

N° d'ordre :

UNIVERSITÉ DE LILLE – FACULTÉ DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES

Ecole Doctorale Biologie-Santé (ED 446)

Thèse de Doctorat présentée par

Alexandre MÉRY

pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université de Lille

Discipline : Biomolécules, pharmacologie, thérapeutique

**Métabolisme des glycanes pariétaux impliqués dans les relations
hôte-pathogène : Etude sur les genres *Candida* et *Mycobacterium***

réalisée au sein de l'Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle
(UGSF, UMR CNRS 8576)

Soutenue publiquement le 11 Juillet 2019 devant le jury composé de :

Rapporteurs :

Dr. Marie-Pierre Chapot-Chartier

Directrice de recherche, INRA-UMR1319, Jouy en Josas

Dr. Stéphane Canaan

Directeur de recherche, LISM, UMR7255, Marseille

Examineurs :

Dr. Emilie Layre

Chargée de recherche, IPBS, UMR5089, Toulouse

Pr. Julien Poissy

Professeur des universités / Professeur hospitalier, LIRIC, UMR995,
Lille

Directeur de thèse :

Dr. Yann Guérardel

Directeur de recherche, UGSF, UMR8576, Villeneuve d'Ascq

Co-encadrant :

Dr. Christophe Mariller

Maître de Conférences, UGSF, UMR8576, Villeneuve d'Ascq

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à adresser mes remerciements au Pr. Christophe d'Hulst pour m'avoir accueilli au sein de l'UGSF afin d'y effectuer mon projet de thèse.

Je remercie ensuite l'ensemble des membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse. Particulièrement au Dr. Marie-Pierre Chapot-Chartier et au Dr. Stéphane Canaan pour me faire l'honneur d'évaluer ce travail en tant que rapporteurs.

Je remercie également le Dr. Emilie Layre et le Pr. Julien Poissy qui ont accepté d'examiner ce travail.

J'adresse aussi des remerciements particuliers au Dr. Anne Lemassu et au Dr. Alain Baulard pour avoir participé à mes différents comités de suivi individuel et à tous les conseils précieux qu'ils m'ont apportés pour poursuivre au mieux mon projet.

J'exprime ma plus profonde gratitude à mon directeur de thèse, le Dr. Yann Guérardel, qui au-delà de ce projet m'a accordé sa confiance depuis maintenant près de six ans. Travailler à tes côtés a été extrêmement enrichissant et c'est en grande partie grâce à toi que je me suis lancé dans l'expérience du doctorat, ce qui n'était pas gagné d'avance. Tu m'as énormément épaulé et soutenu et tu m'as également transmis tes connaissances tout au long de ce parcours. Pour tout ça, encore merci.

Je tiens aussi à remercier chaleureusement le Dr. Christophe Mariller, co-encadrant de cette thèse, pour ses nombreux conseils avisés et plus généralement pour m'avoir enseigné et partagé son savoir. Grâce à tes explications toujours très claires et détaillées, j'ai pu me perfectionner dans de nombreux domaines et notamment dans les techniques d'analyses que j'affectionne particulièrement. Je te remercie également d'avoir toujours pris le temps de m'orienter et parfois même de me recadrer lors des différentes étapes qui ont jalonné ce projet. Tu n'as pas hésité à mettre la blouse et à m'aider lors des problèmes techniques rencontrés qui n'ont pas manqué de donner du fil à retordre pendant ces trois ans et demi.

J'adresse ensuite tous mes remerciements à l'ensemble des personnes qui ont participé de près ou de loin à ces travaux :

- Les équipes du Dr. Laurent Kremer et du Pr. Stéphane Vincent pour leur collaboration et leur expertise dans le projet MyCat.

- Le Pr. Daniel Poulain et le Pr. Boualem Sendid pour m'avoir permis de mettre un pied à l'étrier dans le milieu hospitalier et clinique ainsi que dans le monde complexe des champignons. Je vous exprime ici mes plus vifs remerciements pour tout le temps que vous m'avez consacré lors de réunions ou pour l'écriture des articles mais aussi pour la confiance que vous m'avez accordé pendant et avant mon projet de thèse.

Je remercie ensuite très chaleureusement le Dr. Samir Jawhara pour l'aide précieuse qu'il m'a apporté concernant la partie fondamentale de l'étude sur *Candida* et pour toutes les connaissances qu'il m'a transmises dans le domaine de la microbiologie et de la culture de *Candida*.

Un grand merci également au Dr. Marjorie Cornu pour son aide et ses conseils pour la partie clinique du projet.

Enfin, merci à Nadine (Caroline) pour l'énorme travail réalisé en amont sur les sérums de patients et les tests diagnostiques sans qui ce travail n'aurait pas vu le jour.

- Les membres de la plateforme PAGés et particulièrement au Dr. Emmanuel Maes pour les analyses RMN. Au Dr. Bernadette Codeville et Dr. Nao Yamakawa pour les nombreux coups de mains et les conseils prodigués en spectrométrie de masse et en GC-MS.

- Les membres de l'équipe Glycobiologie Structurale des interactions hôtes-pathogènes Christophe B, Fred K, Fred C, Florence et Cédric. Je remercie particulièrement Isabelle pour son aide précieuse et pour m'avoir initié aux rudiments de la microbiologie et à l'expression et la purification des protéines. J'adresse aussi une pensée amicale à mes collègues et compagnons qui sont ou ont été présents dans l'équipe : Clément, Pierre-André, Thomas, Lin, Clémence, James, Amandine M, Amandine G, Violaine, Maxence, Tony et Jorick sans oublier mon 'grand frère' Pascal. Merci à tous pour votre bonne humeur et pour l'ambiance exceptionnelle à laquelle vous avez contribué;

- L'équipe administrative et le personnel de l'unité pour leur aide et leur travail au quotidien.

Je remercie bien évidemment ma famille et plus particulièrement mes parents qui m'ont soutenu et encouragé dans tous les projets que j'ai entrepris.

Un grand merci également à mes amis Nicolas et Julie, Antoine et Vanessa, Pascal et Cassandra, Hugo pour toutes ces années et les autres à venir !

Enfin, il me tient à cœur de terminer ces remerciements en dédiant ma thèse à Faustine qui a cru en moi comme jamais personne ne l'avait fait auparavant. Si je suis arrivé au bout, c'est grâce à ton soutien sans faille et au regain de confiance que tu as su me donner dans les moments de doute. Je ne serais sûrement pas en train d'écrire ces quelques lignes si tu n'avais pas été là, même si elles ne seront jamais suffisantes pour décrire tout l'amour que je te porte.

Abbréviations

ABC: ATP Binding Cassette	HPAEC-PAD: High Performance Anion Exchange Chromatography-Pulsed Amperometric Detection
Ac: Anticorps	HSP: Heat Shock Protein
ACN: Acétonitrile	HSQC: Heteronuclear Single Quantum Correlation
ADN: Acide DésoxyriboNucléique	HXK: HeXoKinase
Ag: Antigène	IDSA: Infectious Diseases Society of America
AG: Arabinogalactane	IFI: Infection Fongique Invasive
AM: Acide Mycolique	IFN: InterFéroN
AMB : Amphotéricine B	IGRA: In-vitro Interferon Gamma Release Assay
AMP: Adénosine MonoPhosphate	IL: InterLeukine
ARN: Acide RiboNucléique	INH: IsoNicotinyl Hydrazine
ATFA: Acide TriFluoroAcétique	KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
BAAR: Bacille Acido-Alcool-Résistant	LAM: LipoArabinoMannane
BCA: BiCinchoninic Acid	LDAO: LaurylDimethylAmine N-Oxide
BCG: Bacille de Calmette et Guérin	LM: LipoMannane
BDG: β -D-(1 \rightarrow 3)-Glucane	LPA: Line Probe Assay
BK: Bacille de Koch	LT: LymphoToxineABC
CAZy(me): Carbohydrate-Active enZyme	mAGP: mycolyl-ArabinoGalactane-Peptidoglycane
Cl: Candidose Invasive	MALDI-TOF: Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time Of Flight
CLR: C-type Lectin Receptor	MBTH: 3-Méthyl-2-BenzoThiazolinone Hydrazone
CMH: Complexe Majeur d'Histocompatibilité	<i>m</i> -DAP: <i>meso</i> -DiAminoPimélique
CMT: Complexe <i>Mycobacterium Tuberculosis</i>	MDR: MultiDrug-Resistant
COSY: COrrélation SpectroscopyY	MEB: Microscopie Electronique à Balayage
CRD: Cysteine-Rich Domain	MLST: MultiLocus Sequence Typing
CTLD: C-Type Lectin-like Domain	MmpL: Mycobacterial membrane protein Large
CV: Column Volume	Mnn: Mannane
DAT: DiAcylTréhalose	MNT: Mycobactérie Non Tuberculeuse
DC-SIGN: Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesin molecuel-3 Grabbing Non-integrin	MPI: Mannosyl Phosphate Inositol
DP: Degré de Polymérisation	MR: Mannose Receptor
DPA: DecaprenylmonoPhosphoryl-D-Arabinose	MS: Mass Spectrometry
DPG: DiPhosphatidylGlycérol	MTL: Mating-Type-Locus
DPPR: DecaprenylPhosphoryl-5-PhosphoRibose	NAC: Non-albicans Candida
DSS: Dextran Sulfate Sodium	NAD: Nicotinamide Adénine Dinucléotide
EDTA: EthylèneDiamineTétraAcétique	NET: Neutrophil Extracellular Trap
EI: Electron Ionization	NK: Natural Killer
ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay	OMS: Organisation Mondiale de la Santé
ELISPOT: Enzyme-Linked ImmunoSPOT	PAMP: Pathogen-Associated Molecular Pattern
EMB: EthaMButol	PASTA domain: Penicillin-binding protein And Serine/Threonine kinase Associated domain
EORTC: European Organization for Research and Treatment of Cancer	PAT: PolyAcylTréhalose
ESCMID: European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases	PBS: Phosphate Buffer Saline
ESI-ITMS: ElectroSpray Ionization-Ion Trap Mass Spectrometry	PCR: Polymerase Chain Reaction
FAB: Fast Atom Bombardment	PDIM: Phtiocérol DIMycocérosate
FAS: Fatty Acid Synthase	PE: phosphatidyléthanolamine
FDA: Food and Drug Administration	PG: PeptidoGlycane
FID: Flame Ionization Detector	pl: point Isoélectrique
G6P: Glucose-6-Phosphate	PI: Phosphatidyl- <i>myo</i> -Inositol
GC: Gas Chromatography	PIM: Phosphatidyl- <i>myo</i> -Inositol Mannoside
GH: Gycoside Hydrolase	PIR: Protein Identification Ressource
GPI: GlycosylPhosphatidylInositol	PLM: PhosphoLipoMannane
GPR: G-Protein Regulator	pRpp: 5-phosphoRibosyl-1-pyrophosphate
GTP: Guanosine TriPhosphate	PRR: Pathogen Recognition Receptor
	PSM: Poste de Sécurité Microbiologique
	PZA: PyraZinAmide

QIT: Quadrupole Ion Trap
RMN: Résonance Magnétique Nucléaire
RMP: RifaMPicine
RND: Resistance-Nodulation-cell Division
RNS: Reactive Nitrogen Species
ROS: Reactive Oxygen Species
Rpf: Resuscitation-promoting factor
SAB: Serum Albumine Bovine
SAP: Secreted Aspartic Proteinase
SD: Saturation Difference
SDS-PAGE: Sodium DodecylSulfate-PolyAcrylamide
Gel Electrophoresis
SGL: SulfoGlycoLipide
SM: StreptoMycine

STD: Saturation Transfer Difference
TB: TuBerculosis
T6P: Tréhalose-6-Phosphate
TBEP: TuBerculose Extra-Pulmonaire
TDM: Tréhalose DiMycolate
Th: T helper
TLR: Toll-Like Receptor
TMM: Tréhalose MonoMycolate
TMS: Tri Methyl Silyl
VIH: Virus de l'Immunodéficience Humaine
WGD: Whole Genome Duplication
WO: White/Opaque
WT: Wild Type
XDR: eXtensively Drug-Resistant

SOMMAIRE

Introduction générale	1
Etude du genre <i>Candida</i> à travers les candidoses invasives	4
Généralités	5
Chapitre I : Etat des lieux de <i>Candida</i> et des candidoses invasives	8
I) Généralités sur le genre <i>Candida</i>	8
I.1) Phylogénie de <i>Candida</i>	8
I.2) La reproduction chez <i>Candida</i>	9
I.3) Pathogénicité du genre <i>Candida</i>	12
II) De la colonisation à l'infection de <i>Candida</i> chez l'homme	15
II.1) Adhérence et invasion des cellules hôtes.....	16
II.2) Formation du biofilm et filamentation.....	18
II.3) Capacité d'adaptation de <i>C. albicans</i> à son environnement.....	20
III) Mise en place de l'immunité anti-<i>Candida</i> et traitement	22
III.1) Réponse immunitaire innée.....	22
III.2) Réponse immunitaire adaptative.....	26
III.3) Traitement antifongique et résistance.....	28
Chapitre II : La paroi cellulaire de <i>Candida</i> comme outil pour le diagnostic des candidoses invasives	32
I) Composition structurale de la paroi de <i>Candida</i> et son rôle dans la pathogénicité	32
I.1) Les β -D-glucanes de la paroi cellulaire de <i>Candida</i>	33
I.2) La chitine.....	36
I.3) Les mannoprotéines de la couche externe.....	37
I.3.a) Structure des mannoprotéines.....	37
I.3.b) Rôle des mannoprotéines dans la pathogénicité de <i>C. albicans</i>	39
II) Résistance au stress de <i>C. albicans</i> par le tréhalose	40
III) Les polysaccharides de la paroi de <i>Candida</i> comme biomarqueurs pour le diagnostic des candidoses invasives	44
III.1) Méthodes de diagnostic basées sur la culture.....	44
III.2) Méthodes de diagnostic non basées sur la culture.....	45

Conclusion de la partie introductive sur <i>Candida</i>	49
Objectifs	51
Résultats et discussion	54
Chapitre III : Développement d'un nouveau test pour le diagnostic des candidoses invasives	54
I) Principe de la méthode et étude sur une première cohorte	55
II) Performances du MS-DS index sur cohorte composée de patients candidémiques et colonisés.....	58
III) Elargissement de la cohorte à des centres européens spécialisés.....	73
Conclusion de la partie clinique.....	75
Chapitre IV : Etude technique du test diagnostique et mécanismes d'action du disaccharide chez <i>Candida</i>	77
I) Caractérisation du disaccharide retrouvé dans les sérums de patients infectés	77
II) Application du MS-DS index à un spectromètre de masse haute résolution	83
III) Etude des mécanismes de relargage du tréhalose par <i>Candida albicans</i>	89
III.1) Etude sur la souche sauvage de <i>C. albicans</i>	89
III.2) Etude sur les souches mutantes $\Delta tps1$ et $\Delta tps2$ de <i>C. albicans</i>	93
Conclusion de la partie fondamentale et perspectives	98
Matériels et méthodes	101
I) Culture de <i>Candida albicans</i>	101
II) Expériences <i>in vitro</i> d'application de stress sur <i>C. albicans</i>	102
III) Méthodes analytiques.....	103
III.1) Spectrométrie de masse (MS).....	103
III.2) Analyses en chromatographie phase gazeuse (GC) et couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS)	103
ANNEXE 1	104
ANNEXE 2	111
ANNEXE 3	156

Etude du catabolisme de l'arabinogalactane des mycobactéries

Généralités	161
Chapitre I : De la compréhension de la tuberculose à son traitement	164
I) Généralités sur la tuberculose	164

I.1) Impact global de la tuberculose	164
I.2) Etiologie de la tuberculose.....	165
I.2.a) Le complexe <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	166
I.2.b) Les mycobactéries non tuberculeuses	167
II) Cycle infectieux de la tuberculose et granulome	170
II.1) Période d'incubation de la tuberculose	173
II.2) Immunologie de la tuberculose	174
II.3) La tuberculose et l'interféron gamma	176
III) Diagnostic bactériologique et traitement de la tuberculose	177
III.1) Diagnostic de l'infection tuberculeuse latente (indirect)	177
III.2) Diagnostic de la tuberculose pulmonaire (direct)	179
III.3) Traitements contre la tuberculose	180
III.4) Développement de la tuberculose multi-résistante	184
Conclusion du premier chapitre	186
Chapitre II : La paroi cellulaire au cœur de la machinerie mycobacérienne..	188
I) Le peptidoglycane mycobactérien	190
I.1) Structure du peptidoglycane.....	190
I.2) Biosynthèse du peptidoglycane	190
I.3) Turnover du peptidoglycane	194
II) L'arabinogalactane mycobactérien.....	194
II.1) Structure de l'arabinogalactane.....	194
II.2) Biosynthèse de l'arabinogalactane	196
II.2.a) Biosynthèse de l'unité <i>linker</i>	196
II.2.b) Biosynthèse de la chaîne galactane.....	197
II.2.c) Biosynthèse de la chaîne arabinane	198
II.2.d) Modifications de l'AG et ancrage au PG et aux acides mycoliques	201
II.3) Catabolisme de l'arabinogalactane	203
III) Les acides mycoliques.....	204
III.1) Structure des acides mycoliques	204
III.2) Biosynthèse des acides mycoliques.....	206
IV) Phosphatidyl- <i>myo</i> inositol mannosides (PIM), lipomannanes (LM) et lipoarabinomannanes (LAM)	208
Conclusion du second chapitre.....	211
Chapitre III : Mécanismes d'action et caractérisation d'enzymes de dégradation pour appréhender le catabolisme de l'arabinogalactane.....	212
I) La famille des glycosides hydrolases	213

I.1) Banques de données enzymatiques des glycosides hydrolases	214
I.2) Structures tridimensionnelles des glycosides hydrolases	216
I.3) Topologie des sites actifs des glycosides hydrolases	218
I.4) Mécanismes catalytiques des glycosides hydrolases	219
I.4.a) Les glycosides hydrolases agissant par rétention	219
I.4.b) Les glycosides hydrolases agissant par inversion	222
I.4.c) Activité de transglycosylation des glycosides hydrolases	222
I.5) Glycosides hydrolases de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	224
II) Rôle des aldoses 1-épimérase (mutarotases) dans le catabolisme de l'AG	229
III.1) La voie de Leloir	229
III.2) Mécanismes de la galactose mutarotase	233
III.3) Etude de l'UDP-galactose 4-épimérase (GalE) de la voie de Leloir	235
Conclusion générale de la partie introductive sur les mycobactéries	237
Objectifs	239
Résultats et discussion	242
Chapitre IV : Recherche d'enzymes impliquées dans le catabolisme de l'arabinogalactane de la paroi mycobacérienne	242
I) Recherche et optimisation d'une activité endo-D-arabinase impliquée dans le catabolisme de l'arabinogalactane	244
I.1) Purification de l'arabinogalactane et extraction des protéines mycobactériennes	244
I.2) Criblage analytique des activités D-arabinase	249
I.2.a) Criblage par chromatographie et spectrométrie de masse	Erreur ! Signet non défini.
I.2.b) Méthode de dosage des fonctions réductrices des glycanes	Erreur ! Signet non défini.
I.3) Purification et recherche d'une activité arabinasique	253
I.3.a) Etapes chromatographiques préliminaires	253
I.3.b) Optimisation de la stabilité de l'activité enzymatique endo-D-arabinase	255
I.3.c) Purification de l'activité endo-D-arabinase	257
I.4) Caractérisation des protéines après purification du lysat total	261
I.4.a) Analyse par empreinte peptidique massique	261
I.4.b) Caractérisation des protéines par LC-MS	263
I.4.c) Sélection de protéines candidates à la fonction arabinase	264
I.5) Expression des protéines candidates à la fonction endo-D-arabinase et tests d'activité	267
I.6) Seconde campagne de purification de l'endo-D-arabinase chez <i>M. smegmatis</i>	271
II) Identification d'une galactose mutarotase chez <i>M. smegmatis</i>	274

II.1) Purification de l'enzyme A0QQD7 et mise en place de la caractérisation de son activité	274
II.2) Analyses RMN par différence de saturation	277
II.3) Purification et test d'activité de l'enzyme GalK de <i>M. smegmatis</i>	281
III) Etude d'une enzyme de <i>Prevotella brevis</i> impliquée dans le catabolisme de l'arabinogalactane mycobactérien.....	284
III.1) Purification et premiers tests d'activité sur l'enzyme	284
III.2) Analyses structurales des fragments issus de l'hydrolyse.....	286
III.2.a) Séparation des produits de dégradation formés	286
III.2.b) Analyses par spectrométrie de masse et RMN	287
III.2.c) Analyses de composition et de liaison	292
III.3) Etude de l'enzyme sur substrat synthétique.....	295
Conclusions et perspectives	299
Chapitre V : Caractérisation structurale des fragments d'arabinogalactane incomplets.....	303
I) Identification et isolement des fragments incomplets d'arabinogalactane	303
I.1) Identification des AG tronqués chez <i>M. bovis</i> BCG	303
I.2) Séparation des fragments incomplets d'arabinogalactane.....	305
II) Détermination de la structure des fragments incomplets d'arabinogalactane .	308
II.1) Analyses par spectrométrie de masse MALDI-TOF/TOF	308
II.2) Analyses par RMN	315
III) Optimisation de la séparation des fragments incomplets d'AG et analyses complémentaires	318
Conclusions et perspectives	324
Matériels et méthodes	327
I) Culture des mycobactéries	327
I.1) Préparation des milieux de culture	328
I.2) Culture mycobactérienne en milieu liquide	328
II) Purification de l'arabinogalactane mycobactérien	329
II.1) Lyse des mycobactéries.....	329
II.2) Extraction des protéines membranaires et obtention du complexe mycolyl-arabinogalactane-peptidoglycane	329
II.3) Isolement de l'arabinogalactane total	329
II.4) Séparation des différents composants de l'arabinogalactane total	330
III) Purification du lysat protéique soluble totale de <i>M. smegmatis</i>.....	331
III.1) Chromatographies d'exclusion stérique	331
III.2) Chromatographie échangeuse d'anions.....	331

III.3) Fractionnement subcellulaire des protéines mycobactériennes	331
IV) Production et purification de protéines recombinantes	332
IV.1) Multiplication des plasmides	332
IV.2) Purification de l'ADN plasmidique	333
IV.3) Induction de l'expression des protéines recombinantes	333
IV.4) Electrophorèse SDS-PAGE	334
IV.5) Lyse des bactéries compétentes	335
IV.6) Expression des protéines recombinantes pour purification	335
IV.7) Purification des protéines recombinantes par chromatographie IMAC	336
IV.8) Dosage des protéines par le test BCA (<i>Bicinchoninic Acid</i>)	336
V) Méthodes analytiques	337
V.1) HPAEC-PAD	337
V.2) Spectrométrie de masse (MS)	337
V.3) Résonance magnétique nucléaire (RMN)	338
V.4) Chromatographie en phase gazeuse (GC)	338
V.4.a) Dérivation des échantillons	338
V.4.b) Analyses en GC et GC-MS	339
ANNEXE 1	340
ANNEXE 2	354
BIBLIOGRAPHIE	357

Introduction générale

Les glycanes sont des oligo- ou polysaccharides qui peuvent être liés de manière covalente à une grande variété de molécules biologiques par un processus enzymatique appelé glycosylation. Parmi les quatre types de macromolécules essentielles à la vie (protéines, glucides (glycanes), lipides et acides nucléiques), les glycanes représentent la classe de molécules la moins étudiée par les chercheurs. Alors que la fonction énergétique des glycanes était bien connue, ce n'est que récemment que l'étude leurs rôles dans la modulation des activités biologiques a connu un véritable essor. Pourtant, les glycanes sont des composants ubiquistes présents essentiellement à la surface cellulaire où ils jouent divers rôles, dont l'établissement de barrières physiques protectrices contre l'environnement extérieur, la médiation des interactions cellule-cellule et cellule-matrice, ou encore la régulation de la signalisation intracellulaire et l'organisation des récepteurs membranaires [1].

Les glyco-interactions entre l'hôte et le pathogène ont également un rôle crucial lorsqu'une infection se manifeste et leur étude permet d'explorer les relations hôte-pathogène des glycanes associés à l'hôte ou à un agent pathogène. Certains pathogènes sont capables de modifier ou dégrader par l'action de glycosidases et de glycosyltransférases non seulement les glycanes de l'hôte pour révéler des cibles de liaison mais également ceux de leur propre enveloppe cellulaire fin d'assurer leur survie [2]. En effet, ces interactions peuvent favoriser l'adhésion, l'invasion et l'évasion immunitaire ou encore servir de récepteurs aux toxines [3]. De ce fait, les métabolismes associés aux glycanes et principalement les enzymes impliquées constituent des cibles médicamenteuses attrayantes pour la prévention et le traitement des maladies infectieuses. Malgré ces attraits, les stratégies d'intervention sont complexes à cause notamment de la complexité et la diversité des structures glycaniques mais aussi de leur biosynthèse sans modèle prédéfini. Cependant, il n'y a pas que les glyco-interactions qui impliquent les glycanes durant l'infection. Certains composants glycaniques de la paroi cellulaire du pathogène n'ont par exemple pas d'interactant connu mais ont tout de même leur importance dans le processus infectieux [4].

Pour toutes ces raisons, je me suis penché durant ma thèse de doctorat sur l'importance des glycanes dans les relations hôte-pathogène en me focalisant sur les glycanes pariétaux du pathogène. En effet, la paroi cellulaire est une cible attractive car elle est recouverte de structures distinctives accessibles en surface et liées à la pathogénèse [5]. Mon projet s'est particulièrement intéressé à deux pathogènes représentants de graves problèmes de santé publique pour l'Homme : *Candida* et *Mycobacterium*. Si ces deux genres n'ont à priori rien en commun (*Candida* étant un champignon et *Mycobacterium* une bactérie), les objectifs liés à ces derniers sont cependant très similaires dans le contexte présenté précédemment et notamment dans la recherche de nouveaux traitements en ciblant

spécifiquement les enzymes impliquées dans le métabolisme des glycannes pariétaux de ces pathogènes.

Ce manuscrit va donc se diviser en deux grandes parties :

- La première partie de mon travail traite du genre *Candida* dans le cadre des candidoses invasives (CI). Ce projet a débuté par l'élaboration d'un nouveau test de diagnostic basé sur l'analyse des glycannes circulant dans les sérums de patients infectés par *Candida*. Lors de ces investigations, nous avons observé la présence systématique d'un disaccharide dans les échantillons de patients candidémiques. Ce glycanne a ensuite été identifié comme étant le tréhalose, un composant clé dans la protection de la paroi de *Candida*, notamment en cas de stress. Des études ont alors été menées pour mieux comprendre les mécanismes de relargage de ce disaccharide. De façon intéressante, les enzymes impliquées dans la biosynthèse du tréhalose chez *Candida* sont décrites dans la littérature. L'absence de cette voie de biosynthèse chez l'homme et son importance sur la virulence et la pathogénèse de *Candida*, en font une cible thérapeutique intéressante. Le développement d'inhibiteurs spécifiques de ces enzymes pourrait ainsi conduire au développement d'un traitement spécifique des candidoses invasives.

- La seconde partie de mon travail porte sur le genre *Mycobacterium* et plus particulièrement sur l'étude du polysaccharide majeur de sa paroi cellulaire : l'arabinogalactane (AG). Cette étude s'est concentrée sur la recherche d'enzymes impliquées dans le catabolisme de l'AG. Pour le moment, seule la biosynthèse de ce polysaccharide a été étudiée en tant que cible de plusieurs antituberculeux largement utilisés comme par exemple l'éthambutol ou encore l'isoniazide. Pourtant, les mycobactéries sont également capables de modifier la structure de leur paroi pour s'adapter à leur environnement. En partant de ce constat, le but de ce travail a alors été de démontrer le mécanisme biologique du catabolisme et du remodelage de l'AG qui permettra par la suite d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. En effet, dans un contexte d'apparition systématique de pharmacorésistance aux médicaments antituberculeux, le développement de nouveaux traitements reste un enjeu majeur de santé publique.

Toutefois, afin de répondre correctement à ces défis, la recherche fondamentale reste un pilier primordial de la recherche mondiale. Ce travail de thèse illustre d'une part, l'importance de l'étude des glycannes pour l'étude des maladies infectieuses mais également la nécessité d'exploiter la recherche fondamentale pour mieux comprendre et donc mieux combattre les pathogènes microbiens.

**Etude du genre
Candida à travers
les candidoses
invasives**

Généralités

Avant-propos

Les espèces de *Candida* sont la principale cause d'infection fongique opportuniste dans le monde. Parmi ces espèces, *C. albicans* reste l'agent causal le plus courant même si son incidence diminue depuis une dizaine d'années alors que la fréquence des autres espèces est en augmentation.

Les premières candidoses ont été décrites il y a maintenant plus de 2000 ans. En effet, la candidose buccale est la première candidose à avoir été reconnue comme une entité clinique à l'époque de la Grèce antique. C'est d'ailleurs Hippocrate qui a décrit la candidose orale en association avec une grave maladie sous-jacente dans son traité *Epidemics*, qui a été publié au IV^e siècle av. J-C [6]. La première recherche financée sur la candidose buccale a eu lieu bien plus tard, en 1786, lorsque la Société Royale de Médecine en France a demandé une enquête sur le muguet [7]. Ce terme muguet fait généralement référence à une infection à *Candida albicans* des muqueuses de la bouche (particulièrement des bébés), de la gorge ou du vagin. En 1839, Langenbeck décrit l'organisme *Candida albicans*, qu'il a cultivé à partir de la muqueuse buccale d'un patient atteint de typhus. Malheureusement, il en a conclu que l'organisme était l'agent causant le typhus. Ce n'est que quelques années plus tard, en 1846, que Berg décrit correctement la relation entre *Candida albicans* et le muguet [8].

La classification taxonomique de *Candida albicans* quant à elle est restée un sujet de grande discussion pendant plusieurs décennies en raison des différentes formes morphologiques de l'organisme. En 1887, il a été décrit que les deux formes morphologiques levure et hyphale provenaient en fait d'un seul et même organisme avec des formes différentes selon l'environnement de croissance. Il faudra cependant attendre jusqu'en 1923 pour que soit clarifié la taxonomie de l'organisme et qu'il soit séparé des espèces de *Monilia*, associées à la pourriture des fruits et des feuilles. C'est d'ailleurs à ce moment que le nom de *Candida* a été proposé et qui provient du latin *toga candida*, en référence à la robe blanche portée par les candidats au sénat romain. D'autres formes d'infections à *Candida* ont par la suite été décrites à la fin du XIX^e et au début du XX^e siècle, ainsi que leurs relations avec d'autres maladies systémiques sous-jacentes telles que le diabète.

Aujourd'hui, ces infections sont toujours bien présentes mais ce sont principalement les candidoses invasives (CI) qui sont au cœur des préoccupations en milieu hospitalier. La CI est une infection nosocomiale qui pose de plus en plus de problème dans le contexte de la santé moderne et elle est particulièrement répandue dans les unités de soins intensifs [9]. En effet, elle est le résultat indirect des énormes progrès technologiques qui ont été réalisés en

matière de santé au cours des dernières décennies. Parmi ces avancées, on peut notamment citer l'utilisation d'antimicrobiens à large spectre, la pose de cathéters veineux central, l'utilisation de l'hémodialyse aigüe en réanimation ou encore l'utilisation intensive d'agents immunosuppresseurs chroniques [10]. L'incidence mondiale des CI chez les patients a été estimée à 750 000 cas par an (de 2,1 à 21 cas pour 100 000 habitants selon les pays) ce qui fait de *Candida* le 4^e microorganisme retrouvé dans les hémocultures prélevées dans un contexte nosocomial [11]. Dans une étude à grande échelle parue en 2009, *Candida* avait d'ailleurs été isolé dans 17% des cultures positives de patients infectés [12]. Au-delà de la prévalence, les CI sont associées à une morbidité et une mortalité considérable, comprise entre 40 et 60% [12]. Les CI ont donc un impact significatif pour les patients mais également sur l'économie de la santé [13].

Dans ce contexte, un diagnostic rapide et précis de l'infection fongique invasive est crucial pour que des agents antifongiques appropriés puissent être administrés rapidement. Malheureusement, établir un diagnostic précoce n'est pas chose simple. L'examen microscopique par exemple est rapide et peut être utile mais un résultat négatif ne permet pas d'exclure l'infection [14]. L'hémoculture qui reste aujourd'hui le gold standard n'est quant à elle positive que dans environ 50% des cas de CI [15]. De plus, plusieurs jours sont généralement nécessaires avant que les données de sensibilité antifongique ne soient disponibles mais aussi pour la détermination de *Candida* au niveau de l'espèce [15].

Plus récemment, des tests diagnostiques non basés sur la culture ont donc été développés pour la détection dans le sang de biomarqueurs de la paroi cellulaire fongique dont les tests immunologiques et la détection d'ADN par PCR. Ces méthodes ont cependant également leurs limites en terme de sensibilité et/ou de spécificité et restent très coûteuses pour les hôpitaux [16], [17], [18].

Le besoin de nouveaux tests est donc toujours d'actualité afin d'établir un diagnostic précoce aux CI tout en essayant d'en réduire les coûts associés. Ce pan de la thèse s'est ainsi focalisé sur les CI et plus particulièrement le développement d'un nouveau test permettant la détection de glycannes fongiques circulant dans le sérum de patients infectés. La compréhension des mécanismes liés à cette approche a également été étudiée afin de mieux appréhender la relation hôte-pathogène sous-jacente à la mise en place de cette nouvelle méthode.

Chapitre I : Etat des lieux de *Candida* et des candidoses invasives

I) Généralités sur le genre *Candida*

Les *Candida* sont des champignons levuriformes polymorphes dont l'appareil végétatif peut se présenter sous des formes variées : blastopores ovales de 2 à 5 µm, filaments ou pseudofilaments et la multiplication s'effectue par bourgeonnement.

Leur taxonomie linnéenne exacte est : règne des *Fungi*, phylum des *Ascomycota*, classe des *Saccharomycetes*, ordre des *Saccharomycetales* et genre *Candida*.

Les champignons (ou mycètes) sont des organismes eucaryotes uni ou pluricellulaires. Contrairement aux végétaux, les champignons sont dépourvus de pigment assimilateur de type chlorophylle. Ils sont donc contraints à puiser leur énergie de sources de carbones extérieures (hétérotrophie). Le carbone est principalement tiré des glucides absorbés et sont stockés sous forme de glycogène. Pour ce faire, *Candida* va ainsi coloniser son hôte pour y vivre comme saprophyte commensal.

I.1) Phylogénie de *Candida*

Une des principales difficultés pour caractériser les espèces de *Candida* est qu'elles ne partagent aucune origine évolutive. Le terme '*Candida*' a d'ailleurs été attribué aux champignons dits imparfaits, c'est-à-dire n'ayant pas de cycle sexuel clairement défini. Presque toutes les espèces de *Candida* appartiennent à un seul clade de *Candida* nommé CTG (Figure I.1). Ce clade est caractérisé par la traduction unique des codons CUG en sérine plutôt qu'en leucine [19]. Le clade CTG inclut la plupart des pathogènes les plus importants (*C. albicans*, *C. tropicalis* et *C. parapsilosis*) ainsi que d'autres causant plus rarement des maladies (*C. dubliniensis*, *C. guilliermondii* et *C. lusitaniae*). On y retrouve des espèces diploïdes et d'autres haploïdes qui occupent deux sous-groupes distincts (Figure I.1). Cependant, deux espèces pathogènes pour l'homme ne font pas partis de ce clade CTG : il s'agit de *C. glabrata* et *C. krusei*. *C. glabrata* est beaucoup plus étroitement apparenté à *Saccharomyces cerevisiae* qu'à *C. albicans* [20] et se place dans un autre clade WGD pour Whole Genome Duplication [21]. *C. krusei* quant à elle appartient au même clade WGD mais est moins bien étudié que les autres espèces de *Candida*, notamment en ce qui concerne la virulence. En effet, l'incidence de *C. krusei* dans l'infection est faible, mais cet organisme devient de plus en plus préoccupant en raison de sa résistance relative à de nombreux antifongiques [22]. Les levures comprises dans ce clade ont subi durant leur évolution une duplication complète de leur génome mais aussi une réduction de leur ploïdie [23].

Cette phylogénie a pu être affinée grâce à une approche de séquençage dite MLST (*MultiLocus Sequence Typing*). Cette méthode implique la détermination de polymorphismes de séquence d'ADN entre des isolats avec un ensemble de fragments comportant de cinq à sept gènes. Les données obtenues sont hautement reproductibles, se prêtent à des analyses statistiques pour quantifier les similitudes et les relations génétiques putatives entre isolats et peuvent aussi être stockées dans une base de données centrale unique disponible à travers le monde. La technologie MLST a été appliquée à différentes espèces dont *C. albicans* [24], *C. glabrata* [25] et *C. tropicalis* [26]. En revanche, elle n'a pas pu être utilisée pour *C. parapsilosis* en raison de la rareté des polymorphismes alléliques chez cette espèce.

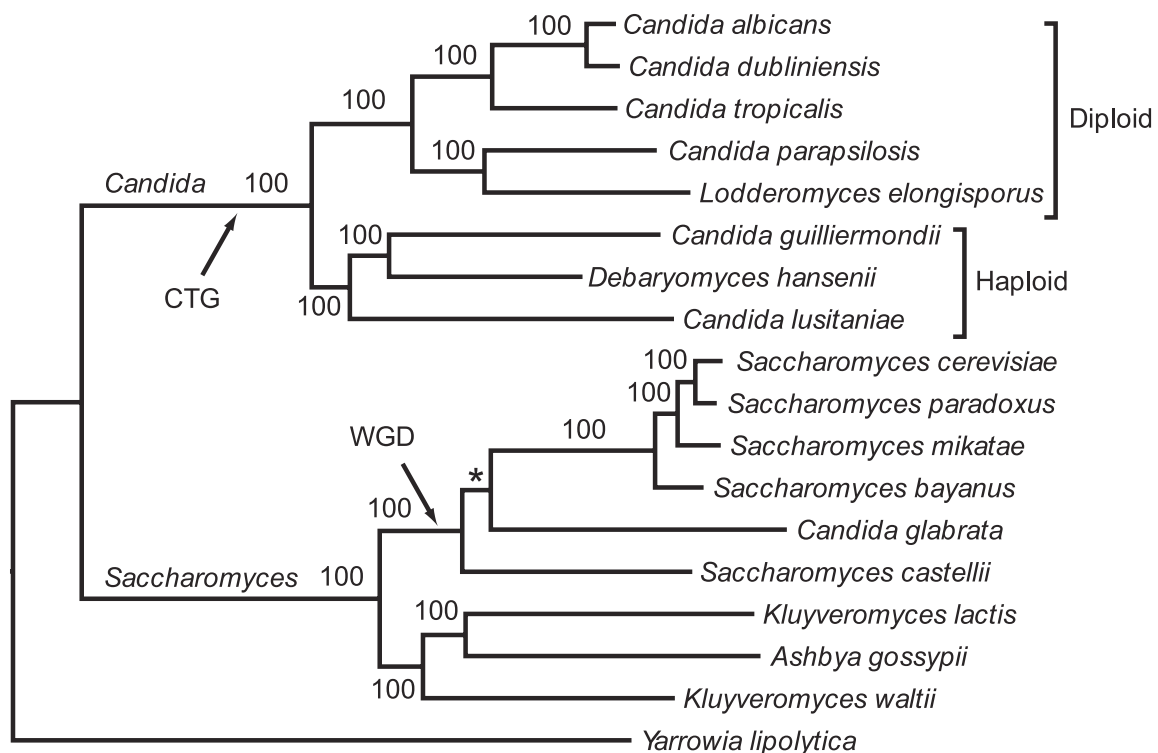


Figure I.1 : Phylogénie des différentes espèces de *Candida* et *Saccharomyces* regroupées en clades [23].

I.2) La reproduction chez *Candida*

La reproduction sexuée chez les champignons est souvent régulée par des gènes codants pour un *Mating-Type-Locus* (MTL), comme par exemple le locus *MAT* de *S. cerevisiae*. Pendant très longtemps, la levure du genre *Candida* était considérée comme ayant une reproduction clonale asexuée, mais la découverte d'un locus MTL chez *C. albicans* a incité à réexaminer le potentiel de reproduction sexuée chez cette espèce [27]. Des études ultérieures ont révélé que les souches diploïdes *MTLa* et *MTLα* pouvaient effectivement être

amenées à s'accoupler et à former des tétraploïdes stables, soit en laboratoire, soit au cours de l'infection d'un hôte mammifère [28,29].

Malgré la découverte d'une reproduction chez *C. albicans* 'asexuée', la fréquence de la conjugaison cellule-cellule observée était extrêmement basse. Cette question a été résolue quand il a été découvert que la reproduction de *C. albicans* est en fait régulée par un mécanisme unique de commutation phénotypique. En effet, certains isolats de *C. albicans* ont la capacité de passer d'un état 'blanc' à un état 'opaque' [30] (Figure I.2). Les cellules blanches sont rondes et donnent naissance à des colonies brillantes en forme de dôme, tandis que les cellules opaques sont plus allongées et produisent des colonies plus sombres et plus plates. Il a également été remarqué que seules les souches a ou α (et non les souches a/α) étaient capables de passer à la forme opaque [31]. De plus, il a été démontré que les cellules opaques s'accouplent un million de fois plus efficacement que les cellules blanches [31].

La fin des cycles sexuels fongiques est généralement réalisée par la méiose, dans laquelle un cycle de réplication de l'ADN précède deux cycles de division de l'ADN. Dans le cas de *C. albicans*, de nombreux gènes méiotiques potentiels ont été découverts dans le génome séquencé, mais il n'existe aucune preuve expérimentale d'une méiose conventionnelle [32]. Il y aurait à la place un mécanisme parasexuel de perte de chromosomes qui pourrait venir compléter le cycle de reproduction. Une étude portant sur la culture de tétraploïdes de *C. albicans* sur des supports sélectifs a d'ailleurs provoqué une perte de chromosomes aléatoire, donnant ainsi lieu à des produits diploïdes (et aneuploïdes) [33]. Un sous-ensemble de cellules parasexuelles a été analysé et s'est avéré avoir subi une recombinaison interchromosomique, indiquant que le cycle parasexuel génère des formes recombinantes de l'espèce aux propriétés potentiellement nouvelles [34].

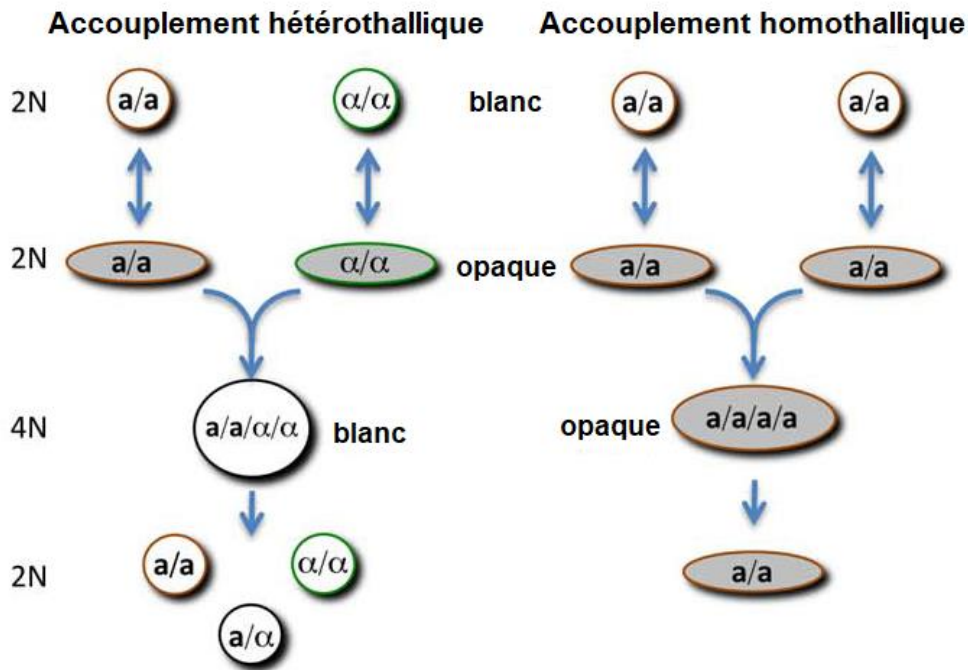


Figure I.2 : Cycles de reproduction hétérothalliques et homothalliques de *C. albicans*.

Dans les deux cycles de reproduction, les cellules doivent passer de l'état blanc à l'état opaque pour devenir aptes à la reproduction. La reproduction hétérothallique implique la fusion de cellules diploïdes a et α pour former une cellule tétraploïde blanche a/α . Dans certaines conditions, une reproduction homothallique peut avoir lieu entre deux cellules opaques a (ou deux cellules α) pour former une cellule tétraploïde opaque [35].

Plus récemment, des études ont montré que *C. albicans* n'était pas capable uniquement d'une reproduction hétérothallique mais parfois aussi d'une reproduction homothallique (Figure I.2). Lors de la reproduction classique a/α chez la levure, les cellules a sécrètent la phéromone a , tandis que les cellules α sécrètent la phéromone α afin d'attirer les partenaires du sexe opposé.

On sait cependant aujourd'hui que les cellules a de *C. albicans* sont aussi capables de sécréter à la fois des phéromones a et α . La phéromone α est alors normalement dégradée par la protéase Bar1p mais en l'absence de celle-ci, la phéromone α s'accumule ce qui conduit à l'induction de la reproduction spontanée chez des populations unisexuées de cellules a (opaques) [36]. Les produits de la reproduction du même sexe sont des cellules a - a tétraploïdes qui peuvent encore subir le cycle parasexuel de perte de chromosomes pour revenir à l'état diploïde [36].

Tous ces mécanismes de reproduction laissent à penser que *Candida* a donc l'habilité de s'adapter à son environnement. Cette faculté a en effet déjà été étudiée et il en est ressorti qu'en plus de la reproduction, la commutation blanc/opaque (*white/opaque* - *WO switch*) influence l'expression de plusieurs gènes du métabolisme, détermine la manière dont les

cellules de *C. albicans* interagissent avec les cellules immunitaires de l'hôte et module également la virulence des souches au cours de l'infection de l'hôte [37]. D'autres études ont mises en avant la sensibilité du switch WO à de multiples stimuli externes. Les conditions favorisant le passage à l'opaque comprennent notamment la présence de N-acétylglucosamine ainsi que des taux élevés en CO₂, qui sont des conditions que l'on retrouve dans le tube digestif [38], [39].

Il est important de noter que si la reproduction sexuée a été décrite jusqu'ici pour *C. albicans*, un locus MTL conservé est également présent dans la majorité des souches du clade CTG de *Candida*. Le remodelage des cycles de transcription sexuelle s'est produit à plusieurs reprises au cours de l'évolution du clade de *Candida*. Par exemple, malgré l'absence d'un facteur de transcription de *MTL* chez *C. lusitaniae*, cette espèce possède un cycle sexuel complet aboutissant à la méiose et à la sporulation [40]. Inversement, les espèces asexuées *C. tropicalis* et *C. parapsilosis* ne semblent pas subir de reproduction, mais contiennent pourtant la plupart des gènes nécessaires à la reproduction et à la méiose [23]. Cela souligne le fait que l'analyse de séquence à elle seule n'est pas suffisante pour déterminer si une espèce est capable de compléter un cycle sexuel (ou parasexuel). Il est fort probable que des cycles de reproduction restent à découvrir chez certaines espèces de *Candida* [35].

Cette partie sur la reproduction a donc notamment permis de mettre en avant le caractère adaptatif de *Candida* à son hôte. Ainsi, de nombreuses espèces sont physiologiquement colonisantes pour l'homme et elles peuvent même dans certaines conditions déboucher sur des infections. Nous allons donc pour la suite nous intéresser aux différents mécanismes mis en jeu dans ce phénomène de colonisation et comment celui-ci peut conduire à l'infection.

I.3) Pathogénicité du genre *Candida*

Les espèces de *Candida* sont parmi les agents pathogènes fongiques les plus courants chez l'homme et sont responsables d'infection superficielle (muqueuse et cutanée) et systémique [41]. On estime qu'environ 8 % des infections sanguines nosocomiales sont causées par des espèces de *Candida* [42]. Seules les CI ont été étudiées dans ce projet de thèse et c'est pour cette raison que nous évoquerons pour la suite uniquement ce versant des infections à *Candida*.

Tout d'abord, il est nécessaire de bien définir le terme de candidose invasive (CI). La CI est une infection fongique englobant la candidémie et la candidose profonde (infections des tissus situés sous les muqueuses). La candidose profonde peut provenir d'une dissémination

hématogène ou de l'introduction directe de *Candida* dans un site stérile. Les infections profondes peuvent rester localisées, se propager à des sites contigus ou conduire à une candidémie secondaire.

Parmi les nombreuses espèces de *Candida*, quatre d'entre elles représentent environ 95% des infections identifiables à *Candida* [42] :

- *C. albicans* : C'est de loin l'espèce la mieux étudiée dans le clade CTG. La séquence du génome de *C. albicans* a été reportée pour la première fois en 2004 [43] et a été organisée un an plus tard [44]. Des comparaisons précoces du génome de *C. albicans* avec celui de la levure modèle non pathogène *S. cerevisiae* ont conduit à l'identification de plusieurs familles de gènes qui sont spécifiques de l'agent pathogène et qui sont associés à la virulence [43], [44].

La virulence est associée d'une part à la transition de la croissance des levures aux formes filamenteuses telles que les hyphes et les pseudohyphes (celle-ci sera décrite plus en détail dans la partie qui suit) et d'autre part au switch WO qui a déjà été évoqué précédemment.

Bien que *C. albicans* soit l'espèce la plus fréquemment impliquée dans les infections fongiques invasives, l'incidence des infections dues à des espèces non-albicans (NAC) est en augmentation et en particulier pour trois d'entre elles : *C. glabrata*, *C. tropicalis* et *C. parapsilosis*.

- *C. glabrata* : Historiquement, cette espèce a longtemps été considérée comme un saprophyte relativement non pathogène de la flore normale d'individus en bonne santé, ne causant que très rarement une infection grave chez l'homme [45]. Mais, suite à l'utilisation croissante de traitements immunosuppresseurs en association avec un traitement antifongique à large spectre, la fréquence des infections causées par *C. glabrata* a considérablement augmenté.

C. glabrata est l'un des deux principaux agents pathogènes du genre *Candida* qui ne relève pas du clade CTG. L'espèce est une cause fréquente de candidose chez les patients immunodéprimés, y compris ceux atteints du VIH/SIDA, de diabète, les patients cancéreux soumis à une chimiothérapie et les personnes âgées [46]. La candidose associée à *C. glabrata* se produit principalement dans la cavité buccale et son incidence chez les membres les plus âgés de la population a été liée à sa capacité à se fixer à la surface acrylique des prothèses ainsi qu'à une suppression accrue de la réponse immunitaire [47].

- *C. tropicalis* : Elle est souvent identifiée chez les patients admis dans des unités de soins intensifs et en particulier chez des patients nécessitant un cathétérisme prolongé, recevant des antibiotiques à large spectre ou atteints d'un cancer [48]. *C. tropicalis* semble également

présenter un potentiel de dissémination plus élevé chez les individus neutropéniques par rapport aux autres espèces pathogènes [49].

L'organisme possède un génome diploïde et, comme *C. albicans*, a un cycle parasexuel. Cependant, il existe des différences significatives entre les espèces. Le switch WO chez *C. tropicalis* est indépendant du type sexuel, alors que chez *C. albicans*, les isolats hétérozygotes au niveau du locus sexué ne commutent que dans des conditions bien définies [50]. Le rôle du switch WO dans la détermination de la virulence de *C. tropicalis* n'est en revanche pas encore connu.

- *C. parapsilosis* : Ce pathogène a une grande affinité pour la nutrition parentérale, il colonise régulièrement les mains du personnel soignant et il est capable de former un biofilm sur les surfaces prothétiques et les cathéters veineux centraux [51]. La population la plus exposée au risque d'infection nosocomiale à *C. parapsilosis* est celle des nouveau-nés [52].

C. parapsilosis possède un génome diploïde, mais le niveau d'hétérozygotie est bien inférieur à celui des autres espèces diploïdes du clade CTG [23]. Cette espèce est plus éloignée de *C. albicans* que *C. dubliniensis* ou encore *C. tropicalis* [20]. Les espèces les plus proches comprennent *C. orthopsilosis* et *C. métapsilosis*, autrefois caractérisées comme appartenant à la même espèce [53]. La comparaison des génomes de *C. parapsilosis* et de *C. orthopsilosis* a également suggéré que l'amplification des familles de gènes, en particulier des gènes de la paroi cellulaire, est associée à une virulence accrue de *C. parapsilosis* [54].

On retrouve quand même d'autres espèces de *Candida* pathogènes, notamment *C. krusei*, *C. lusitaniae* et *C. guilliermondii* qui représentent moins de 5 % des CI.

C. guilliermondii présente plutôt un intérêt pour le secteur des biotechnologies, en tant que producteur de riboflavine et de xylitol [55]. L'espèce est haploïde et entièrement sexuelle, ce qui peut faciliter l'analyse génétique. Les quelques cas de CI recensés d'infections à *C. guilliermondii* représentent cependant un problème croissant car sa résistance aux antifongiques est importante [56]. Les isolats de *C. lusitaniae* sont haploïdes et hétérothalliques et la voie de reproduction a été caractérisée [40].

Toutes ces espèces pathogènes suivent un processus bien défini pour arriver à la pathogénicité et notamment aux CI. Ce cheminement est cependant complexe et se déroule en plusieurs étapes bien distinctes qui vont être décrites dans la partie qui suit.

II) De la colonisation à l'infection de *Candida* chez l'homme

C. albicans est le modèle de candidose le mieux étudié, c'est donc sur cette espèce que seront décrits les différents processus de la colonisation jusqu'à l'infection pour cette partie. Les différentes étapes sont schématisées sur la Figure I.3 et seront développées en détail par la suite.

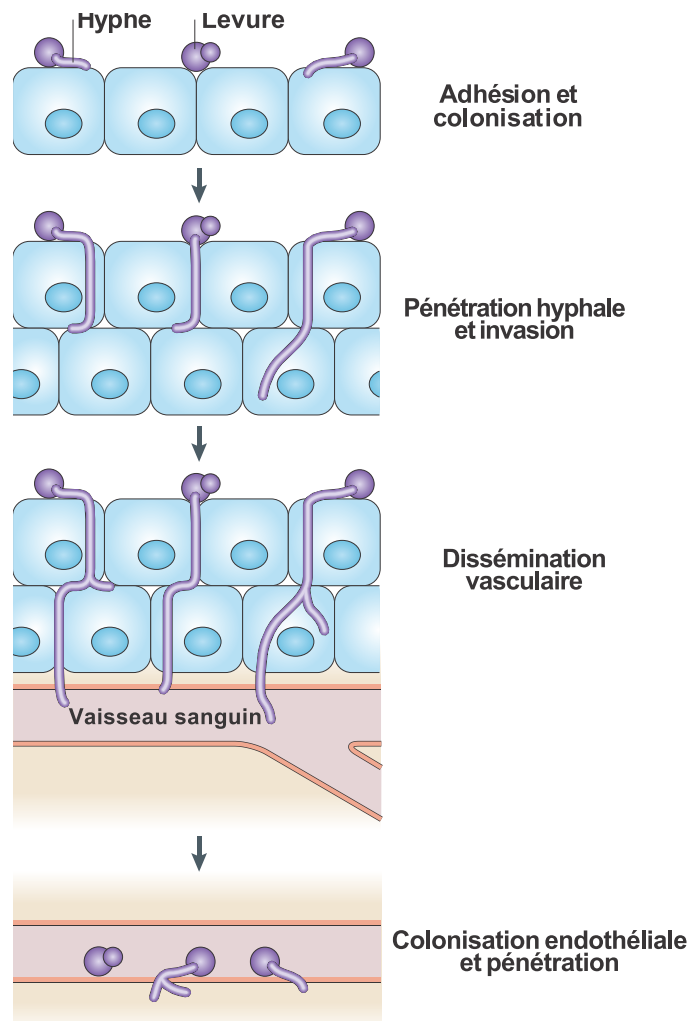


Figure I.3 : Schéma de l'invasion des tissus par *C. albicans*.

L'invasion des tissus par *C. albicans* s'effectue en plusieurs étapes et commence par l'adhésion et la colonisation de l'épithélium par les cellules sous forme de levures ou d'hyphes. S'ensuit alors une pénétration par les hyphes à travers l'épithélium ce qui débouche sur une invasion puis une dissémination dans la circulation sanguine via les vaisseaux sanguins. Enfin, une colonisation et une pénétration endothéliale se produit pendant la maladie [57].

C. albicans est un champignon polymorphe qui peut se développer sous forme de levure de forme ovoïde, de cellules ellipsoïdes allongées (pseudohyphe) ou de véritables hyphes à parois parallèles [58]. Alors que la levure et les hyphes sont régulièrement observés au cours de l'infection et ont des fonctions distinctes, le rôle des pseudohyphes et de la commutation *in vivo* est plutôt flou [59].

Une gamme de signaux environnementaux affecte la morphologie de *C. albicans*. Par exemple, à faible pH (pH<6), les cellules de *C. albicans* se développent principalement sous forme de levure, tandis qu'à un pH élevé (pH>7), une croissance hyphale est induite [60]. La transition entre les formes de croissance des levures et des hyphes est appelée dimorphisme et il a été suggéré que les deux formes de croissance sont importantes pour la pathogénicité [61]. La forme hyphale s'est par contre avérée plus invasive que la forme levure [58]. D'autre part, la forme de levure plus petite représenterait à priori la forme principalement impliquée dans la dissémination [62]. Les mutants qui sont incapables de former des hyphes dans des conditions *in vitro* ont d'ailleurs généralement une virulence atténuée [63]. Cependant, la formation d'hyphes est liée à l'expression d'un sous-ensemble de gènes codant pour des facteurs de virulence qui ne sont pas impliqués dans la formation hyphale.

II.1) Adhérence et invasion des cellules hôtes

C. albicans possède un ensemble spécialisé de protéines appelés adhésines qui assurent la médiation de l'adhésion de *C. albicans* à d'autres microorganismes, sur des surfaces abiotiques et à des cellules hôtes [64]. Les adhésines constituent un groupe majeur de protéines codées par la famille du gène *ALS*. Cette famille de gènes code pour huit protéines de surface cellulaire à ancre GPI et qui assurent la liaison à divers substrats hôtes. Parmi ces huit protéines Als, l'adhésine Als3 associée à l'hyphes est particulièrement importante pour l'adhésion [65]. Une autre adhésine importante de *C. albicans* est Hwp1, qui est une protéine à ancre GPI associée à l'hyphes. Hwp1 sert de substrat aux transglutaminases de mammifère et cette réaction peut lier de manière covalente les hyphes de *C. albicans* aux cellules hôtes. Il a d'ailleurs été montré qu'un mutant $\Delta hwp1$ présentait une virulence atténuée dans un modèle murin de candidose systémique [66].

D'autres protéines peuvent également contribuer à l'adhésion. On y retrouve par exemple des protéines à ancre GPI (Eap1, Iff4 et Ecm33), des protéines associées à la paroi de manière non covalente (Mp65, une β -glucanase putative, et Phr1, une β -(1→3) glucanosyl transférase), des protéases associées à la surface cellulaire (Sap9 et Sap10) et la protéine de surface de type intégrine Int1 [67].

Les mécanismes par lesquels *C. albicans* envahit les cellules épithéliales ont été étudiés à l'aide de modèles *in vitro*. Les résultats de ces études suggèrent que *C. albicans* peut envahir les cellules épithéliales par deux mécanismes distincts (Figure I.4) :

- le premier mécanisme est l'induction de l'endocytose des cellules épithéliales par l'organisme. L'endocytose est induite par des protéines analogues à l'invasine qui sont exprimées à la surface d'un hyphes de *C. albicans*. A ce jour, deux invasines ont été identifiées, à savoir Als3 (qui sert également d'adhésine comme mentionné précédemment) et Ssa1 [65],

[68]. Des études sur des mutants inactivés de ces deux enzymes ont montré que l'adhérence et l'invasion épithéliale étaient réduites et que la virulence l'était également dans un modèle murin de candidose oropharyngée [68]. Ces invasives se lient ensuite aux protéines de la surface des cellules épithéliales de l'hôte (cadhérine E) et induisent la cellule épithéliale à produire des pseudopodes qui phagocytent l'organisme [69];

- le second mécanisme d'invasion est la pénétration active d'un hyphes dans ou entre des cellules épithéliales. *C. albicans* envahit les cellules épithéliales de plusieurs sites anatomiques *via* différents mécanismes. La pénétration active semble nécessiter la formation d'hyphes mais on ne sait cependant toujours pas exactement quels facteurs interviennent dans cette seconde voie d'invasion des cellules hôtes. L'adhésion fongique est considérée comme jouant un rôle crucial car elle permet au champignon de résister aux forces physiques qui peuvent les éliminer [69], [70].

Lorsque *C. albicans* vivant est incubé avec des cellules épithéliales *in vitro*, des dommages importants se produisent après l'invasion. *C. albicans* doit être au moins partiellement endocytosé pour causer des dommages aux cellules épithéliales, car les mutants présentant des défauts d'endocytose induisent moins de dommages à ces cellules [65], [71]. De même, l'inhibiteur de microfilaments cytochalasine D inhibe l'endocytose des cellules épithéliales de *C. albicans* sauvages ce qui les protège des dommages [72].

Cependant, les dommages causés aux cellules épithéliales ne sont pas une conséquence directe du processus d'endocytose, car les hyphes qui sont tués lors de ce processus sont endocytosés mais ne causent pas de dommages détectables [72]. De plus, moduler la capacité d'un mutant de *C. albicans* à induire une endocytose ne modifie pas nécessairement l'ampleur des dommages aux cellules épithéliales qu'il provoque. Ainsi, l'endocytose des cellules épithéliales peut être dissociée des lésions épithéliales. Par contre, le mécanisme par lequel *C. albicans* induit des lésions à ces cellules épithéliales n'est pas entièrement compris. En effet, il est possible que les protéines SAPs (*Secreted Aspartic Proteinase*) participent à ce processus et notamment la Pepstatine A. Mais, *C. albicans* doit causer des dommages aux cellules épithéliales par d'autres mécanismes car, dans certains systèmes, la pepstatine A ne protège pas ces cellules des lésions, et les souches mutantes *sap* de *C. albicans* sont capables d'induire des lésions [73]. D'autres études suggèrent que les lipases et les phospholipases seraient également impliquées [74].

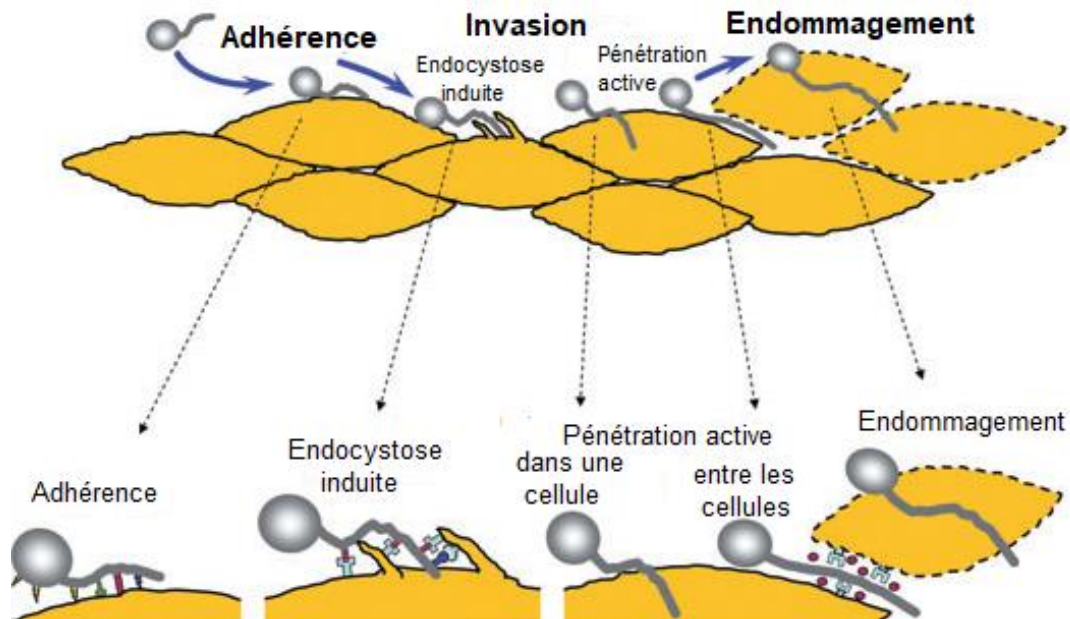


Figure I.4 : Adhérence et invasion des cellules épithéliales hôtes par *Candida albicans*.

Tout d'abord, *C. albicans* adhère aux cellules épithéliales. Cette adhérence s'effectue par l'intermédiaire de plusieurs adhésines présentes à la surface des cellules fongiques (notamment Als3 et Hwp1). Une fois l'adhésion réalisée, *C. albicans* peut alors envahir selon deux mécanismes différents, à savoir par endocytose induite ou par pénétration active dans ou entre les cellules épithéliales. Si les mécanismes de l'endocytose induite sont relativement bien connus, ceux de la pénétration active restent encore mal compris. Enfin, l'invasion dans et entre les cellules épithéliales est une condition préalable à l'induction de dommages par des enzymes lytiques aux cellules épithéliales [67].

II.2) Formation du biofilm et filamentation

Un autre aspect important de la virulence de *C. albicans* est sa capacité à former des biofilms sur des surfaces abiotiques ou biotiques. Les cathéters, les prothèses dentaires (abiotiques) et les surfaces cellulaires de muqueuses (biotiques) sont les substrats les plus courants [75].

Les biofilms développés *in vitro* reposent souvent sur des cellules de levure, à partir desquelles une couche hyphale émane (Figure I.5A) [76]. En revanche, les biofilms issus de modèles d'infection par cathéter *in vivo* apparaissent plus complexes, avec des levures et des hyphes intercalés (Figure I.5B) [77]. L'analyse génétique indique que les cellules de levure et les hyphes sont essentiels à la formation de biofilm, ce qui suggère que chaque type de cellule a un rôle unique dans le processus [76].

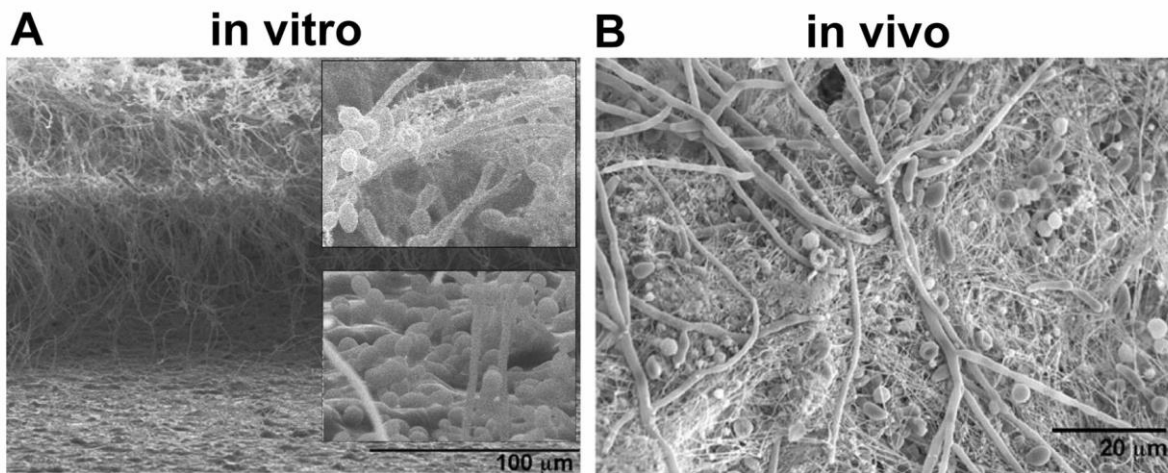


Figure 1.5: (A) Microscopie électronique à balayage (MEB) d'un biofilm de *C. albicans* observé in vitro. La couche basale comprend principalement des cellules de levure (encart zoomé inférieur). La couche centrale est principalement constituée d'hyphes et la couche supérieure a des cellules de levure émergeant des hyphes. (B) MEB d'un biofilm observé in vivo à partir d'un modèle de catheter de rat. On retrouve des cellules de levure, des pseudohyphes ainsi que de la matrice extracellulaire [77].

La formation du biofilm se traduit par quatre étapes :

1. Adhérence - Elle commence par l'adhésion des cellules de levure à un substrat.
2. Initiation - Peu de temps après, les cellules de levure prolifèrent à la surface et produisent des projections cellulaires allongées qui se développent en formes filamenteuses, notamment des hyphes ou des pseudohyphes.
3. Maturation - La matrice extracellulaire s'accumule à mesure que le biofilm mûrit et une résistance élevée aux antifongiques est également acquise.
4. Dispersion - Enfin, les cellules de levure non adhérentes sont libérées du biofilm dans le milieu environnant [77]. Les biofilms matures sont beaucoup plus résistants aux agents antimicrobiens et aux facteurs immunitaires de l'hôte que les cellules planctoniques [75]. De plus, la dispersion des cellules de levure du biofilm mature contribuerait à la virulence car les cellules dispersées se sont montrées plus virulentes dans un modèle murin d'infection disséminée [78]. La protéine de choc thermique majeure HSP90 (*Heat Shock Protein*) a été identifiée comme un régulateur clé de la dispersion dans les biofilms de *C. albicans*. En outre, HSP90 est aussi nécessaire pour la résistance aux antifongiques des biofilms [79].

Les facteurs de transcription jouent un rôle fondamental dans la régulation positive et négative de la formation du biofilm par le biais de la régulation lors de la formation hyphale [80]. Bcr1, un facteur de transcription à doigt de zinc C_2H_2 , est un facteur déterminant de la formation du biofilm chez *C. albicans*. Bcr1 semble être un régulateur conservé de la formation de biofilm, car l'orthologue Bcr1 de *C. parapsilosis* est également nécessaire pour la formation

de biofilm [81]. Ace2, un autre facteur de transcription à doigts de zinc C_2H_2 , contribue également à la formation du biofilm chez *C. albicans*, probablement par son rôle dans l'adhérence ainsi que dans la formation d'hyphes [82]. Enfin, le facteur de transcription Efg1 de *C. albicans*, un régulateur global des gènes de protéine de surface cellulaire et de la formation des hypes, est aussi nécessaire pour la formation du biofilm.

II.3) Capacité d'adaptation de *C. albicans* à son environnement

Une fois que l'hôte permet l'infection, *C. albicans* est confronté à des conditions environnementales variables [83]. En particulier, la nutrition est une condition essentielle à la survie et à la croissance et ce chez tous les organismes vivants.

C. albicans est fréquemment trouvé dans la flore microbienne humaine de l'intestin où la disponibilité des nutriments généralement très abondants est contrôlée par des interactions avec d'autres microorganismes présents sur le même site. Cependant, un traitement antibiotique et une chimiothérapie altèrent la flore microbienne, endommagent la surface des muqueuses et réduisent la réponse immunitaire de l'hôte, ce qui permet l'invasion épithéliale et la dissémination des cellules de *C. albicans* [84]. Après l'entrée de *C. albicans* dans la circulation sanguine, le glucose peut constituer l'une des principales sources de carbone car les concentrations de glucose dans le sang varient entre 6 et 8 mM [85]. Cependant, les cellules effectrices immunitaires telles que les neutrophiles attaquent le champignon et phagocytent les cellules de levure avec l'aide des macrophages. Après la phagocytose, la disponibilité des nutriments est alors fortement réduite, ce qui entraîne une privation de nutriments. Pour échapper aux macrophages, *C. albicans* procède au changement morphologique levure-hyphe ce qui entraîne de ce fait la destruction du phagocyte par des forces mécaniques [86].

Une autre donnée importante de l'adaptation de *C. albicans* à son hôte est la réponse au stress. En effet, une réponse au stress robuste contribue à la survie et à la virulence de *C. albicans* en facilitant son adaptation aux changements d'environnement et en le protégeant contre les stress dérivés de l'hôte. Les voies de régulation sensibles au stress, ainsi que les cibles en aval, se sont révélées essentielles non seulement pour une adaptation efficace mais aussi pour une virulence complète du champignon [87]. Les réponses cellulaires aux stress comprennent des conditions variées :

- la réponse au choc thermique est traitée par les protéines de choc thermique HSP qui agissent en tant que chaperons moléculaires pour empêcher le repliement et l'agrégation délétères des protéines suite au choc thermique. De plus, le stress thermique entraîne l'accumulation de tréhalose chez *C. albicans*, qui aurait un rôle de stabilisateur des protéines

susceptibles de ne pas se replier correctement [87]. Le tréhalose et son rôle chez *Candida* seront évoqués en détail dans le chapitre suivant;

- la réponse au stress osmotique entraîne une accumulation intracellulaire du glycérol utilisé pour lutter contre la perte d'eau due au gradient chimique [88];
- les espèces réactives de l'oxygène (ROS pour *Reactive Oxygen Species*) comme les peroxydes, les anions superoxydes et les radicaux hydroxyles, induisent une réponse au stress oxydatif [87]. La catalase Cta1 et les superoxyde dismutases, Sod1 et Sod5, sont d'ailleurs essentielles pour une détoxification efficace des ROS chez *C. albicans* [89];
- les neutrophiles produisent quant à eux des espèces réactives de l'azote (RNS pour *Reactive Nitrogen Species*), qui induisent une réponse de stress nitrosatif sur les cellules phagocytées de *C. albicans*. La protéine principale impliquée dans la détoxification des RNS est la protéine liée à la flavohémoglobine Yhb1 [90].

Cette capacité d'adaptation de *C. albicans* d'une part via l'apport de nutriments et d'autre part grâce à sa résistance au stress lui permet donc de survivre malgré les changements drastiques d'environnement qui s'opèrent de la colonisation jusqu'à l'infection (Figure I.6).

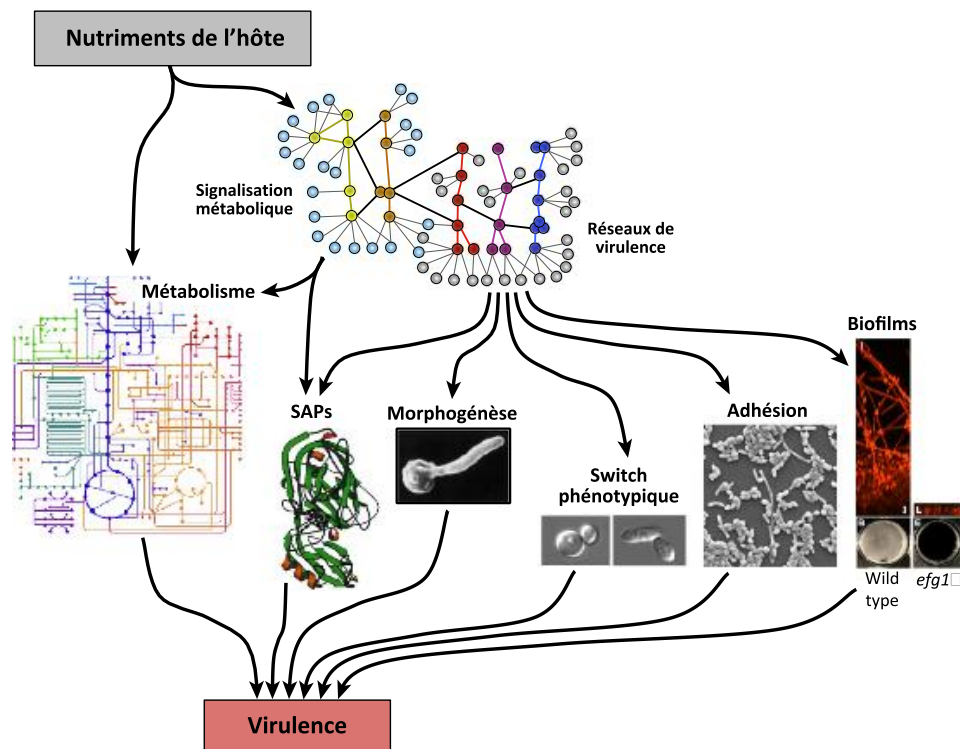


Figure I.6: Influence des nutriments sur la virulence de *C. albicans*.

Les nutriments de l'hôte modifient le métabolisme de *C. albicans* et des signaux métaboliques ainsi que des réseaux de virulence se mettent alors en place. Tous ces changements se produisent à différents niveaux; on y retrouve notamment une modification de la morphogénèse, un switch WO, une induction de l'adhésion aux cellules épithéliales, la formation de biofilms ou encore l'expression de protéines SAP. Ce sont tous ces éléments réunis qui mènent finalement à la virulence [91].

Si tous ces changements adoptés par *Candida* pour son adaptation et sa survie mènent à la virulence, l'hôte de son côté met lui également en place des stratégies de défense face à l'invasion du pathogène et notamment en faisant intervenir la réponse immunitaire. Cet aspect permet d'ailleurs de mettre en avant les relations complexes qui s'établissent entre l'hôte et le pathogène comme nous allons le voir dans la partie suivante.

III) Mise en place de l'immunité anti-*Candida* et traitement

La réponse immunitaire fait partie intégrante de la stratégie défensive de l'hôte face au pathogène *Candida* suite à des dommages causés lors de l'invasion. Si la mise en place de cette immunité est essentielle pour lutter contre l'invasion tissulaire de *Candida*, celle-ci peut parfois desservir l'hôte lorsque la réponse immunitaire devient trop importante [92].

On entrevoit alors ici toute la fragilité et la nécessité d'un bon équilibre dans la réponse immunitaire. En effet, si elle peut permettre la destruction de l'agent pathogène d'un côté, elle peut aussi entraîner des dommages tissulaires importants chez l'hôte.

La reconnaissance immunitaire de *Candida* par l'hôte se produit *via* plusieurs mécanismes comprenant l'immunité innée et l'immunité adaptative. Le système immunitaire adaptatif reconnaît des fragments antigéniques spécifiques, ce qui conduit au développement d'une réponse immunitaire ciblée. En revanche, la reconnaissance immunitaire innée est non spécifique et large et constitue la première ligne de défense de l'hôte contre les microorganismes potentiellement dangereux. Ces réponses non spécifiques sont immédiatement activées lors de la reconnaissance d'un microorganisme de manière préprogrammée et jouent un rôle essentiel dans le contrôle de la charge fongique et la prévention des troubles associés.

Il est aujourd'hui de plus en plus évident que ces réponses activent l'immunité adaptative et agissent conjointement avec d'autres processus homéostatiques pour fournir une protection supplémentaire [93]. C'est donc à travers une bonne coordination entre ces deux réponses innée et adaptative que va se jouer la qualité de la réponse immunitaire dans son ensemble.

III.1) Réponse immunitaire innée

La reconnaissance immunitaire innée de *Candida* se produit *via* la reconnaissance de motifs spécifiques communs à différents types de champignons et nommés Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs). Contrairement aux antigènes, les PAMPs individuels ne sont pas spécifiques à une seule espèce de *Candida*, mais sont partagés entre de nombreuses espèces et genres fongiques différents. La majorité des PAMPs fongiques sont associés à la paroi cellulaire et comprennent les β -glucanes, les mannanes et les phospholipomannanes [94]. Il est à noter que la structure détaillée de la paroi cellulaire de

Candida sera décrite dans le chapitre suivant. Ces PAMPs microbiens sont reconnus par les récepteurs spécifiques PRRs (Pathogen Recognition Receptors) et fournissent un mode préprogrammé de reconnaissance fongique, permettant une reconnaissance instantanée des composants fongiques les plus couramment retrouvés [95].

Les PRRs sont exprimés soit à la surface, soit dans des endosomes ou dans le cytoplasme de cellules hôtes, y compris les cellules dendritiques, les monocytes, les macrophages, les leucocytes polymorphonucléaires (PMN), les lymphocytes T et B, ainsi que les cellules épithéliales [96]. L'activation de ces PRRs par les PAMPs entraîne le déclenchement de voies de signalisation intracellulaires telles que les voies MAPK, NF- κ B ou encore ERK, et finalement une transcription améliorée d'une multitude de gènes impliqués dans les défenses immunitaires de l'hôte, y compris les chimiokines, les cytokines, les médiateurs inflammatoires et les peptides antimicrobiens [94]. Les PRRs sont donc des médiateurs essentiels entre les réponses immunitaires innées et adaptatives.

Les PAMPs sont reconnus par deux familles clés de PRRs (Figure 1.7) :

- Les récepteurs *Toll-like* (TLRs pour *Toll-Like Receptors*) constituent une famille de PRRs qui intervient dans la reconnaissance des pathogènes par les PAMPs, l'induction de réponses inflammatoires ultérieures et la régulation des réponses adaptatives [97]. Dix TLRs humains ont été identifiés et ont été classés en deux groupes en se basant sur leurs localisations subcellulaires respectives. Le premier groupe, qui comprend les TLR1, 2, 4, 5 et 6, est situé à la membrane plasmique, tandis que le second groupe, qui comprend les TLR3, 7, 8 et 9, se localise dans des compartiments intracellulaires tels que les endosomes (ou endolysosomes) [98]. Tous les TLRs sont caractérisés en tant que récepteurs transmembranaires de type I possédant un domaine extracellulaire répété riche en leucine qui reconnaît la cible PAMP et un domaine Toll/interleukine-1 (IL-1) contenant un domaine cytoplasmique qui transmet le signal d'activation [97].

Chez *C. albicans*, la plupart des informations sur l'implication des voies de signalisation médiées par les TLRs dans les défenses de l'hôte ont été obtenus à la suite d'études *in vivo* et *in vitro* utilisant des modèles murins. Les premières TLRs à avoir été étudiés sont TLR2 qui reconnaît les lipoprotéines acylés de la paroi de *Candida* et TLR4 qui reconnaît quant à lui les mannanes O-glycosylés. Il en est ressorti que ces deux récepteurs jouent le même rôle de protection de l'hôte lors de CI, TLR2 ayant un rôle majeur tandis que TLR4 aurait plutôt un rôle mineur dans ce processus [99]. TLR2 et TLR4 contribuent cependant tous les deux à l'induction de signaux pro-inflammatoires dans les cellules immunitaires *via* le facteur de différenciation MyD88, ainsi que dans la voie de signalisation NF- κ B [100]. A noter que TLR2 se dimérise avec TLR1 et TLR6 et que des études sur des mutants TLR6 KO chez la souris ont montré une production défectueuse en IL-10 [101].

Le rôle d'autres TLRs a également été étudié au cours de la CI. C'est le cas notamment de TLR9 qui n'est pas nécessaire pour la résistance à l'infection [102]. L'implication de TLR7 dans la défense anti-*Candida* a en revanche été suggérée, car des souris déficientes en TLR7 présentent une sensibilité accrue à l'infection systémique [103].

- Les récepteurs lectine de type C (CLRs pour *C-type Lectin Receptors*) sont une superfamille de protéines hétérogènes de liaison caractérisées par la présence d'un domaine de reconnaissance des glycanes extracellulaires (CRD pour *Cysteine-Rich Domain*) ou d'un domaine lectine de type C (CTLD pour *C-Type Lectin-like Domain*) [104].

Le rôle des CLRs dans l'immunité antifongique a fait l'objet d'études approfondies dans lesquelles il a été démontré que plusieurs CLRs clés exercent des fonctions critiques dans la reconnaissance, l'absorption et la destruction de *Candida* et qu'ils contribuent également à l'initiation et à la modulation de la réponse immunitaire à *Candida* [105]. Les CLRs les plus impliqués dans la reconnaissance de *Candida* semblent être la dectine-1, la dectine-2 et le récepteur à mannose (MR pour *Mannose Receptor*).

La dectine-1 est un récepteur essentiel dans la défense de l'hôte contre l'infection à *C. albicans*. La reconnaissance des β -glucanes de la paroi de *C. albicans* par la dectine-1 déclenche la phagocytose, la production de cytokines et de chimiokines, la production de ROS et la formation de pièges extracellulaires de neutrophiles (NETs pour *Neutrophil Extracellular Traps*) par l'intermédiaire de différentes voies de signalisation (Figure 1.7) [106]. La perte de fonction associée à des mutations *DECTIN1* chez l'humain a d'ailleurs mis en avant une augmentation de la colonisation de *Candida* au niveau des surfaces muqueuses et un risque accru d'infection à *Candida* [107]. De plus, des études ont montré que la dectine-1 avait un rôle protecteur contre *C. tropicalis* au niveau des sites muqueux et systémiques [108].

La dectine-2 est un autre CLR qui fonctionne sur de nombreux points comme la dectine-1 mais qui reconnaît les α -mannanes de la paroi. Des souris déficientes en dectine-2 présentent une sensibilité accrue à l'infection disséminée par *C. albicans* tout comme la dectine-1 [109]. En revanche, les souris déficientes en dectine-2 n'ont pas montré d'altération dans leur capacité de survie lors d'une infection disséminée par *C. tropicalis* [110] mais sont plus susceptibles aux infections à *C. glabrata*.

Le MR reconnaît les mannanes *N*-glycosylés hautement ramifiés de la paroi de *C. albicans*. Ce récepteur est recruté dans le phagosome après l'ingestion de *C. albicans* et active la signalisation intracellulaire ainsi que la production de cytokines [111]. Les souris déficientes en MR ne montrent par contre pas de différence de sensibilité lors d'une candidose disséminée, ce qui suggère que son rôle dans la médiation de l'immunité anti-*Candida* est redondant avec celui d'autres lectines [112].

La galectine-3 est un autre CLR qui reconnaît les β -(1→2) oligomannanes et qui attire l'attention dans le contexte de l'infection à *C. albicans*. Ce récepteur est présent dans de nombreux types de cellules et possède une activité antifongique directe [113]. La galectine-3 semble également être impliquée dans l'immunité à plusieurs espèces NAC. Il a été démontré que *C. albicans* et *C. tropicalis* induisaient la sécrétion de galectine-3 par les cellules épithéliales gingivales humaines [114]. De plus, la galectine-3 tue directement *C. albicans* et *C. glabrata in vitro*. Cependant, toutes les espèces de *Candida* ne sont pas sensibles car aucun effet n'a été détecté sur *C. guilliermondii* [113].

Enfin, deux dernières CLR peuvent être mentionnés, à savoir DC-SIGN (*Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3 Grabbing Non-integrin*) et Mincle. Le rôle de DC-SIGN dans l'immunité antifongique n'est pas clair, bien qu'il semble reconnaître les mannanes *N*-glycosylés fortement ramifiés et induire la production d'IL-10 [115]. Le récepteur Mincle se lie principalement aux structures glucidiques contenant de l' α -mannane de la paroi de *C. albicans* [116]. Comme avec la dectine-2, Mincle n'est pas supposé être indispensable à la phagocytose mais contribue à l'induction des cytokines et des chimiokines *via* un grand nombre de voies de signalisation (Figure I.7). Bien que les réponses induites par Mincle semblent être indépendantes de MyD88, celui-ci peut entrer en synergie avec les TLRs pour induire des cytokines inflammatoires [116].

