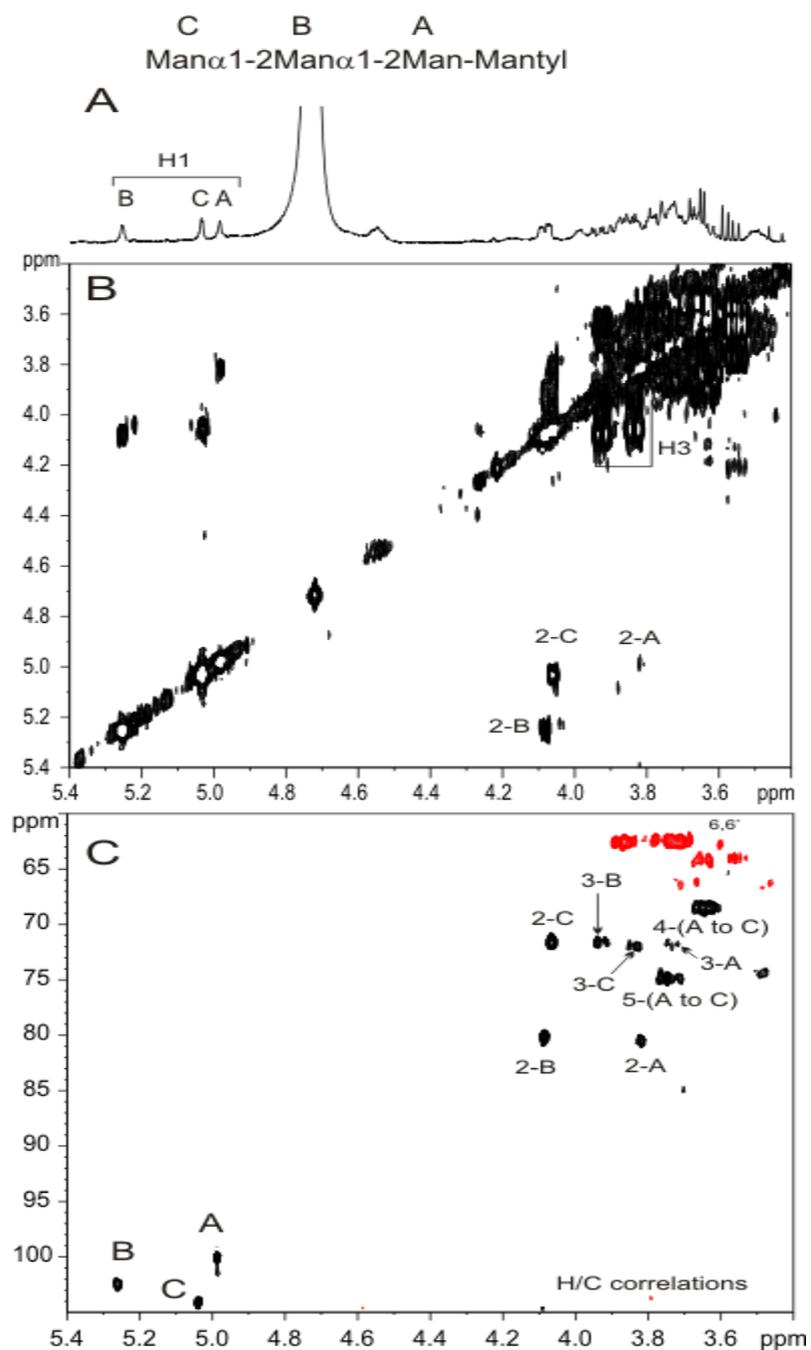


Figure S2 : Detailed NMR analysis of the synthetic mantylated acceptor substrate DP3M-a. (A) ^1H NMR spectrum. (B) COSY spectrum. (C) ^1H - ^{13}C HSQC experiment.

NMR data of synthetic acceptor substrate DP4M-b :

β Man 1->2 α Man1->2 α Man1->2 α Man- linker mantyl

^1H NMR (300 MHz, Deuterium Oxide) δ 8.44 (s, 1H, NH amide), 7.68 - 7.40 (m, 2H, H_{Ar}), 7.07 - 6.74 (m, 2H, H_{Ar}), 5.23 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H, H_1''''), 5.20 - 5.13 (m, 1H, H_1' or H_1''), 5.07 (s, 1H, H_1' or H_1''), 4.78 (m, 1H, H_1), 4.28 (dd, $J = 3.3, 1.7$ Hz, 1H, H_2' or H_2''), 4.25 (s, 1H, NH mantyl), 4.15 - 4.02 (m, 2H, H_2'''' , H_3''''), 3.98 - 3.31 [(m, 23H, 3.98 - 3.84 (H_2' or H_2'') 3.82 - 3.74 (H_2), 3.95 - 3.83 (H_5 , H_5' , H_5'' , H_5''''), 3.98 - 3.58 (H_3 , H_3' , H_3''), 3.94 - 3.38 (H_4 , H_4' , H_4'' , H_4''''), 3.88 - 3.75 ($\text{H}_{7\text{A}}$), 3.64 - 3.46 ($\text{H}_{7\text{B}}$), 3.97 - 3.31 (H_6 , H_6' , H_6'' , H_6''''), 3.55 - 3.37 (H_9)], 2.70 (br s, 3H, CH_3 mantyl), 1.90 (m, 2H, H_8).

^{13}C NMR (75 MHz, D_2O) δ 171.72 (CO amide), 140.87 (C_{qAr} mantyl), 137.12 (C_{Ar} mantyl), 133.09 (C_{Ar} mantyl), 127.11 (C_{qAr} mantyl), 117.00 (C_{Ar} mantyl), 112.55 (C_{Ar} mantyl), 100.67 (C_1''), 99.99 (C_1' or C_1''), 98.54 (C_1' or C_1''), 98.28 (C_1), 79.17 (C_2), 78.93 (C_2' or C_2''), 77.24 (C_2''), 77.05 (C_2' or C_2''), 73.32, 73.30, 72.81, 72.76 (C_5 , C_5' , C_5'' , C_5''''), 70.82, 70.31, 69.69, 69.63 (C_3 , C_3' , C_3'' , C_3''''), 65.59 (C_7), 67.10, 67.01, 66.82, 66.77 (C_4 , C_4' , C_4'' , C_4''''), 61.19, 61.14, 61.01, 60.73 (C_6 , C_6' , C_6'' , C_6''''), 39.59 (C_9), 29.92 (CH_3 mantyl), 28.19 (C_8).

II.7. Conclusion et discussion sur Bmt3p

Les résultats concernant les tests d'activité montrent que Bmt3p transfère *in vitro* un seul résidu mannose en β -1,2 sur un tétramannoside constitué d'une chaîne en α -1,2 avec un mannose terminal lié en β -1,2 ce qui confirme que CaBmt3 agit après l'action de CaBmt1 *in vitro*. De plus, l'étude de l'activité enzymatique de Bmt3p nous a permis de constater que la vitesse catalytique de Bmt3p est plus importante par rapport à celle de Bmt1p, cela pourrait s'expliquer par l'absence du domaine hydrophobe au sein du domaine catalytique qui est présent chez Bmt1p, ce qui favoriserait alors le bon repliement de Bmt3p.

Le rendement de la production des formes recombinantes dans les surnageants de culture de *Pichia pastoris* a été du même ordre pour les deux enzymes : Bmt1p (40mg/l), Bmt3p (35mg/l).

Par ailleurs, nous avons réalisé les études enzymatiques en présence du DP4M-b dans les conditions de vitesse initiale de Bmt3p, après avoir déterminé la zone de linéarité de Bmt3p (Figure 7 article N°3 page 169). Les résultats obtenus ont permis de confirmer que la vitesse catalytique de Bmt3p est plus importante par rapport à celle de Bmt1p puisque au bout d'1 heure d'incubation en présence de Bmt3p et du DP4M-b nous avons la même quantité de substrat transformé (50%) que quand on incube Bmt1p pendant 48h en présence de son substrat accepteur α -1,2 tétramannosidique (DP4M).

L'obtention d'une protéine bien concentrée grâce à l'optimisation des méthodes de purification permettra d'avoir des cristaux et de résoudre la structure tridimensionnelle de Bmt3p.

PARTIE C

Investigation de l'activité CaBmt7, une β -mannosyltransférase putative

1. Introduction

Les travaux de Mille et ses collaborateurs ont permis de mettre en évidence 9 gènes chez *C. albicans* codant pour des Beta-1,2 mannosyltransférases (CaBmt1 à 9) putatives. Actuellement, seules les activités de CaBmt1 à 6 ont été identifiées par des travaux de génétique inverse (Mille *et al*, 2008 et 2012). Les fonctions des CaBmt7 à 9 demeurent inconnues car, en plus du PPM et du PLM, d'autres composés de la paroi de *C. albicans* peuvent être β -mannosylés en particulier les mannoprotéines qui peuvent être soit solubles, soit liées aux β -1,6 ou aux β -1,3 Glucanes (Fradin *et al*, 2008).

Le gène CaBMT7 se situe sur le chromosome N°3 au niveau de la phase ouverte de lecture (ORF ; Open Reading Frame) 19.342. La séquence complète de CaBMT7 est disponible dans la banque de données (<http://www.candidagenome.org/>); elle code pour une enzyme Golgienne de 652 acides aminés. Une étude récente a montré que l'inactivation des gènes CaBMT7 à 9 n'a pas d'effet sur la structure du PLM ce qui suggère que les enzymes correspondantes n'interviennent pas dans la β -mannosylation de la partie glycanique du PLM (Mille *et al*, 2012). L'alignement de séquence réalisé entre les enzymes CaBmt7, CaBmt3 et CaBmt1 montre que CaBmt7 et CaBmt3 présentent 48% d'identité de séquence, et que CaBmt7 et CaBmt1 présentent 44% d'identité de séquence.

C'est dans ce contexte que nous nous sommes intéressés à la détermination de l'activité de CaBmt7 dans la biosynthèse des PPMs et/ou d'autres composés de la paroi de *C. albicans*.

2. Stratégie expérimentale

Dans un premier temps, nous avons recherché l'implication de CaBmt7 dans la biosynthèse des PPMs de *C. albicans* par une approche purement structurale. En effet, nous avons purifié d'une part, les PPMs de souche de *C. albicans* déficiente dans la synthèse de CaBmt7 et d'autre part les PPMs d'une souche sauvage de *C. albicans* utilisée comme référence (SC5314). Ces PPMs nous ont été fournis par l'équipe du Pr. Poulain (*Candida* et Candidoses, Inserm U995, Lille2) et sont présents dans les surnageants d'autoclave des souches Δ BMT7 et SC5314. Au préalable à l'étape de purification, nous avons dialysé ces surnageants puis nous avons vérifié la masse moléculaire apparente des composés présents

par analyse SDS-PAGE. A cette étape, nous avons pu mettre en évidence la présence de dérivés glycosylés supplémentaires spécifiques des souches Δ BMT7, que nous avons isolés par la suite après fractionnement par chromatographie sur colonne de Sephacryl S300. Afin de comparer séparément la structure des parties acido-stable et acido-labile des deux PPMs nous avons procédé à une hydrolyse acide ménagée puis à un fractionnement par chromatographie de gel filtration sur Bio-gel P6. Ainsi, les parties acido-stables ont été analysées par RMN ; les parties acido-labiles ont été analysées par chromatographie sur couche mince et MALDI-TOF, et leur analyse par RMN est en cours. Les analyses des dérivés glycosylés spécifiques de Δ BMT7 (SDS-PAGE, spectrométrie de masse et RMN) sont également en cours. La stratégie suivie lors de cette étude est détaillée dans la **figure 43**.

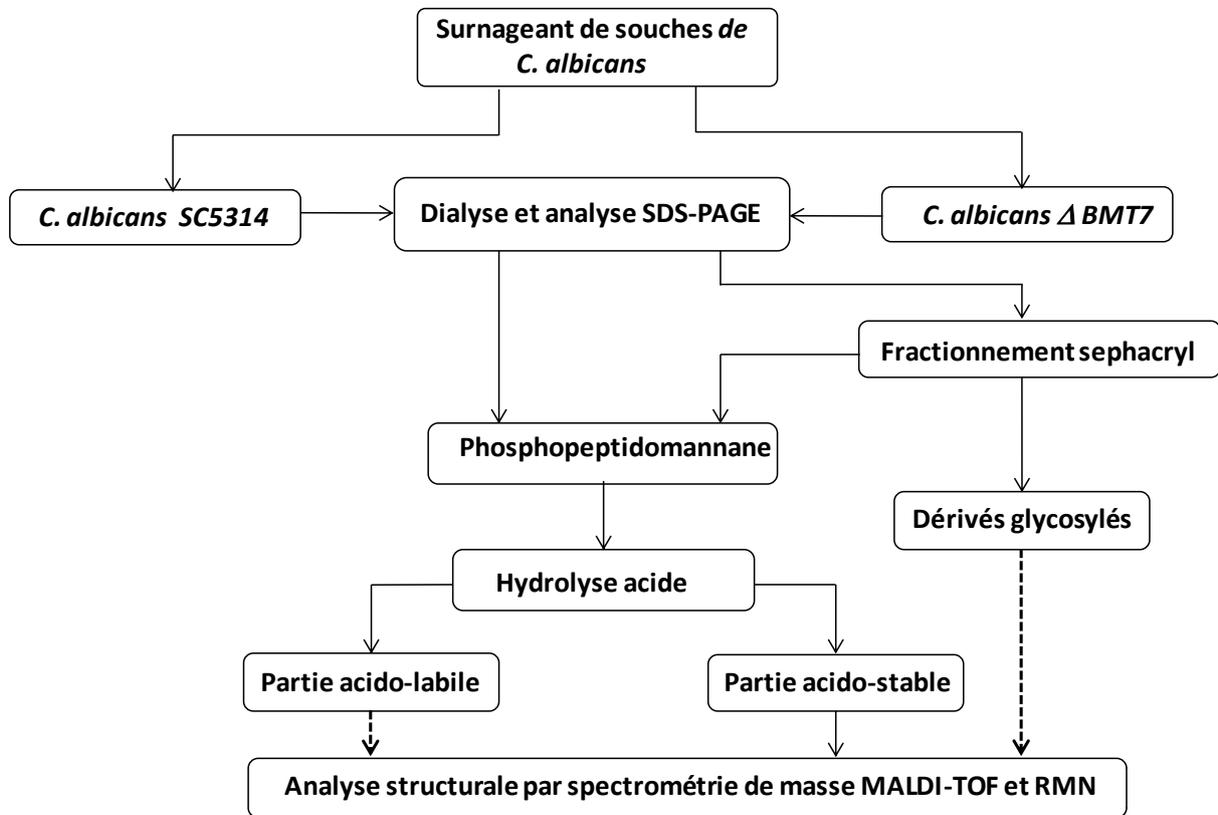


Figure 43 : Stratégie expérimentale suivie lors de l'étude du rôle de CaBmt7.

3. Analyse des PPMs par SDS-PAGE

Avant de procéder aux étapes d'hydrolyse acide et de purification, les surnageants d'autoclave de la souche Δ BMT7 et de la souche de référence SC5314 de *C. albicans* contenant les PPMs ont été dialysés pendant 48h à 4°C, puis analysés par SDS-PAGE, en déposant en parallèle pour comparaison les PPMs des souches Δ BMT1 et Δ BMT3 de *C. albicans* (utilisés respectivement dans les parties A et B des résultats pour la préparation des substrats naturels). Les gels ont été colorés au réactif de Schiff qui permet de mettre en évidence les parties glycaniques (aldéhydes). Les résultats obtenus ont permis d'une part d'avoir une estimation de la taille des différents PPMs et d'autre part de mettre en évidence la présence de dérivés glycosylés de faible poids moléculaire (<25KDa) principalement dans les souches de *C. albicans* déficientes dans la synthèse de CaBmt7 (**Figure 44 bandes dans le cadre 9**). En effet les PPMs de la souche de référence SC5314 cultivée à 28°C (ligne 2) et à 37°C (ligne 3) sont de haut poids moléculaire >250KDa. Les PPMs de la souche Δ BMT7 cultivée à 37°C (ligne 4) sont plus hétérogènes en terme de taille par rapport aux PPMs de Δ BMT7 cultivée à 28°C (ligne 5) et aux PPMs de la souche SC5314 cultivée à 28°C (ligne 2) ou à 37°C (ligne 3).

Les PPMs de la souche Δ BMT3 cultivée à 28°C (ligne 6) et les PPMs de la souche Δ BMT1 cultivée à 28°C (ligne 7) ou à 37°C (ligne 8) sont majoritairement de haut poids moléculaire >250KDa, néanmoins nous avons constaté la présence de composés glycosylés de tailles variables entre 250KDa et 37 KDa dans les souches de *C. albicans* Δ BMT1, Δ BMT3 et Δ BMT7 (**Figure 44**).

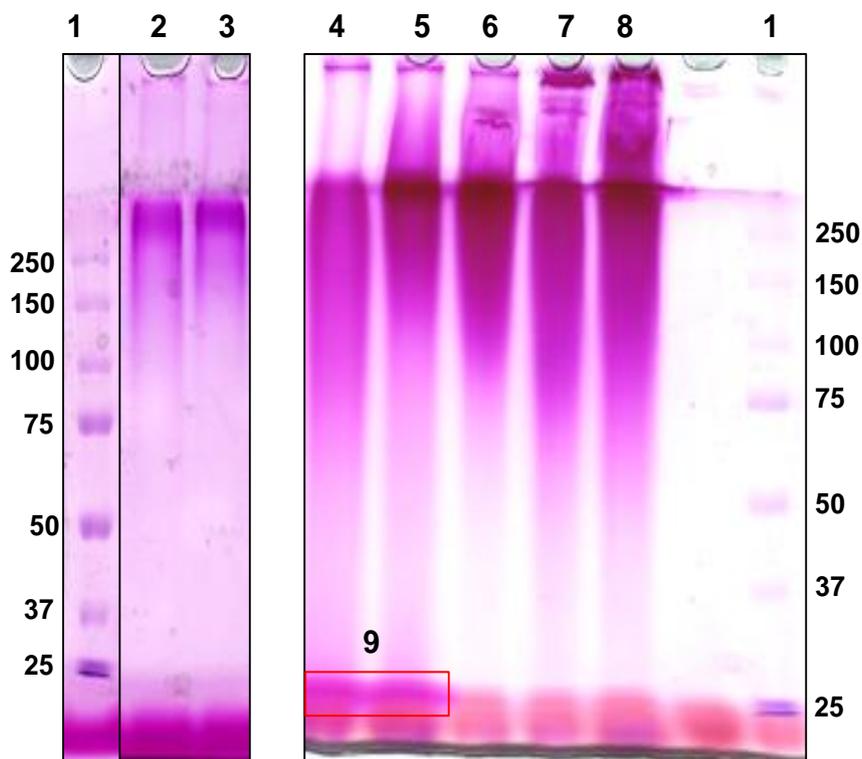


Figure 44 : Analyse des PPMs par SDS-PAGE. 1 ; témoin de masse, 2 ; PPM SC5314 T28°C, 3 ; PPM SC5314 T37°C, 4 ; PPM Δ BMT7 T37°C, 5 ; PPM Δ BMT7 T28°C, 6 ; PPM Δ BMT3 T28°C, 7 ; PPM Δ BMT1 T28°C, 8 ; PPM Δ BMT1 T37°C, 9 ; dérivés glycosylés propres aux souches de *C. albicans* Δ BMT7.

Pour la suite de ce travail, nous avons choisi dans un premier temps de comparer la structure des PPMs de souche Δ BMT7 cultivée à T37°C avec la structure des PPMs de souche SC5314 cultivée à T37°C. Au préalable, nous avons isolé la partie correspondante aux dérivés glycosylés particuliers par fractionnement sur Séphacryl S300.

4. Purification et fractionnement des PPMs

La séparation des parties acido-stable et acido-labile des PPMs a été réalisée par chromatographie sur Bio-gel P6 après avoir effectué une hydrolyse acide. A titre d'exemple, la **figure 45** représente l'analyse par CCM des parties acido-stable et acido-labile des PPMs issus de la souche de référence SC5314.

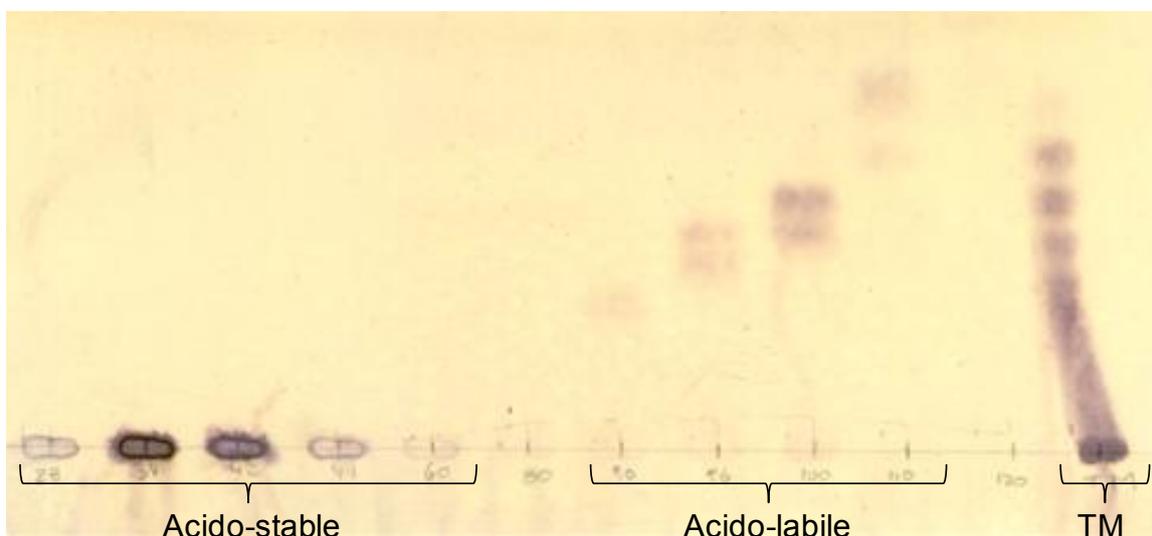


Figure 45 : Analyse par CCM du fractionnement des parties acido-stable et acido-labile issues des PPMs de la souche de référence de *C. albicans* SC5314 cultivée à 37°C. La migration a été effectuée dans un solvant composé d'un mélange de n-butanol/acide acétique/eau (2 : 1 : 1,5). La révélation a été réalisée par pulvérisation d'orcinol sulfurique suivie du séchage de la CCM pendant 5 minutes à 110°C. Le témoin de migration (TM) déposé est le glucidex 12, il comporte des saccharides de degré de polymérisation (DP) différents allant de DP 1 à 12.

Nous avons obtenu le même profil en CCM pour la souche Δ BMT7, c'est-à-dire une fraction acido-stable de haut poids moléculaire qui ne migre pas sur CCM et une fraction acido-labile contenant des oligomannosides de faible poids moléculaire qui migre sur CCM. Ainsi les fractions acido-stable et acido-labile de chacune des souches ont été récupérées pour l'analyse structurale

5. Comparaison de la structure des PPMs

5.1. Parties acido-labiles

5.1.1. Par chromatographie sur couche mince

Les parties acido-labiles issues des PPMs de souche Δ BMT7 T37°C (2) et des PPMs de la souche de référence de *C. albicans* SC5314 (3) ont été analysées dans un premier temps

par chromatographie sur couche mince (**Figure 46**). Ainsi une estimation des degrés de polymérisation des deux fractions est effectuée ; elles sont composées majoritairement d'oligomannosides de DP<10.

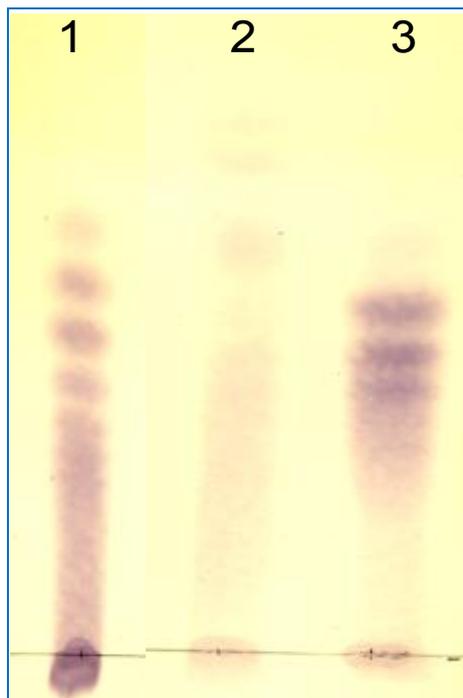


Figure 46 : Comparaison du profil des parties acido-labiles issues des PPMs Δ BMT7 (2) et des PPMs de *C. albicans* SC5314 (3) par chromatographie sur couche mince. 1 ; TM : témoin de taille (Glucidex 12). Pour les conditions de migration, révélation voir la figure 45)

5.1.2. Par spectrométrie de masse MALDI-TOF

Chaque fraction précédemment analysée par CCM est analysée en spectrométrie de masse MALDI-TOF en mode positif (matrice DHB). Les résultats obtenus ont permis de confirmer le degré de polymérisation de la partie acido-labile issue des PPMs de la souche Δ BMT7 ; il varie de DP2 à DP7, les ions majoritaires sont détectés sous la forme $[M+Na]^+$ (**Figure 47**). Néanmoins en raison de la présence de contaminant dans la partie acido-labile issue des PPMs de la souche SC5314, les analyses MALDI-TOF ne nous ont pas permis pour l'instant de confirmer son degré de polymérisation. Une étape de dessalage par chromatographie sur Biogel P2 sera effectuée afin d'éliminer les contaminants. Les analyses en spectrométrie de masse et RMN devront alors nous permettre de comparer la taille et la structure des parties acido-labiles des deux souches.

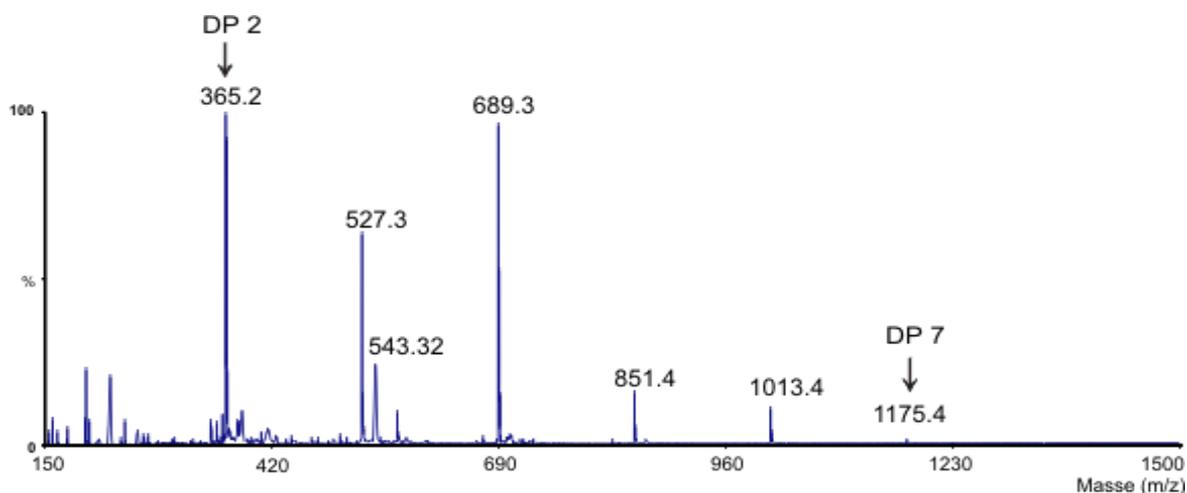


Figure 47 : Analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF de la fraction acido-labile issue des PPMs de la souche Δ BMT7 de *C. albicans* cultivée à 37°C.

5.2. Parties acido-stables (étude par résonance magnétique nucléaire)

Les parties acido-stables des PPMs des souches SC5314 et Δ BMT7 ont été analysées par RMN, nous avons pu alors réaliser des expériences RMN homo-nucléaires et hétéro-nucléaire. La comparaison des régions anomériques des spectres $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQC montre une composition similaire entre les parties acido-stables des PPMs des deux souches (**Figure 48**). En effet, par comparaison avec des travaux antérieurs (**Shibata *et al*, 1993** ; **Maes *et al*, 2009**), nous avons identifié d'une part des signaux correspondant aux déplacements chimiques des protons et des carbones anomères des résidus β -Man ; H1/C1 (δ 4.76-4.98/ 99.6-102.9 ppm), d'autre part la présence de résidus mannose liés en α -1,6 correspondant à la chaîne principale du PPM H1/C1 (δ 5.05/104 ppm). Nous avons également constaté la présence de mannoses liés en α -1,2 H1/C1 (δ 5.35-5.25/102 ppm) et en α -1,3 (δ 5.36/102 ppm) correspondant aux chaînes latérales des PPMs.

L'ensemble de ces résultats montre que la partie acido-stable des deux PPMs présente une structure globale similaire. En effet, cela pourrait s'expliquer par le fait que CaBmt7 n'intervienne pas dans la β -mannosylation de la partie acido-stable des PPMs de *C. albicans*.

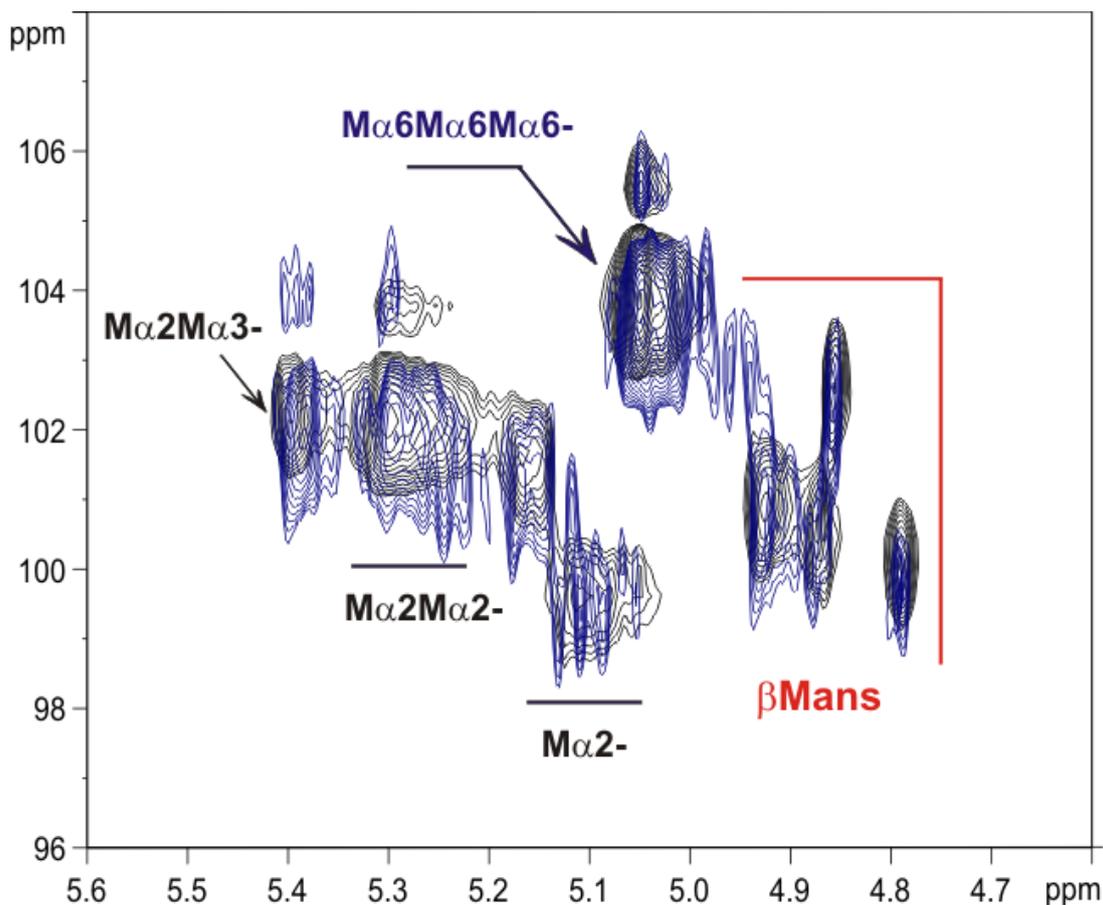


Figure 48 : Analyse RMN des parties acido-stables purifiées des PPMs des souches de *C. albicans* ΔBMT7 cultivée à 37°C (bleu) et SC5314 (noir) ; Région anomérique $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQC. (Les expériences ont été effectuées à 300°K dans le D2O en utilisant l'acétone comme standard interne).

6. Conclusion et perspectives de cette étude préliminaire

L'analyse des surnageants d'autoclave des souches de *C. albicans* ΔBMT7 et SC5314 a permis de mettre en évidence une partie acido-stable et une partie acido-labile propres aux PPMs des deux souches mais également la présence de profils glycaniques différents entre les deux souches.

L'analyse de la partie acido-stable provenant de la souche de *C. albicans* ΔBMT7 par RMN a montré une structure globale similaire à la partie acido-stable de la souche de référence, ce qui suggère donc que l'absence de CaBmt7 ne provoquerait pas des changements majeurs de β -mannosylation dans la partie acido-stable des PPMs. Néanmoins

nous avons constaté une hétérogénéité dans les PPMs de la souche de *C. albicans* Δ BMT7 en SDS-PAGE ce qui pourrait s'expliquer soit par des différences de taille au niveau des parties acido-labiles ou par la présence de dérivés glycosylés de taille variable.

Par ailleurs, les résultats préliminaires d'analyse des parties acido-labiles de ces PPMs ont mis en évidence la présence d'oligomannosides de tailles variables (DP2 à DP7) dans la souche de *C. albicans* Δ BMT7. Il serait alors intéressant de poursuivre cette comparaison, après dessalage par chromatographie sur Biogel P2 de la partie acido-labile du PPM de *C. albicans* SC5314, notamment par une analyse structurale en spectrométrie de masse et RMN.

En deuxième lieu, l'identification de la structure des dérivés glycosylés propres aux souches Δ BMT7 de *C. albicans* est envisagée. La stratégie qui sera utilisée consistera en l'utilisation d'enzymes tels que la PNGase afin de pouvoir libérer les parties N-glycaniques qui seront ensuite analysées par spectrométrie de masse MALDI-TOF. L'origine de ces dérivés glycosylés de faible taille par rapport aux PPMs reste à élucider.

Il serait également intéressant d'étudier la structure des PPMs de souche de *C. albicans* présentant une double ou une triple mutation tels que (Δ BMT7 et Δ BMT8), (Δ BMT7 et Δ BMT8, Δ BMT9) afin de pouvoir évaluer l'implication de ces enzymes dans la β -mannosylation du PPM ou la biosynthèse des glycoconjugués pariétaux de *C. albicans*. A terme ces travaux contribueront à déterminer le rôle de CaBmt7.

Discussion Générale et perspectives

Discussion générale et perspectives

Les glycoconjugués de la paroi des levures pathogènes du genre *Candida*, en particulier les phosphopeptidomannanes (PPM) et les phospholipomannanes (PLM) jouent un rôle crucial dans l'interaction hôte-pathogène et dans les mécanismes de virulence. *C. albicans* représente l'espèce la plus pathogène du genre *Candida*, elle est responsable d'environ la moitié des candidoses invasives avec un taux de mortalité de 40%. La spécificité structurale de ces glycoconjugués pariétaux réside dans la présence de β -1,2 mannosides terminaux considérés comme des facteurs de virulence des espèces les plus pathogènes du genre *Candida*. De plus cette glycosylation terminale est assez rare dans le monde vivant. Les β -1,2 mannosides sont reconnus par la galectine-3, le TLR2 et la Dectin-1, les réactions qui en découlent peuvent aller de la production de cytokines (TNF α) à la production d'anticorps protecteurs (Jouault *et al*, 2003 ; Jouault *et al*, 2006 ; Fradin *et al*, 2014). Par ailleurs, d'autres travaux ont montré que les β -1,2 mannosides jouent un rôle dans l'adhérence aux cellules épithéliales ce qui favorise ainsi la colonisation de différents sites anatomiques tels que la muqueuse intestinale par les levures du genre *Candida* et donc la survenue des infections fongiques invasives (Miyakawa *et al*, 1992 ; Jawhara *et al*, 2008). Bien que la présence des β -1,2 mannosides chez *C. albicans* ait été identifiée dans les années 80 grâce aux travaux de Shibata et de ses collaborateurs (Shibata *et al*, 1985), leurs voies de biosynthèse étaient jusqu'à récemment mal définies.

Les gènes (CaBMT1-9), codant pour des beta-1,2 mannosyltransférases (CaBmts), ont été identifiés en 2008 chez *C. albicans* (Mille *et al*, 2008). Cette nouvelle famille d'enzymes qui ne semble appartenir à aucune famille structurale de glycosyltransférases identifiées à ce jour a été classée récemment dans la famille GT-91 de la banque de données CAZy. Dans ce contexte, les travaux de cette thèse avaient pour objectif la compréhension des voies de biosynthèse des β -1,2 mannosides de *C. albicans* par la caractérisation individuelle des activités enzymatiques *in vitro* des CaBmt1 et CaBmt3 responsables respectivement de l'initiation et de l'élongation de la β -mannosylation sur le phosphopeptidomannane de *C. albicans*.

Dans un premier temps, nous avons mis au point et optimisé les méthodes d'extraction et de purification des substrats potentiels afin d'avoir des composés purs et en quantité suffisante pour permettre leur caractérisation structurale. Les produits de départ qui ont servi à nos expériences sont constitués des PPMs de *S. cerevisiae* et de différentes souches de *C. albicans*. Ainsi, durant cette étape nous avons obtenu un panel important de substrats de nature oligomannosidique. La structure de ces substrats potentiels a été caractérisée grâce à l'utilisation de méthodes analytiques comprenant la spectrométrie de masse en mode MALDI-TOF et la résonance magnétique nucléaire (RMN).

Les études structurales ont permis de mettre en évidence deux familles d'oligomannosides issus de ces PPMs : neutres et phosphatés. Nous nous sommes particulièrement intéressés aux oligomannosides neutres car le protocole de couplage à un fluorophore (la 2-Aminopyridine) est déjà maîtrisé au sein de notre équipe. Ainsi, nous avons décidé de coupler ces oligomannosides neutres à la 2-Aminopyridine afin d'analyser les tests d'activité enzymatique et de suivre les produits formés par chromatographie liquide haute performance (HPLC) avec détection en fluorimétrie.

Nos résultats ont permis d'établir la structure exacte d'un panel important de substrats accepteurs, qui diffèrent essentiellement par leur degré de polymérisation, leurs substitutions ainsi que l'anométrie de liaison. En effet, nos analyses RMN ont permis de mettre en évidence d'une part les liaisons entre les résidus de mannoses de type α 1,2, α 1,3 et α 1,6 correspondant respectivement aux chaînes latérales et à la chaîne linéaire de base des PPMs, et d'autre part la présence de β -1,2-mannosides de degré de polymérisation de 2 à 8 issus de la partie acido-labile du PPM de souche de *C. albicans* déficiente en CaBmt1, connue sous le nom de l'antigène 5 (**Shibata et al, 1992**). De plus, nous avons constaté que les substrats issus de la partie acido-stable des PPMs de souche de *C. albicans* déficiente en CaBmt1 contiennent notamment des chaînes d' α -mannosides linéaires et se terminant préférentiellement par des mannoses liés en α -1,2, ce qui correspond à l'équivalent des substrats endogènes de CaBmt1. Par ailleurs les substrats issus des PPMs de *Saccharomyces cerevisiae* sont majoritairement de structure branchée et se terminent notamment par des mannoses liés en α -1,3.

Les conditions des tests d'activité enzymatique ont été optimisées à partir de nombreux protocoles déjà publiés qui semblent convenir à l'activité enzymatique des β -

mannosyltransférases de *C. albicans* provenant des microsomes (**Suzuki et al, 1995 ; Goto et Okawa, 2008 ; Goto et al, 2009**)

Les essais enzymatiques réalisés avec l'enzyme Bmt1p : forme recombinante de CaBmt1 produite au laboratoire sous forme soluble chez *Pichia pastoris*, en présence de l'ensemble des substrats neutres décrits dans le chapitre 1 de la partie A des résultats, ont permis de mettre en évidence une activité β -1,2 mannosyltransférasique de Bmt1p *in vitro* et de déterminer sa spécificité du substrat. Afin de compléter la caractérisation de l'activité de Bmt1p, cette enzyme a été testée en présence de substrats synthétiques couplés à un autre fluorophore (le mantyl) préparés par l'équipe du Dr. Mallet (**Article N°1** mis en annexe).

Par ailleurs, nous avons mis au point un protocole d'isolement, de purification et de caractérisation, notamment par spectrométrie de masse et RMN, des produits formés par l'action de Bmt1p sur l'un de ces substrats synthétiques, ce qui nous a permis ainsi de confirmer l'activité β -1,2 mannosyltransférasique de l'enzyme étudiée. Ainsi, nous avons démontré dans un premier temps que Bmt1p était capable *in vitro* de transférer successivement deux résidus de mannose en β -1,2 sur un tri-ou tétramannoside lié en α -1,2 et que la présence d'un mannose terminal lié en α -1,3 sur le substrat accepteur ne favorise pas l'action de Bmt1p. **Article N°2** (caractérisation de Bmt1p, *Biochem. J.* 2014).

Dans la seconde partie de l'étude, nous nous sommes intéressés à la caractérisation de l'activité de CaBmt3, enzyme impliquée dans l'élongation des β -Mans du PPM. Dans ce contexte, une forme recombinante de CaBmt3 nommée Bmt3p a été produite au laboratoire sous forme soluble chez *Pichia pastoris*. Cette enzyme a été testée en présence des substrats synthétiques couplés au fluorophore mantyl ainsi que des substrats oligomannosidiques extraits des PPM de *S. cerevisiae* et de souche de *C. albicans* déficiente en CaBmt1 couplés à la 2-aminopyridine, afin de déterminer sa spécificité. Les résultats obtenus montrent que Bmt3p transfère *in vitro* un seul résidu mannose en β -1,2 sur un tétramannoside constitué d'une chaîne en α -1,2 avec un mannose terminal lié en β -1,2.

D'autre part, nous avons déterminé les conditions optimales d'activité des deux enzymes Bmt1p et Bmt3p *in vitro*. Nos résultats montrent que ces deux enzymes présentent une activité maximale dans la zone de pH6-7 et à 28°C, ce qui est en accord avec les conditions optimales des β -1,2-mannosyltransférases de *C. albicans* et de *C. guilliermondii* provenant des microsomes (**Suzuki et al, 1997 ; Goto et Okawa, 2008 ; Goto et al, 2009**).

Nous avons également étudié l'activité enzymatique couplée Bmt1p/Bmt3p *in vitro* en faisant agir les deux enzymes soit séquentiellement, soit simultanément sur le substrat mantylé DP3M-a pour former les produits DP4M-a et DP5M-a. Le produit formé DP4M-a doit théoriquement pouvoir servir de substrat pour Bmt3p. C'est ce que nous avons constaté c'est-à-dire la disparition du DP4M-a et l'accumulation du DP5M-a, dont nous avons établi la structure (**Article N°3**). L'ensemble de ces résultats nous ont permis alors de constater que l'action catalytique de Bmt3p est plus rapide par rapport à celle de Bmt1p, cela peut s'expliquer par l'absence du segment hydrophobe qui se situe au niveau du domaine catalytique du côté C-terminal chez Bmt1p. Ce dernier a été décrit uniquement pour CaBmt1 et CaBmt2 enzymes d'initiation de la β -mannosylation sur les parties acido-stable et acido-labile des PPMs. L'absence de ce domaine hydrophobe favorise le bon repliement de Bmt3p et donc permettrait d'éviter les problèmes de solubilité, de précipitation et d'agrégation rencontrés lors de l'étude de Bmt1p. Contrairement à Bmt1p, l'activité enzymatique de Bmt3p n'est pas inhibée en présence du NiCl₂, de plus cette dernière conserve son activité enzymatique après purification sur colonne de Nickel ce qui n'était pas le cas pour Bmt1p.

Dans la troisième partie, nous avons entrepris la détermination du rôle de CaBmt7 qui est une β -mannosyltransférase de *C. albicans* dont la fonction demeure inconnue, par une approche purement structurale (spectrométrie de masse et RMN). En effet, nous avons purifié des fractions issues de l'hydrolyse acide des PPMs de souche de *C. albicans* déficiente dans la synthèse de CaBmt7 et d'une souche sauvage utilisée comme référence (SC5314). Les résultats obtenus ont montré que les parties acido-stables des PPMs des deux souches présentent une structure globale similaire, identique à celle décrite précédemment par les travaux de Maes et de ses collaborateurs sur la souche BWP17 de *C. albicans* (**Maes et al, 2009**). D'autre part, nous avons observé la présence de profils glycaniques différents entre les deux souches. La comparaison des parties acido-labiles des deux souches ainsi que la mise en évidence de la structure des composés glycosylés propres à la souche Δ BMT7 de *C. albicans* sont envisagées. Ces travaux contribueront à déterminer le rôle de CaBmt7.

Les perspectives offertes par cette étude sont multiples. En premier lieu, la détermination des paramètres cinétiques de Bmt3p pourra être envisagée car il s'agit d'une enzyme active qui forme un seul produit, si les quantités de substrat de synthèse DP4M-b disponibles sont suffisantes.

En deuxième lieu, l'étude de l'effet de composés analogues aux substrats potentiels de Bmt1p et de Bmt3p est prévue. Les premiers composés qui peuvent être testés sont de nature iminosucres ou dendrimères. Il serait alors intéressant de disposer de molécules qui peuvent présenter un effet inhibiteur ou activateur sur Bmt1p et Bmt3p afin de pouvoir moduler l'activité β -1,2mannosyltransférase de ces enzymes impliquées dans la biosynthèse des glycoconjugués pariétaux de *C. albicans*.

Par ailleurs, de nouvelles formes recombinantes de Bmt3p ont été produites au laboratoire chez *E. coli* en présence d'un tag 6xHis dans le but d'améliorer le rendement de la purification pour la réalisation des études cristallographiques. En effet nous avons décidé de dissocier la partie caractérisation de l'activité enzymatique de Bmt3p qui a été réalisée en présence d'une enzyme recombinante produite chez *P. pastoris* et la partie cristallographie. Les études cristallographiques vont permettre de résoudre la structure tridimensionnelle de Bmt3p, afin d'une part de mettre en évidence le type de repliement adopté par Bmt3p, et d'autre part de comprendre son mécanisme catalytique. De plus, la réalisation des études de mutagenèse dirigée est envisagée au sein de notre équipe afin de pouvoir identifier les acides aminés impliqués dans le mécanisme catalytique.

Comme le rôle de CaBmt7 demeure inconnu, les travaux en cours doivent être poursuivis. Pour mener à bien cette étude, il nous faudra tout d'abord poursuivre les analyses structurales afin de caractériser les fractions glycaniques spécifiques de la souche de *C. albicans* déficiente dans la synthèse de CaBmt7.

Dans la continuité de ces travaux, il serait également intéressant d'étudier des substrats glycolipidiques pour la caractérisation des CaBmts 5 et 6 impliquées dans la β -mannosylation du phospholipomannane (PLM) (Mille *et al*, 2012). En effet, la structure du PLM a été caractérisée grâce à des travaux antérieurs en collaboration avec notre équipe (Trinel *et al*, 2002 ; Trinel *et al*, 2005). Pour mener à bien cette étude, nous allons essayer d'adapter, pour les glycolipides de *C. albicans*, un protocole développé au sein de notre équipe pour les glycolipides de *Mycobacterium marinum* (Rombouts, *et al* 2009). Une fois purifiés, la structure de ces glycolipides fongiques provenant de diverses souches de *C. albicans* sera caractérisée par spectrométrie de masse et par RMN.

En conclusion, ces travaux de thèse ont permis une meilleure compréhension de la spécificité et de la séquence d'action des CaBmt1 et CaBmt3 dans les voies de biosynthèse

des β -mannosides de *C. albicans*, notamment par la caractérisation structurale des produits formés et l'identification du substrat accepteur minimal reconnu par les enzymes recombinantes Bmt1p et Bmt3p. La stratégie utilisée dans ce travail présente principalement deux intérêts : un intérêt fondamental qui consiste en la compréhension des mécanismes d'action des CaBmts ainsi que des voies de biosynthèse des beta-mannosides pariétaux, et d'autre part un intérêt médical pour l'élaboration à terme de nouvelles drogues anti-fongiques ciblant la synthèse de la paroi. En effet, la paroi de *C. albicans* présente une composition complexe, la connaissance de la biosynthèse de ses glycoconjugués polymannosylés s'avère particulièrement importante.

Annexe

Mantyl tagged oligo α (1-> 2) mannosides as *Candida albicans* β -mannosyltransferases substrates: a comparison between synthetic strategies

Marilyne Pourcelot¹, Laurent Cattiaux¹, **Ghenima Sfihi-Loualia**^{2,3}, Emeline Fabre^{2,3}, Frédéric Krzewinski^{2,3}, Chantal Fradin⁴, Daniel Poulain⁴, Florence Delplace^{2,3}, Yann Guérardel^{2,3}, Jean-Maurice Mallet^{1*}

1. Laboratoire des biomolécules UMR7203, Université Pierre et Marie Curie, Ecole Normale Supérieure, 24 rue Lhomond, 75005 Paris, France. Jean-Maurice.Mallet@ens.fr, Tel 33 1 44 32 33 90

2. Université Lille1, Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, UGSF, F-59650 Villeneuve d'Ascq, France;

3 CNRS, UMR 8576, F-59650 Villeneuve d'Ascq, France.

4. Unité Inserm 995, Equipe Candida et candidoses, Université Lille Nord de France, CHRU de Lille Faculté de médecine pôle recherche, Lille 59045, France.

Fluorescent oligomannosides are important tools for the evaluation of mannosyl transferase activities and selectivities. In a project dealing with *Candida albicans* β mannosyl transferases, three mantyl tagged α 1->2 oligomannosides were prepared by different ways: using all ester strategy compatible with the presence of an azido group suitable for direct click chemistry; and alternatively using the more classic benzyl protecting groups. Although more elegant, the all ester strategy has shown important limitations: reduced reactivity of mannosyl donors, and 3->2 ester migration. Preliminary enzymatic studies have shown that the synthetic oligomannosides are efficient substrate of β -mannosyl transferases.

Introduction

Candida albicans is a major pathogen in nosocomial infections¹. Its pathogenicity is partially related to the β mannosyl residue contents of the cell wall² and thus to the β mannosyl transferases activities. Nine of them were identified³ and their substrates were primarily determined after structural analysis of different glycoconjugates (mannoproteins and glycolipids) purified from *C. albicans* mutants lacking one of the 9 genes coding for them. Studies that will refine the substrate specificities of the different β mannosyl transferases are required to better understand the role of these enzymes in *C. albicans* virulence. In this respect, fluorescent oligomannosidic substrates are valuable tools. A mantyl (N-methyl anthranilamide) fluorophore⁴ was selected here, although not very bright (ϵ (335nm)=2400; λ ex =335 nm, λ em =440 nm), it is small - one of the smallest fluorophore- and non-charged, and so not supposed to interfere with protein nor with enzyme activity. It is suitable for chromatography and mass spectroscopy characterisation⁵. Based on previous works, tri and tetrasaccharides have been selected as an optimal size for acceptors.