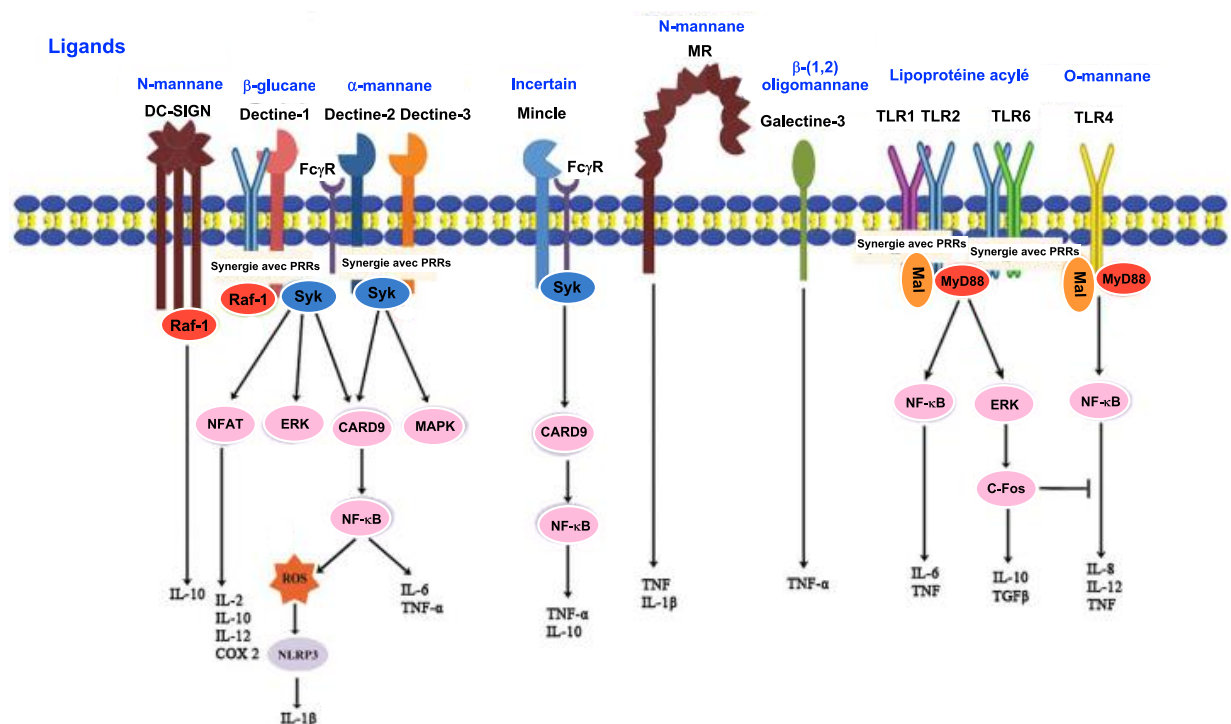


Figure I.7: Reconnaissance des PAMPs de *C. albicans* par les PRRs de l'hôte.

Les PRRs se composent principalement de deux grandes familles que sont les TLRs et les CLR. Tous ces récepteurs reconnaissent des ligands provenant de la paroi cellulaire de *C. albicans*. Lors de la reconnaissance, les PRRs activent des cytokines et des chimiokines soit directement, soit le plus souvent par l'intermédiaire de voies de signalisation [93].

L'expression de tous ces récepteurs va dépendre du type de cellule impliqué dans la réponse immunitaire. Par exemple, les polynucléaires neutrophiles sont les phagocytes prédominants dans la défense de l'hôte et constituent la première ligne de protection lors de l'invasion de l'agent pathogène *Candida* dans le système immunitaire cellulaire inné [117]. TLR2, TLR4 et la dectine-1 participent tous les trois à la reconnaissance de *C. albicans* [118]. Avec leur fonction de phagocytes, les polynucléaires neutrophiles sont capables d'intérioriser les agents pathogènes et de les éliminer en produisant des ROS et des enzymes lysosomales [119]. Plus récemment, des études ont montré que les polynucléaires neutrophiles avaient aussi un rôle lors de l'inflammation. En effet, ces derniers peuvent affaiblir la réponse pro-inflammatoire après la stimulation de *C. albicans* en libérant des protéases dérivées des neutrophiles [120].

Les monocytes et les macrophages sont des détecteurs vitaux des PAMPs. Ils participent au processus de défense de l'hôte contre les infections fongiques et travaillent ensemble pour recruter des neutrophiles sur le site inflammatoire. Inversement, les neutrophiles peuvent également participer au recrutement des monocytes et à la modulation de la libération de cytokines provenant des macrophages activés [121]. Au niveau des PRRs, des taux élevés en TLRs ont été observés à la surface des monocytes [94]. Les CLRs, tels que la dectine-1 et Mincle, jouent également un rôle important dans la médiation de la reconnaissance des monocytes de *C. albicans* [116].

Enfin, les cellules dendritiques jouent un rôle central dans un grand nombre de processus comprenant la détection de *Candida* par le biais de PRRs localisés à leur surface, la sécrétion de cytokines, la phagocytose du pathogène et enfin l'induction d'une réaction immunitaire adaptative par les lymphocytes T [122]. La plupart des PRRs sont retrouvés à la surface des cellules dendritiques, aussi bien les TLRs que les CLRs. Parmi ces récepteurs, MR et DC-SIGN sont d'une importance capitale dans la reconnaissance et l'internalisation de *C. albicans* par les cellules dendritiques humaines [123]. Il est important de noter que ces cellules dendritiques sont d'ailleurs considérées comme le lien entre l'immunité innée et l'immunité adaptative [122].

III.2) Réponse immunitaire adaptative

La réponse immunitaire adaptative est donc activée à la suite de la reconnaissance de *Candida* par le système immunitaire inné. Cette réponse adaptative permet de conférer d'une part une réponse spécifique à l'antigène et d'autre part une réponse mémoire si l'organisme est de nouveau confronté à l'agent pathogène. On distingue deux types de réponse adaptative, à savoir une réponse à médiation cellulaire portée par les lymphocytes T et une réponse à médiation humorale qui portée par les lymphocytes B.

Les lymphocytes T font partie intégrante de la réponse immunitaire adaptative de l'hôte à l'infection par *C. albicans* et constituent un moyen direct et indirect de contrôler la prolifération fongique. Les lymphocytes T CD4⁺ (lymphocytes T auxiliaires) et CD8⁺ jouent un rôle dans l'immunité antifongique et leur activation est contrôlée par les cellules dendritiques comme mentionné précédemment. Le mécanisme principal d'amorçage de l'immunité adaptative est cependant principalement géré par les lymphocytes T CD4⁺ car la présentation de l'antigène fongique se fait sur ces derniers, générant alors une réponse T auxiliaire (Th pour *T helper*) [124].

Il existe 4 sous-ensembles Th différents (Th1, Th2, Th17 et Treg), et le développement de chaque sous-ensemble spécifique est conditionné par les cytokines présentes lors de l'initiation de lymphocytes T CD4⁺ naïfs (c'est-à-dire matures mais non présentées à un antigène) par les cellules dendritiques.

Les réponses immunitaires aux infections systémiques à *C. albicans* et les réponses aux sites muqueux sont également à dissocier; alors que les réponses Th1 sont prédominantes lors d'infections systémiques, les réponses Th17 sont nettement dominantes dans les infections muqueuses mais ces deux réponses ont un même rôle de protection de l'hôte en recrutant et en activant les neutrophiles (Figure I.8).

Contrairement aux phénotypes protecteurs Th17 et Th1, l'induction d'un phénotype Th2 est par contre plus étroitement associée à une augmentation de la croissance et à la dissémination du champignon [125]. Dans les CI, l'équilibre entre les réponses Th1 protectrices et les réponses Th2 délétères est d'ailleurs très importante.

Enfin, Les Tregs suppriment les réponses inflammatoires lors de CI et leur présence lors des réponses pro-inflammatoires protectrices augmente la sensibilité à la maladie chez les souris infectées par *C. albicans*. Aux sites muqueux, cependant, cette tolérance semble être bénéfique car un 'état de vigilance' continu du système immunitaire peut alors se mettre en place.

La production d'anticorps constitue la dernière partie de la réponse immunitaire adaptative. Elle représente la réponse à médiation humorale lors de laquelle les antigènes de *Candida* vont être présentés aux lymphocytes B de l'hôte afin de déclencher la production d'anticorps. Les réponses d'anticorps endogènes à l'infection de *C. albicans* chez l'homme jouent cependant un rôle relativement mineur dans la protection immunitaire contre le pathogène.

En raison de leur accessibilité, les molécules affichées à la surface cellulaire de *C. albicans* constituent des cibles idéales pour la protection immunitaire par les anticorps. Les mannanes *N*- et *O*-glycosylés de la paroi de *C. albicans* particulièrement constituent une cible majeure

pour les anticorps anti-*Candida* mais on retrouve aussi les β -glucanes ou encore la chitine [126]. Ces anticorps peuvent d'ailleurs être utilisés comme tests diagnostiques.

Pour le moment, cette production d'anticorps n'a pas pu aboutir sur le développement d'un vaccin efficace contre *C. albicans*. Les traitements antifongiques restent donc aujourd'hui les seules thérapies disponibles mais celles-ci ont leur limite notamment avec la prévalence grandissante des espèces non-albicans pathogènes et les résistances associées.

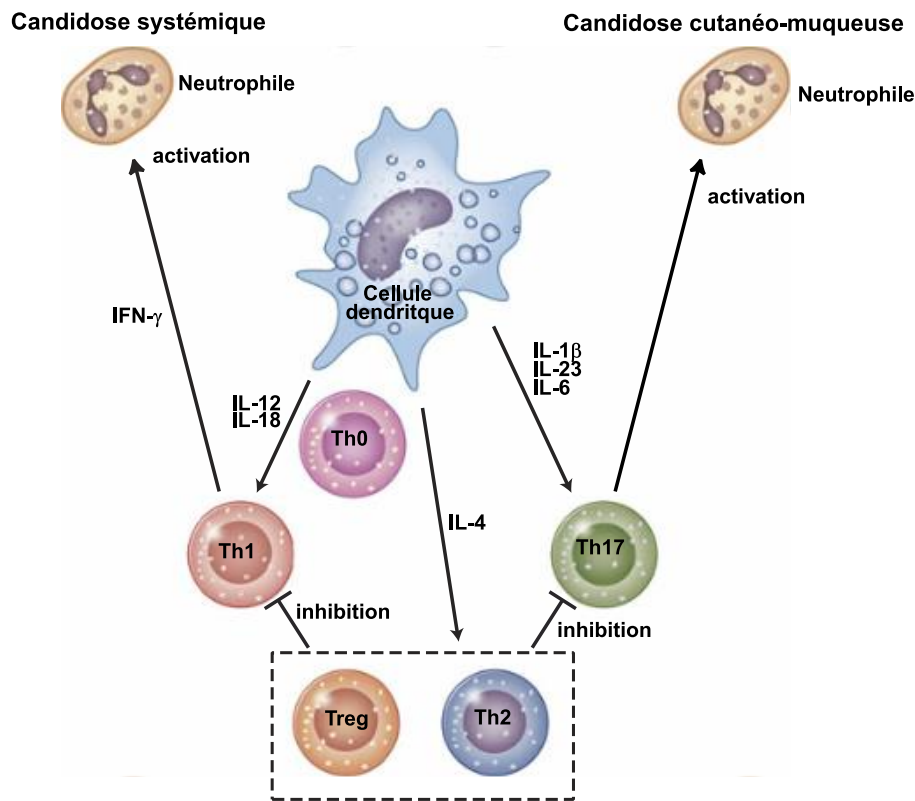


Figure I.8: Rôle des lymphocytes T dans l'immunité adaptative lors de candidose invasive.

Les lymphocytes T CD4+ peuvent générer des réponses Th lors de leur présentation à l'antigène. On retrouve quatre sous-ensembles Th différents. Les cellules Th1 et Th17 jouent un rôle protecteur en recrutant et en activant les neutrophiles. Les cellules Th2 et Treg inhibent quant à elles Th1 et Th17, ce qui peut être bénéfique dans le maintien de l'immunité mais aussi délétère si une réponse pro-inflammatoire est nécessaire [127].

III.3) Traitement antifongique et résistance

Depuis maintenant plus de trois décennies, les infections fongiques sont un problème majeur dans le monde entier, en particulier chez les personnes immunodéprimées [42].

Un hôte fragilisé sera en effet beaucoup plus enclin à l'infection car l'équilibre mis en place par le système immunitaire (finement régulé comme nous avons pu le voir précédemment) finit par se rompre lorsqu'il n'est plus régulé efficacement et favorise alors la transition du champignon vers un phénotype pathogène. En ce qui concerne les CI, ce déséquilibre se retrouve principalement chez les patients admis en réanimation où la prévalence est de ce fait

la plus importante [11]. Le pronostic est également très mauvais avec des taux de mortalité variant de 40 à 60 % selon les espèces [12].

Des traitements antifongiques existent et peuvent être divisés en quatre classes majeures, à savoir :

- Les échinocandines : ce sont des lipopeptides cycliques qui inhibent le complexe transmembranaire de la glucane synthase (Fks1), une enzyme biosynthétique qui produit le β -D-(1→3)-glucane qui le principal polysaccharide de la paroi cellulaire de *Candida*. La perturbation de la synthèse du β -D-(1→3)-glucane endommage l'intégrité cellulaire et peut alors conduire à la rupture et à la mort cellulaire [128]. Trois échinocandines (caspofungine, micafungine et anidulafungine) sont approuvées pour le traitement de la candidose invasive (Figure I.9A) et le mode d'administration se fait uniquement par intraveineuse [129].

La résistance aux échinocandines est liée à une mutation du complexe Fks1 [130]. Fks1 est constituée de deux unités Rho1p et Fksp, où Fksp est le site actif de cette enzyme et Rho1 en est le régulateur. La mutation dans le gène *FKS* entraîne donc une résistance aux échinocandines [129].

- Les azolés : ces composés inhibent la croissance de *Candida* en se liant à la lanostérol 14 α -déméthylase, une enzyme du cytochrome P450 codée par le gène *ERG11* et en l'inhibant [131]. Son inhibition provoque l'épuisement de l'ergostérol qui est le principal stérol de la membrane plasmique des champignons, et l'accumulation de méthylstérols C14 α toxiques pour *Candida* [131]. Les azolés ciblent la croissance de *Candida* et ont donc un effet antifongique fongistatique et non fongicide.

Le fluconazole est le principal antifongique azolé utilisé dans le traitement de la CI (Figure I.9B). Le fluconazole a une excellente biodisponibilité et peut être administré par voie intraveineuse ou orale à des doses identiques. Le principal effet indésirable du fluconazole est son hépatotoxicité. De plus, le fluconazole est un inhibiteur du cytochrome P450 et peut interagir avec d'autres médicaments métabolisés par cette voie [132]. On peut également retrouver deux autres azolés dans le traitement des CI, le voriconazole et le posaconazole.

De nombreux mécanismes de résistance aux azolés existent et dépendent des espèces. Ils comprennent notamment des mutations ou la surexpression de *ERG11*, une diminution de l'accumulation d'azolés dans la cellule fongique ou encore la formation du biofilm.

- Les polyènes : cette classe thérapeutique se compose de l'amphotéricine B (AMB) et de dérivés à ce composé et l'ergostérol est la principale cible des polyènes (Figure I.9C). L'AMB se lie à l'ergostérol localisé dans la membrane cellulaire fongique entraînant alors la formation de pores, une perméabilité accrue de la membrane ainsi que des dommages oxydatifs [130].

Bien que la résistance à l'AMB soit rare chez *C. albicans*, d'autres espèces de *Candida* sont en revanche intrinsèquement résistantes à l'AMB comme *C. glabrata*, *C. krusei* ou encore *C. lusitaniae* [133]. A priori, une diminution de la teneur en ergostérol de la membrane cellulaire fongique serait associée à une résistance à AMB. En effet, les souches de *Candida* AMB-résistantes ont une teneur en ergostérol relativement faible par rapport aux isolats sensibles [130].

- La flucytosine (ou 5-fluorocytosine) : il s'agit d'un dérivé fluoré de la cytosine pyrimidine largement utilisé dans le traitement des CI (Figure I.9D) [134]. Cet agent antifongique perturbe la synthèse protéique en s'incorporant à l'ARN, ce qui entraîne la mort cellulaire [135].

La résistance à la flucytosine est observée dans 3 à 10 % des isolats de *Candida in vitro*. De plus, 30 % des isolats développent une résistance au cours du traitement. Cette résistance est liée à la déficience en enzymes impliquées dans l'absorption, le transport et la transformation de la flucytosine [136]. Les gènes codant pour les enzymes impliquées dans le métabolisme contribuent également à la résistance croisée à la flucytosine et au fluconazole chez *Candida* [137].

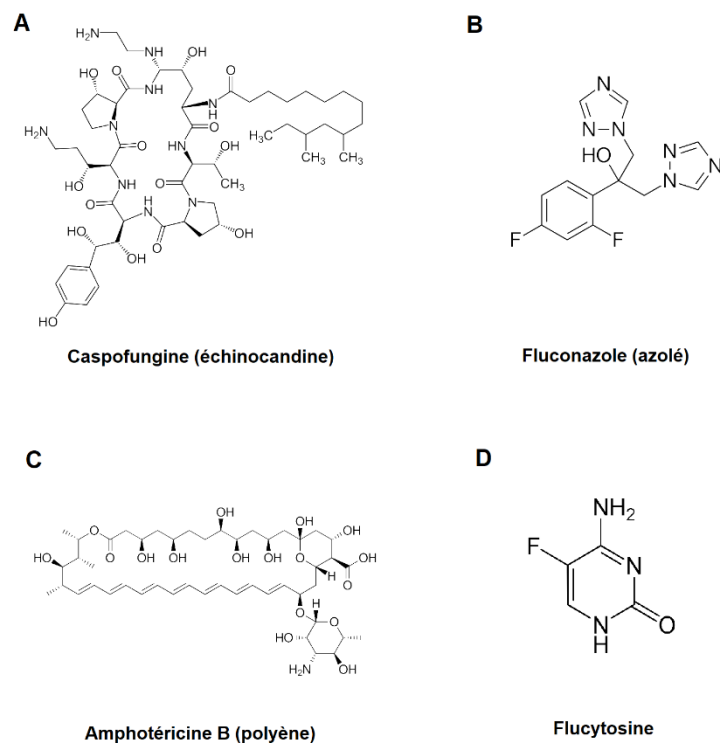


Figure I.9: Structures chimiques des molécules antifongiques les plus couramment utilisées dans les candidoses invasives pour chacune des quatre classes thérapeutiques.

On remarque donc que chaque classe thérapeutique d'antifongique comporte ses limites notamment au niveau des résistances et que celles-ci dépendent le plus souvent de l'espèce impliquée. A cela s'ajoute l'augmentation constante de la prévalence des espèces de *Candida* non-albicans pathogènes dans les CI ce qui ne fait qu'accroître ces résistances.

De plus, la morbi-mortalité des CI reste très élevée car le diagnostic est beaucoup trop tardif alors qu'un diagnostic précoce est la clé pour diminuer considérablement la mortalité. En effet, le diagnostic mycologique repose encore aujourd'hui principalement sur l'hémoculture mais celle-ci n'est positive que dans 50 % des cas environ. Une étude a d'ailleurs montré que 18 % des patients atteints d'une CI mourraient sans même avoir reçu de traitement antifongique car le résultat d'hémoculture positive n'arrivait qu'après leur décès [138]. On estime également que si le traitement antifongique est introduit dans les 12 heures après le début de l'épisode candidémique, la mortalité est de 12 % alors que celle-ci peut être multipliée par trois si le traitement est retardé de 48 h [139]. Avec tous ces éléments, on se rend bien compte que des stratégies de diagnostic alternatives sont nécessaires pour pallier à ces problèmes. Pour ce faire, des recommandations ont été établies par les sociétés savantes Infectious Diseases Society of America (IDSA) et European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) afin de prévenir au mieux l'infection candidémique avant le diagnostic. Ces recommandations se basent sur trois types de traitements prophylactiques que sont le traitement empirique, le traitement probabiliste et le traitement préemptif.

Des stratégies de diagnostic ont également été développées pour se substituer à l'hémoculture. Celles-ci se basent sur la détection de biomarqueurs fongiques présents dans un prélèvement biologique. Cette détection se fait principalement sur des composés polysaccharidiques issus de la paroi de *Candida*.

Le second chapitre va donc se focaliser dans un premier temps sur la composition structurale de la paroi cellulaire de *Candida* pour déboucher sur les stratégies alternatives non basées sur la culture qui ont été développées pour aider au diagnostic clinique des CI.

Chapitre II : La paroi cellulaire de *Candida* comme outil pour le diagnostic des candidoses invasives

I) Composition structurale de la paroi de *Candida* et son rôle dans la pathogénicité

Dans le chapitre précédent, nous avons notamment passé en revue les différents acteurs de l'immunité innée puis adaptative qui sont mis en jeu dans le processus anti-*Candida*. Du côté du pathogène, ce sont principalement les composants de la paroi cellulaire qui sont reconnus par les PRRs de l'hôte. Le rôle de cette paroi dans les relations hôte-pathogène qui se mettent en place lors de l'infection est donc crucial. De ce fait, il est également important de bien connaître les éléments qui composent cette paroi et surtout de savoir quels sont leurs rôles respectifs au sein du champignon. C'est pour ces raisons que le second chapitre va s'articuler autour de la paroi de *C. albicans* et nous verrons par la suite que ses composants sont aussi très utilisés pour le diagnostic des CI.

La paroi cellulaire des champignons est un organite dynamique qui définit la structure et l'écologie de l'organisme. La paroi cellulaire de *C. albicans* est capable de se modifier au cours de la morphogenèse cellulaire et en réponse aux changements environnementaux. Cette paroi réagit également aux différents stress rencontrés et dispose de mécanismes garantissant le rétablissement de sa robustesse en cas de difficulté.

La résistance et la forme de la paroi cellulaire dépendent de la couche interne composée de chitine (polymère de β -(1→4)-*N*-acétylglucosamine) et de β -D-(1→3)-glucane (Figure II.1). Chez *C. albicans*, une paroi 'normale' non soumise au stress contient environ de 1 à 3 % de chitine et 40 % de β -D-(1→3)-glucane. La quantité de chitine peut cependant être multipliée jusqu'à quatre lorsque l'intégrité du β -D-(1→3)-glucane est compromise [94].

La paroi externe comprend une série de protéines dont la plupart sont liées par des fragments de glycosylphosphatidylinositol (GPI) au β -D-(1→6)-glucane (Figure II.1). Ce polymère de β -D-(1→6)-glucane représente environ 20% du poids sec de la paroi total et joue le rôle d'agent de liaison permettant la fixation des différentes protéines au squelette de β -D-(1→3)-glucane [140].

Les protéines de la couche externe jouent un rôle important dans la virulence mais on peut aussi y retrouver des enzymes qui modulent la structure et l'assemblage de la paroi. Toutes ces protéines représentent 35 à 40 % de la masse totale de la paroi de *C. albicans* [126]. Cette masse importante est surtout due au fait que la plupart des protéines sont *N*- et *O*-glycosylées par des polysaccharides de mannose (mannane). Ce mannane agit alors comme un bouclier protégeant ainsi les polypeptides les plus vulnérables aux protéases et également le squelette

interne contre les glycosides hydrolases qui pourraient compromettre la viabilité de la levure [94].

Cette paroi de *C. albicans* est donc une structure composée de plusieurs couches essentiellement constituées de polysaccharides qui remplissent de nombreuses fonctions essentielles au cours de la croissance et de la pathogénèse. La première partie de ce chapitre va donc se concentrer sur ces polysaccharides pariétaux afin de mieux appréhender leur structure et leur rôle au sein de la paroi. Cela permettra ensuite de s'intéresser aux tests diagnostiques relatifs à ces polysaccharides qui ont été développés pour les CI.

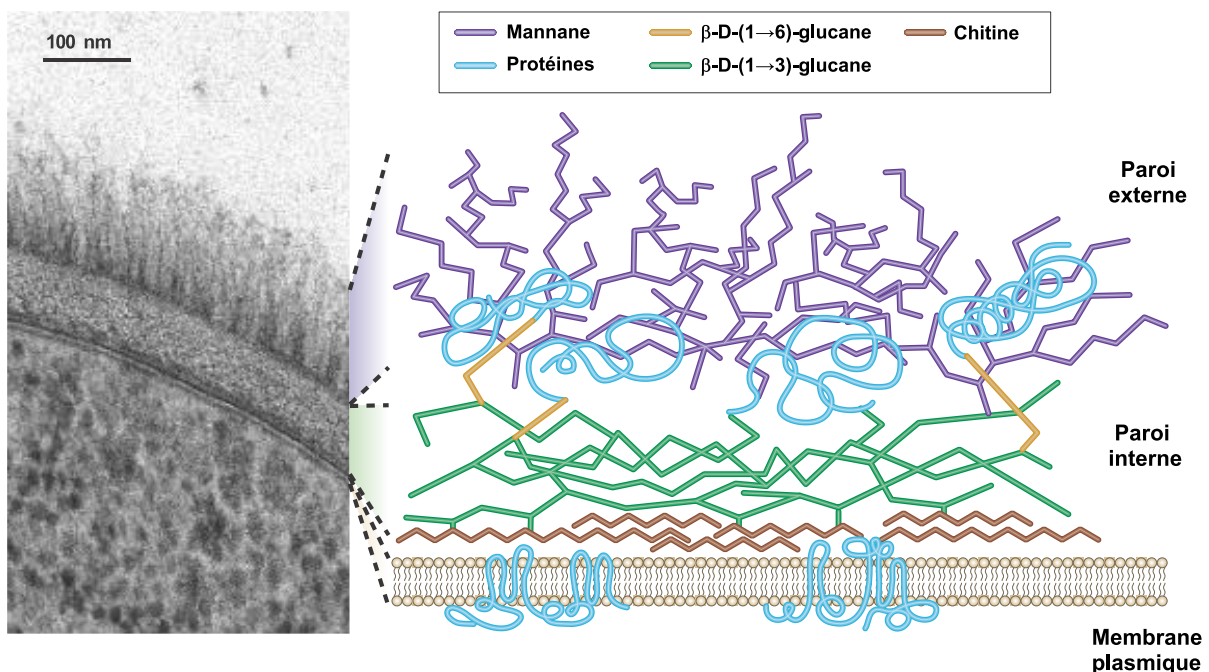


Figure II.1 : Composition structurale de la paroi cellulaire de *C. albicans*.

La paroi de *C. albicans* se divise en deux couches bien distinctes. La première couche correspond à la paroi interne qui compose le squelette assurant la rigidité de la paroi. On retrouve du β -D-(1→3)-glucane attaché de manière covalente à la chitine et au β -D-(1→6)-glucane. La seconde couche externe quant à elle est composée de protéines N- et O-glycosylées par des polysaccharides de mannose (mannane) [57].

I.1) Les β -D-glucanes de la paroi cellulaire de *Candida*

La paroi de *C. albicans* ne comprend pas d' α -D-glucanes mais uniquement des β -D-glucanes. Ces β -D-glucanes de *C. albicans* sont des polymères de glucose reliés par des liaisons β -(1→3) et/ou β -(1→6). On ne trouve cependant pas d'alternance de liaisons β -(1→3)/ β -(1→6) au sein d'une même chaîne mais uniquement au niveau des ramifications (Figure II. 2).

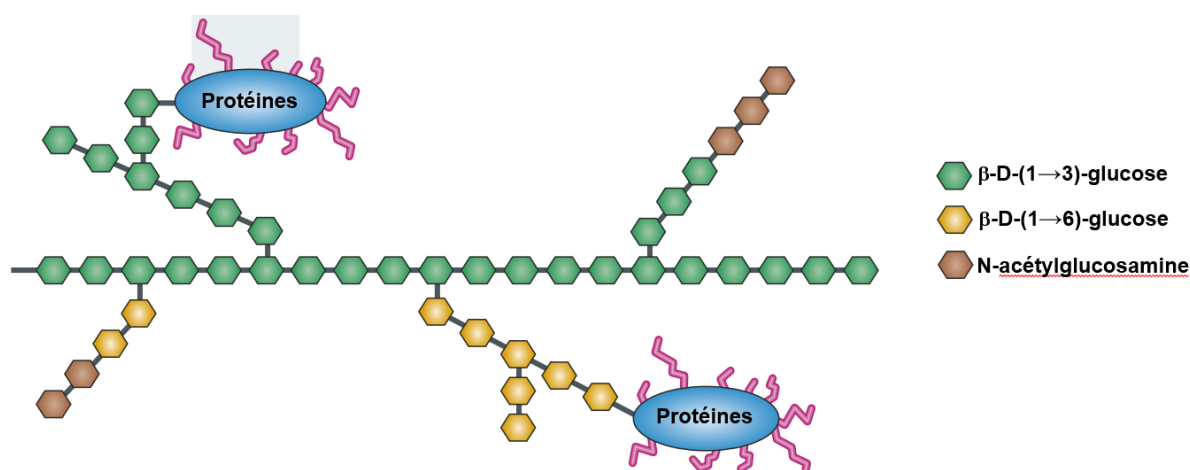


Figure II.2 : Organisation des β -glucanes dans la paroi de *C. albicans*.

Un squelette de β -D-(1 \rightarrow 3)-glucane vient tout d'abord former la base de l'organisation structurale. Des points de branchement de β -D-(1 \rightarrow 6)-glucane viennent ensuite se greffer à ce squelette. Enfin, en bout de ces chaînes de β -D-(1 \rightarrow 3)-glucane ou de β -D-(1 \rightarrow 6)-glucane, on peut retrouver des protéines de la paroi ou des résidus de N-acétylglucosamine provenant de la chitine. A noter que les protéines branchées sur du β -D-(1 \rightarrow 3)-glucane sont des protéines particulières possédant des domaines de répétition interne (PIR) [94].

Le β -D-(1 \rightarrow 3)-glucane est synthétisé sous forme de polymère linéaire par le complexe β -(1 \rightarrow 3)-glucane synthase qui, chez *C. albicans*, serait constitué d'une sous-unité catalytique essentielle Fks1 [141] et d'une sous-unité régulatrice Rho1 [142] :

- Fks1 est une enzyme inhabituelle car elle ne possède pas le motif QXXRW normalement associé à l'activité catalytique des β -glycosyltransférases. A la place, Fks1 possède un domaine hydrophile central d'environ 580 acides aminés qui est proposé comme site catalytique [143]. Le mécanisme réactionnel précis de Fks1 n'est cependant pas connu à ce jour et des preuves formelles sont encore requises concernant sa réelle affiliation de site catalytique [144]. Fks1 a déjà été mentionnée précédemment en tant que cible des échinocandines. En effet, cette classe d'antifongiques est la seule à cibler la paroi de *Candida*. De plus, cibler la synthèse de β -D-(1 \rightarrow 3)-glucane avec des échinocandines active une réponse dans laquelle les niveaux de chitine sont augmentés pour compenser la réduction du β -D-(1 \rightarrow 3)-glucane, rétablissant ainsi la robustesse de la paroi cellulaire et la viabilité [145]. Ce phénomène représente d'ailleurs un mécanisme de résistance aux échinocandines.
- Rho1 quant à elle est une GTPase, qui est aussi impliquée dans d'autres fonctions essentielles de la cellule et notamment l'intégrité de la paroi et la morphogenèse cellulaire. Décrit à l'origine dans *S. cerevisiae*, la protéine Rho1 de *C. albicans* possède 82,9% d'homologie avec Rho1p de *S. cerevisiae* et contient tous les domaines conservés de GTPases d'autres organismes [142].

Le β -D-(1 \rightarrow 3)-glucane peut enfin être remodelé par des β -(1 \rightarrow 3)-glucanosyltransférases à ancre GPI telles que Phr1 et Phr2, qui clivent les chaînes

de β -D-(1→3)-glucane en interne et transfèrent la partie non réductrice sur une nouvelle chaîne [146]. Une étude sur des mutants défectueux dans les gènes codants pour ces deux protéines a mis en avant la présence de morphologies anormales ainsi que des altérations des propriétés et de la structure de la paroi cellulaire [147]. Ces deux enzymes sont également responsables de la liaison entre le β -D-(1→3)-glucane et le β -D-(1→6)-glucane [148].

Comme il a été mentionné dans le chapitre précédent, le β -D-(1→3)-glucane est reconnu par la dectine-1 et TLR2. Initialement, son rôle lors de la détection immunitaire de *C. albicans* était considéré comme une voie mineure, car il a été démontré que les mannanes contribuent à la majeure partie de la production de cytokines. De plus, des mannanes forment la couche externe, recouvrant les composants internes comprenant le β -D-(1→3)-glucane. Cependant, il a été démontré que l'exposition du β -D-(1→3)-glucane à la surface par une inactivation thermique, des antifongiques ou encore des mutations affectant la couche de mannane stimule une forte production de cytokines ainsi qu'une phagocytose [149].

Par contre, la participation de la dectine-1 semble être limitée aux cellules de levure. En effet, les hyphes ne se divisent pas par un processus de bourgeonnement et n'ont donc pas de β -D-(1→3)-glucane exposé à la surface de la cellule et ne déclenchent ainsi pas l'activation de cellules immunitaires via la dectine-1 [150]. Ce processus d'évasion immunitaire que possède *C. albicans* peut être contré par un traitement à la caspofungine car cet antifongique est capable de démasquer le β -D-(1→3)-glucane contenu dans les hyphes afin de l'exposer suffisamment pour être reconnu par la dectine-1 [151].

Le β -D-(1→6)-glucane est un polysaccharide court et amorphe, la plupart des monosaccharides formant une structure linéaire et environ 7 % d'entre eux contiennent un point de ramification [152]. Il permet le lien entre la chitine, le β -D-(1→3)-glucane et les protéines à ancre GPI de la couche externe [140].

Les protéines codés par les gènes *KRE1*, *KRE9*, *KRE6* et *SKN1* sont impliqués dans la biosynthèse de ce polysaccharide, mais *SKN1* est spécifiquement régulé positivement lors de la transition hyphale, ce qui suggère que la machinerie de biosynthèse impliquée dans l'élaboration du β -D-(1→6)-glucane peut être différente chez les cellules de levure et les hyphes. Certaines de ces enzymes sont essentielles à la viabilité de *C. albicans*, soulignant l'importance de ce polysaccharide pour l'organisation de la paroi cellulaire.

Jusqu'à présent, la nature des récepteurs immunitaires impliqués dans la reconnaissance de ce composant de la paroi cellulaire est inconnue. Cependant, certaines données indiquent que ce polymère peut être impliqué dans la stimulation de la phagocytose et la production de ROS dans les neutrophiles humains [153].

I.2) La chitine

La chitine, homopolymère de *N*-acétylglucosamines liés en β -(1→4), est un polysaccharide représenté dans les parois cellulaires de tous les champignons étudiés à ce jour [154]. Le polysaccharide primaire naissant se replie sur lui-même pour former des chaînes anti-parallèles, ce qui permet ensuite de créer des liaisons hydrogène intra-chaînes qui renforcent ce polysaccharide en formant des microfibrilles fibreuses extrêmement résistantes. Ces microfibrilles rendent d'ailleurs la chitine plus solide que n'importe quelle autre molécule de la nature, et plus résistante (à poids identique) que les os ou l'acier [155]. Moins de 5 % de la chitine fongique synthétisée par *C. albicans* est déacétylée en chitosane par l'action d'une ou de plusieurs chitine-déacétylases [156]. La déacétylation de la chitine peut rendre le polymère plus élastique et le protéger de l'action de chitinases.

La simplicité apparente de la structure primaire de la chitine cache en fait un processus biosynthétique sous-jacent complexe. Chez *C. albicans*, la synthèse de la chitine est réalisée par une famille de quatre enzymes chitine synthase : Chs1, Chs2, Chs3 et Chs8 [154]. En raison des difficultés liées à la purification de ces enzymes, leur structure reste encore mal caractérisée. Comme le substrat de la chitine se trouve dans le cytoplasme, il est fort probable que les enzymes chitine synthase soient situées dans la membrane plasmique ce qui laisserait plus d'espace pour former les microfibrilles.

Chs1 est responsable de l'élaboration du septum primaire de la chitine et il s'agit de la seule chitine synthase essentielle à la viabilité de *C. albicans* ce qui montre l'importance de l'élaboration du septum primaire pour la physiologie, la division et l'intégrité des cellules [157]. Chs3 et Chs8 synthétisent respectivement des microfibrilles de chitine courtes et longues, Chs3 synthétisant environ 85 % de la chitine présente dans la paroi des cellules de levure et des hyphes [158]. Enfin, Chs2 est une enzyme spécifique des hyphes et elle est responsable de la synthèse d'environ 40 % de la chitine présente dans cette morphologie [159].

En ce qui concerne l'interaction entre la chitine et les cellules immunitaires, les avis sont contradictoires car certaines études ont montré que *C. albicans* n'était pas capable de stimuler la production de cytokines pro- et anti-inflammatoires ni d'activer des voies alternatives [160] alors que d'autres études ont mis en avant le contraire, même si dans ces dernières il a été précisé que la production de cytokines était dépendante de la taille des particules de chitine et de la phagocytose [161]. Dans tous les cas, il n'y a à l'heure actuelle aucune preuve concrète de l'existence d'un récepteur impliqué dans la détection de la chitine.

I.3) Les mannoprotéines de la couche externe

I.3.a) Structure des mannoprotéines

Les mannoprotéines de la paroi de *C. albicans* sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique (RE) et sont ensuite transportées à la paroi par la voie de sécrétion. Une fois transloquées dans la lumière du RE, les protéines peuvent subir des modifications post-traductionnelles par addition d'oligosaccharides riches en mannose (mannanes). Les mannanes peuvent être *N*-glycosylés, c'est-à-dire rattachés à un résidu d'Asn par une liaison amide (Figure II.3A) ou *O*-glycosylés par une liaison ester avec un résidu de Ser ou Thr (Figure II.3B) [162].

Le mannane *O*-glycosylé comprend de un à cinq résidus de α -(1→2)-mannose chez *C. albicans*. La première unité de mannose est fixée au groupe hydroxyle de Ser ou Thr par une protéine mannosyltransférase (PMT). Le génome de *C. albicans* contient cinq isoformes PMT (*PMT1*, *PMT2*, *PMT4*, *PMT5* et *PMT6*) et la caractérisation de cette famille de protéines a montré que tous les gènes PMT, à l'exception de *Pmt5*, sont nécessaires pour la morphogénèse, la virulence et la résistance antifongique et que *Pmt2* était même essentielle pour la croissance du champignon [163]. Le mannane *O*-glycosylé est ensuite allongé par l'ajout d'unités α -(1→2)-mannose par des mannosyltransférases golgiennes, notamment *Mnt1* et *Mnt2* [164].

L'addition de mannanes *N*-glycosylés est réalisée par le complexe oligosaccharyl transférase qui transfère le noyau glycanique *N*-glycosylé préalablement formé ($\text{GlcNAc}_2\text{Man}_9\text{Glc}_3$) à des résidus Asn comportant la séquence Asn-X-Ser-Thr (avec X tout acide aminé différent de Pro) [162]. Avant que le mannane *N*-glycosylé ne soit allongé, le noyau glycanique subit un traitement par des glycosidases du RE qui éliminent les trois résidus de glucose et une unité terminale de α -(1→2)-mannose [165]. Une fois dans le Golgi, le noyau est modifié par l'ajout de plusieurs unités de α -(1→6)-mannose. Le résidu initial de α -(1→6)-mannose est lié au noyau par action de l'enzyme Och1 et est ensuite étendu via la mannane polymérase I et II [166]. Des unités composées principalement de α -(1→2)-mannose viennent ensuite se greffer aux unités α -(1→6)-mannose. Chez *S. cerevisiae*, ce processus est réalisé grâce aux actions de *Mnn2*, qui ajoute les premières unités de α -(1→2)-mannose, formant ainsi les ramifications. Ces dernières sont ensuite étendues avec l'addition de α -(1→2)-mannose supplémentaires, catalysées par *Mnn5* [167]. En revanche, chez *C. albicans*, ces deux étapes seraient a priori uniquement réalisées par *Mnn2* [165]. Ces ramifications peuvent également être terminées par d'autres résidus que sont le β -(1→2)-mannose ou encore le α -(1→3)-mannose.

De plus, les mannanes *N*- et *O*-glycosylés peuvent être modifiés avec des résidus de mannose liés à l'oligosaccharide par une liaison phosphodiester (au niveau d'un résidu α -(1→2)-mannose), appelée phosphomannane et cette action est prise en charge par les enzymes Mnt3 et Mnt5 [168]. Ce sont des unités de β -(1→2)-mannose qui viennent ensuite se lier au groupement phosphate par l'action de β -(1→2)-mannosyltransférases, notamment Bmt2, Bmt3 et Bmt5 [169].

A noter qu'en plus de la mannosylation, le mannane peut aussi être incorporé au phospholipomannane (PLM). Le PLM est principalement constitué de longues chaînes linéaires composées de β -(1→2)-mannoses et d'inositols liés de manière covalente par une liaison phosphodiester à un fragment lipidique [170]. La mannose inositolphosphocéramide mannosyltransférase, Mit1, est requise pour l'ajout des unités de mannose au groupe inositol [171].

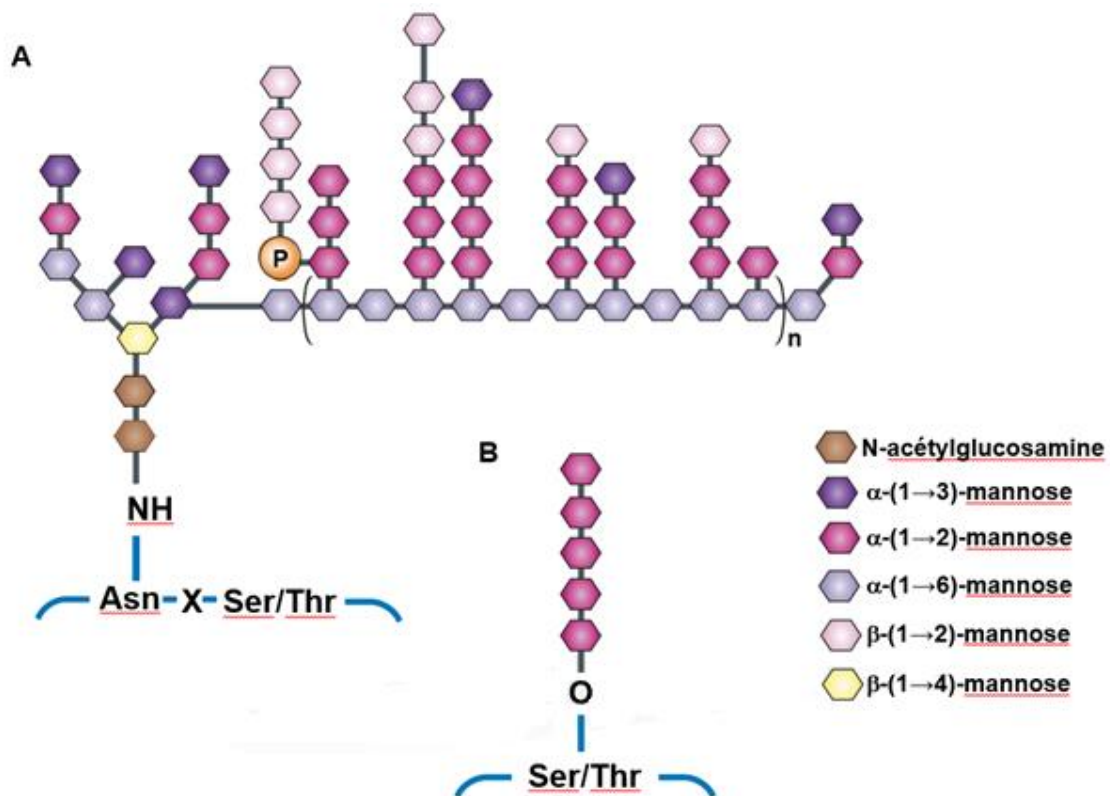


Figure II.3 : Structure des mannanes *N*-glycosylés (A) et *O*-glycosylés (B) de la paroi de *C. albicans* [94].

I.3.b) Rôle des mannoprotéines dans la pathogénicité de *C. albicans*

La reconnaissance des mannanes O-glycosylés est une voie relativement mineure pour la stimulation des cytokines dans les monocytes et les macrophages, et dépend de son interaction avec TLR4 [172]. Cela a d'ailleurs été confirmé dans un modèle de candidose invasive chez des souris déficientes en TLR4, où les souris dépourvues de ce récepteur sont aussi sensibles à la maladie systémique que les animaux témoins [173].

La reconnaissance des mannanes N-glycosylés est en revanche beaucoup plus complexe car les résidus de mannose sont liés entre eux par différentes liaisons glycosidiques. Tout d'abord, le récepteur MR reconnaît les α -mannoses provenant des ramifications de l'oligosaccharide [174]. C'est d'ailleurs sûrement pour cette raison que ce récepteur ne reconnaît pas les mannanes O-glycosylés. DC-SIGN, exprimé uniquement à la surface des cellules dendritiques, est également impliqué dans la reconnaissance des mannanes N-glycosylés *via* les ramifications α -(1→2). Il est aussi efficace que le récepteur MR pour la liaison des cellules de *C. albicans* mais pourrait être mieux exprimé sur les cellules dendritiques que ce dernier [123]. Enfin, la dectine-2 participe aussi à cette reconnaissance mais interagit préférentiellement avec les oligosaccharides hautement mannosylés, et en particulier avec le noyau du mannane N-glycosylé [175].

Le phospholipomannane mentionné précédemment est considéré comme un facteur de virulence de *C. albicans*, comme le démontre son aptitude à déclencher l'apoptose des macrophages lors de la phagocytose du pathogène [176]. Ce glycolipide stimule la production de TNF α par les monocytes et les macrophages et il est détecté par TLR2. Une étude a également montré que la perte de TLR4 et de TLR6 entraîne une diminution significative des taux de TNF α stimulés par le phospholipomannane [177].

Dans le chapitre précédent, les principales protéines retrouvées dans la paroi de *C. albicans* Hwp1 et Als3 avaient été décrites. Hwp1 est exclusivement exprimé dans la paroi cellulaire des tubes germinatifs et 75 % de la protéine totale est fixée de manière covalente à la paroi cellulaire *via* une ancre GPI, le reste étant librement réparti dans la paroi cellulaire [178]. Hwp1 est hautement mannosylée et contient trois sites potentiels de N-mannosylation et 184 sites potentiels de O-mannosylation [179]. Des mutants de mannane O-glycosylé produisent une protéine Hwp1 avec une plus grande mobilité de gel, ce qui suggère que Hwp1 est significativement O-mannosylée [178].

Les protéines ALS sont une famille de protéines d'adhésion exprimées dans la paroi cellulaire qui sont liées de manière covalente à la couche de glucane sous-jacente par une ancre GPI. Chez *C. albicans*, on compte huit membres dans la famille ALS et ils contiennent tous une séquence signal C-terminale pour l'ajout de l'ancre GPI suivie d'une région riche en

thréonine, qui contient plusieurs sites de O-mannosylation pour stabiliser la protéine dans la paroi cellulaire. Le domaine central des protéines ALS contient plusieurs sites de N-mannosylation, qui peuvent être répétés, le nombre de répétitions variant entre les souches [180]. Comme beaucoup d'autres protéines de la paroi cellulaire, la distribution en surface et la localisation des membres de la famille ALS dépendent de la morphologie et des conditions de croissance [181]. Par conséquent, des changements globaux dans les taux de mannoprotéines affecteront considérablement la composition de la paroi cellulaire.

Tout cela nous ramène finalement à la capacité de *C. albicans* à s'adapter à son environnement et à moduler la structure de sa paroi pour contrer les réponses immunitaires mises en place par l'hôte. Un autre aspect important dans cette adaptation est la résistance au stress auquel le pathogène fait face lors de l'invasion. La réponse au stress par *C. albicans* est principalement reliée à la production d'un autre glycanne, le tréhalose qui va venir renforcer la paroi cellulaire.

II) Résistance au stress de *C. albicans* par le tréhalose

Le tréhalose est un disaccharide non réducteur contenant deux résidus de glucose liés entre eux par une liaison α -(1→1). Le tréhalose joue différents rôles, allant de la source d'énergie à la protection contre le stress, et il se retrouve dans les bactéries, les champignons, les plantes et les invertébrés, mais pas chez les mammifères [182]. Chez les champignons, le tréhalose agit à la fois comme principale réserve de glucides et comme protecteur cellulaire contre diverses agressions nutritionnelles et/ou environnementales (stress oxydatif, choc thermique, stress osmotique et salin, etc.), en augmentant la résistance cellulaire face à ces menaces [183].

Pour ce faire, les modes d'action du tréhalose sont multiples et comprennent entre autres le remplacement de l'eau, la transition vitreuse et la stabilité chimique. Le remplacement des molécules d'eau par du tréhalose à la surface cellulaire permet de former des liaisons hydrogènes qui vont venir renforcer les différentes structures. Les liaisons hydrogènes ne se forment pas directement mais se font entre une molécule de tréhalose et deux molécules d'eau (Figure II.4A). Ce type d'arrangement structural apporte une meilleure flexibilité et permet ainsi au tréhalose d'interagir avec des phospholipides ou d'autres macromolécules polaires, bien qu'aucune preuve concrète n'a encore été trouvée concernant l'interaction entre le tréhalose et les protéines de la paroi cellulaire de *C. albicans* [184]. En ce qui concerne la transition vitreuse, il s'agit d'un phénomène complexe qui fait encore l'objet de nombreuses études physico-chimiques et ne sera ici pas développé en détail. Toujours est-il que cette transition est très intéressante car elle est reliée à la capacité des sucres à se solidifier dans certaines conditions environnementales de choc thermique ou de déshydratation ce qui assure la protection d'autres molécules plus sensibles. Dans le cas du tréhalose, son état vitreux est

différent de celui des autres sucres car il ne retient pas les molécules d'eau et ne forme donc pas de cristaux (Figure II.4B). De plus, sa température de transition vitreuse de 115 °C est la plus élevée de tous les sucres ce qui le rend (sous état vitreux) très stable à des températures élevées et dans des conditions de dessiccation [185]. Le rôle biologique de cette propriété du tréhalose est cependant très mal connu. Une dernière particularité de ce disaccharide est qu'il est non-réducteur ce qui signifie qu'il est beaucoup moins sensible à l'hydrolyse que les autres disaccharides.

Pour le moment, tous ces mécanismes ont surtout été étudiés dans un contexte agro-alimentaire pour la conservation des aliments [184]. D'autres études visant à mieux cerner les propriétés biologiques du tréhalose sont donc nécessaires pour révéler pleinement ses mécanismes biologiques et son potentiel de protection des cellules et des molécules sensibles, et ce notamment dans la pathogenèse de *C. albicans*.

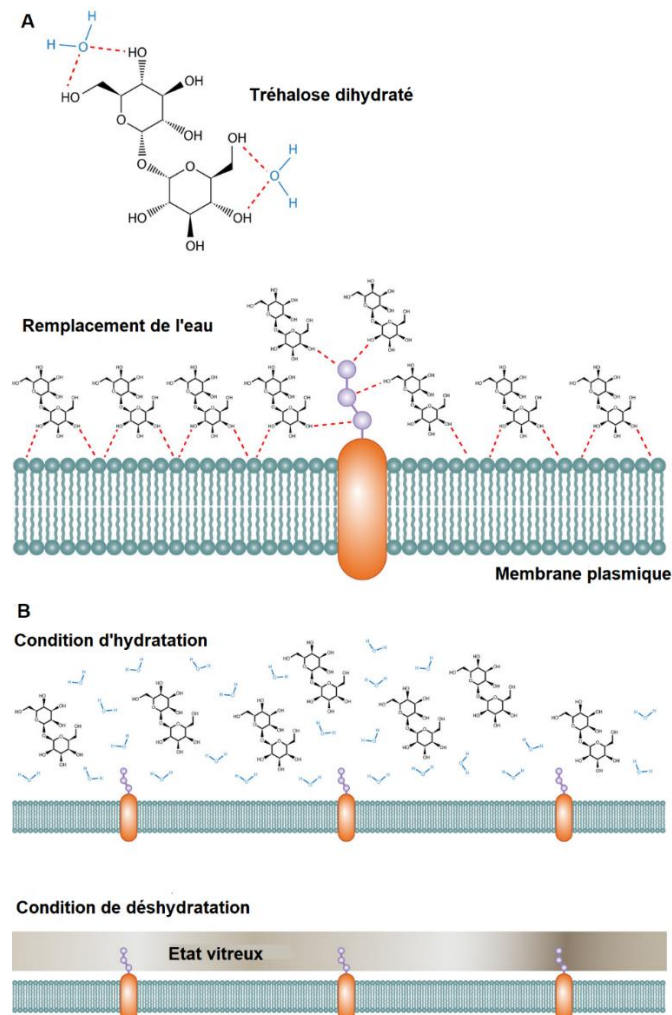


Figure II.4 : Mode d'action du tréhalose dans la protection de *C. albicans* contre le stress. (A) Le tréhalose peut former des liaisons hydrogène avec les molécules d'eau en surface afin de remplacer ces dernières et ainsi d'assurer une flexibilité accrue et des interactions avec d'autres macromolécules. (B) Le tréhalose a également la capacité de passer à un état vitreux (solide) en cas de déshydratation ou de choc thermique lui permettant de protéger efficacement les molécules les plus fragiles [186].

Si le tréhalose est actif au niveau de la membrane de *C. albicans*, sa biosynthèse est réalisée dans le cytoplasme. La principale caractéristique de la voie de biosynthèse est son lien direct avec la voie glycolytique. Cette voie comporte deux enzymes principales : la tréhalose-6-phosphate synthase (Tps1) et la tréhalose-6-phosphate phosphatase (Tps2) [187]. Tps1 convertit l'UDP-glucose et le glucose-6-phosphate (G6P) en UDP et en tréhalose-6-phosphate (T6P). Ensuite, Tps2 vient transformer le T6P en tréhalose et en phosphate inorganique libre (Pi) (Figure II.5). Plus récemment, une troisième enzyme Tps3 a été mise en avant et celle-ci servirait à la régulation de la production du tréhalose chez *C. albicans* mais son mécanisme est encore mal connu. Une fois le tréhalose formé dans une cellule, il peut être dégradé en glucose par plusieurs tréhalases bien décrites. Chez *C. albicans*, on retrouve des tréhalases régulatrices qui fonctionnent dans des conditions neutres (pH 6 à 7,5) et qui ont une faible stabilité thermique [188].

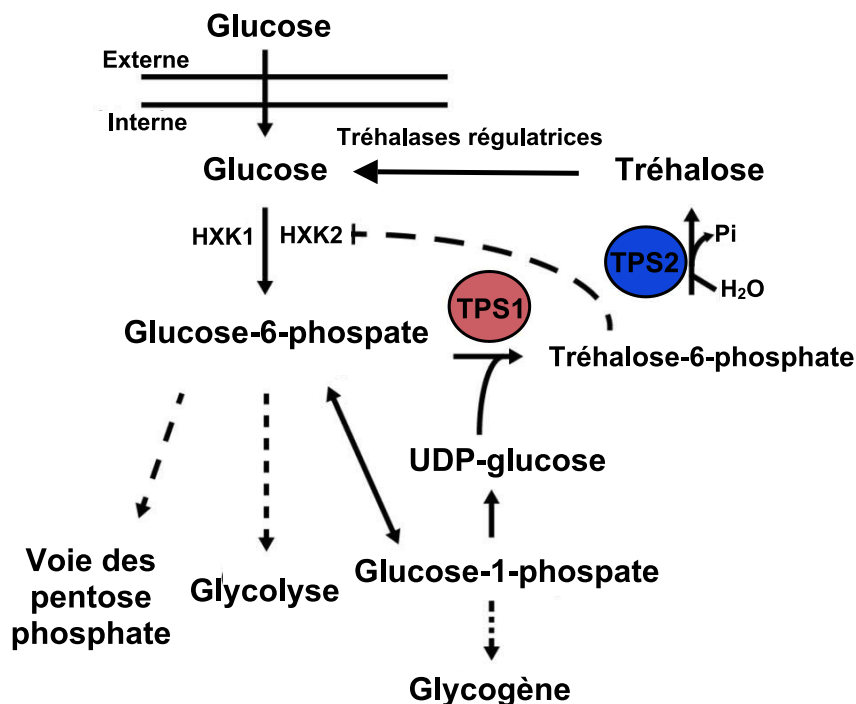


Figure II.5 : Voie de biosynthèse du tréhalose chez *C. albicans*.

La voie de biosynthèse du tréhalose démarre à partir du glucose-6-phosphate synthétisé à partir du glucose grâce aux hexokinases (HXK1/HXK2). Cette voie implique ensuite deux enzymes, à savoir la tréhalose-6-phosphate synthase (Tps1) suivie de la tréhalose-6-phosphate phosphatase (Tps2) pour donner le tréhalose. Enfin, ce tréhalose peut être dégradé en glucose par l'action de tréhalases régulatrices.

La voie de biosynthèse du tréhalose est très intéressante car pouvoir inhiber les enzymes Tps1 et Tps2 qui y sont impliquées permettrait d'empêcher *C. albicans* de se protéger en surface cellulaire lors d'une infection et ainsi favoriser la réponse immunitaire de l'hôte.

De plus, le tréhalose n'est pas synthétisé par les mammifères. Il est alors fort probable que le ciblage et le blocage de la voie par le biais de ses enzymes devraient avoir peu de conséquences pour le métabolisme des mammifères. Ainsi, on peut supposer que les inhibiteurs et/ou les antifongiques éventuels dirigés vers cette voie auraient peu de toxicité pour l'hôte. De nombreuses études ont d'ailleurs été menées sur ce sujet principalement sur des mutants *Δtps1* et *Δtps2*.

A 30 °C les souches mutantes *Δtps1* se développent normalement mais à 42 °C elles ne peuvent se développer que sur du glucose et il faut alors les faire pousser sur du galactose ou du glycérol pour qu'elle puisse supporter des températures plus élevées [189]. De plus, ce mutant montre une virulence également atténué dans un modèle murin d'infection systémique [189]. D'autre part, la souche mutante *Δtps1* présente une réduction importante de la viabilité cellulaire après une exposition à de fortes concentrations de peroxyde d'hydrogène H₂O₂, tandis que la souche sauvage conserve une bonne viabilité cellulaire associée à une augmentation du tréhalose intracellulaire [190]. Cependant, un traitement préalable des deux souches sauvage et *Δtps1* avec une concentration non létale de H₂O₂ (0,5 mM) ou un stress thermique modéré (37 °C) les protège de manière similaire contre le stress oxydatif [191]. On peut donc en conclure à partir de ces résultats que l'accumulation de tréhalose joue un rôle majeur dans la protection des cellules de levure contre une exposition à un stress oxydatif important. En ce qui concerne les souches mutantes *Δtps2*, la mutation entraîne une décroissance légère dans la virulence dans un modèle murin de CI. En revanche, en double mutation avec une autre protéine GPR1 (un récepteur de nutriments activant l'AMP-protéine kinase A cyclique), la virulence est complètement atténuée. Le double mutant *Δtps2/ΔGpr1* accumule des taux très élevés de T6P dans des conditions de stress, avec un défaut de croissance lorsque cette accumulation est associée à des températures élevées [192].

Nous avons donc pour le moment passé en revue les différents composants qui constituent la paroi cellulaire de *C. albicans* et leur rôle protecteur lors de CI ainsi que leurs interactions avec les cellules immunitaires de l'hôte. Ces constituants de la paroi et notamment les polysaccharides β-D-(1→3)-glucanes et les mannanes sont d'ailleurs largement utilisés comme biomarqueurs en mycologie. La partie suivante va donc s'intéresser à ces tests et à leurs performances dans le diagnostic des CI.

III) Les polysaccharides de la paroi de *Candida* comme biomarqueurs pour le diagnostic des candidoses invasives

Les méthodes microbiologiques utilisées pour le diagnostic des CI se divisent en deux catégories : la première est une technique basée sur la culture dans laquelle on retrouve l'hémoculture mais aussi l'identification des espèces de *Candida* par spectrométrie de masse; la seconde est constituée de techniques non basées sur la culture (ou par détection de biomarqueurs) et c'est dans cette catégorie que se place notamment la détection des polysaccharides de la paroi de *Candida*. L'utilisation de ces méthodes pour le diagnostic des CI a fait l'objet de recommandations qui ont été élaborées par l'ESCMID [193].

III.1) Méthodes de diagnostic basées sur la culture

Parmi ces méthodes, on retrouve tout d'abord l'hémoculture qui reste aujourd'hui le gold standard en pratique clinique. Par contre, sa performance est globalement très mauvaise pour le diagnostic des CI. Comme nous l'avons vu précédemment, ces hémocultures peuvent être négatives jusqu'à 50 % des cas de candidose profonde confirmés par l'autopsie ou ne peuvent devenir positives que tard dans l'infection [194]. On estime en effet que le délai moyen pour l'obtention d'une hémoculture positive est de l'ordre de 50 heures, délivrant un résultat souvent après la survenue du décès du patient [138]. Des améliorations ont pu être apportées notamment avec l'utilisation de flacons d'hémocultures spécifiques aux champignons mis en incubation dans un automate qui détecte la production de CO₂ en temps réel dans le flacon. Ce changement a par exemple permis un gain de sensibilité pour l'espèce *C. glabrata* et également un léger gain de temps pour *C. albicans* et *C. glabrata* mais toujours insuffisant pour un diagnostic rapide qui reste le point crucial [195].

Une autre méthode se basant sur la culture est également utilisée en mycologie et utilise la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight*) via deux appareillages que sont le MALDI-TOF Biflex III (Brüker, Billerica, Massachusetts, USA) ou le Vitek MS (Shimadzu, Kyoto, Japon). Cette technologie est aujourd'hui bien implantée dans la plupart des laboratoires de mycologie et permet une identification rapide de l'espèce avec un taux proche de 100 % [196]. Cependant, un prétraitement d'extraction des protéines en amont est nécessaire car l'analyse ne peut pas être directement effectuée sur des colonies obtenues en culture. Au-delà du fait que celui-ci ait un coût et un temps-technicien supplémentaire, le prétraitement pose aussi des problèmes de faux négatifs et de faux positifs lors de contamination par d'autres saprophytes environnementaux [197]. De plus, ces analyses nécessitent des hémocultures positives pour être réalisées [198]. Enfin, plusieurs systèmes différents sont commercialisés mais il n'existe

pas de base de données propre à chaque appareillage ce qui pose également quelques soucis de standardisation.

On s'aperçoit donc que chacune de ces méthodes comporte ses limites que ce soit au niveau de la sensibilité ou du délai de réponse. C'est pour ces raisons que d'autres méthodes ont été développées par d'autres voies non basées sur la culture, et qui s'orientent vers la détection de biomarqueurs.

III.2) Méthodes de diagnostic non basées sur la culture

Si de nombreuses techniques non basées sur la culture existent, seules quelques-unes d'entre elles sont commercialisées et disponibles en routine dans les laboratoires de mycologie. Ces méthodes concernent toutes la détection et le dosage de polysaccharides issus de la paroi cellulaire de *Candida*. Plus précisément, on y retrouve le dosage des β -D-(1 \rightarrow 3)-glucanes (BDG) et des mannanes (Mnn).

Le dosage du BDG s'effectue à partir de sérums de patients et repose sur sa capacité à activer la cascade de coagulation du lysat d'améboocyte de la limule (arthropode marin ancestral) présente dans le sang de *Limulus polyphemus*, la limule Nord-Américaine [199]. En présence de BDG, un zymogène à sérine protéase appelée facteur G est activé ce qui entraîne alors l'activation d'une seconde enzyme de pro-coagulation dans la cascade. L'activation du facteur G quant à elle se produit au préalable *via* la liaison du BDG simple brin à la sous-unité α du facteur G [200]. Parce que le BDG simple brin est nécessaire à l'activation, les échantillons de sérum sont prétraités avec un réactif alcalin qui encourage la conversion des formes multimères en simples brins [200]. La coagulation résultante peut ainsi être mesurée par spectrophotométrie, donnant une concentration indirecte en BDG qui est exprimée en pg/mL (Figure II.6).

Le test BDG est commercialisé sous un kit nommé Fungitell® (Associates of Cape Cod Inc., East Falmouth, Massachusetts, USA). Avec ce kit, une valeur de BDG inférieure à 60 pg/mL est considérée comme un résultat négatif, une valeur comprise entre 60 et 79 pg/mL est un résultat indéterminé et une valeur de 80 pg/mL ou supérieure est un résultat positif. Le cutoff de ce test Fungitell est donc de 80 pg/mL.

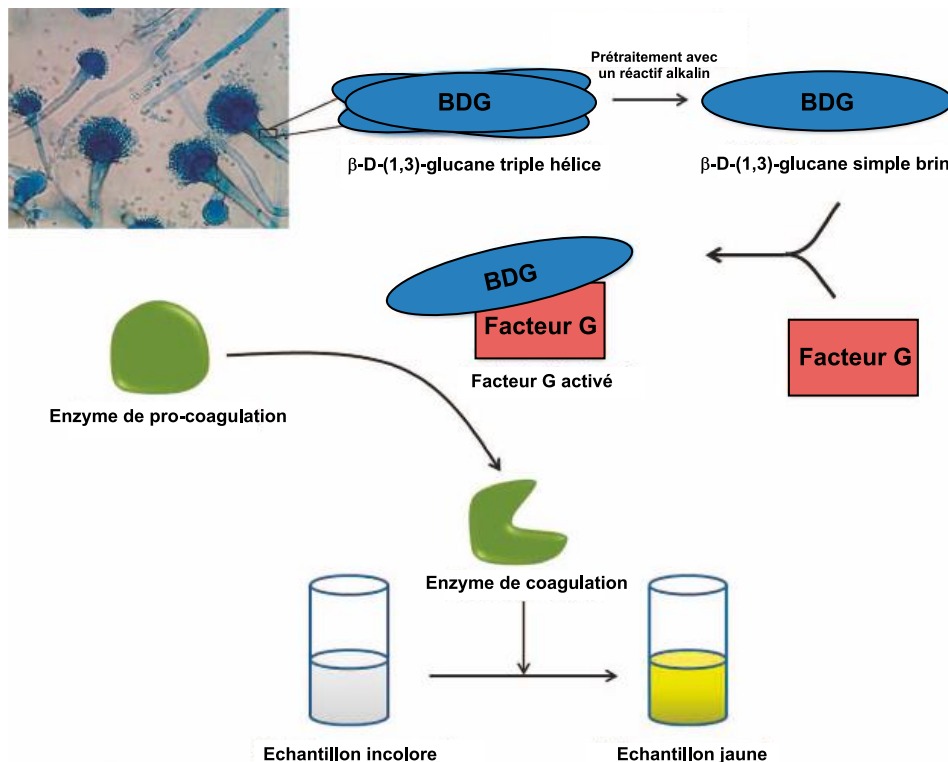


Figure II.6 : Principe du dosage des β -D-(1 \rightarrow 3)-glucanes (BDG) de la paroi cellulaire de *Candida* utilisé pour le diagnostic des candidoses invasives via le kit Fungitel® [201].

De nombreuses études concernant les performances du BDG dans les CI ont été menées mais sont très hétérogènes. En effet, on retrouve pour le dosage BDG dans le diagnostic des CI des valeurs de sensibilité variant de 57 % à 97 % et de spécificité de 56 % à 93 %. Une méta-analyse rassemblant 11 études publiée en 2011 annonçait quant à elle une sensibilité de 75 % [16]. A noter que les résultats sont considérés comme optimaux lorsque deux tests consécutifs sont positifs [202]. Les principales limites à la détection du BDG sont la spécificité et les faux-positifs, et ce particulièrement chez les populations à haut risque. Les faux-positifs sont rares chez les témoins en bonne santé, mais ils sont fréquents chez les patients présentant une bactériémie à Gram positif et à Gram négatif, ainsi que ceux admis en unité de soins intensifs [203]. Les causes aux faux-positifs rencontrés dans le test de détection du BDG sont nombreuses et incluent notamment des interférences avec des produits issus du sang humain (albumine, immunoglobuline, facteurs de coagulation...), des infections bactériennes systémiques concomitantes ou encore une manipulation excessive de l'échantillon [203]. Malgré les limites du test BDG en tant qu'outil de diagnostic de la CI, il présente une caractéristique unique lorsqu'il est utilisé pour suivre la réponse au traitement en raison de son profil quantitatif [204]. En effet, une pente négative des valeurs de BDG est en corrélation avec un traitement réussi tandis qu'une pente positive des taux de BDG est corrélée à un échec du traitement [205]. Enfin, même si la cinétique du BDG dans la circulation

sanguine reste relativement mal comprise, des rapports de positivité ont été rapportés avant des hémocultures positives et dans des échantillons ante-mortem provenant de patients atteints d'une maladie confirmée par l'autopsie mais avec des hémocultures négatives [206].

L'autre méthode commercialisée pour les tests diagnostiques de CI non-basés sur la culture est la détection des Mnn de la paroi de *Candida*. Plus précisément, les Mnn sont dosés par ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) de deux manières différentes : soit par dosage des antigènes (Ag) Mnn soit par dosage des anticorps (Ac) anti-Mnn en utilisant le kit commercialisé Platelia™ (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France). En général, le dosage des Ag est limité par la clairance de la circulation sanguine et est donc transitoire [194]. Bien que l'impact de l'immunosuppression sur la détection des anticorps soit un sujet de préoccupation, un certain nombre d'études indiquent que ces tests donnent de bons résultats chez les patients atteints de neutropénie et de défauts immunitaires à médiation cellulaire [194], [207]. Les espèces non-albicans peuvent également être identifiées par des réponses aux antigènes recombinants de *C. albicans* [207]. Une problématique liée à ces dosages est par contre la complexation Ag/Ac. Pour pallier à ce problème, il a été proposé par la suite de combiner ces deux dosages en utilisant des Ac dirigés contre différents épitopes [208]. Dans une méta-analyse effectuée à partir de 14 études, la sensibilité et la spécificité des Ag mannanes et des Ac anti-mannanes étaient respectivement de 58 % / 93 % et 59 % / 83 %. En combinant les deux tests, les valeurs de sensibilité ont été nettement améliorées tout en gardant une spécificité similaire avec un couple sensibilité/spécificité de 83 % / 86 %, les meilleures performances ayant été relevées pour les infections à *C. albicans*, *C. glabrata* et *C. tropicalis* [17]. De plus, le kit détectant les Ag Mnn par ELISA est normalement constitué d'un Ac monoclonal qui reconnaît les α -(1→2)-mannanes mais une étude a montré qu'il était possible d'améliorer la sensibilité de ce test en y ajoutant un second anticorps monoclonal reconnaissant cette fois-ci les β -(1→2)-mannanes [209]. En ce qui concerne la précocité des résultats, une étude sur la candidémie a mis en avant qu'au moins un test était positif avant l'hémoculture chez 73 % des patients [210]. Des diagnostics précoces de candidémie ont par la suite été corroborés par d'autres études [17].

Pour les méthodes de détection du BDG et du Mnn, le problème majeur est que la plupart du temps, les témoins utilisés dans les études sont composés de sujets sains. Or, cette utilisation n'est pas forcément la plus adaptée à la problématique clinique qui est de pouvoir discriminer une population présentant des facteurs de risques de CI connus mais n'ayant pas connu d'épisode de CI avéré. Cet aspect remet d'ailleurs en avant la complexité du processus d'infection de *Candida* et la barrière entre colonisation et invasion. Globalement, ce qui ressort de la majorité des études est une bonne sensibilité du test BDG mais une spécificité

relativement faible et inversement pour le test de détection des Mnn. Ces deux techniques se complètent donc bien mais elles restent des méthodes très coûteuses pour les hôpitaux et demandent un temps-technicien important.

D'autres méthodes non-basées sur la culture existent cependant. On peut citer notamment la détection d'ADN par PCR qui est de prime abord très intéressante car elle permet d'identifier rapidement différentes espèces de *Candida* et de faire le diagnostic de CI à hémocultures négatives en temps réel. Cependant, le manque de validation et de standardisation a limité la mise en œuvre de la PCR dans la pratique clinique quotidienne. La sensibilité et la spécificité de différents tests PCR ont été évaluées dans une méta-analyse regroupant 54 études [211]. Malgré des rapports prometteurs, une grande variation des performances a été constatée en fonction du type d'échantillon (sérum, sang total ou plasma), du gène cible de la PCR et du nombre de tests PCR effectués pour définir la présence ou non de l'infection. Les auteurs de cette méta-analyse ont conclu que la PCR sur sang total utilisant des amorces pan-fongiques pouvait permettre une meilleure précision du diagnostic, mais des rapports contradictoires d'études individuelles ont également été publiés [212]. Ce sont donc pour toutes ces raisons que la PCR n'est pas utilisée en routine mycologique et qu'elle ne fait pas non plus l'objet de recommandations.

Plus récemment, le test T2MR (T2Biosystems, Inc., Wilmington, Massachusetts, USA) a été approuvé par la FDA (*Food and Drug Administration*) pour son utilisation dans le diagnostic des candidémies même si il représente un coût important. Ce test combine la résonance magnétique nucléaire et le dosage moléculaire par PCR afin de détecter et de définir directement les espèces de *Candida* à partir d'échantillons de sang total [18]. Plus précisément, la technique T2MR permet de détecter 5 espèces de *Candida* : *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* et *C. krusei* via un appareillage spécifique (T2Dx). Le T2MR représente une méthode de diagnostic moléculaire très prometteuse pour le diagnostic des candidémies mais des études restent encore à faire pour déterminer la performance du T2MR chez les patients diagnostiqués avec des infections profondes en suivant ces patients avec le test T2MR, les hémocultures et le marqueur fongique.

Dans cette partie, nous avons passé en revue les différents tests microbiologiques existants pour le diagnostic des CI, qu'ils soient basés sur la culture ou non. Cependant, toutes ces techniques comportent leurs limites qui sont généralement liées au coût et/ou aux performances. Le besoin de nouveaux tests diagnostiques pour les CI est donc toujours d'actualité et des améliorations restent à apporter afin de les diagnostiquer le plus rapidement possible et ainsi de mettre en place un traitement antifongique adapté dans les meilleurs délais.

Conclusion de la partie introductive sur *Candida*

Le genre *Candida* comporte de nombreuses espèces réparties dans deux clades. La plupart d'entre elles sont retrouvées dans le clade CTG de *Candida* et quelques-unes se rapprochent plutôt de *S. cerevisiae* et sont comprises dans le clade WGD. *C. albicans* reste aujourd'hui l'espèce la plus répandue dans les CI même si d'autres espèces sont de plus en plus impliquées comme *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* et *C. krusei*. D'autres émergentes comme par exemple *C. lusitaniae* et *C. guilliermondii* ont également été identifiées.

C. albicans est un champignon polymorphe qui peut se développer sous forme de levure, de pseudohyphes ou de véritables hyphes. Cette capacité est importante dans la virulence car elle caractérise le passage de la forme commensale à pathogène. Les mécanismes mis en jeu dans la pathogénèse de *C. albicans* sont cependant très complexes et comportent de nombreuses étapes débutant par la colonisation et se poursuivant jusqu'à l'invasion des tissus.

Au cours de ce processus, le pathogène mais également l'hôte, sont actifs. On peut distinguer d'une part la stratégie de défense de l'hôte, avec notamment le déclenchement de la réponse immunitaire et d'autre part l'adaptation du pathogène face à cet environnement. Ces stratégies nous ramènent ainsi au cœur du sujet de thèse global sur les relations hôte-pathogène qui s'établissent lors d'une infection, et plus particulièrement ici la CI. Ces relations sont d'ailleurs très fragiles et nécessitent un bon équilibre de la réponse immunitaire. En effet, même si elle permet d'engendrer la destruction de l'agent pathogène, elle peut aussi s'avérer délétère pour l'hôte si elle devient trop importante.

Concernant l'hôte, la réponse immunitaire est composée de deux phases :

- La première représente la réponse immunitaire innée qui consiste en la reconnaissance des motifs structuraux (PAMPs) de la paroi cellulaire de *Candida* par les récepteurs des différentes cellules immunitaires de l'hôte (PRRs) mises en jeu (monocytes, macrophages, polynucléaires neutrophiles et cellules dendritiques). Une fois les motifs structuraux reconnus, les cellules immunitaires peuvent alors procéder à la phagocytose des cellules de *C. albicans*.
- La seconde phase est dite adaptative puisqu'elle implique les lymphocytes T et B, permettant ainsi de produire une réponse spécifique à l'antigène mais également une réponse mémoire en cas de réinfection.

Pour le pathogène, ce sont essentiellement les composants de la paroi (β -D-glucanes, mannoprotéines et phospholipomannane) qui sont impliqués dans les interactions avec l'hôte car ces éléments sont reconnus par les PRRs de l'hôte. *C. albicans* a la capacité de modifier

la structure de sa paroi afin d'échapper à la réponse immunitaire de l'hôte. Il est également apte à résister aux fortes conditions de stress auxquelles il est soumis pendant le processus infectieux et notamment grâce au tréhalose qui va assurer un rôle de protection contre les agressions extérieures.

A partir des nombreuses avancées sur la compréhension des mécanismes liés aux relations hôte-*Candida* lors de CI, des traitements antifongiques ont pu être développés et un large panel de ces composés est aujourd'hui disponible. La morbi-mortalité associée aux CI reste cependant très élevée et celle-ci s'explique par un problème de diagnostic. Le gold standard actuellement utilisé pour le diagnostic de ces CI est l'hémoculture qui possède une sensibilité très faible de l'ordre de 50 % alors que tout l'enjeu ici est de poser un diagnostic précoce afin de pouvoir administrer un traitement antifongique dans les meilleurs délais. En effet, le risque de mortalité croît de manière exponentielle en l'espace de 48 h sans traitement. L'hémoculture se révèle fréquemment positive après ce délai ou de manière post-mortem dans 18% des cas ce qui signifie que ces patients n'auront même pas reçu de traitement antifongique avant leur décès. Dans ce contexte, différentes méthodes ont été développées afin d'améliorer le diagnostic des CI. Ces techniques peuvent être divisées en deux catégories selon le recours à la culture ou non. Parmi les techniques commercialisées et recommandées, on retrouve principalement le dosage de deux polysaccharides de la paroi cellulaire de *Candida*, à savoir les β -D-(1→3)-glucanes (BDG) par test limulus et les mannanes (Mnn) par ELISA. Toutefois, ces tests comportent également des limites de performance et représentent une charge financière considérable pour les établissements hospitaliers.

Ainsi, la mise au point de nouveaux tests pour le diagnostic des CI reste un enjeu de santé publique. Le développement de ces tests doit être réalisé avec des objectifs clairs : réduire les coûts afin de rendre leur accès plus aisé et présenter de bonnes performances pour le diagnostic précoce, c'est-à-dire avant l'hémoculture positive, afin de réduire considérablement la mortalité.

Objectifs

Dans le contexte actuel du diagnostic des CI, un nouveau test a pu être développé. La technique se base sur la détection de glycanes fongiques circulants dans le sérum de patients atteints de CI par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Le projet a été initié il y a maintenant près de 10 ans par une collaboration entre l'équipe anciennement dirigé par le Pr. Daniel Poulain et aujourd'hui sous la responsabilité le Pr. Boualem Sendid (Fungal associated invasive and inflammatory diseases, Lille Inflammation Research International Center (LIRIC), U995, Université de Lille), le service de parasitologie-mycologie du Centre Biologie Pathologie Génétique (CBP) du CHRU de Lille et l'équipe du Dr. Yann Guérardel (Glycobiologie structurale des interactions hôtes-pathogènes, Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle (UGSG) UMR8576, Université de Lille, Villeneuve d'Ascq).

Au départ, l'idée était d'analyser des sérums préalablement traités de patients atteints de CI par MALDI-TOF afin de détecter par une méthode alternative des fragments de polysaccharides pariétaux circulant. En effet, l'identification des Mnn et des BDG par voie immunologique en utilisant les tests Fungitell® et Platelia™ laissaient entrevoir l'utilisation du MALDI-MS dont l'utilisation clinique se démocratisait pour une détection biochimique directe. Les spectres obtenus ont ensuite été confrontés à d'autres provenant de sérums de patients sains (provenant de l'Etablissement Français du Sang, EFS) pour comparaison des signaux. Il en est finalement ressorti qu'un signal à m/z 365 associé à un disaccharide Hex₂ redondant apparaissait de manière très intense chez les patients infectés et pouvant correspondre à un disaccharide. Cette hypothèse a par la suite été rapidement validée par des analyses complémentaires permettant de confirmer avec certitude la forte présence d'un disaccharide chez les patients malades.

Les essais ont alors été poussés plus loin avec l'élaboration d'une première cohorte de patients candidémiques et de sujets sains afin d'établir les performances de cette nouvelle méthode et de la positionner par rapport aux autres tests existants et notamment le BDG et le Mnn. Cette première étude a fait l'objet d'un article 'princeps' permettant de mettre en avant le principe de la méthode et les résultats obtenus sur la première cohorte. Ce premier article sera présenté dans la partie résultats qui suit (Sendid B. *et al.*, 2015). Au cours de cette étude, un brevet a également été déposé et l'entreprise Biomérieux (Marcy-l'Etoile, Lyon) a été démarché afin d'améliorer les conditions expérimentales notamment au niveau de la préparation de l'échantillon dans une optique de commercialisation par ce dernier. Toutes ces collaborations ont été regroupées au sein de la Société d'Accélération du Transfert de Technologie (SATT) Nord située à Lille. Cette société a pour but de faire le lien entre la recherche académique et les industriels lorsqu'une nouvelle technologie a été découverte et qu'une commercialisation est envisagée. Des financements ont ainsi été engagés d'une part par l'industriel Biomérieux et d'autre part par la SATT Nord pour poursuivre les investigations sur ce nouveau test de diagnostic des CI. Ces financements ont permis notamment mon

recrutement pour deux ans en tant qu'ingénieur de maturation avant le début de mon projet de thèse.

Au cours de mon contrat doctoral, j'ai continué à participer à ce projet au travers de deux actions. Premièrement, j'ai finalisé les études engagées précédemment sur une seconde cohorte plus importante qui incluait des patients atteints d'autres infections fongiques invasives (IFI), à savoir l'aspergillose et la mucormycose. Si les témoins de la première étude se sont cantonnés à des sujets sains EFS, les contrôles ont ici été choisis méticuleusement et selon des critères cliniques bien précis. Par exemple, pour les CI, les témoins étaient constitués de patients hospitalisés en réanimation et qui ont connu une colonisation par *Candida* mais n'ont cependant pas eu d'épisode de CI avéré. Cette sélection plus fine a ainsi permis de faire une comparaison plus adéquate des performances des différents tests et surtout plus proche de la réalité clinique. Cette étude a débouché sur une publication qui sera exposée plus en détail dans les résultats (Mery A. *et al.*, 2016). Ce travail a été complété par une étude multicentrique regroupant 6 centres experts internationaux à laquelle j'ai également participé. Cette étude multicentrique a ainsi permis de valider la robustesse de la méthode et celle-ci sera présentée en détail *via* les résultats du troisième article (Cornu M. *et al.*, 2018).

Deuxièmement, je me suis impliqué dans l'identification du signal saccharidique détecté et à l'étude des mécanismes impliqués dans la genèse du signal associé. Au cours de mon travail de thèse, nous avons confirmé que le disaccharide identifié dans les sérums de patients infectés était majoritairement constitué de tréhalose. Comme mentionné dans l'introduction, le tréhalose joue un rôle prépondérant dans les mécanismes de résistance au stress de *Candida* lors de l'infection. De nouvelles études ont alors été menées pour mieux comprendre le mécanisme de relargage de ce disaccharide par *Candida*. Les différents résultats qui ont été obtenus seront présentés sous forme d'une version préliminaire d'un article en vue d'une publication prochaine.

Résultats et discussion

Chapitre III : Développement d'un nouveau test pour le diagnostic des candidoses invasives

Dans le contexte des CI décrit dans la partie introductive, une nouvelle méthode de diagnostic de cette infection a été développée. Cette technique se base sur l'analyse de glycanes fongiques circulants dans les sérums de patients infectés par spectrométrie de masse. Dans un premier temps, il a fallu étudier les performances de ce nouveau test en le comparant notamment à ceux déjà disponibles sur le marché et qui ciblent les glycanes pariétaux de *Candida*, à savoir le BDG et le Mnn. Ce chapitre va ainsi se focaliser sur cet aspect via les études réalisées sur différentes cohortes et en s'appuyant sur les articles publiés au cours de ces travaux.

Nous verrons également à travers les publications que les études ont été étendues à d'autres infections fongiques invasives (IFI) telles que les aspergilloses et les mucormycoses. Les investigations menées sur ces IFI sortant cependant du propos de ce projet de thèse, elles ne seront pas mentionnées volontairement dans ce chapitre. Il est juste à retenir que de bons résultats ont été obtenus pour ces autres IFI et ont mis en évidence un aspect panfongique du nouveau test diagnostic avec des valeurs sensiblement différentes par rapport à celles observées pour les CI.

I) Principe de la méthode et étude sur une première cohorte

Cette première partie se réfère à l'article de Sendid B. *et al.* paru en 2015 dans *Journal of Clinical Microbiology and Infection*. Celui-ci a été reporté en Annexe 1 et une discussion va ici être écrite en se basant sur les résultats découlant de cet article.

La première étape du développement au nouveau test diagnostic consiste à purifier les glycanes sériques tout d'abord en précipitant les protéines contenues dans ces derniers par traitement à la chaleur après ajout d'EthylèneDiamineTétraAcétique (EDTA). Après centrifugation, le surnageant est purifié sur une colonne biphasique spécialement élaborée pour le cas présent. Celle-ci consiste en une première phase polymérique normale pour éliminer les dernières traces de protéines et de lipides et est suivie d'une seconde phase carbographe pour s'acquitter des sels provenant de l'EDTA et du glucose présent en très large quantité dans les sérums. Etant donné que ce test a vocation à être transposé en clinique, des solvants non toxiques ont été utilisés et c'est pour cette raison que l'éthanol a été choisi pour cette purification sur colonne à la place de l'acétonitrile généralement privilégié.

La fraction d'intérêt est séchée puis solubilisée dans un minimum de volume d'eau pour une analyse par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF. Un signal à m/z 365 a rapidement

été identifié chez les patients infectés et a été relativement quantifié par rapport à un pic matriciel à m/z 361 qui s'est avéré stable au fil des analyses. Ce rapport entre ces deux signaux 365/361 m/z a été nommé MS-DS index (*Mass Spectrometry-DiSaccharide*) et a donc été exprimé en %. Le signal à m/z 365 correspond en effet à un disaccharide puisque les analyses sur ces mêmes sérums après perméthylation ont montré un décalage de 112 m/z qui ne peut s'apparenter qu'à un disaccharide. Cette méthode permet en effet de remplacer les groupements hydroxyles OH par des groupements hydroxy-méthyls O-CH₃ ce qui explique ce décalage de m/z . Il est important de noter que la matrice qui a été choisie pour l'ensemble des analyses en spectrométrie de masse sur le versant *Candida* du projet de thèse est la matrice ionique liquide (ILM pour *Ionic Liquid Matrix*) DHB-Py (acide 2,5-DiHydroxyBenzoïque-Pyridine). Cette matrice DHB est celle qui est la plus largement utilisée pour l'analyse des sucres et la pyridine a ici été ajoutée pour une meilleure homogénéité du dépôt sur la plaque MALDI.

Suite à l'établissement du MS-DS index, une première étude sur une cohorte composée de sérums de patients candidémiques (25 sérums provenant de 21 patients) en confrontation avec des sérums de sujets sains EFS (21 sérums) a vu le jour. L'idée a ici été de comparer les tests BDG et Mnn déjà bien ancrés en clinique avec la nouvelle méthode du MS-DS index. Pour ce faire, les valeurs issues de ces trois tests ont été acquises pour chacun des sérums de la cohorte et ont été reportées dans un tableur avec les autres informations cliniques concernant les différents patients. Il a de ce fait été possible à partir de toutes ces valeurs collectées de réaliser la courbe ROC (*Receiver Operating Characteristic*) pour chacun des tests évalués dans l'étude. Une courbe ROC permet d'évaluer les caractéristiques de performance d'un test par mesure de sa sensibilité et de sa spécificité. Ainsi, le meilleur compromis sensibilité/spécificité a pu être établi pour le MS-DS index pour un cutoff à 86 %, c'est-à-dire qu'au-delà de cette valeur, le test a été considéré comme positif dans le cadre de cette étude (Figure III.1). Pour le BDG et le Mnn, les cutoffs définis par le fabricant ont été respectés, à savoir 80 pg/mL et 74 pg/mL respectivement.