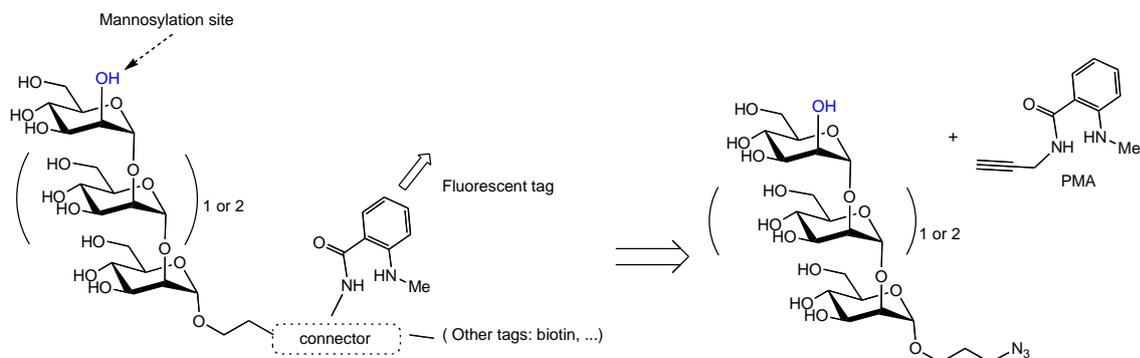


Figure 1: fluorescent β - mannosyl transferase acceptors

Target molecules are depicted on figure 1. Oligo α (1->2) mannosides ⁶ suitable to conjugation have been prepared by Nifantiev group ⁷ (as 2-aminoethyl or 3-aminopropyl aglycon protected during the synthesis as trifluoroacetamide) and by our group ⁸ (as 6-carboxyhexyl aglycon protected as a methyl ester).

In this paper, we chose more versatile connectors - an azido group on the oligosaccharide and an alkyne on the fluorophore. The main advantage on the strategy is the possibility to change 'at the last minute' the fluorophore, to change it into a biotin etc... and thus to gain access to a large panel of glycoconjugates. Click chemistry (CuAAA) is widely used for the preparation of bioconjugates ⁹, as it is fully compatible with many chemical functions and often give high yields with stoichiometric equivalent of reagent or small excess. In spite of this fact, the preparation of azido or alkynyl bearing large and complex oligosaccharides is not frequently used because of the incompatibility of these groups with protecting group manipulation, in particular with benzyl groups. As a solution to this important problem, C. Unverzagt group ¹⁰ recently proposed a promising oxidative de-O-benzylation (NaBrO_3 , $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) in a biphasic AcOEt: water reaction mixture, but this procedure needs to be exemplified further.

Results and Discussion

We want in this paper to describe fluorescent oligomannosides, to compare synthetic options and to present preliminary use as β mannosyl transferase substrates. We designed an all ester strategy for the construction of α 1->2 mannosides (OFmoc / OBenzoate) and we compare it with classical but less elegant OBenzyl/OBenzoate one. (scheme 1)

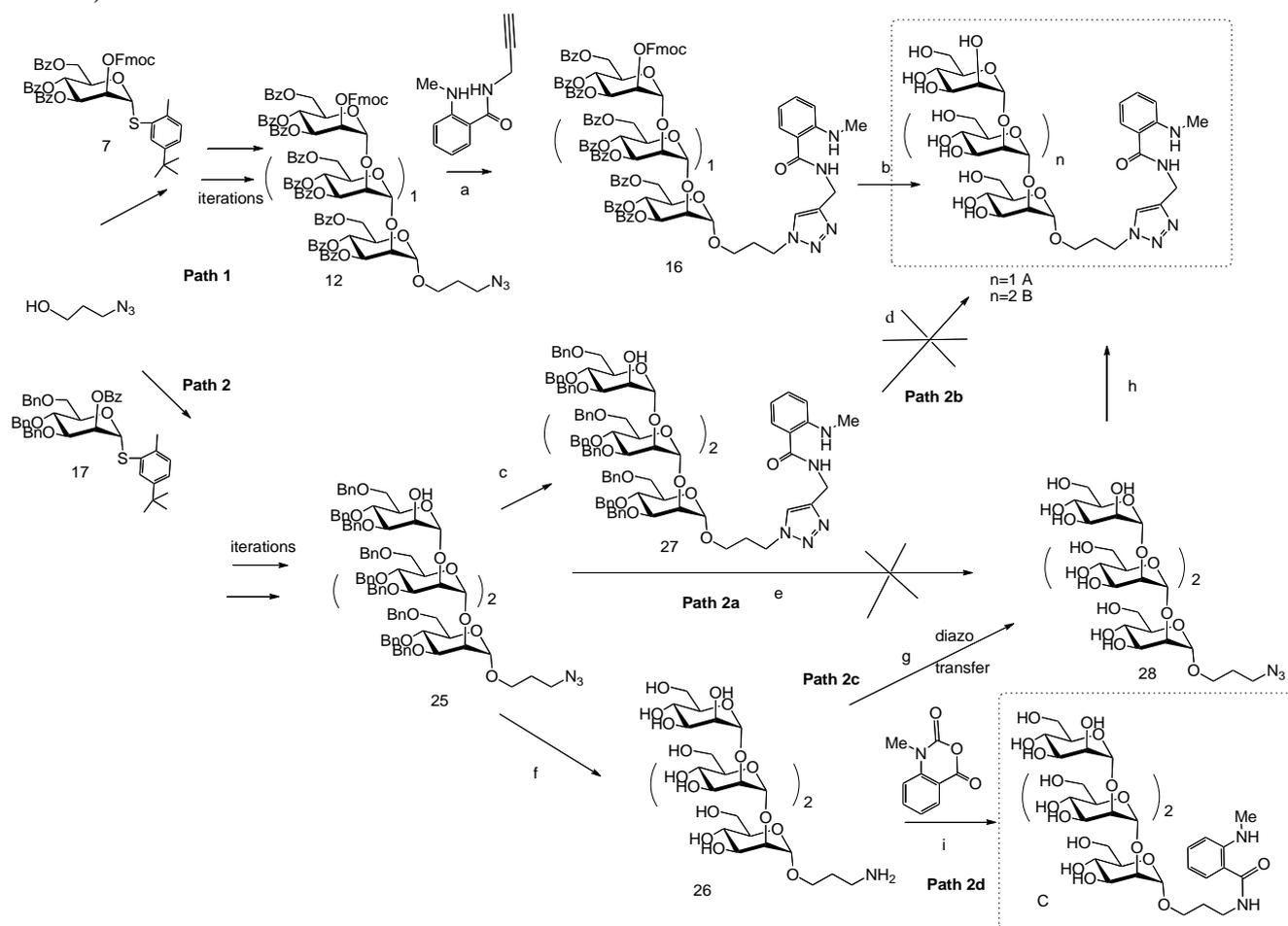
In the first one (path 1), ester and carbonate protected group were selected: their removals are compatible with the presence of an azido group. The 3-azidopropyl side arm was then clicked with a propargyl N-methylanthranilamide (PMA) ¹¹ to give fluorescent substrates. This can be done before or after deprotection of esters. Simplicity of these final steps is counterbalanced by difficulties in glycosylation reaction: disarmed donors, benzoate migrations.

In the second approach (path 2), benzyl groups were used as permanent protecting groups. This chemistry is well established in our group ⁸ but the 3-azidopropyl group is reduced to an

3-aminopropyl group during the classical hydrogen based debenzoylation step.

From benzylated / azido compounds, the four possibilities offered to us are (the first 3 solutions used click chemistry):

- * to use the Unverzagt oxidative debenzoylation protocol (path 2a).
- * to use click-chemistry to introduce the mantyl group before hydrogenolysis: at the contrary of an azido group, the triazole ring is known to be compatible with hydrogenolysis (path 2b).
- * to recover an azido group from the amino propyl aglycon by a treatment with a diazo transfer reagent: a new reagent (imidazole-1-sulfonyl azide)¹² have been described for this reaction on aminated carbohydrates in water (path 2c).
- * Finally to use the amino group by direct acylation with N-methylisatoic anhydride. (path 2d)

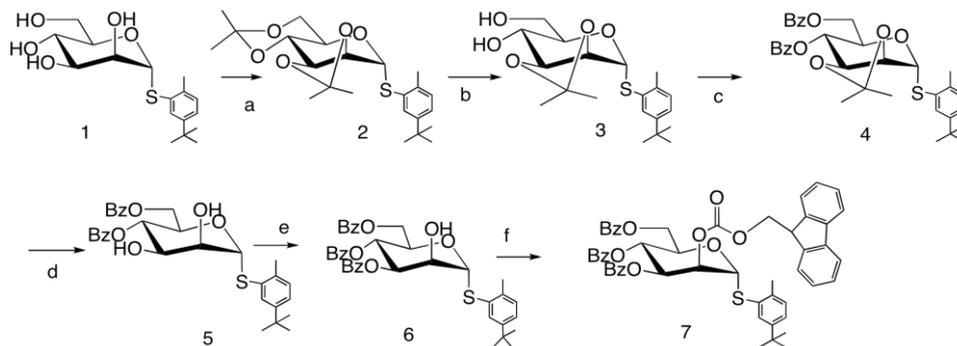


Scheme 1. Strategies and final steps: Reagents and conditions: a) CuSO_4 , Na Ascorbate, THF, water (75%). b) KOH MeOH (98%). c) PMA, CuSO_4 , Na Ascorbate, THF, water (66%). d) $\text{NaBrO}_3/\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 0% e) H_2 , Pd/C, aq. HCl, MeOH (0%). f) H_2 , Pd/C, aq. HCl, MeOH (100%). g) 1) imidazole sulfonylazide CuSO_4 2) Ac_2O , pyr, 3) MeONa, MeOH (overall 50%). h) PMA, CuSO_4 , Na Ascorbate, THF, water (B 60% from **28**). i) N-Methylisatoic anhydride, DMF then NaOH, aq MeOH.

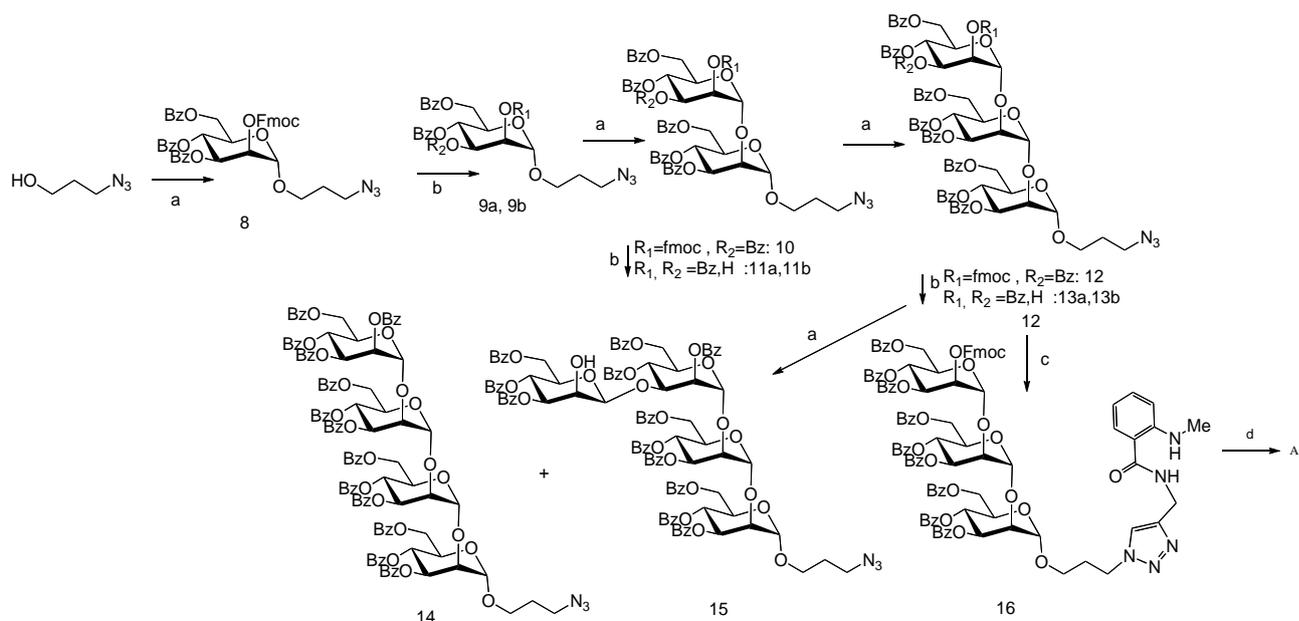
Oligosaccharides synthesis

Method A: Benzoate/fmoc route: Benzoates were selected as permanent protective groups, and various protecting ester were selected for position 2: Levulinate (Lev), monochloroacetate (MCA), fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) for the protection of position 2. Thiomannoside **1**¹³ (scheme 2) was prepared from the odourless thiol 5-*tert*-butyl-2-methyl-thiophenol and mannose peracetate. Using isopropylene manipulation¹⁴ and benzylation of positions 4 and 6, a key diol **5** was obtained. A benzoate is introduced at low temperature at position 3 to give **6**. The position 2 of **6** was then acylated with various acid derivatives and the resulting donors were challenged (NIS, TfOH) with azido propanol¹⁵. Two difficulties were found: the alcohol function at position 2 was found deactivated both for steric and electronic reason and thus difficult to acylate and secondly, the resulting donors were found disarmed and poorly reactive: Fmoc was found the best compromise for both criteria. Scheme 3 depicted the iterative synthetic sequence. Glycosylation using the donor **7** are efficient (80-90%), showing that Fmoc is a good participating group. However, despite important optimization efforts, partial migration of the 3-benzoate on position 2 was found impossible to avoid: the best system found was TBAF/ AcOH (fluorine ion acting as a base in a buffered system, see¹⁶). The two isomers of **9(a,b)** (ratio 5/1); **11(a,b)** (ratio 2/1) have to be separated before the following glycosylation. At the trisaccharide level, the two isomeric compounds **13(a,b)** were inseparable and at the next step, the 2 isomeric tetrasaccharides **14** and **15** was found also inseparable. So we decided to stop at the trimannoside level this approach: the trisaccharide **16**, originated from **12**, was used in conjugation reaction with propargyl N-methyl anthranilamide (PMA) to give **A** with a high yield. We next decided to evaluate for larger fragments the benzyl strategy.

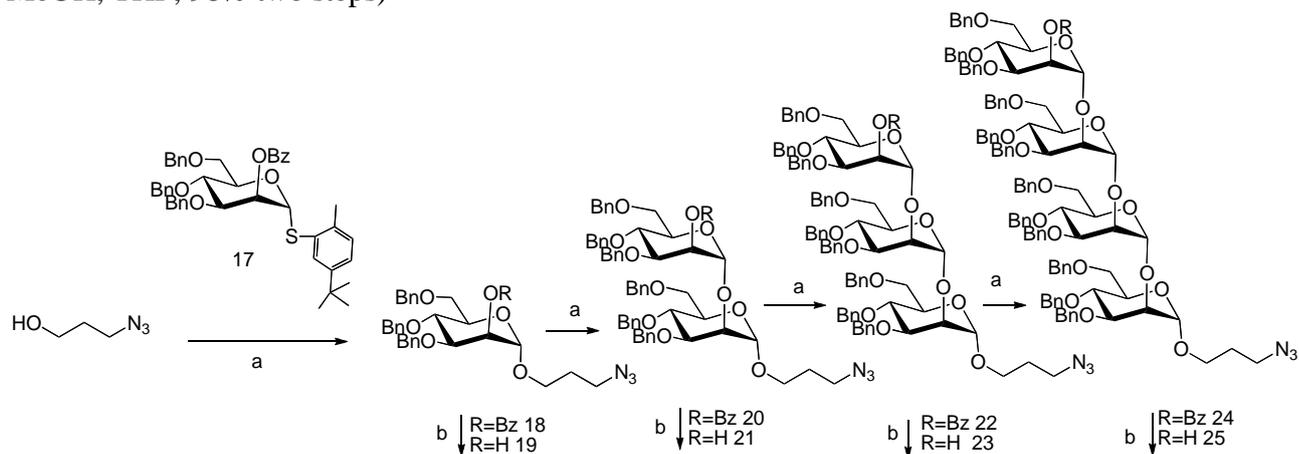
Method B: Benzyl /benzoate route: A known benzylated donor **17**¹⁷ was used and the synthesis was uneventful as depicted in scheme 4. Glycosylation/ transesterification sequence gave the tetrasaccharide with good yields. In particular, the deprotection of the position 2 was quantitative as no side reactions were observed.



Scheme 2: Reagent and conditions a) PTSA, 2,2-dimethoxypropane, acetone. b) PTSA, water/ acetone (57 % two steps). c) BzCl, pyr. d) PTSA, H₂O, (86% two steps). e) BzCl, Pyr, 0°C, 82%. f) FmocCl, pyr, CH₂Cl₂, 63 %



Scheme 3: Reagent and conditions: a) **7**, NIS, TfOH, CH₂Cl₂. **8**: 90%; **10** from **9a**: 77%; **12** from **11 a**: 91% (**14+15**) 87% b) TBAF, AcOH **9a/9b** 67 % ratio 5/1 **11a/11b**, 70% ratio 2/1; **13a/13b** 65% ratio 2/1. c) PMA, Na ascorbate, CuSO₄·5H₂O, THF, H₂O, 75% d) KOH, MeOH, THF, 98% two steps)



Scheme 4: Reagents and conditions: a) **17**, NIS, TfOH, CH₂Cl₂. **18**:85% **20**: 72% **22**: 74% **24**: 70% b) MeONa, MeOH **19**: 100%: **21** 100%. **23** 100%, **25**: 100%

Conjugation steps (scheme 1)

Final steps for the benzyl strategy are presented in scheme 1. Path 2a: the oxidative removal of 12 benzyl groups was tried without success on **25** with sodium bromate/ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ in a (ethyl acetate: water) heterogeneous system. In our hands, it led to complete degradation (no product was isolated from the acetylation (Ac_2O , Pyridine) of the reaction mixture). The main difference is that our final compounds, compare to those of Unverzagt, are highly water-soluble and probably over-oxidized as the oxidizing inorganic reagent are in the same phase (the aqueous layer).

Path 2b: The hydrogenolytic removal of benzyl groups (H_2 , Pd/C) on the mantylated compound **27** (prepared from **25**) failed: no reaction without acid and degradation products in acidic medium (aq HCl in MeOH).

Path 2d: **25** was deprotected through hydrogenolysis of the benzyl groups to give amino group bearing tetrasaccharide **26**,⁷ which was reacted with N methylisatoic anhydride in DMF to give the mantylated oligomannosides **C**.

Path 2c: Alternatively, **26** was reacted with a diazo transfer reagent to give **28**, isolated from the reaction mixture as its peracetylated form **29** (50 % two steps). **29** was deacetylated and submitted to a click mantylation to lead to **B** (30 % from **26**).

Spectroscopic characterization

Absorption / Emission spectra of the two types of mantyl tags (formed by direct acylation or linked by a triazole) are shown in fig 2 and are identical.

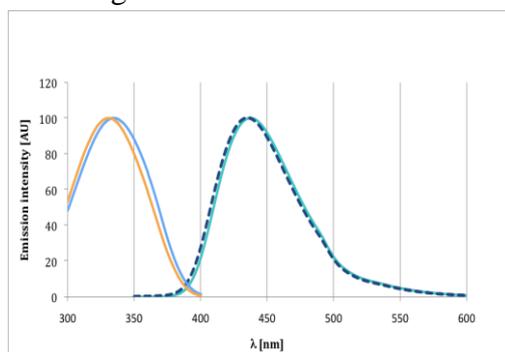


Figure 2: Normalized Absorption / Emission spectra of A and B (ex 335 nm)

Enzymatic evaluation

As example, compound **A** was used as acceptor-substrate in order to study the enzymatic properties of Bmt1p from *C. albicans*, a member of the recently identified β -mannosyl transferase family³. A recombinant soluble enzyme lacking the predicted N-terminal transmembrane domain was expressed as a secreted protein from the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. Details of the genetic construct and culture conditions will be published elsewhere¹⁸. GDP-Man was used as donor of mannosyl units.

The appearance of enzymatic products was assayed by normal-phase HPLC coupled to a fluorescence detector (NP-FL-HPLC). Figure 3 shows the NP-FL-HPLC profiles of the reaction mixture at four different incubation times between 0 and 48h. From 4 hours onward a

first reaction product identified by mass spectrometry ($[M+Na]^+$ at m/z 960.8) as a mantylated-tetrasaccharide (A DP+1) appeared. Then a second reaction product identified by mass spectrometry ($[M+Na]^+$ at m/z 1122.7) as a mantylated-pentasaccharide (A DP+2) clearly appeared from 20h and becomes prominent after 48h incubation time. This experiment established that the mantylated trimannoside was successfully used by the enzyme to give longer oligomannosides, adding one mannose and then a second mannose (DP +1 and DP +2). The non-reducing terminal mannoses residues are in β configuration as they are resistant to an exo α -mannosidase. In contrast, compound A was totally degraded to mantylated-mannose (A-DP2) after α -mannosidase (ManAse) digestion (Fig. 3). The areas integration of product signals (sum of DP +1 and DP +2) established that the enzyme activity was linear ($R^2 = 0.9912$) at least during the first 48h at 28°C. The fluorescent tag allows a simple analysis of the conjugates.

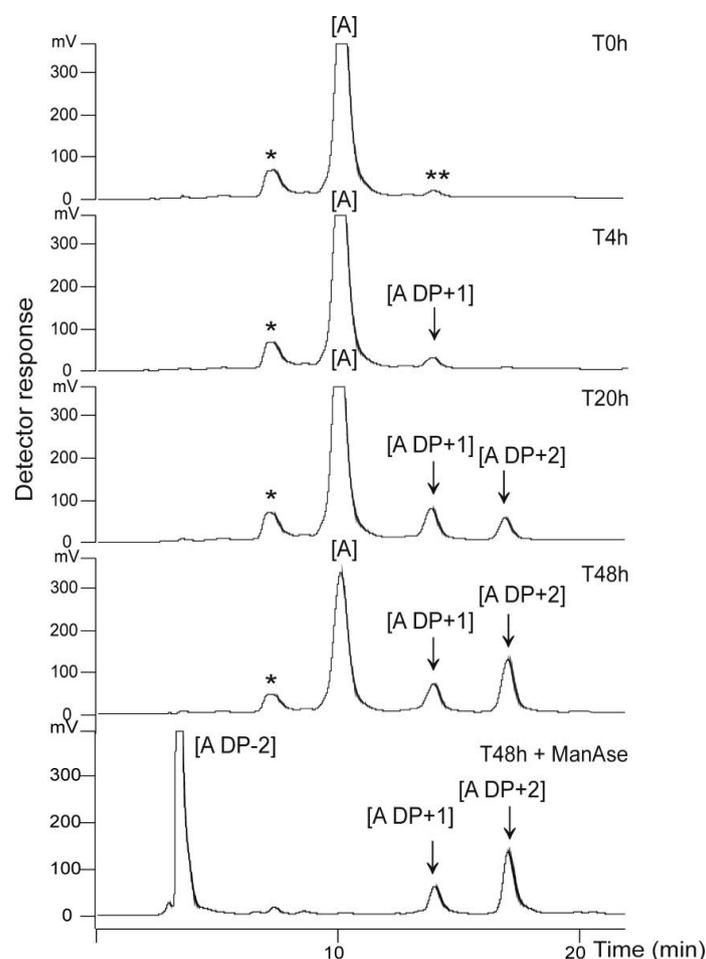


Figure 3: Enzymatic synthesis of two reaction products using recombinant Bmt1p (culture supernatant of engineered *P. pastoris*) with mantyl-mannotriose [A] as substrate under standard assay conditions (0h, 4h, 20h and 48h at 28°C). (A DP+1) and (A DP+2) were sequentially produced along the reaction time. Digestion with an α -mannosidase (ManAse) totally degraded compound A to mantylated-mannose (A DP-2), whereas the two reaction products (A DP+1) and (A DP+2) were resistant, demonstrating that the enzyme transferred mannose residues in β -configuration. Peaks * and ** are contaminants.

Conclusion

Protected tri and tetramannosides were obtained from the two routes. The "benzyl" route is more effective here, as it is avoiding the migration of ester groups. For shorter oligomannosides (up to trimannoside) or probably for other sugars, those in which an acyl migration was not possible (for example in gluco/galacto synthesis), the all esters routes may be convenient. The OFmoc participating group seems to be the best choice in acylated thioglycoside strategy. From these protected derivatives, fluorescent mantylated oligomannosides (A, B, C) have been prepared using various routes. We have shown that a 3-aminopropyl is a suitable intermediate for conjugation through direct acylation or through diazotransfer. Conjugate A was found to be a convenient substrate of β -mannosyltransferase Bmt1, Future studies on structure /selectivity of recombinant *C. albicans* β -mannosyl transferases using tetramannoside are underway.

Experimental

All compounds were homogeneous by TLC analysis and had spectral properties consistent with their assigned structures. Compound purity was checked by TLC on Silica gel 60 F₂₅₄ (E. Merck). Column chromatography was performed on Silica gel 60 (E. Merck). Propyl spacer carbons are numbered from 7 to 9.

Fmoc Route

General procedure for glycosylation with thioglycosides (procedure A): Molecular sieves 4A (same mass as donor+acceptor mass) were added to a solution of a glycosyl acceptor and a glycosyl donor in dry CH₂Cl₂. The mixture was cooled at 0°C and then NIS and TfOH were added successively. At the end of the reaction (TLC monitoring), the mixture was diluted with CH₂Cl₂ and filtered through Celite. The filtrate was washed with aq sodium thiosulfate and sat aq NaHCO₃ and concentrated. The residue was chromatographed (Cyclohexane/AcOEt).