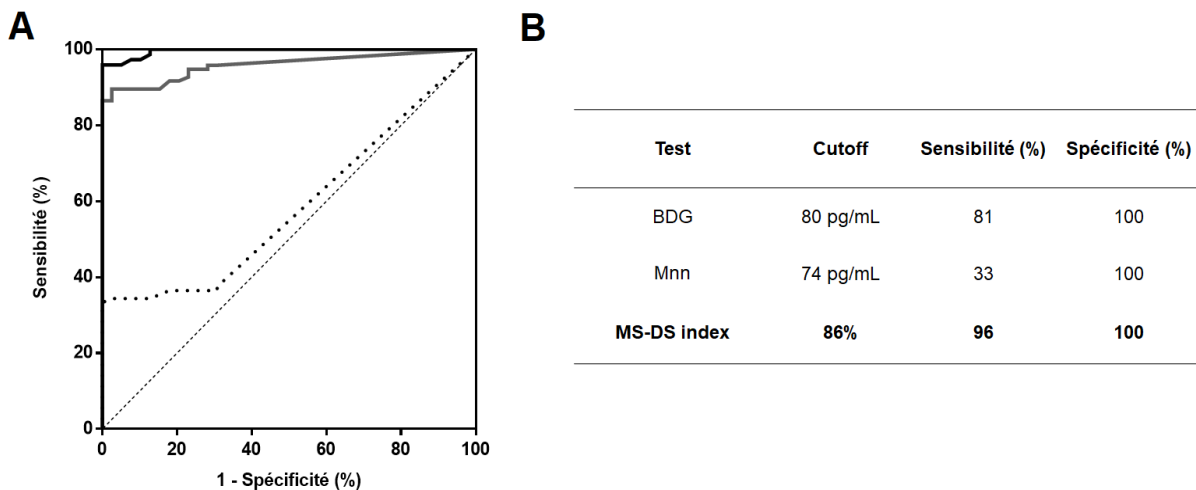


Figure III.1 : Comparaison du BDG, Mnn et MS-DS index des sérums provenant de la première cohorte.

(A) Courbes ROC basées sur la comparaison entre le groupe de patients candidémiques et le groupe de sujets sains EFS : BDG, ligne grise; Mnn, ligne pointillé noire et MS-DS index, ligne noire. (B) Cutoffs établis à partir des courbes ROC et les rapports sensibilité/spécificité correspondants.

Les performances se sont montrées très satisfaisantes pour chacun des tests avec une spécificité identique de 100 % mais avec une sensibilité accrue pour le MS-DS index à 96 % contre 33 % pour le Mnn et 81 % pour le BDG.

En parallèle, des expériences sur modèle murin ont été menées afin de mettre en évidence la présence du signal disaccharidique uniquement chez des souris malades et non pas chez des souris colonisées à *C. albicans* ou saines. Cette étude intermédiaire était en effet importante pour écarter la possibilité de retrouver de manière significative le signal disaccharidique chez des patients colonisés ce qui aurait rendu obsolète l'étude sur une seconde cohorte. Pour réaliser ces expériences modèles, des souris ont subi une induction d'inflammation au DSS (Dextran Sulfate Sodium) puis un gavage à *C. albicans* afin de mimer la colonisation. En effet, l'induction de l'inflammation fragilise le tractus gastro-intestinal en réduisant la population bactérienne ce qui permet aux champignons de proliférer lors du gavage à *C. albicans*. D'autres souris quant à elles ont été soumises à une injection de *C. albicans* directement par intraveineuse pour induire chez ces dernières une candidémie profonde. Comme prévu, le signal à m/z 365 n'a été observé que dans les sérums de souris à candidose systémique et a donc rendu possible l'étude sur la seconde cohorte candidémique/colonisé. Cette étude à laquelle j'ai participé a servi de préambule aux travaux que j'ai ensuite développés au cours de sujet de thèse. Celle-ci a été publiée dans un article placée en Annexe 1 pour information.

II) Performances du MS-DS index sur cohorte composée de patients candidémiques et colonisés

L'étude princeps, comme rapporté ci-dessus, a mis en évidence les bonnes performances du MS-DS index. Néanmoins, les sujets sains EFS sélectionnés ne correspondaient pas à la réalité clinique dans laquelle on ne retrouve pas de sujets sains. De fait, il nous a semblé plus judicieux pour la suite de privilégier des sérums de sujets hospitalisés colonisés par *Candida* mais n'ayant pas développé de CI avérée afin de mettre en évidence de manière plus concrète la robustesse de la méthode MS-DS index. Pour ce faire, une seconde cohorte composée de patients candidémiques et de patients hospitalisés colonisés a été élaborée selon des critères cliniques bien précis afin de bien distinguer ces deux groupes de patients. Cette seconde étude a fait l'objet d'une publication dans *Journal of Clinical Microbiology* en 2016 par Méry *et al.* qui est fournie dans le présent chapitre. Les critères d'inclusion des différents patients se sont montrés plus drastiques pour cette nouvelle étude. Il a fallu en effet intégrer de nouveaux éléments et notamment l'index de colonisation pour les sujets contrôle hospitalisés. C'est cet index qui permet justement en partie de déterminer si des patients sont colonisés ou pas à *Candida*. D'autres critères recommandés par l'EORTC (*European Organization for Research and Treatment of Cancer*) qui est l'organisme fixant les recommandations en termes clinique et biologique pour le diagnostic des IFI ont également été pris en considération dans l'établissement de cette seconde cohorte. L'ensemble des éléments pris en compte sont résumés dans les Tableaux 1 et 2 de l'article présenté ci-dessous.

Une fois celle-ci mise en place, l'étude des performances de chaque test diagnostique a été effectuée comme précédemment. Les courbes ROC associées (se référer à la Figure 1 de l'article) ont ainsi pu être réalisées et le cutoff du MS-DS index a cette fois-ci été établi à 325 % pour le meilleur compromis sensibilité/spécificité. Ces résultats ont mis en exergue une fois de plus les bonnes performances du MS-DS index avec une sensibilité de 62 % et une spécificité de 84 %. Plus particulièrement, on retrouve ici les tendances généralement décrites pour les deux tests BDG et Mnn sur le diagnostic des CI, à savoir une bonne sensibilité pour le BDG au détriment de la spécificité et inversement pour le Mnn. De plus, la méthode MS-DS index se positionne très bien par rapport à ces deux tests puisqu'elle comporte une sensibilité ainsi qu'une spécificité très satisfaisante. A noter que les courbes ROC ont été faites par sérum mais aussi par patient et que cela a permis une nette amélioration de la sensibilité du MS-DS index en perdant un peu de spécificité alors que les performances des autres biomarqueurs n'ont pas été affectées par ce changement. Le fait de se positionner au niveau du patient a l'avantage de permettre un suivi cinétique grâce aux dates des différents sérums prélevés par rapport à l'hémoculture positive. De plus, il est plus judicieux de comparer dans un second

temps les performances d'un test selon toutes les données d'un patient plutôt que sur les sérums pris individuellement qui ont moins de signification clinique.

Pour aller plus loin, des corrélations de Spearman ont été réalisées entre le MS-DS index et les deux autres tests pour les patients candidémiques et les sujets contrôles hospitalisés colonisés. En effet, la corrélation de Spearman est une mesure statistique non paramétrique entre deux variables. Elle consiste à déterminer un coefficient de corrélation lorsque deux variables semblent corrélées mais sans que la relation entre ces deux dernières soit de type affine. Les résultats de ces corrélations ont été représentés sur la Figure III.2 avec les coefficients de corrélation associés. Seul un signe de corrélation a été observé entre le MS-DS index et le BDG pour les contrôles colonisés ($r=0,5$) mais aucun n'a été retrouvé chez les patients candidémiques ni même entre le Mnn et le MS-DS index. Cela signifie donc que ces biomarqueurs ne circulent pas au même moment pour un sérum donné provenant d'un patient spécifique.

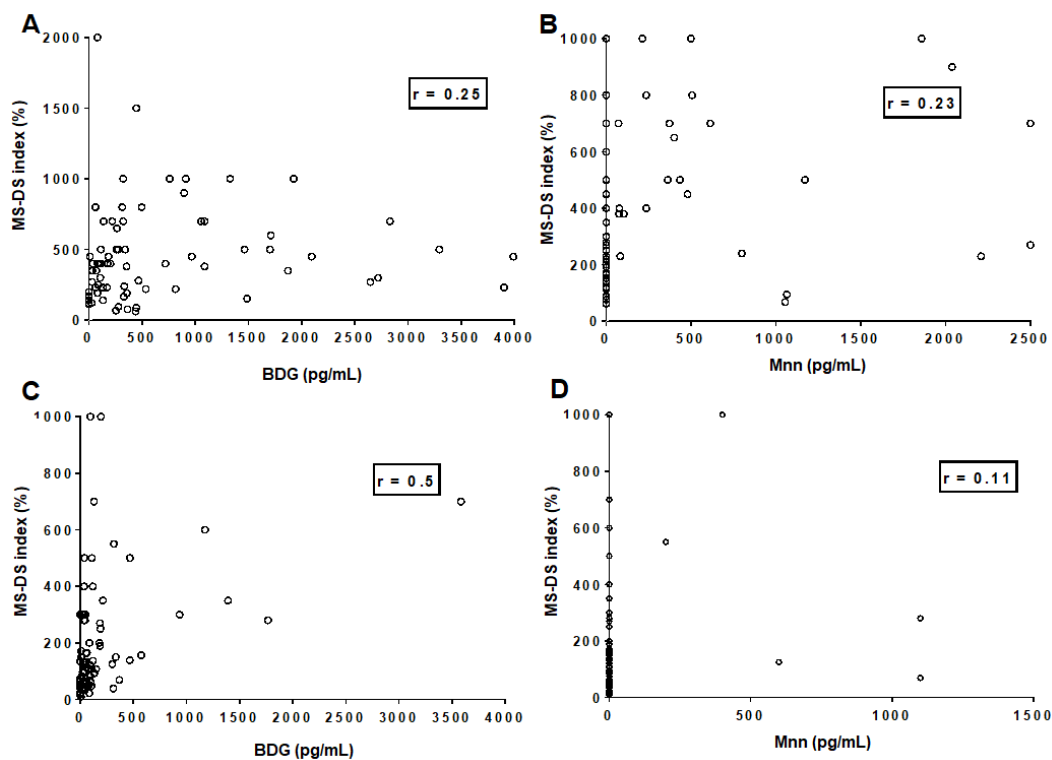


Figure III.2 : Corrélations de Spearman entre le BDG et le MS-DS index pour les patients candidémiques (A) et les sujets contrôle hospitalisés (C) et entre le Mnn et le MS-DS index pour les patients candidémiques (B) et les contrôles associés (D).

D'autres paramètres ont été étudiés comme par exemple le lien entre la mortalité et les valeurs des trois biomarqueurs. Il en est ressorti que la mortalité était corrélée à des taux de MS-DS index élevés chez les patients candidémiques. De plus, il était également important d'évaluer

les performances des tests pour le diagnostic précoce des CI car pour rappel, celui-ci représente un enjeu crucial dans l'intérêt de la méthode développée. Pour ce faire, les valeurs positives de chaque test pour les sérums disponibles avant l'hémoculture ont été comptabilisées (voir Figure 2 de l'article). Un nombre de sérums plus important se sont montrés positifs pour le BDG suivi du MS-DS index et du Mnn. Ces résultats sont finalement directement corrélés avec la sensibilité de chaque test. Cependant, comme cela avait été constaté lors de l'élaboration des courbes ROC, si l'on se place au niveau du patient et non plus du sérum, les performances du MS-DS index sont beaucoup plus intéressantes avec un nombre de patients détectés malades proche de celui du BDG.

Grâce à toutes ces analyses menées sur la seconde cohorte plus significative en terme de sélection des contrôles pour confrontation avec les patients candidémiques, plusieurs points importants ont émané de cette étude :

- Premièrement, les performances du MS-DS index sont satisfaisantes par rapport aux autres biomarqueurs BDG et Mnn et celles-ci sont encore augmentées lorsque l'on se place du point de vue du patient.
- Le MS-DS index est plus sensible que le Mnn et plus spécifique que le BDG pour le diagnostic des CI. De plus, le MS-DS index a semblé mieux compléter le BDG que le Mnn pour cette étude.
- Le MS-DS index possède également des caractéristiques avantageuses qui entrent en ligne de compte. Il s'agit en effet d'une méthode simple à mettre en œuvre, fiable, robuste, adaptable à différentes taille de séries, économique et facilement réalisable dans tout laboratoire équipé d'un spectromètre de masse de type MALDI-TOF.

Suite à ces bons résultats affirmant la robustesse de la technique MS-DS index, une dernière cohorte a été mise en place et a fait cette fois-ci appel à des centres extérieurs européens spécialisés dans chacune des IFI à avoir été étudié. Seuls les résultats sur les CI seront une fois de plus évoqués dans le cadre de ce projet de thèse.

Application of Mass Spectrometry Technology to Early Diagnosis of Invasive Fungal Infections

Alexandre Mery,^{a,b} Boualem Sendid,^{c,d,e} Nadine François,^{c,d,e} Marjorie Cornu,^{c,d,e} Julien Poissy,^{d,e,f} Yann Guerardel,^b Daniel Poulain^{c,d,e,g}

SATT Nord-de-France, Lille, France^a; Université Lille, CNRS, UMR 8576-UGSF-Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, Lille, France^b; CHU Lille, Service de Parasitologie-Mycologie, Lille, France^c; Université Lille, U995-LIRIC-Lille Inflammation Research International Centre, Lille, France^d; INSERM, U995-Team 2, Lille, France^e; CHU Lille, Pôle de Réanimation, Lille, France^f; CHU Lille, Délégation à la Recherche Clinique et à l'Innovation, Lille, France^g

We recently developed a mass spectrometry (MS) procedure based on the detection of a serum disaccharide (MS-DS) in patients with invasive candidiasis (IC). Here, we compare the performance of MS-DS for the diagnosis of IC, invasive aspergillosis (IA), and mucormycosis (MM) with those of commercially available antigen detection tests. This retrospective study included 48 patients (23 IC patients [74 serum samples], 15 IA patients [40 serum samples], and 10 MM patients [15 serum samples]) and 49 appropriate controls (102 serum samples). MS-DS, mannan (Mnn), galactomannan (GM), and (1,3)- β -D-glucan (BDG) were detected by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight (MALDI-TOF) MS, Platelia, and Fungitell assays, respectively. For IC, the sensitivity and specificity of the MS-DS index, BDG detection, and Mnn detection were 62% and 84%, 82% and 60%, and 33% and 94% per serum sample and 83% and 69%, 96% and 31%, and 39% and 86% per patient, respectively. For IA, the corresponding values in comparison to BDG and GM detection were 83% and 81%, 62% and 95%, and 62% and 100% per serum sample and 93% and 76%, 87% and 90%, and 93% and 100% per patient, respectively. Nine of the 10 MM patients had a positive MS-DS result. MS-DS gave an early diagnosis in IC (73% positivity before blood culture), IA (positive before GM detection in six patients), and MM (positivity mainly preceded the date of diagnosis) patients. For IC, persisting MS-DS was associated with a poor prognosis. The different biomarkers were rarely detected simultaneously, suggesting different kinetics of release and clearance. For IA, MS-DS provided better complementation to GM monitoring than BDG monitoring. MS-DS detects panfungal molecules circulating during invasive fungal infections. The performance of MS-DS compared favorably with those of biological tests currently recommended for monitoring at-risk patients. Further validation of this test in multicenter studies is required.

Invasive candidiasis (IC) and invasive aspergillosis (IA) are major life-threatening nosocomial invasive fungal infections (IFIs) (1–3). Although less prevalent, mucormycosis (MM) is an emerging problem. Progress in antifungal therapy has not significantly reduced the high rates of morbidity and mortality associated with IFIs, particularly in intensive care units (ICUs) and oncohematology units (4–6), due to difficulties in obtaining an early diagnosis, an important condition for a favorable outcome (7). Difficulties in the biological detection of IFIs are related to the low yield of culture-based methods (8); blood cultures are positive in only ~50% of episodes of IC and in anecdotal cases of IA. To fill this gap, methods have been developed for the detection of fungal molecules in sera from patients (9–11). These methods include the detection of fungal DNA in body fluids and tissues, for which no consensual recommendations have been produced due to the lack of standardization. In contrast, there is extensive literature on the diagnostic value of fungal polysaccharide detection, including (1,3)- β -D-glucan (BDG) (12), present in *Candida* and *Aspergillus* cell walls, and mannan (Mnn) or galactomannan (GM), found in *Candida* and *Aspergillus*, respectively. Each of these assays, which present different compromises between sensitivity and specificity, are currently widely used, although there is a lack of consensus about therapeutic decisions based on the results of these tests in the complex setting of IC and IA (13–15). For MM, no serological test is currently of diagnostic help.

In a previous report, we described the presence of a specific *m/z* 365 matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) mass spectrometry (MS) signal in sera of IC patients. The fungal origin

of this signal, identified as dihexasaccharide (DS), was confirmed in an experimental model of IC (16). In the present study, we evaluated the clinical usefulness of this new biomarker in well-characterized cohorts of patients with IC, IA, and MM, with reference to appropriate hospitalized controls and in comparison with BDG, Mnn, and GM detection tests.

(This work was presented as an oral communication at the 26th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Amsterdam, Netherlands, 9 to 12 April 2016.)

MATERIALS AND METHODS

Study population. (i) Patients with IFI. Patients were selected from the database of Lille University Hospital according to the following criteria: (i) classification as having proven or probable IFI according to European

Received 11 August 2016 Accepted 24 August 2016

Accepted manuscript posted online 7 September 2016

Citation Mery A, Sendid B, François N, Cornu M, Poissy J, Guerardel Y, Poulain D. 2016. Application of mass spectrometry technology to early diagnosis of invasive fungal infections. *J Clin Microbiol* 54:2786–2797. doi:10.1128/JCM.01655-16.

Editor: D. J. Diekema, University of Iowa College of Medicine

Address correspondence to Daniel Poulain, daniel.poulain@univ-lille2.fr.

A.M. and B.S. contributed equally to the manuscript.

Supplemental material for this article may be found at <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01655-16>.

Copyright © 2016 Mery et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.

TABLE 1 Clinical and biological characteristics of patients with IC^a

Patient	Sex	Patient age (yr)	Hospital ward	Underlying condition(s)	No. of serum samples (no. of serum samples before BC)	Serum sampling points (time to BC) (days)	Candida species isolated from BC	BDG concn (pg/ml) (min-max)	Mmn concn (pg/ml) (min-max)	MS-DS index (%) (min-max)	Outcome	
											Death within 1 mo	Hospital death
1	M	58	ICU	Perineal cellulitis and digestive cancer	3 (1)	-5, 1, 6	<i>C. albicans</i>	315-912	236-2,039	800-1,000	Yes	Yes
2	M	37	ICU	Post-heart-graft care	3 (2)	-3, 0, 7	<i>C. albicans</i>	71-113	0	350-2,000	Yes	Yes
3	M	49	ICU	Digestive cancer, septic shock postchemotherapy, type 2 diabetes	3 (1)	-3, 4, 18	<i>C. albicans</i>	1,088-1,704	373-1,859	500-1,000	Yes	Yes
3	M	70	Hematology	Lymphoma, DRESS syndrome	3 (1)	-4, 3, 10	<i>C. albicans</i>	264-341	363-435	500-650	Yes	Yes
4	F	51	ICU	Septic shock with <i>Staphylococcus aureus</i>	4 (2)	-2, 0, 3, 5, 6	<i>C. albicans</i>	170-364	0-2,500	77-700	Yes	Yes
5	F	51	ICU	Septic shock with <i>Staphylococcus aureus</i>	3 (1)	-2, 5, 12	<i>C. albicans</i>	816-1,712	0	220-700	Yes	Yes
6	F	56	ICU	Autoimmune hepatitis, immunosuppressive therapy,	3 (2)	-3, -2, 3	<i>C. dubliniensis</i>	0-1,488	0	115-800	Yes	Yes
7	M	66	Surgery	corticosteroids, liver fibrosis, Pulmonary cancer, scleroderma, postsurgery care	3 (2)	-2, 0, 12	<i>C. albicans</i>	82-311	0	141-800	Yes	Yes
8	F	60	ICU	Ingestion of caustic substances, gastrectomy	3 (3)	-8, -7, 0	<i>C. albicans</i>	536-2,832	0-614	220-700	Yes	Yes
9	M	66	ICU	Pituitary macroadenoma, chronic respiratory failure, septic shock, type 2 diabetes	4 (2)	-1, 0, 7, 35	<i>C. albicans</i>	1,872-3,992	0-2,500	270-500	Yes	Yes
10	M	60	ICU	Post-heart-graft care, immunosuppressive therapy, corticosteroids	3 (1)	-1, 4, 14	<i>C. albicans</i>	0-323	0	200-1,000	Yes	Yes
11	M	41	ICU	Burns, alcoholism	4 (2)	-3, 0, 4, 36	<i>C. albicans</i>	27-2,720	0	62-300	Yes	Yes
12	F	59	ICU	Mesenteric ischemia, cardiopulmonary arrest	3 (1)	0, 6, 12	<i>C. glabrata</i>	324-3,904	0-6	230-1,000	Yes	Yes
13	F	81	Surgery	Mesenteric vein thrombosis, type 2 diabetes	3 (1)	-25, 5, 12	<i>C. glabrata</i>	63-101	0-77	400-800	Yes	Yes
14	F	47	Hematology	AML, HSC allograft, immunosuppressive therapy, nucleoside analogue, COPD	3 (1)	-5, 2, 9	<i>C. glabrata</i>	0-32	0	143-350	Yes	Yes
15	F	57	Hematology	AML, HSC allograft, hepatosplenic candidiasis	3 (2)	-6, 0, 3	<i>C. glabrata</i>	329-468	0	192-280	Yes	Yes
16	F	52	Burns	Hydrocephalus of undetermined origin, burns	2 (1)	-18, 3	<i>C. parapsilosis</i>	139-720	0	400-700	Yes	Yes
17	M	69	ICU	Chronic cardiac failure, post-heart-surgery care, type 2 diabetes	3 (1)	0, 4, 11	<i>C. parapsilosis</i>	30-89	0	230-270	Yes	Yes
18	M	69	ICU	Postsurgery care for pacemaker infection, septic shock	3 (1)	0, 2, 9	<i>C. parapsilosis</i>	760-1,464	0	450-1,000	Yes	Yes
19	F	34	Hematology	AML chemotherapy, nucleoside analogue	3 (2)	-6, 1, 6	<i>C. tropicalis</i>	11-108	0	300-450	Yes	Yes
20	M	61	Gastroenterology	Liver fibrosis, hepatorenal syndrome	3 (2)	-4, 0, 7	<i>C. tropicalis</i>	60-446	0-507	230-1,500	Yes	Yes
21	M	63	ICU	Post-heart-graft care	3 (2)	-4, -1, 3	<i>C. tropicalis</i>	185-2,096	0-76	380-450	Yes	Yes
22	M	66	ICU	ENT cancer, COPD, septic shock	3 (2)	-12, -5, 2	<i>C. tropicalis</i>	255-333	800-1,065	68-240	Yes	Yes
23	F	59	ICU	CLL, HSC allograft, digestive GVHD, immunosuppressive therapy, corticosteroids, chronic hepatitis B	3 (2)	-4, -1, 1	<i>C. krusei</i>	113-261	0	400-500	Yes	Yes

^a M, male; F, female; BC, blood culture; BDG, (1,3)-beta-D-glucan; Mmn, mannann; ICU, intensive care unit; AML, acute myeloid leukemia; HSC, hematopoietic stem cell; COPD, chronic obstructive pulmonary disease; ENT, ear, nose, and throat; CLL, chronic lymphocytic leukemia; GVHD, graft-versus-host disease.

TABLE 2 Clinical and biological characteristics of patients with IA^a

Patient or serum sample	Hospital ward	Underlying condition(s)	Length of neutropenia (<500 neutrophils/mm ³) (days)	TDM finding(s)	Patient age (yr)	Sex	Time between collection of serum samples (days)	No. of serum samples positive for GM (consecutive)	BAL fluid culture result	BDG concn (pg/ml)	GM ratio	MS-DS index (%)	IA classification		Outcome (death)		Prophylaxis
													NA	Yes	Yes	No	
P1	Hematology	CLL, HSC allograft, Richter syndrome, corticosteroids, MAb	<10	NA	54	F	2	2 (2)	Negative	293	0.7	700	NA	NA	Yes	No	
P2-1	Hematology	Hodgkin's lymphoma, HSC allograft, nucleoside analogue	>10	Dense lesions without halo sign, regression after 3 wk	23	F	0	12 (12)	Negative	108	0.1	500	Probable	Probable	Yes	Yes	
P2-2							12			147	0.4	1,000					
P2-3							18			62	1.5	300					
P2-4							39			23	0.7	82					
P3-1	Hematology	Lymphoma, HSC allograft, corticosteroids, nucleoside analogue	0	Reversal of ground-glass lesions, micronodules under treatment, budding trees	63	M	0	11 (8)	NA	73	0.3	370	Probable	Probable	Yes	Yes	
P3-2							9			89	0.73	588					
P3-3							18			104	2.5	850					
P4-1	Hematology	Myelofibrosis on essential thrombocythemia, HSC allograft, nucleoside analogue, cyclosporine	>10	Reversal of dense lesions and ground glass upon antifungal therapy	63	M	0	15 (12)	Negative	83	1.3	210	Probable	Probable	No	No	
P4-2							49			306	0.7	1,500					
P4-3							106			324	0.3	3,000					
P5-1	Digestive surgery	Digestive postsurgical complications	0	Stable nodules	65	M	0	5 (3)	NA	165	0.07	526	NA	NA	No	No	
P5-2							53			166	2.6	650					
P5-3							56			65	0.4	556					
P6	ICU	Thymoma, myeloma, septic shock, chemotherapy	>10	Ground glass, atelectasis	79	M	1	1 (1)	<i>Aspergillus fumigatus</i>	>500	6	1,500	Probable	Probable	Yes	No	
P7	ICU	Lymphoma, HSC allograft, MAb, nucleoside analogue	>10	Micronodules, atelectasis, excavation	59	M	3	3 (3)	<i>A. fumigatus</i>	342	0.8	1,000	Probable	Probable	Yes	Yes	
P8	ICU	Heart valve replacement postsurgical care, cardiogenic shock	0	NA	70	M	5	5 (5)	NA	143	5.2	550	NA	NA	Yes	No	
P9-1	Oxygen therapy	Necrotizing fasciitis of legs, septic shock	0	Dense lesions and ground glass (ARDS corresponding)	43	F	0	0	<i>A. fumigatus</i>	222	0.25	54	Probable	Probable	Yes	No	
P9-2							11			300	0.1	54					

Patient ID	Cardiovascular surgery	Cardiac transplant, corticosteroids	0	Dense lesions with halo	38	M	0	7 (5)	<i>A. fumigatus</i>	500	0.3	2,000	Proven	No
P10-1														
P10-2							4			500	0.6	1,000		
P10-3							21			500	5	1,500		
P11-1	Hematology	Myelodysplasia, Hodgkin's lymphoma, HSC allograft, corticosteroids, immunosuppressive therapy	>10	Dense lesion	48	F	0	6 (3)	NA	0	0.1	400	Probable	NA
P11-2							7			12	0.9	182		
P11-3							14			478	2	400		
P12-1	Hematology	AML, HSC allograft	>10	Ground-glass, dense lesions with halo	64	F	0	16 (16)	Negative	0	0.05	370	Probable	Yes
P12-2							14			125	0.21	500		
P12-3							20			15	2.71	833		
P12-4							24			177	1.47	588		
P12-5							42			120	0.75	5,000		
P12-6							56			95	1.21	1,000		
P13-1	Hematology	AML, nucleoside analogue	>10	Ground glass	69	M	0	2 (2)	NA	10	0.03	200	Possible	Yes
P13-2							13			0	0.32	526		
P13-3							21			0	0.55	714		
P13-4							23			66	1.13	500		
P14-1	Hematology	Burkitt's lymphoma, HSC allograft	>10	Dense lesion	23	M	0	9 (5)	NA	0	0.07	500	Probable	Yes
P14-2							15			0	2.4	500		
P14-3							50			0	1.26	500		
P15-1	Hematology	AML, HSC allograft, corticosteroids, cyclosporine	0	Ground glass	56	M	0	2 (2)	NA	265	0.5	833	Possible	Yes
P15-2							5			226	2.1	1,000		

* M, male; F, female; TDM, tomodensitometry; BAL, bronchoalveolar lavage; BDG, (1,3)-beta-D-glucan; GM, galactomannan; ICU, intensive care unit; CLL, chronic lymphocytic leukemia; HSC, hematopoietic stem cell; MAb, monoclonal antibody; AML, acute myeloid leukemia; NA, not available.

Organization for the Research and Treatment of Cancer/Mycoses Study Group (EORTC/MSG) criteria (17) and (ii) availability of sera drawn around the time when clinical/mycological/imaging evidence of IFI was obtained. The clinical and biological characteristics of the patients with IC, IA, and MM are shown in Tables 1, 2, and 3, respectively.

(ii) **Control subjects.** Control subjects consisted of hospitalized patients in ICUs and hematology wards who were considered appropriate controls with major risk factors for IFIs. In the ICU, we selected 29 control patients for IC who had previously been enrolled in a prospective study and for whom 82 serum samples were drawn sequentially in parallel with the determination of the colonization index (see Table S1 in the supplemental material). In oncohematology wards, controls for IA consisted of 20 patients for whom regular monitoring of GM was performed (1 serum sample per patient) (see Table S2 in the supplemental material). Both groups corresponded to suitable controls for MM.

Measurement of mannan and glucan polysaccharides/oligosaccharides. The BDG concentration was measured by using the Fungitell kit (Associates of Cape Cod Inc., Falmouth, MA, USA) according to the manufacturer's instructions. The recommended cutoff of 80 pg/ml was used to determine clinical relevance. Measurement of serum Mnn levels was performed by using the Platelia Candida Ag⁺ test (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France) according to the manufacturer's instructions. The recommended cutoff of 62.5 pg/ml was used to determine clinical relevance.

For both tests, serum samples with positive results of >500 pg/ml were diluted and retested.

Detection of DS by MS. The procedure used for the detection of DS was described previously (16). The same procedure was applied here, using a 4800 MALDI-TOF/TOF analyzer (Applied Biosystems/MDS Sciex) at a fixed laser intensity and 1,000 accumulated shots/spectrum within an *m/z* 300 to 800 range. The reproducibility and repeatability of the test were assessed in double-blind studies involving at least two different laboratories; the coefficients of variation were <10% and <5%, respectively. The influence of different mass spectrometers and modes of acquisition (reflectron and/or linear) was determined by using Sciex Voyager DE, Sciex 4700, Bruker Ultraflex Shimadzu Vitek-MS, and Thermo MALDI-LTQ-Orbitrap machines; all of them gave similar results.

Ethics statement. All sera used in this study were obtained from patients monitored at Lille University Hospital. When no results were available from routine tests, BDG and mannan levels were determined retrospectively from residual frozen samples. No additional sampling was necessary. As sera were taken from a registered biological collection, patient consent was not required according to French law. Agreement for the establishment of a biological collection of IFI samples was obtained from the French Ministry of Education and Research under reference DC-2008-642. Institutional review board approval was given by the Comité de Protection des Personnes Nord-Ouest IV, the ethical committee of our institution.

Statistical analysis. The Mann-Whitney two-tailed test was used to compare the distributions of biomarkers in the different groups, and the nonparametric correlation test (Spearman's rank test) was used to analyze the correlation between them. GraphPad Prism 6 was used to generate receiver operating characteristic (ROC) curves and derive cutoffs and graphs.

A *P* value of <0.05 was considered to be statistically significant.

RESULTS

Signal of interest and study design. The principle of the MALDI-time of flight (TOF) MS procedure as well as the methodology used for the serological diagnosis of IC were described previously (16). This procedure reveals an *m/z* 365 signal, corresponding to a hexadisaccharide (DS), specifically associated with human and experimental IC. Quantification of the signal was performed by establishing the "MS-DS index," defined as the ratio of *m/z* 365 over *m/z* 361 matrix signal intensities (percent *m/z* 365 versus *m/z* 361). The same intense signal was observed during IA and MM

(data not shown). Investigations involving the MS-DS index as a tool for diagnosing IC were therefore carried out. In such a complex setting, the 100% specificity achieved by referring to healthy blood donors as controls is not relevant; thus, in this pilot study, special care was taken to include the most appropriate control groups, which consisted of hospitalized patients at high risk of IFI.

MS-DS and diagnosis of IC. The clinical and biological characteristics of the patients with IC are shown in Table 1 (those of the appropriate IC controls are shown in Table S1 in the supplemental material). Both groups were recruited at the same ICU wards. Their clinical characteristics in terms of risk factors were recorded as described previously (18); the two groups did not exhibit any significant differences in terms of major risk factors (acute physiology and chronic health evaluation [APACHE] score, surgery, neutropenia, antibiotherapy, bacteremia, and central venous catheter, etc.), except for mechanical ventilation (100% for the IC group versus 65.2% for the control group; *P* = 0.008) and its duration as well as antifungal therapy (78.3% versus 27.6%; *P* < 0.001). Regarding the mycology results, the median delay between hospital admission and positive blood culture results was 20 days (interquartile range 1 [IQR1], 12.3 days; IQR3, 27.5 days). Candidemia was due to *Candida albicans* (46%), *C. glabrata* (17%), *C. tropicalis* (17%), *C. parapsilosis* (12%), and miscellaneous species (8%). In the control group, colonization was due to *C. albicans* (69%), *C. parapsilosis* (24%), *C. tropicalis* (14%), *C. glabrata* (10%), and miscellaneous species (14%). Therefore, the relative prevalence of the different *Candida* species found in the control group was similar to that in the IC group, with a predominance of *C. albicans*, followed by *C. tropicalis*, *C. glabrata*, and *C. parapsilosis*.

Assessment of the diagnostic value of BDG detection, Mnn detection, and the MS-DS index was performed by comparing the IC and control groups (Fig. 1). Analyses were initially made per serum sample (Fig. 1A to C). ROC curves (Fig. 1A) showed a higher area under the curve (AUC) for the MS-DS index (0.81) than for BDG and Mnn detection (0.78 and 0.66, respectively). Using ROC curves, the best sensitivity/specificity compromise (Fig. 1B) for the MS-DS index (62%/84%) was established for a cutoff at 325%. For the same population, this sensitivity was lower than that for BDG detection (82%) but higher than that for Mnn detection (33%), while the converse was found for specificity (60% and 94%, respectively). The Venn diagram showing overlapping positive values revealed that the MS-DS index was positive alone for only 6/74 serum samples and that all other MS-DS index-positive test results were associated with positivity of either Mnn detection, BDG detection, or both. Analysis by patient (Fig. 1D to F) by applying the 325% cutoff for the MS-DS index confirmed a larger AUC for this test (0.84) than for BDG detection (0.76) and Mnn detection (0.66), with a sensitivity per patient of 83% but a decreased specificity of 69%; this trend was also observed for BDG and Mnn detection.

The Venn diagram showed that most of the patients (19/23) were positive by at least two tests, while 4 were positive by only a single test (3 for BDG detection and 1 for the MS-DS index). Consideration of the decrease in specificity per patient as well as the Venn diagram constructed by using controls (data not shown) suggested that some of these controls could be infected with *Candida* species despite their negative blood culture results. Considering that a previous study established that BDG levels of >800 pg/ml and Mnn levels of >125 pg/ml are indicative of IC (18), we

TABLE 3 Clinical and biological characteristics of patients with mucormycosis^a

Patient	Hospital ward	Patient age (yr)	Sex	Underlying condition(s)	Clinical type/site of mucormycosis (sample for diagnosis)	TDM finding(s)	Microorganism	EORTC/MSG group classification	No. of days from diagnosis (serum sample)	BDG concn (pg/ml)	GM ratio	MS-DS index (%)	Outcome
M1	Hematology	61	F	HSC allograft after myelodysplasia	Pulmonary (lung biopsy specimen)	Dense lesion, right upper lobe	<i>Rhizopus microsporus</i> ^b	Proven	-4 (L1-M1)	0	0.07	132	Death
									+12 (L2-M1)			2,000	
M2	Transplant	66	M	Liver fibrosis, corticosteroids, diabetes, liver graft	Rhinosisinus (sinus, face, nose)		<i>Rhizopus pusillus</i> ^b	Proven	-1 (L3-M2)			588	Death
M3	Burns	66	F	Burns, CML	Skin (skin swab)		<i>Lichtheimia ramosa</i>		-2 (L4-M3) +5 (L5-M3)	31 18		132 159	Alive
M4	Burns	42	M	Burns	Skin (biopsy specimen)		<i>Lichtheimia corymbifera</i>	Proven	-1 (L6-M4) +6 (L7-M4)	146 203		182 2,000	Alive
M5	Hematology	45	F	HSC allograft after AML, GVHD stage IV	Postoperative abscess of abdominal wall (biopsy specimen)		<i>Rhizopus arrhizus</i> ^b	Proven	-9 (L8-M5)	42	0.15	300	Death
									+6 (L9-M5)	46		2,000	
M6	Burns	42	M	Burns	Skin (biopsy specimen)		<i>Lichtheimia corymbifera</i>	Proven	+24 (L10-M6)	21		1,429	Alive
M7	Hematology	83	F	Mantle cell lymphoma, rituximab, diabetes	Lung (BAL fluid)	Dense lesion, right middle lobe	<i>Rhizopus microsporus</i>	Probable	-6 (L11-M7)	18	0.06	455	Death
									0 (L12-M7)	0	0.04	400	
M8	ICU	76	M	Trauma	Skin (biopsy specimen)		<i>Mucor circinelloides</i>	Proven	+4 (L13-M8)	39		3,333	Alive
M9	ICU	60	M	Trauma	Skin (biopsy specimen)		<i>Mucor circinelloides</i>	Proven	+5 (L14-M9)	106	0.06	3,333	Alive
M10	Hematology	3	F	ALL B (induction)	Disseminated, brain, eye, lung, kidney, calf (vitreous humor, muscle biopsy specimen)		<i>Lichtheimia</i> sp. ^a	Proven	-1 (L15-M10)	18	0.05	333	Alive

^a Microorganisms were obtained in culture except for the last one, where the diagnosis was made by quantitative PCR.
^b Samples positive by histology.
^c Boldface type indicates a positive value. ICU, intensive care unit; M, male; F, female; HSC, hematopoietic stem cell; CML, chronic myeloid leukemia; AML, acute myeloid leukemia; GVHD, graft-versus-host disease; ALL, acute lymphocytic leukemia; BAL, bronchoalveolar lavage; TDM, tomodesintometry; BDG, (1,3)-beta-D-glucan; GM, galactomannan; DS, serum disaccharide.

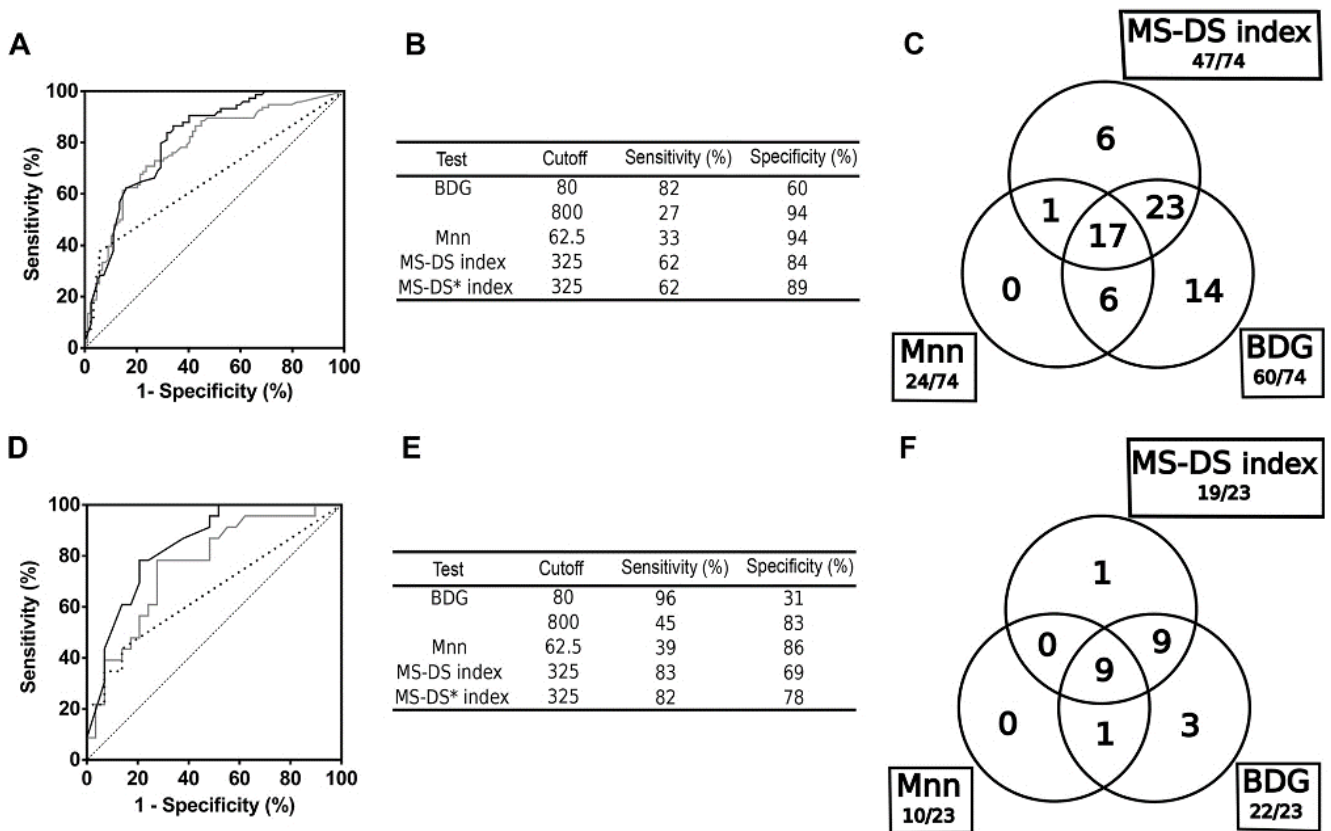


FIG 1 Comparison of BDG detection, Mnn detection, and the MS-DS index. (A to C) Analysis per serum sample. (A) ROC curves based on a comparison between the IC group and the corresponding control group. Dotted line, Mnn detection; gray line, BDG detection; black line, MS-DS index. (B) Cutoffs established by ROC curves and corresponding sensitivity/specificity values. (C) Venn diagrams. (D to F) Analysis per patient. *, control sera exhibiting high levels of BDG (>800 pg/ml) and/or high levels of Mnn (>62.5 pg/ml) were excluded.

reanalyzed the performance of the MS-DS index by excluding the controls accordingly. As shown in Fig. 1B and E, the application of these criteria to the MS-DS index resulted in an increase in specificity (89% per serum sample and 78% per patient).

The levels of biomarkers as a function of the date of serum sampling in relation to the date of isolation of *Candida* species from blood cultures are shown in Fig. 2. All of the biomarkers displayed a Gaussian distribution, with a maximum on day 0,

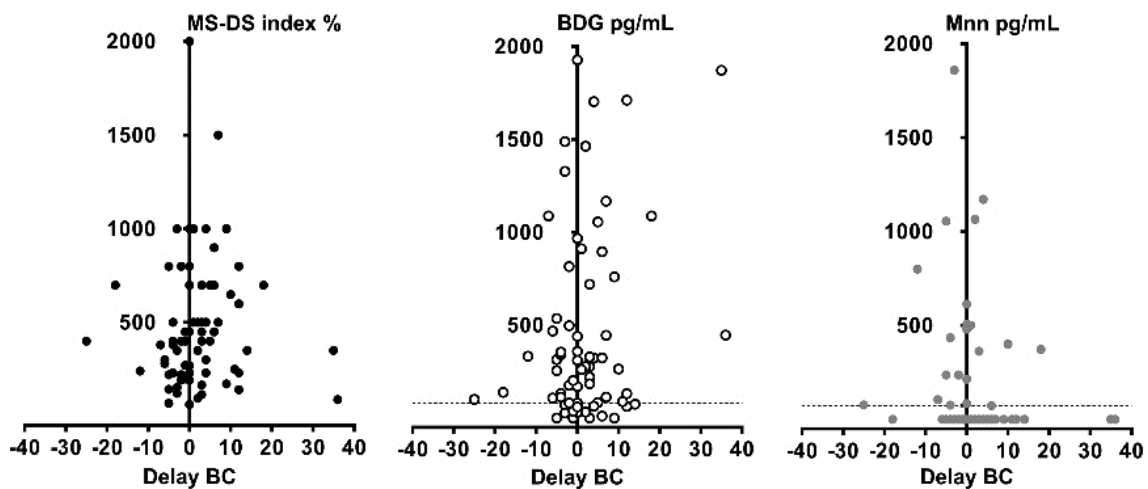


FIG 2 Distribution of MS-DS index, BDG, and Mnn values in sera from IC patients as a function of the date (in days) in relation to the isolation of *Candida* (day 0). BC, blood culture.

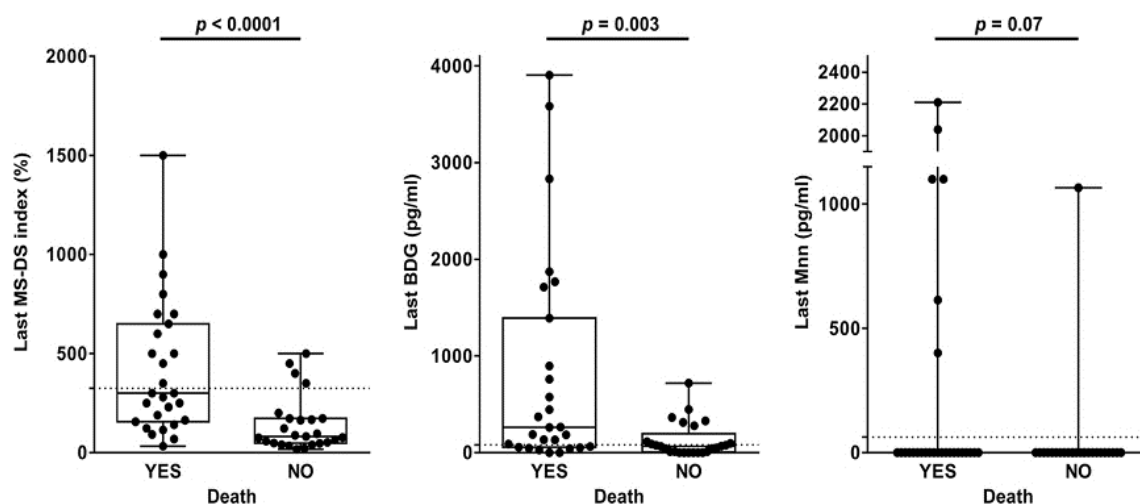


FIG 3 Relationship between outcome and last available value for the MS-DS index, BDG detection, and Mnn detection observed during monitoring of the whole cohort. The hatched line represents the cutoff value for each biomarker.

suggesting that the development of candidemia was crucial to their appearance. All tests were positive before blood cultures were performed. Among the 38 serum samples available from 23 patients, 55%, 81%, and 37% were positive by the MS-DS index, BDG detection, and Mnn detection, respectively (corresponding to 17, 20, and 9 patients, respectively). The MS-DS index test was positive up to 25 days, with a median of 3 days, before blood cultures. After blood cultures became positive, there was a trend toward the persistence of BDG detection in contrast to Mnn detection and the MS-DS index. A correlation analysis between MS-DS results and BDG and Mnn results showed that these biomarkers do not circulate at the same time in a given serum sample from a given patient (data not shown). Although the study was retrospective and was based on 3 to 5 available serum samples per patient, information could be obtained about the variation in the MS-DS index compared to BDG and Mnn detection. Representative examples based on a different duration of the survey are shown in Fig. S1 in the supplemental material, illustrating that all biomarkers may appear or disappear abruptly within short periods of time ranging from 1 to 4 days (patients 4 and 6). Conversely, some biomarkers may persist for periods of up to 5 weeks, while others are negative. As these interindividual differences between biomarkers may reveal different kinetics of release and catabolism, we explored the incidence of neutropenia as a characteristic of IC in at-risk patients. No correlation was found between the MS-DS index and polymorphonuclear neutrophil counts ($r^2 = 0.1$). We also investigated the incidence of colonization on the MS-DS index in control patients for whom the fungal load was known on each day of serum sampling. No correlation was observed between colonization and the MS-DS index (data not shown).

Analysis of the relationship between biomarker levels and the outcome of IC was also performed. Figure 3 shows the last available value for each biomarker as a function of survival at 1 month. Mortality in IC patients was significantly associated with a high serum MS-DS index and high levels of BDG, with a greater significance for the MS-DS index ($P < 0.0001$ by a Mann-Whitney test).

MS-DS and diagnosis of IA. The clinical and biological data

for the patients with IA are shown in Table 2, and those of the corresponding controls are shown in Table S2 in the supplemental material. The studied population consisted of 15 patients with IA and 20 controls. Most of the patients had underlying hematological problems. The control group consisted of patients who were hospitalized in oncohematology wards and exposed to the same risk factors as those for IA patients and for whom regular surveillance of galactomannanemia was performed.

The contribution of the MS-DS index to the diagnosis of IA was evaluated by establishing ROC curves per serum sample in comparison to BDG and GM detection (Fig. 4A and B). Determination of the cutoff showed that the MS-DS index was lower than that for IC (290%). However, as this led to only a slight improvement in sensitivity (85%), the same cutoff as that for IC was used (325%) to maintain homogeneity. When analyzed per patient, the specificity of the MS-DS index decreased slightly to 76%, while the sensitivity increased to 93% (Fig. 4C and D). These values are similar to those for BDG detection but lower than those for GM detection, which was chosen as one of the inclusion criteria.

With regard to the controls, one patient who exhibited a very high MS-DS index (1,500%) was among two controls classified as having "possible IA." As neither of these two patients were positive for BDG or GM, the MS-DS index in this case might have been an early indicator of IA.

When considering the 40 serum samples collected from patients with IA, 33, 25, and 25 were positive by the MS-DS index, BDG detection, and GM detection, respectively. Analysis of the contribution of each marker to the early diagnosis of IA was performed by using sera taken on the first week of GM monitoring. This analysis showed that 4, 8, and 10 serum samples were positive by GM detection, BDG detection, and the MS-DS index, respectively. Considering the distribution of the biomarkers, no correlation was observed between the MS-DS index and BDG detection ($r = 0.028$) or the MS-DS index and GM detection ($r = 0.21$), indicating that these biomarkers do not circulate at the same time in a given serum sample from a given patient.

This high interindividual variability of biomarker kinetics is summarized in Fig. S2 in the supplemental material, with repre-

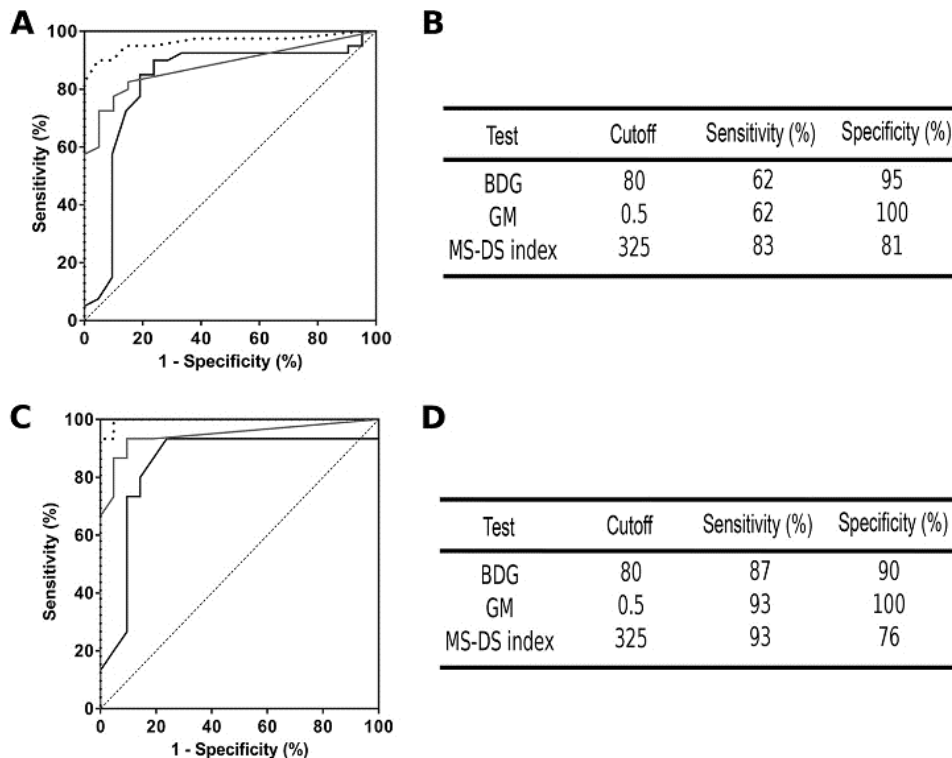


FIG 4 (A) ROC curves per serum sample in IA patients and the corresponding control group. (B) Established cutoffs from ROC curves and sensitivity/specificity values for BDG detection (gray line), GM detection (dotted line), and the MS-DS index (black line) for analysis per serum sample. (C) ROC curves per patient for IA patients and the corresponding control group for GM detection, BDG detection, and the MS-DS index. (D) Established cutoffs from ROC curves and sensitivity/specificity values for BDG detection, GM detection, and the MS-DS index for analysis per patient.

sentative examples of biomarker kinetics during IA episodes. Patient 4 had a decrease in the GM level, whereas his MS-DS index increased constantly during the time of the survey. In contrast, patient 11 had an increase in the GM level, while her MS-DS index remained positive until the end of the survey. However, concordant kinetics could also exist, as for patient 3.

The MS-DS index in IA patients was significantly higher than that observed for IC patients (826% versus 471%).

MS-DS and diagnosis of MM. The clinical and biological data for patients with MM are shown in Table 3. These cases were collected in our clinical laboratory from 2015 to 2016. These patients presented the usual characteristics of patients infected with *Mucorales* in terms of underlying conditions, including immunosuppression, burns, and trauma, as well as the causative agents isolated.

Nine of these patients had a high MS-DS index. Most of the sera were collected retrospectively after the time of diagnosis of MM, and serum samples were available for only five of these patients before or on the day of diagnosis; four of these patients were positive. Although few sequential serum samples were available per patient, two MS-DS conversions were observed. Interestingly, the MS-DS index observed during MM was very high.

DISCUSSION

IFIs are severe life-threatening diseases and are a serious medical problem in immunocompromised patients. IC and IA account for 73.4% and 13.3% of IFIs, respectively (1). These infections are difficult to diagnose and are often characterized by a fulminant

evolution and death (19, 20). Although MM has a lower prevalence (1.6%), this infection, caused by primitive molds slowly evolving in ulceronecrotic lesions, generates peculiar attention from the medical community because its late diagnosis usually results in death or debilitating surgery.

There is extensive literature on IC and IA, and a number of recommendations have been reported for the management of at-risk patients (10, 21). The high economic impact of inappropriate antifungal therapy in this setting has been particularly well documented (22, 23). For IC, a novel culture-independent technology based on DNA detection by T2 magnetic resonance and nanotechnologies has been proposed to detect and identify the causative yeast directly in patient samples (24). Application of this technology considerably reduces the delay in diagnosis in comparison to blood cultures, which is associated with increased hospital mortality and cost. When adopting an institution-wide T2Candida testing strategy instead of a blood culture-based strategy, potential savings of \$1,148 per tested patient and a reduction in mortality of 61% have been observed (24). In clinical circumstances of patients with intra-abdominal *Candida* infection or patients who have received antifungal therapy (for patients with proven or suspected IC in the absence of candidemia), the high analytical sensitivity (1 to 3 CFU/ml) generates an increase in sensitivity of 36% per patient (22). With regard to the delay in diagnosis in relation to blood cultures, T2Candida reduced the mean time to detection and species identification from 129.9 to 4.4 h. To address the problem of a reduction in time to diagnosis in order to initiate appropriate antifungal

treatment, many studies have been carried out on the detection of circulating fungal molecules, which may complement blood cultures and discriminate IC patients from controls with similar risk factors without documented IFI. This approach led to the development of serological tests as adjuncts when making therapeutic decisions. In this setting, meta-analyses of clinical studies have led to moderate-level recommendations concerning the use of BDG and Mnn tests and of Mnn and anti-Mnn tests combined, as suggested previously (10, 25, 26). For IA, the use of GM and BDG tests is recommended (17, 26). Based on our previous study identifying a new biomarker (MS-DS) detected by MALDI-TOF MS (16), we carried out a large-scale evaluation of this method for the diagnosis of IC, IA, and MM with appropriate hospital controls.

For the diagnosis of IC per patient, application of a cutoff of 325% was associated with a sensitivity and specificity of 83% and 69%, respectively; the sensitivity was higher than that of Mnn detection (39%), and the specificity was higher than that of BDG detection (31%). When the MS-DS index cutoff was decreased to 260% in order to reach the same sensitivity as that of BDG detection (96%), the specificity of MS-DS (52%) remained higher than that of BDG detection.

These findings suggest that the MS-DS index positively complements Mnn and BDG detection for the diagnosis of IC. All of these tests were positive before blood culture results were available. Among the 38 serum samples available from 23 patients, 55%, 81%, and 37% were positive by the MS-DS index, BDG detection, and Mnn detection, respectively, which corresponded to 17, 20, and 9 patients, respectively, suggesting the usefulness of the MS-DS index as an early diagnostic marker for IC. The glyco-biomarkers exhibited different kinetics during the time course of infection and were rarely positive simultaneously. Analysis of this panel of IFI patients and appropriate controls, regrouping patients from oncohematology wards and/or suffering from bacterial infections due to the usual bacterial species encountered in the hospital environment, showed that neither neutropenia nor bacteremia influenced MS-DS levels. The prognostic significance of BDG persistence or an increasing slope during patient screening has been proposed as an indicator for monitoring treatment of IC (27). By using the last available value for each test in monitored patients as a function of survival at 1 month, it was established that the persistence of the MS-DS index was more significantly associated with an unfavorable prognosis than BDG detection.

When the MS-DS index was evaluated for the diagnosis of IA in comparison to BDG and GM assays, the sensitivities and specificities per patient were 93% and 76%, 87% and 90%, and 93% and 100% for the MS-DS index, BDG detection, and GM detection, respectively. This is in agreement with the best performance reported so far with the BDG and GM tests, although it must be stated that in the present study, the 100% sensitivity of GM detection is related to the choice of GM positivity as an inclusion criterion. In terms of their contribution to the early diagnosis of IA, BDG detection has been shown to give a better performance than GM detection in pediatric and adult neutropenic patients (28, 29). In the present study, the MS-DS index provided earlier positive results than the other tests on the first serum samples available. During the time course of the disease, these biomarkers do not circulate at the same time. GM is a well-recognized surrogate biomarker (26) of IA, and the

MS-DS index complemented GM detection more positively than BDG detection.

With regard to MM, a definite diagnosis is based on the histopathology of biopsy specimens from which cultures are often negative (30) (especially in patients who have received preventive or empirical antifungal therapy). Some progress has recently been made in the diagnosis of MM by real-time PCR in specialized centers (31–36), but none of the serological tests currently on the market are efficient for the diagnosis of MM. Our study clearly demonstrates that MS-DS could fill this gap as a new serological marker for MM, becoming positive before the establishment of a clinical diagnosis. Altogether, these results suggest a panfungal nature of this new biomarker, and studies are now in progress to investigate its synthesis and release by fungal cells.

In conclusion, these findings suggest that the MS-DS index is a novel physicochemical diagnostic test for the diagnosis of major IFIs. It is cheap to perform and is easily implementable in the majority of clinical mycology laboratories equipped with a routine MALDI-TOF mass spectrometer. Studies are in progress to validate the robustness of this marker in patient cohorts recruited in different European centers.

ACKNOWLEDGMENT

We thank Val Hopwood for editorial assistance.

FUNDING INFORMATION

This work, including the efforts of Alexandre Mery, Boualem Sendid, Nadine François, Marjorie Cornu, Julien Poissy, Yann Guerardel, and Daniel Poulain, was funded by bioMerieux. This work, including the efforts of Boualem Sendid, Nadine François, Julien Poissy, and Daniel Poulain, was funded by European Community's Seventh Framework Program (FP7-2007-2013) (HEALTH-F2-2010-260338-ALLFUN). This work, including the efforts of Boualem Sendid, Nadine François, Julien Poissy, and Daniel Poulain, was funded by Programme Hospitalier de Recherche Clinique du Ministère des Affaires Sociales, de la Santé et de la Ville 1918, 2011. This work, including the efforts of Boualem Sendid, Nadine François, Marjorie Cornu, Julien Poissy, and Daniel Poulain, was funded by Fonds d'Aide à l'Emergence et à l'Excellence du CHRU de Lille-Bonus H.

REFERENCES

1. Pfaller MA, Pappas PG, Wingard JR. 2006. Invasive fungal pathogens: current epidemiological trends. *Clin Infect Dis* 43:S3–S14. <http://dx.doi.org/10.1086/504490>.
2. Dignani MC. 2014. Epidemiology of invasive fungal diseases on the basis of autopsy reports. *F1000Prime Rep* 6:81. <http://dx.doi.org/10.12703/P6-81>.
3. Neofytos D, Horn D, Anaissie E, Steinbach W, Olyaei A, Fishman J, Pfaller M, Chang C, Webster K, Marr K. 2009. Epidemiology and outcome of invasive fungal infection in adult hematopoietic stem cell transplant recipients: analysis of Multicenter Prospective Antifungal Therapy (PATH) Alliance registry. *Clin Infect Dis* 48:265–273. <http://dx.doi.org/10.1086/595846>.
4. Mean M, Marchetti O, Calandra T. 2008. Bench-to-bedside review: Candida infections in the intensive care unit. *Crit Care* 12:204. <http://dx.doi.org/10.1186/cc6212>.
5. Kontoyannis DP, Marr KA, Park BJ, Alexander BD, Anaissie EJ, Walsh TJ, Ito J, Andes DR, Baddley JW, Brown JM, Brumble LM, Freifeld AG, Hadley S, Herwaldt LA, Kauffman CA, Knapp K, Lyon GM, Morrison VA, Papanicolaou G, Patterson TF, Perl TM, Schuster MG, Walker R, Wannemuehler KA, Wingard JR, Chiller TM, Pappas PG. 2010. Prospective surveillance for invasive fungal infections in hematopoietic stem cell transplant recipients, 2001–2006: overview of the Transplant-

- Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET) database. *Clin Infect Dis* 50:1091–1100. <http://dx.doi.org/10.1086/651263>.
6. Kett DH, Azoulay E, Echeverria PM, Vincent JL, Extended Prevalence of Infection in ICU Study Group of Investigators. 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. <http://dx.doi.org/10.1097/CCM.0b013e318206c1ca>.
 7. Ostrosky-Zeichner L. 2012. Invasive mycoses: diagnostic challenges. *Am J Med* 125:S14–S24. <http://dx.doi.org/10.1016/j.amjmed.2011.10.008>.
 8. 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. <http://dx.doi.org/10.1093/cid/cit006>.
 9. Bille J. 2010. New nonculture-based methods for the diagnosis of invasive candidiasis. *Curr Opin Crit Care* 16:460–464. <http://dx.doi.org/10.1097/MCC.0b013e31832833e04df>.
 10. Cuenca-Estrella M, Verweij PE, Arendrup MC, Arkan-Akdagli S, Bille J, Donnelly JP, Jensen HE, Lass-Flörl 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, ESCMID Fungal Infection Study Group. 2012. ESCMID* guideline for the diagnosis and management of Candida diseases 2012: diagnostic procedures. *Clin Microbiol Infect* 18(Suppl 7):9–18. <http://dx.doi.org/10.1111/1469-0691.12038>.
 11. Ambasta A, Carson J, Church DL. 2015. The use of biomarkers and molecular methods for the earlier diagnosis of invasive aspergillosis in immunocompromised patients. *Med Mycol* 53:531–557. <http://dx.doi.org/10.1093/mmy/myv026>.
 12. Ostrosky-Zeichner L, Alexander BD, Kett DH, Vazquez J, Pappas PG, Saeki F, Ketchum PA, Wingard J, Schiff R, Tamura H, Finkelman MA, Rex JH. 2005. Multicenter clinical evaluation of the (1→3) beta-D-glucan assay as an aid to diagnosis of fungal infections in humans. *Clin Infect Dis* 41:654–659. <http://dx.doi.org/10.1086/432470>.
 13. Pfeiffer CD, Fine JP, Safdar N. 2006. Diagnosis of invasive aspergillosis using a galactomannan assay: a meta-analysis. *Clin Infect Dis* 42:1417–1427. <http://dx.doi.org/10.1086/503427>.
 14. Mikulska M, Calandra T, Sanguinetti M, Poulain D, Viscoli C. 2010. The use of mannan antigen and anti-mannan antibodies in the diagnosis of invasive candidiasis: recommendations from the Third European Conference on Infections in Leukemia. *Crit Care* 14:R222. <http://dx.doi.org/10.1186/cc9365>.
 15. Miceli MH, Maertens J. 2015. Role of non-culture-based tests, with an emphasis on galactomannan testing for the diagnosis of invasive aspergillosis. *Semin Respir Crit Care Med* 36:650–661. <http://dx.doi.org/10.1055/s-0035-1562892>.
 16. Sendid B, Poissy J, Francois N, Mery A, Courtecuisse S, Krzewinski F, Jawhara S, Guerardel Y, Poulain D. 2015. Preliminary evidence for a serum disaccharide signature of invasive Candida albicans infection detected by MALDI mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect* 21:88.e1–88.e6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmi.2014.08.010>.
 17. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, Pappas PG, Maertens J, Lortholary O, Kauffman CA, Denning DW, Patterson TF, Maschmeyer G, Bille J, Dismukes WE, Herbrecht R, Hope WW, Kibbler CC, Kullberg BJ, Marr KA, Munoz P, Odds FC, Perfect JR, Restrepo A, Ruhnke M, Segal BH, Sobel JD, Sorrell TC, Viscoli C, Wingard JR, Zaoutis T, Bennett JE, European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group, National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group Consensus Group. 2008. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis* 46:1813–1821. <http://dx.doi.org/10.1086/588660>.
 18. Poissy J, Sendid B, Damiens S, Ichi Ishibashi K, Francois N, Kauv M, Favory R, Mathieu D, Poulain D. 2014. Presence of Candida cell wall derived polysaccharides in the sera of intensive care unit patients: relation with candidaemia and Candida colonisation. *Crit Care* 18:R135. <http://dx.doi.org/10.1186/cc13953>.
 19. Nivoix Y, Velten M, Letscher-Bru V, Moghaddam A, Natarajan-Ame S, Fohrer C, Lioure B, Bilger K, Lutun P, Marcellin L, Launoy A, Freys G, Bergerat JP, Herbrecht R. 2008. Factors associated with overall and attributable mortality in invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis* 47:1176–1184. <http://dx.doi.org/10.1086/592255>.
 20. Safdar A. 2007. Difficulties with fungal infections in acute myelogenous leukemia patients: immune enhancement strategies. *Oncologist* 12(Suppl 2):2–6.
 21. 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, Infectious Diseases Society of America. 2009. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 48:503–535. <http://dx.doi.org/10.1086/596757>.
 22. Bilir SP, Ferrufino CP, Pfaller MA, Munakata J. 2015. The economic impact of rapid Candida species identification by T2Candida among high-risk patients. *Future Microbiol* 10:1133–1144. <http://dx.doi.org/10.2217/fmb.15.29>.
 23. Barnes R, Earnshaw S, Herbrecht R, Morrissey O, Slavin M, Bow E, McDade C, Charbonneau C, Weinstein D, Kantecki M, Schlamm H, Maertens J. 2015. Economic comparison of an empirical versus diagnostic-driven strategy for treating invasive fungal disease in immunocompromised patients. *Clin Ther* 37:1317.e2–1328.e2. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinthera.2015.03.021>.
 24. Pfaller MA, Wolk DM, Lowery TJ. 2016. T2MR and T2Candida: novel technology for the rapid diagnosis of candidemia and invasive candidiasis. *Future Microbiol* 11:103–117. <http://dx.doi.org/10.2217/fmb.15.111>.
 25. Sendid B, Tabouret M, Poirot JL, Mathieu D, Fruit J, Poulain D. 1999. New enzyme immunoassays for sensitive detection of circulating Candida albicans mannan and antimannan antibodies: useful combined test for diagnosis of systemic candidiasis. *J Clin Microbiol* 37:1510–1517.
 26. Marchetti O, Lamoth F, Mikulska M, Viscoli C, Verweij P, Bretagne S, European Conference on Infections in Leukemia Laboratory Working Group. 2012. ECIL recommendations for the use of biological markers for the diagnosis of invasive fungal diseases in leukemic patients and hematopoietic SCT recipients. *Bone Marrow Transplant* 47:846–854. <http://dx.doi.org/10.1038/bmt.2011.178>.
 27. Jaijakul S, Vazquez JA, Swanson RN, Ostrosky-Zeichner L. 2012. (1,3)-Beta-D-glucan as a prognostic marker of treatment response in invasive candidiasis. *Clin Infect Dis* 55:521–526. <http://dx.doi.org/10.1093/cid/cis456>.
 28. Koltze A, Rath P, Schoning S, Steinmann J, Wichelhaus TA, Bader P, Bochenek K, Lehrnbecher T. 2015. Beta-D-glucan screening for detection of invasive fungal disease in children undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Clin Microbiol* 53:2605–2610. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00747-15>.
 29. Fontana C, Gaziano R, Favaro M, Casalnuovo I, Pistoia E, Di Francesco P. 2012. (1-3)-Beta-D-glucan vs galactomannan antigen in diagnosing invasive fungal infections (IFIs). *Open Microbiol J* 6:70–73. <http://dx.doi.org/10.2174/1874285801206010070>.
 30. Roden ML, Zaoutis TE, Buchanan WL, Knudsen TA, Sarkisova TA, Schaufele RL, Sein M, Sein T, Chiou CC, Chu JH, Kontoyiannis DP, Walsh TJ. 2005. Epidemiology and outcome of zygomycosis: a review of 929 reported cases. *Clin Infect Dis* 41:634–653. <http://dx.doi.org/10.1086/432579>.
 31. Millon L, Herbrecht R, Grenouillet F, Morio F, Alanio A, Letscher-Bru V, Cassaing S, Chouaki T, Kauffmann-Lacroix C, Poirier P, Toubas D, Augereau O, Rocchi S, Garcia-Hermoso D, Bretagne S, French Mycosis Study Group. 17 December 2015. Early diagnosis and monitoring of mucormycosis by detection of circulating DNA in serum: retrospective analysis of 44 cases collected through the French Surveillance Network of Invasive Fungal Infections (RESSIF). *Clin Microbiol Infect* <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmi.2015.12.006>.
 32. Millon L, Larosa F, Lepiller C, Legrand F, Rocchi S, Daguindau E, Scherer E, Bellanger AP, Leroy J, Grenouillet F. 2013. Quantitative polymerase chain reaction detection of circulating DNA in serum for early diagnosis of mucormycosis in immunocompromised patients. *Clin Infect Dis* 56:e95–e101. <http://dx.doi.org/10.1093/cid/cit094>.
 33. Petraitis V, Petraitiene R, Antachopoulos C, Hughes JE, Cotton MP, Kasai M, Harrington S, Gamaletsou MN, Bacher JD, Kontoyiannis DP, Roilides E, Walsh TJ. 2013. Increased virulence of Cunninghamella bertholletiae in experimental pulmonary mucormycosis: correlation with circulating molecular biomarkers, sporangiospore germination and hyphal metabolism. *Med Mycol* 51:72–82. <http://dx.doi.org/10.3109/13693786.2012.690107>.
 34. Kasai M, Harrington SM, Francesconi A, Petraitis V, Petraitiene

- R, Beveridge MG, Knudsen T, Milanovich J, Cotton MP, Hughes J, Schaufele RL, Sein T, Bacher J, Murray PR, Kontoyiannis DP, Walsh TJ. 2008. Detection of a molecular biomarker for zygomycetes by quantitative PCR assays of plasma, bronchoalveolar lavage, and lung tissue in a rabbit model of experimental pulmonary zygomycosis. *J Clin Microbiol* 46:3690–3702. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00917-08>.
35. Shigemura T, Nishina S, Nakazawa H, Matsuda K, Yaguchi T, Nakazawa Y. 2016. Early detection of Rhizopus DNA in the serum of a patient with rhino-orbital-cerebral mucormycosis following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Hematol* 103:354–355. <http://dx.doi.org/10.1007/s12185-016-1938-x>.
36. Shigemura T, Nakazawa Y, Matsuda K, Sano K, Yaguchi T, Motobayashi M, Saito S, Noda S, Kobayashi N, Agematsu K, Honda T, Koike K. 2014. Serial monitoring of Mucorales DNA load in serum samples of a patient with disseminated mucormycosis after allogeneic bone marrow transplantation. *Int J Hematol* 100:206–209. <http://dx.doi.org/10.1007/s12185-014-1597-8>.

III) Elargissement de la cohorte à des centres européens spécialisés

Cette dernière partie a donc été étendue à d'autres centres en proposant des sérums extérieurs à ceux du CHRU de Lille qui ont été utilisés jusqu'à maintenant afin d'élargir le panel des résultats et renforcer la robustesse de la méthode MS-DS index. Ce travail auquel j'ai participé au cours de ma thèse de doctorat a été sujet à une publication par Cornu *et al.* parue en 2019 dans *Journal of Clinical Microbiology* qui sera ici reporté en Annexe 2 car il comporte des analyses très diverses de plusieurs IFI.

Concernant les CI, 57 sérums candidémiques provenant de 27 patients nous ont été fournis par l'Hôpital Universitaire de Gênes en Italie et par l'Université catholique du Sacré-Cœur de Rome. Les contrôles appropriés bactériémiques nous ont quant à eux été envoyés par l'Hôpital Universitaire de Lausanne en Suisse (23 plasmas de 22 patients). Une carte récapitulative avec les différents sérums qui nous ont été fournis par chaque centre a été représentée sur la Figure III.3 avec également les autres IFI qui ne feront ici pas l'objet d'une analyse approfondie.



Figure III.3 : Carte d'Europe avec les différents centres médicaux impliqués dans l'étude de la cohorte multicentrique ainsi que les sérums fournis par ces derniers.

Les analyses de courbes ROC et de diagnostic précoce ont notamment été effectuées sur les sérums mis à disposition ainsi que des courbes de cinétique pour chaque biomarqueur lorsque plusieurs sérums étaient disponibles par patient (Figure III.4 reporté de la Figure 2 de l'article). Comme précédemment, les performances du MS-DS index concurrencent bien les deux autres tests et ce surtout quand on se place sur les analyses par patient (61,5 % de sensibilité pour 87 % de spécificité). Une fois de plus, la sensibilité a été nettement améliorée

avec un gain de plus de 10 points sans modifier la très bonne spécificité déjà acquise lors des analyses par sérum.

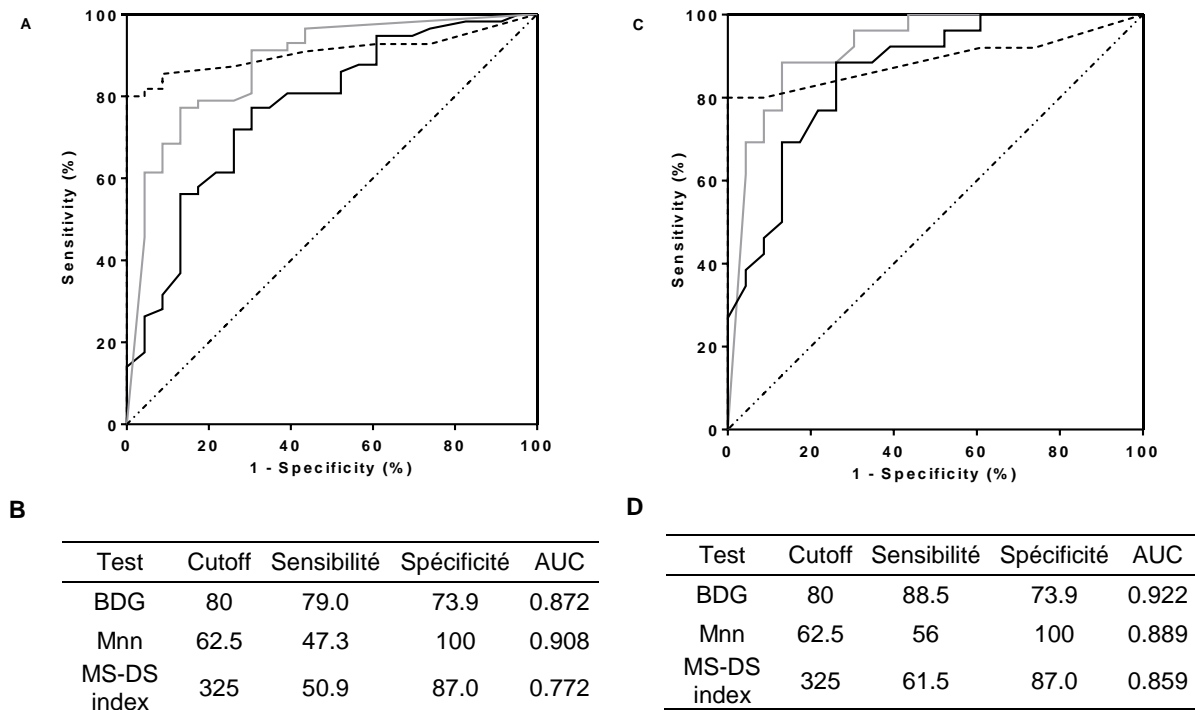


Figure III.4 : Comparaison du BDG, Mnn et MS-DS index des sérums provenant de la cohorte multicentrique.

Courbes ROC basées sur la comparaison entre le groupe candidémiques et le groupe de sujets colonisés par sérum (A) et par patient (C) : BDG, ligne grise; Mnn, ligne pointillé noire et MS-DS index, ligne noire. Cutoffs établis à partir des courbes ROC et les rapports sensibilité/spécificité correspondants par sérum (B) et par patient (D).

Une cinétique d'un patient candidémique dont trois sérums ont pu être purifiés est également présente dans l'article. Celle-ci a mis en avant la circulation différente du MS-DS index en comparaison avec le BDG et le Mnn. En effet le MS-DS index se positive au cours de la cinétique et le reste jusqu'au bout de cette dernière tandis que la tendance inverse a été observée pour les deux autres biomarqueurs (Figure III.5A reprise de la Figure 3A de l'article). Des exemples de cinétiques provenant de deux autres patients de la cohorte multicentrique candidémique ont ici également été reportés sur la Figure III.5B. Une fois de plus, on remarque que le MS-DS index circule de manière différente par rapport aux autres biomarqueurs. On a en effet pour le patient 5 (voir Tableau 1 de l'article) un MS-DS index qui ne se positive qu'en fin de cinétique alors que le Mnn décroît pour arriver à des valeurs en-dessous du cutoff et que le BDG reste quant à lui positif tout au long de la cinétique. En ce qui concerne le patient 3, le MS-DS index reste positif pendant toute la durée de la cinétique ce qui n'est pas le cas du BDG et du Mnn.

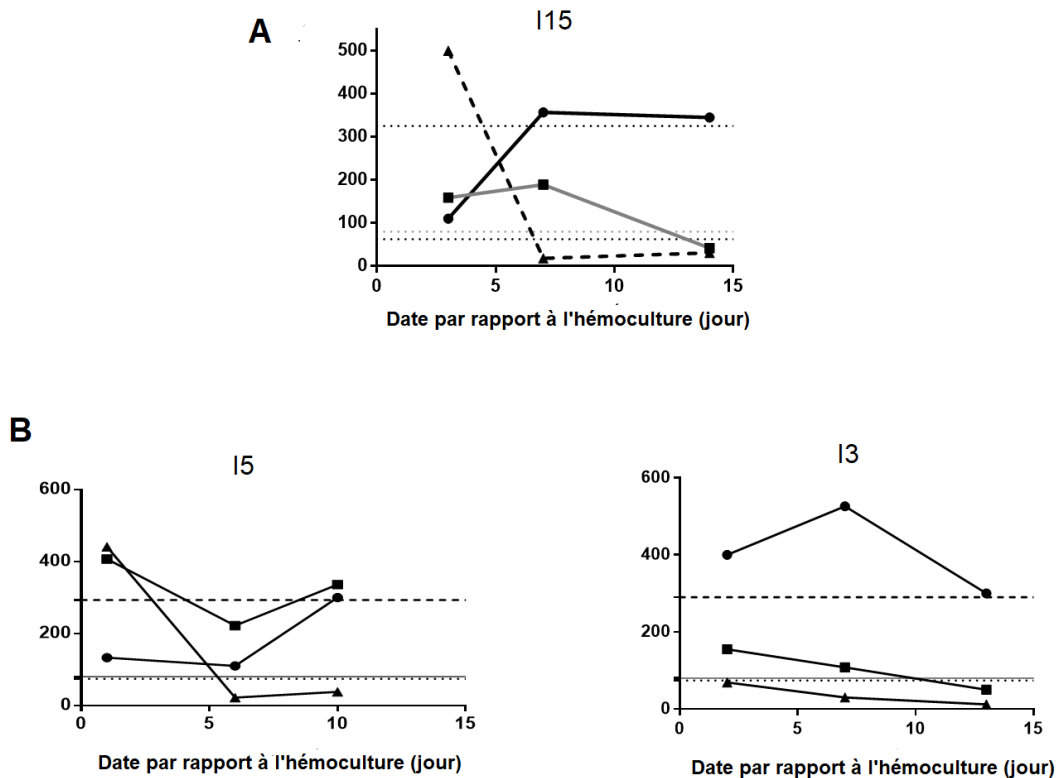


Figure III.5 : Exemples de cinétiques des biomarqueurs sériques provenant de trois patients candidémiques de la cohorte multicentrique.

Le jour 0 indique la date de l'hémoculture positive et les biomarqueurs BDG (carré noir), Mnn (triangle noir) et MS-DS index (rond noir) sont représentés avec leurs cutoffs respectifs (80 pg/mL pour le BDG, 62,5 pg/mL pour le Mnn et 325 % pour le MS-DS index).

Conclusion de la partie clinique

Le développement du nouveau test de diagnostic des CI se basant sur l'analyse des glycanes circulants dans les sérums de patients par spectrométrie de masse a permis l'identification d'un signal disaccharidique spécifique et à l'élaboration d'un index MS-DS en calculant le rapport de ce signal avec un autre signal matriciel. Cet index a ensuite été confronté aux autres biomarqueurs (BDG et Mnn) actuellement disponibles sur le marché afin d'établir ses performances.

En reprenant l'ensemble des résultats provenant des trois cohortes, la robustesse du nouveau test MS-DS index a ainsi pu être validée. Grâce à des études comparatives, le MS-DS index se place favorablement en apportant un compromis sensibilité/spécificité très intéressant. En effet, si le BDG comporte une bonne sensibilité, sa spécificité lui fait généralement défaut alors que la détection du Mnn apporte une très bonne spécificité au détriment d'une faible sensibilité. Le MS-DS index quant à lui se positionne finalement entre ces deux tests avec une sensibilité et une spécificité certes plus faibles que le BDG et le Mnn

respectivement mais avec des scores tout à fait honorables et adaptés à l'utilisation de ce test en clinique. De plus, le MS-DS index complète davantage le BDG que le Mnn comme nous avons pu le voir à travers ce chapitre.

Ce nouveau test de diagnostic des CI présente donc un intérêt évident pour la décision thérapeutique ou lors d'un suivi thérapeutique. De plus, il peut aider à la décision lorsque les hémocultures font défaut ce qui est très souvent le cas en routine clinique. Enfin, le MS-DS index ne se limite pas seulement aux CI mais a l'avantage de couvrir le spectre des IFI les plus couramment retrouvés, à savoir les aspergilloses invasives ou encore les mucormycoses qui sont de plus en plus présentes en milieu hospitalier. D'un point de vue technique, la méthode du MS-DS index ne requiert pas l'utilisation de matériel biologique tel que des anticorps ou encore des enzymes. De plus, il permettrait d'amortir rapidement les équipements de spectrométrie de masse des laboratoires de biologie clinique. Le seul point qui semble pour le moment poser problème est la nécessité du traitement par la chaleur des sérums qui rend plus difficile l'automatisation de la technique.

Chapitre IV : Etude technique du test diagnostic et mécanismes d'action du disaccharide chez *Candida*

Après avoir étudié plusieurs cohortes de patients et établi la robustesse de ce nouvel outil de diagnostic des CI, la suite des investigations s'est orientée dans trois directions :

1- La caractérisation du disaccharide identifié dans les sérums de patients infectés par des analyses structurales pour comprendre son origine. En effet, lors des phases précoces du développement de la méthode, l'hypothèse selon laquelle le disaccharide observé provenait de la dégradation des polysaccharides de la paroi prévalait. Néanmoins, nos travaux ont démontré qu'il n'en était rien.

2- L'amélioration des performances du MS-DS index par l'utilisation d'un spectromètre de masse à haute résolution. En effet, l'accès à la haute résolution peut permettre de discriminer certains signaux qui ne peuvent être visualisés sur un spectromètre de masse moins résolutif tel que le MALDI-TOF/TOF utilisé pour l'étude clinique du MS-DS index. De plus, si pour le moment des spectromètres de masse à haute résolution ne sont pas disponibles en routine clinique, il est très probable que de tels instruments y seront implantés quand leur coût baissera et leur ergonomie s'améliorera, de la même manière que les MALDI-TOF de pailasse sont devenus un outil de routine clinique en quelques années. C'est pour ces raisons que l'application du test MS-DS index à un autre type de spectromètre de masse fera l'objet d'une première partie.

3- L'étude des mécanismes de relargage de ce disaccharide chez *Candida* par diverses expériences *in vitro* qui ont été menées. Cette étude est finalement la suite logique de ce qui a été fait auparavant puisque le disaccharide MS-DS index identifié dans les sérums de patients infectés s'est avéré être du tréhalose. Ce disaccharide non réducteur est d'ailleurs bien connu chez *Candida* pour son rôle protecteur lors d'épisodes de stress rencontrés par le champignon.

I) Caractérisation du disaccharide retrouvé dans les sérums de patients infectés

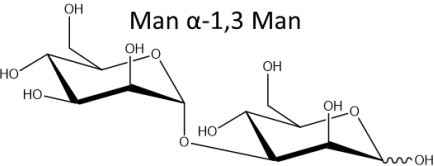
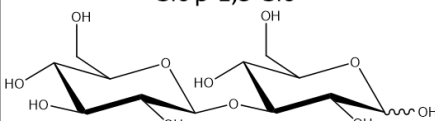
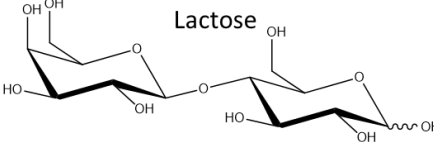
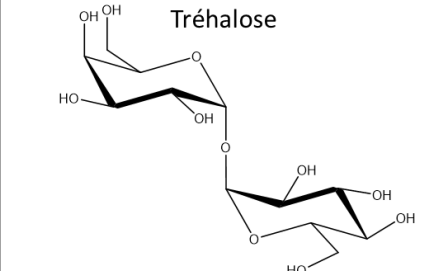
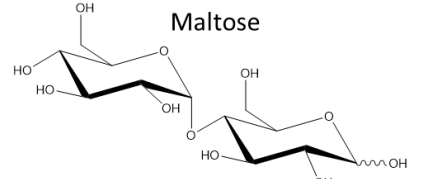
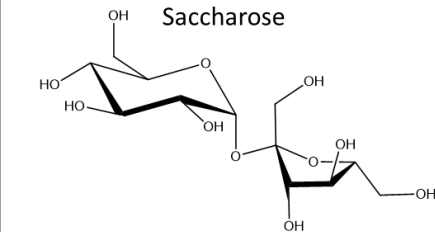
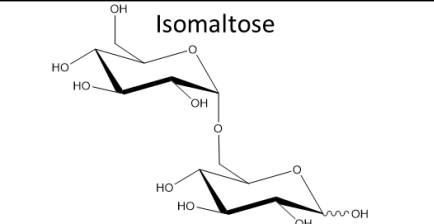
Pour cette caractérisation, l'approche analytique par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS pour *Gas Chromatography/Mass Spectrometry*) a été privilégiée. En effet, l'analyse chromatographique permet de différencier des structures glycaniques ayant la même masse moléculaire mais pas la même conformation ce qui n'est pas réalisable en utilisant la spectrométrie de masse seule. De plus, la fragmentation à très haute énergie qui précède l'analyse par le spectromètre de masse (EI-MS pour *Electron Ionization-Mass Spectrometry*) en GC-MS permettait également d'envisager

la différenciation des isomères selon leurs profils spectrométriques, ce que le mode de fragmentation à basse énergie des MALDI-TOF/TOF ne permet pas. Cette technique a donc été parfaitement adaptée pour la détermination du disaccharide retrouvé dans les sérums de patients atteints de CI.