5-tert-butyl-2-methylphenyl-2,3-O-isopropylidene-1-thio- α -D-mannopyranoside (3) - 2,2-Dimethoxypropane (429ml) and PTSA (8.6g, 45mmol) were added to a solution of **1** (42.86g, 0.125 mol) in acetone (430 ml). The mixture was stirred for 15 min at room temperature, neutralized (Et₃N, 18 ml) and concentrated to give **2** (HRMS: calculated for C₂₃H₃₄O₅NaS [M+Na]⁺: m/z 445.2025, found: 445.2047). This residue was dissolved in 600 ml of a mixture water/acetone (20/1, v/v) and then PTSA was added (2.4g, 12.5 mmol) and the mixture was stirred on rotavapor under vacuum (40 mbar) at 50°C during 15 min. The mixture was cooled at 0°C and neutralized by addition of Et₃N (43 ml). The mixture was concentrated under vacuum and the residue chromatographed on silica gel (eluent cyclohexane/AcOEt) to give **3** (27 g, 57%). HRMS: calculated for C₂₀H₃₀O₅NaS [M+Na]⁺: m/z 405.1712, found: 405.1718. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.51– 6.97 (m, 3H, Har), 5.78 (d, *J* 1, 1H, H1), 4.37 (dd, *J* = 5.4 Hz and *J* 1, 1H, H2), 4.21 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H, H3), 4.02 (dt, *J* = 9.6, 3.4 Hz, 1H, H5), 3.75 (m, 3H, H4, 2H6), 2.98 (brs, 2H, OH), 2.39 (s, 3H, CH3 thio), 1.52 (s, 3H, Me isopropylidene), 1.37 (s, 3H, Me isopropylidene), 1.27 (s, 9H, 3 Me *t*Bu thio). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 149.91 (Cqar), 137.08 (Cqar), 131.41 (Car), 130.41 (Car), 130.09 (Car), 125.40 (Car), 110.05 (Cq isopropylidene), 83.09 (C1), 78.63 (C3), 76.70 (C2), 70.84 (C5), 70.05 (C4), 62.15 (C6), 34.66 (Cq*t*Bu), 31.50 (3Me *t*Bu), 28.33 (Me isopropylidene), 26.58 (Me isopropylidene), 20.34 (Me arom).

5-tert-butyl-2-methylphenyl-4,6-di-O-benzoyl-1-thio- α -D-mannopyranoside (5) - Benzoyl chloride (30.3 ml, 0.245 mol) was added to a solution of **3** (27 g, 70 mmol) in CH₂Cl₂ (20 mL) in the presence of triethylamine (26.3 ml). The reaction mixture was stirred overnight at room temperature and then diluted with CH₂Cl₂. The organic phases was washed with aq NaHCO₃ and water, dried and

concentrated. The intermediate **4** was used without further purification in the next step. This intermediate was dissolved in 367 ml of a mixture acetic acid / water (4/1, v/v) and heated to 100°C during 30 min and then concentrated. The residue was diluted with CH₂Cl₂. The organic phases was washed with a sat aq NaHCO₃ and then dried (MgSO₄) and concentrated. The residue was chromatographed on silica gel (cyclohexane/AcOEt) to give **5** (31.9 g, 86%). HRMS: calculated for C₃₁H₃₄O₇NaS [M+Na]⁺: m/z 573.1923, found: 573.1919. ¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ = 8.25 – 6.98 (m, 13H, Har), 5.68 (s, 1H, H1), 5.59 (t, *J*=9.6, 1H, H4), 4.78 (ddd, *J*=3.0, 4.9, 9.6, 1H, H5), 4.59 (dd, *J*=3.0, 12.1, 1H, H6a), 4.51 (dd, *J*=5.2, 12.1, 1H, H6b), 4.39 (s, 1H, H2), 4.23 (dd, *J*=3.1, 9.6, 1H, H3), 3.70 (br s, 1H, OH), 3.55 (br s, 1H, OH), 2.42 (s, 3H, Me arom), 1.29 (s, 9H, *t*Bu). ¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ = 167.24 (CO Bz), 166.34 (CO Bz), 150.02 (Cqar), 136.20 (Cqar), 133.66 (Car), 132.98 (Car), 132.34 (Cqar), 132.26 (Cqar), 130.04 (Car), 129.77 (Car), 129.65 (Cqar), 129.11 (Cqar), 128.83 (Car), 128.52 (Car), 128.28 (Car), 124.91 (Car), 87.56 (C1), 72.66 (C2), 71.36 (C4), 71.01 (C3), 69.58 (C5), 63.65 (C6), 34.49 (Cq *t*Bu), 31.30 (Me *t*Bu), 20.33 (Me arom).

5-tert-butyl-2-methylphenyl-3,4,6-tri-*O*-benzoyl-1-thio- α -D-mannopyranoside (6) - Benzoyl chloride (0.25 ml, 2.16 mmol) was added to a solution of **6** (1.0 g, 1.8 mmol) in 13 mL of pyridine at 0°C. The mixture was stirred for 30 min at 0°C then overnight at room temperature. The mixture was diluted with CH₂Cl₂, washed with aq 1M HCl and water, and dried (MgSO₄). After concentration the residue was chromatographed on silica gel (cyclohexane/AcOEt) to give **6** (0.97 g, 82%). HRMS: calculated for C₃₈H₃₈O₈NaS [M+Na]⁺: m/z 677.2185, found: 677.2167. ¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ = 8.08 – 7.06 (m, 18H, Har), 6.06 (t, *J*=10.0, 1H, H4), 5.73 (dd, *J*=2.9, 10.0, 1H, H3), 5.65 (d, *J*=1.2, 1H, H1), 4.93 – 4.83 (m, 1H, H5), 4.65 (s, 1H, H2), 4.56 (dd, *J*=3.2, 12.2, 1H, H6a), 4.49 (dd, *J*=4.9, 12.2, 1H, H6b), 2.85 (br s, 1H, OH), 2.42 (s, 3H, Me arom), 1.26 (s, 9H, *t*Bu). ¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ = 166.26 (CO Bz), 165.72 (CO Bz), 165.57 (CO Bz), 150.08 (Cqar), 136.38 (Cqar), 133.51 (Car), 133.43 (Car), 133.00 (Car), 132.14 (Cq), 130.14 (Car), 129.88 (Car), 129.79 (Cqar), 129.65 (Cq ar), 129.04 (Cq), 128.94 (Car), 128.52 (Car), 128.45 (Car), 128.32 (Car), 125.07 (Car), 87.66 (C1), 72.98 (C3), 71.21 (C2), 70.15 (C5), 67.05 (C4), 63.44 (C6), 34.52 (Cq *t*Bu), 31.31 (Me *t*Bu), 20.40 (Me arom).

5-tert-butyl-2-methylphenyl 2-*O*-fluorenylmethoxycarbonyl -3,4,6-tri-*O*-benzoyl-1-thio- α -D-mannopyranoside (7) - Pyridine (0.6 mL, 7.5 mmol) and fluorenylmethoxy carbonyl chloride were added to a solution of **6** (0.7 g, 1.1 mmol) in CH₂Cl₂ (18 mL). The mixture was stirred for 1h at room temperature. The reaction mixture was diluted with CH₂Cl₂ and washed with 1M HCl, dried (MgSO₄) and concentrated. The residue was chromatographed (Cyclohexane/AcOEt) to give **7** (0.59g, 63%). HRMS: calculated for C₅₃H₄₈O₁₀NaS [M+Na]⁺: m/z 899.2866, found: 899.2886. ¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ = 8.14 – 7.14 (m, 26H, Har), 6.25 (t, *J*=10.0, 1H, H4), 5.92 (dd, *J*=2.8, 10.0, 1H, H3), 5.73 (m, 2H, H1, H2), 4.98 (dt, *J*=3.6, 10.0, 1H, H5), 4.70 (dd, *J*=2.8, 12.2, 1H, H6a), 4.60 (dd, *J*=4.4, 12.2, 1H, H6b), 4.40 – 4.17 (m, 3H, CH₂Fmoc, CHFmoc), 2.51 (s, 3H, Me arom), 1.33 (s, 9H, Me *t*Bu). ¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ = 166.21 (CO Bz), 165.49 (CO Bz), 165.34 (CO Bz), 154.37 (CO Fmoc), 150.18 (Cq ar), 143.28 (Cq ar), 143.06 (Cq ar), 141.25 (Cq ar), 137.09 (Cq ar), 133.45 (Car), 133.37 (Car), 133.00 (Car), 131.58 (Cqar), 130.29 (Car), 130.10 (Car), 129.91 (car), 129.82 (Car), 129.05 (Cq), 128.92 (Cqar), 128.46 (Car), 128.35 (Car), 127.96 Car, 127.40 (Car), 127.31 (Car), 127.20 (Car), 125.66 (Car), 125.29 (Car), 125.20 (Car), 120.11 (Car), 120.04 (Car), 85.78 (C1), 75.43 (C2), 70.60 (CH₂Fmoc), 70.43 (C3), 70.34 (C5), 66.91 (C4), 63.24 (C6), 46.54 (CHFmoc), 34.50 (Cq *t*Bu), 31.30 (Me *t*Bu), 20.47 (Me arom).

3-azidopropyl 2-*O*-fluorenylmethoxycarbonyl-3,4,6-tri-*O*-benzoyl- α -D-mannopyranoside (8) - 3-azidopropanol (0.16mL, 1.7 mmol) was glycosylated with **7** (1.0g, 1.14 mmol) in 10 ml of CH₂Cl₂ in the presence of molecular sieves 4 A, NIS (0.64g, 2.85 mmol) and TfOH (50 μ L, 0.57 mmol) at room temperature during 5 min according to procedure A. After purification, **8** (0.82g, 90%) was obtained. HRMS: calculated for C₄₅H₃₉N₃O₁₁Na [M+Na]⁺: m/z 820.2482, found: 820.2480. ¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ = 8.10 – 7.03 (m, 23H), 5.99 (t, *J*=10.1, 1H, H4), 5.73 (dd, *J*=3.3, 10.1, 1H, H3), 5.28 (dd, *J*=1.5, 3.2, 1H, H2), 5.00 (d, *J*=1.5, 1H, H1), 4.59 (dd, *J*=2.8, 12.0, 1H, H6a), 4.46 (dd, *J*=5.2, 12.0, 1H, H6b) 4.32 (ddd, *J*=2.8, 5.2, 10.1, 1H, H5), 4.26 – 4.08 (m, 3H, CH₂ Fmoc, CH Fmoc), 3.87 (dt, *J*=6.1, 9.9, 1H, H7a), 3.56 (dt, *J*=6.1, 9.9, 1H, H7b), 3.40 (t, *J*=6.5, 2H, H9), 2.01 – 1.79 (m, 1H, H8).

^{13}C NMR (63 MHz, CDCl_3) δ = 166.41(CO Bz), 165.69 (CO Bz), 165.59 (CO Bz), 154.65 (CO Fmoc), 143.48 (Cqar), 143.27 (Cqar), 141.46 (Cqar), 133.62 (Car), 133.48 (Car), 133.30 (Car), 130.07 (Car), 129.97 (Car), 129.94 (Car), 129.20 (Cqar), 128.64 (Car), 128.62 (Car), 128.50 (Car), 128.17 (Car), 127.60 (Car), 127.52 (Car), 125.49 (Car), 120.24 (Car), 97.71 (C1), 73.58 (C2), 70.80 (CH₂ Fmoc), 70.19 (C3), 69.31 (C5), 67.07 (C4), 65.37 (C7), 63.53 (C6), 48.44 (C9), 46.72 (CH Fmoc), 28.96 (C8).

3-azidopropyl 3,4,6-tri-*O*-benzoyl- α -D-mannopyranoside 9a and **3-azidopropyl 2,4,6-tri-*O*-benzoyl-1- α -D-mannopyranoside (9b)** - Acetic acid (0.18 ml, 3.25 mmol) and TBAF (2.6 ml of 1M solution in THF, 2.6 mmol) were added to a solution of **8** (0.52 g, 0.65 mmol) in THF (12 ml). The mixture was stirred for one hour at room temperature, dried (MgSO_4) and concentrated. The residue was chromatographed (Cyclohexane/AcOEt) to give **9a** (0.21 g, 56%) and the migration product **9b** (0.04g, 11%). **9a**: HRMS: calculated for $\text{C}_{30}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_9\text{Na}$ [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$: m/z 598.1801, found: 598.1815 ^1H NMR (250 MHz, CDCl_3) δ = 8.10 – 7.03 (m, 15 H), 5.86 (t, $J=10.0$, 1H, H4), 5.55 (dd, $J=3.1$, 10.0, 1H, H3), 4.88 (d, $J=1.3$, 1H, H1), 4.49 (dd, $J=3.1$, 12.0, 1H, H6a), 4.41 (dd, $J=5.5$, 12.0, 1H, H6b), 4.25 (m, 2H, H5 and H2), 3.82 (dt, $J=6.1$, 9.9, 1H, H7a), 3.47 (dt, $J=6.1$, 9.9, 1H, H7b), 3.35 (t, $J=6.5$, 2H, H9), 2.01 – 1.79 (m, 1H, H8). ^{13}C NMR (63 MHz, CDCl_3) δ = 165.25 (CO Bz), 164.73 (CO Bz), 164.64 (CO Bz), 132.33 (Car), 132.30 (Car), 133.05 (Car), 128.76 (Car), 128.16 (Cqar), 128.03 (Cqar), 127.40 (Car), 127.37 (Car), 127.34 (Car), 98.8 (C1), 71.7 (C3), 68.3 and 67.9 (C2 and C5), 66.1 (C4), 63.8 (C7), 62.6 (C6), 47.3 (C9), 27.7(C8). **9b**: HRMS: calculated for $\text{C}_{30}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_9\text{Na}$ [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$: m/z 598.1801, found: 598.1786

3-azidopropyl 2-*O*-fluorenylmethoxycarbonyl-3,4,6-tri-*O*-benzoyl- α -D-mannopyranosyl-(1-2)-3,4,6-tri-*O*-benzoyl- α -D-mannopyranoside (10) - **9a** (0.095 g, 0.16 mmol) was glycosylated with **7** (0.165 g, 0.21 mmol) in 5 ml of CH_2Cl_2 in the presence of molecular sieves 4 A, NIS (0.09 g, 0.4 mmol) and TfOH (7 μL , 0.08 mmol) at room temperature during 10 min according to procedure A. After purification **10** (0.16 g, 77%) was obtained. HRMS: calculated for $\text{C}_{72}\text{H}_{61}\text{N}_3\text{O}_{19}\text{Na}$ [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$: m/z 1294.3797, found: 1294.3826. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.11-7.13 (m, 38 H, Har), 6.03 (t, J = 9.8 Hz, 1H, H4'), 5.97 (t, J = 9.9 Hz, 1H, H4), 5.94 (dd, J = 9.8, 3.1 Hz, 1H, H3'), 5.83 (dd, J = 9.9, 3.2 Hz, 1H, H3), 5.55 (dd, J = 3.1, 1.9 Hz, 1H, H2'), 5.23 (d, J = 1.9 Hz, 1H, H1'), 5.13 (d, J = 1.5 Hz, 1H, H1), 4.66 – 4.50 (m, 5H, 2H6', 2H6, H5'), 4.38 (dd, J = 3.2, 1.5 Hz, 1H, H2), 4.36 – 4.32 (m, 1H, H5), 4.25 – 4.10 (m, 3H, CH₂Fmoc, CHFmoc), 3.80 (dt, J = 9.8, 6.3 Hz, 1H, H7a), 3.41 – 3.35 (m, 3H, H7b, 2H9), 1.85(tdd, 2H, 2H8 J = 6.3 Hz). ^{13}C NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 166.38 (CO Bz), 166.20 (CO Bz), 165.76 (CO Bz), 165.58 (CO Bz), 165.33 (CO Bz), 165.06 (CO Bz), 154.13 (CO Fmoc), 143.07 (Cqar), 141.24 (Cqar), 137.98 (Cqar), 133.53(Car), 133.42(Car), 133.37 (Car), 133.28 (Car), 133.19 (Car), 133.13 (Car), 131.80 (Car), 130.51 (Car), 130.05 (Car), 129.94 (Car), 129.84 (Car), 129.07 (Cqar), 128.90 (Cqar), 128.55 (Car), 128.45 (Car), 128.00(Car), 127.65 (Car), 127.45 (Car), 127.34 (Car), 125.36 (Car), 125.32 (Car), 120.07 (Car), 99.38 (C1'), 98.72 (C1), 76.94 (C2), 73.16 (C2'), 70.91 (C3), 70.61 (CH₂Fmoc), 69.91 (C5'), 69.66 (C3'), 69.05 (C5), 67.51 (C4), 66.93 (C4'), 64.93 (C7), 63.80, 63.45 (C6, C6'), 48.28 (C9), 46.47 (CHFmoc), 28.66 (C8).

3-azidopropyl 3,4,6-tri-*O*-benzoyl- α -D-mannopyranosyl-(1-2)-3,4,6-tri-*O*-benzoyl- α -D-mannopyranoside 11a and **3-azidopropyl 2,4,6-tri-*O*-benzoyl- α -D-mannopyranosyl-(1-2)-3,4,6-tri-*O*-benzoyl- α -D-mannopyranoside (11b)** - Acetic acid (88 μl , 1.54 mmol) and TBAF (1.32 ml of 1M solution in THF, 1.32 mmol) were added to a solution of **10** (0.52 g, 0.65 mmol) in THF (3 ml). The mixture was stirred for 5 min at 80 °C and cooled then diluted with ethyl acetate and washed with water, dried (MgSO_4) and concentrated. The residue was chromatographed (Cyclohexane/AcOEt) to give **11a** (0.16 g) and the migration product **11b** (0.08g, total yield: 70%, 2/1). **11a** HRMS: calculated for $\text{C}_{57}\text{H}_{51}\text{N}_3\text{O}_{17}\text{Na}$ [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$: m/z 1072.3116, found: 1072.3145: ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.11 – 7.91 (m, 10H), 7.56 – 7.31 (m, 20H), 5.96 (t, J = 9.9 Hz, 1H, H4), 5.90 (t, J = 9.7 Hz, 1H, H4'), 5.79 (dd, 1H, $J=3.2$, $J=9.7$, H3'), 5.76 (dd, 1H, $J=3.3$, $J=9.9$, H3), 5.14 (d, J = 1.9 Hz, 1H, H1'), 5.13 (d, J = 1.9 Hz, 1H, H1), 4.65 – 4.44 (m, 6H, 2H6, 2H6', H5', H2'), 4.38 (dd, J = 3.3, 1.9 Hz, 1H, H2), 4.34 (ddd, 1H, J = 9.9, 5.3, 3.3 Hz, H5), 3.77 (dt, J = 9.8, 6.3 Hz, 1H, H7a), 3.37 (t, J = 6.5 Hz, 2H, 2H9), 3.35 (dt, J = 9.8, 6.3 Hz, 1H, H7b), 1.89 – 1.78 (m, 2H, 2H8), 1.68 (br s, 1H, OH). ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 166.43 (CO Bz), 166.26 (CO Bz), 165.83 (CO Bz), 165.75 (CO Bz), 165.51 (CO

Bz), 165.26 (CO Bz), 133.61 (Car), 133.51 (Car), 133.19 (Car), 130.05 (Car), 129.95 (Cqar), 129.88 (Cqar), 129.80 (Cqar), 128.73 (Cqar), 128.63 (Car), 128.59 (Car), 128.55 (Car), 101.71 (C1'), 98.86 (C1), 77.36 (C2), 72.33 (C3'), 71.44 (C3), 69.84 (C5'), 69.50 (C2'), 69.05 (C5), 67.49 (C4), 67.09 (C4'), 64.95 (C7), 63.88-63.71 (C6, C6'), 48.34 (C9), 28.83 (C8). **11b** HRMS: calculated for C₅₇H₅₁N₃O₁₇Na [M+Na]⁺: m/z 1072.3116, found: 1072.3143. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.17 – 7.86 (m, H, Har), 7.65 – 7.29 (m, H, Har), 6.00 (t, *J* = 10.1 Hz, 1H, H4), 5.84 (dd, *J* = 10.1, 3.1 Hz, 1H, H3), 5.67 (t, *J* = 9.9 Hz, 1H, H4'), 5.63 (dd, *J* = 1.8, 3.5 Hz, 1H, H2'), 5.22 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, H1'), 5.09 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, H1), 4.66 (m, 2H, 2H6'), 4.54 – 4.40 (m, 4H, H3', 2H6, H5'), 4.31 (dd, *J* = 3.1, 1.9 Hz, 1H, H2), 4.30 (m, 1H, H5), 3.80 (dt, *J* = 9.7, 6.2 Hz, 1H, H7a), 3.39 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, 2H9), 3.37 (dt, *J* = 6.0 Hz, 9.7, 1H, H7b), 1.85 (tdd, *J* = 6.3, 6.0, 6.5 Hz, 2H, 2H8), 1.69 (br s, 1H, OH). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 166.98 (CO Bz), 166.32 (CO Bz), 166.19 (CO Bz), 165.89 (CO Bz), 165.53 (2XCO Bz), 133.75 (Car), 133.60 (Car), 133.50 (Car), 133.27 (Car), 130.15 (Car), 130.07 (Car), 129.99 (Car), 129.92 (Car), 129.85 (Car), 129.72 (Car), 129.27 (Cqar), 129.08 (Cqar), 129.03 (Cqar), 128.93 (Cqar), 128.64 (Car), 128.54 (Car), 128.50 (Car), 99.75 (C1'), 98.81 (C1), 77.36 (C2), 72.57 (C2'), 70.84 (C3), 70.33 (C4'), 69.61 (C3'), 69.29 (C5), 68.94 (C5'), 67.31 (C4), 65.03 (C7), 63.38 and 63.29 (C6 and C6'), 48.31 (C9), 28.84 (C8).

3-azidopropyl 2-O-fluorenylmethoxycarbonyl-3,4,6-tri-O-benzoyl- α -D-mannopyranosyl-(1-2) 3,4,6-tri-O-benzoyl- α -D-mannopyranosyl-(1-2) 3,4,6-tri-O-benzoyl- α -D-mannopyranoside (12) - 11a (0.27 g, 0.26 mmol) was glycosylated with **7** (0.30 g, 0.34 mmol) in 8 ml of CH₂Cl₂ in the presence of molecular sieves 4 A, NIS (0.15 g, 0.65 mmol) and TfOH (12 μ L, 0.13 mmol) at room temperature during 10 min according to procedure A. After purification **12** (0.41 g, 91%) was obtained. HRMS: calculated for C₉₉H₈₃N₃O₂₇Na [M+Na]⁺: m/z 1768.5112, found: 1768.5129 ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.12 – 7.12 (m, 1H), 6.00 – 5.89 (m, 4H, H4', H4'', H3'), 5.85 (dd, *J* = 10.0, 3.2 Hz, 1H, H3''), 5.73 (dd, *J* = 9.5, 3.2 Hz, 1H, H3), 5.46 (dd, *J* = 3.2, 1.9 Hz, 1H, H2''), 5.43 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, H1'), 5.10 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, H1), 4.99 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, H1''), 4.68 – 4.52 (m, 6H, 2H6, 2H6', H5'), 4.50 (dd, *J* = 1.8, 3.0 Hz, 1H, H2'), 4.45 – 4.39 (m, 1H, H5''), 4.37 (dd, *J* = 2.0, 3.4 Hz, 1H, H2), 4.34 – 4.07 (m, 6H, H5, H6''a, CH₂Fmoc, CHFmoc, H6''b), 3.80 (dt, *J* = 9.8, 6.3 Hz, 1H, H7a), 3.40 (dt, *J* = 6.1, 9.8 Hz, 1H, H7b) 3.39 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, 2H9), 1.87 (tdd, *J* = 6.3, 6.1, 6.6 Hz, 2H, 2H8). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆) δ 176.67 (CO Bz), 166.41 (CO Bz), 166.31 (CO Bz), 166.03 (CO Bz), 165.77 (CO Bz), 165.57 (CO Bz), 165.49 (CO Bz), 165.48 (CO Bz), 165.09 (CO Bz), 154.12 (CO Fmoc), 143.32 (Cqar), 143.18 (Cqar), 141.33 (Cqar), 133.55 (Car), 133.45 (Car), 133.29 (Car), 133.19 (Car), 133.07 (Car), 131.86 (Car), 130.57 (Car), 130.13 (Car), 130.08 (Car), 129.99 (Car), 129.88 (Car), 129.81 (Car), 129.25 (Car), 129.12 (Car), 129.06 (Car), 129.00 (Cqar), 128.66 (Cqar), 128.60 (Cqar), 128.52 (Cqar), 128.44 (Cqar), 128.41 (Cqar), 128.08 (Cqar), 127.71 (Car), 127.52 (Car), 127.41 (Car), 125.36 (Car), 120.16 (Car), 100.18 (C1'), 99.61 (C1''), 98.87 (C1), 77.36 (C2'), 77.03 (C2), 73.13 (C2''), 71.11 (3), 70.57 (CH₂Fmoc), 70.49 (C3'), 69.83 (C5'), 69.78 (C5''), 69.71 (C3''), 69.11 (C5), 67.69 (C4'), 67.59 (C4''), 66.75 (C4), 64.99 (C7), 64.05 and 63.88 (C6 and C6'), 63.38 (C6''), 48.37 (C9), 46.60 (CHFmoc) 28.93 (C8).

3-azidopropyl 3,4,6-tri-O-benzoyl- α -D-mannopyranosyl-(1-2) 3,4,6-tri-O-benzoyl- α -D-mannopyranosyl-(1-2) 3,4,6-tri-O-benzoyl- α -D-mannopyranoside (13a) and 3-azidopropyl 2,4,6-tri-O-benzoyl- α -D-mannopyranosyl-(1-2) 3,4,6-tri-O-benzoyl- α -D-mannopyranosyl-(1-2) 3,4,6-tri-O-benzoyl- α -D-mannopyranoside (13b) - Acetic acid (88 μ l, 1.54 mmol) and TBAF (1.32 ml of 1M solution in THF, 1.32 mmol,) were added to a solution of **12** (0.39 g, 0.22 mmol) in THF (5 ml). The mixture was stirred for 5 min at 80 °C and cooled then diluted with ethyl acetate and washed with water, dried (MgSO₄) and concentrated. The residue was chromatographed (Cyclohexane/AcOEt) to give 0.22 g of mixture of **13a** and **13b** (65%, 2/1). **13a + 13b** HRMS: calculated for C₈₄H₇₃N₃O₂₅Na [M+Na]⁺: m/z 1546.4431, found: 1546.4464. ¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ 101.86 (C1 13a), 100.39 (C1 13b), 100.29 (C1 13a), 99.69 (C1 13b), 98.88 (C1 13b), 98.78 (C1 13a). ¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ 5.36 (s, 1H, H1 **13a**), 5.27 (s, 1H, H1 **13b**), 5.00 (s, 1H, H1 **13a**), 4.97 (s, 1H, H1 **13b**), 4.84 (s, 1H, H1 **13a**), 4.78 (s, 1H, H1 **13b**).

3-azidopropyl 2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- α -D-mannopyranosyl-(1-2) 3,4,6-tri-O-benzoyl- α -D-mannopyranosyl-(1-2) 3,4,6-tri-O-benzoyl- α -D-

mannopyranoside 14 and 3-azidopropyl 2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- α -D-mannopyranosyl-(1-3) 3,4,6-tri-O-benzoyl- α -D-mannopyranosyl-(1-2) 3,4,6-tri-O-benzoyl- α -D-mannopyranosyl-(1-2) 3,4,6-tri-O-benzoyl- α -D-mannopyranoside (15) - The mixture of **13a** and **13b** (0.21 g, 0.14 mmol) was glycosylated with **7** (0.14 g, 0.18 mmol) in 4 ml of CH₂Cl₂ in the presence of molecular sieves 4 Å, NIS (79 mg, 0.35 mmol) and TfOH (6 μ L, 0.07 mmol) at room temperature during 30 min according to procedure A. After purification, a mixture of **14** and **15** (0.26 g, 87 %) was obtained. HRMS: calculated for C₁₁₈H₉₉N₃O₃₄Na [M+Na]⁺: m/z 2124.6008, found: 2124.5908. ¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ 5.36 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, H1 **15**), 5.33 (d, *J* = 1.8 Hz, 0.33 H, H1 **14**), 5.29 (d, *J* < 1.0 Hz, 0.33 H, H1 **14**), 5.18 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H, H1 **15**), 5.06 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, H1 **15**), 5.02 (d, *J* = 1.9 Hz, 0.33H, H1 **14**), 4.97 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, H1 **15**), 4.85 (d, *J* = 1.8 Hz, 0.33H, H1 **14**).

Compound 16 - 12 (0.22 g, 126 μ mol) was added to a solution of PMA (40 mg, 210 μ mol) in 6 ml of THF. Then a suspension of copper sulfate pentahydrate (16 mg, 63 μ mol) with sodium ascorbate (17 mg, 88 μ mol) in 1 ml of water was added. After 24 hours the solvent was evaporated. The residue was dissolved in CH₂Cl₂ and washed with water, dried (MgSO₄) and concentrated. After purification on silica gel with (Cyclohexane/ethyl acetate) **16** (0.18 g, 75%) was obtained. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.03 – 6.88 (m, H, HAr), 6.52 (m, 1H, HAr mantyl), 6.40 (m, 1H, HAr mantyl), 5.99 – 5.73 (m, 5H, H3', H3'', H4, H4', H4''), 5.59 (dd, *J* = 9.4, 3.1 Hz, 1H, H3), 5.39 (m, 2H, H2'', H1'), 5.00 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H, H1), 4.93 (d, *J* = 0.9 Hz, 1H, H1''), 4.60 – 3.97 [(m, 18 H: 4.60-4.55 (CH₂ mantyl), 4.60-4.50 (2H6, 2H6'), 4.55-4.35 (H5', H5''), 4.45-4.25 (H2', H2) 4.25 (H6''a), 4.05 (H6''b), 4.40-4.30 (2H9), 4.32-4.20 (H5), 4.20-4.10 (CH₂ Fmoc), 4.10-4.00 (CHFmoc)], 3.67 (dt, *J* = 10.4, 5.3 Hz, 1H, H7a), 3.29 (dt, *J* = 10.4, 5.7 Hz, 1H, H7b), 2.73 (s, 3H, CH₃ mantyl), 2.16 – 2.00 (m, 2H, 2H8). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 169.93(CO amide), 166.34, 166.29, 166.02, 165.88, 165.49, 165.47, 165.44, 165.06(CO Bz), 154.07 (CO Fmoc), 150.75 (CqAr mantyl), 145.45 (Cq triazole), 143.24 (CqAr Fmoc), 143.09 (CqAr Fmoc), 141.25 (CqAr Fmoc), 133.55 (CAr), 133.36 (CAr), 133.24 (CAr), 133.14 (CAr), 133.04 (CAr),, 129.99 (CAr), 129.86 (CAr), 129.81 (CAr), 129.77 (CAr), 129.72 (CAr), 129.16(CqAr), 129.06 (CqAr), 129.01 (CqAr), 128.97 (CqAr), 128.94 (CqAr), 128.64 (CAr), 128.59 (CAr), 128.55 (CAr), 128.47 (CAr), 128.37 (CAr), 128.34 (CAr), 128.03 (CAr), 127.64 (CAr), 127.46 (CAr), 127.34 (CAr), 125.28 (CAr), 122.33 (CAr), 120.10 (CH triazole), 114.57(CAr mantyl), 114.42 (CqAr mantyl), 111.12 (CAr mantyl), 99.96 (C1'), 99.51(C1''), 98.98 (C1), 77.51 (C2'), 76.16 (C2), 73.10 (C2''), 71.08 (C3), 70.51 (CH₂ Fmoc), 70.47 (C3'), 69.76 (C5' and C3''), 69.65 (C5''), 68.98 (C5), 67.64 (C4'), 67.57 (C4''), 66.61 (C4), 65.15 (C7), 63.95, 63.72, 63.21 (C6, C6', C6''), 47.55 (C9), 46.53 (CH Fmoc), 35.22 (CH₂ mantyl), 30.02 (C8), 29.69 (CH₃ mantyl).

Compound A- 16 (0.124 g) was dissolved in 5 ml of a mixture of methanol /THF (3/2, v/v). 1M KOH (pH > 12) was added. The mixture was stirred at 50°C during 12 h then concentrated. The residue was dissolved in water and washed with CH₂Cl₂ and the aqueous phase was concentrated. After desalting on Sephadex G25, **A** (48 mg, 98%) was obtained. HRMS: calculated for C₃₂H₄₉N₅O₁₇Na [M+Na]⁺: m/z 798.3021, found: 798.3032 ¹H NMR (300 MHz, D₂O) δ 8.44 (s, 1H, NH amide), 7.96 (s, 1H, H triazole), 7.45 (m, 2H, HAr mantyl), 6.87 (m, 1H, HAr mantyl), 6.79 (m, 1H, HAr mantyl), 5.24 (s, 1H, H1'), 5.01 (s, 1H, H1''), 4.97 (s, 1H, H1), 4.62 (s, 2H, CH₂ mantyl), 4.51 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, 2H9), 4.13 – 4.02 (m, 3H, H2', H2'', H3), 3.95 – 3.52 [(m, 16 H: 3.95-3.60 (H3, H3', H3''), 3.85-3.75 (H2), 3.93-3.50 (2H6, 2H6', 2H6''), 3.80-3.60 (H5, H5'), 3.75-3.55 (H4, H4', H4'') 3.75-3.65 (H7a)], 3.52-3.42 (m, 2H, H7b and H5''), 2.80 (s, 3H, CH₃ mantyl), 2.26 – 2.14 (m, 2H, 2H8). ¹³C NMR (75 MHz, D₂O) δ 171.65 (CO amide), 148.94 (CqAr mantyl), 144.90 (Cq triazole), 133.18 (CAr mantyl), 128.38 (CAr mantyl), 123.88 (CH triazole), 117.67 (CAr mantyl), 116.72 (CAr mantyl), 112.39 (CAr mantyl), 102.18 (C1''), 100.60 (C1'), 98.16 (C1), 78.86 (C2), 78.50 (C2''), 73.20, 72.66, 72.03 (C5, C5', C5''), 70.28, 70.10, 69.92, (C3, C3', C3''), 68.46 (C2'), 67.04, 66.81, 66.79(C4, C4', C4''), 64.80 (C7), 61.08, 61.04, 60.75 (C6, C6', C6''), 47.91(C9), 34.65 (CH₂ mantyl), 29.65 (CH₃ mantyl), 29.00 (C8).

Benzyl route

General procedure for deacylation (procedure B): Sodium was added to a solution of starting compound in methanol (with or without THF) in order to have a pH value around 12 to 14. After completion of the reaction (TLC monitoring), the reaction mixture was neutralized with IR120 (H⁺)

and concentrated under vacuum.

3-azidopropyl 2-O-benzoyl-3,4,6-tri-O-benzyl- α -D-mannopyranoside (18)- azidopropanol (0.63 ml, 6.38 mmol) was glycosylated with **17** (2.29 g, 3.19 mmol) in 30 ml of CH₂Cl₂ in the presence of molecular sieves 4 A, NIS (1.58 g, 7.02 mmol) and TfOH (57 μ L, 0.64 mmol) at 0°C during 5 min according to procedure A. After purification, **18** (1.74 g, 85 %) was obtained. HRMS: calculated for C₃₇H₃₉N₃O₇Na [M+Na]⁺: m/z 660.2686, found: 660.2694. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.06 -7.06 (m, 20 H, Har), 5.52 (t, *J* = 1.9 Hz, 1H, H2), 4.88 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, H1), 4.80 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H, CHPh), 4.72 (d, *J* = 11.3 Hz, 1H, CHPh), 4.65 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H, CHPh), 4.51 (d, *J* = 10.1 Hz, 1H, CHPh), 4.47 (m, 2H, 2CHPh), 4.06 – 3.95 (m, 2H, H3, H4), 3.75 (m, 4H, H5, H6a, H6b, H7a) 3.45 (dt, *J* = 9.9, 6.0 Hz, 1H, H7b), 3.30 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, 2H9), 1.79 (m, 2H, 2H8). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 165.90 (C=O, Bz), 138.57 (CqAr), 138.46 (CqAr), 138.11(CqAr), 133.30 (CAr), 130.11(CAr), 128.54 (CAr), 128.48 (CAr), 128.45 (CAr), 128.19 (CAr), 127.82 (CAr), 127.79 (CAr), 127.66 (CAr), 98.04 (C1), 78.29 (C3 or C4), 75.48 (CH2Ph), 74.43 (C3 or C4), 73.61 (CH2Ph), 71.99 (C5), 71.75 (CH2Ph), 69.21 (C2), 69.16 (C6), 64.79 (C7), 48.50 (C9), 28.99 (C8).

3-azidopropyl 3,4,6-tri-O-benzyl- α -D-mannopyranoside (19) - 18 (1.99 g, 3.12 mmol) was deacetylated in 2 h in 70 ml of methanol in presence of sodium according to the procedure B. After the work up, **19** (1.66 g, quantitative) was obtained. HRMS: calculated for C₃₀H₃₉N₄O₆[M+NH₄]⁺: m/z 551.2870, found: 551.2871. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.39 – 7.13 (m, 15H, HAr), 4.89 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H, H1), 4.82 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H, CHPh), 4.66 (m, 3H, 3CHPh), 4.53 (d, *J* = 12.1 Hz, 1H, CHPh), 4.51(d, *J* = 10.8 Hz, 1H, CHPh), 4.02 (dd, *J* = 1.7, 2.8 Hz 1H, H2), 3.87 – 3.67 (m, 6H, H3, H4, H5, 2H6, H7a), 3.50 (dt, *J* = 10.0, 6.1 Hz, 1H, H7b), 3.34 (m, 2H, H9), 2.05 (br s, 1H, OH), 1.84 (tdd, *J* = 6.6, 6.1 Hz, 2H, 2H8). ¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ 138.22 (CqAr), 138.15 (CqAr), 137.91 (CqAr), 128.49 (CAr), 128.34 (CAr), 127.96 (CAr), 127.89 (CAr), 127.84 (CAr), 127.68 (CAr), 127.58 (CAr), 99.35 (C1), 80.09 (C3 or C4), 77.67 (CH2Ph), 77.16 (C3 or C4), 75.14 (CH2Ph), 74.22 (C3 or C4), 73.42 (CH2Ph), 71.94 (CH2Ph), 71.25 (C5), 68.89 (C6), 68.29 (C2), 64.33 (C7), 48.35 (C9), 28.77 (C8).

3-azidopropyl 2-O-benzoyl-3,4,6-tri-O-benzyl- α -D-mannopyranosyl-(1-2)-3,4,6-tri-O-benzyl- α -D-mannopyranoside (20) - 19 (1.16 g, 2.17 mmol) was glycosylated with **17** (1.71 g, 2.34 mmol) in 50 ml of CH₂Cl₂ in the presence of molecular sieves 4 A, NIS (1.07 g, 4.77 mmol) and TfOH (38 μ L, 0.43 mmol) at 0°C during 10 min according to procedure A. After purification, **20** (1.68 g, 72%) was obtained. HRMS: calculated for C₆₄H₇₁N₄O₁₂[M+NH₄]⁺: m/z 1087.5068, found: 1087.5090. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.11 – 7.87 (m, 2H), 7.60 – 6.98 (m, 33H), 5.71 – 5.68 (m, 1H, H2'), 5.11 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H, H1'), 4.82 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H, H1), 4.35-4.80 (m, 12H, CHPh) 4.06 – 4.00 (m, 1H, H3'), 3.97 – 3.90 (m, 2H, H2, H4'), 3.89 – 3.55 (m, 9H, H3, H4, H5, H5', 2H6, 2H6', H7a), 3.25 (dt, *J* = 10.1, 6.1 Hz, 1H, H7b), 3.18 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, 2H9), 1.67 (tdd, *J* = 6.1, 6.7 Hz, 2H, 2H9). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 165.47 (C=O, Bz), 138.54 (CqAr), 138.46 (CqAr), 138.44 (CqAr), 138.41 (CqAr), 138.30 (CqAr), 138.08 (CqAr), 133.08 (CAr), 130.08 (CqAr), 129.98 (CAr), 128.43 (CAr), 128.38 (CAr), 128.34 (CAr), 128.30 (CAr), 128.26 (CAr), 128.12 (CAr), 127.96 (CAr), 127.67 (CAr), 127.60 (CAr), 127.53 (CAr), 99.69 (C1'), 98.80 (C1), 79.57 (C3 or C4), 78.16 (C3'), 75.36 (C3 or C4), 75.21 (CH2Ph), 75.17 (CH2Ph), 74.63 (C5), 74.48 (C4'), 73.44 (CH2Ph), 73.34 (CH2Ph), 72.29 (CH2Ph), 72.11 (C2 or C5'), 72.07 (C2 or C5'), 71.70 (CH2Ph), 69.45 (C6 or C6'), 69.31 (C6 or C6'), 69.14 (C2'), 64.36 (C7), 48.37 (C9), 28.84 (C8).

3-azidopropyl 3,4,6-tri-O-benzyl- α -D-mannopyranosyl-(1-2)-3,4,6-tri-O-benzyl- α -D-mannopyranoside (21) - 20 (1.15 g, 1.07 mmol) was deacetylated in 3 h in 125 ml of methanol in presence of sodium according to the procedure B. After the work up, **21** (1.03 g, quantitative) was obtained. HRMS: calculated for C₅₇H₆₇N₄O₁₁[M+NH₄]⁺: m/z 983.4806, found: 983.4826. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.44 – 6.98 (m, 30H, HAr), 5.10 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H, H1'), 4.87 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H, H1), 4.85 – 4.40 (m, 12H, CHPh), 4.10 (dd, *J* = 2.9, 1.7 Hz, 1H, H2'), 3.99 – 3.84 (m, 2H, H2, H5 or H5'), 3.86 – 3.63 (m, 4H, H3, H3', H4, H4'), 3.77 – 3.60 (m, 5H, 2H6, 2H6', H5), 3.70-3.58 (m, 1H, H7a), 3.30 – 3.21 (m, 1H, H7b), 3.19 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, 2H9), 2.86 (br s, 1H, OH), 1.74 – 1.60 (m, 2H, 2H8). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 138.60 (CqAr), 138.41 (CqAr), 138.35 (CqAr), 138.26 (CqAr), 138.23 (CqAr), 137.99 (CqAr), 128.52 (CAr), 128.42 (CAr), 128.38 (CAr), 128.35 (CAr),

128.05 (CAr), 127.96 (CAr), 127.93 (CAr), 127.92 (CAr), 127.84 (CAr), 127.74, 127.69 (CAr), 127.65 (CAr), 127.50 (CAr), 127.46 (CAr), 101.18 (C1'), 98.85 (C1), 80.02 (C3'), 79.58 (C3), 75.23 (CH2Ph), 75.09 (CH2Ph), 75.03 (C2), 74.74 (C4 or C4'), 74.46 (C4 or C4'), 73.47 (CH2Ph), 73.34 (CH2Ph), 72.32 (CH2Ph), 72.18 (CH2Ph), 72.09 (C5 or C5'), 71.58 (C5 or C5'), 69.35 (C6 or C6'), 69.28 (C6 or C6'), 68.55 (C2'), 64.32 (C7), 48.38 (C9), 28.85 (C8).

3-azidopropyl 2-O-benzoyl-3,4,6-tri-O-benzyl- α -D-mannopyranosyl-(1-2)-3,4,6-tri-O-benzyl- α -D-mannopyranosyl-(1-2)-3,4,6-tri-O-benzyl- α -D-mannopyranoside (22) - 21 (1.05 g, 1.08 mmol) was glycosylated with **17** (0.925 g, 1.30 mmol) in 25 ml of CH₂Cl₂ in the presence of molecular sieves 4 A, NIS (0.534 g, 2.38 mmol) and TfOH (19 μ L, 0.22 mmol) at 0°C during 5 min according to procedure A. After purification, **22** (1.19 g, 74%) was obtained. HRMS: calculated for C₉₁H₉₉N₄O₁₇[M+NH₄]⁺: m/z 1519.7005, found: 1519.7081. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.08–6.82 (m, 50H, HAr), 5.68 (m, 1H, H2''), 5.14 (d, *J*=1.1 Hz, 1H, H1'), 5.05 (d, *J*=1.5 Hz, 1H, H1''), 4.83 (d, *J*=1.2 Hz, 1H, H1), 4.80–4.25 (m, 18H, CHPh), 4.07–4.00 (m, 3H, H4'', H2', H3''), 3.92–3.80 (m, 4H, H2, H3, H5, H5'), 3.79–3.49 (m, 11H, H4, H4', H3', 2H6, 2H6', 2H6'', H5'', H7a), 3.19 (m, 1H, H7b), 3.14 (t, *J*=6.9 Hz, 2H, 2H9), 1.63 (m, 2H, 2H8). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 165.42 (C=O, Bz), 138.53 (CqAr), 138.44 (CqAr), 138.41 (CqAr), 138.38 (CqAr), 138.31 (CqAr), 138.26 (CqAr), 138.07 (CqAr), 133.04 (CAr), 130.05 (CqAr), 129.96 (CAr), 128.31 (CAr), 128.23 (CAr), 128.09 (CAr), 127.96 (CAr), 127.76 (CAr), 127.62 (CAr), 127.51 (CAr), 127.44 (CAr), 127.38 (CAr), 100.69 (C1'), 99.46 (C1''), 98.80 (C1), 79.42 (C3 and C3'), 78.01 (C3''), 75.52–74.77–74.30 (C4, C4', C4'', C2, C2''), 75.22 (2CH2Ph), 74.99 (CH2Ph), 73.28 (3CH2Ph), 72.24 (CH2Ph), 72.07 (CH2Ph), 72.16 (C5 and C5'), 72.01 (C5''), 71.57 (CH2Ph), 69.69 (C6''), 69.24 (C6 and C6'), 69.04 (C2''), 64.26 (C7), 48.31 (C9), 28.78 (C8).

3-azidopropyl 3,4,6-tri-O-benzyl- α -D-mannopyranosyl-(1-2)-3,4,6-tri-O-benzyl- α -D-mannopyranosyl-(1-2)-3,4,6-tri-O-benzyl- α -D-mannopyranoside 23: 22 (1.0 g, 0.51 mmol) was deacetylated in 2 h in 30 ml of methanol/THF (2/1, v/v) in presence of sodium according to the procedure B. After the work up, **23** (0.93 g, quantitative) was obtained. HRMS: calculated for C₈₄H₉₅N₄O₁₆[M+NH₄]⁺: m/z 1415.6743, found: 1415.6858. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.36–6.94 (m, 30H, HAr), 5.13 (s, 1H, H1'), 5.05 (s, 1H, H1''), 4.83 (s, 1H, H1), 4.77–4.20 (m, 18H, CH2Ph), 4.0–4.07 (m, 2H, H2', H2''), 3.90–3.41 [m, 17H: 3.87(H2), 3.70–3.87 (H3, H3', H3''), 3.60–3.85 (H4, H4', H4''), 3.90–3.80 (H5, H5''), 3.63 (H5''), 3.50–3.70 (2H6, 2H6', 2H6''), 3.55 (H7a)], 3.17 (m, 1H, H7b), 3.10 (t, *J*=6.8 Hz, 2H, 2H9), 2.17 (s, 1H, OH), 1.64–1.55 (m, 2H, 2H8). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 138.53 (CqAr), 138.51 (CqAr), 138.46 (CqAr), 138.45 (CqAr), 138.37 (CqAr), 138.28 (CqAr), 138.16 (CqAr), 138.05 (CqAr), 128.48 (CAr), 128.41 (CAr), 128.37 (CAr), 128.32 (CAr), 128.29 (CAr), 128.02 (CAr), 127.90 (CAr), 127.84 (CAr), 127.80 (CAr), 127.75 (CAr), 127.58 (CAr), 127.48 (CAr), 127.42 (CAr), 125.54 (CAr), 101.03 (C1''), 100.88 (C1'), 98.77 (C1), 79.93, 79.36, 79.24 (C3, C3', C3''), 75.30, 75.11 (C2, C2'), 75.18 (CHPh), 75.06 (CHPh), 75.00 (CHPh), 74.94, 74.72, 74.29 (C4, C4', C4''), 73.29 (3 CH2Ph), 72.33 (CH2Ph), 72.08 (CH2Ph), 71.86 (CH2Ph), 72.21, 71.98, 71.60 (C5, C5', C5''), 69.71, 69.27, 68.90 (C6, C6', C6''), 68.54 (C2''), 64.28 (C7), 48.34 (C9), 28.81 (C8).

3-azidopropyl 2-O-benzoyl-3,4,6-tri-O-benzyl- α -D-mannopyranosyl-(1-2)-3,4,6-tri-O-benzyl- α -D-mannopyranosyl-(1-2)-3,4,6-tri-O-benzyl- α -D-mannopyranoside (24) - 23 (0.17 g, 0.12 mmol) was glycosylated with **17** (0.086 g, 0.12 mmol) in 4 ml of CH₂Cl₂ in the presence of molecular sieves 4 A, NIS (0.059 g, 0.26 mmol) and TfOH (2 μ L, 0.024 mmol) at 0°C during 5 min according to procedure A. After purification, **24** (0.16 g 70%) was obtained. HRMS: calculated for C₁₁₈H₁₂₃N₃O₂₂Na[M+Na]⁺: m/z 1956.8490, found: 1956.8569. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.08–6.83 (m, 65H, HAr), 5.71–5.68 (m, 1H, H2'''), 5.18 (d, *J*=1.1 Hz, 1H, H1'), 5.13 (d, *J*=1.1 Hz, 1H, H1''), 5.02 (d, *J*=1.5 Hz, 1H, H1'''), 4.83 (d, *J*=1.2 Hz, 1H, H1), 4.82–4.23 (m, 24H, CH2Ph), 4.10–3.95 (m, 4H, H2', H2'', H3''', H4'''), [3.95–3.41 (m, 20H: 3.97–3.80 H2, H5, H5', H5'', 3.90–3.70 H3, H3', H3'', 3.75–3.58 H4, H4', H4'', 3.62–3.55 H5'''), 3.77–3.44 2H6, 2H6', 2H6'', 2H6'''), 3.57–3.49 H7a)] 3.15 (m, 1H, H7b), 3.10 (t, *J*=6.9 Hz, 2H, 2H9), 1.60 (m, 2H, 2H8). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 165.46 (C=O, Bz), 138.66 (CqAr), 138.61 (CqAr), 138.58 (CqAr), 138.55 (CqAr), 138.51 (CqAr), 138.45 (CqAr), 138.41 (CqAr), 138.40 (CqAr), 138.31

(CqAr), 138.16 (CqAr), 133.10 (CAr), 130.14 (CqAr), 130.04 (CAr), 128.52 (CAr), 128.37 (CAr), 128.35 (CAr), 128.29 (CAr), 128.15 (CAr), 128.10 (CAr), 128.04 (CAr), 127.91 (CAr), 127.83 (CAr), 127.77 (CAr), 127.67 (CAr), 127.54 (CAr), 127.50 (CAr), 127.45 (CAr), 101.29 (C1'), 100.83 (C1''), 99.54 (C1'''), 98.81 (C1), 79.34, 79.23 (C3, C3', C3''), 78.27 (C3'''), 75.39, 75.21, 75.09 (CH₂Ph), 75.73, 75.63, 74.80, 74.74, 74.45 (C4, C4', C4'', C4'''), C2, C2', C2'') 73.38, 73.33, 73.24 (CH₂Ph), 72.38, 72.21, 72.18 (C5, C5', C5''), 71.95 (C5'''), 72.08, 72.32, 71.86, 71.67 (CH₂Ph), 69.83, 69.50, 69.35, 69.06 (C6, C6', C6'', C6'''), 69.10 (C2'''), 64.33 (C7), 48.41 (C9), 28.88 (C8).