Il est néanmoins nécessaire au préalable de posséder les standards adéquats pour déterminer leur temps de rétention respectifs en GC. Dans le cadre de notre étude, plusieurs standards disaccharidiques parmi les plus couramment retrouvés ont alors été analysés avant de passer aux sérums purifiés. Les sucres n'étant pas des composés volatils dans leur état natif, une étape de dérivation est également indispensable avant leur analyse. Pour ce faire, une perméthylation a été effectuée sur chacun des standards sélectionnés ainsi que sur les quelques sérums purifiés analysés par la suite afin de les rendre volatils.

Tout d'abord, les structures natives ainsi que les temps de rétention des différents standards disaccharidiques perméthylés à avoir été analysés en GC-MS ont été reportés sur le Tableau IV.1. On peut distinguer deux types de disaccharides, à savoir les disaccharides réducteurs (lactose, maltose...) et les non réducteurs (tréhalose et saccharose). Pour les disaccharides réducteurs, deux temps de rétention ont été observés contre un seul pour les disaccharides non réducteurs. Cela s'explique par le fait que chaque disaccharide réducteur est présent en solution sous deux formes, α -pyranose et β -pyranose, sous l'effet de la mutarotation de son glucose en position réductrice. Par contre, les formes α -furanose et β -furanose ne sont pas observées car la proportion de glucose soluble sous forme furanose est négligeable. Les sucres non réducteurs quant à eux ne s'isomérisent pas quand ils sont en solution et ne génèrent donc qu'un seul signal.

Tableau IV.1 : Structures des standards disaccharidiques analysés en GC-MS et leur temps de rétention respectif suite à leur dérivation par perméthylation.

Standard disaccharidique	Temps de rétention (min)	Standard disaccharidique	Temps de rétention (min)
 <p>Man α-1,3 Man</p>	11,23 11,38	 <p>Glc β-1,3 Glc</p>	11,12 11,35
 <p>Lactose</p>	11,35 11,52	 <p>Tréhalose</p>	10,60
 <p>Maltose</p>	11,58 11,78	 <p>Saccharose</p>	10,03
 <p>Isomaltose</p>	11,56 11,79		

Suite à ces résultats préliminaires acquis sur les standards, plusieurs sérums préalablement purifiés provenant de la seconde cohorte ont ensuite été utilisés pour caractériser le disaccharide présent dans ces derniers. Quelques sérums témoins EFS ont aussi servi de contrôle négatif pour ces analyses GC-MS. Un tableau récapitulatif des différentes valeurs obtenues sur ces sérums a été représenté ci-dessous avec notamment les données sur les tests BDG, Mnn et MS-DS index (Tableau IV.2).

Tableau IV.2 : Données récapitulatives des différents sérums purifiés issus de la seconde cohorte sélectionnés pour la caractérisation du disaccharide.

	Catégorie	Service	Hémoculture	Date par rapport à l'hémoculture	Fungitell®	Platelia plus® Ag	Espèces	MS-DS index (en %) Cutoff à 325%
EFS11	Témoin négatif				0	0		15
EFS15	Témoin négatif				0	0		15
EFS16	Témoin négatif				0	0		18
Ca33/11 S8	Candidémie	Réa CCV	<i>C. albicans</i>	J0	81	0		2000
Ca34/11 S3	Candidémie	Réa ouest	<i>C. albicans</i>	J-3	1328	1859		1000
Ca45/12 S2	Candidémie	Réa CCV	<i>C. albicans</i>	J+4	323	0		1000
Ca18/10 S 3	Candidémie	Réa sud	<i>C. glabrata</i>	J0	1928	214		1000
Ca37/12 S1	Candidémie	SI Gastro	<i>C.tropicalis</i>	J+7	446	0		1500
Tem 9	Colonisé	Réa ouest			9	0		10
Tem 12	Colonisé	Réa ouest			131	0	<i>C. glabrata</i>	700
Tem 17	Colonisé	Réa ouest			97	0	<i>C. albicans</i>	1000

Tous les chromatogrammes et spectres de masse associés issus de l'analyse sur ces sérums ne seront pas reportés ici mais un exemple de ce qui a été obtenu pour la plupart des sérums est mentionné sur la Figure IV.1B avec en comparaison les résultats de l'analyse du standard tréhalose (Figure IV.1A). En effet, le temps de rétention à environ 10,60 min a bien été retrouvé dans les sérums purifiés.

Les spectres de masse en aval de la GC apportent également des informations importantes sur la nature du disaccharide. En effet, les composés génèrent des spectres EI-MS spécifiques en fonction du caractère réducteur ou non réducteur du disaccharide.

Concernant le tréhalose, deux valeurs à m/z 275 et 307 semblent spécifiques. Ces signaux sont en effet caractéristiques de la fragmentation d'un disaccharide non réducteur.

Le disaccharide relargué par *Candida* dans le sérum de patients atteints de CI correspond donc à du tréhalose. Ce disaccharide a été évoqué dans la partie introductive pour son rôle de protection du champignon contre le stress lors de la pathogénicité. On sait également que la synthèse du tréhalose s'effectue dans le cytoplasme et qu'il est ensuite transporté vers la membrane et la paroi de *Candida*. Il est donc tout à fait cohérent de retrouver ce sucre dans le sérum des patients infectés puisque *Candida* en sécrète en grande quantité lors de l'infection et de sa dissémination dans la circulation sanguine.

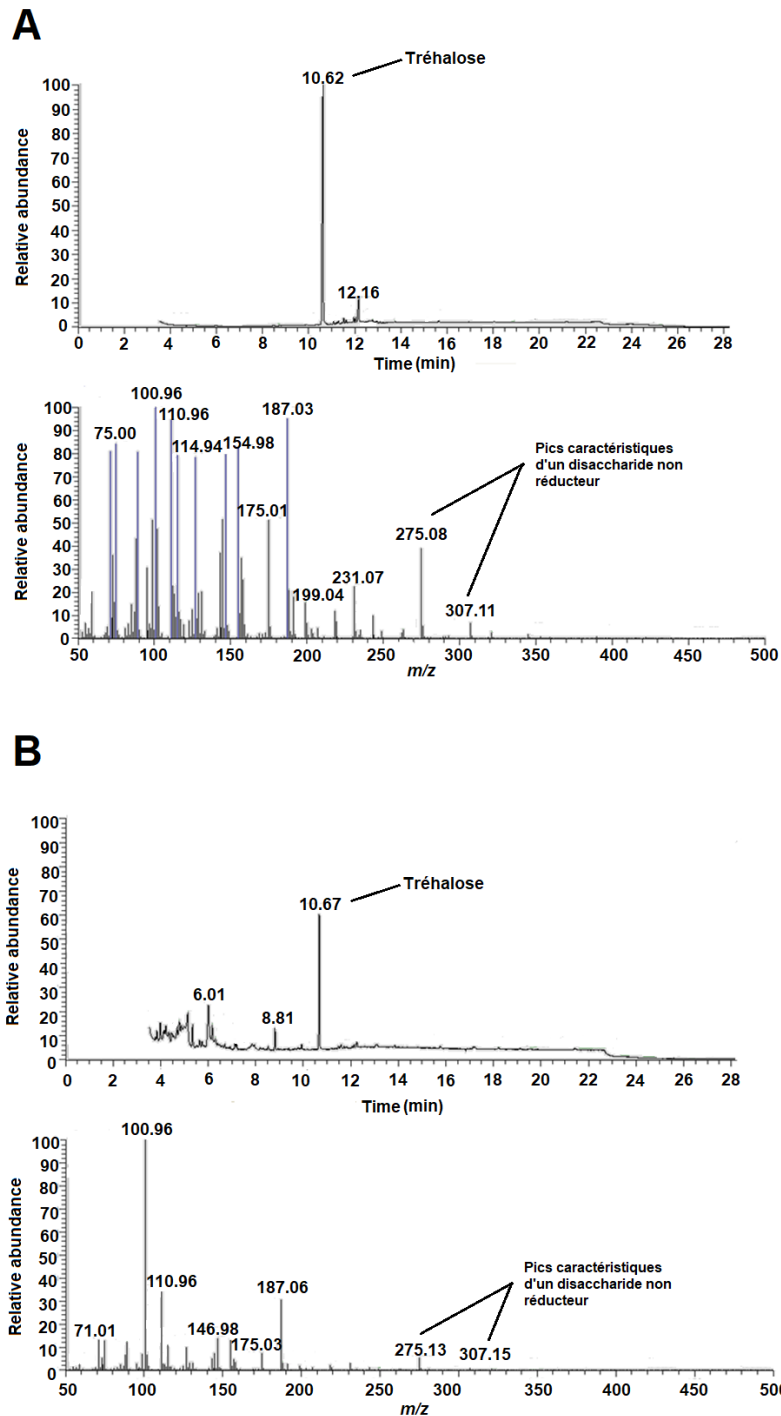


Figure IV.1 : Analyses GC-MS d'un standard de tréhalose perméthylé (A) et d'un sérum de patient candidémique préalablement purifié puis perméthylé (B).

En revanche, il est tout de même à noter ici que dans un des sérums analysés, du maltose uniquement a été retrouvé (Figure IV.2). Le rôle de ce disaccharide est très peu documenté chez *Candida* et serait à priori stocké dans le cytoplasme. Cependant, ce disaccharide a très rarement été observé même par la suite lors d'analyses de sérums provenant de patients atteints d'autres IFI qui ne seront pas évoqués ici. Dans ces sérums, c'est une fois de plus le tréhalose qui a été identifié dans la très grande majorité des cas. On

notera tout de même la présence sur le spectre de masse associé aux temps de rétention du maltose la m/z à 187 que l'on retrouvait déjà pour le tréhalose mais des m/z différentes à 279 et 305 caractéristiques ici d'un disaccharide réducteur. On a également l'apparition d'un pic d'intérêt à m/z 219 qui lui s'apparente au site de coupure du disaccharide au niveau de la liaison osidique.

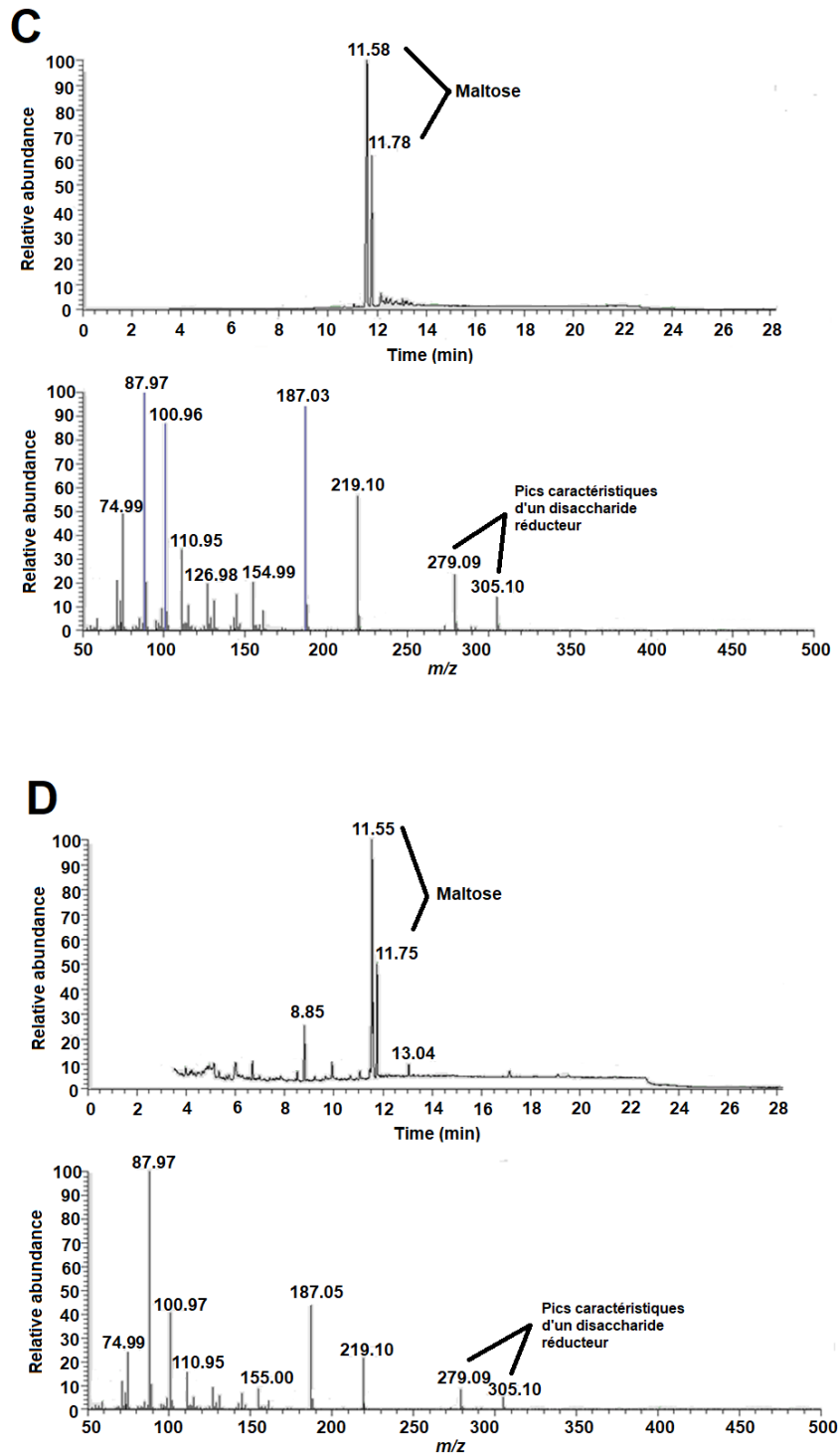


Figure IV.2 : Analyses GC-MS d'un standard de maltose perméthylé (A) et d'un sérum de patient candidémique préalablement purifié puis perméthylé (B).

Les investigations se sont ensuite portées sur le transfert de la méthode MS-DS index jusqu'ici établie sur un spectromètre de masse MALDI-TOF/TOF à un autre spectromètre de masse beaucoup plus résolutif pour tenter de renforcer la robustesse du test. Les performances entre les deux appareillages ont ensuite été comparées pour établir l'impact de la haute résolution sur ce MS-DS index.

II) Application du MS-DS index à un spectromètre de masse haute résolution

Pour réaliser cette étude, 91 sérums provenant de la seconde cohorte et préalablement purifiés ont été sélectionnés puis ont été soumis à une analyse par spectrométrie de masse sur un appareillage de type MALDI-LTQ Orbitrap (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Ce spectromètre de masse permet d'atteindre la très haute résolution et ainsi accéder à des données complémentaires qui ne peuvent être obtenues en spectrométrie de masse de routine telle que le MALDI-TOF/TOF. En effet cette configuration instrumentale permet d'atteindre une résolution qui est ici proche des 91 000, soit dix fois supérieure à celle du MALDI-TOF/TOF. Ces analyses ont été effectuées sur la plateforme Clic-Imaging de l'Université de Lille (<http://laboratoire-prism.fr/index.php/platforms/clic-imaging>) et les différents résultats obtenus ont été résumés dans un tableau en comparaison avec les valeurs du MS-DS index qui avaient été acquises par MALDI-TOF/TOF (Annexe 3).

Au préalable, un standard de tréhalose ainsi qu'un sérum témoin EFS ont été analysés sur le MALDI-LTQ Orbitrap afin de calibrer la machine et d'observer les signaux d'intérêt habituels à 361 et 365 m/z . Les spectres qui en ont résulté sont présentés sur la Figure IV.3 en comparaison avec les spectres qui avaient été acquis par MALDI-TOF/TOF.

Tout d'abord, il convient de rappeler la masse exacte théorique du tréhalose avec l'adduit sodium provenant de la matrice DHB-Py $[M+Na^+]^+$ _{théorique} qui est de 365,0159 m/z . Si l'on s'intéresse maintenant aux spectres de masse du standard de tréhalose (Figure IV.3A), il est possible à partir de celui issu de l'Orbitrap de déterminer la masse exacte du tréhalose observée. Cette démarche n'était pas réalisable auparavant sur le TOF/TOF puisque les m/z varient selon les analyses sur ce type d'appareillage car ce dernier est bien moins résolutif que l'Orbitrap. On a donc $[M+Na^+]^+$ _{observé}=365,12 m/z qui est le signal de référence du tréhalose qui devra être retrouvé pour la suite des analyses sur Orbitrap pour les sérums purifiés de la cohorte.

Pour bien comprendre cet aspect de haute résolution apporté par l'Orbitrap, un sérum témoin EFS préalablement purifié a été analysé en premier lieu sur les deux machines et les spectres de masse en résultant ont été donnés sur la Figure IV.3B. Pour le spectre de masse issu de l'analyse TOF/TOF, on remarque d'emblée que le signal disaccharidique d'intérêt est cette fois retrouvé à m/z 365,15 alors qu'il était observé à m/z 365,19 sur le spectre de masse du

standard tréhalose. Concernant le spectre de masse issu de l'analyse par Orbitrap, le signal est toujours bien présent à m/z 365,12 mais un autre signal à m/z 365,29 est ici apparu. Ce dernier est alors ubiquitaire puisqu'il ne s'agit pas d'un signal disaccharidique.

Ces premières analyses comparatives ont donc finalement mis en avant d'une part la stabilité du signal d'intérêt pour les analyses en Orbitrap mais également la discrimination de deux pics à m/z 365 sur ce même appareillage, l'un à m/z 365,12 spécifique au tréhalose et un autre à m/z 365,29 ubiquitaire ce qui était impossible à visualiser à partir des analyses TOF/TOF de par sa résolution trop basse.

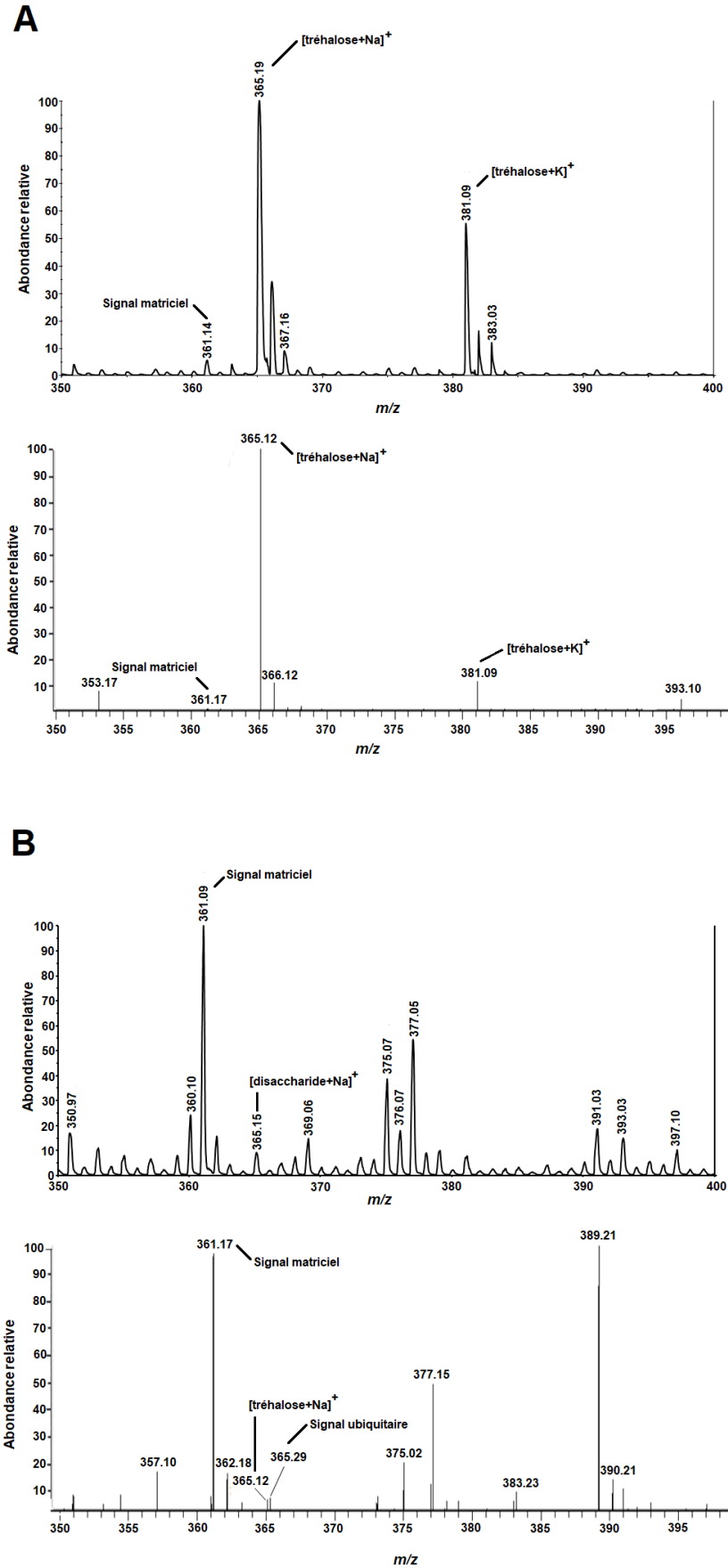


Figure IV.3. Spectres de masse MALDI-TOF/TOF (haut) et MALDI-LTQ Orbitrap (bas) respectifs d'un standard de tréhalose (A) et d'un sérum témoin EFS (B).

Suite à ces résultats préliminaires ayant apportés leur lot d'informations, les analyses ont été poursuivies sur les 91 sérums de patients candidémiques et colonisés ainsi que sur quelques témoins EFS supplémentaires afin de confirmer ce qui a été trouvé sur le premier sérum analysé mais aussi pour établir une comparaison des performances du MS-DS index entre les deux appareillages. Un exemple de spectre de masse Orbitrap a été reporté sur la Figure IV.4 provenant d'un sérum purifié de patient colonisé et candidémique toujours en comparaison avec les spectres de masse MALDI-TOF/TOF associés. A noter que pour le sérum de patient colonisé, l'exemple qui a été choisi correspond à un sérum dont le MS-DS index s'était révélé négatif lors de l'analyse TOF/TOF.

Au niveau des spectres acquis pour le sérum issu d'un patient candidémique (Figure IV.4B), un seul signal à m/z 365 est observé pour les deux spectres de masse avec le signal spécifique du tréhalose pour le spectre MALDI-LTQ Orbitrap à m/z 365,12. En revanche, le même profil que celui du sérum EFS a été obtenu pour le sérum de patient colonisé (Figure IV.4A), à savoir la présence du double pic à m/z 365,12 et 365,29 sur le spectre de masse issu de l'analyse sur Orbitrap.

Il ressort donc de ces analyses que le signal ubiquitaire à m/z 365,29 n'est retrouvé que dans les sérums négatifs au MS-DS index. Cet aspect vient ainsi renforcer la robustesse du test car on s'aperçoit grâce à ces analyses que les signaux qui semblaient s'apparenter à un disaccharide dans les sérums témoins analysés en MALDI-TOF/TOF seraient en fait composés en partie d'un signal 'parasite' qui ne correspond pas au disaccharide recherché.

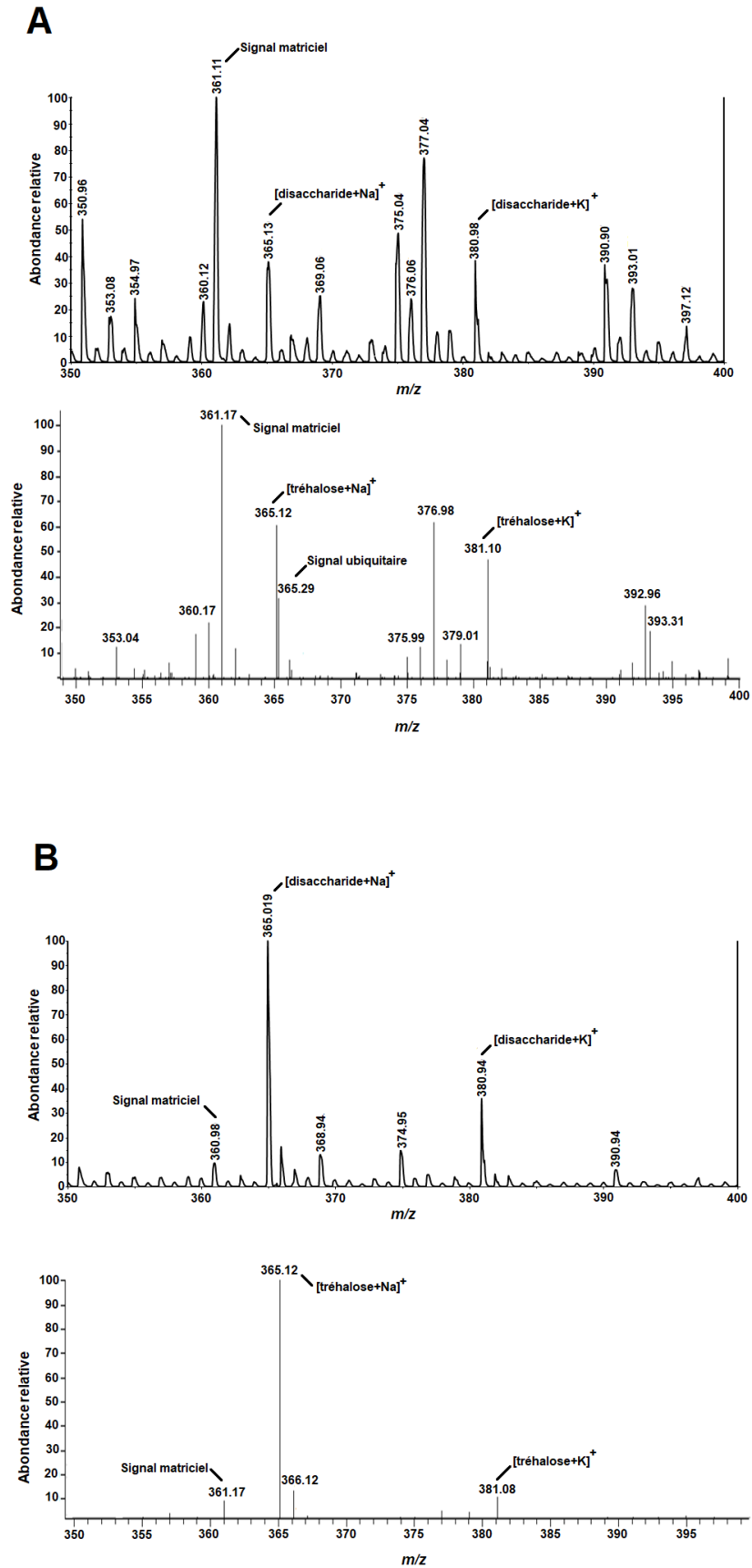


Figure IV.4. Spectres de masse MALDI-TOF/TOF (haut) et MALDI-LTQ Orbitrap (bas) respectifs d'un sérum de patient colonisé par *Candida* (A) et d'un sérum de patient candidémique (B) préalablement purifiés.

Toutes les données ont ensuite été compilées et des courbes ROC ont été réalisées sur chacun des paramètres pris en compte pour les 91 sérums analysés, c'est-à-dire les valeurs de BDG, Mnn et MS-DS index des deux appareillages MALDI-TOF/TOF et MALDI-LTQ Orbitrap (Figure IV.5). Pour les valeurs du MS-DS index Orbitrap, seul le signal à m/z 365,12 a été quantifié et pris en compte pour l'établissement de la courbe ROC associé.

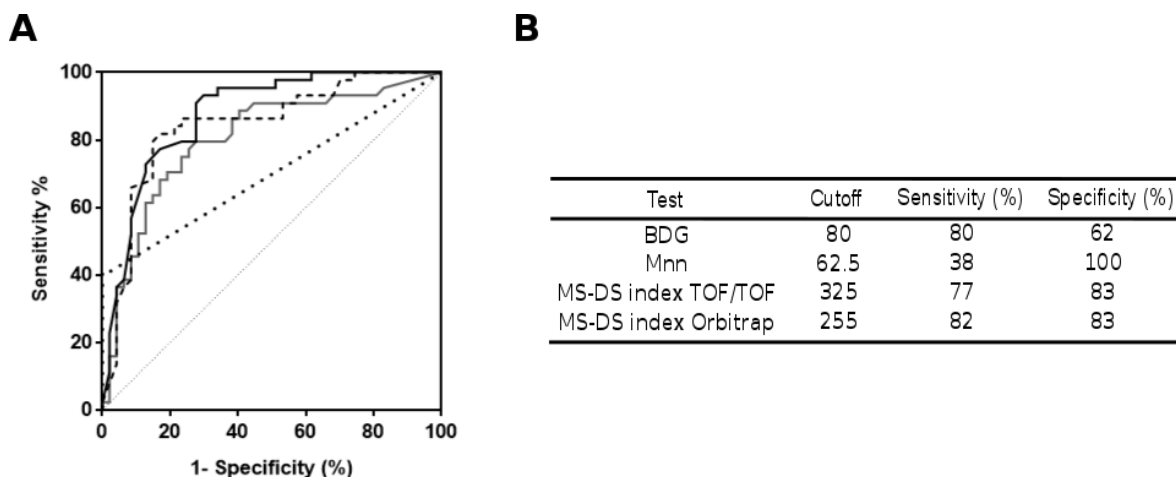


Figure IV.5. Comparaison du BDG, Mnn et MS-DS index de 91 sérums purifiés provenant de la seconde cohorte.

(A) Courbes ROC basées sur la comparaison entre le groupe de patients candidémiques et le groupe contrôle correspondant : BDG, ligne grise; Mnn, ligne pointillé; MS-DS index TOF/TOF, ligne noire et MS-DS index Orbitrap, ligne hachurée. (B) Cutoffs établis à partir des courbes ROC et les rapports sensibilité/spécificité correspondants.

On s'aperçoit que le cutoff du MS-DS index Orbitrap sur le signal à m/z 365,12 a été modifié en passant de 325 % à 255 %. Le cutoff du MS-DS index TOF/TOF n'a quant à lui pas été modifié et les cutoffs fabricants ont été conservés pour le BDG et le Mnn pour cette étude sur les 91 sérums purifiés provenant de la seconde cohorte. Au niveau des rapports sensibilité/spécificité du BDG et du Mnn, on retrouve des valeurs habituelles avec une bonne sensibilité pour le BDG mais avec une faible spécificité et inversement pour le Mnn. En quantifiant le signal spécifique du tréhalose à m/z 365,12 sur le MALDI-LTQ Orbitrap plutôt que le signal global à m/z 365 sur le MALDI-TOF/TOF, on observe que la sensibilité augmente de 77 % à 82 % alors que la spécificité reste identique à 83 %.

Cette étude a donc permis de renforcer la robustesse de la méthode en montrant que le test MS-DS index pouvait être amélioré par l'utilisation d'un spectromètre de masse à haute résolution. De nouveaux signaux ont en effet pu être observés permettant ainsi de discriminer le signal disaccharidique d'un autre signal ubiquitaire en MALDI-LTQ Orbitrap ce qui n'était pas possible auparavant par MALDI-TOF/TOF. Le fait de transférer la méthode du MS-DS index sur un spectromètre de masse à haute résolution a d'ailleurs permis un gain de 5 points

en sensibilité dans le cadre de l'étude. Celle-ci n'a cependant pas été poursuivie sur l'ensemble des sérums car l'idée ici était uniquement de montrer qu'un transfert vers des spectromètres de masse plus performants était réalisable pour le test MS-DS index si ce type d'appareillage venait à être implanté en clinique à l'avenir.

Suite à ces résultats, une étude plus fondamentale a alors émergée et celle-ci s'est focalisée sur la compréhension des mécanismes de relargage du tréhalose chez *C. albicans*. Pour ce faire, des expériences *in vitro* ont été réalisées en appliquant différents stress sur la levure (thermique, salin, oxydatif...) dans le but de mimer les conditions rencontrées par ce dernier au cours de l'infection. Des souches mutantes $\Delta tps1$ et $\Delta tps2$ ont été utilisées afin de mieux comprendre l'impact des enzymes de la biosynthèse du tréhalose sur ce relargage.

III) Etude des mécanismes de relargage du tréhalose par *Candida albicans*

Cette partie aborde un versant plus fondamental du projet de thèse sur *Candida* suite à l'identification du tréhalose contenu dans les sérums de patients infectés et au renforcement de la robustesse de la méthode MS-DS index par des analyses Orbitrap. En effet, il convenait pour la suite de l'étude de s'intéresser aux mécanismes d'action sous-jacents à la méthode développé et plus particulièrement à ceux liés au tréhalose. Les différents rôles protecteurs de ce disaccharide au sein de la paroi de *Candida* lors de stress ont été évoqués dans la partie introductive et l'objectif était de réaliser des expériences *in vitro* sur *C. albicans* en soumettant notamment le champignon à différentes conditions de stress (thermique, oxydatif, nitrique...). Ces expériences ont été menées tout d'abord sur la souche sauvage de *C. albicans* et se sont ensuite étendues à deux souches mutantes $\Delta tps1$ et $\Delta tps2$ qui sont les deux enzymes de biosynthèse du tréhalose chez *Candida*. Cette étude a été réalisée au travers d'une collaboration étroite avec le Dr. Samir Jawhara de l'équipe du Pr. Boualem Sendid. L'ensemble des résultats obtenus vont être décrits dans cette troisième partie.

III.1) Etude sur la souche sauvage de *C. albicans*

Pour étudier ces mécanismes, des cultures de *C. albicans* sur des souches sauvages (WT pour *Wild Type*) ont tout d'abord été réalisées. Ces cultures ont ensuite été divisées de manière à obtenir le même nombre de cellules par tube (1.10^8 cellules). Différents stress ont alors été appliqués sur *C. albicans* pour quantifier le relargage de tréhalose. Des cinétiques ont également été réalisées sur 4 h (avec une prise d'échantillon toutes les heures) pour certaines expériences en incubant les cellules dans un tampon ou solvant défini afin d'y appliquer un effet de stress. Les échantillons ont enfin été centrifugés et les surnageants ont

été purifiés sur colonne biphasique avant leur analyse par spectrométrie de masse pour déterminer le MS-DS index.

Les essais se sont dans un premier temps concentrés sur l'élaboration d'une cinétique en milieu RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) à 40 °C (stress thermique). Ce milieu est couramment utilisé chez *C. albicans* pour sa capacité à induire le processus de filamentation. En comparant les résultats qui ont été acquis tout au long de la cinétique, le MS-DS index reste négatif car le signal n'évolue pas comparé à la valeur de départ à t0, c'est-à-dire avant application du chauffage sur les cellules comme en témoigne le Tableau IV.3. Le MS-DS index se positive cependant en fin de cinétique à t4 h. Un nouvel essai a alors été réalisé à 60 °C et l'échantillon a été analysé au bout d'une heure. On remarque cette fois que le MS-DS index est ici beaucoup plus élevé ce qui signifie qu'en appliquant un stress thermique sur *C. albicans*, un relargage de tréhalose important se produit et il n'a donc pas été nécessaire de poursuivre la cinétique. Il est à noter que les valeurs de MS-DS index qui ont été reportés dans le Tableau IV.3 correspondent à des valeurs moyennes suite à la réalisation des expériences en triplicat. Une nouvelle cinétique a de ce fait été mise en place avec ajout de NaCl à forte concentration dans le PBS (*Phosphate Buffer Saline*) pour mimer un stress osmotique. En comparant les résultats avec le contrôle sans ajout de NaCl, on remarque que le MS-DS index se positive dès l'ajout de NaCl à t0 et la suite de la cinétique est alors très hétérogène alternant entre des valeurs positives et négatives. Dans tous les cas, la valeur positive du MS-DS index à t0 signifie probablement qu'un phénomène d'osmolarité se produit lors de l'ajout du NaCl. D'autres essais ont ensuite été effectués avec notamment la lyse des cellules et avec l'ajout de soude à forte concentration. Pour tous ces cas, le relargage du tréhalose s'est révélé très important comme le montre les valeurs MS-DS index du Tableau IV.3.

Tableau IV.3. Valeurs moyennes de triplicats du MS-DS index obtenus suite à l'application de différents stress sur *C. albicans*.

Echantillon	MS-DS index (%)
t0 RPMI 40°C	110
t1h RPMI 40°C	140
t2h RPMI 40°C	105
t3h RPMI 40°C	78
t4h RPMI 40°C	200
RPMI 60°C	1000
Contrôle <i>Candida</i> PBS	120
t0 NaCl 0,5M	170
t1h NaCl 0,5M	200
t2h NaCl 0,5M	68
t3h NaCl 0,5M	63
t4h NaCl 0,5M	200
Lyse cellulaire billes + ultrasons	2000
Lyse cellulaire billes sans ultrasons	667
NaOH 1M	4000

Pour vérifier que le disaccharide retrouvé dans ces premières expériences *in vitro* était bien du tréhalose, des analyses GC-MS ont été réalisées sur chacun de ces échantillons. Le tréhalose a bien été retrouvé dans chacun d'entre eux et l'exemple de l'analyse issu du NaOH 1 M a été donné sur la Figure IV.6 ci-dessous.

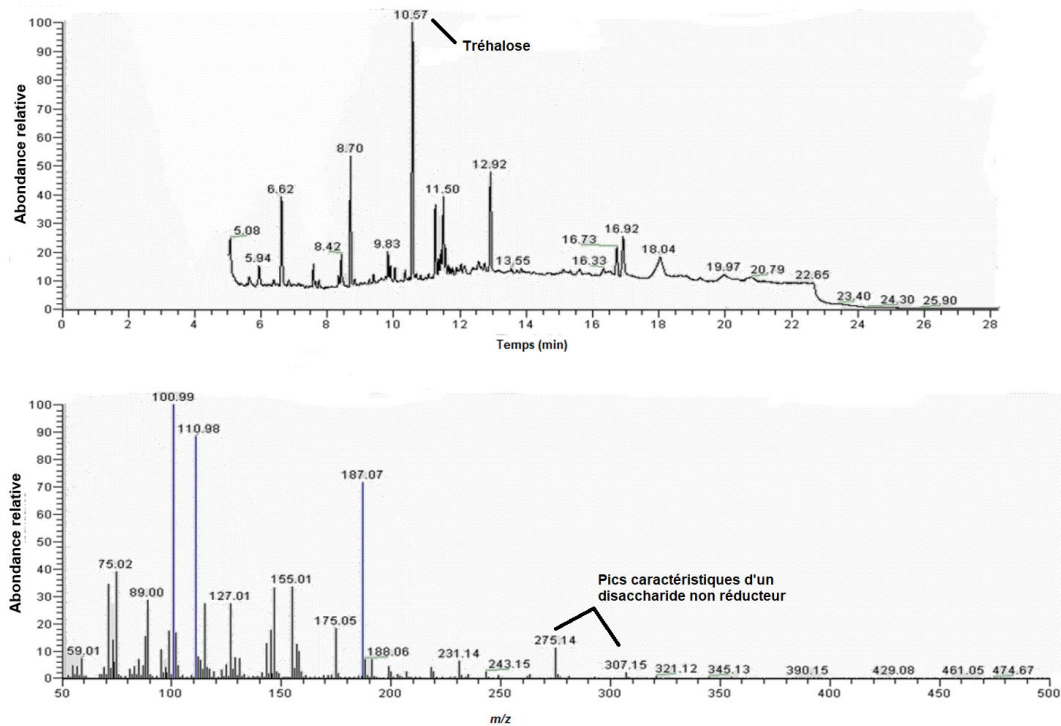


Figure IV.6. Analyse GC-MS de l'échantillon NaOH 1M avec le spectre MS/MS du signal à 10,57min issu du chromatogramme.

Les premiers essais s'étant montré concluants, un stress oxydatif à l'aide du H_2O_2 a par la suite été appliqué sur les cellules de *C. albicans* sous forme de cinétique comme précédemment. Deux concentrations ont ici été envisagées, à savoir 0,5 mM et 1 mM pour se rapprocher au plus près des conditions *in vivo* que pourraient rencontrer *C. albicans* lors de l'infection et plus particulièrement lorsque le système de protection des cellules est submergé par les ROS (induit par H_2O_2 dans le cas présent) ce qui entraîne un stress oxydatif comme nous l'avons évoqué dans la partie introductive. Les résultats de ces cinétiques ainsi que les courbes associées ont été représentés sur la Figure IV.7. Toutes les valeurs MS-DS index qui ont été reportées sont apparues positives en comparaison avec le contrôle réalisé sans H_2O_2 . Ces valeurs se sont cependant montrées plus élevées pour une concentration en H_2O_2 à 1 mM qu'à 0,5 mM. Toujours est-il que l'induction d'un stress oxydatif sur *C. albicans* a également entraîné un relargage important de tréhalose comme cela avait été constaté pour le stress thermique.

Echantillon	MS-DS index (%)
Contrôle PBS	90
t0 H2O2 0,5 mM	400
t1h H2O2 0,5 mM	750
t2h H2O2 0,5 mM	250
t3h H2O2 0,5 mM	120
t4h H2O2 0,5 mM	450
t0 H2O2 1 mM	700
t1h H2O2 1 mM	700
t2h H2O2 1 mM	700
t3h H2O2 1 mM	800
t4h H2O2 1 mM	1500

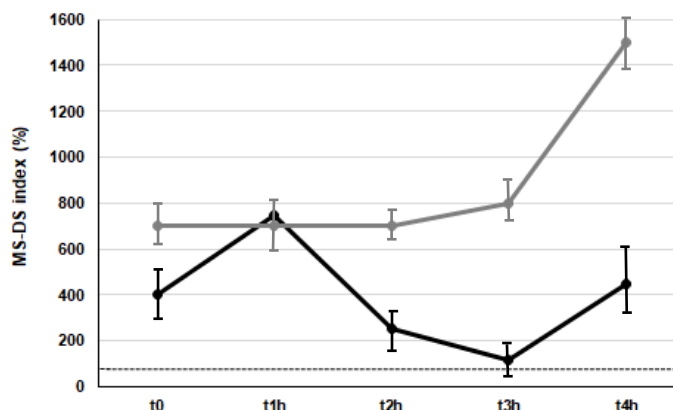


Figure IV.7. Résultats des analyses réalisées en triplicats sur *C. albicans* après induction d'un stress oxydatif au H₂O₂.

Sur le graphique, la courbe noire représente les valeurs de MS-DS index pour les expériences H₂O₂ à 0,5 mM et la courbe grise pour la concentration en H₂O₂ à 1 mM. Le seuil est également représenté en pointillé sur le graphique et correspond à la valeur du contrôle PBS sans H₂O₂ de 90 %.

La question qui s'est posée après avoir soumis *C. albicans* à ces différentes conditions de stress a été de savoir si le tréhalose relargué provenait du cytoplasme ou de la paroi du champignon. Pour répondre à cette question, deux nouvelles expériences ont été menées à l'aide de la zymolyase qui est une enzyme lytique permettant la digestion des parois cellulaires fongiques ainsi que le β-mercaptoéthanol. Ce dernier est un agent réducteur qui a été utilisé dans ce cas pour casser les ponts disulfures entre les résidus de mannose et les protéines de la paroi cellulaire de *C. albicans* et ainsi exposer la couche interne des glucanes. L'objectif était de visualiser par ces deux méthodes la présence ou non du tréhalose au sein de la paroi cellulaire. Les résultats de cette étude de localisation du tréhalose ont été reportés dans le Tableau IV.4 où différentes concentrations de chacun des deux réactifs ont été testées. On voit clairement qu'à la concentration de 100 μM en zymolyase, le MS-DS index est très élevé et pour le β-mercaptoéthanol, la concentration la plus basse à avoir été tentée (5 % v/v) est celle qui a donné la valeur de MS-DS index la plus importante. Ces échantillons ont ensuite été perméthylés puis analysés en GC-MS et du tréhalose a bien été identifié. Ces expériences ont donc mis en avant le relargage de tréhalose lorsque la paroi est fragilisée mais ne prouvent cependant pas encore si ce disaccharide relargué provient bien de la paroi. Ce dernier peut en effet être relargué du cytoplasme lorsque la paroi devient poreuse suite à l'ajout de zymolyase ou de β-mercaptoéthanol. Il conviendra donc par la suite de réaliser des tests d'intégrité de la paroi pour répondre avec certitude à la question de la localisation du tréhalose.

Tableau IV.4. Valeurs MS-DS index obtenus suite à l'utilisation de zymolyase et de β -mercaptoéthanol pour étudier le relargage du tréhalose par la paroi cellulaire de *C. albicans*.

Echantillon	MS-DS index (%)
Contrôle zymolase	52
Zymolyase 50 μ M	122
Zymolyase 100 μ M	700
Contrôle β -mercaptoéthanol	65
β -mercaptoéthanol 5 %	230
β -mercaptoéthanol 10 %	120
β -mercaptoéthanol 15 %	102

Suite à ces différents résultats obtenus sur la souche sauvage de *C. albicans*, les investigations ont été poursuivies sur deux souches mutantes. La première souche mutante est inactivée pour la protéine Tps1 qui est l'enzyme permettant le passage du glucose-6-P en tréhalose-6-P ($\Delta tps1$). La seconde est inactivée pour la protéine Tps2 qui est l'enzyme prenant le relais dans la biosynthèse du tréhalose en déphosphorylant le tréhalose-6-P ($\Delta tps2$). Ces souches nous ont été fournies par l'équipe du Pr. Martínez-Esparza Alvargonzález (Université de Murcia, Espagne).

III.2) Etude sur les souches mutantes $\Delta tps1$ et $\Delta tps2$ de *C. albicans*

Les mêmes conditions de stress ont été appliquées aux souches mutantes mais le nombre de cellules de départ était inférieur car la division de ces cellules est beaucoup plus lente que la souche sauvage. En effet, les souches mutantes ne peuvent être cultivées en milieu Sabouraud car elles ne peuvent pas utiliser le glucose comme source de carbone. Un milieu riche en galactose a de ce fait été privilégié ce qui s'est tout de même traduit par une croissance cellulaire plus lente. Finalement, 1.10^7 cellules de la souche WT et de deux souches mutantes ont été soumises aux différentes conditions de stress pendant 1 h sans cinétique avant détermination du MS-DS index. Les résultats qui en ont découlés sont présentés sous forme d'histogrammes sur la Figure IV.8.

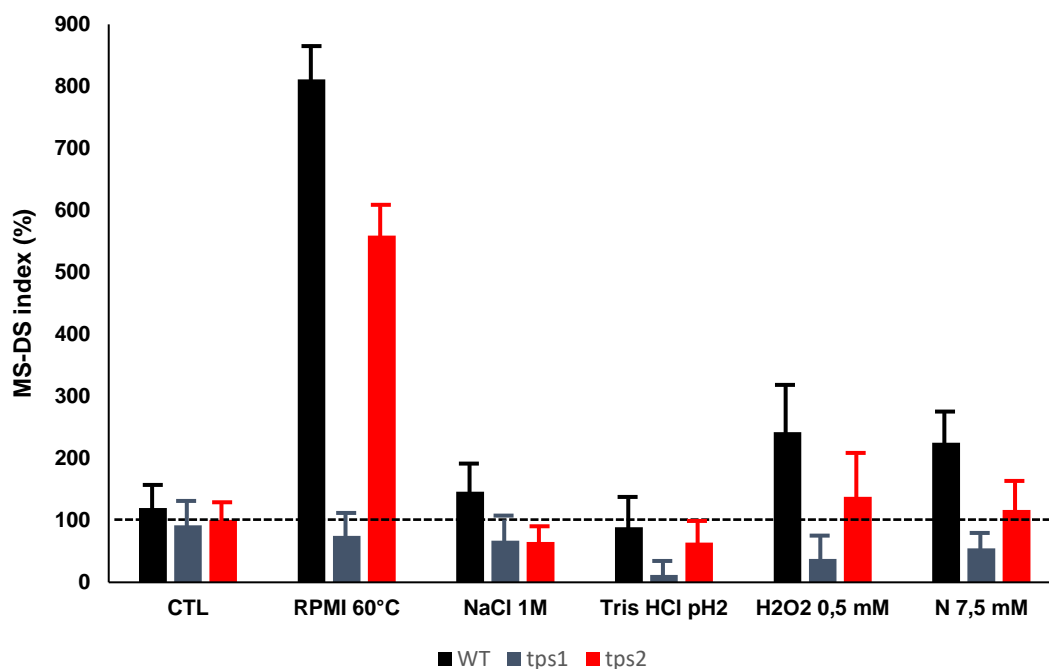


Figure IV.8. Histogrammes à barre représentant les valeurs moyennes de triplicats du MS-DS index des trois souches de *C. albicans* étudiées soumises à différentes conditions de stress. Le même protocole expérimental a été utilisé pour les trois souches avec un temps d'expérience de 1 h avant de réaliser la purification de l'échantillon par la méthode décrite pour le MS-DS index. En pointillés noirs est représenté le seuil de positivité en se basant sur les valeurs obtenues sur les échantillons contrôle.

De nouvelles conditions de stress ont été ajoutées pour cette étude sur les souches mutantes en plus de celles réalisées précédemment sur la souche sauvage. Ces ajouts ont concerné la variation du pH (dans un tampon Tris-HCl) et le stress nitrique. De plus, toutes les expériences ont été réalisées en triplicats.

Un cutoff a pu être établi pour le MS-DS index grâce aux valeurs des contrôles de chaque souche qui se sont avérés similaires et celui-ci a été fixé à 100 %. En se basant sur ce seuil, on s'aperçoit que les valeurs de MS-DS index les plus élevées concernent la souche WT qui sont d'ailleurs toujours comprises au-dessus du seuil fixé à l'exception de l'expérience au Tris-HCl pH2. A contrario, aucune valeur de MS-DS index n'est apparue positive pour la souche $\Delta tps1$. Enfin, la souche $\Delta tps2$ a montré qu'elle était capable de relarguer du tréhalose en conditions de stress thermique, nitrique et oxydatif mais toujours avec un MS-DS index plus faible que pour la souche WT.

On peut donc en conclure que les mutations $\Delta tps1$ et $\Delta tps2$ ont un effet sur la libération du tréhalose par *C. albicans* avec un effet accentué pour la souche $\Delta tps1$ qui ne semble pas être capable de produire du tréhalose lorsqu'un stress est induit. En revanche, la souche $\Delta tps2$ a montré qu'elle pouvait tout de même en synthétiser sous certaines conditions de stress mais de manière atténuée par comparaison avec la souche WT.

L'étude a ensuite été poursuivie par une cinétique après induction de stress oxydatif au H₂O₂ à 1 mM. Cette cinétique s'est faite sur 2 h au lieu des 4 h habituelles. L'objectif était de remettre en culture *C. albicans* au bout des 2 h de cinétique après élimination du H₂O₂ afin d'observer si le champignon était capable ou non de synthétiser à nouveau du tréhalose après exposition à ce stress oxydatif. Cette remise en culture s'est effectuée également pendant 2 h avant de relancer une nouvelle fois une cinétique de 2 h après ajout de H₂O₂ toujours à 1 mM. L'ensemble des résultats est représenté sur la Figure IV.9 qui suit sous forme de graphique mettant en avant l'évolution du MS-DS index entre les deux cinétiques. En observant tout d'abord le graphique de la première cinétique, on retrouve les mêmes tendances qui avaient été obtenues sur les précédentes analyses, à savoir un MS-DS index négatif pour la souche $\Delta tps1$ et un MS-DS index au-dessus du seuil (fixé à 90 % sur cette cinétique qui correspond à la valeur qui a été obtenue pour ces expériences sur l'échantillon contrôle sans H₂O₂) pour les deux autres souches avec un signal moins important pour $\Delta tps2$. Si l'on se place maintenant au niveau de la seconde cinétique après la remise en culture, on s'aperçoit qu'il n'y a pas eu de changement pour les deux souches mutantes mais en revanche, une augmentation significative du MS-DS index s'est produite pour la souche WT de *C. albicans*. Cette observation est très intéressante car elle a permis de montrer que la souche WT était capable de se 'recharger' en tréhalose lors de la remise en culture ce qui n'est pas le cas des deux souches mutantes inactivées pour la synthèse de l'une des enzymes de la biosynthèse du tréhalose. Cette étude n'a cependant été mise en œuvre qu'une seule fois pour le moment et devra donc être reproduite pour confirmer les résultats.

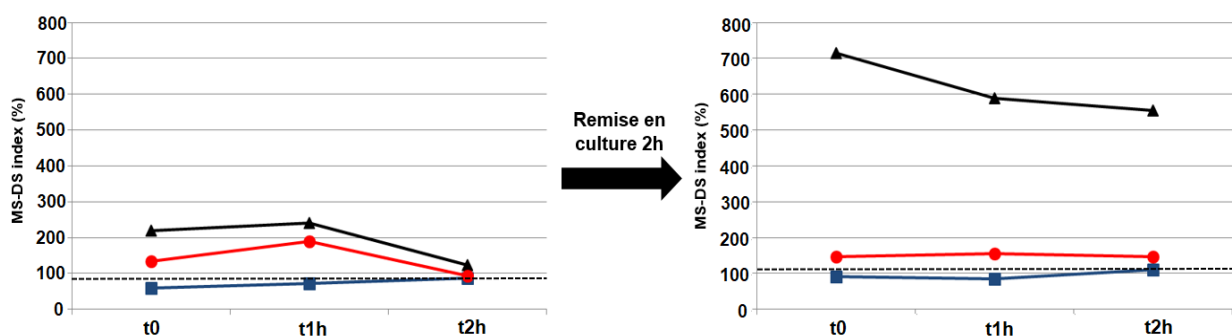


Figure IV.9. Graphiques montrant l'évolution du MS-DS index entre deux cinétiques après induction d'un stress oxydatif sur *C. albicans* pour les trois souches étudiées.

Les courbes représentées en noir correspondent aux résultats de la souche WT, celles en bleu sont corrélées à la souche $\Delta tps1$ et celles en rouge correspondent à la souche $\Delta tps2$.

Enfin, une dernière étape a consisté à étudier l'effet d'un antifongique sur le relargage de tréhalose par *C. albicans* pour les trois souches. La Caspofungine a été choisie car elle cible spécifiquement la paroi cellulaire de *Candida* en inhibant la synthèse des β -D-(1 \rightarrow 3)-glucanes et cet antifongique est largement utilisé dans le traitement des CI. L'investigation sur

la Caspofungine était ici importante dans le processus de compréhension des mécanismes de relargage du tréhalose et notamment pour faire un lien avec les sérums.

Les résultats sur la variation du MS-DS index au cours des cinétiques se sont avérés similaires à ceux observés précédemment, c'est-à-dire que le MS-DS index reste négatif tout au long de la cinétique pour la souche $\Delta tps1$ tandis que cet index est positif sur toute la cinétique pour les souches $\Delta tps2$ et WT avec des valeurs beaucoup plus importantes pour cette dernière (Figure IV.10). Les échantillons contrôle (c'est-à-dire sans Caspofungine) de chacune des souches ont également été effectués puis analysés afin de déterminer les seuils de positivité.

L'antifongique Caspofungine induit cependant donc bien un stress chez *C. albicans* puisque une quantité importante de tréhalose a été visualisée pour la souche WT.

Echantillon	MS-DS index (%)
Contrôle WT	140
Contrôle tps1	70
Contrôle tps2	70
t0 Caspofungine WT	286
t1h Caspofungine WT	1000
t2h Caspofungine WT	700
t3h Caspofungine WT	769
t4h Caspofungine WT	800
t0 Caspofungine tps1	63
t1h Caspofungine tps1	62
t2h Caspofungine tps1	40
t3h Caspofungine tps1	44
t4h Caspofungine tps1	67
t0 Caspofungine tps2	263
t1h Caspofungine tps2	333
t2h Caspofungine tps2	244
t3h Caspofungine tps2	192
t4h Caspofungine tps2	176

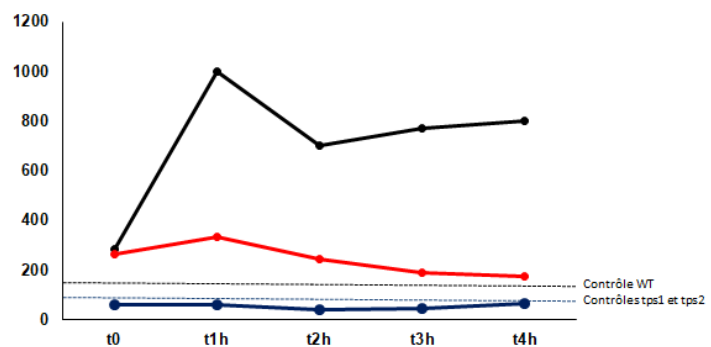


Figure IV.10. Etude de l'impact de la Caspofungine sur le relargage de tréhalose par *C. albicans* sur les trois souches étudiées via les analyses de variation du MS-DS index.

Les courbes représentées en noir correspondent aux résultats de la souche WT, celles en bleu sont corrélées à la souche $\Delta tps1$ et celles en rouge correspondent à la souche $\Delta tps2$. Les différents seuils de chacune des souches a également été reporté à partir des résultats sur les contrôles sans Caspofungine.

Finalement, sur toutes les conditions de stress qui ont été appliquées sur *C. albicans* cultivé *in vitro*, bon nombre d'entre elles se sont traduites par une libération de tréhalose pour la souche sauvage WT. Les études qui ont suivies sur les deux souches mutantes $\Delta tps1$ et $\Delta tps2$ ont révélées de nombreuses informations d'une part sur l'incapacité de la souche $\Delta tps1$ à produire du tréhalose en cas de stress et de l'autre une production de tréhalose amoindrie pour la souche $\Delta tps2$ malgré l'absence de la seconde enzyme tréhalose-6-phosphate phosphatase. Cette absence ne semble donc pas complètement inhiber la synthèse de

tréhalose comme nous avons pu le voir dans cette partie et on peut alors imaginer qu'une autre phosphatase est capable de prendre en partie le relais après action de Tps1.

Une dernière étape a de ce fait été réalisée pour clore ces études préliminaires et a consisté à introduire *C. albicans* directement dans des sérums et plasmas EFS et de suivre l'évolution du MS-DS index. Cependant, les résultats se sont avérés très hétérogènes pour ce suivi et ne seront donc pas présentés ici. Toutefois, il conviendra pour la suite de poursuivre ces expériences qui pourraient apporter des informations clés sur le relargage du tréhalose puisqu'il s'agit là du milieu d'intérêt.

Conclusion de la partie fondamentale et perspectives

Ce chapitre portant sur les aspects techniques et fondamentaux inhérents au développement du nouveau test diagnostique des CI a permis de mettre en avant trois points importants dans la compréhension des mécanismes sous-jacents à ce test :

1. Tout d'abord, les analyses pour la détermination du MS-DS index ont pu être améliorées grâce au passage des sérums purifiés sur un spectromètre de masse à très haute résolution de type MALDI-LTQ-Orbitrap. En effet, le signal à m/z 365 a été discriminé en deux sous-signaux dont l'un d'entre eux s'est avéré ubiquitaire car il ne correspondait pas à un signal disaccharidique. La déduction de ce signal ubiquitaire prédominant dans les échantillons contrôles a ainsi permis d'augmenter la sensibilité et donc la robustesse du test MS-DS index.
2. Ensuite, le disaccharide retrouvé dans le sérum de patients atteints de CI a été identifié comme étant du tréhalose grâce à des analyses GC-MS. Il a également été observé dans quelques rares sérums la présence de maltose qui n'a cependant pas été pris en considération dans les études suivantes. La présence de ce dernier n'est pour l'instant pas expliquée et nous ne savons pas encore si celui-ci provient d'une contamination ou d'un phénomène de compétition entre les deux disaccharides. Ce point devra être élucidé en effectuant une analyse structurale sur un plus grand nombre d'échantillons pour estimer la prévalence du maltose par rapport au tréhalose.
3. Une fois le disaccharide identifié, des études portant sur les mécanismes de relargage du tréhalose par *C. albicans* ont alors été menées. Ces études ont permis dans un premier temps de confirmer ce qui est décrit dans la littérature à propos de ce disaccharide, à savoir qu'il aurait un rôle de protection du champignon en cas de stress (thermique, oxydatif ou encore salin). Les différentes corrélations ont pu être faites en transposant la méthode du MS-DS index sur des expériences *in vitro* de la souche WT de *C. albicans*. Suite à l'obtention de ces résultats préliminaires, les investigations ont été poursuivies sur deux souches mutantes $\Delta tps1$ et $\Delta tps2$ et les données acquises sur celles-ci ont été confrontées aux valeurs obtenues sur la souche WT. Il en est ressorti que la souche délétée en l'enzyme tréhalose-6-phosphate synthase (Tps1) n'était pas capable de synthétiser du tréhalose lors d'une situation de stress. En revanche, la souche inactivée dans la synthèse de la tréhalose-6-phosphate phosphatase Tps2 était quant à elle en capacité d'en produire mais dans une moindre mesure.

L'ensemble des résultats exposés ouvrent plusieurs perspectives :

1. En premier lieu, l'augmentation des performances du MS-DS index grâce à l'Orbitrap permettra d'envisager sereinement un transfert de la méthode si les cliniques devaient

s'équiper dans le futur de spectromètres de masse à plus haute résolution. De plus, les analyses ont également été menées sur deux autres appareillages de type MALDI-TOF (MALDI-TOF Biflex III et Vitek MS) avec succès ce qui démontre également son adaptabilité sur une technologie similaire mais avec des systèmes différents.

2. De plus, l'identification du tréhalose comme étant le disaccharide très largement retrouvé dans les sérums de patients infectés a changé les perspectives d'étude qui se sont alors tournées vers une compréhension des mécanismes d'action mis en jeu par *Candida* pour cette synthèse et ce relargage de tréhalose qui est bien connu chez ce dernier. En effet, l'hypothèse de départ s'était orientée de prime abord vers du β -D-(1 \rightarrow 3)-glucane avant cette caractérisation provenant d'une dégradation du β -glucane pariétal. C'est d'ailleurs l'hypothèse d'une dégradation de la paroi de *Candida* qui nous a incité initialement à poursuivre de front l'analyse de la dégradation des parois de *Candida* et des mycobactéries. En apprenant que le disaccharide était en fin de compte du tréhalose, les études qui ont été menées se sont donc penchées vers des expériences liées au stress tout en gardant l'aspect associé à la paroi cellulaire. Les quelques sérums pour lesquels du maltose a été identifié mériteront également des investigations plus poussées en essayant notamment d'en apprendre davantage sur ce disaccharide encore mal caractérisé chez *C. albicans*.
3. Grâce à l'acquisition de deux souches mutantes $\Delta tps1$ et $\Delta tps2$ qui sont les deux enzymes de la biosynthèse du tréhalose, des comparaisons ont pu être effectuées avec la souche WT de *C. albicans* mais les expériences devront être poursuivies notamment en ce qui concerne l'introduction des trois souches dans le plasma et le sérum de sujets sains. Il conviendra également de consolider les expériences pour lesquels une seule cinétique a été effectuée notamment en ce qui concerne le stress oxydatif avec remise en culture ainsi que l'effet de la Caspofungine. Tous ces résultats feront ensuite l'objet d'une publication reprenant les analyses de caractérisation du tréhalose mais aussi l'étude fondamentale qui a suivie sur les trois souches WT, $\Delta tps1$ et $\Delta tps2$.
4. Pour poursuivre, il sera aussi intéressant d'étudier ces enzymes Tps1 et Tps2 dans le but d'élaborer de nouveaux inhibiteurs qui bloqueront la synthèse du tréhalose. Ainsi, *C. albicans* ne sera plus en capacité de se protéger face à la défense immunitaire mis en place par l'hôte et ne pourra donc pas survivre dans cet environnement hostile. Si cet aspect sort du contexte diagnostic, il n'en reste pas moins très intéressant au vu des résultats obtenus tout au long de ce projet qui ont ouvert la voie à un nouveau versant orienté vers la conception de médicament (*Drug design*).
Pour le moment, un projet est en cours de montage dans lequel Tps2 serait plutôt privilégiée pour ces études en jouant sur l'accumulation de T6P lorsque cette enzyme

est inactivée. Il s'agira notamment de vérifier en premier lieu la drugabilité de Tps2 comme cible thérapeutique grâce à des expériences de *knock-down* puis d'observer à partir de quel pourcentage d'atténuation un effet biologique délétère sur *C. albicans* se produit.

Ensuite, des expériences de modélisation d'interactions (docking) entre Tps2 et glycannes seront réalisées par un criblage virtuel *in silico* à haut débit d'une librairie de fragment afin de concevoir des composés très spécifiques de l'enzyme. Un test biologique sera alors mis au point d'une part pour évaluer le ciblage spécifique de Tps2 ainsi que la survie *in vitro* de *Candida* en présence des fragments identifiés. Les résultats obtenus *in silico* et *in vitro* seront enfin rapprochés afin de concevoir des molécules capables d'inhiber l'activité de Tps2.

Matériels et méthodes

I) Culture de *Candida albicans*

Les cultures de *C. albicans* WT sont réalisées dans des tubes à centrifuger de 50 mL sur une nuit à partir d'une à deux colonies et dans 20 mL de milieu Sabouraud liquide. Ce milieu est préparé en mélangeant 5 g d'hydrolysate tryptique de caséine, 5 g de peptone peptique de viande et 20 g de glucose dans un volume total de 1 L d'eau distillée. Le pH est ensuite ajusté à 5,7 et le milieu est autoclavé à 120 °C pendant 15 min. En fin de culture, une centrifugation est effectuée à 2500 tr.min⁻¹ (rotor Beckman JA-20) pendant 5 min et le culot est repris dans 10 à 15 mL de tampon PBS 1 X (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄ et 1,76 mM KH₂PO₄ à pH 7,4) à partir d'une solution de PBS 10 X (Euromedex, Souffelweyersheim, France). Une seconde centrifugation dans les mêmes conditions est alors de nouveau réalisée et le culot est de nouveau repris dans du tampon PBS 1 X frais. Les cellules sont ensuite comptées par microscopie sur lame quadrillée et la culture est aliquotée par volume de 1 mL dans des tubes de 1,5 mL de manière à se retrouver avec 10⁸ cellules/mL dans chaque tube. Enfin, une dernière centrifugation à 2500 tr.min⁻¹ (rotor Eppendorf A-4-44) pendant 5 min permet de se débarrasser du surnageant.

Pour les cultures de *C. albicans* $\Delta tps1$ et $\Delta tps2$, les mêmes cultures sont réalisées mais en milieu galactose. Le comptage cellulaire se fait de la même manière que pour les souches WT mais en se retrouvant au final à 10⁷ cellules/mL dans chacun des tubes eppendorf.

II) Expériences *in vitro* d'application de stress sur *C. albicans*

II.1) Expériences sans cinétique

Le culot de *C. albicans* est repris dans 500 μ L d'un des solvants ou milieux utilisés dans le cadre de ces expériences (NaOH 1M, RPMI...). Les échantillons sont ensuite incubés à 37 °C ou à plus haute température en cas d'application d'un stress thermique. Au bout d'une heure, les échantillons sont centrifugés à 2500 tr.min⁻¹ pendant 5 min (rotor Eppendorf A-4-44) et le surnageant est utilisé pour purification sur colonne à double phase et analyse par spectrométrie de masse MALDI TOF/TOF selon le protocole du MS-DS index.

II.2) Cinétiques

Pour les cinétiques, le culot de *C. albicans* est repris dans 1 mL de milieu RPMI, de plasma ou de sérum. La cinétique est menée à 37 °C pendant 4 à 6 h avec prélèvement de 200 μ L toutes les heures ainsi qu'à t₀ avant de démarrer l'incubation. Le prélèvement est centrifugé à 2500 tr.min⁻¹ pendant 5 min (rotor Eppendorf A-4-44) et le surnageant est utilisé pour purification sur colonne à double phase et analyse par spectrométrie de masse MALDI TOF/TOF selon le protocole du MS-DS index. Pour les expériences avec du plasma ou du sérum, le prétraitement à la chaleur et à l'EDTA doit en plus être réalisé.

III) Méthodes analytiques

III.1) Spectrométrie de masse (MS)

Pour la spectrométrie de masse MALDI TOF/TOF, se reporter aux matériels et méthodes des différents articles. En ce qui concerne l'Orbitrap, les analyses sont menées sur un appareillage MALDI-LTQ-Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) selon les mêmes conditions de dépôt sur plaque MALDI que pour le TOF/TOF. Les spectres de masse sont quant à eux retraités par le logiciel Xcalibur™ de Thermo Fisher Scientific.

III.2) Analyses en chromatographie phase gazeuse (GC) et couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS)

Les échantillons sont dans un premier temps perméthylés selon la méthode de Ciucanu et Kerek parue en 1984 [213] avant leur analyse en GC et GC-MS. Brièvement, les échantillons sont repris par un mélange DMSO/NaOH/ICH₃ après leur lyophilisation puis incubés pendant 2 h au bain à ultrasons. La réaction est arrêtée par l'ajout d'eau et les composés perméthylés sont extraits par le CHCl₃ et lavés 7 fois avec de l'eau. Les échantillons perméthylés sont enfin solubilisés dans l'acétonitrile.

Les sérums purifiés sont d'abord injectés en GC-FID (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) sur colonne SOLGEL-1MS de 30 m x 0,25 mm (SGE Analytical Science, Melbourne, Australie) via un injecteur de Ross à 280 °C afin d'optimiser la concentration de l'échantillon avant l'analyse en GC-MS. La détection est réalisée par un détecteur à ionisation de flamme (FID pour *Flame Ionization Detector*).

Pour les analyses en GC-MS, le même type de chromatographe a été utilisé et selon les mêmes conditions chromatographiques. La colonne est ici couplée à un spectromètre de masse Finnigan Automass II (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) avec une limite de masse à m/z 1000. Les analyses de masse sont réalisés en mode Impact Électronique (EI) (énergie d'ionisation 70 eV ; température de la source : 150 °C).

ANNEXE 1 :

Article princeps au MS-DS index

Preliminary evidence for a serum disaccharide signature of invasive *Candida albicans* infection detected by MALDI Mass Spectrometry

B. Sendid^{1,2,3}, J. Poissy^{1,3,4}, N. François^{2,3}, A. Mery⁵, S. Courtecuisse^{6,7}, F. Krzewinski^{6,7,8}, S. Jawhara^{1,3}, Y. Guerardel^{6,7,10} and D. Poulain^{1,2,3,9,10}

1) Université de Lille, 2) Service de Parasitologie-Mycologie, CHRU, 3) INSERM 995, 4) Pôle de Réanimation CHRU, 5) SATT Nord-de-France, Lille, 6) Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, Université de Lille, 7) CNRS, UMR 8576, 8) PAGés, CNRS FR3637, Université Lille I, Villeneuve d'Ascq, and 9) Délégation à la Recherche Clinique et à l'Innovation, CHRU, Lille, France

Abstract

The diagnosis of systemic *Candida* infections is a recognized challenge. We developed a mass spectrometry strategy to detect signals from *Candida* molecules in patients' sera. Pre-analytical procedures were designed to extract oligosaccharides from serum. A peak *m/z* of at 365 was specifically revealed in sera from patients with candidaemia with regard to healthy controls. This biomarker was identified as a disaccharide, its presence did not correlate with mannanaemia or glucanaemia. Mouse models of *Candida albicans* colonization and infection showed that the signal was specifically associated with tissue invasion, suggesting that clinical evaluation of its usefulness in discriminating colonized and infected patients would be worthwhile.

Clinical Microbiology and Infection © 2014 European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: *Candida albicans*, diagnosis, disaccharide, invasive fungal infections, mass spectrometry, matrix-assisted laser desorption/ionization time-of flight

Original Submission: 23 May 2014; **Revised Submission:** 11 August 2014; **Accepted:** 17 August 2014

Editor: E. Roilides

Article published online: 12 October 2014

Corresponding author: D. Poulain, Service de Parasitologie-Mycologie, Délégation à la Recherche Clinique et à l'Innovation, CHRU, Lille, France

E-mail: dpoulain@univ-lille2.fr

¹⁰These authors contributed equally.

Introduction

Despite considerable progress in antifungal therapy, the morbidity and mortality of invasive candidiasis remain high, particularly in the intensive care unit [1]. This is due to the difficulties in diagnosis of these infections, which needs to be early for a favourable outcome. In contrast to bacterial infections, blood cultures dramatically lack sensitivity (50%) [2]. Facing this problem, methods for the detection of fungal molecules circulating in the sera of infected patients have been developed, some of which are now recommended by infectious disease societies as diagnostic alternatives or adjuncts [3]. These tests detect *Candida* cell wall glycans (i.e. polysaccharides and polysaccharide moieties of glycoproteins and glycolipids), comprising mannans and glucans, by application of immunocapture and biochemical methods, respectively [4]. We present here a preliminary description of an innovative physicochemical approach developed for detecting circulating fungal glycans among the complex serum environment by using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS).

Patients and methods

Sera from patients with *Candida* infection and controls

Sera were selected from the clinical mycology laboratory database from patients with candidaemia and for whom sera around the time of the infection were available. Sera were selected primarily from patients infected with *Candida albicans* (11 patients, 15 sera), but also from patients with candidaemia episodes due to *Candida glabrata* (*n* = 2), *Candida parapsilosis* (*n* = 3), *Candida tropicalis* (*n* = 2), *Candida krusei*, *Candida dubliniensis* and *Candida lusitanae* (*n* = 1) to cover the spectrum of the most frequent blood isolates. Altogether, 25 sera were selected from 21 patients (7 females and 14 males; median age 55 years, range: 30–75 years) hospitalized on the intensive care unit (*n* = 18), on a geriatric ward (*n* = 1) or on a haematology unit (*n* = 2). Sera were drawn between 2 weeks before and 2 weeks after the isolation of *Candida* species in blood culture (median delay of sampling: 4 days after positive blood culture). The clinical charts of these patients were then reviewed to confirm that they were suffering from invasive candidiasis. The presence of circulating glucans and mannans was also determined.

Control sera consisted of 21 sera from healthy blood donors (Etablissement Français du Sang, Lille, France).

Ethics statement

All the sera used in this study were sampled from patients followed in Lille University Hospital. No additional sampling was necessary. As sera were taken from a registered biological collection, according to French law, patients consent was not required. An institutional review board approval was given by the 'Comité de Protection des Personnes Nord-Ouest IV'.

Animal models

Six-week-old to 8-week-old female C57BL/6 mice were maintained by Charles River Laboratories (L'Arbresle, France). Experiments were approved by the Subcommittee on Research Animal Care of the Regional Hospital Centre of Lille, France, and in accordance with the European guidelines (86/609/CEE).

To induce colonization, ten mice were given 1.5% dextran sulphate sodium (DSS; MW 36–50 kDa; MP Biomedicals, Eschwege, Germany) in drinking water from day 1 to day 14 to induce intestinal inflammation, and inoculated on the same day by oral gavage with 200 μ L of phosphate-buffered saline containing 10^7 *C. albicans* SC5314 strain [5,6].

To induce systemic candidiasis, ten mice were injected with 10^4 yeasts from the same strain in 0.1 mL sterile saline via the tail vein. Mice were monitored daily for 14 days and killed by cervical dislocation. Blood was collected by cardiac puncture.

A total of 60 mice were divided into two experimental groups and each experiment is composed of infected mouse with *C. albicans* (10 mice/cage), mice receiving DSS alone (10 mice/cage), and DSS+ *C. albicans* (10 mice/cage).

Controls for colonization/infection were made by fluorescence staining of *C. albicans* on colon and kidney paraffin sections by using the anti-*C. albicans* monoclonal antibody 5B2 [5]. The sections, counterstained with Evans blue and DAPI, were examined with immunofluorescence and confocal microscopy (Leica Microsystems AG; Zeiss LSM710, diode 561 nm DPSS, respectively).

Measurement of mannan and glucan polysaccharides in clinical samples

Serum β -1,3-glucan was measured using a Fungitell[®] kit (Associates of Cape Cod Inc., Falmouth, MA, USA) and measurement of serum mannan was performed using the Platelia Candida[®] Ag+ test (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France) according to the manufacturers' instructions. The cut-off values of serum β -1,3-glucan and mannan were 80 pg/mL and 125 pg/mL, respectively.

Pre-analytical procedures

Sera were treated as described previously [7]. Briefly, 300 μ L of serum and 100 μ L of Na₂-EDTA were added in Eppendorf tubes, vortexed vigorously and heated at 120°C for 6 min. Samples were centrifuged at 10000 g for 10 min and the supernatants were collected. Soluble oligosaccharides were then enriched

from supernatant by affinity and reverse-phase chromatography; 100 μ L of supernatant was applied to a homemade mixed-bed chromatography column made by packing 60 μ L of activated charcoal-celite (50 : 50 by weight) in a 1.5-mL reservoir cartridge fitted with a 5-mm polyethylene frit, and then 60 μ L of RP medium (Septra ZT 30 μ m, 85 A; Phenomenex, Torrance, CA, USA). The column was conditioned by washing with ethanol/water 20 : 80 (volume/volume) and equilibrating with water. After loading the sample, the column was washed with 4 mL of water and the oligosaccharide fraction was eluted with 600 μ L of 5% ethanol. The solution was dried down under vacuum and resuspended in 40 μ L water.

Detection by mALDI-TOF MS

An ionic liquid matrix (2,5-dihydrobenzoic acid-pyridine (DHB-Py)) was chosen over a classic DHB matrix for better homogeneity, which is a crucial factor for reproducibility in quantitative analyses. This ionic liquid matrix was prepared by adding 4 μ L of pyridine to 1 mL of acetonitrile/water/trifluoroacetic acid (50 : 50 : 0.1, by volume) solution with 7.7 mg of DHB, which yielded a 1 : 1 molar ratio of pyridine : DHB. One microlitre of purified serum was then spotted onto the MALDI plate followed by 1 μ L of DHB-Py preparation. The sample spots were dried by heating at 50°C for 2 min.

Analysis was performed using an AB (Applied Biosystems/MDS Sciex, Concord, ON, Canada) 4800 MALDI-TOF/TOF analyser at fixed laser intensity for 1000 shots/spectrum. In total, 3000 shots were accumulated in reflectron positive ion mode MS for each sample. Signals were registered between *m/z* 300 and 800.

Statistical analysis

Mann–Whitney two-tailed tests were used to compare the distribution of 365/361 ratios between patients with candidaemia and healthy subjects.

Results

Enrichment of oligosaccharides and identification of an oligosaccharide marker

The development steps of the research comprised a pre-analytical process to purify serum oligosaccharides by heat treatment initially described for releasing fungal glycans from complexes with serum compounds and eliminate interference in their biochemical detection [7]. The clear supernatant still contains heat-stable glycans but is devoid of the vast majority of proteins and lipids, which are trapped in the coagulum. Omission of heat treatment prevented the detection of any oligosaccharide in the samples. A two-phase chromatography process enriched the oligosaccharide fraction to increase the

signal to noise ratio. Residual proteins and lipids were first removed by reverse-phase solid-phase extraction whereas free glucose and salts were removed by affinity solid-phase extraction on activated charcoal. Oligosaccharides were eluted and dried under vacuum. Samples were analysed in reflectron mode using MS parameters previously established for the analysis of purified *C. albicans* cell-wall-derived oligoglucosides [6]. MALDI-TOF spectra of sera from healthy controls and patients with candidaemia revealed the presence of a prominent signal at m/z 365 observed in all patients' sera (Fig. 1a) that was absent or present at a much reduced intensity in control sera (Fig. 1b). This signal was tentatively attributed to an $[M+Na]^+$ adduct of Hex disaccharide. In order to confirm the disaccharide nature of the signal observed at m/z 365, treated samples were permethylated by the NaOH/ICH₃ slurry method [8] and extracted by chloroform/water partitioning. MALDI-TOF spectra of permethylated sera showed a candidiasis patient-specific signal at 477 m/z (Fig. 2) corresponding to the $[M+Na]^+$ adduct of permethylated Hex₂ disaccharide, which confirmed the previous attribution of signal at 365 m/z as Hex₂. Altogether, purification steps and structural analysis established the presence of Hex disaccharide, in sera from patients with candidaemia.

Potential clinical value

The 25 sera from 21 patients with candidaemia and 21 control sera were analysed following the established protocol.

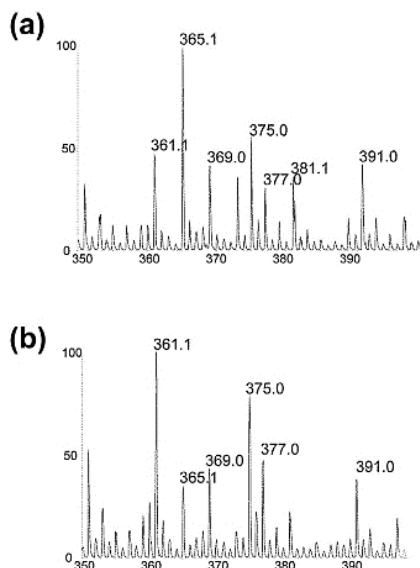


FIG. 1. (a, b) Representative example of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectra containing the m/z 365 signal in purified sera from patients with candidaemia (a) in comparison with healthy subjects (b). (c) Comparison of the distribution of the 365/361 ratio determined by MALDI-TOF in 25 sera from 21 patients with candidaemia and 21 healthy controls. The values are the mean of three independent experiments.

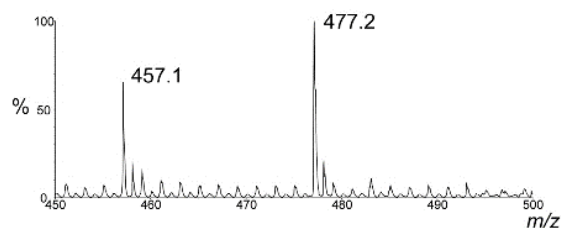
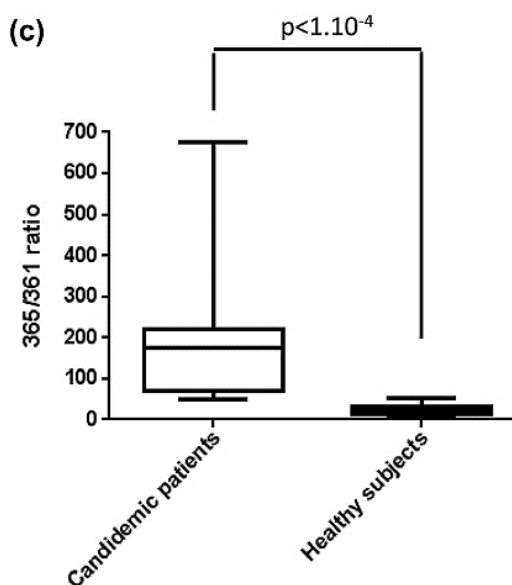


FIG. 2. Structural analysis of the disaccharide from a patient with candidaemia. Disaccharide-containing purified serum was permethylated as described by Ciucanu and Kerek (*Carbohydrate Res* 1984;131:209–17) and analysed by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry (MS). MALDI-TOF spectrum of permethylated serum shows a signal at m/z 477 corresponding to $[M+Na]^+$ of permethylated Hex₂.

Consideration of spectra revealed an m/z 361 peak originating from the matrix (Fig. 1a, b) and attempts to use the 365/361 ratio gave highly reproducible results in differentiating patients and controls. The distribution of these values, is shown in Fig. 1(c); 365/361 median (interquartile range; 25–75) values of 174 (71–206) and 23 (17–30) were calculated for the patients and controls, respectively ($p < 0.0001$). The 365/361 ratio did not correlate with glucan nor mannan contents of sera (Fig. 3a, b, respectively).



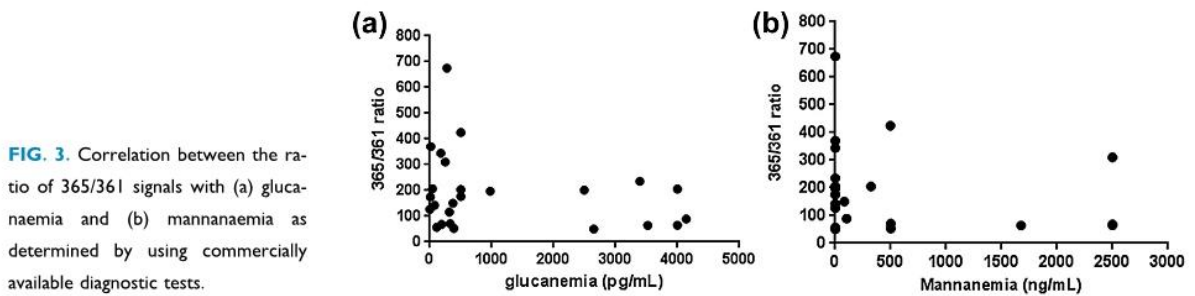


FIG. 3. Correlation between the ratio of 365/361 signals with (a) glucanemia and (b) mannaemia as determined by using commercially available diagnostic tests.

Confirmation of results in mice

Because human invasive candidiasis is a disease that evolves quickly over time, from colonization to invasion, we designed an *in vivo* animal model to confirm the specificity of the signal

for invasion. We chose mice because they can either be heavily colonized or infected intravenously. Ten BALB/c mice were colonized by *C. albicans* by using the DSS model. Ten more mice were injected intravenously with the same *C. albicans* strain.

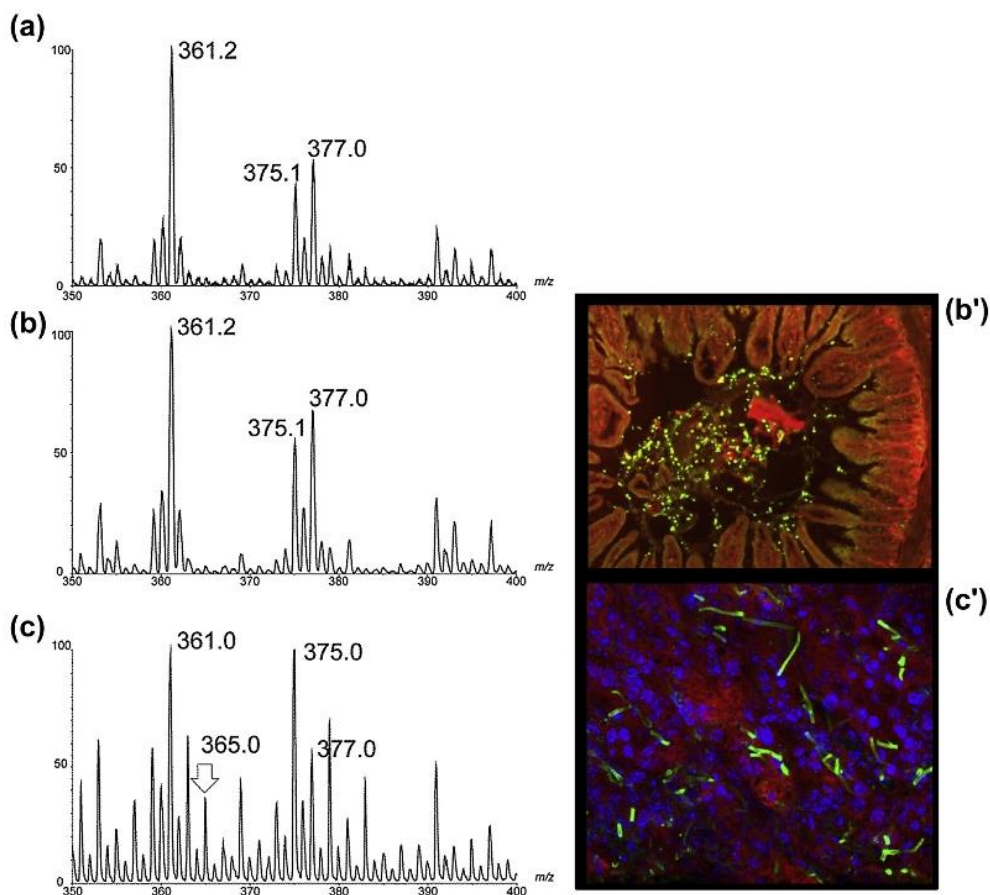


FIG. 4. (a) Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) spectra of sera from mice after application of the enrichment/purification procedure. (a) Pooled control sera from BALB/c mice treated with dextran sulphate sodium (DSS) alone; (b) pooled sera from BALB/c mice treated with DSS and colonized with *Candida albicans* following oral administration and killed on day 14; (c) pooled sera from BALB/c mice infected by intravenous injection of *C. albicans* and killed on day 14. The arrow indicates the signal at *m/z* 365 observed specifically after systemic infection. (b', c') Immunofluorescent labelling of *C. albicans* in the corresponding experiments (b') colonization of mouse gut; and (c') invasion of mouse kidneys electively leading to the observation of *m/z* 365 signal. Scale bar 10 μm.