3-azidopropyl 3,4,6-tri-O-benzyl- α -D-mannopyranosyl-(1-2)-3,4,6-tri-O-benzyl- α -D-mannopyranosyl-(1-2)-3,4,6-tri-O-benzyl- α -D-mannopyranoside (25) - 24 (0.15 g, 77 μ mol) was deacetylated after 3 h in 30 ml of methanol/THF (1/1, v/v) in presence of sodium according to the procedure B. After the work up, **25** (0.14 g, quantitative) was obtained HRMS: calculated for C₁₁₁H₁₁₉N₃O₂₁Na[M+Na]⁺: m/z 1852.82283, found: 1852.82286. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.17 (m, 60 H, HAR), 5.16-5.13 (m, 2H, H1'', H1'''), 5.05 (m, 1H, H1'), 4.86 (m, 1H, H1), 4.78-4.17 (m, 22H, 11 CH₂Ph), 4.12-4.00 (m, 5H, 1CH₂Ph, H2', H2'', H2'''), 3.92-3.34 [m, 22 H: 3.86 (H2), 3.88-3.69 (H3, H3', H3'', H3'''), 3.75-3.64 (H4, H4', H4'', H4'''), 3.94-3.76 (H5, H5', H5''), 3.61 (H5'''), 3.70-3.48 (2H6, 2H6', 2H6'', 2H6'''), 3.52 (H7a)], 3.21-3.07 (m, 3H, H7b, 2H9), 1.67-1.55 (m, 2H, 2H8). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 138.62 (CqAr), 138.57 (CqAr), 138.54 (CqAr), 138.47 (CqAr), 138.44 (CqAr), 138.41 (CqAr), 138.35 (CqAr), 138.18 (CqAr), 138.13 (CqAr), 128.55 (CAr), 128.49 (CAr), 128.39 (CAr), 128.13 (CAr), 128.07 (CAr), 128.02 (CAr), 127.98 (CAr), 127.81(CAr), 127.71 (CAr), 127.68 (CAr), 127.59, 127.54 (CAr), 127.45 (CAr), 101.33(C1'''), 101.09 (C1''), 101.05 (C1'), 98.82 (C1), 80.20, 79.49, 79.27, 79.21(C3, C3', C3'', C3'''), 75.84, 75.71(C2, C2', C2''), 75.25, 75.14 (CH₂Ph), 74.92, 74.86, 74.42 (C4, C4', C4'', C4'''), 73.43, 73.39, 73.36, 73.29, 72.46, 72.17, 71.98 (CH₂Ph), 71.92, 71.68(C5, C5', C5'', C5'''), 69.89, 69.58, 69.39, 68.93(C6, C6', C6'', C6'''), 68.60 (C2'''), 64.37 (C7), 48.45 (C9), 28.91(C8).

3-aminopropyl α -D-mannopyranosyl-(1-2)- α -D-mannopyranosyl-(1-2)- α -D-mannopyranosyl-(1-2)- α -D-mannopyranoside (26) - A mixture of **25 (0.168 g, 92 μ mol), methanol (5 ml), 1M HCl (20 μ l) and Pd/C (10%) (100 mg) were stirred for 72h under of dihydrogen atmosphere (7 bar). The reaction mixture was filtered through Celite, neutralized with IRA67 resin and concentrated to give **26** (66 mg, quantitative).**

Compound 27 - 25 (88 mg, 63 μ mol) was added to a solution of PMA (20 mg, 107 μ mol) in 3 ml of THF. Then a suspension of copper sulfate pentahydrate (8 mg, 31 μ mol) with sodium ascorbate (9 mg, 44 μ mol) in 0.5 ml of water was added. After 18 hours the reaction mixture was concentrated. The residue was dissolved in CH₂Cl₂ and washed with water, dried (MgSO₄) and concentrated. After purification on silica gel (cyclohexane/ethyl acetate), **27** (66 mg, 66%) was obtained.

Compound C - A mixture of **26 (66 mg, 92 μ mol), DMF (5 ml) and N-methylisatoic anhydride (175 mg, 0.92 mmol) was stirred at room temperature for 48 h then diluted with AcOEt and water. The aqueous phase was concentrated and the residue was purified on a Sephadex G25 column. To eliminate traces of O-mantylated derivatives, the residue was dissolved in a mixture of 0.1M aq NaOH /methanol (11 ml, 10/1 v/v). The mixture was stirred at room temperature during 24 h, neutralized by 1M HCl and concentrated. The residue is purified by HPLC (reverse phase C18, ACN/water). HRMS: calculated for C₃₅H₅₇N₂O₂₂[M+H]⁺: m/z 857.3403, found: 857.3433. ¹H NMR (300 MHz, D₂O) δ 7.74 (s, 1H, NH amide), 7.55-7.35 (m, 2H, HAR), 6.95 – 6.66 (m, 2H, HAR), 5.28 (s, 1H, H1'), 5.24 (s, 1H, H1''), 5.08 (s, 1H, H1), 5.03 (s, 1H, H1'''), 4.23 (s, 1H, NH mantyl), 4.12-4.02 (m, 3H, H2', H2'', H2'''), 4.00 – 3.53 [(m, 23 H: 4.00-3.92 (H2), 3.95-3.80 (H3, H3', H3'', H3'''), 3.80-3.65 (H5, H5', H5'', H5'''), 3.75-3.60 (H4, H4', H4'', H4''') 3.80-3.70 (H7a) 3.67-3.53 (H7b), 3.82-3.65 (2H6, 2H6', 2H6'', 2H6'''), 3.50-3.38 (m, 2H, 2H9), 2.79 (s, 3H, CH3), 1.99-1.82 (m, 2H, 2H8). ¹³C NMR (75 MHz, D₂O) δ 172.19 (CO amide), 149.51 (CqAr mantyl), 131.91 (CAr mantyl), 128.89 (CAr mantyl), 118.60 (CqAr mantyl), 116.76 (CAr mantyl), 112.89 (CAr mantyl), 102.86 (C1'''), 101.29, 101.24 (C1', C1''), 98.85 (C1), 79.67, 79.39, 79.17 (C2, C2', C2''), 73.86, 73.42 (C5, C5', C5'', C5'''), 70.98, 70.91, 70.63 (C2''', C3, C3', C3'', C3'''), 67.76, 67.67, 67.61, 67.47 (C4, C4', C4'', C4'''), 66.12 (C7), 62.02, 61.82, 61.70, 61.52 (C6, C6', C6'', C6'''), 37.38 (C9), 30.33 (CH3 mantyl),**

28.91 (C8).

Diazo transfert route

3-azidopropyl α -D-mannopyranosyl-(1-2)- α -D-mannopyranosyl -(1-2)- α -D-mannopyranosyl-(1-2)- α -D-mannopyranoside (28) - 26 (0.060 g, 79 μ mol) was dissolved in 2 ml of a mixture water/methanol (1/1, v/v) and potassium carbonate (0.033g, 237 μ mol, 3 eq.) and copper sulfate pentahydrate (0.2 mg) were added followed by imidazole-1-sulfonyl azide.HCl, (0.025 g, 119 μ mol, 1.5eq.). After 15h at room temperature, the reaction mixture was concentrated and coevaporated with toluene twice. The residue was dissolved in a mixture of 7 ml pyridine, and 1.5 ml of acetic anhydride. After 48 h at room temperature, the reaction mixture was concentrated. A solution of the residue in ethyl acetate was filtered, washed with water, dried (MgSO₄) and concentrated. After purification on silica gel cyclohexane/ethyl acetate) 0.051 g of acetylated oligosaccharide was obtained. This product was dissolved in 5 ml of methanol and sodium was added in order to have a pH value around 12. After completion of the deacetylation, (TLC monitoring), IR120 (H⁺) resin was added to the reaction mixture until neutrality. The reaction mixture was filtered and concentrated under vacuum to give **28** (29 mg, 50%)

Compound B - 28 (0.028 g, 37 μ mol) was added to a solution of PMA (14 mg, 74 μ mol, 2eq.) in 1 ml of THF. Then a suspension of copper sulfate pentahydrate (4.6 mg, 19 μ mol) with sodium ascorbate (5 mg, 26 μ mol) in 1 ml of water was added. After 5 h the reaction mixture was concentrated. The residue was dissolved in water and washed with CH₂Cl₂ and then passed on Chelex 100 column (elution: water). After desalting using a Sephadex G25 column (elution: water), **B** (20 mg, 60%) was obtained. HRMS: calculated for C₃₈H₅₉N₅O₂₂Na [M+Na]⁺: m/z 960.3549, found: 960.3571 ¹H NMR (300 MHz, D₂O) δ 7.91 (s, 1H, CH triazole), 7.62 (m, 2H, HAr mantyl), 7.29 (m, 2H, HAr mantyl), 5.17 (m, 2H, H1', H1''), 4.91 (m, 2H, H1, H1'''), 4.58 (s, 2H, CH₂ mantyl), 4.43 (m, 2H, 2H9), 3.97 (m, 4H, H2', H2'', H2''', H3), 3.87-3.47 [m: 21 H, H3', H3'', H3''', H2, 2H6, 2H6', 2H6'', 2H6''', H5, H5', H5'', H5''', H4, H4', H4'', H4''', H7a], 3.41-3.33 (m, 2H, H7b and H5'''), 2.92 (s, 3H, CH₃ mantyl), 2.17-2.05 (m, 2H, 2H8).

Enzymatic assay

The culture supernatant of an engineered *P. Pastoris* strain containing about 40mg.L⁻¹ Bmt1p as the only detected protein, CHAPS 0.1% w/v and Triton X100 0.5% v/v was used as enzyme source. The details of genetic constructions and culture conditions will be described elsewhere¹⁸. The assay mixture containing 25 μ L of supernatant, 1mM mantyl-oligomannoside **A**, 20mM GDP-mannose donor, 50 mM Tris/maleate pH 7, 20 mM MnCl₂, 0.3 % Triton X-100, in a total volume of 100 μ L with protease inhibitors pepstatin and leupeptin, was incubated for 4h, 20h and 48h at 28°C (standard assay). The reaction was stopped by heating the mixture for 5 min at 95°C. After removal of the denatured protein by centrifugation, each reaction mixture was analyzed by normal phase HPLC as described below.

Analysis of fluorescent substrates and enzyme reaction products by HPLC

An Amide-80 (TSK gel) column (4.6mm x 25cm) was used for HPLC analysis, with an elution in 50 min at a flow rate of 0.8 mL/min, using a gradient of two eluents, A (10% acetonitrile (ACN) 3% acetic acid, triethylamine pH 7.3 / ACN) (25: 75 v / v) and B (10% ACN, 3% acetic acid, triethylamine pH 7.3 / ACN) (50: 50 v / v). Fluorimetric detection of the mantyl-oligomannosides was conducted with excitation and emission wavelengths at 334 and 437 nm, respectively.

Treatment with α -mannosidases

The α -mannosidases treatment of the synthetic products and the reaction mixture after mannosyltransferase assays was carried out in 20 mM sodium acetate buffer pH 5, containing 2 mM ZnCl₂ and 0.15 units of α -exomannosidase from Jack Bean (Prozyme) at 37°C for 24h. Resulting products were analyzed by HPLC. Reaction mixture containing Bmt1p without incubation was used as control for the substrate digestion with α -mannosidase.

Acknowledgements:

This work has been supported by the Agence Nationale de la Recherche CaBMT and by a grant from "Ministère de l'Enseignement Supérieur" to G. S-L.

References

- 1 D.H. Kett, E. Azoulay, P.M. Echeverria, J.L. Vincent, Extended Prevalence of Infection in ICU Study (EPIC II) Group of Investigators *Crit. Care Med.* 2011, **39**, 665-70.
- 2 F. Dromer, R. Chevalier, B. Sendid, L. Improvisi, T. Jouault, R. Robert, J.-M. Mallet, D. Poulain, *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002, **46**, 3869-76; H. Xin, S. Dziadek, D.R. Bundle, J.E. Cutler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008, **105**, 13526-31.
- 3 C. Mille, C. Fradin, F. Delplace, P.A. Trinel, A. Masset, N. François, B. Coddeville, P. Bobrowicz, T. Jouault, Y. Guerardel, S. Wildt, G. Janbon, D. Poulain *Glycobiology.* 2012, **22**, 1332-42. C. Mille, P. Bobrowicz, P.A. Trinel, H. Li, E. Maes, Y. Guerardel, C. Fradin, M. Martínez-Esparza, R.C. Davidson, G. Janbon, D. Poulain, S. Wildt. *J. Biol. Chem.* 2008, **283**, 9724-36.
- 4 K. Anumula, R. Schulz, N. Back, *Peptides* 1992, **13**, 663-9.
- 5 E. Vorstenbosch, T. Pape, M. V. Rodnina, B. Kraal, W. Wintermeyer. *EMBO Journal* 1996, **15**, 6766. D. Locke, C.G. Bevans, L.X. Wang, Y. Zhang, A.L. Harris, Y.C. Lee, *Carbohydr Res* 2004, **339**, 221-31.
- 6 A. Koizumi, I. Matsuo, M. Takatani, A. Seko, M. Hachisu, Y. Takeda, Y. Ito, *Angew Chem, Int Ed* 2013, **52**, 7426-7431. E. Blattes, A. Vercellone, H. Eutamene, C.-O. Turrin, V. Theodorou, J.-P. Majoral, A.-M. Caminade, J. Prandi, J. Nigou, G. Puzo, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2013, **110**, 8795-8800, S8795/1-S8795/9. L. Chen, Z.P. Tan, *Tetrahedron Lett* 2013, **54**, 2190-2193. M. Collot, C. Loukou, J.-M. Mallet in: Progress in the synthesis of complex carbohydrate chains of plant and microbial polysaccharides 2009: 371-397; Editor: Nikolay E. Nifantiev; ISBN: 978-81-7895-424-0.
- 7 A.A. Karelin, YuE. Tsvetkov, G. Kogan, S. Bystricky, N. E. Nifantiev, *Russ. J. Bioorg. Chem.*, 2007, **33**, 110-21.
- 8 M. Collot, B. Sendid, A. Fievez, C. Savaux, A. Standaert-Vitse, M. Tabouret, A.S. Druchbert, P. M. Danze, D. Poulain, J.-M. Mallet, *J. Med. Chem.* 2008, **51**, 6201-6210, F. Dalle, T. Jouault, P.-A. Trinel, J. Esnault, J.-M. Mallet, P. d'Athis, D. Poulain, A. Bonnin, *Infect. Immun.* 2003, **71**, 7061-8.
- 9 M. Meldal, C. W. Tornøe, *Chem. Rev.* 2008, **108**, 2952-3015; C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* 2002, **67**, 3057-3062; V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2002, **41**, 2596-2599.
- 10 D. Kushwaha P. Dwivedi, S. K. Kuanar, V. K. Tiwari, *Curr. Org. Syn.*, 2013, 10, 90. M. Niemietz, L. Perkams, J. Hoffman, S. Eller, C. Unverzagt, *Chem. Comm.* 2011, **47**, 10485-7.
- 11 X. Fu, C. Albermann, J. Jiang, L. Liao, C. Zhang, J. S. Thorson, *Nature Biotechnology* 2003, **21**, 1467-1469. J. Reisch, C. O. Usifoh, E. Okoh, J. O. Oluwadiya, *Pharmazie* 1992, **47**, 18-20. C. Bogentoft, O. Ericsson, M. Kvist, B. Danielsson, *Acta Pharm. Suec.*, 1971, **8**, 667-70.
- 12 E.D. Goddard-Borger, R.V. Stick, *Org Let* 2007, **19**, 3797-3800.
- 13 M. Collot, J. Savreux, J.-M. Mallet, *Tetrahedron*, 2008, **64**, 1523-35.
- 14 S. Sarbajna, A. K. Misra, N. Roy *Synthetic. Comm.*, 1998, 2559-61.
- 15 J. Szmuszkowicz, M.P. Kane, L.G. Laurian, C.G. Chidester, T. A. Scahill, *J. Org. Chem.*, 1981, **46**, 3562-4.
- 16 G. Despras, C. Bernard, A. Perrot, L. Cattiaux, A. Prochiantz, H. Lortat-Jacob, J.-M. Mallet, *Chem. Eur. J.* 2013, **19**, 531-40.
- 17 G. Despras, R. Robert, B. Sendid, E. Machez, D. Poulain, J.-M. Mallet, *Bioorg. Med. Chem.*, 2012, **20**, 1817-31.
- 18 Full details on recombinant enzyme production and specificity measurements will be published elsewhere.

Matériels et Méthodes

Matériels et Méthodes

A. Extraction et purification des oligomannosides

1. Les mannanes ou (PPM) de souche de *C. albicans* et conditions de culture :

Les mannanes ou (PPM) utilisés dans ce travail ont été fournis par l'équipe du Professeur Daniel Poulain (*Candida* et Candidoses, Inserm U995, Lille2). Ils ont été obtenus selon le protocole suivant. Deux souches de la levure *C. albicans* ont été mises en culture, la souche mutée en CaBMT1 et la souche mutée en CaBMT3 dans le milieu YPD [1% (p / v) d'extrait de levure / 2% (p / v) de peptone / 2% (p / v) de glucose] à 28°C. Les PPM de ces souches ont été extraits comme décrit par Faille et collaborateurs. Brièvement, les cellules ont été autoclavées dans le tampon citrate 0,02 M à 125 °C pendant 90 minutes puis la liqueur de Fehling a été ajoutée au surnageant afin de précipiter les PPM. Les PPM ont été ensuite lavés avec un mélange de méthanol / acide acétique (8 : 1, v / v) puis séchés à l'aide d'un SpeedVac après un lavage final dans du méthanol (Faille *et al*, 1992).

Nous avons également utilisé des mannanes de *S. cerevisiae* qui sont commercialisés par SIGMA ; M7504-1G.

2. Hydrolyse et acétolyse des mannanes :

Les oligomannosides naturels provenant des PPM des souches de *C. albicans* déficientes en CABMT1 ou en CABMT3 ont été obtenus après une hydrolyse acide des différents mannanes par l'ajout de HCl 10mM à 100°C pendant 1h (Faille *et al*, 1991) suivie d'une acétolyse des fractions acido-stables obtenues : 250 mg de mannanes auxquels on ajoute dans l'ordre 10 ml d'acide acétique, 10 ml d'anhydride acétique, 1ml d'acide sulfurique sont homogénéisés à l'aide d'un agitateur pendant 24 heures à 25°C. Le surnageant est récupéré après une centrifugation à 4500g, pendant 10min à 4°C, puis déposé sur 40ml de glace afin d'arrêter la réaction d'acétolyse (Stewart *et al*, 1968). Dans le cas des PPM de *S. cerevisiae*, l'acétolyse est effectuée de la même manière sans hydrolyse acide préalable.

3. Extraction, désacétylation des oligomannosides :

Après avoir ajusté le pH à 6-7 par ajout de bicarbonate de sodium en poudre, les oligomannosides sont récupérés par deux extractions avec 100 ml de chloroforme (CHCl₃) ;

les deux phases chloroformiques sont lavées par agitation et décantation avec 20ml de solution de bicarbonate de sodium saturée puis évaporées à l'aide d'un évaporateur rotatif. L'échantillon est repris par 50ml de méthanol, et 50ml NaOH 0,2M, le pH est ajusté avec NaOH 1M à pH =11 puis le mélange est incubé pendant 1h30 à 4°C. L'échantillon est concentré à l'évaporateur rotatif puis déposé sur colonne (2,1cm x 15cm) de DOWEX 50 x 8, H⁺, résine polystyrène échangeuse de cations (mesh 25-50), l'élution se fait avec l'H₂O. Les fractions contenant les oligosaccharides sont repérées après dépôt sur CCM et révélation à l'orcinol sulfurique, réunies et neutralisées avec 10ml d'ammoniaque (NH₄OH) diluée puis concentrées.

4. Fractionnement et purification des oligomannosides :

a. Gel-filtration sur Bio-gel P6:

L'échantillon contenant les oligosaccharides obtenus par acétolyse, est injecté sur colonne de Bio-gel P6 (BIORAD) (66 cm x 1,5 cm), l'élution se fait avec l'eau à un débit constant de la colonne de 8ml/heure. En sortie de colonne des fractions de 1,3 ml sont récupérées. Un repérage à l'orcinol est effectué pour situer les fractions dans lesquelles se trouvent les oligosaccharides. Les tubes positifs (1tube sur 2) sont analysés en chromatographie sur couche mince. La migration est réalisée pendant 6 heures dans un solvant composé de n-butanol/acide acétique/ eau (2 : 1 : 1,5). Par la suite les couches minces sont révélées à l'orcinol, les fractions identifiées sont concentrées à l'évaporateur rotatif puis lyophilisées.

b. Sur résine échangeuse d'anions :

La séparation est réalisée sur une colonne de résine échangeuse d'anions (1cmx13cm), type Dowex 1x2 (forme formiate / BIO-RAD / 200-400 mesh). Les échantillons sont repris dans 1ml d'eau et 100 µl NH₄OH à 10% afin d'ajuster le pH vers 9. Les oligosaccharides neutres sont élués avec l'eau, les oligosaccharides acides sont élués avec de l'acétate de pyridine 0,2 M. Après un repérage à l'orcinol les fractions dans lesquelles se trouvent les oligosaccharides neutres et phosphorylés sont concentrées.

c. Sur Bio-gel P4 :

Les oligomannosides neutres de haut poids moléculaire ont été séparés en familles d'oligomannosides de degré de polymérisation défini en les injectant sur une colonne de Bio-gel P4 (BIORAD) (1,5x70cm), l'élution se fait avec de l'eau et avec un débit de 6ml/heure.

En sortie de colonne un repérage à l'orcinol est effectué et les fractions positives sont déposées sur un support de chromatographie : gel silice (60 MERCK). Après migration dans les mêmes conditions de la partie (4.a) et révélation à l'orcinol les fractions contenant des oligomannosides de degrés de polymérisation voisins ont été réunies.

d. Sur Bio-gel P2 :

Les fractions neutres de faible DP sont injectées sur une colonne de Bio-gel P2 (BIORAD) (90cm x1.7cm). Pour les conditions d'élution et de migration se référer à la partie (4.a). Après révélation à l'orcinol les fractions présentant un profil similaire de migration sont réunies. Après plusieurs passages sur la même colonne, des oligomannosides de degré de polymérisation défini ont été obtenus.

B. Dérivation des oligomannosides

1. Couplage des oligomannosides à la 2-Aminopyridine :

Le couplage des oligomannosides à la 2-Aminopyridine a été décrit par Hase et collaborateurs dans une étude publiée en 1994 (**Hase *et al*, 1994**). 100 µg de substrat (ou oligomannosides) sont incubés à 80°C pendant 1heure en présence de 20µl de la solution A (1) puis 1heure en présence de 70 µl de la solution B (2). Les échantillons sont ensuite séchés à l'azote après l'ajout successif de méthanol à 75 % et à 80%. Ensuite les produits sont repris par 1ml d'eau et le pH est ajusté à 10 par l'ajout d'ammoniaque (NH₄OH 25%). Afin d'éliminer l'excès du fluorophore, 10 extractions avec le chloroforme sont effectuées et à chaque extraction les phases aqueuses sont récupérées, le pH est amené à (5-6) par l'ajout d'acide acétique et les différentes fractions sont lyophilisées.

1-La solution A est préparée par dissolution de 552 mg de la 2-Aminopyridine (ALDRICH) dans 200 µl d'acide acétique glacial et chauffage à 80°C pendant quelques minutes.

2-La solution B est préparée en faisant dissoudre 250 mg du complexe diméthylamine borate (ALDRICH) dans une solution contenant 100µl d'acide acétique et 62.5 µl H₂O.

2. Purification des oligomannosides marqués :

Afin de purifier les produits marqués, les échantillons sont repris par 100 µl H₂O et injectés sur une colonne C18 (Sep-Pak, Waters®), la première fraction est éluée par 3 ml d'H₂O après lavage de la colonne par 5ml acétonitrile ACN/H₂O (80/20), La deuxième

fraction est éluée par 5 ml ACN/H₂O (25/75) pour éluer les produits retenus sur la colonne puis cette dernière fraction est lyophilisée.

C. Les conditions d'activité enzymatique :

1. Action des enzymes recombinantes (Bmtps) en présence des substrats dérivés :

Les essais d'activité enzymatique sont effectués en présence des différentes enzymes recombinantes produites au laboratoire chez *Pichia Pastoris* (1µg) dans un milieu réactionnel de 100 µl contenant : tampon Tris/maléate 20 mM pH7 ou tampon citrate 20mM pH6.5, MnCl₂ 20 mM ou CaCl₂ 20mM, Triton X 100 0.3%, GDP-Man 20 mM et des substrats accepteurs de nature oligomannosidique couplés à la 2-Aminopyridine ou au mantyl (0.1mM). L'ensemble est incubé à 28°C pendant différents temps (conditions standard : 48 heures en présence de Bmt1p ou 30min en présence de Bmt3p).

2. Action des α-1,2/1,3/1,6-mannosidases :

Le milieu réactionnel (20µL) contenant les oligomannosides provenant des essais enzymatiques avec les Bmtps est incubé 24 à 48h à 37°C avec 0.15 UI d'α-exomannosidases (Prozyme) dans 20mM d'acétate de Na pH5, 2mM de ZnCl₂.

D. Méthodes analytiques utilisées pour l'analyse des oligomannosides:

1. Chromatographie sur couche mince (CCM) :

Les chromatographies sur couche mince (CCM) sont réalisées sur des plaques de silice (TLC Silica gel 60 [20x20 cm] - MERCK). La séparation a été effectuée en utilisant un solvant composé d'un mélange de n-butanol/acide acétique/ eau (2 : 1 : 1,5) dans une cuve chromatographique saturée avec ce même solvant. Les CCM ont pour but d'identifier la présence des oligomannosides qui sont visualisés par pulvérisation d'un mélange d'orcinol / acide sulfurique (2 % d'orcinol dans l'acide sulfurique 20 %, (v/v)) suivie d'une révélation à 110C°, pendant 5 minutes.

2. Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) :

Nous avons travaillé sur une HPLC de type Variant ProStar équipée d'une colonne TSK gel Amide-80 (4.6mm x 25cm) de phase normale couplée à un détecteur de fluorescence avec une longueur d'onde λ d'excitation de 310 nm et λ d'émission de 380 nm pour les

substrats couplés à la 2-Aminopyridine **(a)** et une longueur d'onde λ d'excitation de 334 nm et λ d'émission de 437 nm pour les substrats couplés au mantyl **(b)**. L'éluion s'effectue en 60 **(a)** ou 50 **(b)** minutes, à un débit de 0,8 mL/min, grâce à 2 éluants, le A (10% acétonitrile (ACN) 3% Acide acétique, triéthylamine PH 7 / ACN) (25 : 75 ; v/v)) et le B (10% ACN, 3% Acide acétique, triéthylamine pH 7 / ACN) (50 : 50 ; v/v). Les programmes analytiques utilisés sont détaillés dans les Tableaux 1 et 2.

Tableau 1 : Programme dérivés 2AP

Time (min)	Flow Rate (mL.min⁻¹)	% A	% B
0	0.80	90	10
5	0.80	90	10
45	0.80	0	100
60	0.80	0	100
62	0.80	90	10
70	0.80	90	10

Tableau 2 : Programme dérivés mantylés

Time (min)	Flow Rate (mL.min⁻¹)	% A	% B
0	0.80	90	10
5	0.80	90	10
30	0.80	18	82
31	0.80	0	100
36	0.80	0	100
38	0.80	90	10
50	0.80	90	10

Nous avons également utilisé l'HPLC pour collecter les produits de la réaction enzymatique de Bmt1p et/ou Bmt3p avec les substrats mantylés (HPLC préparative). Les produits de la réaction enzymatique sont purifiés sur une colonne de charbon (SPE-Carbograph 150mg, Alltech®) dans un mélange d'eau/ acétonitrile (50:50, v / v) puis analysés par spectrométrie de masse (MALDI-TOF) et RMN comme décrit ci-dessous.

3. Spectrométrie de masse MALDI-TOF :

Les analyses MALDI-TOF (Ionisation par Désorption Laser Assistée par une Matrice, analyseur à temps de vol) sont réalisées sur un spectromètre de masse Voyager Elite (DE-STR, PerSeptive Biosystem®). La désorption et l'ionisation sont obtenues à l'aide d'un laser à azote pulsé (longueur d'onde : 337 nm). Le spectromètre opère en mode réflectron positif et négatif avec une tension d'accélération de 20 kV, le délai d'extraction étant de 250 nsec. Les spectres présentés résultent de l'accumulation des spectres acquis sous 100 tirs pour les échantillons et 25 tirs pour les matrices. Les fractions d'oligosaccharides à analyser sont diluées dans l'eau distillée à une concentration de 20 à 50 µg/ml. Sur la cible métallique sont déposés 1µl de matrice et 1µl d'échantillon, puis l'ensemble est séché. Les matrices employées sont le DHB : acide 2,5-dihydroxybenzoïque (à 10mg/ml dans un mélange méthanol/eau, (v : v)) et l'aminoquinoline (AQ) (à 10mg/ml dans un mélange composé de 5vol de méthanol/eau, (v : v)) et 1vol d'acétate d'ammonium 2mM dans acétonitrile/eau, v : v).

4. Analyse des différentes fractions d'oligomannosides en RMN :

Les analyses RMN sont réalisées sur un spectromètre Bruker® de 9,4 T équipé d'une sonde 5mm large bande (²H, ¹H, X) (Centre Commun de Mesure RMN, USTL, Villeneuve d'Ascq). A ce champ magnétique les protons (¹H) résonnent à 400. 33 MHz, les carbones (¹³C) résonnent à 100.66 MHz. Les séquences impulsionnelles utilisées sont celles de la librairie de programme Bruker. Toutefois, les délais et les impulsions ont été optimisés pour chaque expérience. Les expériences RMN ont été réalisées à 300 °K et les déplacements chimiques (δ) calibrés à 2.225 ppm pour le proton et 31.55 ppm pour le carbone. Les déplacements chimiques sont mesurés par rapport à une référence interne pour les protons et les carbones : les protons de l'acétone résonnent à 2.225 ppm. La fréquence de référence fixée à 0 Hz est celle des protons du tétraméthylsilane TMS, Si(CH₃)₄. Avant d'enregistrer les spectres homonucléaires et hétéronucléaires, les échantillons anhydres ont été dissous dans 500µl de D₂O, lyophilisés puis solubilisés à nouveau dans le même solvant. Cette opération

est répétée trois fois de manière à remplacer les protons chimiquement échangeables par du deutérium ^2H qui dans les conditions standard ne résonne pas. Néanmoins il subsiste un signal résiduel d'eau visible sur le spectre et noté HOD. Cette substitution permet de rendre invisibles les signaux RMN inutiles à l'élucidation des séquences primaires et de gagner sensiblement en signal. Enfin après trois cycles d'échange, par lyophilisation, les échantillons ont été solubilisés dans 500 μL de D $_2\text{O}$ et mis en tube de 5mm.

E. Enzymes recombinantes Bmt1p et Bmt3p :

1. Analyse SDS-PAGE :

Les surnageants de culture contenant la protéine recombinante Bmt1p ou Bm3p ont été chauffés pendant 10 min à 100°C puis analysés par SDS-PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis) sur gel de 15% avec le système électrophorétique Mini-Protean 3 de Bio-Rad. Le témoin de masse *Precision Plus Protein Standards* BIO-RAD a été utilisé pour le repère des masses. La révélation des gels a été effectuée au bleu de Coomassie en utilisant une solution commerciale de l'*Instant Blue* (Expedeon).

2. Purification de Bmt1p et Bmt3p par chromatographie d'échange d'ions :

Les essais préliminaires de purification des enzymes (Bmt1p et Bmt3p) surexprimées dans le surnageant de culture ont été réalisés par chromatographie d'échange d'ions à l'aide du système Akta FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography, GE Healthcare). Tout d'abord, la colonne HiTrap SP FF 1ml (échangeur de cation) (GE Healthcare) a été équilibrée avec du tampon A (Acétate de sodium 20mM pH 5, heptyl-mannose 0.5%) ensuite le surnageant de culture contenant soit Bmt1p ou Bmt3p a été chargé sur la colonne avec un débit de 0,5 ml / min. A la fin du chargement, la colonne a été rééquilibrée avec le tampon A (Acétate de sodium 20mM pH 5, heptyl-mannose 0.5%). L'élution a été effectuée en utilisant le tampon B (Acétate de sodium 20mM pH 5, heptyl-mannose 0.5%, NaCl 1M) à 2 ml / min pendant 10 min. Les fractions éluées ont été recueillies et analysées par SDS-PAGE (gel à 15%). La concentration en protéine a été déterminée par densitométrie GS-800 (Bio-Rad Laboratories) à l'aide du logiciel Quantity One. Pour éliminer l'excès de NaCl, la protéine éluée a été dialysée à l'aide d'un Vivaspin 30 kDa MWCO (GE Healthcare) en présence de 50 ml de tampon A à 5000 g et à + 4 ° C. Enfin, l'échantillon a été concentré 10 fois en utilisant le même Vivaspin 30.

Nous avons également effectué des tests de purification de Bmt1p et de Bmt3p par chromatographie d'échange d'anion on utilisant comme colonne HiTrap Q FF 1ml (échangeur

d'anion) (GE Healthcare), le tampon A (Tris HCl 20mM pH8, heptyl-mannose 0.5%), le tampon B (Tris HCl 20mM pH8, heptyl-mannose 0.5%, NaCl 1M). Les différentes étapes de purification ont été réalisées de la même manière que la chromatographie d'échange de cation (protocole ci-dessus).

F. Traitement des PPMs des souches Δ BMT7/SC5314 de *C. albicans*

1. Séparation sur colonne Sephacryl 300 :

Les PPMs des souches Δ BMT7/SC5314 de *C. albicans* ont été préparés selon le protocole détaillé dans la partie **A.1**. Les PPMs ont été ensuite dialysés (coupure 3500 Da) à 4°C pendant 48h puis analysés par SDS-PAGE afin de vérifier leur tailles. Les PPMs de la souche Δ BMT7 de *C. albicans* ont été fractionnés par chromatographie sur Séphacryl 300 (66 cm x 1,5 cm) (10-1500kDa), l'élution a été effectuée par NaCl 0.05M à un débit de 8ml/heure. Pour les conditions de migration sur CCM et de repérage à l'orcinol se référer à la partie **4.a**. Puis nous avons séparé les parties acido-stables et acido-labiles des PPMs des deux souches par la réalisation d'une hydrolyse acide et d'une purification par chromatographie sur Bio-gel P6 (se référer aux parties **A.2** et **4.a**) pour la réalisation des études structurales.

2. SDS-PAGE et révélation par le réactif de Schiff :

Les PPM provenant des différentes souches de *C. albicans* ont été analysés par SDS-PAGE 10 % ensuite les gels ont été mis dans l'acide trichloroacétique 12.5% pendant 30min puis rincés à l'eau distillée pendant 15 min. Les gels ont été ensuite traités par l'acide périodique 1% (préparé dans l'acide acétique 3% fraîchement préparé) pendant 50 min. Après plusieurs lavages avec de l'eau les gels sont colorés par le réactif de Schiff (SIGMA) pendant 50 min. Afin d'enlever l'excès de coloration, les gels ont été lavés 3 fois avec le métabisulfite 0.5% fraîchement préparé pendant 10 min puis avec de l'eau distillée (**Zacharius et al, 1969**).

Les protocoles complémentaires à cette partie matériels et méthodes sont inclus dans les articles N°2 et 3.

Bibliographie

Bibliographie

A-B

- Aebi M.** (2013). N-linked protein glycosylation in the ER. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1833** : 2430-2437.
- Bai C, Xu X L, Chan FY, Lee RTH, Wang Y.** (2006). MNN5 encodes an iron-regulated alpha-1,2-mannosyltransferase important for protein glycosylation, cell wall integrity, morphogenesis, and virulence in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*. **5** : 238–247.
- Barlowe C.** (2000). Traffic COPs of the early secretory pathway. *Traffic*, **1**, 371-377.
- Bates S, Hughes HB, Munro CA, Thomas WP, MacCallum DM, Bertram G, Atrih A, Ferguson MA, Brown AJ, Odds FC, Gow NA.** (2006). Outer chain N-glycans are required for cell wall integrity and virulence of *Candida albicans*, *The Journal of Biological Chemistry*. **281**, 90–98.
- Bitar D, Lortholary O, Dromer F, Coignard B, Che D.** (2013). Mycoses invasives en France métropolitaine, PMSI 2001-2010 : incidence, létalité et tendances. *Bulletin épidémiologique hebdomadaire*. **12-13** : 109-114.
- Bougnoux ME, Kac G, Aegerter, P, d'Enfert, C, Fagon, JY.** (2008). Candidemia and candiduria in critically ill patients admitted to intensive care units in France: incidence, molecular diversity, management and outcome, *Intensive Care Med*. **34**, 292-299.
- Bourne Y, Henrissat B.** (2001). Glycoside hydrolases and glycosyltransferases: families and functional modules. *Curr. Opin. Struc. Biol.* **11**, 593–60.
- Breton C, Bettler E, Joziassé DH, Geremia RA, Imberty A.** (1998). Sequence-function relationships of prokaryotic and eukaryotic galactosyltransferases. *J. Biochem.* **123**, 1000–9.
- Breton C, Imberty A.** (1999). Structure/function studies of glycosyltransferases. *Curr. Opin. Struc. Biol.* **9**, 563–71.
- Brigance WT, Barlowe C, Graham TR.** (2000). Organization of the yeast Golgi complex into at least four functionally distinct compartments. *Mol Biol Cell*. **11**, 171-182.

C

- Cambi A, Netea MG, Mora-Montes HM, Gow NA, Hato SV, Lowman DW, Kullberg BJ, Torensma R, Williams DL, Figdor CG.** (2008). Dendritic cell interaction with *Candida albicans* critically depends on N-linked mannan. *J. Biol. Chem.* **283**, 20590–20599.
- Campbell JA, Davies GJ, Bulone V, Henrissat B.** (1997). A classification of nucleotide-diphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* **326**, 929-939.
- Cantelli C, Trinel PA, Bernigaud A, Jouault T, Polonelli L, Poulain D.** (1995). Mapping of β -1,2-linked oligomannosidic epitopes among glycoconjugates of *Candida* species, *Microbiology*. **141**, 2693-2697.
- Chaffin WL.** (1985). Effect of tunicamycin on germ tube and yeast bud formation in *Candida albicans*. *Journal of General Microbiology*. **131**, 1853–1861.
- Charnock SJ, Davies GJ.** (1999). Structure of the nucleotide-diphospho-sugar transferase, SpsA from *Bacillus subtilis*, in native and nucleotide-complexed forms. *Biochemistry*. **38**, 6380–85.

- Clancy CJ**, Nguyen MH. (2013). Finding the ‘missing 50%’ of invasive candidiasis: how nonculture diagnostics will improve understanding of disease spectrum and transform patient care. *Clin Infect Dis.* **56**, 1284–1292.
- Coutinho PM**, Deleury E, Davies GJ, Henrissat B. (2003). An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases. *J. Mol. Biol.* **328**, 307-317.
- Cuenca-Estrella M**, Verweij PE, Arendrup MC, Arikian-Akdagli S, Bille J, Donnelly JP, Jensen HE, Lass-Florl C, Richardson MD, Akova M, Bassetti M, Calandra T, Castagnola E, Cornely OA, Garbino J, Groll AH, Herbrecht R, Hope WW, Kullberg BJ, Lortholary O, Meersseman W, Petrikos G, Roilides E, Viscoli C, Ullmann AJ. (2012). ESCMID guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: diagnostic procedures. *Clin Microbiol Infect.* **18**, 9–18.

D

- Dalle F**, Wächtler B, L'Ollivier C, Holland G, Bannert N, Wilson D, Labruere C, Bonnin A, Hube B. (2010). Cellular interactions of *Candida albicans* with human oral epithelial cells and enterocytes. *Cell Microbiol.* **12**, 248–271.
- Del Palacio A**, Villar J, Alhambra A. (2009). Epidemiology of invasive candidiasis in pediatric and adult populations. *Rev. Iberoam. Micol.* **26**, 2-7.
- Devillers A**, Courjol F, Fradin F, Coste A, Poulain D, Pipy B, Bernardes ES, Jouault T. (2013). Deficient beta-mannosylation of *Candida albicans* phospholipomannan affects the proinflammatory response in macrophages. *PLoS One* **8**, e84771.
- Dodds AE**, Drew R, Johnson M, Danna R, Dabrowski D, Walker V, Prasad M, Alexander B, Papadopoulos G, Perfect J. (2012). Cost of invasive fungal infections in the era of new diagnostics and expanded treatment options. *Pharmacotherapy.* **32**, 890-901.
- Doucey MA**, Hess D, Cacan R, Hofsteenge J. (1998). Protein C-Mannosylation Is Enzyme-catalysed and Uses Dolichyl-Phosphate-Mannose as a Precursor. *Mol. Biol. Cell.* **9**, 291–300.
- Dromer F**, Chevalier R, Sendid B, Improvisi L, Jouault T, Robert R, Mallet JM, Poulain D. (2002) Synthetic analogues of β -1,2 oligomannosides prevent intestinal colonization by the pathogenic yeast *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother.* **46**, 3869–3876.

E-F

- Ellgaard L**, Helenius A. (2003). Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* **4**, 181–191.
- Ernst JF**, Prill SK. (2001). O-glycosylation. *Med. Mycol.* **39**, 1, 67–74
- Fabre E**, Hurtaux T, Fradin C. (2014). Mannosylation of fungal glycoconjugates in the Golgi apparatus. *Curr Opin Microbiol.* **20** : 103-110.
- Faille C**, Wieruszkeski JM, Michalski JC, Poulain D, Strecker G. (1992). Complete ¹H- and ¹³C-resonance assignments for D-mannooligosaccharides of the β -D-(1→2)-linked series released from the phosphopeptidomannan of *Candida albicans* VW.32 (serotype A). *Carbohydr.* **236**, 17–27.

- Faille C**, Wieruszeski JM, Lepage G, Michalski JC, Poulain D, Strecker G. (1991). ¹H-NMR spectroscopy of manno-oligosaccharides of the β -1,2-linked series released from the phosphopeptidomannan of *Candida albicans* VW-32 (serotype A). *Biochem. Biophys.* **181**, 1251–1258.
- Felk A**, Kretschmar M, Albrecht A, Schaller M, Beinhauer S, Nichterlein T, Sanglard D, Korting HC, Schäfer W, Hube B. (2002). *Candida albicans* hyphal formation and the expression of the Efg1-regulated proteinases Sap4 to Sap6 are required for the invasion of parenchymal organs. *Infect. Immun.* **70**, 3689-700.
- Fradin C**, Bernardes ES, Jouault T. (2014). *Candida albicans* phospholipomannan: a sweet spot for controlling host response/inflammation. *Semin Immunopathol.* **281**-14-461-5.
- Fradin C**, Poulain D, Jouault T. (2000). Beta-1,2-linked oligomannosides from *Candida albicans* bind to a 32-kilodalton macrophage membrane protein homologous to the mammalian lectin galectin-3. *Infect. Immun.* **68**, 4391-8.
- Fradin C**, Slomianny M C, Mille C, Masset A, Robert R, Sendid B, Ernst J F, Michalski J C, Poulain D. (2008). Beta-1,2 oligomannose adhesin epitopes are widely distributed over the different families of *Candida albicans* cell wall mannoproteins and are associated through both N- and O-glycosylation processes. *Infect. Immun.* **76**, 4509–4517.
- Furmanek A**, Hofsteenge J. (2000). Protein c-mannosylation: facts and questions. *Acta Biochim Pol.* **47**, 781–789.

G

- Garey KW**, Rege M, Pai MP, Mingo DE, Suda KJ, Turpin RS, Bearden DT. (2006). Time to initiation of fluconazole therapy impacts mortality in patients with candidemia: a multi-institutional study. *Clin Infect Dis.* **43**, 25–31.
- Gloster TM**. (2014). Advances in understanding glycosyltransferases from a Structural perspective. *Current Opinion in Structural Biology.* **28** :131–141
- Gonzalez de Peredo A**, Klein D, Macek B, Hess D, Peter-Katalinic J, Hofsteenge J. (2002). C-mannosylation and o-fucosylation of thrombospondin type 1 repeats. *Mol. Cell. Proteomics.* **1**, 11–18.
- Goto K**, Okawa Y. (2008). Activity and Stability of α - and β -Mannosyltransferases in *Candida albicans* Cells Cultured at High Temperature and at Low pH, *Biol. Pharm. Bull.* **31**, 1333-1336.
- Goto K**, Suzuki A, Shibata N, Okawa Y. (2009). Some Properties of β -1,2-Mannosyltransferases Related to the Biosynthesis of the Acide-Labile Oligomannosyl Side Chains in *Candida albicans* NIH B-792 Strain Cells, *Biol. Pharm. Bull.* **32**, 1921-1923.
- Goto M**. (2007). Protein O-glycosylation in fungi: Diverse structures and multiple functions. *Biosci Biotechnol Biochem.* **71**, 1415-27.
- Gow NA**, van de Veerdonk FL, Brown AJP, Mihai G, Netea MG. (2013). *Candida albicans* morphogenesis and host defence : discriminating invasion from colonization. *Nat Rev Microbiol.* **10** : 112–122.
- Graham TR**, Seeger M, Payne GS, MacKay VL, Emr SD. (1994). Clathrin- dependent localization of alpha 1,3 mannosyltransferase to the Golgi complex of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol.* **127**, 667-678.

Grenouillet F, Hénon T, Kaiser JD, Limat S, Million L, Leroy J. (2013). Usage, impact écologique et économique des antifongiques systémiques en milieu hospitalier en France. *Bulletin épidémiologique hebdomadaire*. **12-13** : 117-120.

H-I

- Hauptle MA**, Pujol FM, Neupert C, Winchester B, Kastaniotis AJ, Aebi M, Hennet T. (2008). Human RFT1 deficiency leads to a disorder of N-linked glycosylation. *The American Journal of Human Genetics*. **82**, 600–606.
- Hall RA**, Bates S, Lenardon MD, MacCallum DM, Wagener J, Lowman DW, Kruppa MD, Williams DL, Odds FC, Brown AJP, Gow NA. (2013). The Mnn2 man-nosyltransferase family modulates mannoprotein fibril length, immune recognition and virulence of *Candida albicans*. *PLoS Pathog*. **9** : e1003276.
- Hall RA**, Gow NAR. (2013). Mannosylation in *Candida albicans* : role in cell wall function and immune recognition, *Molecular Microbiology*, **90**, 1147-1161.
- Hase S**. (1994). High-performance liquid chromatography of pyridylaminated saccharides. *Methods Enzymol*. **230**, 225–237.
- Hasenclever HF**, Mitchell WO. (1961). Antigenic Studies of *Candida*. I. Observation of two antigenic groups in *Candida albicans*. *J. Bact*. **82**, 570-573.
- Herrero AB**, Magnelli P, Mansour MK, Levitz SM, Bussey H, Abeijon C. (2004). KRE5 gene null mutant strains of *Candida albicans* are avirulent and have altered cell wall composition and hypha formation properties. *Eukaryotic Cell*. **3**, 1423–1432.
- Hofsteenge J**, Blommers M, Hess D, Furmanek A, Miroshnichenko O. (1999). The four terminal components of the complement system are C-mannosylated on multiple tryptophan residues. *J. Biol. Chem*. **274**, 32786–32794.
- Hofsteenge J**, Muller DR, de Beer T, Loffler A, Richter WJ, Vliegenthart JF. (1994). New type of linkage between a carbohydrate and a protein: C-glycosylation of a specific tryptophan residue in human RNase Us. *Biochemistry*. **33**, 13524–13530.
- Hu YN**, Walker S. (2002). Remarkable Structural Similarities between Diverse Glycosyltransferases. *Chem. Biol*. **9**, 1287–96.
- Ibata-Ombetta S**, Idziorek T, Trinel PA, Poulain D, Jouault T. (2003). *Candida albicans* phospholipomannan promotes survival of phagocytosed yeasts through modulation of bad phosphorylation and macrophage apoptosis. *J. Biol. Chem*. **278**, 13086–13093.

J

- Jawhara S**, Mogensen E, Maggiotto F, Fradin C, Sarazin A, Dubuquoy L, Maes E, Guérardel Y, Janbon G, Poulain D. (2012). Murine Model of Dextran Sulfate Sodium-induced Colitis Reveals *Candida glabrata* Virulence and Contribution of β -Mannosyltransferases. *J. Biol. Chem*. **287**.11313-11324.
- Jawhara S**, Thuru X, Standaert-Vitse A, Jouault T, Mordon S, Sendid B, Desreumaux P, Poulain D. (2008). Colonization of mice by *Candida albicans* is promoted by chemically induced colitis and augments inflammatory responses through galectin-3. *J Infect Dis*. **197**, 972–80.

- Joly S**, Ma N, Sadler JJ, Soll DR, Cassel SL, Sutterwala FS. (2009). Cutting edge: *Candida albicans* hyphae formation triggers activation of the Nlrp3 inflammasome. *J. Immunol.* **183**, 3578–3581.
- Jones T**, Federspiel NA, Chibana H, Dungan J, Kalman S, Magee BB, Newport G, Thorstenson YR, Agabian N, Magee PT, Davis RW, Scherer S. (2004). The diploid genome sequence of *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci USA.* **101**, 7329–7334.
- Jouault T**, El Abed-El Behi M, Martinez-Esparza M, Breuilh L, Trinel PA, Chamailard M, Trottein F, Poulain D. (2006). Specific recognition of *Candida albicans* by macrophages requires galectin-3 to discriminate *Saccharomyces cerevisiae* and needs association with TLR2 for signaling. *J. Immunol.* **177**, 4679-4687.
- Jouault T**, Lepage G, Bernigaud A, Trinel P A, Fradin C, Wieruszkeski J M, Strecker G, Poulain D. (1995). β -1,2-Linked oligomannosides from *Candida albicans* act as signals for tumor necrosis factor α production. *Infect. Immun.* **63**, 2378–2381.
- Jouault T**, Ibata-Ombetta S, Takeuchi O, Trinel PA, Sacchetti P, Lefebvre P, Akira S, Poulain D. (2003). *Candida albicans* phospholipomannan is sensed through toll-like receptors. *J. Infect. Dis.* **188**, 165-172.
- Jungmann J**, Munro S. (1998). Multi-protein complexes in the cis Golgi of *Saccharomyces cerevisiae* with α -1,6-mannosyltransferase activity. *The EMBO Journal.* **17**, 423–434
- Jungmann J**, Rayner JC, Munro S. (1999). The *Saccharomyces Cerevisiae* protein Mnn10p/Bed1p is a subunit of a Golgi mannosyltransferase complex. *The Journal of Biological Chemistry.* **274**, 6579–6585.

K

- Kamai Y**, Kubota M, Hosokawa T, Fukuoka T, Filler SG. (2001). New model of oropharyngeal candidiasis in mice. *Antimicrob Agents Chemother.* **45**, 3195–3197.
- Kett DH**, Azoulay E, Echeverria PM, Vincent JL. (2011). *Candida* bloodstream infections in intensive care units: analysis of the extended prevalence of infection in intensive care unit study. *Crit Care Med.* **39**, 665–670.
- Kibbler CC**, Seaton S, Barnes RA, Gransden WR, Holliman RE, Johnson EM, Perry JD, Sullivan DJ, Wilson JA. (2003) . Management and outcome of bloodstream infections due to *Candida* species in England and Wales. *J Hosp Infect.* **54**, 18-24.
- Kobayashi H**, Shibata N, Nakada M, Chaki S, Mizugami K, Ohkubo Y, Suzuki S. (1990). Structural Study of Cell Wall Phosphomannan of *Candida albicans* NIH B-792 (Serotype B) Strain, with Special Reference to ^1H and ^{13}C NMR Analyse of Acide-Labile Oligomannosyl Residues. *Arch. Biochem. Biophys.* **278**, 195-204.
- Kobayashi H**, Shibata N, Suzuki S. (1992). Evidence for oligomannosyl residues containing both β -1,2 and α -1,2 linkages as a serotype A-specific epitope(s) in mannans of *Candida albicans*. *Infect. Immun.* **60**, 2106–2109.
- Kobayashi H**, Takahashi SI, Shibata N, Miyauchi M, Ishida M, Sato J, Maeda K, Suzuki S. (1993). Structural Modification of Cell Wall Mannans of *Candida albicans* Serotype A Strains Grown in Yeast Extract-Sabouraud Liquid Medium under Acidic Conditions. *Infect. Immun.* **62**, 968-973.