Immunohistological examination confirmed the presence of large amounts of *C. albicans* yeasts in the gut of colonized mice (Fig. 4b') and the absence of organ invasion, whereas infected animals displayed *C. albicans* yeasts and hyphae invading organs (Fig. 4c'). The two corresponding serum pools (Fig. 4b,c) and a control pool from uninfected mice (Fig. 4a) were subjected to the same extraction/purification procedure and MS analysis as the human sera. The *m/z* 365 signal was only observed in sera from mice that developed a *C. albicans* systemic infection.

Discussion

Invasive candidiasis is associated with high morbidity and is a frequent cause of mortality among hospitalized patients who receive intensive management. A combination of risk factors, well known by clinicians [9], results in a transient disruption of homeostasis leading to proliferation of *C. albicans* in the intestine and dissemination [10]. Unfortunately, blood cultures are only positive in 50% of patients with invasive candidiasis [2]. As early diagnosis is essential to reduce mortality, infectious disease societies recommend the use of non-culture-based methods to complement blood culture and assist in therapeutic decisions. Among these surrogate markers, *Candida* cell wall polysaccharides can be measured in sera from patients with invasive candidiasis. These consist of mannan, non-covalently associated to the cell wall outer layers, and β -D,1-3-glucan making up the fibrils in the cell wall middle layers [11]. These glycans can be detected using immunological and biochemical tests, respectively. Both methods now detect molecules in the range of pg/mL with high reliability [4] and may be complementary [12].

Our aim was to seek new biomarkers with a physicochemical approach. The pre-analytical treatment led to purification/concentration of soluble fungal oligosaccharides [6,7] with a dramatic reduction in signals originating from serum. The spectrum analysis revealed a specific signal at *m/z* 365 in sera from patients with candidaemia which was quantified with regard to a signal at *m/z* 361 corresponding to a matrix peak used as a reference. Permethylation of patients confirmed its disaccharide nature. Hence, beside proteins and polysaccharides, our study shows for the first time that Hex₂ disaccharides are among the fungal molecules circulating during human invasive candidiasis. Confirmation of this circulation was gained by experimental models. Comparison of mouse colonization and systemic infection in a blind analysis provided evidence for the specific association of the *m/z* 365 signal with systemic *Candida* infection [9].

From the clinical point of view, this preliminary finding is of interest for clinical context where discrimination between gut colonization and infection is not clear-cut. The presence of Hex₂ is

not correlated with those of mannans and glucans and may open new doors to IC diagnosis and patient management. Its clinical value remains to be established through large prospective studies.

From a technical point of view, MALDI MS is now part of daily practice in clinical microbiology laboratories. Its applications range from microbe identification to the determination of sensitivity to antifungal drugs [13]. However, up to now no application has concerned the detection of microbe-derived molecules in sera for diagnostic purposes. The method does not involve enzymes or antibodies, is rapid, simple, cheap and adapted to the survey of large numbers of patients' sera.

From a basic point of view, there is still progress to be made in the detection and characterization of glycans synthesized by fungi that could circulate in human sera and have immunological roles [14]. The goals of identifying these molecular species are theoretically accessible to the method described.

Transparency Declaration

Competing interests: All authors report no potential conflicts of interest.

Acknowledgements

The research leading to these results has received funding from the European Community's Seventh Framework Programme (FP7-2007-2013) under HEALTH-F2-2010-260338-ALLFUN. This work was also supported by the Programme Hospitalier de Recherche Clinique du Ministère des Affaires Sociales, de la Santé et de la Ville PHRC 1918, 2011 « Candigène ». We thank Val Hopwood, val@langmed.co.uk, for writing assistance.

References

- [1] Mean M, Marchetti O, Calandra T. Bench-to-bedside review: *Candida* infections in the intensive care unit. *Crit Care* 2008;12:204.
- [2] Clancy CJ, Nguyen MH. Finding the "missing 50%" of invasive candidiasis: how nonculture diagnostics will improve understanding of disease spectrum and transform patient care. *Clin Infect Dis* 2013;56:1284–92.
- [3] Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, Benjamin Jr DK, Calandra TF, Edwards Jr JE, et al. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2009;48:503–35.
- [4] Marchetti O, Lamothe F, Mikulska M, Viscoli C, Verweij P, Bretagne S, European Conference on Infections in Leukemia (ECIL) Laboratory Working Groups. ECIL recommendations for the use of biological markers for the diagnosis of invasive fungal diseases in leukemic patients and hematopoietic SCT recipients. *Bone Marrow Transpl* 2012;47:846–54.

- [5] Jawhara S, Thuru X, Standaert-Vitse A, Jouault T, Mordon S, Sendid B, et al. Colonization of mice by *Candida albicans* is promoted by chemically induced colitis and augments inflammatory responses through galectin-3. *J Infect Dis* 2008;197:972–80.
- [6] Jawhara S, Habib K, Maggioro F, Pignede G, Vandekerckove P, Maes E, et al. Modulation of intestinal inflammation by yeasts and cell wall extracts: strain dependence and unexpected anti-inflammatory role of glucan fractions. *PLoS one* 2012;7:e40648.
- [7] Sendid B, Francois N, Decool V, Poissy J, Poulain D. Strategy for overcoming serum interferences in detection of serum (1,3)- β -D-glucans. *J Clin Microbiol* 2013;51:375–6.
- [8] Ciucano I, Kerek F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydrate Res* 1984;131:209–17.
- [9] Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* 2007;20:133–63.
- [10] Voss A, Hollis RJ, Pfaller MA, Wenzel RP, Doebbeling BN. Investigation of the sequence of colonization and candidemia in nonneutropenic patients. *J Clin Microbiol* 1994;32:975–80.
- [11] Latge JP. The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Mol Microbiol* 2007;66:279–90.
- [12] Held J, Kohlberger I, Rappold E, Busse Grawitz A, Hacker G. Comparison of (1-3)- β -D-glucan, mannan/anti-mannan antibodies, and Cand-Tec *Candida* antigen as serum biomarkers for candidemia. *J Clin Microbiol* 2013;51:1158–64.
- [13] Posteraro B, De Carolis E, Vella A, Sanguinetti M. MALDI-TOF mass spectrometry in the clinical mycology laboratory: identification of fungi and beyond. *Expert Rev Proteomics* 2013;10:151–64.
- [14] Netea MG, Brown GD, Kullberg BJ, Gow NA. An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *Nat Rev Microbiol* 2008;6:67–78.

ANNEXE 2 :

**Article clinique multicentrique du
MS-DS index**

1 **Evaluation of mass spectrometry detection of pan-fungal serum disaccharide (MS-DS)**
2 **for the diagnosis of invasive fungal infections: results from a collaborative study**
3 **involving six European clinical centres**

4
5 Marjorie Cornu ^a, Boualem Sendid ^{a§}, Alexandre Mery ^b, Nadine François ^a, Mikulska
6 Malgorzata ^c, Valérie Letscher-Bru ^d, Elena De Carolis ^e, Lauro Damonti ^f, Marie Titecat ^g,
7 Pierre-Yves Bochud ^f, Alexandre Alanio ^h, Maurizio Sanguinetti ^c, Claudio Viscoli ^c, Raoul
8 Herbrecht ^{i*}, Yann Guerardel ^{b*}, Daniel Poulain ^{a§}

9
10 ^a Laboratoire de Parasitologie Mycologie, CHU Lille, Univ. Lille, Inserm U995 – LIRIC -
11 Lille Inflammation Research International Centre, F-59000 Lille, France

12 ^b Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle UMR CNRS Université de Lille 1,
13 Villeneuve d'Ascq, France

14 ^c Division of Infectious Disease, Ospedale Policlinico San Martino, University of Genova,
15 Department of Health Sciences, Genova, Italy

16 ^d Institut de Parasitologie et de Pathologie Tropicale-Université de Strasbourg, Laboratoire de
17 Mycologie Médicale, CHU de Strasbourg, France

18 ^e Department of Laboratory Sciences and Infectious Diseases, Fondazione Policlinico
19 Universitario A. Gemelli IRCCS, Rome, Italy

20 ^f Service des Maladies Infectieuses, Centre Hospitalier Universitaire Vaudois, Lausanne,
21 Switzerland

22 ^g Laboratoire de Bactériologie, CHU Lille, Univ. Lille, Inserm U995 – LIRIC - Lille
23 Inflammation Research International Centre, F-59000 Lille, France

24 ^h Institut Pasteur, Molecular Mycology Unit, Département de Mycologie, CNRS UMR2000,
25 Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Hôpital Saint-Louis, Groupe Hospitalier

26 Lariboisière, Saint-Louis, Fernand Widal, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP),
27 Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

28 ⁱ Oncologie et Hématologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg et Université de
29 Strasbourg, Inserm, UMR-S1113 / IRFAC, Strasbourg, France

30 * These authors contributed equally to this work

31

32 **Keywords:** invasive fungal infection; invasive aspergillosis; invasive candidiasis;
33 mucormycosis; mass spectrometry; serological diagnosis

34

35 **Running title:** Pan-fungal disaccharide detection for IFI diagnosis

36

37 [§]**Corresponding authors:**

38 Daniel Poulain. E-mail: daniel.poulain@univ-lille.fr

39 Boualem Sendid. E-mail: boualem.sendid@univ-lille.fr

40 Tel: +(33)3 20 44 54 80; Fax: +(33)3 20 44 48 95

41 **Abstract (243 words)**

42 **Background** A mass spectrometry (MS) method that detects a serum disaccharide (MS-DS)
43 was recently described for the diagnosis of invasive fungal infections (IFI). We carried out a
44 European collaborative study to evaluate this assay.

45 **Methods** Patients with IFI were selected according to the availability of sera obtained around
46 the time that IFI was documented: invasive candidiasis (IC; n=26 patients), invasive
47 aspergillosis (IA; n=19), mucormycosis (MM; n=23). Control sera originated from 20
48 neutropenic patients and 20 patients with bacteraemia. MS-DS was carried out blind to IFI
49 diagnosis. Diagnosis of IC and IA was confirmed by detection of (1,3)- β -D-glucan (BDG),
50 mannan (Man) and galactomannan (GM), respectively. MM was detected by q-PCR.

51 **Results** All tests discriminated IC sera from controls with bacteraemia ($P \leq 0.0009$). MS-DS
52 sensitivity and specificity were 51% and 87%, respectively. MS-DS complemented the high
53 specificity of Man monitoring. All tests discriminated IA sera from neutropenic controls
54 ($P \leq 0.0009$). MS-DS sensitivity and specificity were 64% and 90%, respectively. Only 13/36
55 MM sera were concordant by MS-DS and q-PCR (six positive and seven negative); 14 were
56 positive by MS-DS alone. q-PCR and MS-DS made a similar contribution to the diagnosis of
57 MM. In patients undergoing long-term monitoring, persistent MS-DS circulation was
58 observed whereas DNA was only detected for a short period after initiation of treatment.

59 **Conclusions** MS-DS has an important role to play in the early diagnosis of IFI. Its pan fungal
60 nature and complementarity with other tests may justify its use in the management of IFI.

61

62 **Word count:** 2459

63 **Introduction**

64 Numerous reports have described the increasing problem of nosocomial invasive fungal
65 infections (IFI) in immunocompromised patients (1, 2). This is due to the increased number of
66 at risk patients in parallel with progress in intensive care and/or haematology, leading to
67 deeper or longer immunosuppression (3). In parallel, the spectrum of isolated fungi has
68 shifted from well-known opportunistic pathogens, with characterized virulence factors (4, 5),
69 to other species, rarely reported as a cause of human infection (6-8). Disruptions in the
70 microbial balance induced by antibacterial antibiotics favour fungal fitness (9). Antifungal
71 therapy is generally prescribed in patients with persistent fever despite 3 days of antibiotic
72 treatment (10). Diagnostic strategies involve conventional methods of isolation and
73 identification of fungi from blood or sterile sites, imaging and a panel of biological tests
74 whose nature depends on the fungal agent suspected (11, 12). The few biological tests
75 currently considered by physicians to be of diagnostic help do not involve changes in the host
76 response related to fungal infections (e.g. antifungal antibodies (13) or cytokine profiling
77 (14)), but consist of the detection of circulating fungal molecules, either glycans or DNA, in
78 patients' sera using tests developed with the advent of hybridoma technology (15, 16),
79 discoveries in biochemical cascades (17) or polymerase chain reaction (PCR) (18). Due to the
80 poor sensitivity of conventional mycological methods (12, 19), infectious disease societies
81 have produced different levels of recommendation for immunological tests in the diagnosis of
82 invasive candidiasis (IC) and aspergillosis (IA) (20, 21). These tests, considered as specific
83 but sometimes lacking sensitivity, were later complemented by recommendations for the more
84 sensitive Fungitell[®] test that detects both IC and IA (22). Despite years of extensive research
85 into the detection of fungal DNA, only a consensus has been reached for IA while
86 standardization is still in progress for IC and mucormycosis (MM) (23). For MM, a
87 standardized PCR method would be of primary interest since, in contrast to IC, glycan

88 detection tests are not available (24). Recently, T2MR technology, combining DNA
89 amplification and detection by magnetic resonance, has provided significant progress in terms
90 of reducing the delay to diagnosis, in comparison with blood cultures for IC (25). More
91 recently, MALDI-TOF spectrometry has become essential in clinical mycology laboratories,
92 providing more rapid and accurate identification of fungal species isolated from patients (26).

93 We developed an approach based on the ability of mass spectrometry (MS) to detect
94 fungal molecules in patients' sera (27). Subsequent work showed that this method, which
95 allowed the detection and relative quantification of a pan fungal serum disaccharide (MS-DS),
96 gave results that were comparable with recommended methods for the diagnosis of IFI (28).
97 Here, we describe the results of a European collaborative blind study carried out to validate
98 the use of MS-DS for the diagnosis of IFI.

99

100 **Material and Methods**

101 **Study design and participants**

102 Different centres provided sera from patients with IFI classified as proven or probable
103 according to the European Organization for the Research and Treatment of Cancer/Mycoses
104 Study Group (EORTC/MSG) criteria (29). Patients with IC were selected at the University
105 Hospital of Genoa and Catholic University of Sacred Heart, Rome, Italy. Controls for IC
106 patients consisted of febrile patients admitted to the Emergency Department of the University
107 Hospital of Lausanne, Switzerland, and in whom bacteraemia was subsequently documented.
108 Two cases of nocardiosis from Lille University Hospital were also included among the
109 controls. Patients with IA were selected at the University Hospital of Strasbourg, France.
110 Controls consisted of neutropenic patients hospitalized at the University Hospital of Genoa.
111 Patients with MM were selected at Saint Louis University Hospital, Paris, and University
112 Hospital, Lille, France.

113 Altogether 95 patients and 189 sera and plasma were selected. They were distributed
114 as follows: 17 patients with IC (27 sera), 19 patients with IA (53 sera), 16 patients with MM
115 (36 sera), 10 control neutropenic patients (20 sera), 20 patients (21 plasma) with bacterial
116 infections and two patients with *Actinomyces* infections (2 sera).

117

118 **MS-DS detection**

119 Serum and plasma samples were frozen and sent on dry ice to the Laboratory of Clinical
120 Mycology, Lille University Hospital, for processing as described previously (27). After a pre-
121 analytical step for the extraction and purification of oligosaccharides, spectra were recorded
122 and analysed using a 4800 MALDI-TOF/TOF analyser (Applied Biosystems/MDS Sciex) at a
123 fixed laser intensity within a 300 to 800 *m/z* range (UMR CNRS 8576, University of Lille).

124

125 **Detection of circulating poly/oligosaccharides and DNA in sera/plasma**

126 For the diagnosis of IC and IA, detection of mannan (Man), or galactomannan (GM) and β -D-
127 glucan (BDG) were performed in the participating centres during routine patient screening or
128 in the Lille Clinical Mycology Laboratory if not tested previously.

129 BDG was measured using the Fungitell[®] kit (Associates of Cape Cod Inc., Falmouth,
130 MA, USA), following the manufacturer's instructions. The recommended cut-off of 80 pg/mL
131 was used to determine clinical relevance.

132 Measurement of serum Man and GM was performed using the Platelia[™] Candida Ag
133 Plus test and Platelia[™] Aspergillus Ag test (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France),
134 respectively, according to the manufacturer's instructions. The recommended cut-offs of 62.5
135 pg/mL and index ≥ 0.5 were used, respectively.

136 For the diagnosis of MM, quantitative real-time PCR (q-PCR) was performed as
137 described previously (24, 30).

138

139 **Ethics statement.**

140 No additional sampling was necessary in any centre due to the retrospective nature of the
141 study. In Lille, agreement for the establishment of a biological collection of IFI samples was
142 obtained from the French Ministry of Education and Research under reference DC2008-642.
143 Institutional review board approval was granted by the "Comité de Protection des Personnes
144 Nord-Ouest IV", the ethical committee of our institution.

145

146 **Statistical analysis**

147 GraphPad Prism 6 was used to compare the distribution of biomarkers in the different groups
148 with the Mann-Whitney two-tailed test and to generate ROC curves, derive cut-offs and
149 graphs. $P < 0.05$ was considered to be statistically significant.

150

151 **Results**

152 **Invasive candidiasis**

153 *Study population*

154 The origin of the IC patients, the delay to serum sampling in relation to the first positive blood
155 culture and the *Candida* species isolated are shown in **Table 1**. The *Candida* species were
156 representative of the usual epidemiology encountered in Southern Europe with a higher
157 prevalence of *C. parapsilosis* complex. The control patients with bacteraemia are listed in
158 **Table 2**. These included the usual panel of community-acquired bacterial infections and two
159 cases of *Nocardia* infection.

160

161 *MS-DS diagnosis of IC in comparison to BDG and Man detection*

162 The distribution of BDG, Man and MS-DS values is shown in **Figure 1**. All tests significantly
163 discriminated IC patients from bacteraemic controls ($P<0.0001$).

164 Among the 27 IC patients, nine were positive by all three tests, 12 were positive with
165 two tests (six for BDG + MS-DS; five for BDG + Man; one for Man + MS-DS) and four were
166 positive for BDG alone. Only two patients (I19, I27) infected by *C. parapsilosis* and *C. krusei*
167 were negative with all tests. When considering control patients with bacteraemia, three were
168 positive by MS-DS compared to six with BDG, including the patient with *Nocardia* infection
169 who displayed very high glucan levels. Only one control (S5) was positive for two biomarkers
170 (BDG and MS-DS).

171 **Figure 2** shows the ROC curves and corresponding sensitivities and specificities for
172 MS-DS, BDG and Man detection tests. When considering the results per sera (**A, B**),
173 application of the cut-off of 325 for MS-DS showed a sensitivity of 51% and a specificity of
174 87%, which were intermediate values when compared to BDG and Man tests. Analysis of
175 MS-DS values for IC diagnosis was then performed per patient (**C, D**) and the sensitivity
176 reached 67% without altering the high specificity estimated per serum. Comparison of ROC
177 curves established for MS-DS, BDG and Man tests revealed that the diagnostic value of MS-
178 DS was similar to that of BDG and positively complemented the high specificity of Man
179 monitoring (revealed by the asymptotic curve). A lack of concordance between MS-DS, BDG
180 and Man was observed for serial sera from a given patient. This appeared to be more
181 moderate when considering global biomarker patterns per patient, since most patients (22/26)
182 aggregated into two groups, displaying three or two positive tests. **Figure 3A** shows an
183 example of biomarker kinetics during the time course of IC in one patient. BDG and Man
184 were positive on day 1 and decreased on day 7, whereas MS-DS became positive at the end of
185 monitoring. Due to the retrospective nature of the study, few sera were available per patient,

186 but analysis of the whole IC patient population confirmed the transient nature of Man
187 detection, in contrast with a slower decrease in glucanaemia.

188

189 **Invasive aspergillosis**

190 *Study population*

191 The characteristics of the IA patients, level of IA certainty according to EORTC criteria, and
192 *Aspergillus* species isolated are shown in **Table 3**. Except for one patient with invasive
193 sinusitis, all patients presented with invasive pulmonary aspergillosis. Time sera refer to the
194 date of IA suspicion according to clinical and radiological arguments.

195 The characteristics of the controls, consisting of neutropenic patients, are summarized
196 in **Table 4**. Retrospective analysis of the clinical evolution of IA revealed that control patients
197 3, 6 and 7 developed probable IA, 1, 2 and 6 months after serum sampling, respectively.

198

199 *MS-DS diagnosis of IA in comparison to BDG and GM detection*

200 The distribution of BDG and MS-DS values is shown in **Figure 4**. Values for biomarkers
201 were significantly higher in IA patients than in controls ($P \leq 0.0001$).

202 The sensitivity, specificity and cut-off values for MS-DS and BDG detection were
203 assessed by establishing ROC curves per serum as shown in **Figures 5A and B**. With a cut-
204 off of 325 for MS-DS, the sensitivity and specificity were 64% and 95%, respectively. The
205 sensitivity values were intermediate between those of GM and BDG, which had 100%
206 specificity. Interestingly, the 95% specificity of MS-DS was due to the high MS-DS index
207 observed for control patient 6, who subsequently developed IA. In **Figure 5C and D**, an
208 analysis of MS-DS values for IA diagnosis was performed per patient and no difference in
209 terms of sensitivity and specificity was revealed with the data obtained per serum. A
210 comparison of MS-DS and BDG ROC curves (according to the manufacturer's recommended

211 threshold) showed that the diagnostic value of MS-DS was better than that of BDG with a
212 maximum sensitivity of 64% for MS-DS and 50% for BDG.

213 **Figure 3B** shows an example of MS-DS and BDG kinetic evolution during GM
214 monitoring. For this patient, only one serum was positive at the GM cut-off 14 days after the
215 beginning of monitoring, while BDG levels were already positive on day 0 before increasing
216 at unusually high levels. MS-DS was constantly positive during the whole survey, although it
217 decreased at the time when BDG and GM levels were maximum.

218

219 **Mucormycosis**

220 *Study population*

221 The characteristics of patients and level of MM certainty according to EORTC criteria are
222 shown in **Table 5**. The genera/species involved are representative of the usual spectra of
223 Mucorales isolated, as are the risk factors, infection sites and high mortality.

224

225 *MS-DS diagnosis of MM in comparison with q-PCR*

226 In contrast to IC and IA, no biochemical or immunological assays for the detection of
227 circulating fungal poly-oligosaccharides are available for the diagnosis of MM. We therefore
228 compared MS-DS with q-PCR as the only test currently available for MM. The q-PCR
229 method used detects species from the genera *Mucor*, *Rhizomucor*, *Lichtheimia* and *Rhizopus*.

230 We tested 36 sera from 16 patients (1-13 sera/patient) by MS-DS and q-PCR. Only 13
231 sera were concordant by both methods (positive or negative). Among the 23 discordant sera,
232 13 were positive by MS-DS only and 10 were positive by q-PCR only. Only three patients
233 were positive by both tests. Remarkably, all the patients in this series could be diagnosed by
234 at least one test.

235 The distribution of MS-DS in relation to the date of IFI diagnosis and in comparison to
236 the q-PCR results is shown in **Figure 6**. Among the sera tested before a mycological
237 diagnosis was obtained, three were positive by MS-DS (three patients) and six with q-PCR
238 (five patients). An example of the kinetic evolution of MS-DS and q-PCR in a patient for
239 whom numerous samples were available is shown in **Figure 3C**. A steady increase in MS-DS
240 was observed during the 2 months of follow up, whereas DNA circulation could only be
241 detected between day 0 and day 20.

242

243 **Discussion**

244 In contrast to diagnostic tests for obligate pathogens, whose detection is indicative of disease,
245 diagnostic tests for opportunistic pathogens have to discriminate between the presence of
246 microbes as (endo- or exo-) saprophytes and their shift to a pathogen (19). This is a kinetic
247 process where the assay has to present the best compromise between specificity and
248 sensitivity over time from disease onset and its evolution to invasive infection. Currently, for
249 IC and IA, only two types of test have been shown to be clinically useful for disease
250 management (6, 21, 31, 32). On the one hand, the Platelia™ Candida Ag Plus test and
251 Platelia™ Aspergillus Ag tests detecting Man and GM, respectively, are considered specific
252 but have low sensitivity (especially Man). On the other hand, the Fungitell® test detecting
253 BDG is considered to be more sensitive but less specific. The results of our previous study
254 concerning MS-DS and those of the current study are in agreement with these conclusions. In
255 both studies, MS-DS appeared to provide intermediate results, being more sensitive than the
256 Platelia™ tests but more specific than BDG (28). It is therefore suggested that MS-DS could
257 be useful in the management of patients at risk of IC and IA.

258 For some other IFI, such as those caused by Mucorales, the lack of glucans in their cell
259 wall and negativity of BDG in the context of host invasion has led to considerable efforts to

260 develop alternative diagnostic methods; specific PCR is now available (24). This test is of
261 great help in the diagnosis of MM, whose emergence is worrying in terms of incidence and
262 severity (33). MS-DS was previously shown to be positive during MM (28). In the present
263 study, a comparison with the results of q-PCR showed a similar performance, confirming that
264 a pan-fungal diagnostic assay is useful in daily practice when an IFI is suspected without
265 mycological evidence. The reproducibility of sensitivity values in mono- and multicentre
266 studies confirms the robust character of the PlateliaTM and BDG tests in line with their
267 extensive use worldwide for several decades. A similar reproducibility and thus robustness,
268 was observed for MS-DS. Additional information regarding MS-DS specificity concerned the
269 absence of false positivity associated with *Nocardia* infection, in contrast to BDG as reported
270 previously (34) and recently observed in our laboratory for one of the two patients included in
271 this study. Conversely, among the three neutropenic patients included as IA controls and who
272 were revealed to have subsequently developed IA, none were positive for either GM or BDG
273 while MS-DS values were positive and above the limit of significance in two patients.
274 Although these results could be considered as a coincidence, the long delay before disease
275 development should be considered with caution due to the possible sub-clinical character of
276 MS-DS circulation. A comprehensive paper in progress, describing the structure and function
277 of MS-DS, shows that among the *m/z*365 hex-disaccharide signal (27) is trehalose, an
278 important fungal metabolite (35). What the present paper, investigating four different IFI
279 biomarkers in comparison with MS-DS, makes particularly obvious is the different kinetics of
280 their circulation as shown in **Figure 3**. From a pathophysiological point of view, the
281 metabolite DS has different kinetics of synthesis and release from fungal cells than cell-
282 surface associated Man and GM, or BDG that is thought to be deeply anchored in the cell
283 wall. These fungal polysaccharides are synthesized *in situ* and then different processes of
284 degradation take place, either as a result of fungal or host carbohydrate catabolism. In parallel,

285 binding to host receptors, catabolism by host soluble enzymes and circulation as immune
286 complexes make the levels of circulation completely different. The efficiency of human
287 mannosidases, naturally present for degrading human glycoproteins, and the large amount of
288 anti-mannan antibodies present in IC patients, are responsible for the rapid clearance of
289 mannan. In contrast, mammals are poorly equipped for degrading glucans, which are not self-
290 components, and their poor immunogenicity does not help their clearance, explaining their
291 longer persistence than mannans (36, 37). Despite considerable efforts to solve the problems
292 of DNA extraction and standardization, the lack of knowledge regarding the relationship
293 between clinical outcome and PCR *Candida* results has prevented clinical recommendations
294 (38). Recent progress has been made by the association of PCR with magnetic resonance
295 detection in the T2MR system, leading to good specificity and increased sensitivity with
296 regard to blood cultures for IC (25, 39). For MM, and in the absence of other biomarkers, q-
297 PCR represents significant progress, as demonstrated by a large collaborative study showing
298 its ability to confirm the diagnosis. Furthermore, survival rate was significantly higher in
299 patients with an initially positive PCR that became negative after treatment initiation, than in
300 patients whose PCR remained positive (40). In our study, Mucorales q-PCR and MS-DS were
301 complementary since all sera were positive in at least one test. Although the significance of
302 MS-DS persistence should be compared to positive PCR, these results emphasize the benefit
303 of MS-DS in patient care, principally due to the combination of biomarkers whose kinetics of
304 synthesis and release differ during the pathogenic processes. The pan-fungal characteristics
305 of MS-DS adapted to the broad diversity of emerging fungal pathogens presents some
306 advantages for first-line screening. This simple, robust physico-chemically based technology
307 is easily implementable in the majority of clinical mycology laboratories now equipped with
308 MALDI-TOF and can be adapted to single tests or a large series (41). However, as the present
309 collaborative study is retrospective, its promising results have to be confirmed through a

310 prospective study. More generally, this method, allowing early identification and
311 quantification of fungal glycans, is in its infancy and studies are in progress to explore its
312 potential. In parallel, studies concerning the contribution of MS-DS in complementation with
313 currently recommended tests are exploring the possibility of improving antifungal stewardship
314 based on a better knowledge of the diagnostic and prognostic significance of
315 glycobiomarkers.

316

317 **Acknowledgments**

318 We thank Dr Val Hopwood for editing assistance.

319

320 **Funding Sources**

321 This work was supported by internal funding “Fonds d’aide à l’émergence et à l’excellence du
322 CHRU de Lille-Bonus H” and by the Programme Hospitalier de Recherche Clinique du
323 Ministère des Affaires Sociales, de la Santé et de la Ville PHRC 1918, 2011, « Candigène ».

324

325 **Conflicts of Interest**

326 BS has received travel grants from Pfizer and MSD and a research grant from bioMérieux.
327 MM has received speaker fees from Gilead, Pfizer, Biotest, Janssen and MSD and a grant
328 from Gilead, all outside the submitted work. AA has received untied travel grants from MSD,
329 Gilead and Astellas and honoraria from Pathoquest and Gilead. CV has received research
330 support to his institution from Pfizer and MSD, speaker and advisory board fees from Gilead,
331 Pfizer and MSD, all outside the submitted work. RH reports personal fees from Astellas,
332 Basilea, Gilead and MSD, grants and personal fees from Pfizer, outside the submitted work.
333 MC, AM, NF, VLB, EDC, LD, MT, PYB, MS, YG, DP declare no conflict of interest.

334

335 **Author Contributions**

336 All authors have significantly contributed to this work: BS, YG and DP designed the MS-DS
337 assay; MC, BS and DP wrote the manuscript; AM and NF performed the assays; MC and AM
338 performed the statistical analyses; MC, MM, VLB, EDC, LD, MT, PYB, AA, MS, CV and
339 RH collected the clinical and biological data; all authors contributed to the data analyses. All
340 authors have approved the content of the final manuscript.

341

342

343 **References**

- 344 1. Colombo AL, de Almeida Junior JN, Slavin MA, Chen SC, Sorrell TC. 2017. Candida and
345 invasive mould diseases in non-neutropenic critically ill patients and patients with
346 haematological cancer. *Lancet Infect Dis* 17:e344-e356.
- 347 2. Kullberg BJ, Arendrup MC. 2015. Invasive Candidiasis. *N Engl J Med* 373:1445-1456.
- 348 3. Suleyman G, Alangaden GJ. 2016. Nosocomial Fungal Infections: Epidemiology, Infection
349 Control, and Prevention. *Infect Dis Clin North Am* 30:1023-1052.
- 350 4. Poulain D. 2015. Candida albicans, plasticity and pathogenesis. *Crit Rev Microbiol* 41:208-
351 217.
- 352 5. van de Veerdonk FL, Gresnigt MS, Romani L, Netea MG, Latge JP. 2017. Aspergillus
353 fumigatus morphology and dynamic host interactions. *Nat Rev Microbiol* 15:661-674.
- 354 6. Arendrup MC, Boekhout T, Akova M, Meis JF, Cornely OA, Lortholary O, European
355 Society of Clinical M, Infectious Diseases Fungal Infection Study G, European Confederation
356 of Medical M. 2014. ESCMID and ECMM joint clinical guidelines for the diagnosis and
357 management of rare invasive yeast infections. *Clin Microbiol Infect* 20 Suppl 3:76-98.
- 358 7. Caira M, Trecarichi EM, Mancinelli M, Leone G, Pagano L. 2011. Uncommon mold
359 infections in hematological patients: epidemiology, diagnosis and treatment. *Expert Rev Anti*
360 *Infect Ther* 9:881-892.
- 361 8. Walsh TJ, Groll A, Hiemenz J, Fleming R, Roilides E, Anaissie E. 2004. Infections due to
362 emerging and uncommon medically important fungal pathogens. *Clin Microbiol Infect* 10
363 Suppl 1:48-66.
- 364 9. Romani L, Zelante T, Palmieri M, Napolioni V, Picciolini M, Velardi A, Aversa F, Puccetti
365 P. 2015. The cross-talk between opportunistic fungi and the mammalian host via microbiota's
366 metabolism. *Semin Immunopathol* 37:163-171.

- 367 10. Cordonnier C, Pautas C, Maury S, Vekhoff A, Farhat H, Suarez F, Dhedin N, Isnard F,
368 Ades L, Kuhnowski F, Foulet F, Kuentz M, Maison P, Bretagne S, Schwarzinger M. 2009.
369 Empirical versus preemptive antifungal therapy for high-risk, febrile, neutropenic patients: a
370 randomized, controlled trial. *Clin Infect Dis* 48:1042-1051.
- 371 11. Clancy CJ, Nguyen MH. 2014. Undiagnosed invasive candidiasis: incorporating non-
372 culture diagnostics into rational prophylactic and preemptive antifungal strategies. *Expert Rev*
373 *Anti Infect Ther* 12:731-734.
- 374 12. Lamoth F, Calandra T. 2017. Early diagnosis of invasive mould infections and disease. *J*
375 *Antimicrob Chemother* 72:i19-i28.
- 376 13. Clancy CJ, Nguyen ML, Cheng S, Huang H, Fan G, Jaber RA, Wingard JR, Cline C,
377 Nguyen MH. 2008. Immunoglobulin G responses to a panel of *Candida albicans* antigens as
378 accurate and early markers for the presence of systemic candidiasis. *J Clin Microbiol*
379 46:1647-1654.
- 380 14. Krause R, Zollner-Schwetz I, Salzer HJ, Valentin T, Rabensteiner J, Pruller F, Raggam R,
381 Meinitzer A, Prattes J, Rinner B, Strohmaier H, Quehenberger F, Strunk D, Heidrich K,
382 Buzina W, Hoenigl M. 2015. Elevated levels of interleukin 17A and kynurenine in
383 candidemic patients, compared with levels in noncandidemic patients in the intensive care
384 unit and those in healthy controls. *J Infect Dis* 211:445-451.
- 385 15. Fortier B, Hopwood V, Poulain D. 1988. Electric and chemical fusions for the production
386 of monoclonal antibodies reacting with the in-vivo growth phase of *Candida albicans*. *J Med*
387 *Microbiol* 27:239-245.
- 388 16. Stynen D, Sarfati J, Goris A, Prevost MC, Lesourd M, Kamphuis H, Darras V, Latge JP.
389 1992. Rat monoclonal antibodies against *Aspergillus galactomannan*. *Infect Immun* 60:2237-
390 2245.

- 391 17. Nagi N, Ohno N, Adachi Y, Aketagawa J, Tamura H, Shibata Y, Tanaka S, Yadomae T.
392 1993. Application of limulus test (G pathway) for the detection of different conformers of (1--
393 >3)-beta-D-glucans. *Biol Pharm Bull* 16:822-828.
- 394 18. Loffler J, Hebart H, Sepe S, Schumcher U, Klingebiel T, Einsele H. 1998. Detection of
395 PCR-amplified fungal DNA by using a PCR-ELISA system. *Med Mycol* 36:275-279.
- 396 19. Lass-Flörl C. 2017. Current Challenges in the Diagnosis of Fungal Infections. *Methods*
397 *Mol Biol* 1508:3-15.
- 398 20. Ullmann AJ, Akova M, Herbrecht R, Viscoli C, Arendrup MC, Arikan-Akdagli S,
399 Bassetti M, Bille J, Calandra T, Castagnola E, Cornely OA, Donnelly JP, Garbino J, Groll
400 AH, Hope WW, Jensen HE, Kullberg BJ, Lass-Flörl C, Lortholary O, Meersseman W,
401 Petrikos G, Richardson MD, Roilides E, Verweij PE, Cuenca-Estrella M, Group EFIS. 2012.
402 ESCMID* guideline for the diagnosis and management of Candida diseases 2012: adults with
403 haematological malignancies and after haematopoietic stem cell transplantation (HCT). *Clin*
404 *Microbiol Infect* 18 Suppl 7:53-67.
- 405 21. Ullmann AJ, Aguado JM, Arikan-Akdagli S, Denning DW, Groll AH, Lagrou K, Lass-
406 Flörl C, Lewis RE, Muñoz P, Verweij PE, Warris A, Ader F, Akova M, Arendrup MC,
407 Barnes RA, Beigelman-Aubry C, Blot S, Bouza E, Brüggemann RJM, Buchheidt D, Cadranel
408 J, Castagnola E, Chakrabarti A, Cuenca-Estrella M, Dimopoulos G, Fortun J, Gangneux JP,
409 Garbino J, Heinz WJ, Herbrecht R, Heussel CP, Kibbler CC, Klimko N, Kullberg BJ, Lange
410 C, Lehrnbecher T, Loffler J, Lortholary O, Maertens J, Marchetti O, Meis JF, Pagano L,
411 Ribaud P, Richardson M, Roilides E, Ruhnke M, Sanguinetti M, Sheppard DC, Sinko J,
412 Skiada A, et al. 2018. Diagnosis and management of Aspergillus diseases: executive summary
413 of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline. *Clin Microbiol Infect* 24 Suppl 1:e1-e38.
- 414 22. Lamoth F, Cruciani M, Mengoli C, Castagnola E, Lortholary O, Richardson M, Marchetti
415 O, Third European Conference on Infections in L. 2012. beta-Glucan antigenemia assay for

- 416 the diagnosis of invasive fungal infections in patients with hematological malignancies: a
417 systematic review and meta-analysis of cohort studies from the Third European Conference
418 on Infections in Leukemia (ECIL-3). *Clin Infect Dis* 54:633-643.
- 419 23. Barnes RA, White PL, Morton CO, Rogers TR, Cruciani M, Loeffler J, Donnelly JP.
420 2018. Diagnosis of aspergillosis by PCR: Clinical considerations and technical tips. *Med*
421 *Mycol* 56:60-72.
- 422 24. Millon L, Larosa F, Lepiller Q, Legrand F, Rocchi S, Daguindau E, Scherer E, Bellanger
423 AP, Leroy J, Grenouillet F. 2013. Quantitative polymerase chain reaction detection of
424 circulating DNA in serum for early diagnosis of mucormycosis in immunocompromised
425 patients. *Clin Infect Dis* 56:e95-101.
- 426 25. Clancy CJ, Nguyen MH. 2018. T2 magnetic resonance for the diagnosis of bloodstream
427 infections: charting a path forward. *J Antimicrob Chemother* 73:iv2-iv5.
- 428 26. Wattal C, Oberoi JK, Goel N, Raveendran R, Khanna S. 2017. Matrix-assisted laser
429 desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for rapid
430 identification of micro-organisms in the routine clinical microbiology laboratory. *Eur J Clin*
431 *Microbiol Infect Dis* 36:807-812.
- 432 27. Sendid B, Poissy J, Francois N, Mery A, Courtecuisse S, Krzewinski F, Jawhara S,
433 Guerardel Y, Poulain D. 2015. Preliminary evidence for a serum disaccharide signature of
434 invasive *Candida albicans* infection detected by MALDI Mass Spectrometry. *Clin Microbiol*
435 *Infect* 21:88 e81-86.
- 436 28. Mery A, Sendid B, Francois N, Cornu M, Poissy J, Guerardel Y, Poulain D. 2016.
437 Application of Mass Spectrometry Technology to Early Diagnosis of Invasive Fungal
438 Infections. *J Clin Microbiol* 54:2786-2797.
- 439 29. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, Pappas PG,
440 Maertens J, Lortholary O, Kauffman CA, Denning DW, Patterson TF, Maschmeyer G, Bille J,

- 441 Dismukes WE, Herbrecht R, Hope WW, Kibbler CC, Kullberg BJ, Marr KA, Munoz P, Odds
442 FC, Perfect JR, Restrepo A, Ruhnke M, Segal BH, Sobel JD, Sorrell TC, Viscoli C, Wingard
443 JR, Zaoutis T, Bennett JE, European Organization for R, Treatment of Cancer/Invasive
444 Fungal Infections Cooperative G, National Institute of A, Infectious Diseases Mycoses Study
445 Group Consensus G. 2008. Revised definitions of invasive fungal disease from the European
446 Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative
447 Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group
448 (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis* 46:1813-1821.
- 449 30. Legrand M, Gits-Muselli M, Boutin L, Garcia-Hermoso D, Maurel V, Soussi S,
450 Benyamina M, Ferry A, Chaussard M, Hamane S, Denis B, Touratier S, Guigue N, Frealle E,
451 Jeanne M, Shaal JV, Soler C, Mimoun M, Chaouat M, Lafaurie M, Mebazaa A, Bretagne S,
452 Alanio A. 2016. Detection of Circulating Mucorales DNA in Critically Ill Burn Patients:
453 Preliminary Report of a Screening Strategy for Early Diagnosis and Treatment. *Clin Infect*
454 *Dis* 63:1312-1317.
- 455 31. Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, Clancy CJ, Marr KA, Ostrosky-Zeichner L, Reboli
456 AC, Schuster MG, Vazquez JA, Walsh TJ, Zaoutis TE, Sobel JD. 2016. Clinical Practice
457 Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases
458 Society of America. *Clin Infect Dis* 62:e1-50.
- 459 32. Patterson TF, Thompson GR, 3rd, Denning DW, Fishman JA, Hadley S, Herbrecht R,
460 Kontoyiannis DP, Marr KA, Morrison VA, Nguyen MH, Segal BH, Steinbach WJ, Stevens
461 DA, Walsh TJ, Wingard JR, Young JA, Bennett JE. 2016. Practice Guidelines for the
462 Diagnosis and Management of Aspergillosis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society
463 of America. *Clin Infect Dis* 63:e1-e60.

- 464 33. Danion F, Aguilar C, Catherinot E, Alanio A, DeWolf S, Lortholary O, Lanternier F.
465 2015. Mucormycosis: New Developments into a Persistently Devastating Infection. *Semin*
466 *Respir Crit Care Med* 36:692-705.
- 467 34. Sawai T, Nakao T, Yamaguchi S, Yoshioka S, Matsuo N, Suyama N, Yanagihara K,
468 Mukae H. 2017. Detection of high serum levels of beta-D-Glucan in disseminated nocardial
469 infection: a case report. *BMC Infect Dis* 17:272.
- 470 35. Perfect JR, Tenor JL, Miao Y, Brennan RG. 2017. Trehalose pathway as an antifungal
471 target. *Virulence* 8:143-149.
- 472 36. Lefort A, Chartier L, Sendid B, Wolff M, Mainardi JL, Podglajen I, Desnos-Ollivier M,
473 Fontanet A, Bretagne S, Lortholary O, French Mycosis Study G. 2012. Diagnosis,
474 management and outcome of *Candida* endocarditis. *Clin Microbiol Infect* 18:E99-E109.
- 475 37. Jaijakul S, Vazquez JA, Swanson RN, Ostrosky-Zeichner L. 2012. (1,3)-beta-D-glucan as
476 a prognostic marker of treatment response in invasive candidiasis. *Clin Infect Dis* 55:521-526.
- 477 38. Nguyen MH, Clancy CJ. 2018. PCR-Based Methods for the Diagnosis of Invasive
478 Candidiasis: Are They Ready for Use in the Clinic? *Curr Fungal Infect Rep* 12:e71-77.
- 479 39. Mylonakis E, Zacharioudakis IM, Clancy CJ, Nguyen MH, Pappas PG. 2018. Efficacy of
480 T2 Magnetic Resonance Assay in Monitoring Candidemia after Initiation of Antifungal
481 Therapy: the Serial Therapeutic and Antifungal Monitoring Protocol (STAMP) Trial. *J Clin*
482 *Microbiol* 56.
- 483 40. Millon L, Herbrecht R, Grenouillet F, Morio F, Alanio A, Letscher-Bru V, Cassaing S,
484 Chouaki T, Kauffmann-Lacroix C, Poirier P, Toubas D, Augereau O, Rocchi S, Garcia-
485 Hermoso D, Bretagne S, French Mycosis Study G. 2016. Early diagnosis and monitoring of
486 mucormycosis by detection of circulating DNA in serum: retrospective analysis of 44 cases
487 collected through the French Surveillance Network of Invasive Fungal Infections (RESSIF).
488 *Clin Microbiol Infect* 22:810 e811-810 e818.

489 41. van Belkum A, Welker M, Pincus D, Charrier JP, Girard V. 2017. Matrix-Assisted Laser
490 Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry in Clinical Microbiology: What Are
491 the Current Issues? *Ann Lab Med* 37:475-483.

492

493

494 **Table 1. Origin of the sera from patients with invasive candidiasis, delay between serum**
 495 **sampling and first positive blood culture and *Candida* species isolated**

Patient n° (site)	Species isolated	Delay vs. BC (days)	Man (pg/ml)	BDG (pg/ml)	MS-DS index
I1 (G)	<i>Candida albicans</i>	2	>500	688	2000
		5	>500	1528	550
		7	>500	861	625
I2 (G)	<i>C. albicans</i>	2	81	943	79
		5	192	405	133
		7	79	286	200
I3 (G)	<i>C. albicans</i>	2	69	155	400
		7	30	108	526
		13	12	50	300
I4 (G)	<i>C. albicans</i>	0	>500	5000	1000
		5	>500	5000	333
		7	>500	5000	285
I5 (G)	<i>C. albicans</i>	1	441	407	133
		6	22	222	110
		10	38	336	300
I6 (G)	<i>C. albicans</i>	-5	108	403	70
		0	150	283	85
		4	232	2528	500
I7 (G)	<i>C. albicans</i>	2	>500	850	350
		10	>500	367	667
I8 (G)	<i>C. albicans</i>	1	41	158	238
		7	39	58	151
I9 (R)	<i>C. albicans</i>	1	4	>500	1000

I10 (R)	<i>C. albicans</i>	2	0	>500	385
I11 (R)	<i>C. albicans</i>	1	3	>500	175
		0	3	>500	435
I12 (R)	<i>C. albicans</i>	1	>500	>500	159
I13 (R)	<i>C. albicans</i>	1	0	>500	122
I14 (R)	<i>C. glabrata</i>	0	64	>500	78
I15 (G)	<i>C. tropicalis</i>	3	>500	159	110
		7	18	189	357
		14	31	42	345
I16 (R)	<i>C. tropicalis</i>	3	>500	>500	714
I17 (G)	<i>C. parapsilosis</i>	2	5	61	53
		5	0	245	172
		6	82	7	238
I18 (G)	<i>C. parapsilosis</i>	1	16	125	122
		4	14	159	400
		14	34	70	667
I19 (G)	<i>C. parapsilosis</i>	0	21	26	159
		4	18	77	65
I20 (G)	<i>C. parapsilosis</i>	-1	110	39	833
		3	6	20	450
I21 (R)	<i>C. parapsilosis</i>	1	2	>500	1000
I22 (R)	<i>C. parapsilosis</i>	1	NA	>500	109
		1	NA	>500	106
I23 (R)	<i>C. parapsilosis</i>	7	256	>500	333
I24 (R)	<i>C. parapsilosis</i>	0	0	>500	96
I25 (R)	<i>C. orthopsilosis</i>	1	> 500	>500	769
		1	> 500	>500	588

		1	> 500	>500	1000
		1	> 500	>500	625
I26 (G)	<i>C. krusei</i>	3	12	327	357
		7	10	385	344
		10	8	191	400
I27 (G)	<i>C. krusei</i>	2	12	7	300
		4	16	14	167

496 BC: blood culture; BDG: (1,3)- β -D-glucan; Man: mannan; NA: not available; G: Genoa; R: Rome.

497 Bold characters correspond to positive values.

498

499 Table 2. Origin of the control sera used in the MS-DS test for invasive candidiasis

Patient n° (site)	Reason for hospitalization	Risk factors for fungal infection	Species isolated	Delay vs. BC (days)	Man (pg/ml)	BDG (pg/ml)	MS-DS index
S1	Septic shock infected kidney stone	Corticosteroids panhypopituitarism (substitution)	<i>Escherichia coli</i>	-1	2	97	230
S2	Septic shock urinary infection	MGUS, CRF, corticosteroids (unconfirmed Horton's disease)	<i>E. coli</i>	0	3	83	286
S3	Cholangitis	Corticosteroids, polymyalgia rheumatica	<i>E. coli</i>	0	4	7	70
S4	Urosepsis	IDDM, PPI	<i>E. coli</i>	0	1	7	65
S5	Urosepsis	CRF, chronic ulcers, gout	<i>E. coli</i>	0	9	169	400
S6	Cholecystitis	PPI	<i>E. coli</i>	0	3	29	122
S7	Urosepsis	CRF, corticosteroids polymyalgia rheumatica, PPI	<i>E. coli</i>	0	0	7	667
S8	Urosepsis	indwelling urinary catheter	<i>E. coli</i>	0	0	122	43
S9	Skin infection	CRF	<i>Streptococcus agalactiae</i>	0	0	7	120
S10	Skin infection	None	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	0	2	7	154
S11	Skin infection	None	<i>S. dysgalactiae</i>	0	1	22	76
S12	Pneumococcal pneumonia	NIDDM	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	0	3	7	55
S13	Pneumonia	None	<i>Streptococcus pyogenes</i>	0	4	7	500
S14	Plantar abscess	IDDM, metabolic syndrome	<i>S. pyogenes</i>	0	0	7	115

S15	Wound infection	IDDM, diffuse vascular disease, PPI	<i>Staphylococcus aureus</i>	0	4	280	238
S16	Endocarditis/spondylodiscitis	PPI	<i>S. aureus</i>	4	2	7	53
S17	Pyelonephritis	IDDM	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	7	7	54
S18	Urosepsis	Indwelling urinary catheter	<i>Proteus mirabilis</i>	2	3	77	65
S19	Stroke, dental abscess	Diffuse cerebrovascular disease, PPI	<i>Parvimonas micra</i>	0	1	7	106
S20	Skin infection	IDDM, diffuse vascular disease;	<i>Corynebacterium spp.</i>	0	4	7	104
S21	Cholangitis	None	<i>Enterococcus faecalis</i>	0	2	7	115
			<i>Enterobacter cloacae</i>				
			<i>Pseudomonas aeruginosa</i>				
L1	Pneumonia	Renal graft and leukaemia	<i>Nocardia nova</i>	-2	0	35	72
L2	Skin infection and adenitis	Renal graft	<i>N. nova</i>	-5	0	2336	131

500 BC: blood culture; BDG: (1,3)- β -D-glucan; CRF, chronic renal failure; IDDM, insulin-dependent diabetes mellitus; L, Lille; Man: mannan;

501 NIDDM, non-insulin-dependent diabetes mellitus; PPI, proton pump inhibitor; S, Switzerland.

502 Bold characters correspond to positive values.

503

504

505

506 **Table 3. Origin of the sera from patients with invasive aspergillosis, *Aspergillus* species isolated and level of evidence of *Aspergillus* infection**

Patient n°	Age	Sex	Underlying condition	Species isolated	EORTC classification	Treatment	Outcome	GM in BAL	Delay between sera (days)	BDG (pg/ml)	GM in sera	MS-DS
A1	44	M	Heart transplant	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Proven IPA	VCZ	Complete remission	NA	0	4279	>6	350
							Alive at W12		7	5000	4.06	333
									17	4362	2.63	555
									24	4045	2.12	333
A2	56	M	CLL with Richter transformation	NA	Probable IPA	VCZ	Progression	Pos	0	134	1.09	123
							Death D28		11	42	0.17	400
									16	98	0.16	714
A3	90	M	AML	<i>A. fumigatus</i>	Probable IPA	VCZ	Progression Death D44	NA	0	7	0.09	113
A4	63	M	COPD corticosteroids diabetes mellitus	<i>A. fumigatus</i>	Probable IPA	VCZ	Complete remission Alive at W12	NA	0	1643	1.59	58
A5	35	M	Lymphoma MAS	NA	Probable IPA	VCZ	Progression	NA	0	60	0.97	90
							Death D66		3	79	0.55	76
A6	56	F	Liver transplant	<i>A. fumigatus</i>	Probable IPA	VCZ	Complete remission	NA	0	489	2.30	3333
							Alive at W12		8	235	0.87	1250
									15	340	0.57	2000

A7	59	M	Liver transplant	<i>Aspergillus nidulans</i>	Probable	VCZ	Progression	Pos	0	40	1.02	526
					IPA	then VCZ + CAS	Death D84		10	78	0.54	400
									21	64	0.34	526
A8	56	M	ALL	NA	Probable	VCZ	Progression	Pos	0	7	0.06	105
					IPA		Alive at W12		10	7	0.05	135
									19	35	0.05	72
A9	32	M	Testicular cancer	NA	Probable	VCZ	Progression	Pos	0	73	1.37	1250
					IPA	then L-AmB	Death D71		4	102	0.67	1667
									10	66	0.35	3333
A10	53	F	AML	<i>A. fumigatus</i>	Proven	L-AmB	Partial response	NA	0	7	0.55	87
			Allo-HSCT		IA sinusitis	Death D61		3	36	0.98	625	
								9	7	0.22	1000	
A11	54	M	Heart and liver transplant	<i>A. fumigatus</i>	Probable	VCZ	Progression	Pos	0	949	0.44	714
			IPA		then L-AmB	Death D82		14	1999	0.51	333	
								21	1776	0.31	833	
A12	26	M	Lymphoma HTLV1 Allo-HSCT	NA	Probable	VCZ	Stable	NA	0	208	3.32	1429
			IPA			Alive at W12		3	454	0.56	5000	
								14	312	0.31	1429	
A13	62	M	CMML COPD	<i>A. fumigatus</i>	Probable	VCZ	Partial response	Pos	0	238	0.13	127
			IPA		then VCZ + CAS	Alive at W12		11	195	0.07	78	

										15	217	0.06	83
A14	47	M	Post-hepatitis liver fibrosis	<i>A. fumigatus</i>	Probable IPA	L-AmB	Progression Death D27	Pos	0	31	0.20	1667	
									4	48	0.13	1429	
									7	30	0.16	1429	
A15	71	M	Multiple myeloma	NA	Probable IPA	VCZ	Progression Death D54	Pos	0	7	0.08	333	
									3	7	0.08	400	
									9	7	0.07	300	
A16	60	M	AML	NA	Probable IPA	VCZ	Progression Death D21	Pos	0	27	2.39	149	
									7	7	1.89	52	
A17	51	M	Lymphoma	NA	Probable IPA	VCZ then L-AmB	Complete response Alive at W12	NA	0	12	0.73	61	
									4	7	0.11	109	
									6	20	0.07	238	
A18	73	M	CLL	NA	Probable IPA	VCZ	Progression Death D31	NA	0	73	0.82	109	
									11	292	>6	588	
									24	111	3.08	625	
A19	39	F	Lymphoma	NA	Probable IPA	VCZ then L-AmB	Progression Death D61	NA	0	3030	>6	714	
									8	517	3.34	2000	
									15	479	1.22	3333	

507 ALL: acute lymphoblastic leukaemia; Allo-HSCT: allogeneic haematopoietic stem cell transplantation; AML: acute myeloid leukaemia; BAL, broncho-alveolar lavage; BDG:
508 (1,3)- β -D-glucan; CAS: caspofungin; CLL: chronic lymphoblastic leukaemia; CMML: chronic myelomonocytic leukaemia; COPD: chronic obstructive pulmonary disease;
509 GM: galactomannan; IPA: invasive pulmonary aspergillosis; L-AmB: liposomal amphotericin B; MAS: macrophage activation syndrome; NA: not available; Pos, positive;
510 VCZ: voriconazole.
511 **Bold characters correspond to positive values.**
512
513

514 **Table 4. Origin of the control sera used in the MS-DS test for invasive aspergillosis**

Patient n°	Age	Sex	Underlying conditions	Antifungal Prophylaxis	Delay between sera (days)	BDG (pg/ml)	GM in sera	MS-DS index
1	50	M	Neutropenia	Fluconazole	0	7	0.07	68
			Myelofibrosis		3	7	0.08	86
2	40	M	Neutropenia	Fluconazole	0	7	0.09	147
			Hodgkin's disease		4	7	0.06	143
3	48	F	Neutropenia	No	0	7	0.18	200
			Allo-HSCT (ALL)		5	7	0.21	81
4	44	F	Neutropenia/GVHD	Posaconazole	0	7	0.04	161
			Allo-HSCT (myelofibrosis)		1	7	0.04	120
5	21	F	Neutropenia	Posaconazole	0	7	0.05	66
			Allo-HSCT (AML)		7	7	0.05	39
6	49	M	Neutropenia	Fluconazole	0	7	0.10	400
			Allo-HSCT (Myeloma)		3	7	0.06	200
7	57	F	Neutropenia/GVHD	Fluconazole	0	7	0.03	200
			Allo-HSCT (AML)		7	7	0.04	300

8	75	F	Neutropenia	Fluconazole	0	41	0.03	85
			AML		3	7	0.03	49
9	36	M	Neutropenia	Posaconazole	0	7	0.05	58
			AML		3	7	0.03	86
10	52	F	Neutropenia	Posaconazole	0	7	0.05	50
			AML		11	7	0.05	51

ALL: acute lymphoblastic leukaemia; Allo-HSCT: allogeneic haematopoietic stem cell transplantation; AML: acute myeloid leukaemia;

BDG: (1,3)- β -D-glucan; GM: galactomannan; GVHD: graft versus host disease.

Bold characters correspond to positive values.

515

516

517 Table 5. Origin of the sera used in the MS-DS test for the detection of mucormycosis

Patient n° (site)	Age	Sex	Underlying conditions	Site of MM	Imagery result	Diagnosis sample	Histology / DE	Species	MM level of certainty, EORTC	Treatment	Outcome	Delay vs. mycological evidence (days)	PCR Mucorales	BDG (pg/ml)	GM in sera	MS-DS index
1 (P)	27	M	Lymphoma	Lung	Bronchiectasis Ground glass	Sputum	NA	<i>Syncephalastrum</i> sp.	Probable	L-AmB	Death	-15	Neg	NA	<0.5	3333
								Culture				0	Neg	NA	<0.5	123
												7	Neg	NA	<0.5	278
2 (P)	23	F	AML	Lung	Nodule	Biopsy	Hyphae	<i>L. corymbifera</i>	Proven	L-AmB	Death	-3	Cq 40	NA	<0.5	37
3 (P)	18	F	ALL	Liver	Nodule	Biopsy	Hyphae	<i>Mucor</i> sp.	Proven	L-AmB	Alive	45	Neg	NA	<0.5	3333
								Culture				51	Neg	NA	<0.5	3333
4 (P)	75	M	Myelo-dysplasia	Rhino-cerebral	Sinus, eye and brain invasion	Conjunctival swab	Hyphae	<i>Lichtheimia</i> sp.	Proven	No	Death	-18	Neg	NA	<0.5	213
								Culture				-14	Cq 40	NA	<0.5	122
												-7	Cq 37	NA	<0.5	139
5 (P)	72	M	AML	Lung	Nodule	Serum	NA	<i>Rhizomucor</i> sp.	Possible	L-AmB	Death	0	Cq 31	NA	<0.5	213
6 (P)	77	F	ALL	Lung	Nodule	Serum	NA	<i>Mucor</i> sp.	Possible	L-AmB	Alive	30	Cq 39	NA	<0.5	100
								PCR								
7 (P)	19	F	Aplastic Fanconi anaemia	Lung and kidney	Nodule	Kidney biopsy	Hyphae	<i>Rhizomucor</i> sp.	Proven	L-AmB	Death	45	Cq 39	NA	<0.5	123
8 (P)	57	M	AML	Liver	Nodule	Biopsy	Hyphae	<i>Lichtheimia</i> sp.	Proven	L-AmB	Death	-28	Neg	NA	<0.5	333

13 (L)	83	F	Lymphoma, rituximab, diabetes	Lung	Nodule	BAL	Neg	<i>R. microsporus</i> Culture	Probable	No	Death	-6 0	Cq35 Cq35	18 0	0.06 0.04	455 400
14 (L)	76	M	Trauma	Skin	NA	Biopsy	Hyphae	<i>M. circinnelloides</i> Culture	Proven	Switch from POSA to L-AmB Surgery Hyperbaric oxygen	Alive	16	Neg	39	NA	3333
15 (L)	60	M	Trauma	Skin	NA	Biopsy	Hyphae	<i>M. circinnelloides</i> Culture	Proven	L-AmB Surgery	Alive	5	Neg	106	0.06	3333
16 (L)	3	F	ALL	Disseminated	Disseminated	Vitreous humour	Hyphae	<i>Lichtheimia</i> sp. PCR	Proven	ISA /L-AmB	Alive	-1	Neg	18	0.05	333

ALL: acute lymphoblastic leukaemia; Allo-HSCT: allogeneic haematopoietic stem cell transplantation; AML: acute myeloid leukaemia; DE, direct examination; BDG: (1,3)- β -D-glucan; CML: chronic myelogenous leukaemia; GM: galactomannan; ISA: isavuconazole; L, Lille; MM, mucormycosis; P, Paris; POSA: posaconazole; GVHD: graft versus host disease; NA: not available; NS: not specified.

Bold characters correspond to positive values.

519 **Figure legends**

520 **Figure 1.** Distribution of MS-DS (**A**), Man (**B**) and BDG (**C**) values in patients with invasive candidiasis
521 (IC) vs. controls. The patient and control groups for each biomarker were compared using the Mann
522 Whitney test (significant at $P \leq 0.05$). The hatched line represents the cut-off value for each biomarker.

523

524 **Figure 2.** ROC curves per serum (**A**) and per patient (**C**) for invasive candidiasis. Sensitivity/specificity
525 values according to pre-established cut-off values for each biomarker, analysis per serum (**B**) and per patient
526 (**D**). Grey, simple dotted and black lines represent BDG, Man and MS-DS, respectively.

527

528 **Figure 3.** Examples of kinetics of serum biomarkers in invasive candidiasis (IC) (**A**), invasive aspergillosis
529 (IA) (**B**) and mucormycosis (MM) (**C**). Day 0 indicates the date of positive fungal blood culture (BC) for IC
530 or the first available serum for IA and the date of mycological evidence for MM. MS-DS (black circle and
531 line), Man or GM (black triangle and dotted line) and BDG (black square and grey line). Horizontal lines
532 indicated the cut-off values for BDG (80 pg/ml), Man (62.5 pg/ml), GM (0.5×1000) and MS-DS (325).
533 Empty and full circles represent negative and positive Mucorales q-PCR results, respectively, for MM
534 patients.

535

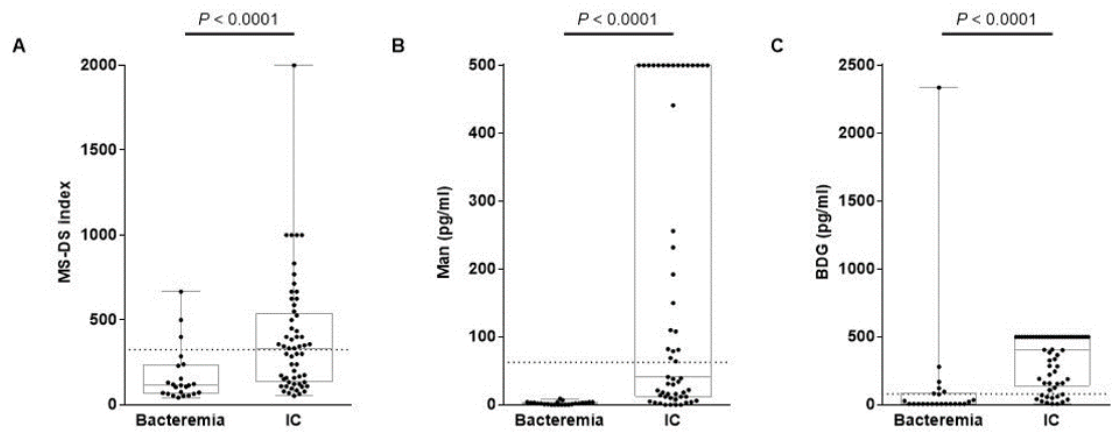
536 **Figure 4.** Distribution of MS-DS (**A**), GM (**B**) and BDG (**C**) values in patients with invasive aspergillosis
537 (IA) and controls. The patient and control groups were compared using the Mann Whitney test (significant
538 at $P \leq 0.05$). The hatched line represents the cut-off value for each biomarker.

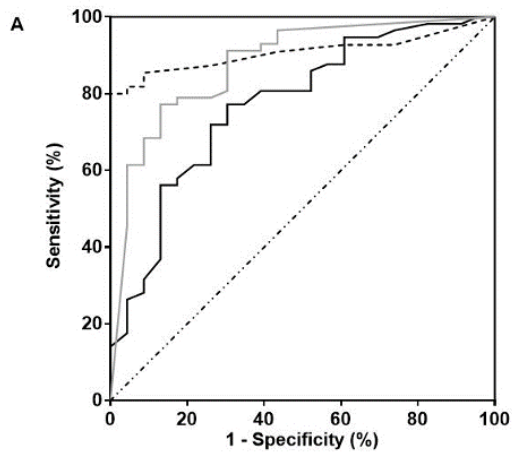
539

540 **Figure 5.** ROC curves per serum (**A**) and per patient (**C**) for invasive aspergillosis (IA).
541 Sensitivity/specificity values according to pre-established cut-off values for each biomarker, analysis per
542 serum (**B**) and per patient (**D**). (MS-DS*, exclusion of control who developed IA 2 months later). Grey,
543 simple dotted and black lines represent BDG, GM and MS-DS, respectively.

544

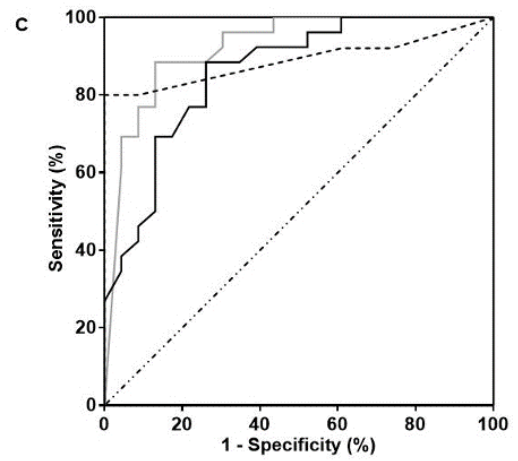
545 **Figure 6.** Distribution of MS-DS in relation to the day of mycological diagnosis. (Empty and full circles
546 represent negative and positive Mucorales q-PCR results, respectively).





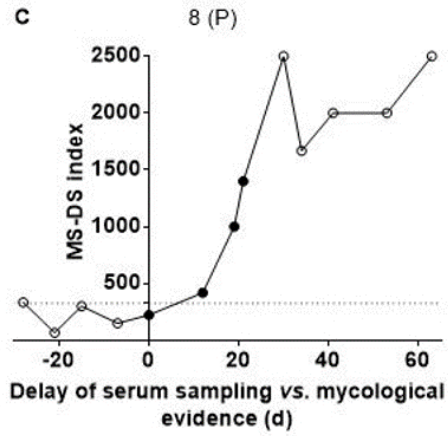
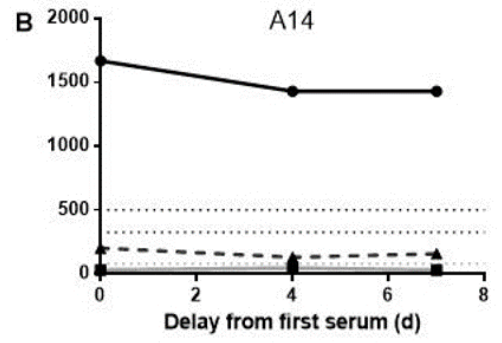
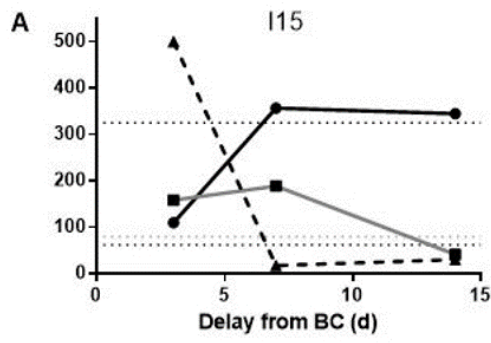
B

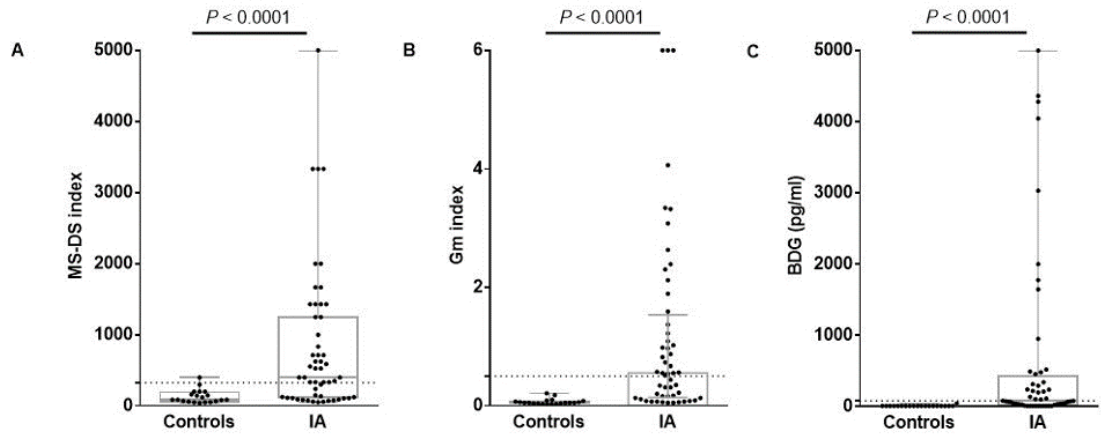
Test	Cut-off	Sensitivity	Specificity	AUC
BDG	80	79.0	73.9	0.872
Man	62.5	47.3	100	0.908
MS-DS	325	50.9	87.0	0.772

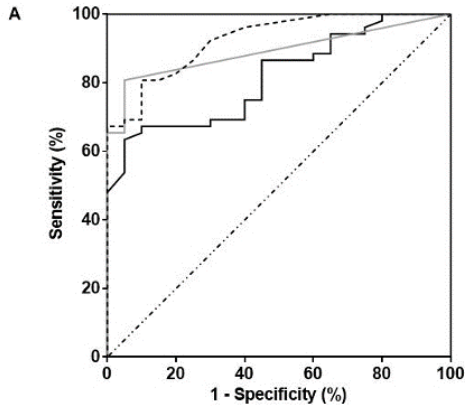


D

Test	Cut-off	Sensitivity	Specificity	AUC
BDG	80	88.5	73.9	0.922
Man	62.5	56	100	0.889
MS-DS	325	61.5	87.0	0.859

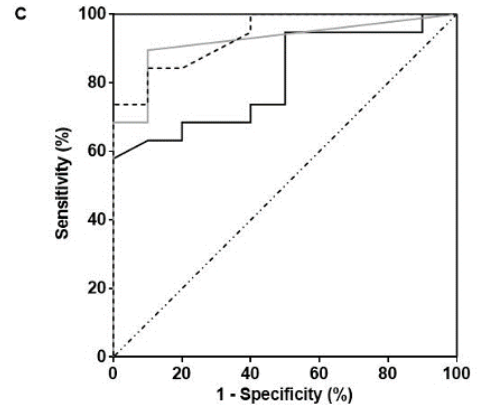






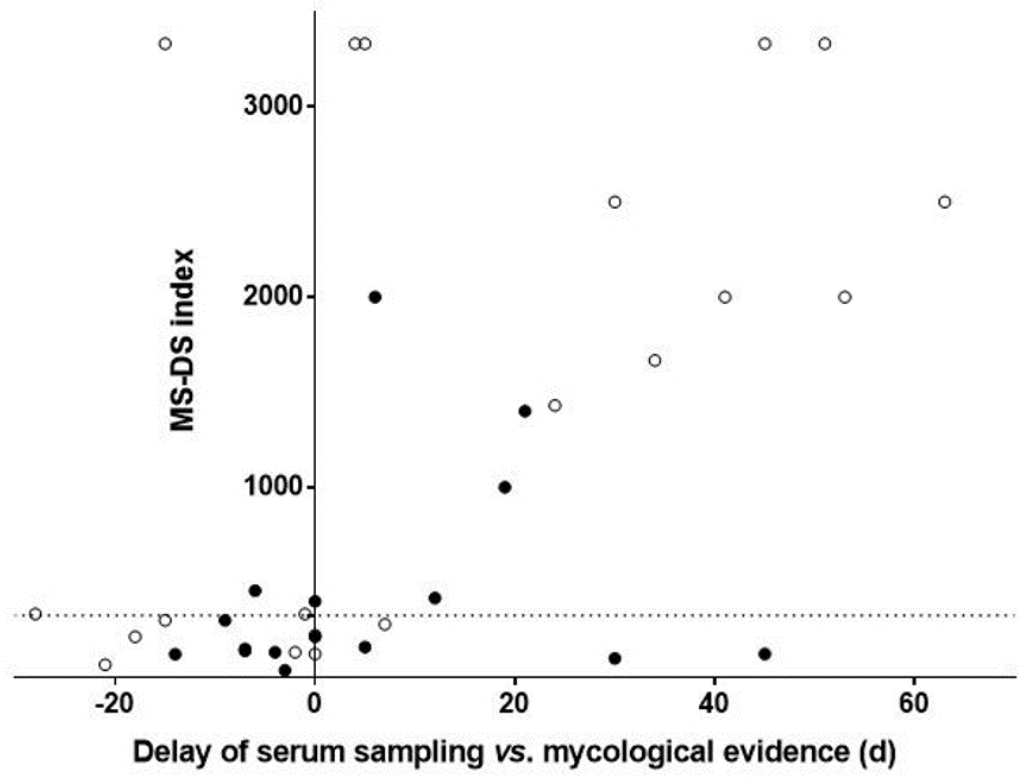
B

Test	Cut-off	Sensitivity	Specificity	AUC
GM	0.5	53.9	100.0	0.926
BDG	80	50.0	100.0	0.891
MS-DS	325	63.5	95.0	0.816
MS-DS*	325	63.5	100.0	0.864



D

Test	Cut-off	Sensitivity	Specificity	AUC
GM	0.5	71.1	100.0	0.937
BDG	80	57.9	100.0	0.921
MS-DS	325	63.2	95.0	0.813
MS-DS*	325	63.2	100.0	0.862



ANNEXE 3 :

**Résultats comparatifs du MS-DS
index entre MALDI TOF/TOF et
MADI-LTQ Orbitrap**

Sérum	Catégorie	Hémoculture	Date par rapport à l'hémoculture	Fungitell®	Platelia plus ®Ag	Platelia plus ®Ab	MS-DS index TOF/TOF (en %)	MS-DS index Orbitrap (en %)
Ca23/11 S3	Candidémie	<i>C albicans</i>	J-5	315	236	0	800	1000
Ca23/11 S4	Candidémie		J+1	912	>500	9	1000	2000
Ca23/11 S5	Candidémie		J+8	896	2039	8	900	1000
Ca33/11 S7	Candidémie	<i>C albicans</i>	J-3	71	0	7	350	400
Ca33/11 S10	Candidémie		J+7	113	0	10	500	300
Ca34/11 S4	Candidémie	<i>C albicans</i>	J+4	1704	1172	14	500	500
Ca34/11 S6	Candidémie		J+18	1088	373	16	700	700
Ca34/11 S9	Candidémie		J-4	341	435	24	500	500
Ca34/11 S10	Candidémie		J+3	277	363	21	500	700
Ca34/11 S11	Candidémie		J+10	264	401	25	650	500
Ca5/12 S1	Candidémie	<i>C albicans</i>	J-2	177	236	4	400	300
Ca5/12 S2	Candidémie		J0	170	84	6	230	500
Ca5/12 S3	Candidémie		J+3	220	>2500	6	700	1000
Ca5/12 S7	Candidémie		J+56	364	0	2	77	94
Ca8/12 S3	Candidémie	<i>C albicans</i>	J-2	816	0	20	220	60
Ca8/12 S2	Candidémie		J+5	1056	0	9	700	700
Ca8/12 S1	Candidémie		J+12	1712	0	7	600	900
Ca12/12 S1	Candidémie	<i>C dubliniensis</i>	J-3	1488	0	0	153	350
Ca12/12 S2	Candidémie		J-2	497	0	0	800	2000
Ca12/12 S4	Candidémie		J+3	0	0	0	115	200
Ca29/12 S3	Candidémie	<i>C albicans</i>	J-5	536	0	0	220	60
Ca29/12 S2	Candidémie		J-7	1088	105	0	380	350
Ca29/12 S1	Candidémie		J0	2832	614	3	700	1000
Ca45/12 S1	Candidémie	<i>C albicans</i>	J-1	0	0	11	200	75
Ca45/12 S2	Candidémie		J+4	323	0	7	1000	2000
Ca45/12 S5	Candidémie		J+14	75	0	3	350	92
Ca18/10 S 3	Candidémie	<i>C glabrata</i>	J0	1928	214	0	1000	500
Ca18/10 S 4	Candidémie		J+6	324	73	0	700	2000
Ca18/10 S 6	Candidémie		J+12	3904	2210	6	230	220
Ca40/11 S3	Candidémie	<i>C glabrata</i>	J-25	101	77	23	400	300
Ca40/11 S4	Candidémie		J+5	84	0	19	400	450
Ca40/11 S5	Candidémie		J+12	63	0	16	800	1000
Ca52/12 S1	Candidémie	<i>C parapsilosis</i>	J0	968	0	0	450	700
Ca52/12 S3	Candidémie		J+2	1464	0	0	500	1000
Ca52/12 S4	Candidémie		J+9	760	0	0	1000	900
Ca44/11 S7	Candidémie	<i>C tropicalis</i>	J-6	108	0	8	300	260
Ca44/11 S8	Candidémie		J-1	36	0	6	400	1000
Ca44/11 S10	Candidémie		J+6	11	0	3	450	1000
Ca37/12 S3	Candidémie	<i>C tropicalis</i>	J-4	133	0	6	230	51
Ca37/12 S2	Candidémie		J0	60	507	0	800	2000
Ca37/12 S1	Candidémie		J+7	446	0	6	1500	4000
Ca53/12 S8	Candidémie	<i>C krusei</i>	J-4	113	0	0	400	500
Ca53/12 S9	Candidémie		J-1	203	0	0	400	700
Ca53/12 S10	Candidémie		J+1	261	0	0	500	800

Sérum	Catégorie	Fungitell® (pg/mL)	Platelia plus® Ag (pg/mL)	Platelia plus® Ab (UA/mL)	ICC dp	ICC	Espèces	MS-DS index TOF/TOF (en %)	MS-DS index Orbitrap (en %)
Tem1	Colonisé	47	0	4	2	0.8	<i>C. trop.</i>	280	250
	Colonisé	0	0	3	3	0.8	<i>C. trop.</i>	50	20
	Colonisé	134	0	27	4	1	<i>C. trop., C. alb.</i>	92	110
Tem 2	Colonisé	12	0	0	2.6	0.8	<i>C. alb.</i>	150	142
	Colonisé	468	0	1	1.6	0.6	<i>C. alb.</i>	139	65
	Colonisé	1392	0	>80	3.7	1	<i>C. alb.</i>	350	400
Tem 3	Colonisé	12	0	1	2.4	0.8	<i>C. alb., C. gla.</i>	52	100
	Colonisé	0	0	4	0.25	0.2	<i>C. gla.</i>	65	62
Tem 4	Colonisé	84	0	1	3.2	1	<i>C. para., C. kef.</i>	110	50
	Colonisé	101	0	1	0	0		60	70
	Colonisé	56	0	1	2	0.5	<i>C. para., C. kef.</i>	164	140
Tem 5	Colonisé	20	0	7	2.4	0.8	<i>C. alb.</i>	300	260
	Colonisé	38	0	11	2	0.8	<i>C. alb.</i>	300	118
	Colonisé	89	0	5	3.2	1	<i>C. alb.</i>	200	123
Tem 6	Colonisé	120	0	0	0	0		400	230
	Colonisé	38	0	0	0	0		400	180
	Colonisé	42	0	0	0	0		40	65
Tem 8	Colonisé	215	0	17	7.2	0.6	<i>C. alb., C. trop., C. gla.</i>	350	400
	Colonisé	109	0	18	1.2	0.8	<i>C. alb., C. gla.</i>	48	10
	Colonisé	46	0	16	2.2	0.6	<i>C. alb., C. gla.</i>	33	24
Tem 10	Colonisé	120	0	78	2.2	0.8	<i>C. alb.</i>	137	50
	Colonisé	60	0	46	0.6	0.5	<i>C. alb.</i>	133	180
	Colonisé	49	0	53	0.2	0.2	<i>C. alb.</i>	122	50
Tem 14	Colonisé	25	0	5	0.4	0.2	<i>C. alb.</i>	97	88
	Colonisé	36	0	5.9	1	0.4	<i>C. alb.</i>	280	800
	Colonisé	3584	0	2.8	1	0.75	<i>C. alb.</i>	700	400
Tem 16	Colonisé	0	0	9.5	2.2	0.8	<i>C. alb.</i>	23	14
	Colonisé	87	0	7	3	1	<i>C. alb.</i>	22	27
	Colonisé	0	0	10	1.2	0.4	<i>C. alb.</i>	300	155
Tem 18	Colonisé	22	0	3	0	0		38	30
	Colonisé	0	0	1	0.25	0.25	<i>C. para.</i>	55	60
	Colonisé	65	0	3	2	0.6	<i>C. para.</i>	164	185
Tem 21	Colonisé	100	0	8	0.25	0.2	<i>C. alb.</i>	120	40
	Colonisé	0	0	7	2.8	0.8	<i>C. alb.</i>	62	52
	Colonisé	41	0	12	3	0.8	<i>C. alb.</i>	500	2000
Tem 25	Colonisé	196	0,4	0	2,6	0,8	<i>C. kef.</i>	1000	900
	Colonisé	>500	0	0	3,2	1	<i>C. kef., C. lusit.</i>	600	2000
	Colonisé	314	0	4	2,4	0,8	<i>C. kef., C. lusit.</i>	39	110
Tem 26	Colonisé	0	0	0	1	0,4	<i>C. alb., C. para.</i>	53	37
	Colonisé	62	0	0	0,4	0,2	<i>C. para.</i>	48	90
	Colonisé	42	0	0	0,2	0,2	<i>C. para.</i>	34	61
Tem 27	Colonisé	31	0	2	3,4	0,6	<i>C. alb., C. trop.</i>	133	210
	Colonisé	336	0	6	4	1	<i>C. alb., C. trop.</i>	150	125
	Colonisé	96	0	6	5,2	0,75	<i>C. alb., C. trop.</i>	82	130
Tem 29	Colonisé	42	0	18	1,2	0,6	<i>C. alb.</i>	96	143
	Colonisé	0	0	26	1,2	0,6	<i>C. alb.</i>	43	52
	Colonisé	11	0	46	1,2	0,6	<i>C. alb.</i>	52	40

Sérum	Catégorie	MS-DS index TOF/TOF (en %)	MS-DS index Orbitrap (en %)
EFS1	Témoin négatif	34	8
EFS6	Témoin négatif	45	8
EFS9	Témoin négatif	33	7
EFS10	Témoin négatif	8	12
EFS12	Témoin négatif	26	12
EFS14	Témoin négatif	13	18
EFS15	Témoin négatif	15	6
EFS16	Témoin négatif	18	6
EFS20	Témoin négatif	14	8

Etude du catabolisme de l'arabinogalactane des mycobactéries

Généralités

Avant-propos

La tuberculose ravage l'humanité depuis des millénaires, causant des maladies, des difformités et la mort depuis la nuit des temps. Des momies de civilisations anciennes ont d'ailleurs été retrouvées avec des preuves évidentes de tuberculose [214]. Bien que la tuberculose pulmonaire soit et a toujours été la forme la plus courante de la maladie, d'autres formes extra-pulmonaires de la tuberculose occupent une place prépondérante dans l'histoire. Par exemple, la tuberculose des ganglions lymphatiques cervicaux (écrouelles) aurait été guéri par le 'toucher royal', du roi Clovis de France au V^e siècle à Edward le Confesseur, roi d'Angleterre au XI^e siècle.

C'est au Moyen-Âge que la tuberculose est apparue comme une maladie épidémique en Europe et elle est devenue une cause majeure de décès pendant les siècles qui ont suivis. Des années 1600 à la fin des années 1800, la tuberculose a causé entre 20 et 30 % de tous les décès au Royaume-Uni et aux Etats-Unis [215]. Alors que la maladie était romancée dans l'art, la réalité n'était pas tout aussi rose.

Au XX^e siècle, la tuberculose a continué de causer des souffrances et de nombreux décès, mais les taux de la maladie ont chuté pendant plusieurs décennies; les autres causes de décès comme la guerre, la famine, la grippe ou encore la variole devenant encore plus redoutables. La baisse de l'incidence de la tuberculose et de la mortalité dans les décennies précédant le développement d'un traitement efficace a été largement attribuée aux avancées socio-économiques, avec une meilleure nutrition, un meilleur logement et une augmentation globale du bien-être social répertoriée comme causes possibles du déclin de l'épidémie [216]. Une hypothèse alternative est que la coévolution de l'organisme et de son hôte a entraîné une immunité plus efficace chez les humains [217].

La découverte du bacille tuberculeux par Robert Koch en 1882 a marqué le début d'un siècle de grandes avancées sur la maladie. L'annonce capitale de Koch d'une cause microbienne de la phtisie (tuberculose pulmonaire) fut suivie de l'isolement de la tuberculine (extrait à la glycérine du bacille tuberculeux), pensée au départ comme agent thérapeutique contre la maladie par Koch mais jouant finalement un rôle diagnostique important. Puis le développement d'un vaccin vivant atténué, le bacille de Calmette et Guérin ou BCG; la découverte de la streptomycine ainsi que la création d'un puissant arsenal d'agents antimicrobiens contre cette infection autrefois non traitable et hautement mortelle ont vu le jour [218]. Dans les années 1980, 100 ans après la percée de Koch, la tuberculose pouvait être guérie chez presque tous les patients traités par des médicaments administrés par voie orale sur 6 mois [219].

Ces découvertes majeures ont été récompensées par deux prix Nobel attribués à Koch et Waksman. Elles ont également abouti à la fermeture des sanatoriums dans le monde entier, ont accordé la vie à ceux qui étaient auparavant condamnés et ont eu un bénéfice socio-économique colossal. Avec des diagnostics, un traitement efficace, une thérapie préventive et un vaccin en plus, la science est passée à d'autres priorités et problèmes, laissant ainsi de côté la tuberculose.

Tandis que les scientifiques, les médecins, les responsables de la santé publique et le public se réjouissaient de la fin de la tuberculose, la maladie poursuivait son essor. En effet, même si les Etats-Unis, l'Europe et d'autres régions développées ont connu un déclin accéléré de la tuberculose, la maladie a continué à faire de nombreuses victimes dans les pays pauvres notamment en Afrique, en Asie et en Amérique latine. Une croyance commune est que l'échec de la lutte contre la tuberculose dans ces parties du monde était en fait le résultat de systèmes de santé faibles incapables de délivrer les progrès technologiques apportés par les chercheurs au cours du siècle précédent. Cette hypothèse est cependant facilement contrable, car la réalité a montré que les limites se trouvaient dans les outils disponibles pour le contrôle de la tuberculose dans la dernière partie du XXe siècle. Le vaccin BCG par exemple est devenu et reste le vaccin le plus largement utilisé dans le monde et dans l'histoire, mais il y a peu de preuves sur le fait qu'il ait eu un impact sur l'épidémie de tuberculose car il ne semble pas protéger contre la tuberculose pulmonaire chez les adultes, qui sont les principaux vecteurs d'infection. Le test diagnostique le plus largement utilisé pour la tuberculose, le frottis de bacilles acido-alcool-résistants (BAAR), est très peu sensible avec 50% de cas détectés voire moins de tuberculose pulmonaire.

Dans ce contexte de fragilité des outils de lutte antituberculeuse à l'échelle mondiale, deux développements épidémiologiques d'une importance cruciale ont modifié de façon drastique la maladie au cours des trois dernières décennies. L'émergence du VIH a eu un impact considérable sur la tuberculose dans le monde, alimentant une augmentation importante de l'incidence de la tuberculose chez les personnes vivant avec le VIH ainsi qu'une augmentation des taux nationaux d'infection tuberculeuse en Afrique subsaharienne où vivent les deux tiers des personnes infectées par le VIH [220]. Le deuxième grand changement épidémiologique de ces dernières décennies a été l'émergence de la tuberculose pharmacorésistante [221]. La tuberculose multirésistante (MDR) et la tuberculose ultrarésistante (XDR) représentent aujourd'hui environ 5 % de tous les cas dans le monde et posent des problèmes de diagnostic et de traitements importants.

C'est pour toutes ces raisons que la tuberculose est aujourd'hui revenue sur le devant de la scène et a contribué au regain d'intérêt de la communauté scientifique afin d'enrayer cette

maladie de manière définitive, l'objectif étant d'éradiquer la tuberculose avant 2030 selon l'OMS [222].

Chapitre I : De la compréhension de la tuberculose à son traitement

I) Généralités sur la tuberculose

I.1) Impact global de la tuberculose

L'impact global de la tuberculose reste énorme. Depuis 5 ans, la tuberculose est la première cause de décès dans le monde causée par un seul agent infectieux, surpassant ainsi l'infection par le VIH [222]. Ceci en dépit du fait que, avec un diagnostic rapide et un traitement adapté, la plupart des personnes ayant développé une tuberculose peuvent être guérie. En 2016, on estimait à 1,3 million le nombre de décès par tuberculose parmi les personnes séronégatives (contre 1,7 million en 2000) et 374 000 décès supplémentaires parmi les personnes séropositives. On estime également que 10,4 millions de personnes sont tombées malades de la tuberculose en 2016 : 90% étaient des adultes, 65% étaient des hommes, 10% étaient des personnes vivant avec le VIH (74% en Afrique) et 56% étaient localisées dans cinq pays : Inde, Indonésie, Chine, Philippines et Pakistan.

La distribution de la tuberculose à travers le monde affecte de manière inégale l'Afrique, l'Asie et l'Europe de l'Est, tandis que l'Europe de l'Ouest, les Etats-Unis, le Canada et l'Océanie connaissent des taux beaucoup plus faibles. Les taux les plus élevés se retrouvent principalement en Afrique subsaharienne, où l'infection par le VIH a entraîné une forte augmentation de l'incidence au cours des 25 dernières années comme le montre la Figure I.1 [222].

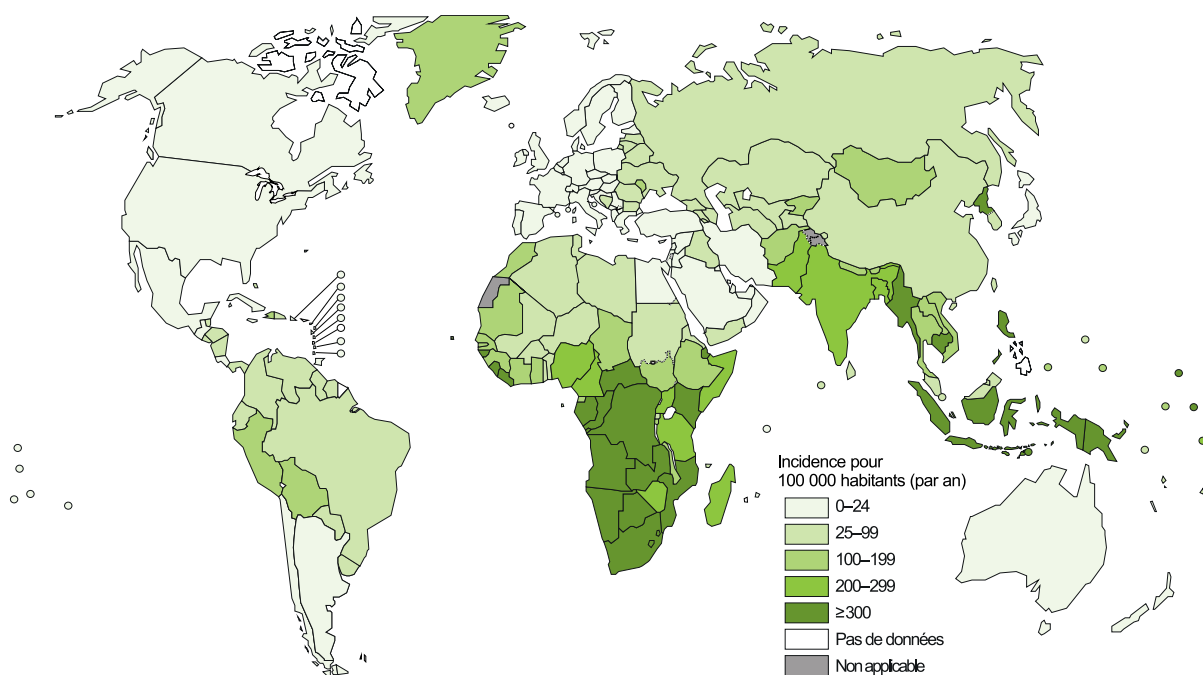


Figure I.1. Incidence de la tuberculose dans le monde pour 100 000 habitants [222].

La tuberculose multirésistante MDR se retrouve quant à elle partout dans le monde, mais les pays d'Europe de l'Est possèdent des taux particulièrement élevés, et de nombreux cas ont été reportés en Afrique du Sud, en Inde, en Chine et au Pérou. Historiquement, la tuberculose MDR est un phénomène anthropique qui se produit généralement chez des patients dont le traitement a été mal géré, interrompu ou irrégulier. Même si la tuberculose MDR est plus présente chez des patients ayant déjà été exposés à un traitement anti-tuberculeux, de plus en plus de cas ont été recensés chez des patients avec un premier épisode de la maladie [223]. Ce bouleversement de l'épidémiologie de la tuberculose nécessite donc un changement dans la stratégie à employer pour lutter contre les maladies résistantes. En conséquence, les tests de sensibilité aux médicaments de tous les patients atteints de tuberculose, en particulier ceux qui sont exposés à des taux de prévalence plus élevés, sont essentiels pour assurer l'identification rapide de la résistance et l'initiation d'un traitement approprié.

Avant de s'intéresser aux traitements, il convient de comprendre le mode de fonctionnement des mycobactéries ainsi que le processus infectieux mis en place par celles-ci.

I.2) Etiologie de la tuberculose

Les mycobactéries appartiennent à la famille des *Mycobacteriaceae*, au genre *Mycobacterium*, à l'ordre des Actinomycétales, à la classe des *Actinobacteria* et à la sous-classe des *Actinobacteridae*.

Les mycobactéries se présentent sous la forme de bacilles fins et immobiles (1 à 10 µm de long sur 0,2 à 0,6 de large), aérobies, non sporulés et ne possédant pas de flagelle. L'ultrastructure particulière de leur paroi constituée d'acides mycoliques à très longues chaînes (60 à 90 atomes de carbones) fait qu'elles ne prennent pas la coloration de Gram bien qu'elles soient classées dans les bactéries à Gram positif mais elles sont acido-alcool-résistantes (BAAR). C'est d'ailleurs sur ce dernier aspect que se base la coloration de Ziehl-Neelsen permettant l'identification des mycobactéries par microscopie. Une autre particularité des mycobactéries est qu'elles possèdent un génome riche en G/C compris entre 61 et 71 % (hormis pour *M. leprae* qui possède un taux compris entre 54 et 57 %).

Le genre *Mycobacterium* (*M.*) a été introduit en 1896 pour désigner les agents responsables de la tuberculose (*M. tuberculosis*) et de la lèpre (*M. leprae*) dont on connaît bien les effets ravageurs sur l'humanité [224]. Il compte aujourd'hui environ 200 espèces et toutes les mycobactéries ont été classées selon la classification de Runyon [225]. Cette classification se base sur deux critères que sont la vitesse de croissance et les caractéristiques pigmentaires. On retrouve tout d'abord les mycobactéries non-tuberculeuses (MNT) dites atypiques qui sont des pathogènes occasionnels pour l'homme à l'exception de *M. leprae* se démarquant par sa pathogénicité avérée pour l'homme et qui constitue donc un groupe à part entière. Le second grand groupe quant à lui est dénommé complexe *Mycobacterium tuberculosis* (CMT).

1.2.a) Le complexe *Mycobacterium tuberculosis*

Ce complexe regroupe les bacilles responsables de la tuberculose et comprend dix espèces mycobactériennes dont trois d'entre elles qui ont été identifiées dans 99 % des cas d'infections humaines [226] :

- *M. tuberculosis* (ou Bacille de Koch BK) : espèce la plus étudiée du complexe en raison de sa forte pathogénicité pour l'Homme. Il peut néanmoins atteindre certains animaux domestiques (chien, chat, perroquet...). L'ADN de *M. tuberculosis* présente plus de 99,9% d'identité avec les autres bactéries du complexe.

- *M. bovis* : l'agent responsable de la tuberculose bovine mais touchant aussi d'autres espèces animales (chien, chat, caprins, ovins...). Le caractère pathogène de cet espèce pour l'homme est le même que celui de *M. tuberculosis* et la contamination se fait essentiellement par voie digestive. Le vaccin Bilié de Calmette et Guérin (BCG) provient d'une souche atténuée de l'espèce *M. bovis* [227].

- *M. africanum* : cette espèce est retrouvée principalement en Afrique de l'Ouest et dans d'autres régions africaines. Sa mise en évidence en Europe reste rare mais possible.

On retrouve également *M. microti*, *M. canettii*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*, *M. mungii*, le bacille de l'oryx et le bacille de Dassie (Figure I.2).

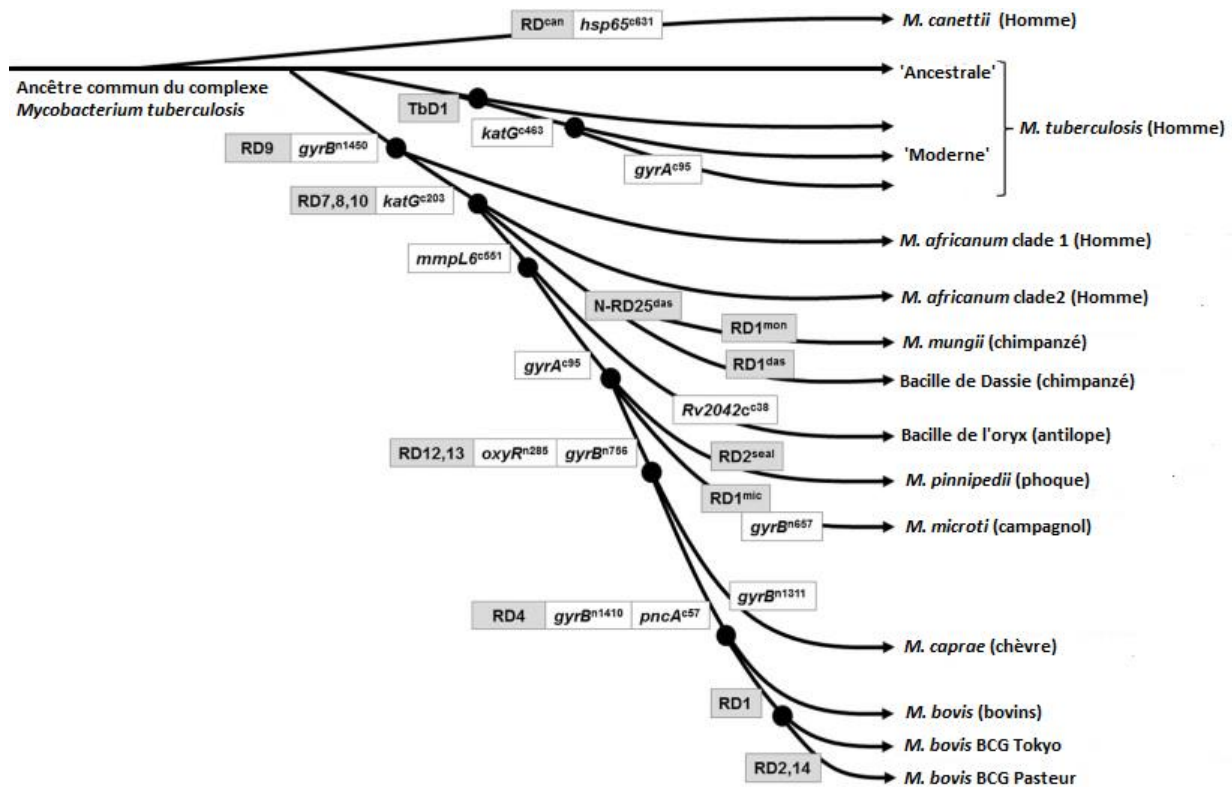


Figure I.2. Schéma de l'évolution du complexe de *M. tuberculosis*.

L'évolution s'est faite par mutation ou délétion. On n'a en fait qu'une seule espèce réelle et des 'pathovars' -liés à une pathologie ou une espèce- mais toutes ont été élevées au rang d'espèce pour des raisons épidémiologiques à l'exception de BCG [227].

I.2.b) Les mycobactéries non tuberculeuses

Les mycobactéries non tuberculeuses (MNT) comprennent toutes les espèces de mycobactéries qui ne provoquent pas la tuberculose ou la lèpre, excluant ainsi les espèces du complexe *M. tuberculosis* et *M. leprae*. Parmi les espèces de MNT, un nombre croissant de souches ont été jugées responsables de maladies graves et de résistances au traitement au cours des dernières décennies [228], [229]. Les MNT sont présentes dans l'environnement, en particulier dans l'eau et le sol [230], et peuvent occasionnellement infecter des humains ou des animaux causant alors diverses infections pathologiques, incluant des maladies pulmonaires, cutanées, osseuses, articulaires mais également disséminées en présence de diverses conditions prédisposantes (principalement maladies chroniques et immunosuppression) [231], [232]. Parce que les mycobactéries sont très résistantes à la chaleur et à la plupart des produits de nettoyage à l'eau, elles sont présentes dans presque toutes les eaux de boisson et de baignade. Les bactéries peuvent ainsi entrer dans le corps via l'eau potable par exemple et se retrouver dans les bronches.

L'incidence de la tuberculose pulmonaire due aux mycobactéries environnementales est d'ailleurs en constante augmentation quelle que soit la région du monde dans laquelle l'étude épidémiologique est réalisée [233]. Les raisons de cette augmentation sont diverses et

comprennent la sensibilisation accrue aux mycobactéries en tant que pathogènes pulmonaires, l'amélioration des méthodes de détection et de culture mais aussi le vieillissement de la population. De plus, le diagnostic est souvent difficile ou peu convaincant. Le traitement est également compliqué et souvent controversé, nécessitant des traitements prolongés et mal tolérés qui ne sont pas susceptibles d'entraîner l'éradication de la maladie [234].

Les MNT sont divisés en 4 groupes bien distincts d'après la classification de Runyon (Figure 1.3). Les MNT à croissance lente qui forment des pigments soit à la lumière (photochromogènes), soit à l'obscurité (scotochromogènes) constituent respectivement les groupes I et II. Dans le groupe I, on retrouve par exemple *M. kansasii* et *M. marinum* et dans le groupe II *M. xenopi* notamment. Les organismes à croissance lente non pigmentés (non chromogènes) comme *M. avium* et ceux à prolifération rapide telles que *M. smegmatis* représentent respectivement les groupes III et IV [225].

M. smegmatis est l'une des mycobactéries les plus couramment utilisées dans les études sur le genre *Mycobacterium* en raison de son caractère non pathogène et de sa croissance rapide. *M. smegmatis* est aussi un modèle simple et facilement manipulable, c'est-à-dire avec un temps de doublement rapide pour une mycobactérie (environ 4 à 5 heures) et qui nécessite uniquement un laboratoire avec un niveau de confinement L1. Le temps et l'infrastructure lourde nécessaires pour travailler avec des espèces pathogènes et notamment *M. tuberculosis* ont incité les chercheurs à se tourner vers d'autres espèces comme *M. smegmatis*. Cette espèce partage plus de 2000 gènes orthologues avec *M. tuberculosis* et possède la même structure pariétale particulière que cette dernière [235]. *M. smegmatis* est également capable d'oxyder le monoxyde de carbone en aérobiose, comme le fait *M. tuberculosis*.

De plus, la découverte de plasmides, de phages et d'éléments génétiques mobiles a permis la construction de systèmes dédiés à l'inactivation génique et à la génération de gènes. Chez *M. smegmatis*, la souche mc²155 est la plus utilisée car elle est facilement transformable et est maintenant le cheval de bataille de la génétique mycobactérienne. En outre, elle est facilement cultivable dans la plupart des milieux de laboratoire synthétiques ou complexes, où elle peut former des colonies visibles en 3-5 jours. Ces propriétés en font un organisme modèle très attrayant pour l'étude de *M. tuberculosis* et d'autres pathogènes mycobactériens. *M. smegmatis* mc²155 est également utilisé pour la culture de mycobactériophages.

II) Cycle infectieux de la tuberculose et granulome

M. tuberculosis est un pathogène humain obligatoire, c'est-à-dire qu'il ne peut vivre que lié à un hôte. Plus de 80 % des patients avec une tuberculose (TB) manifestent des symptômes classiques de toux parfois accompagnée de sang, fièvre, sueurs nocturnes et perte de poids.

La tuberculose pulmonaire peut se différencier en plusieurs phases (Figure I.4) :

- Infection mineure sans symptômes : le patient est en bonne santé avec des symptômes bénins voire aucun dans la plupart des cas. *M. tuberculosis* a envahi le corps et vit dans un état de dormance. On parle alors d'infection tuberculeuse latente et on estime qu'un tiers de la population mondiale en serait atteinte ce qui constitue un large réservoir pour la tuberculose. Dans cet état, les personnes infectées ne peuvent cependant pas transmettre l'infection à d'autres personnes.
- Infection active ou tuberculose symptomatique : Celle-ci a lieu dans moins de 5 % des cas. Les bacilles tuberculeux peuvent se multiplier et se propager dans le corps. La concentration élevée en bacilles peut alors être suffisante pour générer des mutations spontanées et induire une résistance aux médicaments. Les personnes les plus à risque d'être affectées sont les personnes immunodéprimés ou souffrant de malnutrition et celles qui vivent dans la pauvreté ou dans des environnements de santé médiocres. Selon les facteurs de risque, un *cas index infectieux* survient lorsqu'un cas de tuberculose active devient aigu et expulse un grand nombre de bacilles tuberculeux [237].
- Réactivation de l'infection (secondaire) : Les bacilles en dormance peuvent causer une tuberculose symptomatique aiguë des mois voire des années après l'infection initiale. Les bactéries se retrouvent alors emmêlées dans la structure granulomateuse formée, se multiplient et circulent de nouveau à l'intérieur de l'hôte. Les réactivations post-dormance se produisent généralement dans les poumons et moins dans d'autres organes [238]. La réactivation est probablement associée à un système immunitaire défaillant que l'on retrouve couramment dans un certain nombre de groupes à haut risque tels que le VIH, un âge avancé, la malnutrition ou encore la prise de médicaments immunosuppresseurs [239]. La virulence de la tuberculose est directement affectée par le taux de réactivation de la latence parmi les hôtes [240].

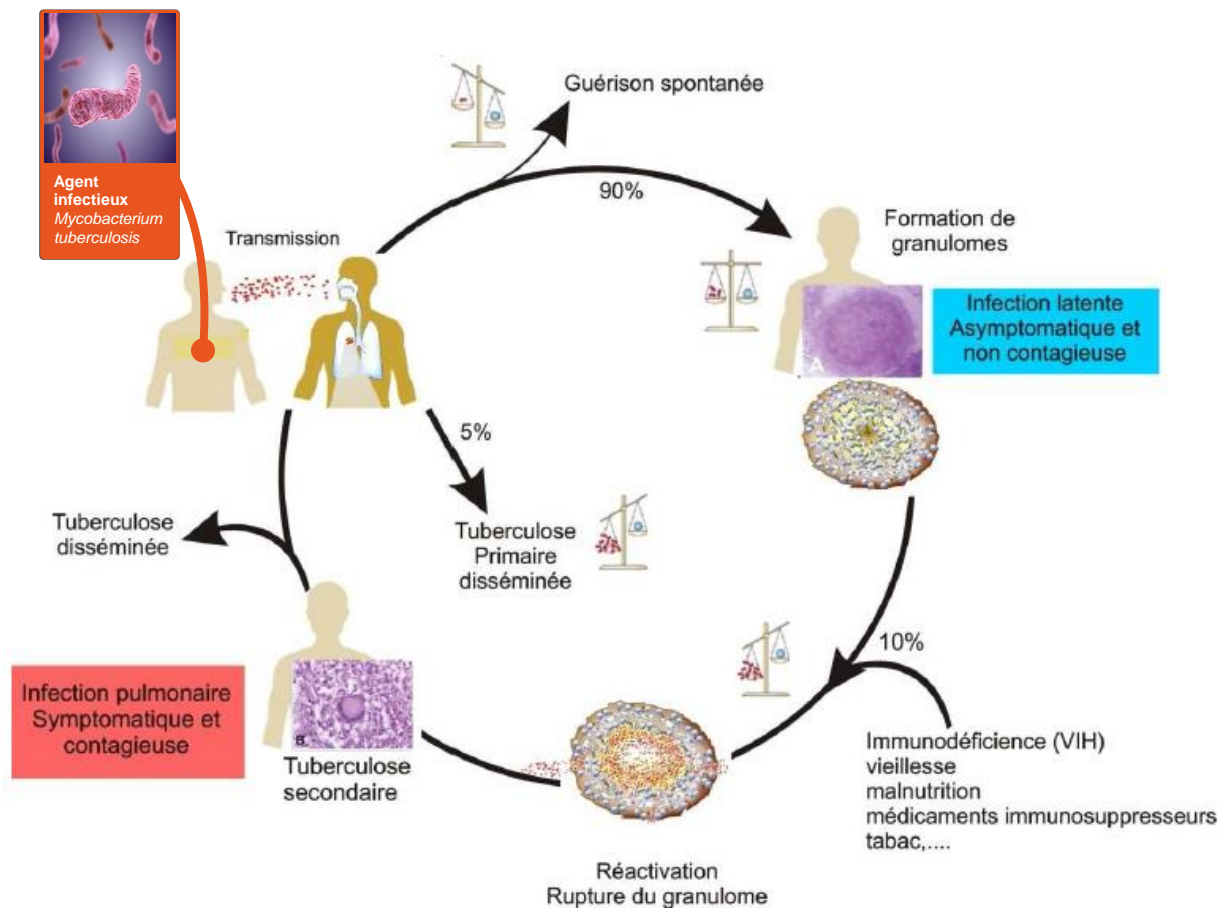


Figure I.4. Cycle infectieux de la tuberculose.

La transmission des bacilles tuberculeux s'effectue par voie aérienne. Dans 90 % des cas, l'immunité adaptative se met en place pour donner lieu à la formation du granulome composée essentiellement de lymphocytes et de fibrocytes. L'infection est alors latente mais des bacilles restent en dormance. Lors d'une déficience du système immunitaire, les bacilles peuvent se multiplier entraînant la rupture du granulome. On parle alors de tuberculose secondaire. Dans 5 % des cas, lors de la transmission, une tuberculose active primaire peut directement se déclencher notamment chez les personnes immunodéprimées ou chez les enfants. Réalisée à partir de [241].

Les poumons représentent la principale porte d'entrée et le principal organe cible de *M. tuberculosis*. Il peut infecter les mammifères mais ne peut être transmis que par les humains d'un individu infecté à un individu sain par inhalation de gouttelettes infectieuses contagieuses contenant les bacilles tuberculeux. Ces gouttelettes expirées sont connues pour rester dans l'atmosphère pendant plusieurs heures, et la dose est considérée comme infectieuse à partir d'une seule bactérie. Comme écrit précédemment, seul environ 5 % des personnes immunocompétentes peuvent développer une tuberculose dite *primaire* mais la plupart (90 %) ne développeront jamais de maladie clinique car une réponse immunitaire adaptative se met en place, conduisant à la formation d'un amas cellulaire organisé : le granulome.

Dans le poumon, les bactéries sont phagocytées par les macrophages alvéolaires et induisent une réponse pro-inflammatoire localisée qui conduit au recrutement de cellules mononucléaires à partir de vaisseaux sanguins voisins (Figure I.5). Le pH interne du

phagosome des macrophages diminue alors rapidement suite à la libération de cytokines pro-inflammatoires, y compris l'interféron gamma (IFN- γ), qui inhibe la croissance des bacilles et favorise la fusion avec le lysozyme. De plus, IFN- γ stimule le macrophage pour libérer le facteur de nécrose tumorale α (TNF- α), qui est important dans la formation du granulome et dans la prévention de la dissémination. La réponse des lymphocytes T se met alors en place et celle-ci est antigène spécifique. Ce processus immunitaire initial se poursuit ensuite pendant 2 à 12 semaines. Toutes ces cellules forment donc les éléments constitutifs du granulome qui est la signature de la tuberculose.

En d'autres termes, le granulome est formé d'un noyau de macrophages infectés autour duquel viennent s'ajouter d'autres macrophages spumeux. Des agrégats de lymphocytes B proéminents entourés de lymphocytes T CD3+ sont trouvés en périphérie, avec des cellules de Langerhans multinucléées CD68+ et des fibrocytes [242]. L'ensemble des lymphocytes et fibrocytes forment un manteau qui est lui-même lié à une chape fibreuse composée essentiellement de collagène (Figure I.5). Il sert à contenir les bacilles avant leur destruction mais *M. tuberculosis* est cependant capable de détourner le granulome à son insu en formant une barrière protectrice ce qui lui permet de se multiplier avant de disséminer au moment opportun [243].

Le confinement du granulome échoue lorsque le statut immunitaire de l'hôte change, généralement en conséquence de la vieillesse, d'une co-infection par le VIH, de la malnutrition et plus globalement par toute condition réduisant le nombre de lymphocytes T CD4+ ou altérant leur fonction. En effet, la caractéristique pathologique de la lésion de *M. tuberculosis* est la caséification. Ce phénomène est au cœur du cycle de vie de l'infection tuberculeuse humaine, car elle peut évoluer vers la nécrose et la cavitation. Suite à ce changement de l'état immunitaire, le granulome se désintègre et répand des milliers de bacilles infectieux dans les voies aériennes. Cela se traduit par le développement d'une toux qui facilite la propagation des bacilles infectieux [244].

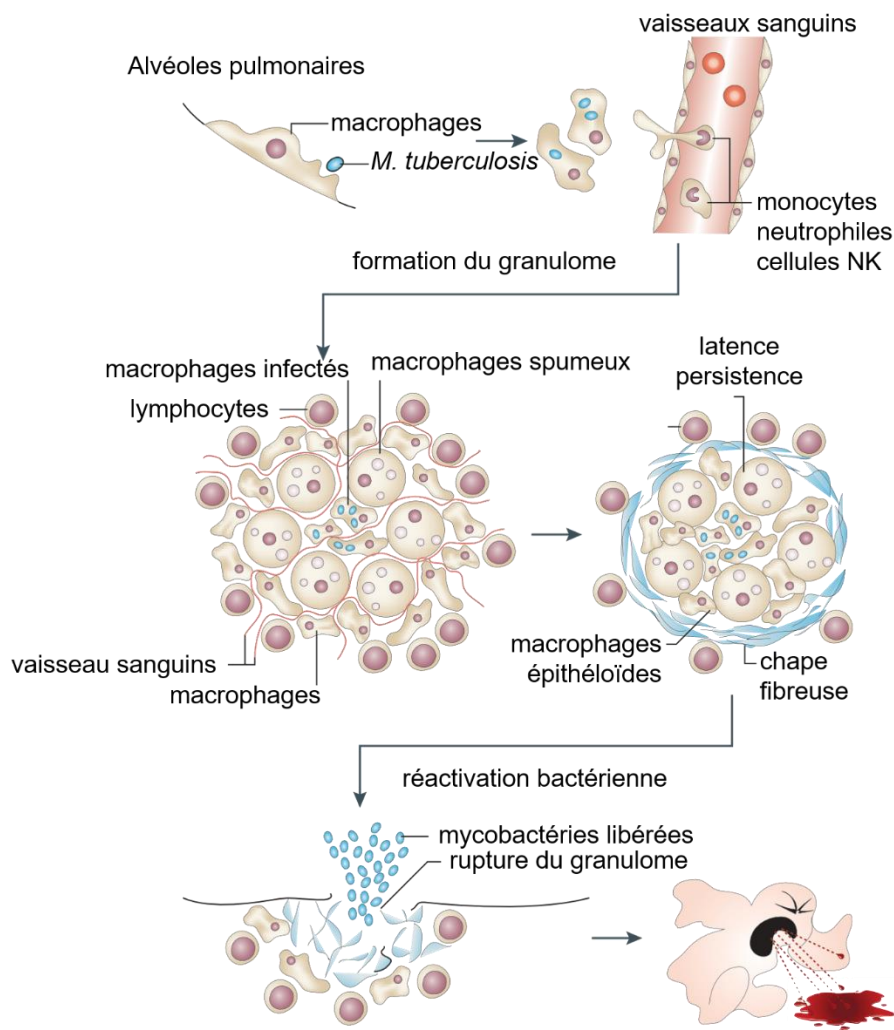


Figure I.5. Schéma descriptif de la formation à la rupture du granulome tuberculeux.

Les bacilles inhalés sont pris en charge par les macrophages alvéolaires à leur arrivée dans les poumons. Cette action induit alors une réponse pro-inflammatoire qui résulte sur le recrutement des cellules de l'immunité innée telles que les monocytes et les neutrophiles puis des cellules de l'immunité adaptative que sont les lymphocytes. Le tout permet ainsi d'éviter la propagation de l'infection par formation d'un amas cellulaire nommé granulome. Ce granulome mature ensuite et produit une chape fibreuse en périphérie extérieure composée principalement de collagène. Lors de la phase de latence, le granulome arrive à se maintenir à un état stable mais lorsque la maladie évolue, les bacilles se multiplient et le granulome nécrose puis caséifie. Enfin, le granulome finit par se rompre en libérant tous les bacilles pathogènes dans les poumons. Adaptée de [244].

II.1) Période d'incubation de la tuberculose

La période d'incubation et l'intervalle de série sont des déterminants importants dans l'épidémiologie des maladies infectieuses. La période d'incubation est définie comme la période allant de l'infection à l'apparition de la maladie et l'intervalle de série comme la période entre l'apparition des symptômes chez un patient primaire et l'apparition des symptômes chez un second patient [245].

Les périodes d'incubation sont variables et vont de quelques semaines à plusieurs années ou même à vie si l'infection n'est pas traitée mais le plus souvent, le délai est compris entre 4 et 12 semaines après l'exposition à la (aux) lésion(s) primaire(s). Il est communément admis que la période d'incubation se situe dans les cinq premières années de l'infection tuberculeuse et que le risque d'infection diminue à mesure que cet intervalle de temps augmente [246]. Autrement dit, l'infection acquise à un âge précoce (lors de l'enfance par exemple) est associée à des périodes d'incubation plus longues que si l'infection a été acquise à l'âge adulte [247]. Pendant cette période d'incubation, les organismes bacillaires peuvent atteindre et infecter d'autres organes tels que les ganglions lymphatiques, les reins et les méninges et ainsi causer une tuberculose extra-pulmonaire (TBEP).

Les programmes de contrôle épidémiologique visent à détecter les cas de tuberculose avant le seuil (délai maximum entre le début de l'infectiosité jusqu'au diagnostic et au traitement de la tuberculose) et à réduire la progression vers une tuberculose active.

Une infection récente est définie comme une réaction cutanée significative après la documentation d'un test cutané à la tuberculine négatif au cours des deux années précédentes. Celui-ci est utilisé comme synonyme de *conversion tuberculinique* [248].

II.2) Immunologie de la tuberculose

La pathogénèse des bacilles tuberculeux comprend plusieurs étapes :

- la résistance (ou la modification) de la réponse immunitaire de l'hôte;
- l'arrêt de la maturation du phagosome et l'inhibition de la fusion phagolysosomale;
- la persistance pendant laquelle la forme de dormance est inactive mais il y a tout de même maintien du potentiel de réactivation;
- la réplication dans les macrophages de l'hôte.

Les bacilles vivants en dormance se divisent lentement, en libérant des protéines sécrétées afin de maintenir leurs protéines cytoplasmiques, ce qui leur permet d'éviter la reconnaissance du système immunitaire et de contrôler l'environnement de l'hôte. *M. tuberculosis* est un puissant inducteur de l'apoptose dans les macrophages hôtes. En formant des pores dans les membranes phagosomales, il peut apporter des nutriments du cytoplasme de l'hôte et il peut également promouvoir la translocation de l'antigène vers la voie de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Une immunité protectrice forte et spécifique contre ces protéines cytoplasmiques (libérées de bacilles en fin de vie ou mortes) peut empêcher le passage de la dormance à la maladie active.

Le confinement bactérien de la réponse immunitaire protectrice se concentre sur les différents lymphocytes T participants de la manière suivante :

- les lymphocytes T CD4+ ou les lymphocytes T auxiliaires (Th1) reconnaissent les peptides antigènes codés par le CMH de classe II;
- les lymphocytes T CD8+ ou les lymphocytes T cytotoxiques reconnaissent des antigènes cytoplasmiques (par exemple des cellules tumorales ou des cellules virales) ou des peptides liés à des cellules de classe I du CMH;
- les lymphocytes T CD1 restreints reconnaissent les glycolipides abondants des parois de *M. tuberculosis*.

CD8+ et CD1 sécrètent tous les deux des perforines et des granulysines qui tuent directement la mycobactérie dans les macrophages infectés [249].

Les lymphocytes T CD4+ jouent également un rôle dans la réponse immunitaire principale contre l'invasion des mycobactéries en produisant de la lymphotoxine alpha (LT- α). Les cytokines inflammatoires comme l'IFN- γ , le facteur de nécrose TNF- α , l'interleukine-2 (IL-2) et la LT- α aident à l'activation des macrophages ce qui a pour effet de réduire la réplication de *M. tuberculosis* puis, avec les cellules dendritiques et les différents lymphocytes T vont entraîner la formation de granulomes. L'absence d'un tel équilibre cellulaire peut conduire à des lésions caséuses avec ou sans réactivation de *M. tuberculosis* et à des disséminations de bacilles tuberculeux.

Le granulome, en réponse à une infection chronique, utilise le CD4+ pour réguler la fonction protectrice, limiter la dissémination du pathogène en dehors du site de l'inflammation et protéger les tissus sains environnants [250]. Le nombre médian de lymphocytes CD4+ est significativement plus élevé chez les patients atteints par *M. tuberculosis* que chez les patients atteints par une MNT [251].

Les proportions de lymphocytes T CD4+ sécrétant les IFN- γ , IL-2 et TNF- α sont généralement plus élevées chez les enfants infectés qu'en cas d'infection latente ou dans d'autres groupes et cette augmentation est synonyme d'une infection tuberculeuse active. Les cytokines dérivées des lymphocytes T comme IFN- γ sont des indicateurs efficaces de mémoire immunitaire et de protection. Les mécanismes effecteurs qui tuent *M. tuberculosis* sont pris en charge par les macrophages activés à partir des lymphocytes T. Les bacilles inhibent notamment la maturation des phagosomes et la fusion des lysosomes bloquant ainsi la destruction des macrophages actifs. Les lymphocytes auxiliaires Th1 produisant les IFN- γ sont en équilibre avec les lymphocytes auxiliaires de type 2 (Th2), ces derniers étant stimulés par les infections parasitaires, l'atopie ou encore l'asthme [252] (Figure I.6).

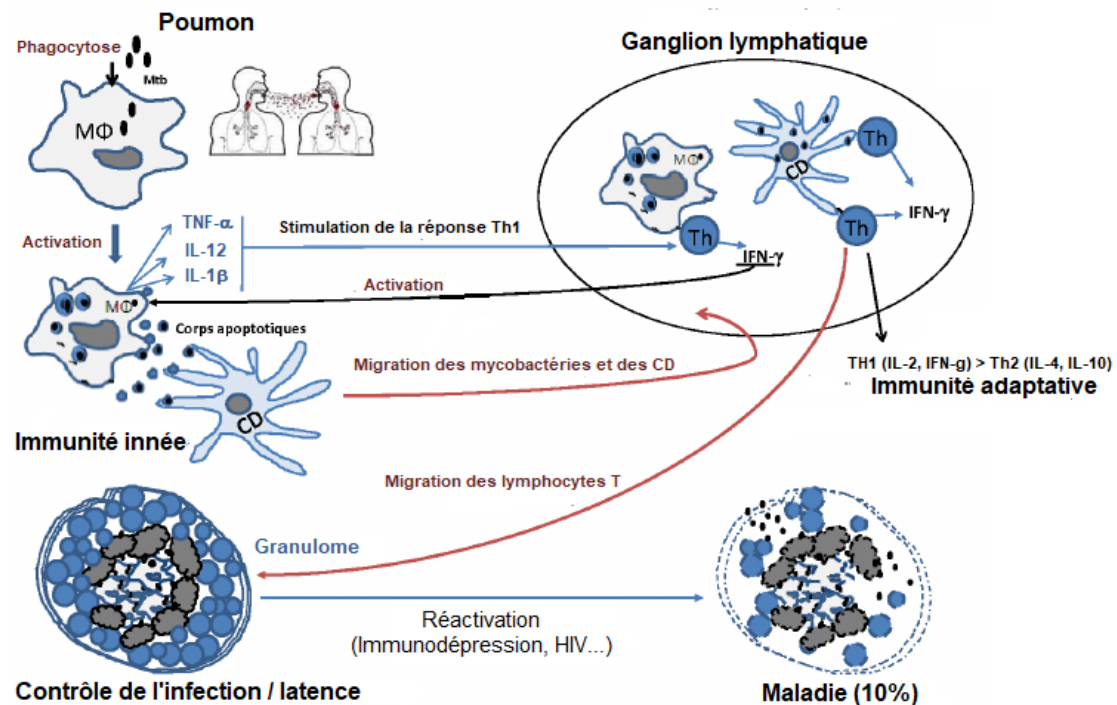


Figure I.6. Mise en place de l'immunité lors d'une infection par *M. tuberculosis*.

Les macrophages et les cellules dendritiques (CD) sont activés par les bacilles ou les corps apoptotiques ce qui constitue l'immunité innée. Ces macrophages et CD migrent ensuite vers les ganglions lymphatiques afin de stimuler la production de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺, mettant alors en place l'immunité adaptative. En effet, ces lymphocytes permettent la production massive de cytokines nécessaires à l'activation des macrophages.

Les CD et les macrophages activés peuvent alors générer l'IL-12 qui est indispensable pour l'induction des cellules Th1. Ces cellules Th1 quant à elles secrètent l'IL-2 et l'IFN-γ qui assurent l'action protectrice contre *M. tuberculosis*. Enfin, les cellules Th2 secrètent les interleukines IL-4 et IL-10 qui exercent une action négative sur la réponse immunitaire. Les lymphocytes T migrent alors vers le site de l'infection ce qui conduit à la formation du granulome ainsi qu'à l'arrêt de la croissance des bacilles qui se mettent en état de dormance [253].

II.3) La tuberculose et l'interféron gamma

Les interférons gamma (IFN-γ) sont des protéines naturelles ou des cytokines solubles libérées par les lymphocytes T du système immunitaire Th1 en tant que mécanisme de défense de l'hôte contre les organismes étrangers. IFN-γ a des propriétés anti-bactériennes, anti-virales et anti-tumorales. IFN-γ appartient à la classe des glycoprotéines cytokines qui agissent directement en inhibant la réplication virale, en stimulant les cellules *natural killer* (NK) et en tant que médiateurs centraux pour l'activation des macrophages seuls ou en synergie avec TNF-α. La résistance des cellules hôtes contre les organismes étrangers est stimulée par IFN-γ en augmentant la présentation de l'antigène aux lymphocytes T et B et agissant comme médiateur puissant de l'activation de l'activité bactéricide des macrophages contre *M. tuberculosis* [254].

IFN- γ a également un rôle protecteur crucial contre divers pathogènes par stimulation des cellules normales afin d'augmenter l'expression du complexe CMH de classe I et des récepteurs d'immunoglobulines de présentation des antigènes pour les macrophages. Il active également l'activité des lysosomes dans les macrophages et recrute des lymphocytes T bactéricides. Ceci est réalisé en synergie avec TNF- α et les deux activent les macrophages infectés en initiant un mécanisme effecteur de l'immunité à médiation cellulaire.

L'infection par *M. tuberculosis* inhibe la voie de signalisation IFN- γ pour échapper à la réponse immunitaire humaine et les défauts des gènes ou récepteurs IFN- γ prédisposent les individus aux infections mycobactériennes. Après l'exposition à l'antigène, IFN- γ ou des cellules productrices d'IFN- γ sont utilisées comme marqueur de l'activité cellulaire effectrice. L'absence de cellules lymphocytaires ou d'antigènes d'infection à distance n'est cependant pas liée aux effets stimulants de l'IFN- γ [255].

La réinfection par *M. tuberculosis* commence au cours de la phase chronique une fois que les macrophages spumeux quittent le tissu granulomateux vers les espaces alvéolaires. Les cellules épithéliales alvéolaires infectées par *M. tuberculosis* libèrent de manière durable la cytokine IFN- γ à des concentrations élevées après l'infection comparées à des cellules non infectées. Cet IFN- γ joue un rôle dans la régulation de la réponse immunitaire innée intracellulaire et internalise seulement le pathogène tuberculeux vivant plutôt que les bacilles morts liés à la surface cellulaire [256]. Les réponses IFN- γ sont plus fréquentes chez les sujets tuberculeux latents que chez les sujets non infectés par la tuberculose [257]. Ces propriétés de l'IFN- γ en font donc un parfait outil de diagnostic pour la tuberculose latente qui est d'ailleurs développé depuis quelques années comme alternatives aux méthodes conventionnelles comme nous allons le voir dans la partie qui suit.

III) Diagnostic bactériologique et traitement de la tuberculose

III.1) Diagnostic de l'infection tuberculeuse latente (indirect)

Le test le plus couramment utilisé pour le dépistage de la tuberculose latente dans le monde est le test Mantoux ou intradermo-réaction à la tuberculine (IDR) (Figure I.7). Celui-ci consiste à injecter une dose standard de tuberculine sous la peau et de faire une lecture des résultats 48 à 72 h au plus tard. Une personne ayant été exposée à la bactérie va alors montrer une réponse immunitaire de la peau. Les facteurs de risques médicaux de la personne déterminent à quelle taille (en millimètres) de l'induration le résultat est positif (5, 10 ou 15 mm). Un résultat positif indique alors une infection par la tuberculose [258]. Une controverse

existe cependant quant à l'effet de ce test sur les personnes vaccinées au BCG. En effet, certains pays estiment que le test Mantoux pourrait donner de faux-positifs chez des sujets préalablement vaccinés au BCG [259].

Comme mentionné dans la partie précédente, les avancées en génomique et en immunologie pour la détection de *M. tuberculosis* ont conduit au développement de plusieurs tests alternatifs prometteurs. Par exemple, le dosage IGRA (*In-vitro Interferon Gamma Release Assay*) mesure l'IFN- γ libéré, qui est spécifiquement produit par les cellules T (Th1) stimulées par *M. tuberculosis* (Figure I.7).

Une évaluation de 130 enfants en France utilisant le test QuantiFERON IGRA (technique ELISA sur sang total) a montré une différence dans les valeurs d'IFN- γ entre des enfants témoins en bonne santé, des cas de tuberculose latente et des cas de tuberculose active. Les niveaux d'IFN- γ du sang périphérique (technique ELISPOT pour *Enzyme-Linked ImmunoSPOT*) observés ont également différenciés entre les patients traités et non traités, qui sont liés à l'immunité individuelle contre la tuberculose et peuvent être utiles pour surveiller les niveaux d'IFN- γ avant et après traitement antituberculeux [260] (Figure I.7).

Une diminution des taux d'IFN- γ pendant le traitement permet au clinicien de surveiller l'effet de la chimiothérapie curative ou préventive [254]. L'IFN- γ thérapeutique se lie puis active le récepteur IFN- γ en surface cellulaire, stimule la cytotoxicité dépendante des anticorps et améliore la fixation des cellules NK aux cellules tumorales, induisant ainsi l'apoptose dans les cellules malignes.

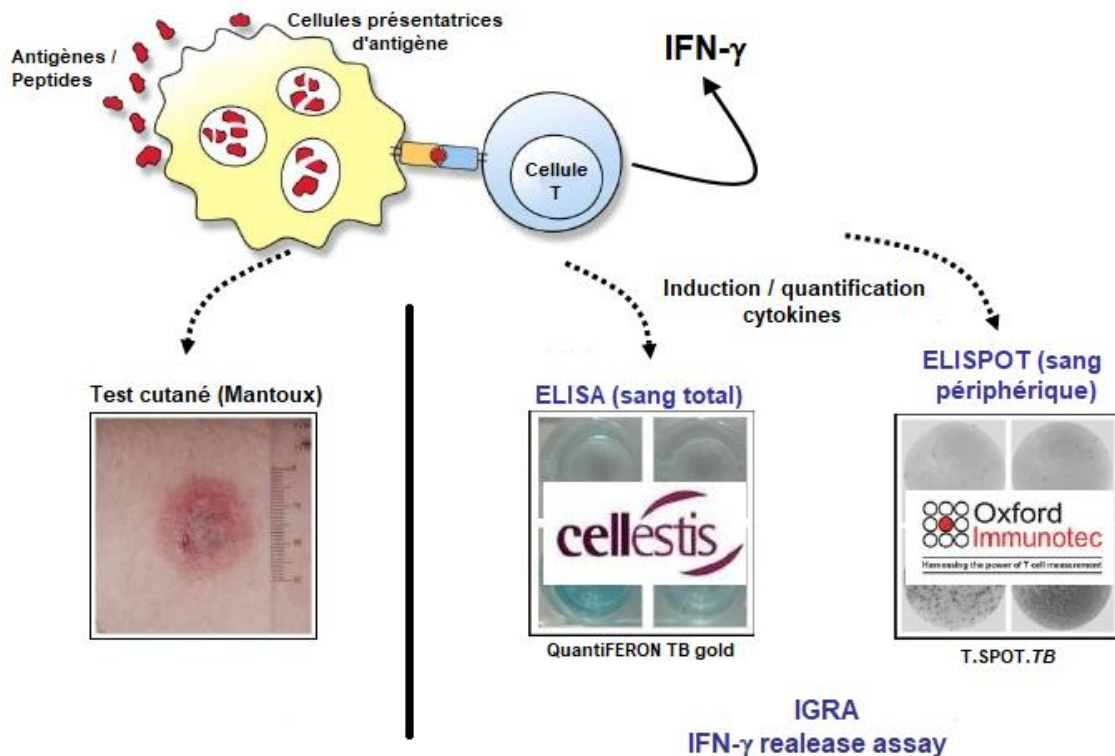


Figure I.7. Principe immunologique des tests de libération de l'IFN- γ disponibles sur le marché. Les cellules présentatrices d'antigène (CPA) telles que les cellules dendritiques rencontrent les antigènes, les ingèrent puis les digèrent. Les CPA présentent ensuite les antigènes aux cellules T spécifiques qui se chargent d'activer la sécrétion d'IFN- γ . Deux techniques de quantification de ces IFN- γ sécrétés sont alors utilisées, soit sur un échantillon de sang total par ELISA, soit sur le sang périphérique par ELISPOT. A noter que si l'antigène est spécifique à la tuberculose, seules les cellules T spécifiques de la tuberculose activeront et sécréteront les IFN- γ .

III.2) Diagnostic de la tuberculose pulmonaire (direct)

Les tests diagnostiques actuellement utilisés pour la tuberculose pulmonaire sont les suivants :

- Tests moléculaires rapides : le seul test rapide pour le diagnostic de la tuberculose pulmonaire recommandé par l'OMS est le dosage Xpert[®] MTB/RIF (Cepheid, USA). Il peut fournir des résultats en deux heures et il était initialement recommandé pour le diagnostic des tuberculoses pulmonaires chez les adultes. Depuis 2013, il est maintenant également recommandé pour les enfants et pour des formes spécifiques de TBEP.
- Microscopie des frottis d'expectoration : cette méthode a été développée il y a plus de 100 ans et se base sur l'analyse d'échantillons provenant d'expectorations par microscopie afin de déterminer la présence de bactéries. Cette technique est cependant beaucoup moins précise que celle décrite ci-dessus.
- Coloration de Ziehl-Neelsen : l'examen microscopique après coloration de Ziehl-Neelsen représente l'étape initiale et généralement l'unique possibilité dans de nombreux pays en développement pour poser un diagnostic.

Les organismes tels que les mycobactéries sont extrêmement difficiles à colorer par des méthodes ordinaires comme la coloration de Gram en raison de leur teneur élevée en lipides dans la paroi cellulaire. Le composé phénolique carbol-fuschine est utilisé comme colorant primaire car il est liposoluble. Un acide est alors utilisé pour décolorer les cellules non-acido résistantes tandis que les mycobactéries qui sont acido-alcool-résistantes (BAAR) résistent à cette décoloration. Après la décoloration, la lame est contre-colorée avec du vert malachite ou du bleu de méthylène qui colore le matériau de fond, fournissant ainsi une couleur de contraste par rapport à laquelle les BAAR rouges peuvent être observés.

La sensibilité de ce test est par contre faible et en termes de spécificité, l'examen microscopique ne reconnaît que les BAAR, propriété partagée par l'ensemble des mycobactéries.

- Méthodes de culture : actuellement considérées comme les méthodes de référence, elles requièrent néanmoins des structures particulières ainsi que du personnel expérimenté et peuvent prendre jusqu'à 12 semaines pour fournir un résultat.

La tuberculose pharmacorésistante est également au centre des attentions pour son diagnostic. En 2016, il y a eu 600 000 nouveaux cas de résistance à la rifampicine (RR-TB), le médicament de première ligne le plus efficace, dont 490 000 étaient atteints de tuberculose multirésistante (MDR-TB) [222]. Il existe également des tests pour les cas de tuberculoses résistantes aux médicaments de première et de seconde ligne. Ils comprennent le dosage Xpert[®] MTB/RIF qui teste simultanément la tuberculose et la résistance à la rifampicine; l'hybridation sur bandelette (ou Line Probe Assay, LPA) qui teste la résistance à la rifampicine et à l'isoniazide (référéncée comme LPA de première ligne); une LPA de seconde ligne qui cible cette fois-ci la résistance aux fluoroquinolones et les médicaments anti-tuberculeux injectables; et les technologies de séquençage. Cependant, les méthodes basées sur la culture restent le gold standard pour les tests de sensibilité aux médicaments. Au-delà du diagnostic, la tuberculose pharmacorésistante impose aujourd'hui la recherche de nouvelles cibles médicamenteuses car la menace est grandissante et de nouveaux traitements sont aujourd'hui nécessaires pour contrer la croissance exponentielle des cas de MDR-TB.

III.3) Traitements contre la tuberculose

Le traitement antibiotique de la tuberculose active comporte trois objectifs principaux :

- le premier consiste à réduire rapidement la population de bactéries qui se répliquent afin de résoudre les symptômes / signes, prévenir la mort et prévenir la transmission de l'infection;
- le second consiste à éliminer les sous-populations de bactéries persistantes qui pourraient provoquer une rechute après l'arrêt du traitement et ainsi obtenir une guérison durable;

- le troisième est de prévenir l'émergence de la résistance aux médicaments pendant la thérapie.

La thérapie combinatoire qui consiste à utiliser de manière simultanée plusieurs antibiotiques est requise pour parvenir à ces objectifs. En effet, le traitement utilisant plus d'un médicament repose sur deux principes : prévenir la résistance acquise aux médicaments et améliorer l'efficacité. Les bacilles tuberculeux subissent des mutations chromosomiques aléatoires qui les ont rendus résistants à toutes les drogues utilisés pour traiter la tuberculose. Heureusement, ces mutations sont rares [261]. Parce qu'il n'y a pas de lien en termes de localisation ou de fonction chromosomique, la génération spontanée d'un organisme à multirésistance est extrêmement improbable. La pharmacorésistance acquise pour la tuberculose est presque toujours due à un traitement inadéquat. Cela peut inclure l'échec du patient à prendre les médicaments prescrits, une prescription du médecin non approprié, l'échec du système de santé à s'assurer que les médicaments soient bien disponibles ou encore dans des cas plus rares un dysfonctionnement du système digestif du patient.

Il a été montré que le traitement combinatoire accélère la réponse de la maladie au traitement et diminue également la durée du traitement nécessaire pour la guérison [262]. La rifampicine et l'isoniazide sont les principaux médicaments utilisés aujourd'hui, la rifampicine étant l'agent le plus important en termes de réduction de la durée du traitement et d'obtention de résultats favorables [262]. Des thérapies de neuf mois utilisant la rifampicine et l'isoniazide, accompagnés d'une phase d'introduction d'éthambutol, ont été prédits pour guérir 95 % ou plus des patients [263]. Des études du *Medical Research Council* du Royaume-Uni ont montré que si la pyrazinamide est inclus dans le traitement pendant les deux premiers mois, la durée du traitement peut être réduite à six mois tout en conservant des taux de guérison de 95 % ou plus [264]. Depuis maintenant quelques années, avec l'émergence de MDR-TB, des résistances se mettent en place sur toutes ces drogues et les traitements deviennent ainsi de moins en moins efficaces. Tous ces antibiotiques font partie de ce que l'on appelle les antituberculeux de première ligne qui seront les seuls à être développés ici. Il existe cependant d'autres antituberculeux moins répandus de seconde et troisième ligne.

Pour les antituberculeux de première ligne, leurs modes d'action sur *M. tuberculosis* sont les suivants :

- La rifampicine (RMP) est l'un des antibiotiques les plus puissants et à large spectre utilisée contre les pathogènes bactériens et c'est un élément clé de la thérapie antituberculeuse, en raison de son inhibition de l'ARN polymérase bactérienne (ARNP) [265]. En effet, la RMP se diffuse librement dans les tissus, les cellules vivantes et les bactéries ce qui la rend extrêmement efficace contre *M. tuberculosis*. Le site catalytique de l'ARNP des bactéries a

une masse moléculaire d'environ 400 kDa et il a été conservé de manière évolutive chez tous les organismes vivants [266].

Cependant, les bactéries développent une résistance à la RMP avec une fréquence élevée, ce qui a conduit la communauté médicale aux Etats-Unis à restreindre volontairement son utilisation pour le traitement de la tuberculose ou des urgences. Les mutations conférant une résistance à RMP se retrouvent presque exclusivement dans le gène *rpoB* (codant pour la sous-unité β de l'ARNP) dans tous les organismes y compris *E. coli* [267] et *M. tuberculosis* [268].

- L'isoniazide (INH) est le médicament antituberculeux le plus largement utilisé. Des études génétiques chez *M. smegmatis* ont identifié la protéine InhA comme cible principale de cet antibiotique [269]. Une forme réactive de l'INH inhibe la InhA en réagissant avec le cofacteur NADH lié au site actif de l'enzyme formant alors un adduit covalent susceptible de se lier avec une forte affinité.

La caractérisation enzymatique de l'enzyme InhA purifiée recombinante a montré que la InhA était impliqué dans l'élongation des acides gras et/ou dans la synthèse des acides mycoliques [270].

La résistance peut survenir lors d'une expression accrue d'InhA ou par des mutations qui abaissent l'affinité de l'enzyme pour le NADH. Ces deux mécanismes de résistance sont observés dans 30 % des isolats cliniques de tuberculose [271]. La mutation de *katG*, qui code pour la catalase peroxydase, est la source la plus commune de résistance [272].

- L'éthambutol (EMB) a été introduit pour la première fois dans le traitement de la tuberculose en 1966 et fait partie du traitement de première intention pour le traitement de la maladie. L'EMB est bactériostatique [273], inhibe la polymérisation de l'arabinane de la paroi cellulaire de l'AG et du lipoarabinomannane (LAM) et induit l'accumulation de D-arabinofuranofuranosyl-P-décaprénol, un intermédiaire de la synthèse de l'arabinane [274]. L'arabinosyltransférase *embB* est une enzyme impliquée dans la synthèse de l'AG et a été proposée comme cible de l'EMB chez *M. tuberculosis* [275]. Son gène, *embB*, est organisé en opéron avec *embC* et *embA* dans l'ordre *embCAB*. *embC*, *embB* et *embA* partagent plus de 65 % d'identité entre eux et codent pour des protéines transmembranaires [275]. Les différents composants et enzymes de la paroi impactés par EMB seront développés dans le chapitre suivant dédié à la paroi mycobactérienne.

Des mutations dans l'opéron *embCAB*, en particulier *embB*, et occasionnellement *embC*, sont responsables de la résistance à l'EMB [275]. La mutation du codon 306 d'*embB* est la plus fréquente retrouvée dans les isolats cliniques résistants à l'EMB, représentant jusqu'à 68 % des souches résistantes [276]. Cependant, environ 35 % des souches résistantes à l'EMB

n'ont pas de mutations du gène *embB*, suggérant qu'il pourrait y avoir d'autres mécanismes de résistance à l'EMB [277].

- La pyrazinamide (PZA) est un antituberculeux unique qui joue un rôle clé dans le raccourcissement de la thérapie antituberculeuse. La PZA tue les souches que les autres antituberculeux ne parviennent pas à éliminer, ce qui en fait un médicament essentiel à inclure dans toutes les associations médicamenteuses pour le traitement de la tuberculose pharmacosensible et pharmacorésistante telle que MDR-TB [278].

Avant les années 70, la PZA était principalement utilisé comme un antituberculeux de seconde ligne mais des études cliniques ont ensuite montré que les effets de RIF et PZA étaient synergiques. Ces études ont également montré que le traitement pouvait être raccourci de 12 mois ou plus à 9 mois si RIF ou PZA était ajouté mais à 6 mois si les deux étaient inclus [279]. PZA a depuis été utilisé comme agent de première ligne pour le traitement de MDR-TB. PZA a la particularité d'agir sur les bacilles en dormance contrairement aux autres antibiotiques. Il se diffuse dans le granulome où il est converti en acide pyrazinoïque qui est la forme active de la molécule grâce à l'action de la pyrazinamidase [280]. Cet acide pyrazinoïque a plusieurs effets sur la mycobactérie en inhibant notamment l'acide gras synthase (FAS I) [281]. Il peut également se lier à la protéine ribosomique S1 (RpsA) et ainsi inhiber la traduction qui serait à l'origine de la destruction des mycobactéries en dormance [282].

Les résistances à la PZA proviennent pour la majorité de mutations sur le gène *pncA* codant la pyrazinimidase [282].

- La streptomycine (SM) est un aminoglycoside qui interagit directement avec la petite sous-unité ribosomique contrairement à la plupart des antibiotiques qui agissent sur la croissance des bactéries en ciblant la biosynthèse protéique [283]. La résistance à SM émerge lorsque des mutations apparaissent dans les gènes codant pour l'ARNr 16S et la protéine S12 codée par le gène *rpsL*.

SM a été le premier antibiotique utilisé contre *M. tuberculosis*. Elle a été utilisée pendant des années en monothérapie ce qui a fini par mener à des résistances; par conséquent, son utilisation a progressivement diminué. Mais compte tenu des taux de résistance détectés avec les médicaments antituberculeux actuels, l'utilisation de la streptomycine a suscité un regain d'intérêt. En effet, une étude réalisée sur 1496 souches de *M. tuberculosis* a permis de déterminer une résistance globale de 2,2 % à SM sur l'ensemble des souches testées ce qui la place dans la moyenne comparée aux autres drogues [284]. Malgré tout, la SM est maintenant passé dans le traitement antituberculeux de seconde ligne.

Pour tous ces antituberculeux, des résistances ont donc émergé ce qui amène aujourd'hui à la recherche de nouvelles cibles médicamenteuses afin d'élaborer de nouveaux traitements (Tableau I.1). Si l'on regarde les cibles actuelles des différents médicaments, on s'aperçoit également que les composants de la paroi mycobactérienne sont le plus souvent privilégiés, notamment en ce qui concerne la biosynthèse des acides mycoliques et de l'arabinogalactane (AG).

Tableau I.1. Cibles moléculaires impliquées dans la résistance aux antituberculeux de première ligne.

Les pourcentages sont corrélés à la proportion de souches résistantes ayant une mutation dans le gène [285].

Antituberculeux	Cibles	Gène(s)	Anomalies impliquées dans la résistance
Rifampicine	Sous-unité β de l'ARN polymérase	<i>rpoB</i> (99%)	Mutations faux-sens (93%) Délétions (4%) Insertions (3%)
Isoniazide	Catalase peroxydase	<i>katG</i> (60%)	Mutations faux sens Délétions
	Enoyl acyl carrier protein reductase	<i>inhA</i> (10 à 20%)	Mutations codon 94/95 Mutation promoteur
	Alkylhydroperoxide reductase	<i>ahpC</i> <i>kasA</i> <i>oxyR</i>	
Ethambutol	Arabinogalactane	<i>embA</i> , <i>embB</i>	Mutations <i>embB</i> (70%)
Pyrazinamide	Pyrazinamidase	<i>pncA</i>	Mutations Délétions Insertions
Streptomycine	Protéine ribosomale S12	<i>rpsL</i>	Mutations faux-sens (70%)
	ARNr 16S	<i>rrs</i>	Mutations

III.4) Développement de la tuberculose multi-résistante

Le développement de la résistance bactérienne a été identifié peu de temps après l'introduction des traitements antituberculeux dans les années 1940 [286]. Bien que des thérapies contenant de l'INH et de la RMP aient été mis au point au cours des 30 années qui ont suivies, le terme de tuberculose multirésistante (MDR-TB), qui dénote une résistance à ces deux médicaments, n'a été largement utilisé qu'au début des années 1990 [287].

Peu de temps après, des souches tuberculeuses de plus en plus résistantes ont été signalées et, en 2006, l'OMS a introduit la définition de la tuberculose ultrarésistante (XDR-TB) – une amélioration de la tuberculose multirésistante – définie comme une souche résistante non seulement à l'INH et à la RMP, mais également à la fluoroquinolone et à l'un des trois antituberculeux injectable de seconde ligne (kanamycine, amikacine, ou capreomycine) [288].

En 2007, lorsque des cas de tuberculose résistants à tous les médicaments de première et seconde ligne ont été identifiés pour la première fois publiquement, le terme de pharmacorésistance extrême a d'abord été utilisé pour qualifier ces souches [289], mais ce

type de résistance a été renommé totalement pharmacorésistant dans des publications ultérieures. L'OMS a cependant recommandé de ne pas définir la résistance au-delà d'une tuberculose ultrarésistante faute de preuves montrant que ces souches, définies comme totalement résistantes lorsqu'elles sont cultivées *in vitro*, sont en corrélation avec les résultats cliniques.

En revanche, les termes MDR-TB et XDR-TB ont une signification clinique. Ces termes ont été choisis à l'origine non seulement parce qu'ils possèdent des profils de résistance reproductibles, mais également parce qu'ils décrivent la résistance aux médicaments antituberculeux les plus puissants. Les patients atteints de tuberculose multirésistante présentent des taux élevés d'échec thérapeutique et de décès [290], et les résultats sont encore plus médiocres chez les patients atteints de tuberculose ultrarésistante [291]. Des taux de mortalité particulièrement élevés ont été rapportés chez les personnes co-infectées par une tuberculose ultrarésistante et par le VIH.

Les résultats médiocres chez les patients atteints de tuberculose multirésistante et ultrarésistante ont été attribués à la perte d'efficacité et à la toxicité accrue des médicaments de seconde ligne ainsi qu'à la longueur du traitement.

Le développement de traitements plus sûrs et plus efficaces pour lutter contre la tuberculose à bacilles résistants a été identifié comme une priorité par l'OMS, et plusieurs nouveaux médicaments et schémas thérapeutiques sont en cours de développement.

Conclusion du premier chapitre

Au cours du siècle qui s'est écoulé entre la découverte du bacille tuberculeux par Koch et la mise au point d'un traitement capable de guérir la tuberculose en seulement 6 mois, les progrès biomédicaux fulgurants ont permis d'apprivoiser un tueur aussi redoutable que la tuberculose.

Alors que de grands progrès ont été réalisés dans la lutte contre la tuberculose dans les pays riches, le fardeau mondial de la maladie n'a jamais diminué et l'avènement de l'épidémie de VIH ainsi que l'apparition de maladies pharmacorésistantes ont déclenché une nouvelle crise mondiale. Mais la perte d'intérêt pour l'innovation, la découverte et l'amélioration des outils disponibles pour contenir la maladie n'ont fait qu'accroître cette situation. Ce n'est qu'au cours des dernières années que la communauté mondiale de la santé publique a reconnu l'importance de chercher continuellement de nouvelles stratégies pour combattre la maladie.

C'est pour cela que l'OMS a créé la 'End TB Strategy' avec pour objectif une réduction de 90 % de l'incidence de la tuberculose dans les vingt prochaines années, ainsi qu'une réduction de 95 % des décès dus à la tuberculose et à la fin des coûts exorbitants pour les personnes et les familles touchées par la tuberculose [292]. Cette stratégie semble ambitieuse car les taux actuels de baisse de l'incidence se situent entre 1 et 2 points par an alors qu'une diminution de 15 points par an est nécessaire pour arriver à l'objectif fixé. Son succès repose donc sur le développement rapide d'un nouvel arsenal de diagnostics, de biomarqueurs, de médicaments pour traiter et prévenir la tuberculose et enfin d'un vaccin très efficace qui pourrait venir remplacer le vaccin BCG actuel.

Une partie du problème est que les stratégies de santé publique pour lutter contre la tuberculose sont basées uniquement sur le modèle d'identification et de traitement des cas de maladie depuis les années 1970, croyant à tort que la recherche de cas et la prescription du traitement adéquat étaient tout ce qui était nécessaire pour réduire l'incidence. Peu d'attention cependant a été accordée à la prévention de la tuberculose, même dans les populations les plus à risque d'infection latente, telles que les jeunes enfants, les contacts familiaux et les personnes infectées par le VIH alors qu'il s'agit ici des pistes les plus sérieuses sur lesquelles il faut se pencher pour enrayer la maladie. En effet, la modélisation épidémiologique montre aujourd'hui clairement qu'il est nécessaire d'attaquer le réservoir d'infections latentes à l'origine de futurs cas si l'on veut contenir la tuberculose.

Si l'on fait maintenant le lien avec le projet de thèse, celui-ci s'insère parfaitement dans les besoins actuels de lutte contre la tuberculose. D'un point de vue fondamental, rechercher de nouvelles enzymes impliquées dans la paroi mycobactérienne permet de mieux appréhender les différents mécanismes qui y sont associés, que ce soit en termes de

biosynthèse mais aussi de catabolisme. D'ailleurs, si la plupart des voies biosynthétiques de la paroi mycobactérienne sont aujourd'hui bien connues, il en est tout autre pour un éventuel catabolisme où un seul article en fait référence dans la littérature [293].

D'un point de vue plus concret, démontrer un catabolisme de la paroi mycobactérienne et identifier les enzymes associées, et plus particulièrement ici dans le cas de l'AG, permettrait de rechercher des inhibiteurs potentiels à ces enzymes et ainsi développer de nouveaux traitements contre la tuberculose. En effet, pour s'adapter à son environnement et notamment au granulome, les mycobactéries sont capables de moduler la structure de leur paroi [294]. En empêchant ce remodelage par ciblage des enzymes impliquées, il est fort probable que la mycobactérie ne puisse survivre.

C'est pour toutes ces raisons que le second chapitre va s'articuler autour de la paroi mycobactérienne et aux différents composants qui la définissent. Celui-ci va également permettre de faire un tour d'horizon des différents acteurs connus à l'heure actuelle dans la biosynthèse et le catabolisme de ces constituants de la paroi mycobactérienne afin de mieux replacer le sujet de thèse dans son contexte.

Chapitre II : La paroi cellulaire au cœur de la machinerie mycobactérienne

La remarquable complexité moléculaire de la paroi mycobactérienne est une caractéristique particulièrement distinctive qui différencie les espèces mycobactériennes des autres procaryotes. Bien qu'elles soient classées comme organismes à Gram positif, leurs enveloppes partagent en fait des caractéristiques notables avec les parois cellulaires à Gram négatif, comme par exemple l'existence d'une barrière externe perméable agissant comme une pseudo-membrane externe. Une grande partie de la définition structurelle de la paroi mycobactérienne a été réalisée dans les années 1960 et 1970 et a ensuite été poursuivie par Minnikin et *al.* qui ont proposé en 1982 le modèle structural qui est actuellement accepté pour l'architecture de la paroi cellulaire [295].

Cette paroi mycobactérienne est composée de trois entités majeures (Figure II.1). La couche la plus interne est la membrane plasmique qui est typique des membranes bactériennes à l'exception de la présence de glycolipides, lipoglycanes et lipoprotéines spécifiques aux mycobactéries. En dehors de la membrane plasmique se trouve le noyau de la paroi composé du peptidoglycane (PG) en liaison covalente avec l'hétéropolysaccharide arabinogalactane (AG) *via* des unités de liaison phosphoryl-N-acétylglucosaminosyl-rhamnosyle, qui est à son tour estérifié à ses extrémités non réductrices en acides mycoliques à longues chaînes carbonées (C60-C90) α -alkyles et β -hydroxyles. Le noyau de la paroi mycobactérienne, aussi appelé complexe mycolyl-arabinogalactane-peptidoglycane (mAGP) constitue approximativement 35 % de la paroi mycobactérienne. Ce complexe est essentiel pour la viabilité de la mycobactérie et il est aussi le site de résistance et de susceptibilité à de nombreux médicaments antituberculeux [296], [297]. Les acides mycoliques liés à l'AG (mAG) forment la majeure partie du feuillet interne de la membrane externe, avec la couche externe constituée d'une variété de glycolipides, lipoglycanes (lipomannane et lipoarabinomannane) et lipoprotéines liés de manière non covalente, certains d'entre eux étant glycosylés. L'organisation et la composition de cette bicouche externe asymétrique aussi appelée *mycomembrane* ou membrane externe [298], [299] confère à la mycobactérie une haute résistance intrinsèque à de nombreux agents thérapeutiques et aux mécanismes de défense de l'hôte [300]. Enfin, il a été montré qu'une structure capsulaire lâche rattachée à l'extérieur de la membrane externe était également présente [301], [302]. Les trois polysaccharides majeurs retrouvés dans cette capsule-like de *M. tuberculosis* sont de l' α -D-glucane de masse moléculaire élevée et de structure similaire à celle du glycogène, du D-arabino-D-mannane et du D-mannane [303], [304]. De plus, la nature et les quantités des différents composants de la membrane externe et de la capsule-like varient selon les isolats de *M. tuberculosis* et cette

diversité en terme de composition de surface a un impact significatif sur la façon dont *M. tuberculosis* agit avec l'hôte [305], [306].

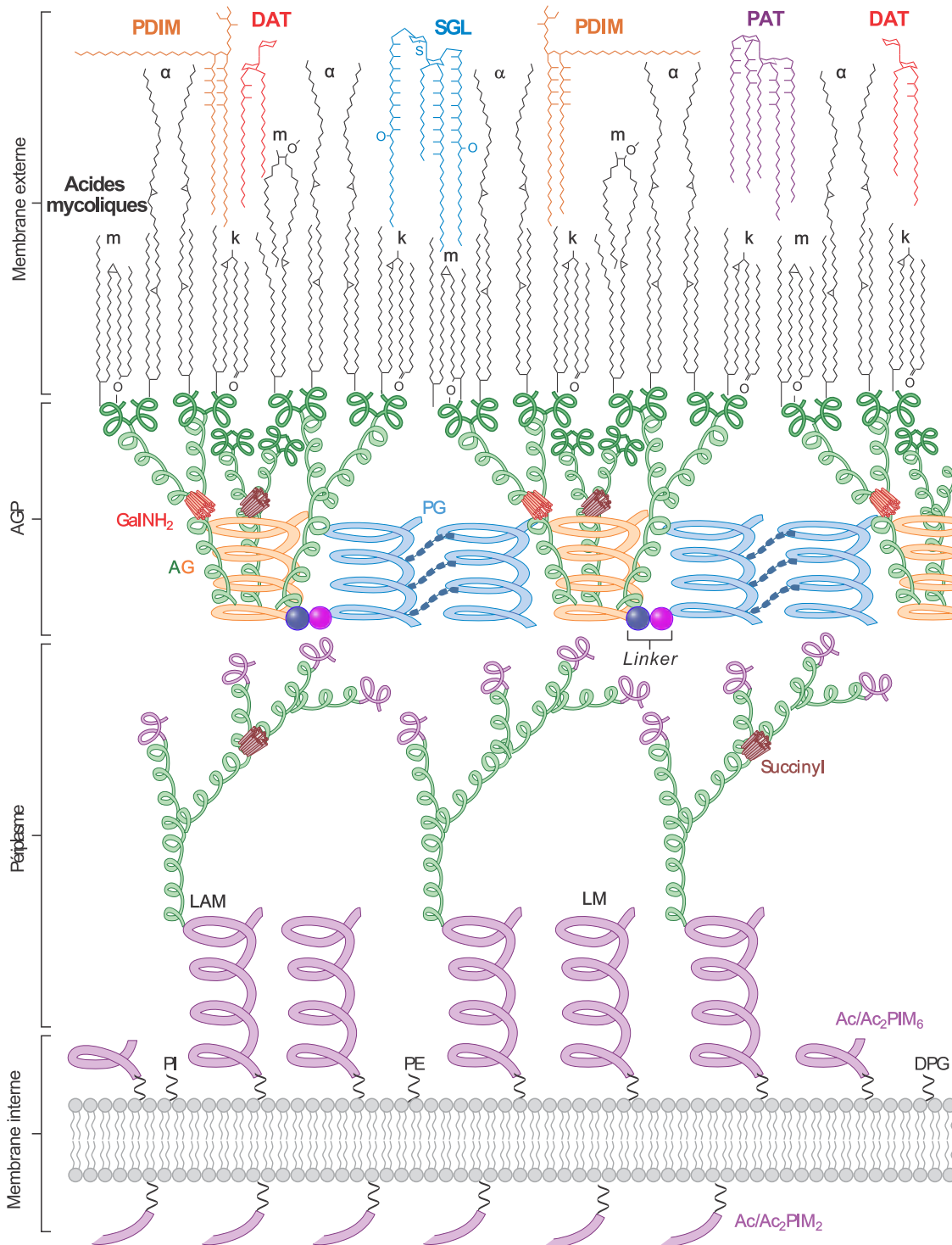


Figure II.1. Représentation schématique de l'enveloppe cellulaire de *M. tuberculosis*.

La capsule-like n'est ici pas représentée car la structure n'est pas encore totalement élucidée. Abréviations : Ac/Ac₂ PIM₂, tri-/tétra-acylé phosphatidyl-myo-inositol-dimannoside; Ac/Ac₂ PIM₆, tri-/tétra-acylé phosphatidyl-myo-inositol-hexamannoside; AG, arabinogalactane; AGP, complexe arabinogalactane-peptidoglycane; DAT, diacyltréhalose; DPG, diphosphatidylglycérol; GalNH₂, résidu galactosamine; k, céto; LAM, lipoarabinomanne; LM, lipomannane; m, méthoxy; AM, acides mycoliques; PAT, polyacyltréhalose; PDIM, phtiocérol dimycocérosate; PE, phosphatidyléthanolamine; PG, peptidoglycane; PI, phosphatidyl-myo-inositol; SGL, sulfoglycolipide [307]

Comme on peut le constater sur la Figure II.1, la paroi mycobactérienne est très riche et très diversifiée en termes de composition et de structure. Le projet de thèse se concentre sur une partie de la paroi en particulier, à savoir l'AG, mais il est également important de savoir ce qui a déjà été découvert sur les autres éléments de la paroi et notamment au niveau du complexe mAGP afin de mieux cerner l'environnement de cet AG. C'est pour cette raison que la seconde partie de l'introduction va se focaliser sur la structure et le métabolisme de ces différents constituants de la paroi avec une attention toute particulière sur l'AG qui reste le point central du projet. Au-delà du complexe mAGP, un intérêt sera également porté aux LM et LAM qui possèdent des chaînes d'arabinane que l'on retrouve aussi dans l'AG.

I) Le peptidoglycane mycobactérien

I.1) Structure du peptidoglycane

Le peptidoglycane (PG) est présent dans presque toutes les bactéries, assurant la forme, la rigidité et la stabilité osmotique des bacilles à Gram négatif et Gram positif [308]. Tous les PG produits par des bactéries partagent la même structure de base : un squelette glycanique et de courtes chaînes latérales peptidiques réticulées [309]. Le squelette est généralement composé de *N*-acétylglucosamine (GlcNAc) et d'acide *N*-acétylmuramique (MurNAc) liés via des liaisons β -(1→4) [310]. Cependant, les PGs mycobactériens possèdent une modification structurale notable : Le résidu MurNAc est oxydé en acide *N*-glycolylmuramique (MurNGlyc) [311], [312]. Cette modification est censée être impliquée dans l'augmentation de la résistance globale du PG en fournissant des sites pour les liaisons hydrogène, ainsi que dans la sensibilité décroissante potentielle du lysozyme [312]. Les chaînes latérales tétrapeptidiques sont attachées aux composants muramyl qui se ramifient pour former une structure en maillage. Chez *M. tuberculosis*, ces chaînes latérales sont composées de L-alanyl-D-isoglutaminyl-*meso*-diaminopimétyl-D-alanine ramifiées entre le résidu acide *meso*-diaminopimélique (*m*-DAP) d'une première chaîne et la D-alanine d'une seconde chaîne en formant une liaison (3→4), ce qui signifie que *M. tuberculosis* possède un PG du groupe Al- γ selon le système de classification de Schleifer et Kandler [308]. De plus, *M. tuberculosis* a la capacité de modifier les liaisons (3→4) en liaisons (3→3) sans passer par une synthèse *de novo* du PG, ce qui lui permet d'assurer la protection de la mycobactérie contre les endopeptidases [313]. Le PG mycobactérien a également la capacité de former un grand nombre de liaisons *m*-DAP-(3→3)-*m*-DAP qui augmentent lorsque le bacille entre en phase stationnaire (plus de 80 % de ramifications de ce type) [313].

I.2) Biosynthèse du peptidoglycane

La voie séquentielle Mur ligase est le contributeur majeur de la biosynthèse du PG (Figure II.2). MurA (Rv1315) possède une activité énoylpyruvyl transférase qui ajoute le

phospho-énol-pyruvate à l'UDP-GlcNAc pour former l'UDP-énoylpyruvyl-GlcNAc [314]. MurB (Rv0482) utilise ensuite le NADPH pour réduire le groupement énoylpyruvyl en groupement ether de lactoyle pour former de l'UDP-MurNAc [315]. NamH (Rv3808) hydroxyle alors l'UDP-MurNAc en UDP-MurNGlyc pour fournir les deux types de substrats UDP-muramyl [312]. A partir de ce point, les résidus d'acides aminés sont attachés à l'UDP-MurNAc/Glyc par les ligases Mur ATP-dépendant, en commençant avec la ligature de l'UDP-*N*-acetylmuramoyl:L-alanine par MurC (Rv2151c). S'ensuit l'ajout du D-isoglutamate par MurD (Rv2155c), l'addition du *m*-DAP par MurE (Rv2158c), et enfin l'ajout de la D-alanyl-D-alanine par MurF (Rv2157c) [316]. Le produit ainsi formé s'apparente au nucléotide de Park, à savoir le pentapeptide muramyl suivant : UDP-MurNAc/Glyc-L-ala-D-isoglu-*m*-DAP-D-ala-D-ala [317]. Chez *M. tuberculosis*, seules MurB [318], MurC [319] et MurE [320] ont été biochimiquement caractérisées. Ce nucléotide de Park est ensuite transféré sur un décaprényl phosphate par MurX (Rv2156c), aussi connue sous le nom de MraY [321], donnant ainsi lieu à ce que l'on appelle le Lipide I. MurG (Rv2153c) attache le GlcNAc de l'UDP-GlcNAc sur le lipide I via une liaison β -(1→4) entre le résidu GlcNAc et le MurNAc/Glyc afin de former le Lipide II, l'unité monomérique finale de la synthèse du PG [322]. Il y a actuellement un débat quant à l'identité de la Lipide II flippase, qui permet la translocation du Lipide II à travers la membrane plasmique. Initialement, elle a été reportée comme étant MurJ chez *E. coli* (Rv3910) par Ruiz [323], mais a par la suite été contestée par Mohammadi *et al.* [324]. Cependant, le groupe de Ruiz a récemment reporté des données *in vivo* de *E. coli* qui prètent plus de crédibilité à l'identification de la flippase comme étant MurJ [325]. Quoi qu'il en soit, des recherches approfondies sur ces deux enzymes doivent être menées pour caractériser entièrement la Lipide II flippase mycobactérienne.

Des inhibiteurs de ces différentes enzymes impliquées dans la biosynthèse du PG existent mais beaucoup d'efforts doivent encore être fournis pour déterminer la totalité d'entre eux. En effet, les inhibiteurs de *M. tuberculosis* MuraA et MurB restent encore à découvrir. Tandis que le produit naturel, l'antibiotique à large spectre fosfomycine, cible MurA chez les bactéries à Gram négatif, le résidu crucial pour l'inhibition est absent chez *M. tuberculosis*, fournissant alors la résistance intrinsèque contre cette antibiotique [314]. De ce fait, un inhibiteur avec un nouveau mode d'action est nécessaire pour cibler MurA chez *M. tuberculosis*. Un nombre limité d'inhibiteurs ont été reportés contre MurB. Des études par dynamique moléculaire et *docking* sur les inhibiteurs existants de MurB (dérivés de 3,5-dioxypyrazolidine) ont révélé l'activité potentielle de ces composés qui pourront être utilisés comme modèle pour la conception de futurs médicaments [326]. Les inhibiteurs de NamH n'ont pas été documentés; *namH* n'est pas essentiel chez *M. smegmatis*, et n'est donc pas propice à une propriété prioritaire de cible caractéristique. Cependant, la délétion de gène

conduit à une souche hypersensible aux antibiotiques β -lactame et au lysozyme. Les inhibiteurs de NamH pourraient donc potentialiser l'effet des β -lactames [312].

En ce qui concerne les Mur ligases permettant l'attachement des différents acides aminés composant le PG, celles-ci partagent des propriétés communes comme le mécanisme réactionnel, les six résidus 'Mur' invariants, une séquence consensus de liaison à l'ATP ou encore des domaines structuraux [327]. En raison de ces similitudes, il est fort probable qu'un seul inhibiteur puisse cibler plus d'une Mur ligase et de tels inhibiteurs ont été reportés dans la littérature [328]. De nombreuses petites molécules inhibitrices de ces Mur ligases ont été découvertes et ont fait l'objet d'études approfondies [329]. Dans la plupart des cas, ces inhibiteurs ont été identifiés à partir de campagnes de criblage à haut débit de banques de composés en utilisant des dosages cinétiques *in vitro*.

Après translocation du Lipide II à travers la membrane, les enzymes bifonctionnelles PonA1/PBP1 (Rv0050) et PonA2/PBP2 (Rv3682) transglycosylent les monomères du Lipide II en attachant le résidu GlcNAc au résidu muramyl du PG [330]. En plus de leur domaine de transglycosylation, PonA1 et PonA2 possèdent une activité transpeptidase, permettant la formation des liaisons classiques (3→4) entre le *m*-DAP et la D-ala, au détriment du clivage au niveau de la chaîne latérale peptidique D-ala-D-ala [331]. D'autres domaines de PonA1 et PonA2 comprennent une hélice transmembranaire et un domaine PASTA (*penicillin-binding protein and serine/threonine kinase associated domain*). Cependant, il ne se comporte pas comme un domaine PASTA classique car il ne lie pas les ligands attendus [332]. Quand *M. tuberculosis* entre en dormance, le nombre de liaisons (3→3) entre les résidus *m*-DAP augmente par un réarrangement du PG *via* des L,D-transpeptidases atypiques [333]. Cinq paralogues ont été identifiés au sein de *M. tuberculosis* : *LdtMt1* (Rv0116c), *LdtMt2* (Rv2518c), *LdtMt3* (Rv1433), *LdtMt4* (Rv0192) et *LdtMt5* (Rv0483). Les L,D-transpeptidases effectuent la conversion des liaisons (3→4) en liaisons (3→3) par clivage du résidu D-ala de la chaîne donneuse, laissant derrière elles une chaîne tripeptidique dans la phase stationnaire du PG [334]. Cependant, seules des souches Δ LdtMt1 et Δ LdtMt2 ont montré des différences phénotypiques dans la structure du PG [335].

Les inhibiteurs mentionnés jusqu'à présent ciblent directement les enzymes impliquées dans la biosynthèse du PG. Il existe cependant d'autres antibiotiques qui agissent sur les précurseurs du PG. Par exemple, les glycopeptides vancomycine et teicoplanine se lient aux D-ala-D-ala terminaux du pentapeptide, empêchant ainsi les réactions de polymérisation [336]. Les membres de la famille d'antibiotiques des lantibiotiques tels que la nisine interagissent avec le résidu pyrophosphate du lipide II, formant alors un pore dans la membrane cytoplasmique, ce qui inhibe la biosynthèse du PG [337]. Le lipoglycopeptide ramoplanine inhibe quant à lui l'action de MurG en se liant au lipide I. La ramoplanine peut également se lier au lipide II, ce qui empêche sa polymérisation [338].