L

- Lairson LL**, Henrissat B, Davies GJ, Withers SG. (2008). Glycosyltransferases: structures, functions, and mechanisms. *Annu Rev Biochem.* **77**, 521-555.
- Lehle L**, Strahl S, Tanner W. (2006). Protein glycosylation, conserved from yeast to man : A model organism helps elucidate congenital human diseases. *Angewandte Chemie—International Edition.* **45**, 6802–6818.
- Liu J**, Mushegian A. (2003). Three monophyletic superfamilies account for the majority of the known glycosyltransferases. *Protein Sci.* **12**, 1418–31.
- Liu Y**, Filler SG. (2011). *Candida albicans* Als3, a multifunctional adhesin and invasin. *Eukaryot Cell.* **10**, 168–173.
- Lizak C**, Gerber S, Numao S, Aebi M, Locher KP. (2011). X-ray structure of a bacterial oligosaccharyltransferase. *Nature.* **474**, 350-355.
- Lobsanov YD**, Romero PA, Sleno B, Yu B, Yip P, Herscovics A, Howell PL. (2004). Structure of Kre2p/Mnt1p: a yeast alpha1,2- mannosyltransferase involved in mannoprotein biosynthesis. *J Biol Chem.* **279**, 17921-17931.
- Lommel M**, Strahl S. (2009). Protein O-mannosylation : Conserved from bacteria to humans. *Glycobiology.* **19**, 816–828.

M

- Maeda Y**, Watanabe R, Harris CL, Hong Y, Ohishi K, Kinoshita K, Kinoshita T. (2001). PIG-M transfers the first mannose to glycosylphosphatidylinositol on the luminal side of the ER. *EMBO J.* **20**, 250–61.
- Maes E**, Mille C, Trivelli X, Janbon G, Poulain D, Guérardel, Y. (2009). Molecular phenotyping of mannosyltransferases-deficient *Candida albicans* cells by high-resolution magic angle spinning NMR. *J. Biochem.* **145**, 413–419.
- Marchetti O**, Bille J, Fluckiger U, Eggimann P, Ruef C, Garbino J, Calandra T, Glauser MP, Täuber MG, Pittet D. (2004). Epidemiology of candidemia in Swiss tertiary care hospitals: secular trends, 1991-2000. *Clin Infect Dis.* **38**, 311-20.
- Martínez-Duncker I**, Díaz-Jímenez DF, Mora-Montes HM. (2014). Comparative Analysis of Protein Glycosylation Pathways in Humans and the Fungal Pathogen *Candida albicans*. *International Journal of Microbiology.* **V 2014**, ID 267497,16 pages.
- Martinez-Lopez R**, Park H, Myers CL, Gil C, Filler SG. (2006). *Candida albicans* Ecm33p is important for normal cell wall architecture and interactions with host cells. *Eukaryot Cell.* **5**, 140–147.
- McKenzie CG**, Koser U, Lewis LE, Bain JM, Mora-Montes HM, Barker RN, Gow NA, Erwig LP. (2010). Contribution of *Candida albicans* cell wall components to recognition by and escape from murine macrophages. *Infect Immun.* **78**: 1650–1658.
- Mille C**, Bobrowicz P, Trinel PA, Li H, Maes E, Guerardel Y, Fradin C, Martinez-Esparza M, Davidson RC, Janbon G, Poulain D, Wildt S. (2008). Identification of a new Family of Genes Involved in β -1,2-Mannosylation of Glycans in *Pichia pastoris* and *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.* **283**, 9724-9736.

- Mille C**, Fradin C, Delplace F, Trinel PA, Masset A, François, N, Coddeville B, Bobrowicz P, Jouault T, Guerardel Y, Wildt S, Janbon G, Poulain D. (2012). Members 5 and 6 of the *Candida albicans* BMT family encode enzymes acting specifically on β -mannosylation of the phospholipomannan cell-wall glycosphingolipid. *Glycobiology*. **22**, 1332–1342.
- Mille C**, Janbon G, Delplace F, Ibata-Ombetta S, Gaillardin C, Strecker G, Jouault T, Trinel P A, Poulain D. (2004). Inactivation of CaMIT1 inhibits *Candida albicans* phospholipomannan β -mannosylation, reduces virulence, and alters cell wall protein β -mannosylation. *J. Biol. Chem.* **279**, 47952-47960.
- Miyakawa Y**, Kuribayashi T, Kagaya K, Suzuki M, Nakase T, Fukazawa Y. (1992). Role of specific determinants in mannan of *Candida albicans* serotype A in adherence to human buccal epithelial cells. *Infect. Immun.* **60**, 2493–2499.
- Mora-Montes HM**, Bates S, Netea MG, Castillo L, Brand A, Buurman ET, Díaz-Jiménez DF, Jan Kullberg B, Brown AJ, Odds FC, Gow NA. (2010). A multifunctional mannosyltransferase family in *Candida albicans* determines cell wall mannan structure and host fungus-interactions. *Journal of Biological Chemistry*. **285**, 12087–12095.
- Mora-Montes HM**, Bates S, Netea MG, Diaz-Jimenez DF, Lopez-Romero E, Zinker S, Ponce-Noyola P, P Kullberg BJ, Brown AJP, Odds FC, Flores-Carrenn A, Gow NAR. (2007). Endoplasmic Reticulum alpha-glycosidases of *Candida albicans* are required for N-glycosylation, cell wall integrity, and normal host–fungus interaction. *Eukaryot. Cell*. **6** : 2184–2193.
- Morrell M**, Fraser VJ, Kollef MH. (2005). Delaying the empiric treatment of candida bloodstream infection until positive blood culture results are obtained: a potential risk factor for hospital mortality. *Antimicrob Agents Chemother.* **49**, 3640–3645.
- Murciano C**, Moyes DL, Runglall M, Islam A, Mille C, Fradin C, Poulain D, Gow NAR, Naglik JR. R. (2011). *Candida albicans* cell wall glycosylation may be indirectly required for activation of epithelial cell proinflammatory responses. *Infect Immun.* **79** : 4902–4911.

N-O

- Netea MG**, Brown GD, Kullberg BJ, Gow NAR. (2008). An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *Microbiology*. **6**, 67-78.
- Netea MG**, Gow NA, Munro CA, Bates S, Collins C, Ferwerda G, Hobson RP, Bertram G, Hughes HB, Jansen T, Jacobs L, Buurman ET, Gijzen K, Williams DL, Torensma R, McKinnon A, MacCallum DM, Odds FC, Van der Meer JW, Brown AJ, Kullberg BJ. (2006). Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors. *J Clin Invest.* **116**, 1642–50.
- Nucci M**, Anaissie E. (2001). Revisiting the source of candidemia: skin or gut ? *Clin. Infect. Dis.* **33** , 1959-67.
- Odds FC**. (2000). Pathogenic fungi in the 21st century. *Trends. Microbiol.* **8**, 200-201.

P

- Pappas PG**, Kauffman CA, Andes D, Benjamin DK Jr, Calandra TF, Edwards JE Jr, Filler SG, Fisher JF, Kullberg BJ, Ostrosky-Zeichner L, Reboli AC, Rex JH, Walsh TJ, Sobel JD. (2009). Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* **48**, 503–535.

- Parodi AJ.** (1993). N-glycosylation in trypanosomatid protozoa. *Glycobiology*. **3**, 193–199.
- Perez-Vilar J, Randell SH, Boucher RC.** (2004). C-Mannosylation of MUC5AC and MUC5B Cys subdomains. *Glycobiology*. **14**, 325–337.
- Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, Fluit AC, Verhoef J, Sader HS, Messer SA, Houston A, Coffman S, Hollis RJ.** (1999). International surveillance of blood stream infections due to *Candida* species in the European SENTRY program: species distribution and antifungal susceptibility including the investigational triazole and echinocandin agents. *Diagn Microbiol Infect Dis*. **35**, 19-25.
- Pfaller MA, Moet GJ, Messer SA, Jones RN, Castanheira M.** (2011). Geographic variations in species distribution and echinocandin and azole antifungal resistance rates among *Candida* bloodstream infection isolates: report from the SENTRY. Antimicrobial surveillance program (2008 to 2009). *J Clin Microbiol*. **49**, 396-9.
- Phan QT, Myers CL, Fu Y, Sheppard DC, Yeaman MR, Welch WH, Ibrahim AS, Edwards JE Jr, Filler SG.** (2007). Als3 is a *Candida albicans* invasin that binds to Cadherins and induces endocytosis by host cells. *PLoS Biol*. **5**, e64.
- Poulain D, Slomianny C, Jouault T, Gomez JM, Trinel PA.** (2002). Contribution of phospholipomannan to the surface expression of beta-1,2-oligomannosides in *Candida albicans* and its presence in cell wall extracts. *Infect. Immun*. **70**, 4323-4328.

R

- Rahman D, Mistry M, Thavaraj S, Challacombe SJ, Naglik JR.** (2007). Murine model of concurrent oral and vaginal *Candida albicans* colonization to study epithelial host-pathogen interactions. *Microbes Infect*. **9**, 615–622.
- Ramage G, Robertson SN, William C.** (2014). Strength in numbers: antifungal strategies against fungal biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*. **43**, 114– 120.
- Renaudat C, Sitbon K, Desnos-Ollivier M, Fontanet A, Bretagne S, Lortholary O, Dromer F.** (2013). Candidemia in the Paris area (France): data from the YEASTS program (2002-2010). *Bulletin épidémiologique hebdomadaire*. **12-13**, 125-12.
- Richet H, Roux P, Des Champs C, Esnault Y, Andremont A.** (2002). Candidemia in French hospitals: incidence rates and characteristics. *Clin Microbiol Infect*. **8**, 405-12.
- Robinson MJ, Osorio F, Rosas M, Freitas RP, Schweighoffer E, Gross O, Verbeek JS, Ruland J, Tybulewicz V, Brown GD, Moita LF, Taylor PR, Reis e Sousa C.** (2009). Dectin-2 is a Syk-coupled pattern recognition receptor crucial for Th17 responses to fungal infection. *J Exp Med*. **206**, 2037–51.
- Rodionov D, Romero PA, Berghuis AM, Herscovics A.** (2009). Expression and purification of recombinant M-Pol I from *Saccharomyces cerevisiae* with alpha-1,6 mannosylpolymerase activity. *Protein Expression and Purification*. **66**, 1–6.
- Rombouts Y, Burguière A, Maes E, Coddeville B, Ellass E, Guérardel Y, Kremer L.** (2009). *Mycobacterium marinum* Lipooligosaccharides Are Unique Caryophyllose-containing Cell Wall Glycolipids That Inhibit Tumor Necrosis Factor-Secretion in Macrophages. *J. Biol. Chem*. **284**, 20975-20988
- Romani L.** (2011). Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol*. **11**, 275–88.
- Rush JS, Gao N, Lehrman MA, Matveev S, Waechter CJ.** (2009). Suppression of Rft1 expression does not impair the transbilayer movement of Man5GlcNAc2-P-P-dolichol in sealed microsomes from yeast. *Journal of Biological Chemistry*. **284**, 19835–19842.

S

- Said-Sadier N**, Padilla E, Langsley G, Ojcius DM. (2010). *Aspergillus fumigatus* stimulates the NLRP3 inflammasome through a pathway requiring ROS production and the Syk tyrosine kinase. *PLoS ONE*. **5**, e10008.
- Samuelson J**, Banerjee S, Magnelli P, Cui J, Kelleher DJ, Gilmore R, Robbins PW. (2005). The diversity of dolichol-linked precursors to Asn-linked glycans likely results from secondary loss of sets glycosyltransferases. *Proc National Academy of Sciences of the USA*. **102**, 1548–1553.
- Sato K**, Yang XL, Yudate T, Chung JS, Wu J, Luby-Phelps K, Kimberly RP, Underhill D, Cruz PD Jr, Ariizumi K. (2006). Dectin-2 is a pattern recognition receptor for fungi that couples with the Fc receptor gamma chain to induce innate immune responses. *J Biol Chem*. **281**, 38854–66.
- Sentandreu R**, Northcote DH. (1968). The structure of a glycopeptide isolated from the yeast cell wall. *Biochem J*. **109**, 419-432.
- Shepherd MG**, Poulter RTM, Sullivan PA. (1985). *Candida albicans*: Biology, Genetics and Pathogenicity. *Ann. Rev. Microbiol*. **39**, 579-614.
- Sheth CC**, Hall R, Lewis L, Brown A J P, Odds F C, Erwig LP, Gow N A R. (2011). Glycosylation status of the *C. albicans* cell wall affects the efficiency of neutrophil phagocytosis and killing but not cytokine signaling. *Med Mycol*. **49** : 513–524.
- Shibata N**, Hisamichi K, Kobayashi H, Suzuki S. (1993). Complete assignment of ¹H and ¹³C nuclear magnetic resonance chemical shifts of O-1,2-linked manno oligosaccharides isolated from the phosphomannan of the pathogenic yeast *Candida albicans* NIH B-792 strain. *Arch. Biochem. Biophys*. **302**, 113–117.
- Shibata N**, Akagi R, Hosoya, T, Kawahara K, Suzuki A, Ikuta K, Kobayashi, H, Hisamichi K, Okawa Y, Suzuki S. (1996). Existence of novel branched side chains containing beta-1,2 and alpha-1,6 linkages corresponding to antigenic factor 9 in the mannan of *Candida guilliermondii*. *J. Biol. Chem*. **271**, 9259–9266.
- Shibata N**, Arai M, Haga E, Kikuchi T, Najima M, Satoh T, Kobayashi H, Suzuki S. (1992). Structural identification of an epitope of antigenic factor 5 in mannans of *Candida albicans* NIH B-792 (serotype B) and J-1012 (serotype A) as beta-1,2-linked oligomannosyl residues. *Infect. Immun*. **60**, 4100–4110.
- Shibata N**, Ichikawa T, Tojo M, Takahashi M, Ito N, Okubo Y, Suzuki S. (1985). Immunochemical study on the mannans of *Candida albicans* NIH A-207, NIH B-792, and J-1012 strains prepared by fractional precipitation with cetyltrimethylammonium bromide. *Arch. Biochem. Biophys*. **243**, 338-348.
- Shibata N**, Kobayashi H, Okawa Y, Suzuki S. (2003). Existence of novel O-1,2 linkage-containing side chain in the mannan of *Candida lusitanae*, antigenically related to *Candida albicans* serotype A. *Eur. J. Biochem*. **270**, 2565–2575.
- Shibata N**, Okawa Y. (2010). Enzymatic Synthesis of New Oligosaccharides Using Mannosyltransferases from *Candida* Species and Their NMR Assignments. *Biol. Pharm. Bull*. **33**, 895-899.
- Smits GJ**, van den Ende H, Klis FM. (2001). Differential regulation of cell wall biogenesis during growth and development in yeast. *Microbiology*. **147**, 781-794.

- Southard S B**, Specht CA, Mishra C, Chen-Weiner J, Robbins PW. (1999). Molecular analysis of the *Candida albicans* homolog of *Saccharomyces cerevisiae* MNN9, required for glycosylation of cell wall mannoproteins. *J Bacteriol.* **181**: 7439–7448.
- Steele C**, Marrero L, Swain S, Harmsen AG, Zheng M, Brown GD, Gordon S, Shellito JE, Kolls JK. (2003). Alveolar macrophage-mediated killing of *Pneumocystis carinii* f. sp. *muris* involves molecular recognition by the Dectin1 β -glucan receptor. *J. Exp. Med.* **198**, 1677–1688.
- Steele C**, Rapaka RR, Metz A, Pop SM, Williams DL, Gordon S, Kolls JK, Brown GD. (2005). The β -glucan receptor dectin-1 recognizes specific morphologies of *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Pathog.* **4**, 323–334.
- Stewart TS**, Mendershausen PB, Ballou CE. (1968). Preparation of a mannopentaose, mannohexaose, and mannoheptaose from *Saccharomyces cerevisiae* mannan. *Biochemistry.* **7**, 1843–1854.
- Strahl-Bolsinger S**, Gentzsch M, Tanner W. (1999). Protein O-mannosylation. *Biochim Biophys Acta.* **1426**, 297-307.
- Strahl-Bolsinger S**, Immervoll T, Deutzmann R, Tanner W. (1993). PMT1, the gene for a key enzyme of protein O-glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**, 8164–68.
- Striebeck A**, Robinson DA, Schuttelkopf AW, van Aalten DM. (2013). Yeast Mnn9 is both a priming glycosyltransferase and an allosteric activator of mannan biosynthesis. *Open Biol.* **3**, 130022.
- Suzuki A**, Shibata N, Suzuki M, Saitoh F, Oyamada H, Kobayashi H, Suzuki S, Okawa Y. (1997). Characterization of β -1,2-mannosyltransferase in *Candida guilliermondii* and its utilization in the synthesis of novel oligosaccharides. *J. Biol. Chem.* **272**, 16822-16828.
- Suzuki A**, Takata Y, Oshie A, Tezuka A, Shibata N, Kobayashi H, Okawa Y, Suzuki S. (1995). Detection of β -1,2- mannosyltransferases in *Candida albicans* cells. *FEBS Letters.* **373**, 275-279.
- Suzuki T**, Nishibayashi S, Kuroiwa T, Kanbe T, Tanaka K. (1982). Variance of ploidy in *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* **152**, 893-896.

T

- Takahashi M**, Inoue N, Ohishi K, Maeda Y, Nakamura N, Endo Y, Fujita T, Takeda J, Kinoshita T. (1996). PIG-B, a membrane protein of the endoplasmic reticulum with a large luminal domain, is involved in transferring the third mannose of the GPI anchor. *EMBO J.* **15**, 4254–61.
- Tanner W**, Behrens NH. (1971). Dolicholmonophosphates: Mannosyl acceptors in a particulate in vitro system of *S. cerevisiae*. *FEBS Lett.* **16**, 245-248.
- Tanner W**. (1969). A lipid intermediate in mannan biosynthesis in yeast. *Biochem Biophys Res Commun.* **35**, 144-150.
- Toubas D**. (2013). Epidémiologie des candidoses invasives. *Revue Francophone Des Laboratoires.* **450** : 27-36.
- Trinel PA**, Borg-von-Zepelin M, Lepage G, Jouault T, Mackenzie D, Poulain D. (1993). Isolation and preliminary characterization of the 14- to 18-kilodalton *Candida albicans* antigen as a phospholipomannan containing O-1,2-linked oligomannosides. *Infect. Immun.* **61**, 4398–4405.
- Trinel PA**, Delplace F, Maes E, Zanetta PA, Mille C, Coddeville B, Jouault T, Strecker G, Poulain D. (2005). *Candida albicans* serotype B strains synthesize a serotype-specific

phospholipomannan overexpressing a beta-1,2-linked mannotriose. *Mol. Microbiol.* **58**, 984-998.

- Trinel PA**, Lepage G, Jouault T, Strecker G, Poulain D. (1997). Definitive chemical evidence for the constitutive ability of *Candida albicans* serotype A strains to synthesize beta-1,2 linked oligomannosides containing up to 14 mannose residues. *FEBS Letters.* **416**, 203-206.
- Trinel PA**, Maes E, Zanetta JP, Delplace F, Coddeville B, Jouault T, Strecker G, Poulain D. (2002). *Candida albicans* phospholipomannan, a new member of the fungal mannose inositol phosphoceramide family. *J. Biol. Chem.* **277**, 37260-37271.
- Trinel PA**, Plancke Y, Gerold P, Jouault T, Delplace F, Schwarz RT, Strecker G, Poulain D. (1999). The *Candida albicans* phospholipomannan is a family of glycolipids presenting phosphoinositolmannosides with long linear chains of O-1,2-linked mannose. *J. Biol. Chem.* **274**, 30520–30526.
- Tu L**, Banfield DK. (2010). Localization of Golgi-resident glycosyltransferases. *Cell.Mol.LifeSci.* **67**, 29-41.

U-Z

- Unligil UM**, Rini JM. (2000). Glycosyltransferase structure and mechanism. *Curr. Opin. Struc. Biol.* **10**, 510–17.
- Van de Veerdonk FL**, Marijnissen RJ, Kullberg BJ, Koenen HJ, Cheng SC, Joosten I, van den Berg WB, Williams DL, van der Meer JW, Joosten LA, Netea M. (2009). The macrophage mannose receptor induces IL-17 in response to *Candida albicans*. *Cell Host Microbe.* **5**, 329–340.
- van de Veerdonk FL**, Kullberg B. J, van der Meer J. W, Gow N. A, Netea M. G. (2008). Host–microbe interactions: innate pattern recognition of fungal pathogens. *Curr. Opin. Microbiol.* **11**, 305–312.
- Viriyakosol S**, Fierer J, Brown GD, Kirkland TN. (2005). Innate immunity to the pathogenic fungus *Coccidioides posadasii* is dependent on Toll-like receptor 2 and dectin1. *Infect. Immun.* **73**, 1553–1560.
- Vrielink A**, Ruger W, Driessen HPC, Freemont PS. (1994). Crystal structure of the DNA modifying enzyme beta-glucosyltransferase in the presence and absence of the substrate uridine diphosphoglucose. *EMBO J.* **13**, 3413-3422.
- Wächtler B**, Wilson D, Haedicke K, Dalle F, Hube B. (2011). From attachment to damage: defined genes of *Candida albicans* mediate adhesion, invasion and damage during interaction with oral epithelial cells. *PLOS ONE.* **6**, e17046.
- Walker LA**, Munro CA, De Bruijn I, Lenardon MD, McKinnon A, Gow NA. (2008). Stimulation of chitin synthesis rescues *Candida albicans* from echinocandins. *PLoS Pathog.* **4**, e1000040.
- Wells CA**, Salvage-jones JA, Li X, Hitchens K, Butcher S, Murray RZ, Beckhouse AG, Lo. YL, Manzanero S, Cobbold C, Schroder K, Ma B, Orr S, Stewart L, Lebus D, Sobieszczuk P, Hume DA, Stow J, Blanchard H, Ashman RB. (2008). The Macrophage-Inducible C-Type Lectin, Mincle, Is an Essential Component of the Innate Immune Response to *Candida albicans*. *J Immunol.* **180**, 7404–13.
- Wiggins CA**, Munro S. (1998). Activity of the yeast MNN1 alpha-1,3-mannosyltransferase requires a motif conserved in many other families of glycosyltransferases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**, 7945–5.

- Xin H**, Cartmell J, Bailey J J, Dziadek S, Bundle D R, Cutler J E. (2012). Self-adjuvanting glycopeptide conjugate vaccine against disseminated candidiasis. *PLoS One*. **7**, e35106.
- Xin H**, Dziadek S, Bundle D R, Cutler J E. (2008). Synthetic glycopeptide vaccines combining β -mannan and peptide epitopes induce protection against candidiasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 13526–13531.
- Zacharius RM**, Zell TE, Morrison JH, Woodlock JJ. (1969). Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gels, *Analytical Biochemistry*. **30**, 148–152.
- Zhu W**, Filler SG. (2010). Interactions of *Candida albicans* with epithelial cells. *Cell Microbiol*, **12**, 273–282.

Candida albicans est une levure de la flore digestive humaine, pouvant dans certaines conditions s'avérer être un pathogène opportuniste. Différents glycoconjugués de la paroi de la levure, en particulier le phosphopeptidomannane (PPM), sont impliqués dans l'interaction hôte-pathogène notamment *via* des beta-1,2 oligomannosides (β -Mans) terminaux intervenant dans les mécanismes de virulence de la levure. Les travaux de thèse visent à mieux comprendre les voies de biosynthèse des β -Mans par l'étude des enzymes impliquées (CaBmts).

Dans ce contexte, la première enzyme étudiée a été CaBmt1, impliquée dans l'initiation de la β -mannosylation du PPM. La stratégie d'étude a consisté d'une part en la préparation d'un panel important de substrats accepteurs potentiels et leur caractérisation structurale par spectrométrie de masse et RMN, et d'autre part à l'étude de l'activité enzymatique de Bmt1p, enzyme recombinante produite chez *Pichia pastoris*, en présence des substrats naturels et de substrats de synthèse. Nous avons démontré que Bmt1p était capable *in vitro* de transférer successivement deux résidus de mannose en β -1,2 sur un tri-ou tétramannoside lié en α -1,2.

Dans la seconde partie, nous nous sommes intéressés à la caractérisation de l'activité de CaBmt3, enzyme impliquée dans l'élongation des β -Mans du PPM ; la même démarche a été retenue pour l'étude. Les résultats obtenus montrent que Bmt3p transfère *in vitro* un seul résidu mannose en β -1,2 sur un tétramannoside constitué d'une chaîne en α -1,2 avec un mannose terminal lié en β -1,2. L'ensemble de ces travaux sont un préalable à l'élaboration de nouvelles drogues anti-fongiques ciblant la synthèse de la paroi.

Candida albicans is a commensal yeast present in human digestive flora; nevertheless, this opportunistic pathogen may cause severe infections. Several cell wall components including phosphopeptidomannan (PPM) are involved in *C. albicans*-host cells interaction especially by terminal beta-1,2 oligomannosides (β -Mans) known as implicated in the yeast virulence mechanisms. The aim of our work is to better understand biosynthetic pathways of β -Mans by the characterization of CaBmts individual activities.

In this context, the first enzyme to be studied was CaBmt1, involved in the initiation of β -mannosylation of PPM. The strategy is based firstly on the preparation of a large panel of potential acceptor substrates and their structural characterization by mass spectrometry and NMR. On the other hand, the study of enzymatic activity of Bmt1p, a recombinant soluble form produced in *Pichia pastoris*, was performed in the presence of the natural substrates and synthetic substrates. We established that Bmt1p can sequentially transfer *in vitro* two β -1,2-mannosyl units onto a α 1-2 linked tri-or tetramannoside.

The second part of this work focused on the characterization of the activity of CaBmt3, the enzyme involved in the elongation of the β -Mans chain on the PPM; the same approach was used for the study. Our results demonstrated that Bmt3p can catalyse the *in vitro* transfer of one β -1,2-mannosyl unit onto a tetramannoside containing a terminal β -1,2-Man linked to a α (1-2)Man chain. These data are a prerequisite for the design of new potential antifungal drugs that target the biosynthesis of cell wall.