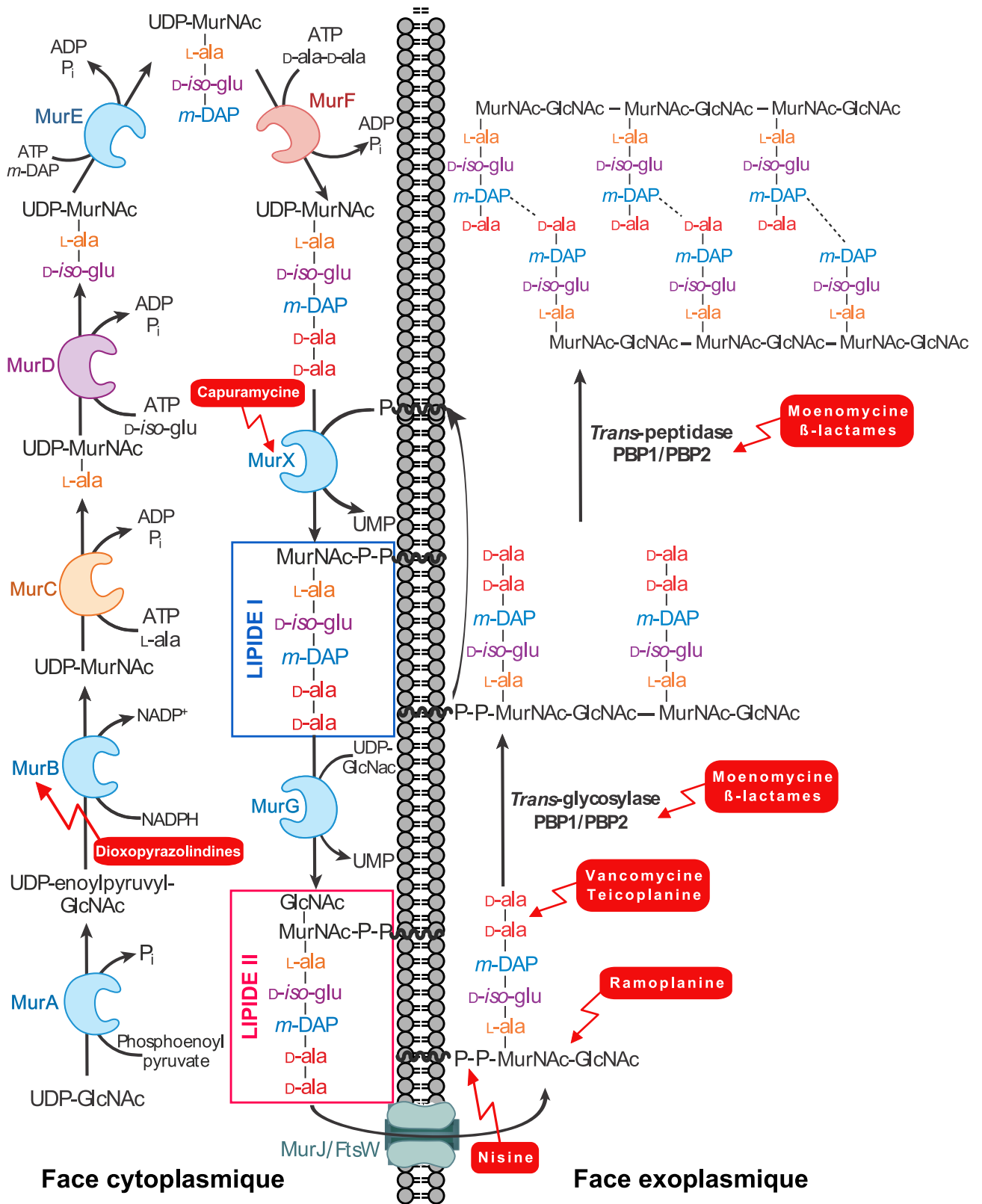


Figure II.2. Schéma de biosynthèse du peptidoglycane avec les différentes enzymes impliquées et les inhibiteurs associés.

I.3) Turnover du peptidoglycane

On connaît à ce jour peu de choses sur la dégradation et le recyclage du PG chez les mycobactéries. CwlM (Rv3915) et Rv3717 sont des amidases de *M. tuberculosis* qui clivent le PG entre les résidus MurNAc et le premier L-Ala de la chaîne peptidique [339]. En outre, le génome de *M. tuberculosis* code potentiellement pour sept endopeptidases de la famille NPL/P60. Les deux membres les plus étudiées de cette famille sont RipA (Rv1477) et RipB (Rv1478) qui clivent les fragments du PG entre le D-isoglu et le *m*-DAP [340]. Enfin, *M. tuberculosis* possède cinq gènes *rpf-like* codant pour des protéines partageant des caractéristiques structurales communes avec le *lysozyme-like* (dérivé de l'enzyme lysozyme qui hydrolyse le PG), ce qui suggère qu'ils peuvent cliver la chaîne glycanique du PG [341]. Le mécanisme par lequel les protéines Rpf stimulent la réactivation cellulaire et la croissance est encore incertain. Alors que le clivage du PG par les protéines Rpf peut directement expliquer l'initiation de la réplication après une période de latence, il a également été proposé que les muropeptides libérés à la suite de l'action des protéines Rpf puissent agir comme des molécules de signalisation dans l'hôte. Ils pourraient également stimuler la protéine Ser/Thr kinase PknB pour réguler indirectement la biosynthèse de l'enveloppe cellulaire et la division cellulaire [342].

II) L'arabinogalactane mycobactérien

II.1) Structure de l'arabinogalactane

L'AG est un composant structural clé du complexe mAGP. En effet, cet hétéropolysaccharide joue un rôle important dans l'ancrage covalent de la couche des acides mycoliques à la couche interne du peptidoglycane. Il est également unique dans sa composition car il n'est constitué que de glycanes sous forme furanique [343] (Figure II.3).

Contrairement à la plupart des polysaccharides bactériens, l'AG ne comporte pas d'unités répétitives mais se compose plutôt de quelques motifs structuraux bien distincts [344]. De précédentes recherches ont montré que l'AG était attaché de manière covalente au PG via une unité *linker* spécifique [345]. Dans cette étude, la dépolimérisation partielle de l'AG per-*O*-alkylé et l'utilisation de la méthylation ont permis de générer des oligomères qui ont été analysés par GC-MS, mais aussi par spectrométrie de masse FAB (*Fast Atom Bombardment*) et par spectroscopie RMN, dans le but d'élucider en détail la structure de l'AG. Il en est ressorti qu'à l'extrémité réductrice de ce polysaccharide, l'unité *linker* connecte la chaîne de galactane linéaire en position C-6 d'un résidu acide *N*-glycolyl-muramique (MurNGly) provenant du PG. Ce *linker* contient un pont di-glycosyl-phosphoryle, α -L-Rhap-(1→3)- α -D-GlcNAc-(1→P), structure propre aux mycobactéries et à d'autres actinomycètes [345].

La chaîne galactane de l'AG se compose d'environ 30 résidus de galactofuranose liés entre eux alternativement par des liaisons β -(1→5) et β -(1→6) sous forme linéaire. Trois chaînes d'arabinane, chacune contenant environ 30 résidus d'arabinose (Araf), viennent se greffer au niveau du carbone C-5 de certains résidus β -(1→6)-Gal [344] [346]. Le domaine arabinane, en contraste avec le galactane linéaire, est fortement ramifié. L'AG étant un composant essentiel de la mycobactérie, sa structure a aussi été étudiée dans le genre apparenté *Corynebacteria* dans lequel l'AG n'est pas essentiel. Des études de délétion dans *Corynebacterium glutamicum*, couplées à des analyses en spectrométrie de masse, ont mises en avant que les trois chaînes d'arabinane sont attachées sur les galactoses en position 8, 10 et 12 de la chaîne galactane dans *C. glutamicum* [347]. La majorité des résidus Araf forment un squelette contenant des résidus α -D-Araf liés en α -(1→5) avec des ramifications introduites sur l'hydroxyle C-3 formant alors des résidus 3,5- α -D-Araf [344]. A l'extrémité non réductrice de l'AG, le domaine arabinane ramifié est attaché de manière covalente aux acides mycoliques de la membrane externe, complétant ainsi le complexe mAGP dans son intégralité. Des études ont également montré que les extrémités non réductrices des chaînes d'arabinane sont constituées du motif suivant : [β -D-Araf-(1→2)- α -D-Araf]₂-(1→3,5)- α -D-Araf-(1→5)- α -D-Araf-(1→5)-(1→), avec les acides mycoliques liés en position 5 des unités β -D-Araf et des unités pénultièmes 2- α -D-Araf [348]. Des analyses approfondies en GC-MS ont démontré que les unités mycolyl sont regroupées par groupe de quatre sur l'hexa-arabinofuranoside terminal. Cependant, seul deux tiers d'entre elles sont mycolylées sous condition physiologique [348].

D'autre part, des substituants galactosamine (D-GalN) et succinyl ont été identifiés en position C-2 de certains résidus 3,5- α -D-Araf [346], [349], [350], [351]. Il a été estimé qu'un résidu de D-GalN par AG est présent et il est retrouvé exclusivement dans les parois mycobactériennes des espèces à croissance lente, comme *M. tuberculosis* par exemple. En revanche, jusqu'à trois résidus de succinyl sont présents par AG et on les retrouve aussi bien dans les espèces mycobactériennes à croissance lente qu'à croissance rapide. De plus, seules les chaînes d'arabinane non mycolylées sont succinylées, et aucune des chaînes d'arabinane décorée ne possède les deux substituants. Ces deux structures décoratives contribuent d'ailleurs à la rigidité et à l'étanchéité de l'AG; le D-GalN protoné par exemple peut interagir avec des substances anioniques, telles que les succinates chargés négativement [346].

Il a également été montré par des expériences sur des mutants *KO* pour l'enzyme de branchement du D-GalN chez *M. tuberculosis* que la présence de ce substituant abroge la maturation complète et l'activation des cellules dendritiques humaines. Elle stimulerait également l'augmentation de la sécrétion des IL-10 et la diminution de l'activation des récepteurs *Toll-Like 2* (TLR2) [4]. Les AG purifiés des souches WT ou des mutants D-GalN-déficient n'altèrent pas la maturation des cellules dendritiques, il a été postulé que la présence

du résidu D-GalN protoné sur l'AG, à travers ses interactions avec les composés anioniques de la membrane externe, pourrait altérer la topologie de la surface cellulaire, modulant ainsi les interactions avec les récepteurs de la cellule hôte et résultant en la répression de la réponse immunitaire initiale [4]. La signification biologique des substituants succinyl n'a quant à elle pas encore été définie. Il a été proposé que les résidus succinyl chargés négativement interagissent avec le D-GalN protoné, menant alors à une structure d'AG plus resserrée et plus rigide [352]. L'observation que les chaînes d'arabinane mycolylées sont dépourvues de substituant succinyl a également conduit à la suggestion que la succinylation pourrait contrôler négativement la mycolylation [352].

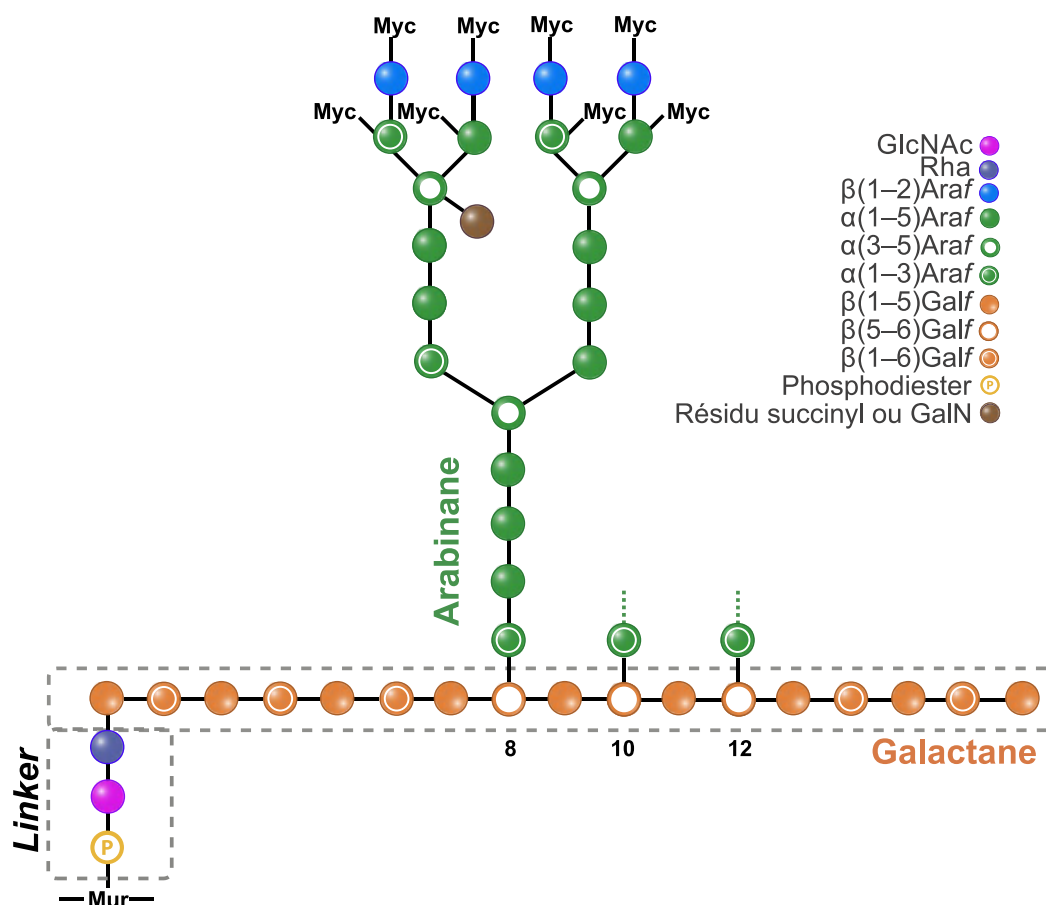


Figure II.3. Modèle structurale de l'arabinogalactane [307].

II.2) Biosynthèse de l'arabinogalactane

II.2.a) Biosynthèse de l'unité *linker*

Les différents constituants de l'AG du complexe mAGP sont tous synthétisés sur un transporteur lipidique decaprenyl phosphate (P-C₅₀), avant d'être rattachés au PG et aux mycolates. La biosynthèse de cette unité *linker* s'effectue du côté cytoplasmique de la membrane et démarre avec le transfert d'une GlcNAc-1-P provenant de l'UDP-GlcNAc sur le

transporteur lipidique grâce à la GlcNAc transférase WecA (Rv1302) [353], [354]. Cette enzyme WecA chez *M. tuberculosis* montre des homologies significatives avec celles retrouvées chez les bactéries Gram négatif, comme *E. coli* où elle catalyse la première étape de la biosynthèse du lipopolysaccharide antigène O [354]. Des études sur des mutants KO à l'aide de la microscopie électronique en transmission (MET) ont également mis en avant le fait que *wecA* est essentiel pour la croissance de *M. smegmatis* [354].

Ensuite, la rhamnosyltransférase WbbL encodé par *Rv3265c* attache le résidu rhamnose (Rha) sur le motif C₅₀-P-P-GlcNAc formant ainsi la structure C₅₀-P-P-GlcNAc-Rha [353], [355] correspondant à l'unité *linker* complète. L'inactivation d'un mutant de *M. smegmatis* sensible à la température a démontré que WbbL est essentielle pour la formation du linker AG-PG et qu'elle est par conséquent vitale pour la mycobactérie [355]. Des expériences *in vitro* couplées à de l'analyse bioinformatique de WbbL de *M. tuberculosis* ont offert une meilleure compréhension du mécanisme de cette enzyme et ont donc fourni des informations pour le développement de vaccins et de nouveaux médicaments anti-tuberculeux [356]. Le résidu Rha est fourni par le dTDP-Rha provenant d'une séquence réactionnelle à quatre étapes. RmlA, RmlB, RmlC et RmlD (Rv0334, Rv3464, Rv3465 et Rv3266c, respectivement) catalysent la conversion du α -D-Glc-1-P et du TTP en dTDP-Rha. Il a été montré par mutagénèse insertionnelle que l'inactivation des gènes *rmlB*, *rmlC* et *rmlD* dans *M. smegmatis* est létale pour la mycobactérie [357], [358].

Concernant les inhibiteurs, WecA a été identifiée comme cible de dérivés de la caprazamycine, tels que CPZEN-45, avec l'antibiotique nucléosidique d'origine montré pour cibler MraY [359]. Récemment, un test basé sur la fluorescence pour l'activité de WecA a été développé et utilisé pour cribler les banques de composés avec un certain succès [360]. Les inhibiteurs ciblant WbbL doivent encore être identifiés. Cette enzyme essentiel, présente dans toutes les mycobactéries, est reconnue comme une cible prometteuse et c'est pour cette raison que des recherches sont en cours pour caractériser l'enzyme *via* l'établissement d'un test basé sur du microtitrage afin de déterminer son activité qui pourrait par la suite être exploitée grâce au criblage de la banque d'inhibiteurs [361].

II.2.b) Biosynthèse de la chaîne galactane

Cette biosynthèse a lieu également au niveau de la face cytoplasmique de la membrane mycobactérienne. L'unité *linker* sert d'accepteur pour l'addition séquentielle de 30 résidus de Galf assemblés de manière linéaire. Deux galactofuranosyltransférases bifonctionnelles impliquées dans la biosynthèse de la paroi mycobactérienne ont été identifiées à ce jour, les deux utilisant l'UDP-Galf comme substrat [362], [363], [364]. GlfT1 (Rv3782) reconnaît spécifiquement l'unité *linker*, C₅₀-P-P-GlcNAc-Rha, et catalyse le transfert des deux premiers résidus Galf en position C-4 du Rha. Les autres résidus Galf sont ensuite ajoutés par la

seconde transférase GlfT2 (Rv3808c). Il a été démontré que GlfT2 agit aussi bien en tant que UDP-Galf:β-D-(1→5) galactofuranosyltransférase qu'en tant que UDP-Galf:β-D-(1→6) galactofuranosyltransférase. Elle est aussi responsable de l'essentiel de la biosynthèse du galactane en polymérisant séquentiellement ce polysaccharide et en alternant les liaisons β-(1→5) et β-(1→6) [362]. D'autres études ont été menées sur les propriétés biochimiques et biophysiques de GlfT1 et GlfT2 afin d'obtenir une meilleure compréhension de la biosynthèse de l'AG. De plus, des équipes ont proposé un mécanisme de polymérisation en chaîne dans lequel GlfT2 contrôle la longueur de la chaîne galactane. Cette variation de longueur de chaîne a d'ailleurs un impact direct les fonctions biologiques de la paroi et aurait donc un effet sur la virulence [365], [366].

II.2.c) Biosynthèse de la chaîne arabinane

Il est admis que les étapes suivantes de l'assemblage de l'AG, incluant la polymérisation de l'arabinane, s'effectuent du côté exoplasmique de la membrane. Malgré les investigations sur la nature du transport de ces polysaccharides pariétaux mycobactériens, les protéines impliquées dans ce processus restent à ce jour inconnues. Seules Rv3781 et Rv3783, codant pour un transporteur ATP Binding Cassette (ABC), seraient des candidates potentielles au rôle de *flippase* [367], [368].

Des études *in vitro* suggèrent que les résidus *Araf* sont transférés directement sur l'intermédiaire C₅₀-P-P-GlcNAc-Rha-Galf₃₀ préalablement synthétisé, en utilisant le seul donneur d'*Araf* connu chez les mycobactéries, à savoir le decaprenylmonophosphoryl-D-arabinose (DPA) [369]. La biosynthèse de ce sucre a été étudiée en détail et comporte plusieurs étapes se déroulant dans le cytoplasme, avant que celui-ci ne soit réorienté vers la face exoplasmique de la membrane [370], [371]. La réorientation du DPA dans le périplasme reste d'ailleurs inconnue. La flippase impliquée dans ce mécanisme avait récemment été associée à l'enzyme Rv3789, mais celle-ci semble finalement jouer un rôle différent de protéine d'ancrage pour le recrutement d'AftA [372]. Le DPA est synthétisé à partir du 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate (pRpp) et la première étape consiste au passage du pRpp au decaprenylphosphoryl-5-phosphoribose (DPPR), une réaction catalysée par UbiA (Rv3806c). La délétion du gène *ubiA* de *C. glutamicum* (NCgl2781) résulte en une perte complète de la chaîne arabinane, indiquant ainsi que le DPA est le seul donneur d'*Araf* dans la biosynthèse de l'AG [371]. La déphosphorylation du DPPR en decaprenyl-5-phosphoribose (DPR) est catalysée par la phosphatase Rv3807c, dont l'orthologue chez *M. smegmatis* (MSMEG_6402) a été montré comme étant un gène non essentiel [373]. Le produit déphosphorylé, DPR, est par la suite oxydé au niveau du 2-OH du ribose pour donner le decaprenylphosphoryl-2-kéto-β-D-erythropentofuranose (DPX), qui est lui-même réduit en DPA. DprE1 (Rv3790) et DprE2 (Rv3791) forment un hétérodimère et catalysent

l'épimérisation de l'unité ribosyl du DPR, menant alors au donneur essentiel DPA. L'implication possible d'une troisième enzyme (Rv2073c) a aussi été suggérée dans cette réaction d'épimérisation [374]. De nombreuses études ont été menées sur Rv3790 et Rv3791, et sur leurs orthologues respectifs chez *M. smegmatis* (MSMEG_6382 et MSMEG_6385) et *C. glutamicum* (NCgl0187 et NCgl0186) [374], [375]. Elles ont mises en évidence le caractère essentiel de *dprE1*, mais pas *dprE2*, conduisant donc à un mutant possédant un AG avec un taux réduit en arabinose et rhamnose comparé à la souche parentale [374]. La voie synthétique du DPA est d'ailleurs une cible médicamenteuse validée. Les nitrobenzothiazones (BTZs) et les dinitrobenzamides structurellement apparentés ciblent DprE1 et sont effectifs contre les souches MDR et XDR de *M. tuberculosis* avec une faible toxicité (Figure II.4).

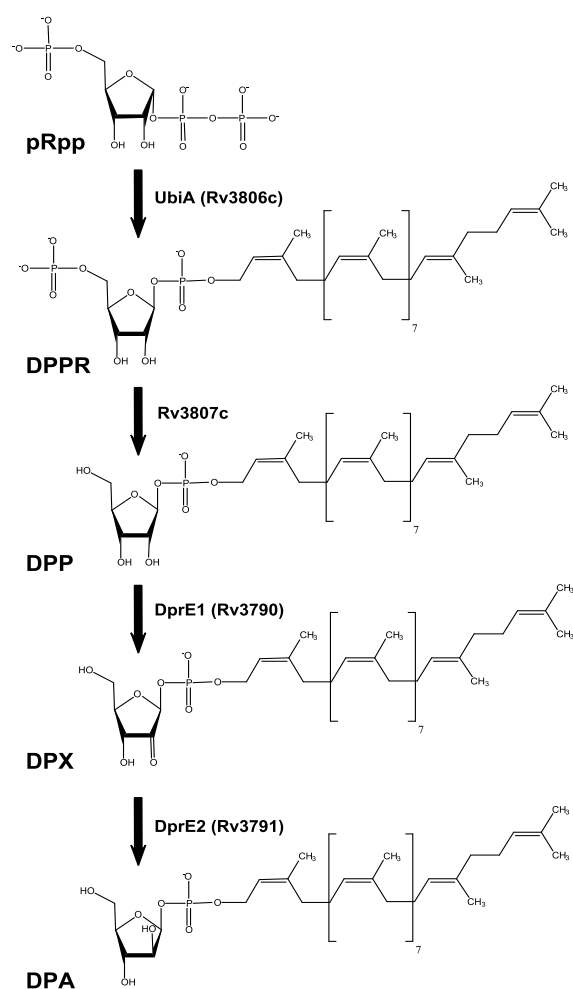


Figure II.4. Voie biosynthétique proposée pour la synthèse du decaprenylmonophosphoryl-D-arabinose (DPA) à partir du 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate (pRpp).

Pour revenir à la biosynthèse de la chaîne arabinane, une arabinofuranosyltransférase (AraF) provenant du locus *emb*, AftA (Rv3792), catalyse l'addition des tous premiers résidus d'Araf à partir du donneur DPA sur la chaîne galactane en positions 8,10 et 12, amorçant de

ce fait le galactane pour une extension par d'autres AraFTs [347]. Des expériences de *KO* sur l'homologue de *Rv3792* dans *M. smegmatis*, *MSMEG_6386*, ont montré que *aftA* est essentiel pour la viabilité de la mycobactérie [376]. La suite de la polymérisation de l'arabinane est catalysée par les enzymes EmbA (*Rv3794*) et EmbB (*Rv3795*) qui possèdent une activité α -1,5 transférase et agiraient comme un hétérodimère. Les protéines Emb jouent aussi un rôle clé dans la formation du motif hexa-arabinofuranosyl terminal [377]. Bien que la formation de l'AG des mycobactéries soit essentielle pour sa viabilité, les homologues de *Rv3794* et *Rv3795* dans *M. smegmatis* peuvent être perturbés, conduisant alors à un mutant viable avec une structure d'AG altérée. En comparaison avec *M. tuberculosis*, *C. glutamicum* ne semble posséder qu'un seul gène *emb* qui n'est pas essentiel pour cette organisme [371]. Malgré tout, la délétion de ce gène cause une sévère réduction d'arabinose dans la paroi, menant ainsi à une structure d'AG tronquée avec uniquement des résidus d'AraF terminaux. Une autre AraFT, AftC (*Rv2673*), est également engagé dans la synthèse de l'arabinane et celle-ci est responsable des branchements en α -(1→3) du domaine arabinane interne à l'extrémité non réductrice de l'AG et des LAM [378], [379]. En outre des AraFT précédemment caractérisées, une AraFT fonctionnelle encodée par *aftD* (*Rv0236c*) a été décrite dans *M. tuberculosis*. AftD est la glycosyltransférase putative possédant la taille la plus importante de sa classe dans le génome de *M. tuberculosis* et a été proposée comme ayant une activité de branchement en α -(1→3) [380]. De par sa taille, AftD a également été associée à d'autres fonctions additionnelles dans la biosynthèse de l'AG et du LAM, telles que l'implication dans l'arabinylation ou la division cellulaire par la machinerie de cascade multienzyme [380]. Enfin, les résidus β -(1→2)-D-AraF terminaux sont transférés à partir du DPA sur la chaîne arabinane par l'intermédiaire de AftB (*Rv3805c*) dans les espèces *Corynebacteriaceae* telles que *C. glutamicum* et *M. tuberculosis*, marquant ainsi le point final de la biosynthèse de l'AG avant la décoration avec les acides mycoliques [381], [382] (Figure II.5).

De nombreux inhibiteurs ciblant les enzymes impliquées dans la biosynthèse de l'arabinane ont également été caractérisés. En effet, les arabinosyltransférases Emb sont inhibées par EMB comme cela a été vu précédemment. Les efforts sont axés sur l'étude d'analogues d'EMB, tels que SQ109 qui cible l'enzyme MmpL3, un transporteur d'acides mycoliques requis pour incorporer les acides mycoliques dans la paroi de *M. tuberculosis* [383] et SQ775 dont le mécanisme d'action reste à déterminer [384]. Les autres AraFTs ne sont en revanche pas inhibées par EMB [347], [382], [385] et le dépistage des inhibiteurs de ces enzymes est entravé en raison de la nature de la protéine et du substrat (lié à la membrane). Cependant, des rapports existent sur des analogues de DPA pour l'inhibition de la biosynthèse de l'AG. Une étude récente utilisant une approche sans cellule avec des préparations membranaires a déterminé que divers analogues de DPA sont capables de limiter l'incorporation d'un DP^[14C]A radiomarqué [379].

II.2.d) Modifications de l'AG et ancrage au PG et aux acides mycoliques

Deux modifications chimiques majeures sont présentes dans les régions internes de l'arabinane dans le cas de *M. tuberculosis*, et vraisemblablement dans toutes les mycobactéries à croissance lente. Ces modifications incluent le transfert des résidus succinyl [346] et D-GalN [349], [350] sur les chaînes arabinane de l'AG. L'avancée dans les enzymes impliquées dans ces deux modifications chimiques reste mince. Cependant, les composants clés requis pour la synthèse et le transfert du D-GalN dans les mycobactéries ont été élucidés [386]. PpgS (Rv3631) catalyse la formation de l'intermédiaire polyprenyl-P-D-GalNAc, qui est déacétylé et transloqué à travers la membrane plasmique. La seconde protéine transmembranaire Rv3779 vient ensuite transférer le D-GalN en position C-2 sur une portion des résidus internes 3,5- α -D-Araf de l'AG [386]. Des mutants *KO* de *ppgS* (Rv3631) ou *Rv3779* abolissent entièrement la synthèse du substituent D-GalN de l'AG chez *M. tuberculosis*. *Rv3779* a également été proposée comme étant une polyprenylphosphomannosyl synthase, ce qui l'impliquerait donc dans deux activités catalytiques [387]. D'autres études doivent cependant être menées afin de comprendre pleinement l'origine biosynthétique des résidus succinyl et D-GalN, ainsi que leurs rôles dans la physiologie et la pathogénèse des mycobactéries.

La liaison entre la macromolécule AG et le PG s'effectue grâce à l'enzyme essentielle Lcp1 qui a récemment été identifiée [388]. En revanche, on ne sait pas encore exactement à quel moment l'AG est mycolylé ; avant ou après l'attachement au PG. Des dosages enzymatiques directs et des mutagénèses dirigées ont démontré que le complexe antigène 85 possède une activité mycolyltransférase [381]. Ce complexe est composé de trois protéines étroitement liées FbpA (Rv3804c), FbpB (Rv1886c) et FbpC (Rv0129c) qui catalysent le transfert des mycolates sur du tréhalose, formant ainsi du tréhalose monomycolate et du tréhalose dimycolate [381]. L'analyse du mutant déficient en antigène 85C isolé de *M. tuberculosis* a confirmé l'implication de cet antigène dans le transfert des résidus mycolyl sur la structure AG [389]. De plus, des expériences de délétion dans *C. glutamicum* ont démontré que le transfert des résidus mycolyl sur l'AG est catalysé par des mycolyltransférases encodées par *cmytA* et *cmytB* [390] (Figure II.5).

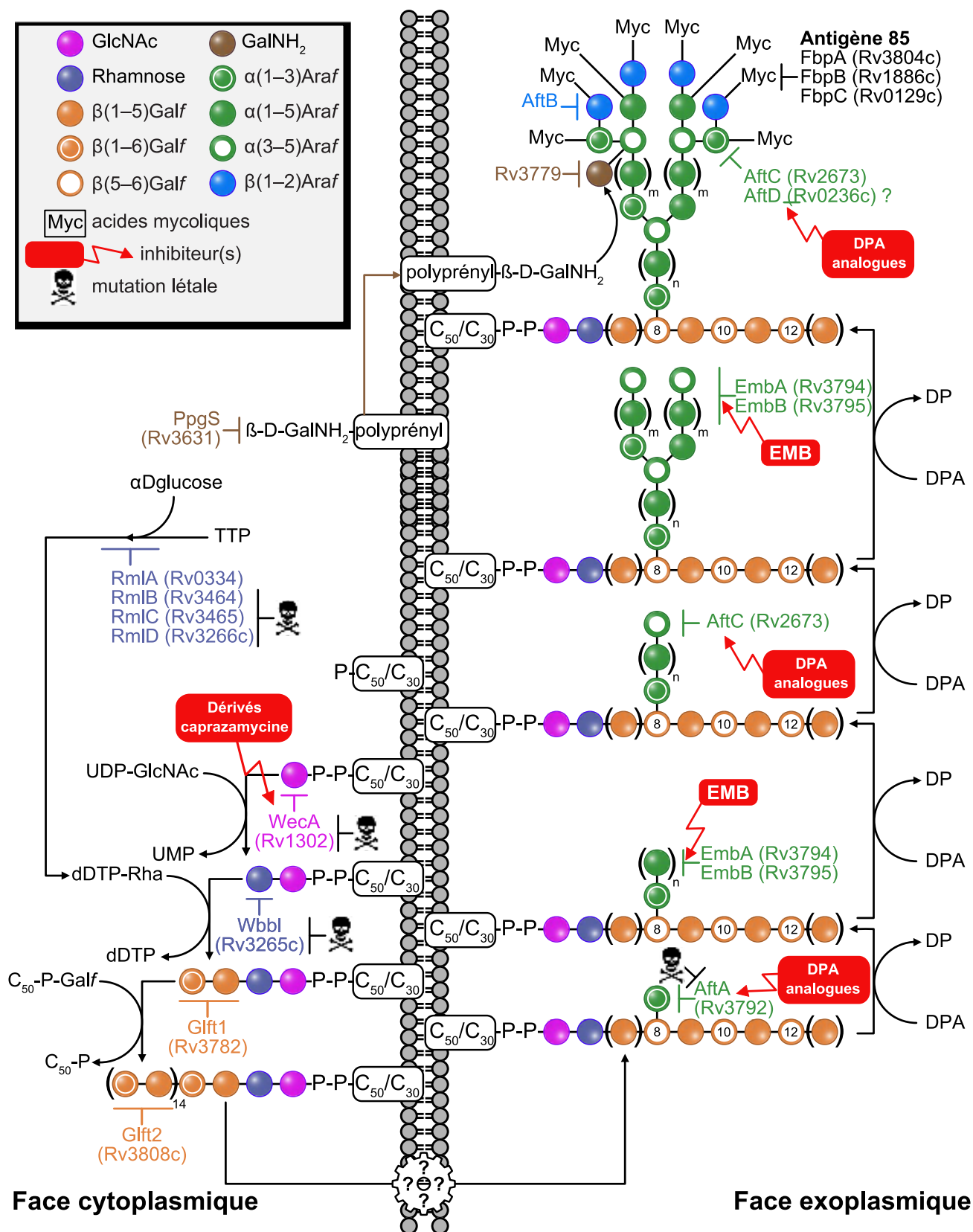


Figure II.5. Schéma de biosynthèse de l'arabinogalactane avec les différentes enzymes impliquées et les inhibiteurs associés.

II.3) Catabolisme de l'arabinogalactane

La paroi cellulaire de *M. tuberculosis* joue un rôle prépondérant dans les interactions hôte-pathogène et dans l'immunomodulation des défenses de l'hôte. Pour faire face aux différents stress rencontrés pendant l'infection, les mycobactéries sont capables de modifier la structure de leur paroi ce qui leur permet de s'adapter à leur environnement renforçant ainsi le caractère très résistant de la paroi mycobactérienne. Cependant, peu d'éléments sont connus sur la façon dont *M. tuberculosis* module et adapte l'expression des composants de sa paroi en réponse aux conditions fluctuantes perçues ou lors de changements dans la morphologie cellulaire et dans la division cellulaire. Contrairement aux voies biosynthétiques qui ont été largement scrutés durant la dernière décennie comme vu précédemment, le remodelage de la paroi mycobactérienne a quant à lui été très peu étudié. En effet, malgré quelques études reportant l'existence d'activités dégradant l'AG des mycobactéries, les enzymes correspondantes n'ont jamais été identifiées [293], [350].

D'autres éléments ont tout de même permis de prouver que les mycobactéries avaient la capacité de dégrader leur propre mAGP. Un glycolipide extractible a notamment été identifié dans les mycobactéries pathogènes à croissance lente et dont la structure rappelle fortement celle retrouvée au niveau de l'extrémité non réductrice du mAGP intact [391], [392]. Le composé majoritaire de cette famille correspond à du 5-O-mycolyl- β -Araf-(1 \rightarrow 2)-5-O-mycolyl- α -Araf-(1 \rightarrow 1)-Gro (DMDA), consistant en un motif dimycolyl-diarabinose et attaché à un résidu glycérol (Gro) sur le mAGP terminal (Figure II.6). Toutes ces données supportent fortement l'idée que cette nouvelle famille de glycolipides est générée par la libération et le transfert des séquences arabinanes terminales du mAGP vers un accepteur glycérol, une réaction étant très susceptible d'être catalysée par une ou plusieurs endo-arabinase(s). Des analyses transcriptomiques et biochimiques ultérieures ont révélé que le DMDA exerce des propriétés immunomodulatrices sur les macrophages humains et régule positivement une multitude de gènes liés aux réponses immunitaires, y compris des gènes pertinents pour le recrutement des leucocytes, l'apoptose, les voies de transduction du signal associées aux récepteurs de surface cellulaire et la réponse au stress oxydatif [392]. Ce DMDA représente d'ailleurs le premier produit catabolique associé au mAG à avoir été caractérisé dans la littérature.

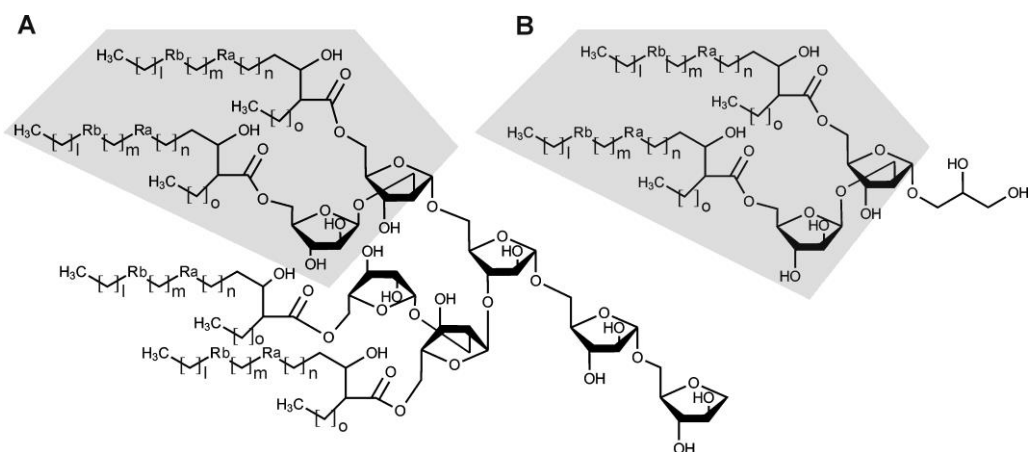


Figure II.6. Analogie structurale entre (A) le domaine terminal du mAGP pariétal et (B) le di-mycolyl-di-arabinoglycérol (DMAG).

De plus, une β -D-exogalactofuranohydrolase (Rv3096) a récemment été identifiée dans le laboratoire comme dégradant la chaîne galactane de l'AG de façon récurrente en libérant du galactose libre. Jusqu'à présent, seules deux autres enzymes possédant une activité similaire avaient été découvertes chez *Penicillium fellutanum* [393] et *Streptomyces JHA₁₉* [394]. Les travaux réalisés sur Rv3096 ont permis d'établir les paramètres *michaeliens* de l'enzyme, l'importance des ions Ca^{2+} et également son inhibition par l'EMB. Ces différentes expériences ont été réalisées à l'aide d'un substrat synthétique, le PNP- β -D-galactofuranoside. Cette enzyme sera décrite plus en détail dans le chapitre suivant traitant des glycosidases.

III) Les acides mycoliques

III.1) Structure des acides mycoliques

Les acides mycoliques sont des acides gras de 60 à 90 carbones α -alkylés et β -hydroxylés. Au sein de la paroi mycobactérienne, ces longues chaînes carbonées sont majoritairement attachées à l'AG-PG, mais aussi à des glycolipides tels que les tréhaloses mono- et dimycolates (TMM, TDM). Les acides mycoliques sont présents dans toutes les espèces de mycobactéries. Ils sont constitués de deux chaînes alkylées, la branche α , (C₂₄-C₂₆) et le méromycolate (C₅₄-C₅₆) contenant le groupement hydroxyle. L'étude de la structure des acides mycoliques a été grandement facilitée par la présence d'un groupement hydroxyle sur le C-3 les rendant sensibles à la pyrolyse [310]. A l'exception des faibles variations de longueur, la structure de la branche α est constante chez toutes les mycobactéries. Les variations structurales se retrouvent plutôt au niveau du méromycolate. Elles concernent la longueur de la chaîne ainsi que la présence d'insaturations, de cyclopropanes, de méthyles et de groupements chimiques oxygénés de type cétones, méthoxyl, époxydes et acides carboxyliques. Chaque acide mycolique possède un ou deux groupements localisés en

positions dites proximale et distale sur le méromycolate. Les insaturations, les cyclopropanes et les méthyles sont localisés en positions proximale et/ou distale alors que les autres groupements sont uniquement retrouvés en position distale. On distingue trois sous-familles principales d'acides mycoliques : les α -mycolates contenant des cycles cyclopropane en configuration *cis* ; les méthoxy-mycolates et les céto-mycolates contenant des groupements méthoxyl et cétone, ainsi que des cycles cyclopropane en configuration *cis* ou *trans* [395], [396] (Figure II.7). On retrouve aussi trois autres sous-familles d'acides mycoliques mais de manière beaucoup moins récurrente : les α' -mycolates, les époxymycolates et les dicarboxymycolates. Ces acides mycoliques contribuent à la perméabilité de la paroi, et sont donc essentiels pour la viabilité cellulaire et la virulence, ce qui rend la biosynthèse des mycolates importante pour la découverte de nouvelles cibles médicamenteuses [397]. Par exemple, la suppression des cyclopropanes en position proximale des α -mycolates ou la suppression des méthoxy- et céto-mycolates de *M. tuberculosis* entraîne une diminution importante de la virulence des souches mutantes dans un modèle murin [398].

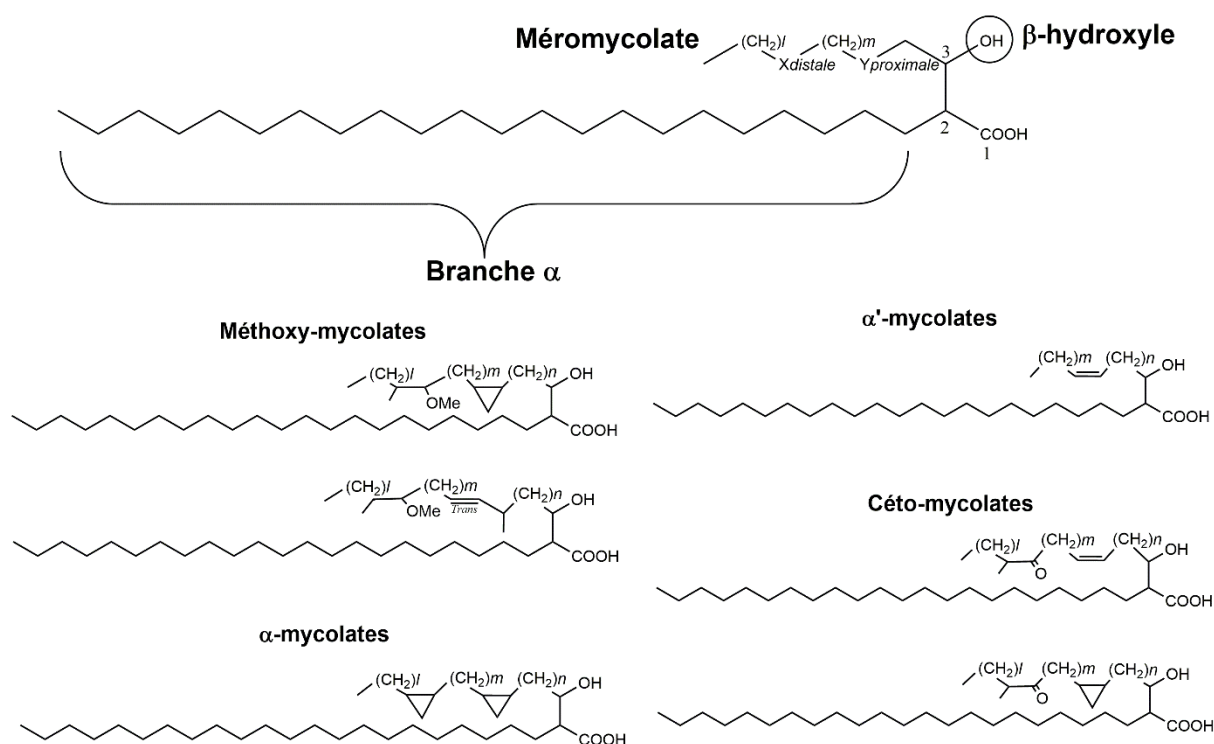


Figure II.7. Structure générale des acides mycoliques et principales familles d'acides mycoliques retrouvées dans les différentes espèces de mycobactéries.

III.2) Biosynthèse des acides mycoliques

La biosynthèse des acides mycoliques a lieu dans le cytoplasme et implique deux voies distinctes nommées Fatty Acid Synthase types I et II (FAS I et FAS II). FAS I (Rv2524c), polypeptide multifonctionnel, génère des esters gras acyl-CoA à courte chaîne qui peuvent former la branche α saturé ($C_{24/26}$), ou être étendus par FAS II pour former la chaîne méromycolate [399]. L'élongation des acides gras est dépendante de la disponibilité de la protéine holo-AcpM, un transporteur acyl, et du malonyl-CoA. FabD, la malonyl:AcpM transacylase génère du malonyl-AcpM [400]. Les amorces $C_{16/18}$ -CoA de FAS I sont condensées avec du malonyl-AcpM et cette réaction est catalysée par FabH (β -cétoacyl ACP synthase) [401], formant ainsi un lien pivot entre les voies FAS I et FAS II. Le C_{16} -AcpM formé est canalisé vers la voie FAS II où il subit une série de céto-réduction, déshydratation et énoyl-réduction grâce à l'action d'une β -cétoacyl-AcpM réductase (MabA) [402], d'une β -hydroxyacyl-AcpM hydratase (HadAB/BC) [403] et d'une énoyl-AcpM réductase [269]. Des cycles successifs s'ensuivent, au cours desquels la réaction de condensation de FabH est remplacée par les activités de KasA et KasB, des β -cétoacyl synthases [404]. La chaîne acyle liée à l'AcpM s'étend de deux unités de carbone dans chaque cycle, formant alors un méromycolate saturé à longue chaîne C_{42} - C_{62} , qui est sujet à des modifications telles que la *cis/trans*-cyclopropanation ou encore l'addition de groupes méhoxy et céto [405]. FabD32, une ligase acyl-AMP, active la chaîne méromycolate [406] et le méromyl-AMP subséquent est lié avec l'ester α -alkyl-CoA par l'enzyme Pks13, afin de générer l'acide α -alkyl- β -céto-mycolique [407]. Enfin, une étape de réduction catalysée par Rv2509 permet de générer un mycolate mature [408] (Figure II.8).

Le transport des mycolates à l'enveloppe cellulaire ou pour l'attachement à l'AG reste à élucider. Il est aujourd'hui admis que les mycolates sont transportés sous forme de tréhalose monomycolate (TMM). Lors de la création du TMM, l'hypothèse serait qu'une mycolyl-transférase transfère le groupement mycolyl provenant du mycolyl-Pks13 en D-mannopyranosyl-1-phosphoheptaprenol [409]. Le groupement mycolyl du mycolyl-D-mannopyranosyl-1-phosphoheptaprenol est transféré sur le tréhalose-6-phosphate par une seconde mycolyltransférase, formant alors le TMM-phosphate. Le résidu phosphate quant à lui est éliminé par une tréhalose-6-phosphate phosphatase, et le TMM est immédiatement transloqué en dehors de la cellule à l'aide d'une famille de pompes d'efflux *Resistance-Nodulation-cell Division* (RND), appelée *Mycobacterial membrane protein Large* (MmpL), ce qui permet de limiter l'accumulation de TMM dans le cytoplasme [409], [410]. Enfin, comme écrit précédemment, le complexe Antigène 85 attache le résidu d'acide mycolique provenant du TMM sur l'AG [389]. Ce complexe catalyse également la formation du tréhalose dimycolate (TDM) à partir de deux molécules de TMM avec la libération du tréhalose [409]. Le TDM, ou 'cord factor' est d'ailleurs impliqué dans la pathogénicité de *M. tuberculosis*.

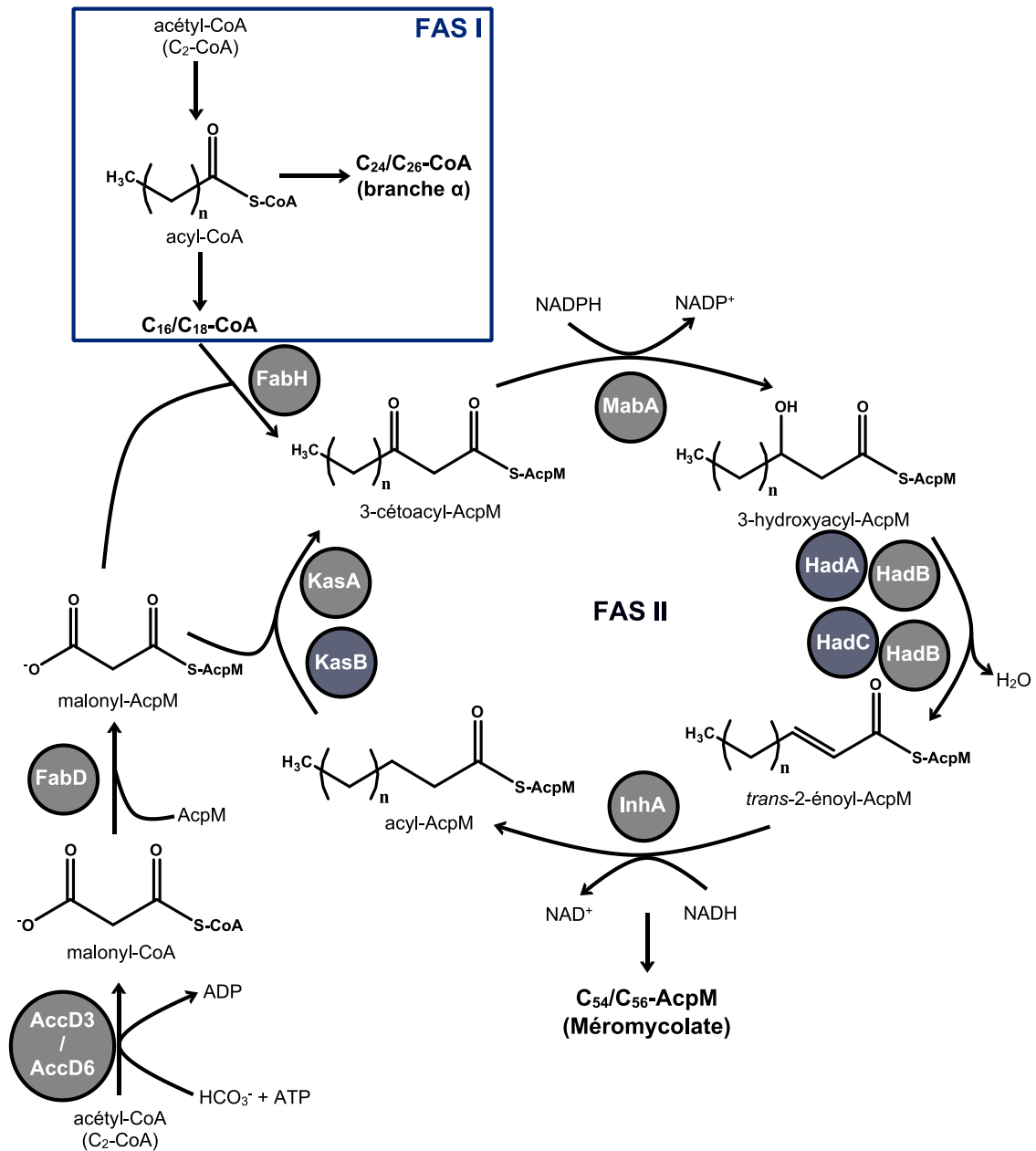


Figure II.8. Schéma de biosynthèse des acides mycoliques avec les voies de synthèse FAS I et FAS II.

Dans les deux systèmes, les étapes d'élongation de la chaîne consistent en une série itérative de réactions construites sur l'addition successive d'une unité à deux atomes de carbone à un groupe acyle naissant, et les intermédiaires de réaction sont liés de manière covalente à la protéine Acyl AcpM. FAS I est capable de synthétiser de novo de l'acyl-CoA à partir d'acétyl-CoA soit la branche α , soit pour le C16/C18-CoA qui est directement transporté dans la voie FAS II pour la production de l'acide méromycolique. FAS II est amorcé par la β -cétoacyl-AcpM synthase FabH CoA-dépendante, qui condense l'acyl-CoA avec le malonyl-AcpM pour générer un β -cétoacyl-AcpM, converti ensuite en un énoyl-AcpM saturé par les actions séquentielles d'une β -cétoacyl-AcpM réductase (MabA), un complexe β -hydroxyacyl-AcpM-déshydratase (HadABC), et une trans-2-énoyl-AcpM réductase (InhA). Les cycles subséquents d'allongement sont initiés soit par les β -kétoacyl AcpM synthases KasA ou KasB. KasA est considéré comme responsable des premières phases d'allongement, alors que KasB est impliqué dans les phases ultérieures [411].

IV) Phosphatidyl-*myo*_inositol mannosides (PIM), lipomannanes (LM) et lipoarabinomannanes (LAM)

Ces glycosphingolipides liés de manière non covalente sont abondants dans les membranes internes et externes de toutes les espèces mycobactériennes [412]. En conjonction avec leur fonction physiologique, ces glycoconjugués bien distincts jouent un rôle clé dans la modulation de la réponse immunitaire de l'hôte pendant l'infection [413]. Les PIM sont des glycolipides uniques composés d'une unité de phosphatidyl-*myo*-inositol (PI), d'un à six résidus d' α -D-mannopyranosyl (Man ρ) et jusqu'à 4 chaînes acyle. L'unité PI est basée sur un *sn*-glycéro-3-phospho-(1-D-*myo*-inositol) qui est ensuite glycosylé avec des résidus Man ρ en positions O-2 et O-6 du *myo*-inositol ce qui conduit à une ancre mannosyl phosphate inositol (MPI) [412]. La structure de l'ancre MPI est très hétérogène, avec des variations dans leur nombre, leur localisation et la nature des chaînes acyles. Quatre sites potentiels d'acylation sont disponibles sur l'ancre MPI : l'hydroxyle en position 1 et 2 de l'unité glycérol, l'hydroxyle en position 3 du résidu *myo*-inositol et l'hydroxyle en position 6 du résidu Man ρ lui-même attaché en position O-2 du *myo*-inositol [414]. Les espèces les plus abondantes de PIM chez les mycobactéries sont les phospho-*myo*-inositol dimannosides tri- et tétra-acylés (Ac₁PIM₂ et Ac₂PIM₂ respectivement) et les phospho-*myo*-inositol hexamannosides tri- et tétra-acylés (Ac₁PIM₆ et Ac₂PIM₆ respectivement). Ac₁PIM₂ et Ac₁PIM₆ contiennent deux groupes acyles sur le fragment glycérol et un groupe acyle additionnel soit sur l'hydroxyle en position 3 du *myo*-inositol, soit sur l'hydroxyle en position 6 du Man ρ attaché en position O-2 du *myo*-inositol, tandis que Ac₂PIM₂ et Ac₂PIM₆ possèdent quatre groupes acyles sur toutes ces positions. Dans les mycobactéries, les chaînes acyles palmitiques et tuberculostéariques sont les substituants les plus abondants.

Dans toutes les espèces mycobactériennes, les LM et LAM possèdent une chaîne mannane qui contient approximativement de 21 à 34 résidus Man ρ liés entre eux par des liaisons α -(1→6) et périodiquement décorés par 5 à 10 unités de résidus α -(1→2)-Man ρ [415]. A noter que dans le cas de *M. chelonae*, les ramifications se produisent en position C-3 [416]. La longueur de la chaîne mannane et le degré de ramification dans les LM est espèce-dépendant. Le noyau mannane peut ensuite être glycosylé avec 55 à 72 résidus d'Araf ce qui conduit au LAM. Le domaine arabinane quant à lui ne contient qu'une seule chaîne linéaire d'Araf lié en α -(1→5) avec des ramifications 3,5- α -D-Araf [415]. L'extrémité non réductrice du domaine arabinane des LAM se termine soit par un hexa-arabinoside modifié {[β -D-Araf-(1→2)- α -D-Araf]₂-3,5- α -D-Araf-(1→5)- α -D-Araf]}, soit par un tétra-arabinoside linéaire [β -D-Araf-(1→2)- α -D-Araf-(1→5)- α -D-Araf-(1→5)- α -D-Araf] [417]. *M. tuberculosis* et *M. leprae* sont également capables de modifier les extrémités terminales des chaînes d'arabinane avec des résidus α -(1→2)-Man ρ (ManLAM), tandis que *M. smegmatis* possède des coiffes phosphoinositol (PILAM) [418]. De plus, un substituant unique 5-deoxy-5-méthylthio-

xylofuranose (MTX) lié en position C-4 du man_p terminal de la coiffe ManLAM a été observé chez *M. tuberculosis* [419]. Enfin, comme pour l'AG, des groupements succinyl ont été identifiés en position C-2 de certains résidus 3,5- α -D-Araf [420].

La biosynthèse des PIMs, LM et LAM est bien connue et la plupart des enzymes impliquées ont été identifiées (Figure II.9). En s'intéressant plus particulièrement au LAM, celui-ci est généré par addition de 55 à 70 résidus d'Araf sur le LM, résultant en un domaine arabinane similaire à celui de l'AG. L'hypothèse actuelle est qu'une ArafT encore non-identifiée amorce le noyau mannane avec quelque résidus d'Araf de la même manière que AftA pour l'AG avec la chaîne galactane [413]. EmbC (Rv3793) est responsable exclusivement de l'extension du LM avec l'ajout de 12 à 16 résidus de α -(1 \rightarrow 5)-Araf de manière linéaire [421]. AftC, une enzyme de branchement impliquée dans la biosynthèse de l'AG, a été démontré comme introduisant les résidus α -(1 \rightarrow 3)-Araf dans les LAM [378]. Une seconde ArafT de ramification α -(1 \rightarrow 3) AftD a été proposé pour jouer un rôle dans la biosynthèse du LAM; cependant, sa fonction claire dans cette biosynthèse reste à déterminer [380]. L'extrémité non réductrice du domaine arabinane est ensuite complétée par l'addition de résidus β -(1 \rightarrow 2)-Araf, aboutissant alors à des motifs caractéristiques tétra-arabinosides et hexa-arabinosides [382]. Étant donné que AftB possède une activité β -(1 \rightarrow 2) ArafT dans la biosynthèse de l'AG, il est fort probable que cette enzyme joue un rôle similaire dans la biosynthèse du LAM. Contrairement au domaine arabinane de l'AG, celui du LAM est modifié avec des résidus de mannose [418]. CapA (Rv1635c) a été identifiée comme une α -(1 \rightarrow 5) Man_pT, utilisant le PPM comme donneur de sucre et attachant le premier résidu Man_p sur l'extrémité arabinane non réductrice du LAM [422]. La liaison d'au moins un résidu α -(1 \rightarrow 2)-Man_p qui suit est catalysée par MptC (Rv2181), qui est aussi responsable de l'addition de résidus uniques α -(1 \rightarrow 2)-Man_p au squelette de mannose α -(1 \rightarrow 6) amenant au ManLAM [415]. Les enzymes requises pour l'attachement du MTX et des résidus succinyl au LAM restent quant à elles à établir.

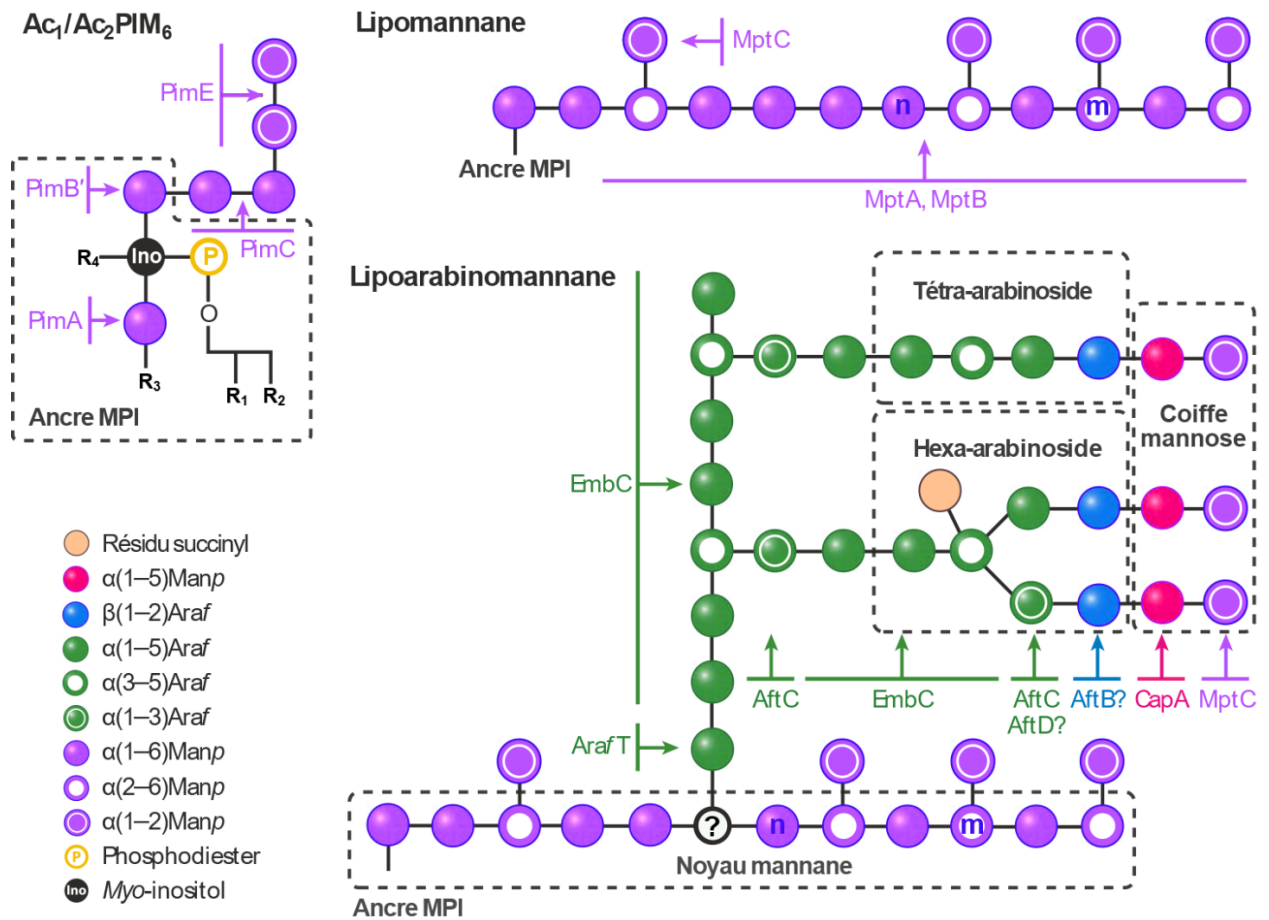


Figure II.9. Structure des phospho-myoinositols hexamannosides tri- et tétra-acylés, du lipomannane (LM) et du lipoarabinomannane (LAM) avec les enzymes clés impliquées dans leur biosynthèse respective.

Conclusion du second chapitre

Les voies de biosynthèse des composants individuels de la paroi cellulaire de *M. tuberculosis* sont aujourd'hui largement comprises. Cependant, des éléments restent encore à élucider comme par exemple les mécanismes qui régulent et coordonnent l'assemblage du mAGP pour disposer spatialement ce complexe. De plus, déterminer le mécanisme de translocation de divers substrats glycaniques liés aux lipides, tels que les intermédiaires impliqués dans la biosynthèse de l'AG et du LM / LAM, ou encore les donneurs de sucre, DPA et PPM, permettrait probablement d'identifier des cibles médicamenteuses idéales. Enfin, l'analyse structurale et fonctionnelle des protéines membranaires impliquées dans l'assemblage des parois cellulaires est en retard sur celle des protéines solubles impliquées dans l'assemblage du mAGP. Ceci est dû au fait que l'extraction de protéines membranaires pures de leur membrane native dans un état actif reste un véritable défi. De nouvelles approches tentent de répondre à cette limitation et seront essentielles à l'analyse et à l'élucidation structurale des glycosyltransférases membranaires mycobactériennes.

En revanche, en ce qui concerne le catabolisme, le chantier reste énorme et seules quelques études ont mises en avant cet aspect et ce pour tous les constituants de la paroi cellulaire mycobactérienne alors que ce versant est également particulièrement intéressant pour la recherche de nouvelles cibles médicamenteuses. Concernant l'AG, étant donné la présence exclusive de composés glycaniques, les enzymes impliquées dans son catabolisme s'apparentent à des glycosides hydrolases (ou glycosidases). Pour le moment, il n'y a que les études sur la galactofuranohydrolase Rv3096 menées au laboratoire qui font référence à ce pan du métabolisme de la paroi mycobactérienne. Cette partie du projet de thèse s'est donc focalisé sur la chaîne arabinane et plus particulièrement sur la recherche de glycosidases associées à la coupure de cette chaîne de l'AG. Plus largement, les investigations ont également été étendues à toutes les enzymes pouvant induire un remodelage ou un catabolisme de l'AG.

La structure de la paroi cellulaire ainsi que les enzymes impliquées dans son métabolisme ayant été passées en revue, le cœur du projet de thèse portant sur la recherche d'enzymes liées au catabolisme de l'AG va maintenant être abordé. Mais avant de passer aux résultats, un troisième chapitre va décrire le rôle et le mécanisme des glycosidases ainsi que les méthodes utilisées pour les caractériser et les purifier. Ce dernier chapitre d'introduction s'intéressera également à d'autres enzymes de ce catabolisme sur lesquelles notre attention s'est portée au fur et à mesure du projet, à savoir notamment une mutarotase impliquée dans le métabolisme du galactose.

Chapitre III : Mécanismes d'action et caractérisation d'enzymes de dégradation pour appréhender le catabolisme de l'arabinogalactane

Les glucides sont la classe de composés biologiques la plus abondante et la plus diversifiée structurellement parlant présents dans la nature. Cependant, notre compréhension actuelle de la relation entre la structure des glucides et leur fonction biologique est encore loin de ce qui est connu en ce qui concerne les protéines et les acides nucléiques. Initialement, les glucides ne sont reconnus que comme molécules structurelles et de stockage d'énergie (cellulose, chitine et glycogène), mais des développements récents dans le domaine ont montré que les glucides sont également impliqués dans de nombreux événements biologiques tels que le cancer, les inflammations... En outre, les enzymes de traitement des glucides sont devenues monnaie courante dans de nombreuses applications industrielles en raison de leur stéréosélectivité et de leur efficacité [423].

Les glucides peuvent être trouvés dans la nature sous de nombreuses formes, allant des monomères simples aux oligomères plus complexes, aux polymères ou aux glycoconjugués. Les éléments constitutifs des monosaccharides sont stéréochimiquement très diversifiés, comportant différents groupes fonctionnels, adoptant différentes tailles de cycle (furanoside ou pyranoside) et peuvent être assemblés différemment en termes de stéréochimie et de régiochimie. A titre d'exemple, plus de 10^{12} isomères sont possibles pour un hexasaccharide réducteur simple [424]. Les structures glucidiques transmettent donc une énorme densité d'informations *via* un *glycocode*. Cette diversité est exploitée par des organismes vivants, qui utilisent des oligosaccharides et des polysaccharides pour une multitude de fonctions biologiques, du stockage et de la structure à des rôles de signalisation hautement spécifiques.

En raison de cette extrême variété de structures, le nombre important d'enzymes agissant sur ces glycoconjugués, oligo- et polysaccharides constitue probablement l'un des substrats les plus diversifiés sur le plan structurel de la planète. Collectivement désignées comme CAZymes (*Carbohydrate-Active enZymes*), ces enzymes construisent et décomposent des glucides complexes ainsi que des glycoconjugués et sont impliquées dans un grand nombre de processus biologiques. De ce fait, les CAZymes doivent généralement remplir leur fonction avec une grande spécificité. Parce que la diversité des glucides dépasse de loin le nombre de replis protéiques, les CAZymes ont évolué à partir d'un nombre limité de progéniteurs et en acquérant de nouvelles spécificités au niveau du substrat et du produit.

La formation enzymatique et le clivage de la liaison entre deux monomères glucidiques ou entre un monomère glucidique et un autre groupe peuvent se produire par hydrolyse ce qui conduit à un sucre libre (glycosidases), par transglycosylation pour donner un nouveau glycoside (glycosyltransférases), par phosphorylyse pour donner un sucre 1-phosphate (phosphorylases) ou encore par élimination pour aboutir à des produits insaturés (lyases). Pour revenir aux mycobactéries, ces enzymes sont omniprésentes dans le métabolisme des différents constituants de la paroi et notamment du polysaccharide AG qui se compose exclusivement d'unités monomériques glucidiques.

En regard de cela, et en dépit de progrès considérables dans la compréhension des mécanismes d'action de la tuberculose, de nombreux gènes, voies métaboliques et processus jugés essentiels pour la virulence et/ou la persistance, sont aujourd'hui encore mal compris. En effet, selon la source et la définition, jusqu'à 40 % des gènes codants pour des protéines de *M. tuberculosis* n'ont pas de fonction assignée ou sont considérés comme hypothétiques [425]. Cette donnée exclut les gènes avec des orthologues étroitement apparentés, mais sans aucune caractérisation fonctionnelle. De nombreuses glycosides hydrolases (GH) candidates entrent dans cette catégorie et ce sont ces enzymes en particulier qui seront décrites en détail car il s'agit des acteurs principaux du catabolisme de l'AG mycobactérien. Le chapitre décrit ici se focalisera sur les glycosidases qui représentent le point essentiel du projet de thèse mais également sur une mutarotase impliquée dans le métabolisme du galactose et sur laquelle une étude approfondie a été réalisée.

I) La famille des glycosides hydrolases

Les GH sont une vaste superfamille d'enzymes qui catalysent l'hydrolyse des liaisons glycosidiques. Des études génomiques ont révélé que 1 à 3 % des gènes d'un organisme sont généralement dédiés à la dégradation glucidique, ce qui témoigne de l'importance du métabolisme des glucides pour les organismes vivants.

Comme les liaisons glycosidiques entre les monosaccharides sont extrêmement stables (celles de la cellulose ayant une demi-vie pour l'hydrolyse spontanée de 5 millions d'années), les systèmes biologiques reposent sur des enzymes pour augmenter le taux d'hydrolyse. En effet, de nombreuses GH sont des catalyseurs très efficaces avec des vitesses réactionnelles pouvant être améliorées de l'ordre de 10^{17} fois comparées aux réactions non enzymatiques [426]. Parce que les glucides ne diffèrent que par des variations stéréochimiques, ces enzymes ont acquis leur spécificité grâce à de subtiles différences structurelles et ont évolué à partir d'un nombre limité d'ancêtres.

La spécificité du substrat glycosidasique est définie par plusieurs caractéristiques :

- la spécificité anomérique (α ou β);
- la stéréochimie finale (que le clivage se fasse par inversion ou rétention de la configuration anomérique);
- l'emplacement du clivage par rapport au substrat (exo- si les monosaccharides sont hydrolysés en fin de chaîne ou endo- si l'hydrolyse se produit au milieu de la chaîne polysaccharidique);
- le type de sucre libéré.

I.1) Banques de données enzymatiques des glycosides hydrolases

Traditionnellement, les enzymes ont été regroupées selon les lignes directrices établies par l'Union internationale de biochimie et de biologie moléculaire (IUB-MB), et sont largement basées sur leurs spécificités de substrat [427]. Pour les GH, le numéro de classification de l'enzyme est EC 3.2.1.x et est défini comme des enzymes capables d'hydrolyser les composés O- et S-glycosylés. Le dernier chiffre varie en fonction de la structure du substrat et du produit. Même si ce système de classification est toujours utilisé aujourd'hui, il ne reflète pas les caractéristiques structurelles et mécaniques des GH.

Un autre système de classification basé sur les similarités de séquences d'acides aminés entre différentes enzymes a gagné beaucoup en popularité depuis sa conceptualisation au début des années 1990 [428]. L'expansion de ce système de classification a abouti au développement de la base de données CAZy (*Carbohydrate Active Enzyme*) (<http://www.cazy.org>) comme mentionné précédemment [429]. Les premières bases d'une classification de CAZymes ont été observées dans le cadre d'un effort consistant à classer les cellulases en plusieurs familles distinctes sur la base de la similarité de séquence d'acides aminés. Peu de temps après, le système de classification des familles basé sur les séquences protéiques et les similarités de structure a été étendu à toutes les glycosides hydrolases connues, puis à toutes les CAZymes impliqués dans la synthèse, la dégradation et la modification de glycoconjugués [430].

Comme il existe une corrélation directe entre la séquence d'acides aminés et les similitudes de repliement des protéines, cette classification reflète mieux les caractéristiques structurelles de l'enzyme donnée. Cela peut aussi aider à révéler la relation évolutive entre ces enzymes. Mais l'atout principal de CAZy est que, du fait que les enzymes groupées dans la même famille partagent des similarités structurelles et mécanistiques, des généralisations sur des membres non caractérisés peuvent être déduites. Plus particulièrement,

l'appartenance à la famille CAZy permet de prédire la stéréochimie de la liaison qui peut être clivée et la stéréochimie du produit (avant la mutarotation).

Avec pratiquement aucune exception, le mécanisme utilisé (c'est-à-dire le maintien ou l'inversion de la configuration de carbone anomérique) est conservé dans une famille GH [429]. On compte 153 familles de GH au total dont certaines avec des similarités de séquences apparemment non apparentées et qui montrent une uniformité dans leurs structures tridimensionnelles. Plusieurs familles GH de CAZy contiennent également des membres ayant une activité transglycosidase ou phosphorylase prouvée.

Le repliement des protéines est cependant mieux conservé que leurs séquences; c'est pour cette raison que certaines familles peuvent être regroupées en *clans* notés de A à Q (Tableau III.1). Les familles sont comprises dans ces *clans* lorsque de nouvelles séquences sont liées à plusieurs familles ou lorsque la sensibilité des méthodes de comparaison de séquence est augmentée ou encore quand que les déterminations structurelles démontrent la ressemblance entre les membres de différentes familles.

On retrouve également dans le Tableau III.1 la structure tridimensionnelle adoptée par les protéines en fonction de leurs clans respectifs. Ces différents repliements seront décrits en détail dans la partie qui suit. Le type de mécanisme utilisé par ces GH, c'est-à-dire si elles agissent par rétention ou inversion de la configuration du substrat glucidique est également indiqué dans ce tableau.

Tableau III.1. Organisation de certaines familles de glycosides hydrolases (GH) en clans selon la banque de données Carbohydre Active Enzyme (CAZy).

Cette classification permet de regrouper des familles avec des similarités de conformation car celle-ci est mieux conservée que les séquences protéiques à proprement dites.

Clan	Famille (GHs)	Type de mécanisme	Structure tri-dimensionnelle
A	1, 2, 5, 10, 17, 26, 30, 35, 39, 42, 50, 51, 53, 59, 72, 79, 86, 113, 128, 147, 148	Rétention	Tonneau (β/α) ₈
B	7, 16	Rétention	β -jelly roll
C	11, 12	Rétention	β -jelly roll
D	27, 31, 36	Rétention	Tonneau (β/α) ₈
E	33, 34, 83, 93	Rétention	6-fold- β -propeller
F	43, 62	Inversion	5-fold- β -propeller
G	37, 63, 100, 125	Inversion	Tonneau (α/α) ₆
H	13, 70, 77	Rétention	Tonneau (β/α) ₈
I	24, 80	Inversion	$\alpha+\beta$
J	32, 68	Rétention	5-fold- β -propeller
K	18, 20, 85	Rétention	Tonneau (β/α) ₈
L	15, 65	Inversion	Tonneau (α/α) ₆
M	8, 48	Inversion	Tonneau (α/α) ₆
N	28, 49	Inversion	Hélice β
O	52, 116	Rétention	Tonneau (α/α) ₆
P	127, 146	Rétention	Tonneau (α/α) ₆
Q	94, 149	Inversion	Tonneau (α/α) ₆

I.2) Structures tridimensionnelles des glycosides hydrolases

La première enzyme dont la structure tridimensionnelle a été élucidée est la glycosidase paradigmatique du lysozyme par cristallographie aux rayons X en 1965 [431]. Depuis, le nombre de structures 3D a explosé au cours des années 1990 et a révélé qu'une pléthore de repliements pouvait catalyser la même réaction. Par exemple, les premières structures de cellulase ont révélé 6 ou 7 topologies différentes [432]. L'existence d'une gamme aussi étendue de repliements catalysant la même réaction démontre donc l'immense polyvalence des échafaudages protéiques. Au départ, les chercheurs pensaient que le repliement reflétait la spécificité de l'enzyme vis-à-vis du substrat mais on sait aujourd'hui que cette hypothèse était erronée. En effet, l'examen approfondi de la base de données CAZy a rapidement révélé que les repliements simples tiennent compte d'enzymes possédant une gamme de spécificités, illustrant ainsi pourquoi le système CAZy est supérieur à la classification CE pour les analyses de structure/fonction de ces enzymes.

Les GH peuvent donc adopter différents repliements. Pour mieux appréhender les différentes structures tridimensionnelles des GH, la Figure III.1 représente schématiquement chacun de ces repliements et le détail de ceux-ci sont donnés ci-dessous :

- Tonneau (α/β)₈ : ce repliement a été rencontrée pour la première fois dans l'enzyme triose phosphate isomérase (TIM). Il est omniprésent dans la nature, le plus souvent dans les enzymes associées au métabolisme. Le tonneau (α/β)₈ est constitué de huit brins β parallèles et de huit hélices α qui alternent le long de la séquence protéique, les brins β formant le cylindre interne et les hélices α bordant l'extérieur (Figure III.1a).
- *jelly roll* : Le repliement *jelly roll* est un tonneau formé de quatre paires de brins β antiparallèles (Figure III.1b).
- β -*propeller* : Le repliement β -*propeller* est entièrement composé de feuillets β et se caractérise par 4 à 8 feuillets en forme de lames disposées symétriquement autour d'un axe central. Chaque feuillet β est typiquement composé de quatre brins β antiparallèles et tordu de telle façon que les premiers et derniers brins sont quasiment perpendiculaires l'un à l'autre (Figure III.1c). Certaines sialidases et neuraminidases (clan E) utilisent une architecture à six lames (Figure III.1d), tandis que la famille GH74 a une répétition de deux domaines comportant sept lames (Figure III.1e).
- Tonneaux (α/α)_n : Cette structure est constituée de six hélices α qui constituent les supports internes du tonneau, flanquée de six hélices α externes (Figure III.1f). Une variation de ce repliement est observée dans la famille GH47 possédant un tonneau (α/α)₇ dans lequel sept épingles à cheveux en hélice α forment les structures interne et externe du tonneau (Figure III.1g).
- Hélice β : Les structures en hélice β semblent être caractéristiques des enzymes traitant les polysaccharides polyanioniques tels que le pectate, le rhamnogalacturonane et le carraghénane (Figure III.1h). Le nombre de tours des brins β , le nombre de feuillets β formés ainsi que l'architecture du site actif varient selon les familles et les clans.
- Repliement type déshydrogénase : La famille GH4 ne partage aucune similarité structurale avec les autres GH connues à ce jour. Les enzymes de cette famille utilisent le NADH comme cofacteur (voir partie suivante) et ressemblent également aux lactate/malate déshydrogénases dans l'agencement spatial de plusieurs résidus clés de sites actifs (Figure III.1i).
- $\alpha+\beta$: Cette structure se compose de deux hélices et d'un feuillet β triple brin (Figure III.1j).

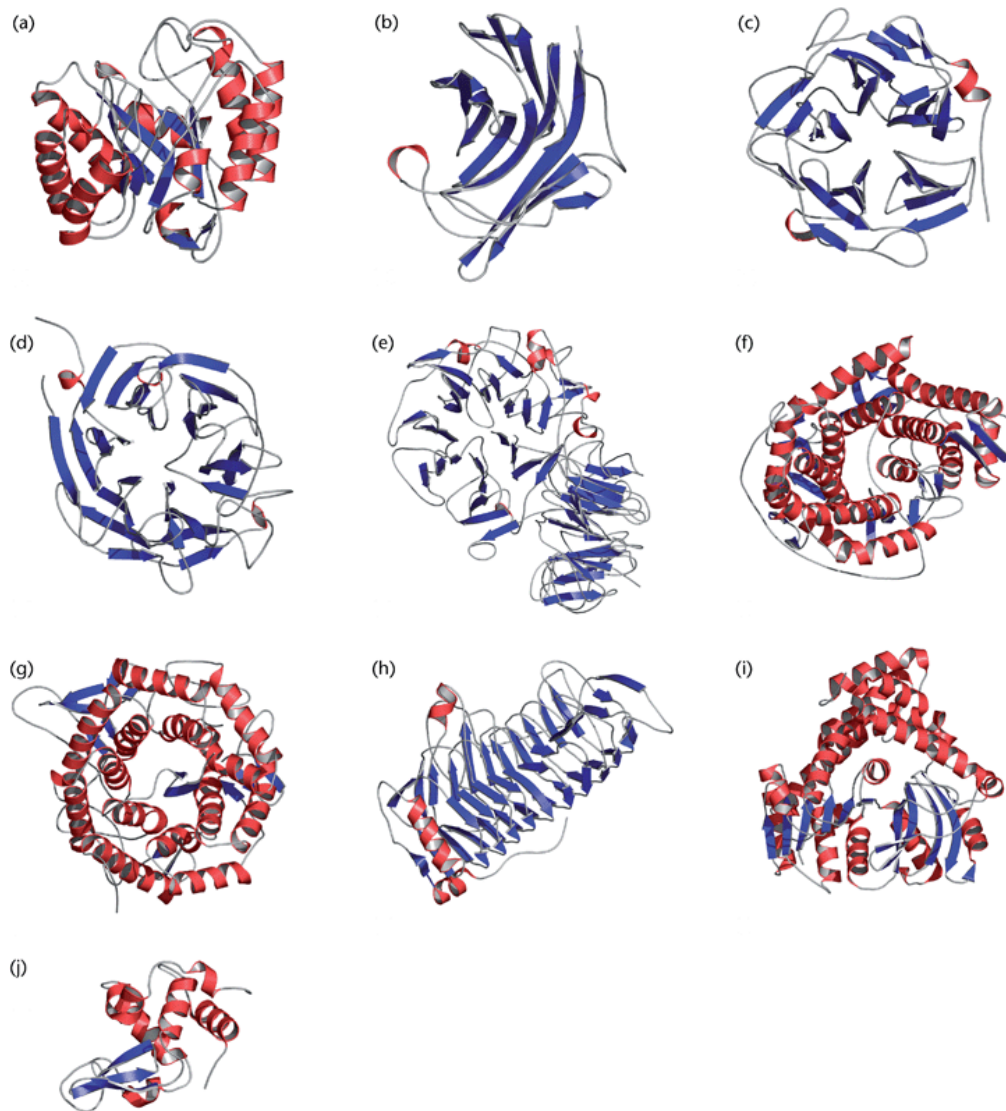


Figure III.1. Différents types de repliement des protéines retrouvés dans les GH.

(a) tonneau (α/β)₈, (b) jelly roll, (c) 5-fold- β -propeller, (d) 6-fold- β -propeller, (e) 7-fold- β -propeller, (f) tonneau (α/α)₆, (g) tonneau (α/α)₇, (h) hélice β , (i) repliement type déshydrogénase, (j) $\alpha+\beta$ [433].

I.3) Topologie des sites actifs des glycosides hydrolases

Bien que les glycosidases possèdent une grande variété de structures tridimensionnelles, il existe trois topologies générales de sites actifs, correspondant à la fonction enzymatique. Les exo-glycosidases telles que la β -galactosidase, la β -glucosidase et la neuraminidase, et les exo-polysaccharidases telles que la glucoamylase et la β -amylase, coupent les monosaccharides à l'extrémité non réductrice des oligo et polysaccharides. Ces enzymes présentent des poches ou des cratères en surface optimisés pour la liaison d'une ou deux unités monosaccharidiques (Figure III.2a).

Inversement, une topologie de fente ou de rainure est observée dans les endo-polysaccharidases comme le lysozyme ou la chitinase, qui maximise l'affinité de la liaison pour les longs substrats polymériques (Figure III.2b).

Dans certains cas, ces enzymes ont développé de longues boucles qui recouvrent partiellement cette fente pour produire une topologie en tunnel dans laquelle le substrat est enfilé (Figure III.2c).

Contrairement aux glycosidases qui dégradent les polymères solubles, les polysaccharidases agissent sur la cellulose cristalline et la chitine. Par conséquent, ces enzymes présentent une surface plate plutôt qu'une fente ou une poche (Figure III.2d).

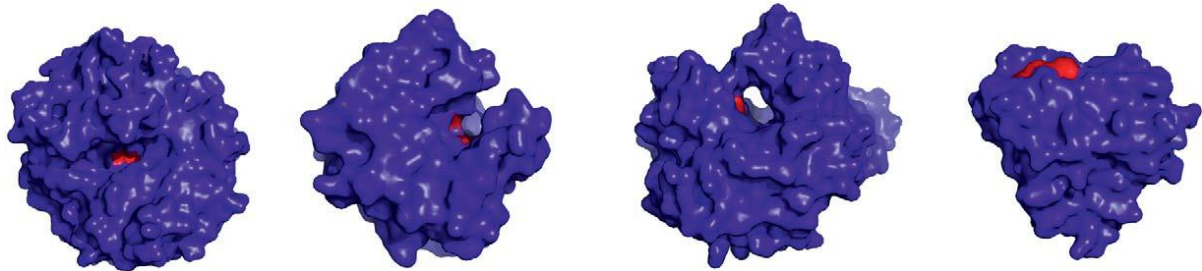


Figure III.2. Topologies de sites actifs des enzymes GH. (A) poche, (B) fente, (C) tunnel et (D) surface. La position des résidus catalytiques est indiquée en rouge [433].

I.4) Mécanismes catalytiques des glycosides hydrolases

Au cours des deux dernières décennies, un intérêt croissant a été porté sur les GH à des fins thérapeutiques. Pour le moment, peu d'attention s'est portée sur les GH mycobactériennes car celle-ci a été plutôt focalisée sur les enzymes impliquées dans la biosynthèse. De nombreux inhibiteurs de GH ont cependant été découverts dans le cadre d'infections virales, du diabète ou encore de troubles génétiques [434]. Certains exemples de réussite sont l'inhibiteur de l' α -amylase, l'Acarbose et le Miglitol, qui ont été approuvés par la FDA (*Food and Drug Administration*) en 1990 et 1996 respectivement, et qui sont utilisés pour inhiber certaines GH intestinales et l' α -amylase pancréatique afin de réguler l'absorption des glucides. Ces inhibiteurs sont actuellement utilisés dans le traitement par voie orale du diabète non insulino-dépendant (diabète de type II) [435].

D'autres inhibiteurs de GH sont utilisés comme agents anti-viraux [436]. Par exemple, le développement du Zanamivir (Relenza) et de l'Oseltamivir (Tamiglu), approuvé par la FDA en 1999, sont aujourd'hui utilisés dans le traitement et la prophylaxie de la grippe causée par le virus de la grippe A et de la grippe B [437].

I.4.a) Les glycosides hydrolases agissant par rétention

Le mécanisme catalytique des GH agissant par rétention a été proposé en 1954 par Koshland *et al.* [438] (Figure III.2). Selon ce modèle, le mécanisme se présente sous la forme d'un double déplacement comportant deux étapes : une étape de glycosylation et une étape de déglycosylation.

Au cours de la première étape, l'enzyme est glycosylée par l'action concertée des acides carboxyliques de deux résidus, Asp ou Glu (ou les deux), qui se trouvent sur les côtés opposés du site actif de l'enzyme et qui sont normalement proches l'un de l'autre (environ 5,5 Å). Un de ces résidus fonctionne comme un acide général dans la première étape du mécanisme où la liaison glycosidique commence à se rompre. Le résidu acide donne alors un proton au sucre dissocié. Au cours de cette même étape, le deuxième acide carboxylique déprotoné agit comme un nucléophile, attaquant le carbone anomère sur l'ion oxocarbenium transitoire. Cette étape de glycosylation conduit à la formation d'un intermédiaire glycosyl-enzyme lié de manière covalente et qui présente une configuration anomérique opposée à celle du produit de départ.

La deuxième étape de cette réaction, l'étape de déglycosylation, consiste en la dégradation hydrolytique de l'intermédiaire glycosyl-enzyme [439]. L'acide carboxylique qui a dans un premier temps servi de catalyseur acide agit désormais comme une base en extrayant un proton du nucléophile entrant (généralement une molécule d'eau). Simultanément, la molécule d'eau attaque la liaison glucide-enzyme de manière réverse comparée à la première étape.

A la fin de la réaction, le renouvellement enzymatique est obtenu et un héli-acétal est formé avec la même configuration anomérique que le produit de départ. Des études plus récentes ont montré que les états de transition (TS1 et TS2) des étapes de glycosylation et de déglycosylation ont un caractère dissociatif. Les deux réactions sont favorisées par la distorsion du substrat pendant la catalyse, mais cet effet est cependant plus évident lors de la première étape réactionnelle [440]. Le processus de glycosylation est également favorisé par la liaison hydrogène entre l'acide carboxylique nucléophile et le groupement hydroxyle en position 2 du substrat. Il s'agit en quelque sorte d'un ancrage qui aligne le substrat sur le site actif de l'enzyme en facilitant ainsi le processus de glycosylation.

Une variation du mécanisme général de rétention des enzymes a cependant été démontrée pour les N-acétyl- β -hexosaminidases appartenant aux familles GH18 et GH20 de CAZy [432]. Contrairement à la plupart des glycosidases agissant par rétention, ces enzymes ne possèdent pas de nucléophile catalytique. Dans ce cas, c'est le substituant acétamido du substrat qui agit comme nucléophile catalytique intramoléculaire [441]. Le résidu acide/base général protone l'oxygène de la liaison glycosidique clivable. L'autre résidu acide carboxylique chargé stabilise la charge positive développée sur l'azote de l'ion oxazolinium formé après l'attaque nucléophile intramoléculaire de l'oxygène N-acétamido du carbone anomérique (Figure III.3) [441]. Pour compléter le mécanisme de double déplacement, une molécule d'eau entrante attaque le carbone anomère au cours d'une seconde étape, entraînant alors la rétention de la configuration initiale [442].

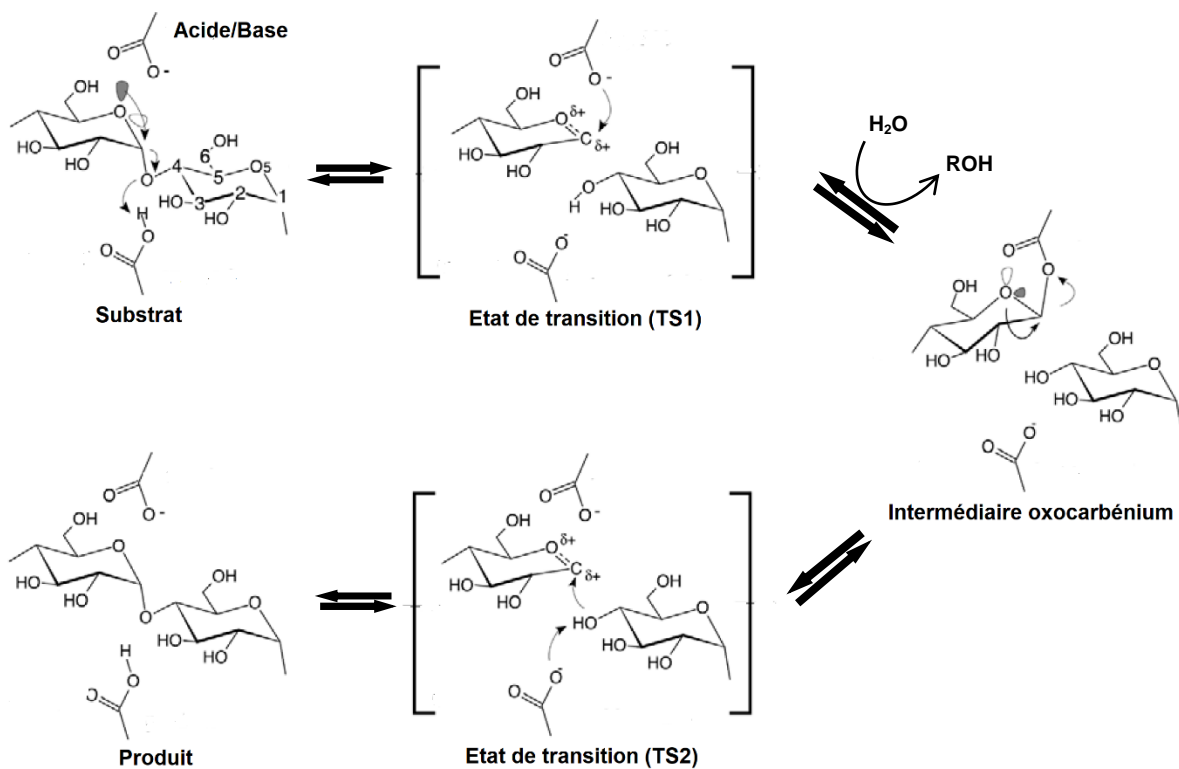


Figure III.2. Mécanisme catalytique des glycosides hydrolases agissant par rétention de configuration du substrat.

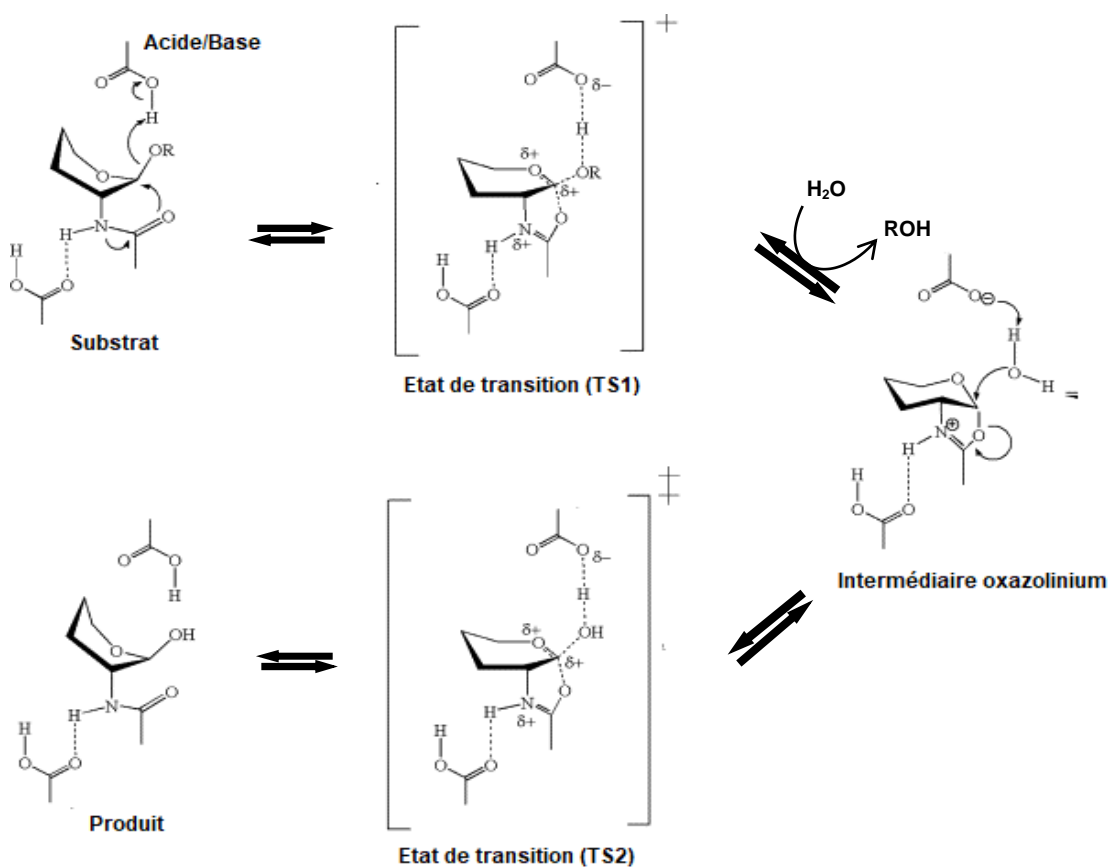


Figure III.3 Mécanisme catalytique des glycosides hydrolases β -hexosaminidases agissant par rétention provenant des familles GH18 et GH20 de la banque de données CAZy.

I.4.b) Les glycosides hydrolases agissant par inversion

Dans les GH agissant par inversion, il y a une inversion de configuration anomérique du substrat de départ. Ici, les deux résidus acides carboxyliques essentiels agissent en tant que catalyseurs acides et basiques généraux et ces groupements sont séparés d'environ 10,5 Å. Dans ce cas particulier, cette distance est plus importante que pour les GH agissant par rétention car le substrat et la molécule d'eau doivent être présents simultanément dans le site actif de l'enzyme au cours du processus hydrolytique [443]. La Figure III.4 illustre le mécanisme d'action des GH agissant par inversion, qui se produit *via* un seul type de mécanisme de déplacement. L'un des résidus acide carboxylique protone l'atome d'oxygène glycosidique scissile tandis que l'autre coordonne la molécule d'eau nucléophile pour faciliter sa déprotonation et ainsi compléter la réaction d'hydrolyse [444]. Contrairement au mécanisme de rétention, cette réaction est donc achevée en une seule étape et on suppose qu'elle nécessite la formation d'une structure à un seul état de transition. De plus, elle n'implique pas la formation d'une enzyme covalente intermédiaire au cours de la catalyse et induit donc l'inversion de la configuration anomère du substrat de départ.

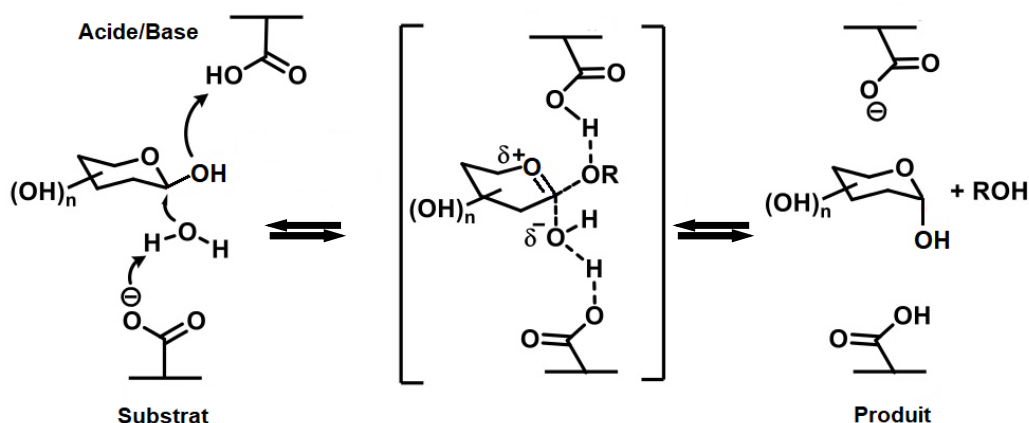


Figure III.4. Mécanisme catalytique des glycosides hydrolases agissant par inversion de configuration anomérique du substrat.

I.4.c) Activité de transglycosylation des glycosides hydrolases

Outre leur capacité hydrolytique, les GH sont également impliquées dans la réaction inverse sous certaines conditions appropriées, favorisant ainsi la formation de liaisons glycosidiques. Ce type de réaction est appelé transglycosylation et nécessite généralement une concentration importante de substrat [445]. De manière similaire aux mécanismes décrits précédemment, la première étape conduit au départ du groupe aglycone et à la formation de l'intermédiaire covalent. La seconde étape de la réaction consiste à attaquer la liaison glucide-enzyme par une autre molécule de sucre et à transférer le proton du sucre au site actif acide/base de l'acide carboxylique.

Généralement, la synthèse de liaisons glycosidiques dans la nature est prise en charge par les glycosyltransférases. Les donneurs glycosidiques typiques de ces glycosyltransférases sont des sucres nucléotidiques tels que l'ADP-glucose, l'UDP-glucose ou encore l'UDP-galactose. En revanche, l'activité de transglycosylation des GH utilise des sucres simples comme donneurs (Figure III.5).

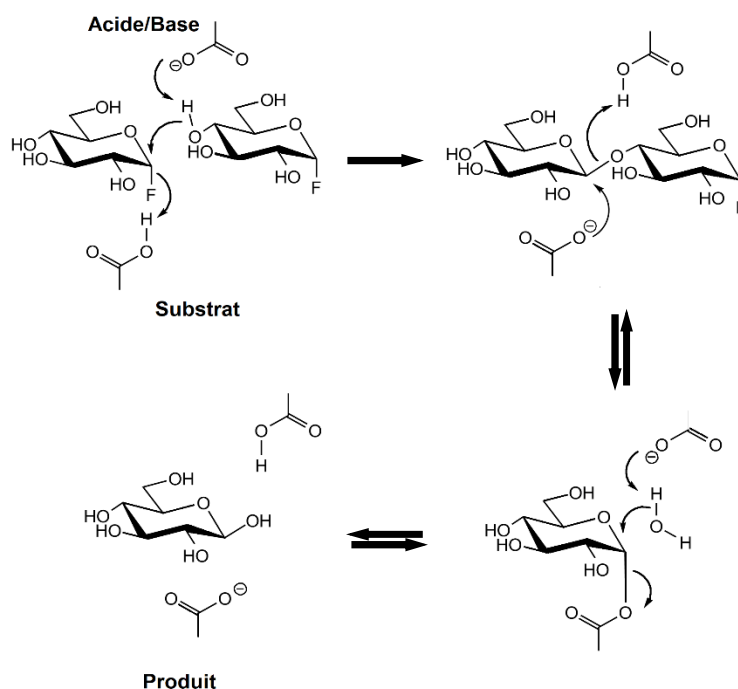


Figure III.5. Réaction de transglycosylation catalysée par les glycosidases hydrolases agissant par rétention.

Pour résumer, les GH sont des enzymes présentes dans presque tous les organismes vivants (à l'exception de certains Archéens et de quelques eucaryotes parasites unicellulaires). Ces enzymes catalysent l'hydrolyse de la liaison glycosidique dans une myriade de réactions biologiques et, dans des conditions spécifiques, peuvent également catalyser la réaction inverse favorisant la formation de liaisons glycosidiques.

L'intérêt des GH a démarré il y a longtemps, mais le pouvoir catalytique des glycosidases n'a été établi que depuis quelques années. Des analyses structurales de divers complexes enzymatiques ainsi que des études mécanistiques et spectroscopiques détaillées ont permis de révéler que la source catalytique des GH repose sur une catalyse acide/base générale et nucléophile. Ces enzymes développent des sites actifs qui contiennent deux résidus carboxylates (Asp et Glu) soigneusement alignés et positionnés sur les côtés opposés du site actif de l'enzyme et qui s'enroule autour du substrat lors de sa liaison. Le site actif fournit également un réseau étendu de liaisons hydrogène qui supportent une distorsion conformationnelle du substrat. Cela induit que le substrat adopte une conformation énergétique plus élevée avant que l'hydrolyse n'ait lieu et que cette configuration soit

maintenue pendant le processus catalytique complet. Cet effet est d'ailleurs très important pour la stabilisation de la structure lors de l'état de transition. Certaines GH présentent également des cations (Zn^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} ou encore Ca^{2+}) dans leur structure qui se sont également avérés essentiels à la stabilisation des états de transition pendant la catalyse. Cela est notamment le cas de la β -D-exogalactofuranohydrolase Rv3096 récemment identifié au laboratoire qui utilise le calcium comme stabilisateur.

Les deux mécanismes les plus couramment utilisés pour hydrolyser la liaison glycosidique des substrats par les GH sont donc des mécanismes de rétention ou d'inversion. Ces mécanismes sont conservés dans la majorité des familles de GH. La seule exception concerne les GH de la famille 4 et 109, dans lesquelles le processus hydrolytique se produit via un mécanisme d'élimination et nécessite la présence du cofacteur NADH [446].

Maintenant que les différentes propriétés et mécanismes des GH ont été décrits, la partie suivante va s'intéresser aux GH spécifiques de *M. tuberculosis* afin d'évaluer les avancées réalisées chez les mycobactéries.

I.5) Glycosides hydrolases de *Mycobacterium tuberculosis*

Chez *M. tuberculosis* H37Rv, 31 gènes codant pour des GH ont été identifiés à ce jour provenant de 14 familles différentes (Tableau III.2). Une caractéristique frappante est la surreprésentation des membres des familles GH13 et GH23 (48 % de tous les gènes GH). Il est à noter que seuls 12 des 31 produits géniques ont été caractérisés biochimiquement. Pour les 19 autres enzymes, les hypothèses ne peuvent donc être faites qu'en fonction de la famille GH à laquelle ils appartiennent et sont donc assignées aux *clans* décrits précédemment. On retrouve également dans le Tableau III.2 la structure tridimensionnelle adoptée par les protéines en fonction de leurs clans respectifs. Ces différents repliements sont décrits en détail dans la partie qui suit. Le type de mécanisme utilisé par ces GH, c'est-à-dire si elles agissent par rétention ou inversion de la configuration du substrat glucidique est également indiqué dans le tableau.

Les premières GH à avoir été élucidées chez *M. tuberculosis* sont celles impliquées dans la biosynthèse du tréhalose. Ce tréhalose est constitutivement retrouvé dans les mycobactéries cultivées en laboratoire; c'est le seul sucre libre facilement détectable dans le cytoplasme et il représente de 1,5 à 3 % du poids sec total des cellules.

La voie la mieux caractérisée pour la biosynthèse du tréhalose implique la condensation du glucose 6-phosphate avec de l'UDP-glucose pour former du tréhalose 6-phosphate, suivie d'une déphosphorylation générant le disaccharide libre (Figure III.6A). Chez *E. coli*, ces

réactions sont catalysées par la tréhalose-6-phosphate synthase (le produit du gène *otsA*) et la tréhalose-6-phosphate phosphatase (*otsB*).

Une voie alternative générant du tréhalose à partir du glycogène a également été identifiée dans laquelle le résidu terminal du polymère de glucose lié en α -(1→4) est converti en liaison α -(1→1) par la maltooligosyltréhalose synthase (MOT synthase, encodée par *treY*) [447]. Le disaccharide terminal est ensuite clivé par une GH (MOT tréhalohydrolase, encodée par *treZ*), libérant alors une molécule de tréhalose libre (Figure III.6B).

Enfin, une dernière voie impliquant du maltose existe. La liaison α -(1→4) du maltose est convertie en liaison α -(1→1) pour former le tréhalose (Figure III.6C). Cette réaction est catalysée par la tréhalose synthase, encodée par le gène *treS* [448].

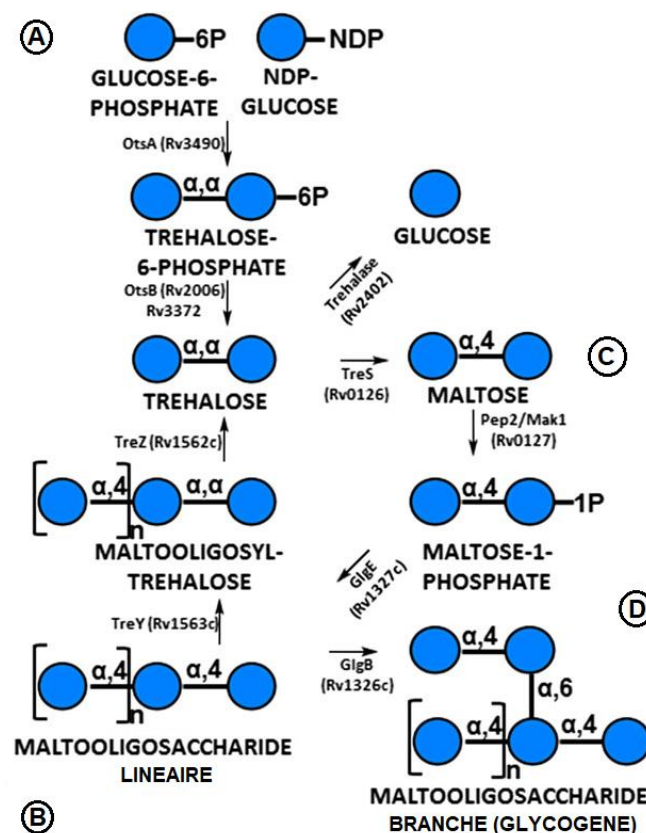


Figure III.6. Voies de biosynthèse du tréhalose chez *M. tuberculosis*.

Trois voies ont été identifiées chez les bactéries : (A) la voie OtsA-OtsB à partir du glucose-6-phosphate; (B) la voie TreY-TreZ mettant en jeu du glucane α -(1→4) linéaire et (C) la voie TreS impliquant du maltose. (D) Le maltose peut être également utilisé pour reformer du glucane α -(1→4) linéaire et ce dernier peut former du glucane ramifié par action de l'enzyme *glgB* [449].

Plus récemment, de nouvelles voies sont venues compléter cette biosynthèse du tréhalose avec comme point central l' α -glucane. On sait depuis longtemps que *M. tuberculosis* accumule ce polymère qui peut atteindre jusqu'à 14 % en poids sec de cellules lorsqu'elle est

cultivée dans des conditions limitantes en azote ou en soufre [450]. Il a d'ailleurs été établi que les homologues de GlgA et de GlgB dans cet organisme étaient responsables de sa synthèse [451]. En effet, les enzymes recombinantes sont capables de synthétiser du glycogène [452], ce qui est corroboré par des preuves génétiques [453].

Ce qui est plus inhabituel chez les mycobactéries, c'est qu'elles sont recouvertes d'une capsule principalement composée d'un α -glucane qui ressemble aussi au glycogène comme mentionné précédemment [454]. Certaines études semblent indiquer que les polymères cytosoliques et capsulaires sont légèrement différents en termes de taille et de degré de compacité [455]. De plus, l' α -glucane capsulaire échappe aux réponses immunitaires innées et acquises, ce qui entraîne un impact sur la persistance [453].

Plus récemment, une nouvelle voie GlgE pour la production d' α -glucane a été identifiée (Figure III.6D). GlgE est une maltosyl transférase qui utilise l' α -maltose 1-phosphate comme donneur afin de générer des liaisons α -(1→4) [456]. Ce disaccharide est assez distinct du donneur monosaccharidique de la glycogène synthase GlgA.

Toutes ces enzymes liées au tréhalose appartiennent à la même famille CAZy GH13 à l'exception de la tréhalase Rv2402. La famille GH13 agit exclusivement sur des substrats contenant des liaisons α -glucoside. Elle est aussi l'une des plus grandes familles du système de classification CAZy, avec plus de 20 activités enzymatiques différentes rapportées. En raison de sa taille et de la diversité de ses activités, cette famille a été l'une des premières familles CAZy à être divisée phylogénétiquement en sous-familles où la plupart d'entre elles n'exercent qu'un seul type d'activité [457].

En revanche, même si les enzymes tréhalase sont généralement présentes dans la famille GH65 [432], la tréhalase Rv2402 a ici été placée dans la famille GH15. La tréhalase (α -(1→1)-glucosyl hydrolase) est l'enzyme majeur du *turnover* du tréhalose, permettant sa conversion en deux molécules de glucose [188]. Ce groupe d'enzymes est largement répandu dans le monde biologique et les tréhalases sont présentes dans la plupart des organismes qui synthétisent et/ou utilisent le tréhalose. Dans la plupart des bactéries, la tréhalase ne semble pas subir de modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation [458], bien que certaines de ces enzymes puissent être régulées par la transcription. Rv2402 se distingue de la plupart des tréhalases car elle a une exigence presque absolue de phosphate inorganique et de Mg^{2+} pour son activité. Leur rôle doit être potentiellement de stabiliser la conformation de l'enzyme ou d'aider à l'agrégation de la protéine pour produire une enzyme active.

D'autres GH sont également présentes en nombre chez les mycobactéries. C'est le cas notamment des enzymes *Resuscitation-promoting factor* (Rpf). Ces enzymes ont déjà été évoquées rapidement lors du *turnover* du PG. Elles sont impliquées dans la réactivation

bactérienne suite à un état de dormance. Il s'agit d'un phénomène complexe nécessitant de nombreuses étapes et mettant en jeu à la fois des hydrolases et des kinases de la paroi [459]. Bien que les cinq gènes codants pour des Rpf soient collectivement indispensables à la croissance *in vitro*, le gène spécifique codant pour RpfB est indispensable pour la réanimation *in vivo* ce qui en fait la cible la plus intéressante pour de nouvelles approches thérapeutiques [460].

Cependant, en dépit de nombreuses informations structurales partielles collectées sur des domaines isolés, les caractéristiques de l'ensemble des multi-domaines de RpfB n'ont jamais été élucidées. Seule la fonction de l'enzyme RpfE est aujourd'hui connue [461] et on sait également que RpfB et RpfE interagissent avec RipA démontrant ainsi que les Rpfs n'agissent pas seules.

Les enzymes Rpfs appartiennent à la famille CAZy GH23. Tous les membres de cette famille possèdent une activité de transglycosylase lytique sur le PG; c'est-à-dire qu'elles catalysent une transglycosylation intramoléculaire sur l'hydroxyle C-6 du résidu muramyle, ce qui conduit à la formation d'un acide 1,6-anhydromuramique terminal [462].

Un peu plus étonnant, deux cellulases ont aussi été caractérisées chez *M. tuberculosis*. En effet, bien que les mycobactéries appartiennent au groupe *Actinobacteria* qui est un phylum composé de nombreuses bactéries cellulolytiques du sol telles que *Streptomyces*, aucune mycobactérie n'a été rapporté comme étant cellulolytique (c'est-à-dire pouvant utiliser une source cristalline de cellulose comme seule source glucidique) [463].

Cependant, le séquençage des génomes mycobactériens a révélé des gènes codant pour la cellulase. La première à avoir été caractérisée et cristallisée est l'endoglucanase CelA (Rv0062) appartenant à la famille GH6 [464]. Par la suite, une analyse plus poussée du génome de *M. tuberculosis* a démontré que le gène *Rv1090* code pour une seconde cellulase (CelA2b) et que le gène *Rv1987* code pour une protéine candidate de liaison à la cellulose [465]. Les deux cellulases CelA et CelA2b sont en fait capables d'hydrolyser des chaînes de β -glucane.

De nombreuses hypothèses ont été émises sur les raisons pour lesquelles les mycobactéries ont conservé des gènes codant pour la cellulase mais aucune d'entre elles n'a pu être vérifiée par des preuves expérimentales.

Les organismes non cellulolytiques peuvent tout de même s'associer à de vrais organismes cellulolytiques au sein d'une communauté complexe afin d'hydrolyser une source cristalline de cellulose [466]. Il est donc tout à fait concevable que certaines mycobactéries utilisent une stratégie similaire.

Plus récemment, il a été montré que *M. tuberculosis* est capable de produire des filaments de cellulose, qui jouent un rôle central dans l'intégrité structurale de ses biofilms [467]. Ce

phénomène est très bien connu chez les protéobactéries où la cellulose confère une résistance aux structures du biofilm [468]. Une nouvelle cellulase a ainsi pu être mise en avant chez *M. smegmatis* en relation avec l'induction de la cellulose (MSMEG_6752) [469].

Tableau III.2. Liste des 31 glycosides hydrolases (GH) connues à ce jour chez *M. tuberculosis* avec leurs orthologues respectifs chez *M. smegmatis*.

Les familles à laquelle appartiennent les différentes GH concernées sont également indiquées ainsi que les références associées aux fonctions des protéines lorsque celles-ci sont connues.

Nom (Numéro accession Uniprot)	Orthologue <i>M. smegmatis</i> (Numéro accession Uniprot)	Classe d'enzyme IUB-MB	Protéine sécrétée ?	Nom du gène	Famille GH CAZy	Référence pour la fonction de la protéine
Rv1327c (P9WQ17)	MSMEG_4916 (Q9RP48)	2.4.99.16	Non	<i>glgE</i>	GH13	Kalscheuer et al. (2010)
Rv1326c (P9WN45)	MSMEG_4918 (A0R1Y4)	2.4.1.18	Non	<i>glgB</i>	GH13	Garg et al. (2007)
Rv1562c (P9WQ23)	MSMEG_3184 (A0QX61)	3.2.1.141	Non	<i>treZ</i>	GH13	De Smet et al. (2000)
Rv1564c (P9WQ25)	MSMEG_3186 (A0QX62) MSMEG_6507 (A0R6D2)	-	Non	<i>treX</i>	GH13	-
Rv0126 (P9WQ19)	MSMEG_6515 (A0R6E0)	5.4.99.16	Non	<i>treS</i>	GH13	Pan et al. (2004)
Rv1563c (P9WQ21)	MSMEG_3192 (A4ZHS7)	5.4.99.15	Non	<i>treY</i>	GH13	De Smet et al. (2000)
Rv2471 (O53198)	MSMEG_4696 (A0R1B9)	-	Non	<i>aglA</i>	GH13	-
Rv2402 P71741)	MSMEG_4535 (A0R0W9)	3.2.1.28	Non	<i>rv2402</i>	GH15	Carroll et al. (2007)
Rv3031 (P9WQ27)	MSMEG_2349 (A0QUV4)	-	Non	<i>rv3031</i>	GH57	-
Rv2006 (P9WN15)	MSMEG_3954 (A0QZA5)	-	Non	<i>otsB1</i>	GH65	-
Rv3401 (P9WN13)	MSMEG_1608 (A0QSU9)	-	Non	<i>rv2006</i>	GH65	-
Rv1781c (P9WK23)	MSMEG_3673 (A0QYI8)	-	Non	<i>malQ</i>	GH77	-
Rv0186 (O07430)	-	-	Non	<i>bglS</i>	GH3	-
Rv3096 (I6YB54)	MSMEG_5877 (A0R4L5)	-	Oui	<i>rv3096</i>	GH5	-
Rv0062 (Q79G13)	MSMEG_6752 (A0R722)	3.2.1.4	Oui	<i>celA1</i>	GH6	Varrot et al. (2005)
Rv1090 (O53438)	-	3.2.1.4	Non	<i>celA2b</i>	GH12	Mba Medie et al. (2011)
Rv0315 (O07242)	MSMEG_0645 (A0QQ67)	3.2.1.6	Oui	<i>rv0315</i>	GH16	Dong et al. (2015)
Rv0237 (L7N6B0)	MSMEG_0361 (A0QPD6)	-	Oui	<i>lpqI</i>	GH3	-
Rv2450c (O53177)	MSMEI_4524 (I7FQH2)	4.2.2.n1	Oui	<i>rpfE</i>	GH23	Hett et al. (2008)
Rv1009 (P9WG29)	MSMEG_5439 (A0R3E0)	-	Oui	<i>rpfB</i>	GH23	-
Rv1022 (P96378)	MSMEG_5416 (A0R3B9)	-	Oui	<i>lpqU</i>	GH23	-
Rv1230c (O86313)	MSMEG_5067 (A0R2C9)	-	Non	<i>rv1230c</i>	GH23	-
Rv0867c (P9WG31)	MSMEG_5700 (A0R445)	-	Oui	<i>rpfA</i>	GH23	-
Rv1884c (O07747)	-	-	Oui	<i>rpfC</i>	GH23	-
Rv2389c (P9WG27)	-	-	Non	<i>rpfD</i>	GH23	-
Rv3896c (O05448)	-	-	Non	<i>rv3896c</i>	GH23	-
Rv2525c (I6XEI5)	-	-	Oui	<i>rv2525</i>	GHinc.	-
Rv0648 (P96937)	MSMEG_1361 (A0QS59)	3.2.1.24	Non	<i>rv0648</i>	GH38	Rivera-Marrero et al. (2001)
Rv0365c (O06315)	MSMEG_0740 (A0QQF8)	-	Non	<i>rv0365c</i>	GH76	-
Rv0584 (O86365)	-	-	Oui	<i>rv0584</i>	GH92	-
Rv0394c (P95202)	-	-	Non	<i>rv0394c</i>	GHinc.	-

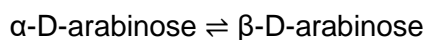
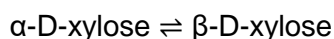
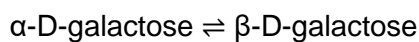
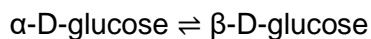
Si tout ce chapitre s'est pour le moment focalisé sur les GH rencontrées chez les mycobactéries, de nombreuses autres enzymes entrent dans le métabolisme de l'AG et notamment en ce qui concerne les monosaccharides le composant. C'est le cas par exemple des aldoses 1-épimérase (ou mutarotases) qui interviennent dans le recyclage de la chaîne galactane de l'AG. Nous nous sommes donc également penchés sur les mécanismes de ce type d'enzymes et c'est sur ce point que le reste du chapitre se portera.

II) Rôle des aldoses 1-épimérase (mutarotases) dans le catabolisme de l'AG

III.1) La voie de Leloir

Tout d'abord, les épimérases sont des enzymes de type isomérase qui catalysent l'inversion stéréochimique d'un atome de carbone asymétrique (en l'occurrence le carbone anomérique dans le cas des glucides) dans une molécule ayant plus centres d'asymétrie.

L'aldose 1-épimérase, également nommée galactose mutarotase, est donc une épimérase qui catalyse différentes réactions :



Cette enzyme peut aussi agir sur des disaccharides tels que le maltose ou encore le lactose. Elle intervient dans divers processus comme la glycolyse, la néoglucogenèse et la voie de Leloir [470] (Figure III.6).

Lors de la première étape de la voie de Leloir, le β -D-galactose est épimérisé en α -D-galactose par action de la galactose mutarotase. L'étape suivante implique la phosphorylation de l' α -D-galactose par la galactokinase ATP-dépendante pour donner le galactose 1-phosphate. Comme indiqué sur la Figure III.6, la troisième enzyme de la voie, la galactose-1-phosphate uridylyltransférase, catalyse le transfert d'un groupe UMP de l'UDP-glucose en galactose 1-phosphate, générant ainsi le glucose 1-phosphate et l'UDP-galactose. Pour compléter la voie, l'UDP-galactose est converti en UDP-glucose par l'UDP-galactose 4-épimérase [471]. Chez l'homme, des défauts dans les gènes codant pour la galactokinase, l'uridylyltransférase ou l'épimérase peuvent donner lieu à une pathologie appelée communément galactosémie.

Bien que la galactosémie soit rare, elle est potentiellement mortelle avec des manifestations cliniques comprenant un retard intellectuel, un dysfonctionnement du foie et de la formation de cataracte, entre autres [472]. En effet, les enzymes de la voie de Leloir ont attiré l'attention pendant de nombreuses années, en partie à cause de leur rôle métabolique important dans le métabolisme normal du galactose.

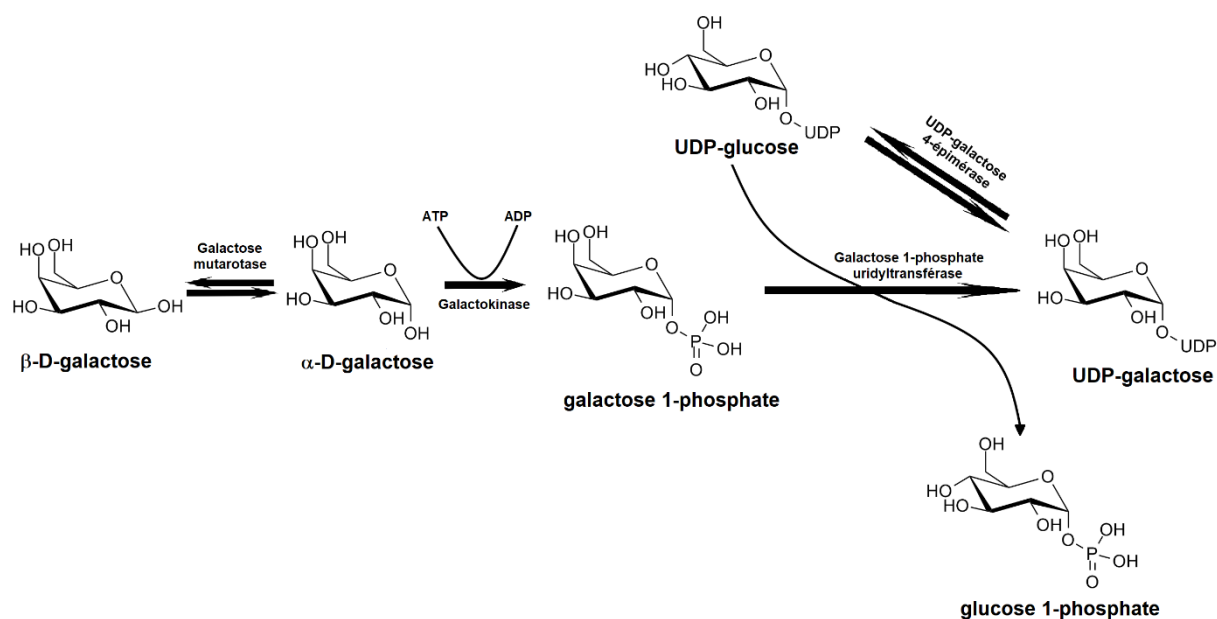


Figure III.6. Schéma réactionnel de la principale voie métabolique de dégradation du galactose, aussi appelée voie de Leloir.

La voie de Leloir s'inscrit également dans le métabolisme du galactose chez les mycobactéries comme le montre l'encadré noir de la Figure III.7 représentant le schéma KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) de ce métabolisme chez *M. smegmatis*. Les enzymes impliquées dans ce recyclage du galactose sont aujourd'hui connues à l'exception de la galactose mutarotase toujours hypothétique (enzyme 5.1.3.3 sur la Figure III.7).

En effet, comme décrit précédemment, une exo-galactofuranohydrolase a déjà été caractérisée chez *M. smegmatis* (MSMEG_5877) et *M. bovis* BCG (Rv3096), qui libère le galactose de la chaîne galactane de l'AG (enzyme 3.2.1.23). Une galactose mutarotase se positionne donc tout naturellement après cette étape pour permettre un recyclage du galactose libéré en accélérant sa conversion vers le galactose-1-P. Ensuite, ce galactose-1-P, par action successive d'une galactose-1-phosphate uridylyltransférase et d'une UDP-galactopyranose mutase peut reformer de l'UDP-D-galactofuranose nécessaire à la biosynthèse des chaînes galactane de l'AG. Ces deux enzymes sont déjà identifiées chez *M. smegmatis*, MSMEG_3691 (*galT*) est la galactose-1-phosphate uridylyltransférase et MSMEG_6404 (*glf*) est l'UDP-galactopyranose mutase. Le fait que *M. smegmatis* ne puisse pas pousser sur galactose semble bien confirmer le fait que ce monosaccharide est utilisé par la biosynthèse de l'AG et non pas pour son apport énergétique [473].

Un écueil à cette hypothèse est le fait que le galactose est libéré au niveau de la paroi alors que la galactose mutarotase apparaît comme une protéine cytosolique. L'existence d'un transporteur GalP (MSMEG_3689) chez *M. smegmatis* a déjà été postulé mais pas chez

M. tuberculosis (qui, par contre, possède trois gènes *galE* permettant la conversion du glucose en galactose). Une recherche dans les banques de données ne montre que deux *hits* significatifs chez les mycobactéries : MSMEG_3598 (*xypA*) et MSMEG_3599 (*thpA*). C'est pour cette raison que la voie métabolique KEGG de la Figure III.7 a ici été choisie chez *M. smegmatis*. Ces deux protéines ne semblent être retrouvées que chez *M. smegmatis* parmi les mycobactéries. Malheureusement pour l'instant, il n'a été montré, pour ces deux transporteurs, qu'une liaison aux polyols comme le xylitol et le thréitol.

III.2) Mécanismes de la galactose mutarotase

Pour en revenir à la galactose mutarotase, son activité a été pour la première fois reportée chez *E. coli* en 1965 [474], et le gène codant correspondant a été défini en 1994 [475]. Depuis 1986, des gènes codants pour des protéines ayant une activité mutarotase ont été identifiées dans d'autres organismes, dont *Lactococcus lactis*. En ce qui concerne le mécanisme catalytique, il a tout d'abord démontré que la réaction se produisait par extraction du proton du groupement hydroxyle C1 du sucre par une base du site actif et par la donation d'un proton à l'oxygène C5 par un acide du site actif, conduisant ainsi à l'ouverture du cycle. Une rotation ultérieure de 180° autour de la liaison C1-C2, suivie de l'abstraction du proton sur l'oxygène C5 et de la restitution d'un proton à l'oxygène C1 génère le produit [476].

La première structure d'une galactose mutarotase provenant de *L. lactis* a été déterminée en 2002. La Figure III.8 montre une représentation en ruban de l'enzyme dimérique. Chaque sous-unité contient 339 résidus d'acides aminés et adopte un motif distinctif en sandwich β . Malgré le manque d'homologie au niveau de la séquence en acides aminés, la topologie globale de ce sandwich β est similaire à celle qui avait été observée pour la première fois dans le domaine 5 de la β -galactosidase d'*E. coli* [477].

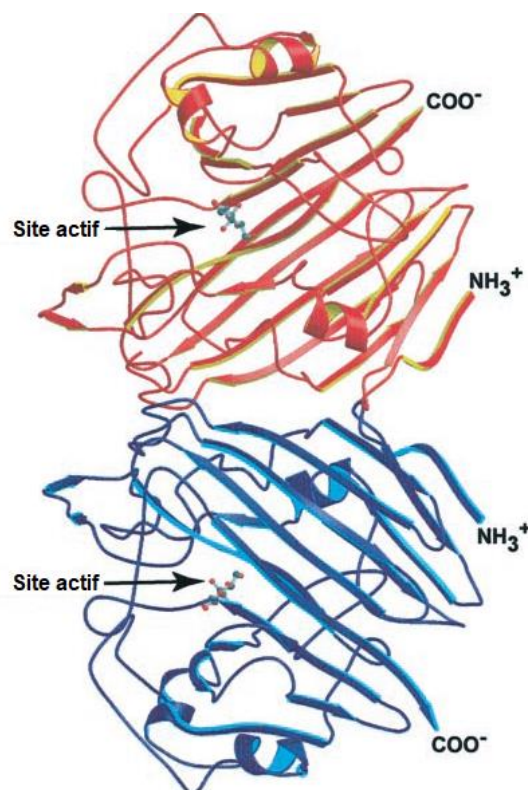


Figure III.8. Représentation dimérique en ruban de l'enzyme galactose mutarotase avec les sites actifs.

Chaque sous-unité possède 339 acides aminés et adopte une conformation en sandwich β [471].

Le site actif quant à lui est positionné dans une fente ouverte et les groupements hydroxyle du galactose sont situés à une distance de la liaison hydrogène entre plusieurs chaînes latérales, notamment His-96, His-170 et Glu-304. Ces trois résidus sont strictement conservés dans les séquences de la galactose mutarotase. Afin de déterminer le rôle de chacun de ces trois résidus dans la catalyse, des protéines mutantes ont été construites par mutagenèse dirigée. Leurs structures ont ainsi pu être résolues à haute résolution et leurs paramètres cinétiques ont été déterminés [478]. Toutes ces recherches ont abouti à la proposition du mécanisme catalytique de la galactose mutarotase, dans lequel le résidu Glu-304 sert de base dans le site actif pour extraire l'hydrogène de l'hydroxyle C1 et le résidu His-170 (ou His-96) agit en tant qu'acide pour protoner l'oxygène C5 du cycle (Figure III.9).

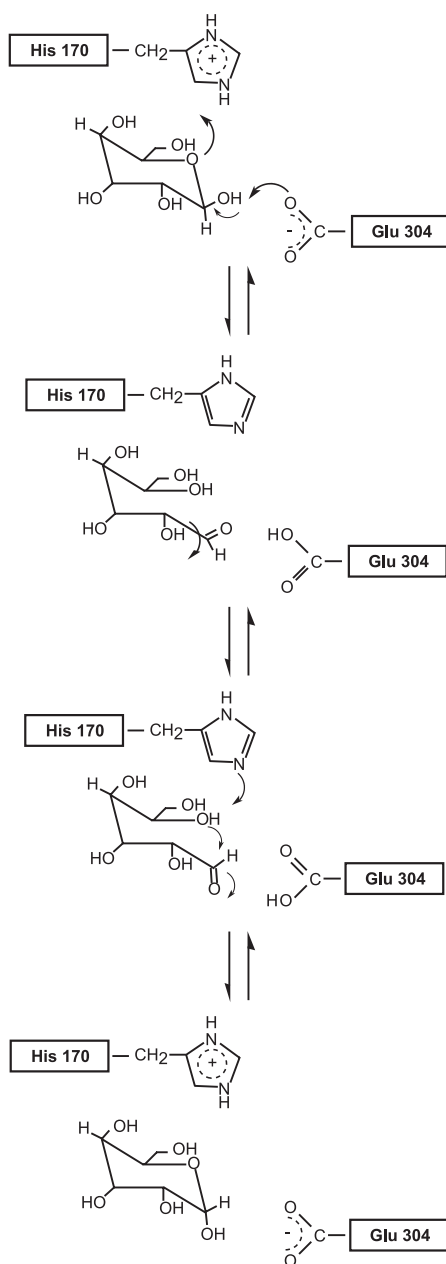


Figure III.9. Schéma réactionnel du mécanisme catalytique de l'enzyme galactose mutarotase chez *L. lactis*.

Plus récemment, le gène codant pour la galactose mutarotase chez l'homme a été cloné et exprimé, et la protéine a été purifiée à homogénéité [479]. Contrairement à l'enzyme bactérienne, la protéine humaine se comporte comme un monomère en solution. Cependant, comme observé pour l'enzyme chez *L. lactis*, la galactose mutarotase humaine a démontré une préférence pour le galactose comme substrat plutôt que le glucose. Sur la base d'expériences de mutagenèse dirigée et d'analyses cinétiques, il semble que la réaction catalysée par la galactose mutarotase humaine se déroule grâce à l'action des résidus Glu-307 et His-176 via un mécanisme similaire proposé pour l'enzyme de *L. lactis*. Jusqu'à présent, aucune maladie n'a été attribuée à des mutations dans la galactose mutarotase humaine.

III.3) Etude de l'UDP-galactose 4-épimérase (GalE) de la voie de Leloir

Une épimérase est également présente dans la voie de Leloir comme indiqué sur la Figure III.6. Il s'agit de l'UDP-galactose 4-épimérase (GalE) qui est aujourd'hui bien connue et caractérisée (enzyme 5.4.99.9 de la voie KEGG, Figure III.7). Cette enzyme catalyse l'étape finale du métabolisme normal du galactose en régénérant l'UDP-glucose. C'est d'ailleurs la seule enzyme qui catalyse l'interconversion des groupes glucosyl et galactosyl. Une des particularités de GalE et plus généralement des épimérases et racémases est leur non-stéréospécificité. En effet, les interactions enzyme-substrat sont presque universellement stéréospécifiques et conduisent à une stéréospécificité dans les réactions, ce qui n'est pas le cas de GalE qui possède une molécule de nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) par sous-unité fonctionnant en catalyse redox réversible [480].

Le mécanisme réactionnel de l'épimérase est caractérisé par l'utilisation de NAD⁺ en tant que cofacteur pour soustraire l'hydrure de la position d'épimérisation. Le proton restant est dans le même temps transféré vers un résidu de base catalytique, laissant alors derrière lui un groupe céto. En raison de la mobilité dite en torsion de la partie glucidique de l'UDP-sucre dans le site actif, une rotation peut avoir lieu et ainsi permettre au NADH de transférer l'hydrure vers le site opposé, complétant ainsi la réaction d'épimérisation [481] (Figure III.10). Il semblerait que ce mécanisme ne fonctionne que sur des structures en cycle fermé, comme c'est le cas pour l'UDP-galactose 4-épimérase [482].

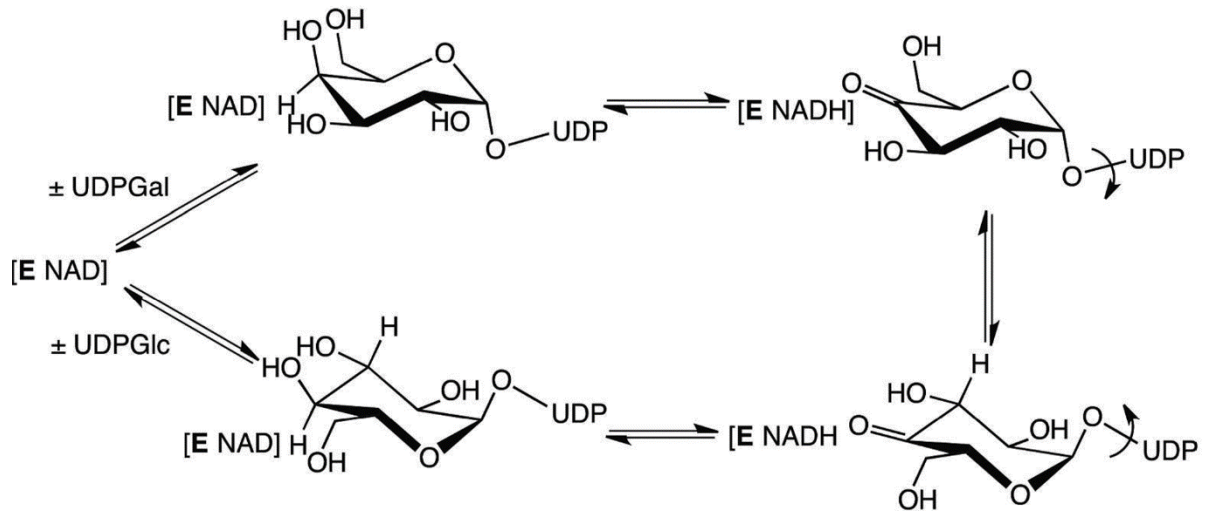


Figure III.10. Schéma du mécanisme réactionnel de l'UDP-galactose 4-épipimérase (GalE) avec l'utilisation du NAD⁺ comme cofacteur [481].

L'épipimérase GalE fait partie de la super-famille des déshydrogénases à courte chaîne (*short-chain dehydrogenase* ou SDR) qui comprend plus de 5000 séquences et 300 structures cristallographiques et qui englobe plusieurs classes d'enzymes, y compris les oxydoréductases et les lyases en plus des épimérasés [483].

Tous les membres de cette famille contiennent un pli Rossman qui est un motif structural protéique présent dans les protéines liants les nucléotides et notamment le NAD [484]. La structure est composée d'un feuillet β de 6 brins parallèles liés à deux paires d'hélices α (Figure III.11A). Les 4 acides aminés Asn-Ser-Tyr-Lys sont également conservés dans leur site actif (Figure III.11B).

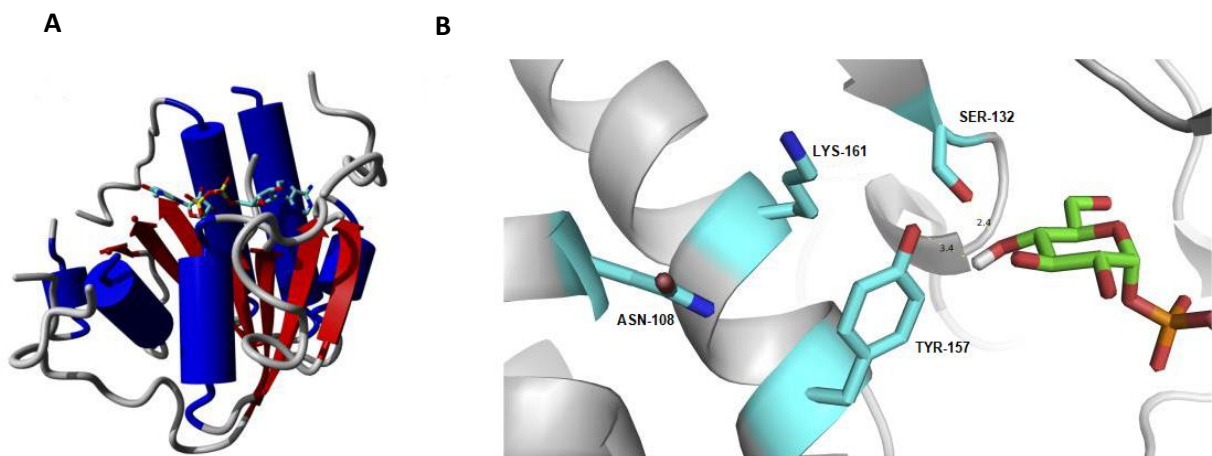


Figure III.11. (A) Domaine de pli Rossman de la GDP-mannose 3,5-épipimérase provenant d'*A. thaliana* avec le NAD comme substrat. (B) Le site catalytique de GalE contient la tétrade Asn-Ser-Tyr-Lys conservée, qui est responsable de la liaison de l'UDP-glucose et de la réalisation d'importantes fonctions catalytiques [484].

Conclusion générale de la partie introductive sur les mycobactéries

M. tuberculosis, qui cause la tuberculose humaine, est la première cause de décès dans le monde lié à un seul pathogène selon l'OMS. De plus, l'émergence de souches multi-résistantes (MDR) et ultra-résistantes (XDR) a mis en avant le besoin urgent de nouvelles cibles médicamenteuses afin que l'objectif ambitieux d'éradiquer la tuberculose avant 2030 ait une chance d'aboutir.

Environ un tiers de la population mondiale vit aujourd'hui avec le pathogène dans son organisme et celui-ci vit en état de dormance en attente d'une réactivation qui se produit notamment en cas d'immunodépression et principalement lors d'infection au VIH en amont.

On peut alors prendre la réponse au processus infectieux sous deux angles : le premier en se plaçant du côté de l'hôte qui va mettre en place la réponse immunitaire et de l'autre *M. tuberculosis* qui va établir des stratégies pour échapper au système immunitaire de l'hôte. Cela implique donc de s'intéresser aux nombreux mécanismes qui régissent les relations hôte-pathogène afin d'appréhender au mieux les solutions à apporter pour l'élaboration de nouveaux traitements dans le but de faire face notamment aux souches résistantes qui sont un problème de plus en plus préoccupant.

Si l'on se place dans un premier temps du côté de l'hôte, nous avons vu dans le premier chapitre que ce dernier met en jeu très rapidement différents acteurs du système immunitaire lors de l'entrée des mycobactéries dans les poumons. On retrouve principalement les cellules dendritiques et les macrophages qui une fois activés vont produire une réponse immunitaire adaptative débouchant au final sur la formation du granulome. Ce granulome vient en fait piéger les bacilles en empêchant leur propagation mais ne permet pas leur destruction. C'est pour cette raison que l'on parle d'état de dormance.

En effet, du point de vue de *M. tuberculosis*, son confinement dans le granulome n'est pas suffisant pour entraîner son éradication. Au contraire, les mycobactéries sont même capables de contourner le granulome à leur avantage en formant une barrière protectrice. Lorsqu'un évènement immunodépressif intervient, le système immunitaire de l'hôte ne peut alors plus contenir le pathogène qui peut ainsi se propager et infecter les autres tissus. Cette capacité de *M. tuberculosis* à utiliser l'hôte pour se protéger est dû à des mécanismes adéquats et notamment à son aptitude de remodelage de la paroi cellulaire au cours de l'infection pour s'adapter à son environnement.

La paroi de *M. tuberculosis* possède une structure unique comportant principalement des glycolipides et des polysaccharides. Nous avons dans le second chapitre passé en revue ses différents composants et force a été de constater que pour l'ensemble d'entre eux, les

voies de synthèse ont été minutieusement examinés au cours des deux dernières décennies mais peu d'éléments sont aujourd'hui connus sur la façon dont *M. tuberculosis* module et adapte l'expression de sa paroi cellulaire en réponse aux conditions fluctuantes perçues ou de stress.

L'attention en ce qui concerne ce pan de la thèse s'est portée exclusivement sur l'AG et plus particulièrement à sa dégradation. L'AG étant composé uniquement de monosaccharides, les enzymes impliquées dans son catabolisme sont forcément des GH. C'est pour cette raison que le dernier chapitre de l'introduction s'est focalisé sur les GH et à leurs mécanismes. Ces GH ont été répertoriées dans la banque de données CAZy et ont été classées par famille selon leur séquence protéique et leur structure. Chez *M. tuberculosis*, 31 GH ont été identifiées à ce jour provenant de 14 familles différentes mais seules 12 d'entre elles ont été caractérisées. Pour revenir sur l'AG, seule une galactofuranohydrolase (Rv3096) a récemment été identifiée au sein de notre laboratoire mais le champ exploratoire reste important notamment en ce qui concerne la dégradation de l'arabinane.

De manière plus générale, la dégradation et le remodelage de l'AG mycobactérien constitue donc une voie innovante pour la découverte de nouveaux traitements anti-tuberculeux et ainsi répondre aux attentes actuelles.

Objectifs

Depuis quelques années, notre laboratoire sous la direction du Dr Yann Guérardel s'intéresse au catabolisme de la paroi mycobactérienne et a pu prouver en collaboration avec l'équipe du Dr Laurent Kremer (Mycobacterial Pathogenesis and Novel Therapeutic Targets, IRIM-UMR9004, Montpellier) que les mycobactéries avaient la capacité de dégrader leur propre mAGP. Ces observations résultent de trois études complémentaires qui ont été menées par ces équipes. Deux de ces aspects ont déjà été évoqués dans la partie traitant du catabolisme de l'AG, à savoir l'identification du di-mycolyl-di-arabinoglycérol (DMAG) et de l'enzyme β -D-galactofuranohydrolase Rv3096.

Un dernier point est également entré en ligne de compte dans les premiers résultats sur l'existence d'un catabolisme de l'AG. En effet, une méthode se basant sur un dosage biochimique hautement spécifique et sensible par chromatographie ionique couplée à la spectrométrie de masse a été développée. Pour ce faire, de l'AG est purifié à partir de mycobactéries et sert de substrat pour l'hydrolyse avec le lysat protéique soluble total mycobactérien. Cette méthode a permis d'identifier des oligosaccharides libérés par l'AG initial s'apparentant à des fragments de chaînes d'arabinane.

Sur la base de ces résultats préliminaires, un projet a été financé par l'Agence Nationale de la Recherche pendant 3 ans (2016-2019) sous l'acronyme MyCat et ayant pour sujet le catabolisme de la paroi mycobactérienne : vers le développement de nouveaux inhibiteurs. Ce travail regroupe les deux laboratoires cités précédemment auquel s'est greffé l'équipe du Pr. Stéphane Vincent (laboratoire de Chimie Bio-Organique, Namur).

Le projet de thèse a donc pu voir le jour afin de poursuivre les investigations sur les glycosidases pouvant être impliquées dans le remodelage et la dégradation de la paroi mycobactérienne, en portant ici une attention exclusive sur l'AG.

L'objectif principal s'est donc porté sur la recherche d'une endo-D-arabinase participant à la dégradation de l'AG et dont les premiers résultats se sont révélés prometteurs grâce notamment au développement de la méthode de criblage de cette activité. Pour ce faire, l'enzyme a été isolée à partir d'un lysat protéique soluble total provenant de *M. smegmatis* par des étapes chromatographiques successives (gel-filtration, chromatographie échangeuse d'ions, hydrophobe...) et en contrôlant au fur et à mesure l'activité en HPAEC. Ensuite, les fractions positives contenant l'activité endo-D-arabinase ont été soumises à une analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS/MS) en collaboration avec le Dr. Jean-Michel Saliou (Plateforme de Protéomique et Peptides Modifiés, P3M, INSERM U1019, CNRS UMR 8204, Université de Lille, Institut Pasteur de Lille) afin de déterminer les protéines encore présentes dans ces fractions. Enfin, par un travail de bioinformatique, des candidats potentiels à la fonction endo-D-arabinase ont été sélectionnés

puis les gènes synthétiques associés ont été commandés (GeneCust, Boynes, France) pour leur expression dans *E. coli*.

La première partie des résultats va donc porter sur tout ce processus de recherche d'enzyme arabinase et nous verrons qu'au fil de l'avancée de cette partie de thèse, d'autres enzymes ont pu être identifiées.

En plus de cet objectif principal, un autre aspect a attiré notre attention et a concerné l'étude structurale de l'AG tronqué. En effet, il a été montré avant le début de l'ANR que lors de la purification de l'AG, des fragments de plus petite taille que l'AG complet étaient également retrouvés (Figure 1). Ce versant est également très intéressant car à l'heure actuelle, les recherches sur l'AG n'ont concerné que la structure de l'AG complet, ce qui se justifie aisément par la complexité du travail et par le caractère majoritaire de l'AG complet. Mais l'étude des structures minoritaires et/ou incomplètes d'AG n'a pas encore été abordée alors qu'elles peuvent révéler des informations essentielles sur sa biosynthèse ou son catabolisme. En cela, la caractérisation structurale de ces fragments peut constituer une aide précieuse pour montrer et étudier un catabolisme de l'AG. C'est pour cette raison que la seconde partie des résultats portera sur la caractérisation structurale de ces fragments d'AG.

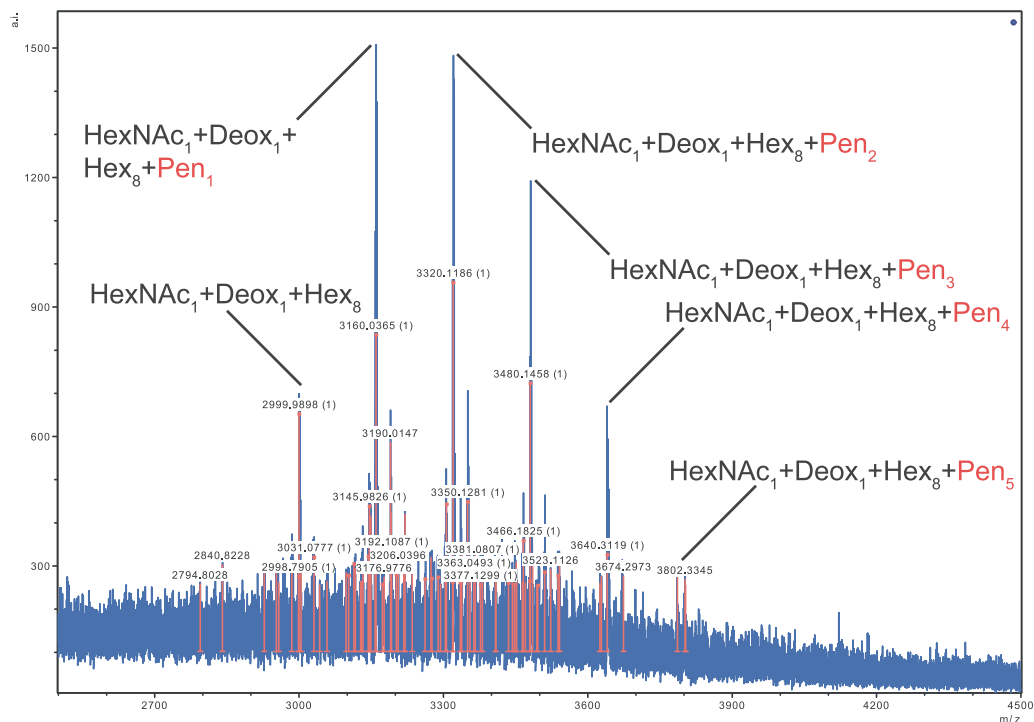


Figure 1. Analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF des fragments incomplets d'AG. Lors de la purification de l'AG, il a été observé pour la première fois qu'en plus de l'AG complet se trouvait des fragments d'AG de plus petite taille. La plupart des études s'étant cantonnées à l'utilisation de l'AG total, l'analyse structurale de ces fragments incomplets d'AG n'a jamais été réalisée mais ces derniers pourraient bien provenir d'une dégradation de l'AG et donc être associés à son catabolisme.

Résultats et discussion

Chapitre IV : Recherche d'enzymes impliquées dans le catabolisme de l'arabinogalactane de la paroi mycobactérienne

Comme nous avons pu le constater dans la partie introductive, la paroi mycobactérienne a été très étudiée au cours des dernières décennies mais les études qui l'ont concerné se sont penchées principalement sur sa biosynthèse. Le versant catabolique a en effet été très peu mis en avant alors qu'il peut apporter de nombreuses informations clés pour le développement de nouveaux traitements anti-tuberculeux face aux résistances croissantes. Ce sont ces dernières qui ont d'ailleurs remis la tuberculose sur le devant de la scène et les besoins se font de plus en plus pressants car l'objectif est d'éradiquer cette maladie dans les vingt prochaines années.

C'est pour ces raisons que le chapitre développé ici porte sur la recherche des enzymes impliquées dans ce catabolisme en se focalisant sur l'AG car celui-ci étant constitué exclusivement d'oligosaccharides, il correspond parfaitement aux compétences disponibles au sein de notre laboratoire. Comme il a été mentionné dans la partie de présentation du projet de thèse, des études préliminaires ont été menées sur ce sujet et ont pu prouver l'existence d'un catabolisme de l'AG et une première enzyme a été caractérisée. Il s'agit d'une exogalactofuranohydrolase, Rv3096, qui coupe de façon récurrente la chaîne galactane de l'AG en libérant du galactose libre. De plus, un article de la littérature paru en 1999 par Xin Y. *et al.* fait mention d'une activité endo-D-arabinase et celle-ci a été décrite dans *M. smegmatis* sans pour autant identifier la protéine ni le gène correspondant [293]. Cet article est d'ailleurs le seul à ce jour à avoir stipuler une telle activité chez *Mycobacterium* et a ainsi servi de base de travail dans le cadre de notre étude. A noter qu'un second article publié par Dong X. *et al.* en 2006 [485] pour la détection de cette activité peut également être cité mais celui-ci reprend les travaux réalisés par Xin Y. *et al.* en 1999. C'est pour cette raison que le modèle qui a été choisi pour l'étude protéomique est *M. smegmatis* puisqu'aucune preuve directe n'existe à ce jour sur la présence d'une activité arabinase chez *M. tuberculosis*. L'idée a donc été de séparer les différentes protéines de *M. smegmatis* par des techniques chromatographiques afin d'isoler la protéine porteuse de l'activité arabinase puis de déterminer le gène responsable associé grâce à des analyses de chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS pour *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*). Une fois l'enzyme d'intérêt identifiée, il sera alors possible d'identifier son potentiel orthologue dans les bactéries du complexe *tuberculosis*.

Par ailleurs, nous verrons à travers ces investigations que d'autres enzymes d'intérêt sont venus s'ajouter à la liste de celles impliquées dans le catabolisme de l'AG au fur et à mesure des avancées.

Ce chapitre représente ainsi le cœur du sujet de thèse et a occupé la majeure partie des investigations. Son cheminement va être décrit de manière chronologique et va se diviser en plusieurs grandes parties :

- la première va aborder les différentes étapes qui ont été nécessaires pour déterminer l'activité arabinasique de l'AG. Cette partie a été complexe à réaliser dû à la difficulté inhérente à l'isolement de protéines associées à la paroi mycobactérienne. Ces difficultés ne sont cependant pas réellement étonnantes car des problèmes similaires ont été observés pour Rv3096;
- une fois la stratégie établie, deux campagnes de purification pour la recherche d'une endo-D-arabinase ont été menées. A noter que le terme endo est utilisé ici car contrairement à la chaîne galactane, les chaînes arabinane sont ramifiées et d'après les profils analytiques obtenus, l'enzyme recherchée clive à l'intérieur de ces chaînes. Ces deux campagnes ont permis une sélection de plusieurs candidats potentiels amenant à la purification des protéines recombinantes correspondantes. Il n'a cependant pas été possible d'arriver à une fraction ne contenant que l'enzyme d'intérêt. Il a de ce fait été choisi de poursuivre l'isolement au maximum sans perdre l'activité puis d'identifier les protéines par LC-MS afin de sélectionner celles qui pourraient être une glycosidase;
- enfin, lors de la sélection des candidats, d'autres enzymes se sont avérées avoir un rôle potentiel dans le catabolisme/remodelage de l'AG. L'une d'entre elle a particulièrement attiré notre attention et a été étudiée plus en détail, à savoir la galactose mutarotase dont les fonctions ont été décrites dans la partie introductive.

I) Recherche et optimisation d'une activité endo-D-arabinase impliquée dans le catabolisme de l'arabinogalactane

I.1) Purification de l'arabinogalactane et extraction des protéines mycobactériennes

Dans un premier temps, il est essentiel de présenter le protocole ayant servi à la purification de l'AG mycobactérien qui constitue le substrat principal de cette partie du projet. Ce protocole a été utilisé à maintes reprises tout au long de la thèse et comporte de nombreuses étapes qui se basent sur une publication de Besra GS. paru en 1998 [486] et qui vont être détaillées ici (Figure IV.1).

Tout d'abord, seules deux espèces mycobactériennes ont servi dans ce projet, à savoir *M. smegmatis* et *M. bovis* BCG. La méthode de purification de l'AG reste la même pour ces deux espèces et commence en amont par la culture mycobactérienne. Cette culture est réalisée en milieu liquide. Le milieu 7H9+OADC a été choisi en premier lieu avant que le milieu Sauton ne soit finalement privilégié pour uniformiser les conditions expérimentales des différents sujets du groupe portant sur les mycobactéries. Le temps de division est cependant très différent entre *M. smegmatis* et *M. bovis* BCG. En effet, pour *M. smegmatis*, le temps de doublement des cellules est de l'ordre de 3 à 5 h alors que *M. bovis* BCG faisant partie du complexe *tuberculosis*, son temps de division est beaucoup plus lent et se rapproche plutôt des 20 h.

Dans tous les cas, la purification de l'AG a généralement été démarrée à partir d'un culot humide d'environ 5 g qui a été obtenu après centrifugation de la culture en milieu liquide. Dans un premier temps, les cellules sont lysées par sonication puis par deux passages successifs en presse de French après avoir été suspendues dans un tampon de lyse. Ensuite, une centrifugation permet de séparer deux composantes; on obtient d'une part le culot nommé C1 qui est requis pour la suite de la purification de l'AG et d'autre part le surnageant appelé S1 qui est composé de l'ensemble des protéines solubles et constitue le lysat protéique total. C'est ce lysat qui a servi de point de départ à la purification de l'activité endo-D-arabinase. Il est important de souligner ici que seul le lysat protéique de *M. smegmatis* a été exploité pour cette recherche enzymatique car aucune activité n'a été visible chez *M. bovis* BCG dans nos conditions expérimentales.

Pour en revenir au culot C1, celui-ci est soumis à une extraction à l'aide du détergent Triton X-100 sur une nuit avant d'effectuer une seconde centrifugation permettant de récupérer le culot C2 et le surnageant S2. Cette seconde étape est nécessaire pour séparer le matériel insoluble de la paroi cellulaire (C2) du surnageant composé des PIM, LM et LAM (S2). Ces derniers peuvent ensuite être purifiés à leur tour selon un autre protocole qui ne sera pas abordé ici car ils n'ont pas eu d'utilité dans le cadre de notre étude. Trois extractions consécutives au SDS sont alors réalisées sur le culot C2 afin d'extraire les protéines associées à la paroi (S2) qui n'ont pas été conservées. Il ne reste ainsi plus que le complexe mAGP à la fin de ces extractions (C3) qui est tout de même soumis à plusieurs séquences de lavages à l'acétone et à l'eau pour éliminer les traces de SDS.

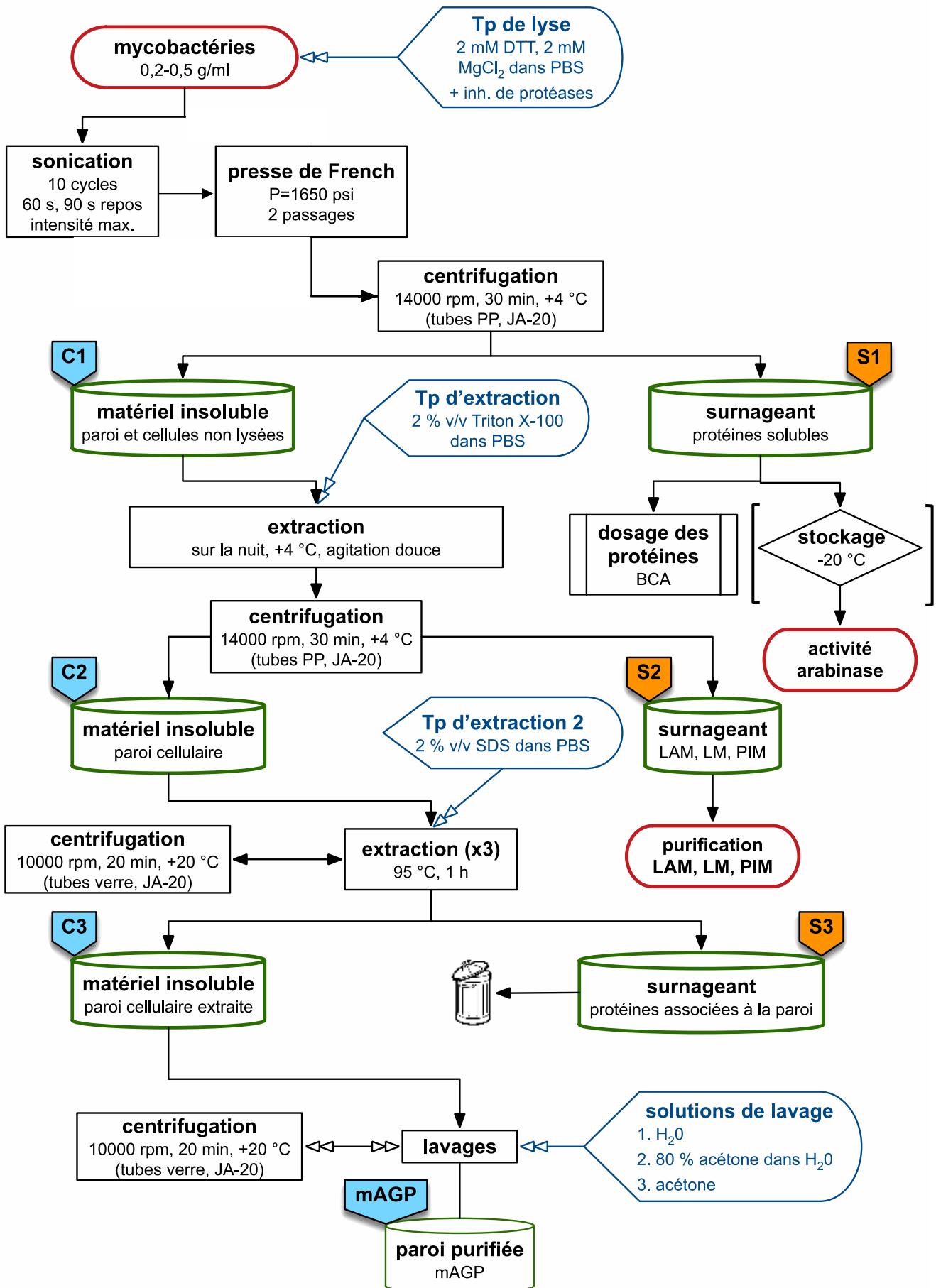
Le but de la seconde partie du fractionnement est de séparer les trois composants de la paroi cellulaire restants, à savoir les acides mycoliques, l'AG et le PG qui sont encore liés de façon covalente entre eux. Ce sont tout d'abord les acides mycoliques qui sont saponifiés par de la potasse KOH en condition anhydre afin d'être libérés dans le surnageant après

centrifugation. Le culot contient alors l'AGP qui subit à son tour une lyse alcaline par la soude pour ne récupérer que l'AG dans le surnageant.

Cette double étape a par la suite été remplacée par une seule étape qui consiste à réaliser la seconde lyse alcaline directement sur le mAGP ce qui suffit à obtenir l'AG purifié dans des quantités similaires.

Enfin, deux options sont envisageables pour l'étape finale de la purification de l'AG. Soit il est dialysé sur membrane de 1 kDa, soit il est passé sur une membrane d'ultrafiltration de 3 kDa afin d'éliminer les sels qui ont été engendrés par la lyse alcaline à la soude. L'option de la dialyse a été la plus largement choisie car de meilleurs rendements ont été observés avec cette méthode.

Avant de passer à la suite, une notion importante doit ici être énoncée. L'AG qui est obtenu en fin de purification est considéré comme étant de l'AG total car il comporte en fait deux catégories, à savoir l'AG complet qui est celui que l'on retrouve dans la littérature mais aussi des fragments de plus petites tailles qui n'avaient pas encore été étudiés à ce moment. Ces AG tronqués sont d'ailleurs évoqués en détail dans le chapitre suivant. Toujours est-il qu'il est possible de séparer ces entités par chromatographie d'exclusion stérique et que même si le substrat qui a été le plus utilisé est l'AG total, certaines analyses essentielles lors d'étapes cruciales ont nécessité l'utilisation d'AG complet exempt de toute trace de fragments incomplets pour simplifier l'analyse des résultats de l'activité arabinasique sur l'AG. A noter également que les AG totaux de *M. smegmatis* et *M. bovis* BCG comportent des profils analytiques identiques. Les AG totaux provenant de ces deux espèces ont donc été utilisés pour notre étude sans distinction notable.



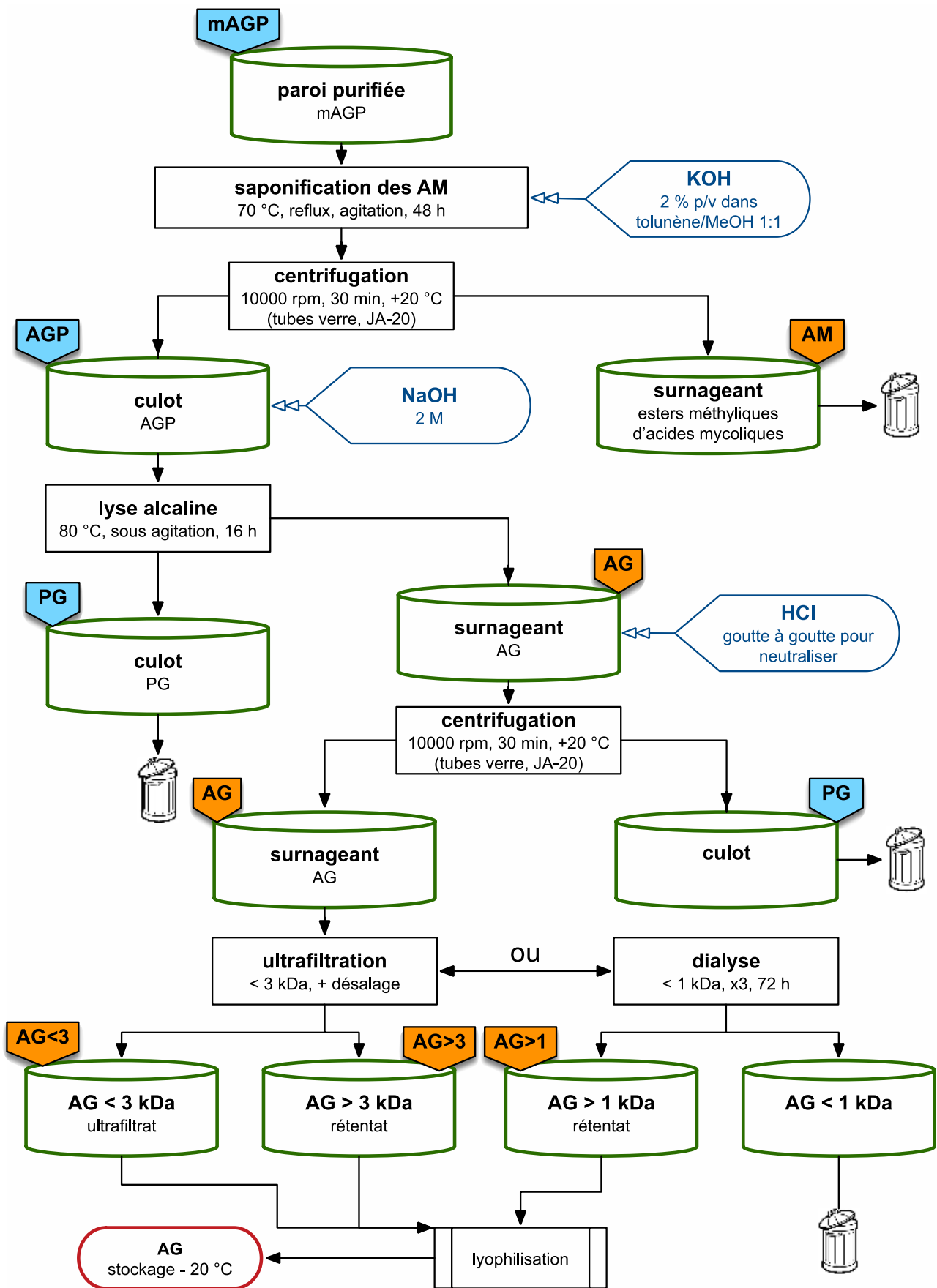


Figure V.1. Protocole de purification de l'arabinogalactane mycobactérien.

I.2) Criblage analytique des activités D-arabinase

Une fois l'AG purifié (*M. smegmatis* ou *M. bovis* BCG) et le lysat protéique soluble total extrait (*M. smegmatis*), un crible de détection d'activités glycosidasiques spécifique de l'AG et plus particulièrement de D-arabinases a été développé dans le but de pouvoir suivre ces activités au fur et à mesure de leur purification.

Cette technique à avoir été mise au point se base sur l'analyse des produits issus de l'hydrolyse de l'AG par les enzymes contenues dans le lysat soluble total extrait lors de la purification de l'AG. Cette hydrolyse s'est déroulée durant 48 h dans du tampon phosphate à 20 mM pH 7,4. Les produits ont ensuite été analysés par chromatographie échangeuse d'anions avec détection ampérométrique (HPAEC-PAD pour *High Performance Anion Exchange Chromatography-Pulsed Amperometric Detection*) pour les séparer selon leur charge ionique. Les différents pics ont alors été collectés puis perméthylés pour une seconde analyse par spectrométrie de masse afin d'identifier les produits présents dans cette hydrolysats.

Le concept de l'HPAEC-PAD est dans le cadre de cette étude parfaitement adapté. En effet, ce type d'analyse est réalisé à haut pH (~13) avec l'utilisation de tampons basiques tels que la soude et l'acétate de sodium. Les glycanes se comportant comme des anions faibles en solutions basiques, il est alors possible de les séparer efficacement par échange d'anions grâce aux colonnes cationiques à base de polymères disponibles aujourd'hui qui offrent l'avantage de la stabilité sur une large plage de pH. La combinaison avec l'ampérométrie pulsée à l'aide d'une électrode de travail en or, dont la surface peut catalyser l'électrooxydation de composés contenant du -COH dans des solutions à pH élevé, a également fourni un outil sélectif et sensible pour la séparation de glycanes natifs.

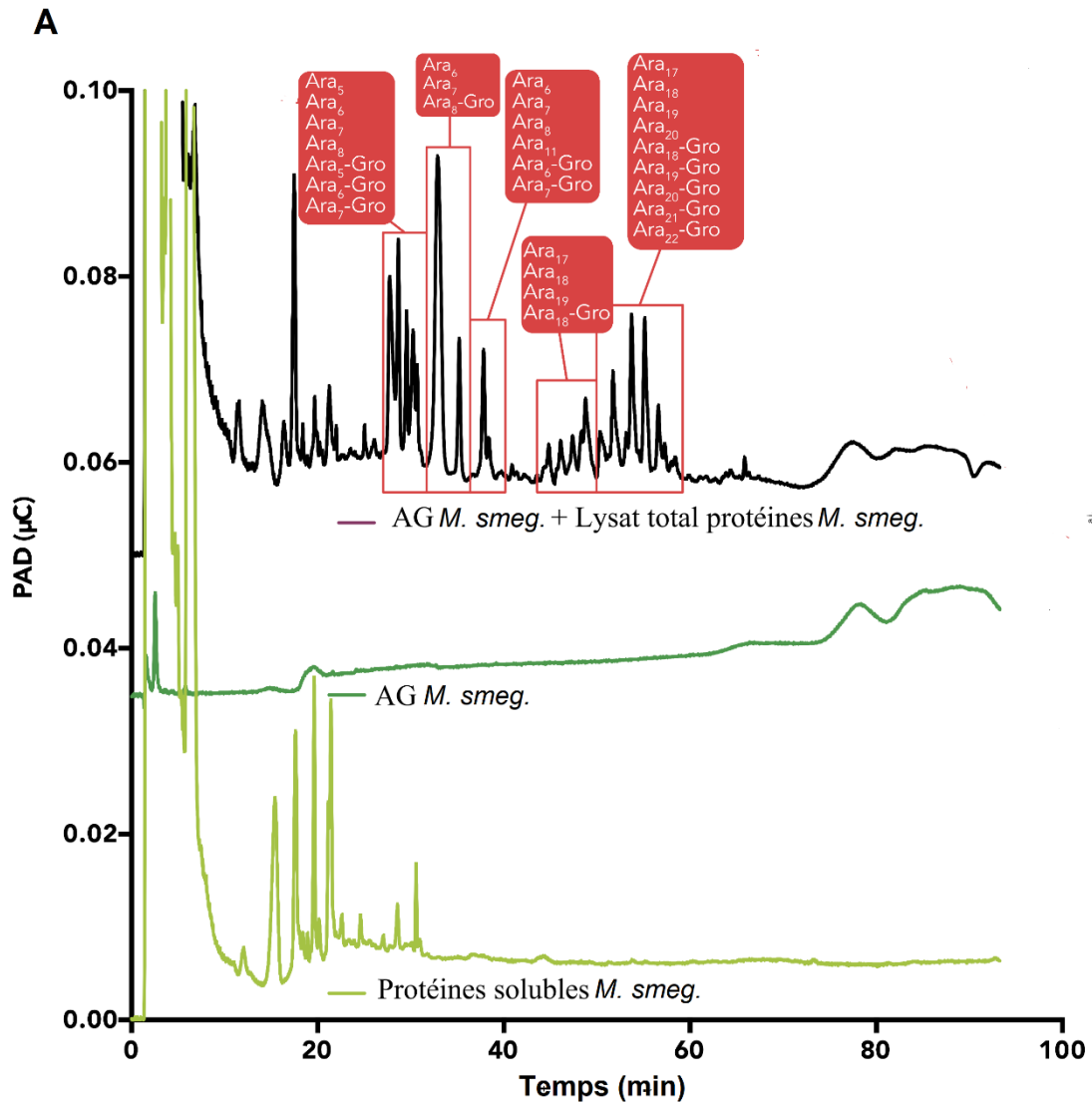
En sortie d'analyse HPAEC-PAD, les produits sont en revanche très chargés en sels ce qui ne permet pas leur identification directement en spectrométrie de masse de manière native. C'est pour cette raison qu'ils sont perméthylés au préalable, ce qui apporte ici le double avantage d'éliminer les sels contaminants par extraction au chloroforme du produit perméthylé et une sensibilité accrue lors de l'analyse en spectrométrie de masse (moins de fragmentation spontanée).

Enfin, l'identification par spectrométrie de masse a été effectuée sur deux spectromètres de masse différents, à savoir MALDI-TOF/TOF principalement et MALDI-QIT-TOF (QIT pour *Quadrupole Ion Trap*) qui a été acquis par le laboratoire pendant le projet de thèse.

Pour revenir sur l'application de cette méthode à l'hydrolyse AG + lysat protéique total de *M. smegmatis*, celle-ci a permis d'identifier deux familles d'oligosaccharides provenant de l'AG initial : la première comprend les petits fragments de la chaîne d'arabinane (Ara₅₋₈) tandis que la seconde famille se compose d'oligosaccharides plus larges (Ara₁₈₋₂₂) (Figure IV.2A). La

détermination de ces structures a été réalisée par fragmentation en spectrométrie de masse MS/MS exceptionnellement sur un appareillage Bruker ESI-ITMS (*ElectroSpray Ionization-Ion Trap Mass Spectrometry*) sur les différentes fractions collectées en HPAEC-PAD (Figure IV.2B).

De plus, lorsque le mélange réactionnel est supplémenté avec du glycérol, une partie des oligosaccharides est transférée sur ce dernier démontrant ainsi la capacité de transglycosylation de l'activité arabinasique recherchée.



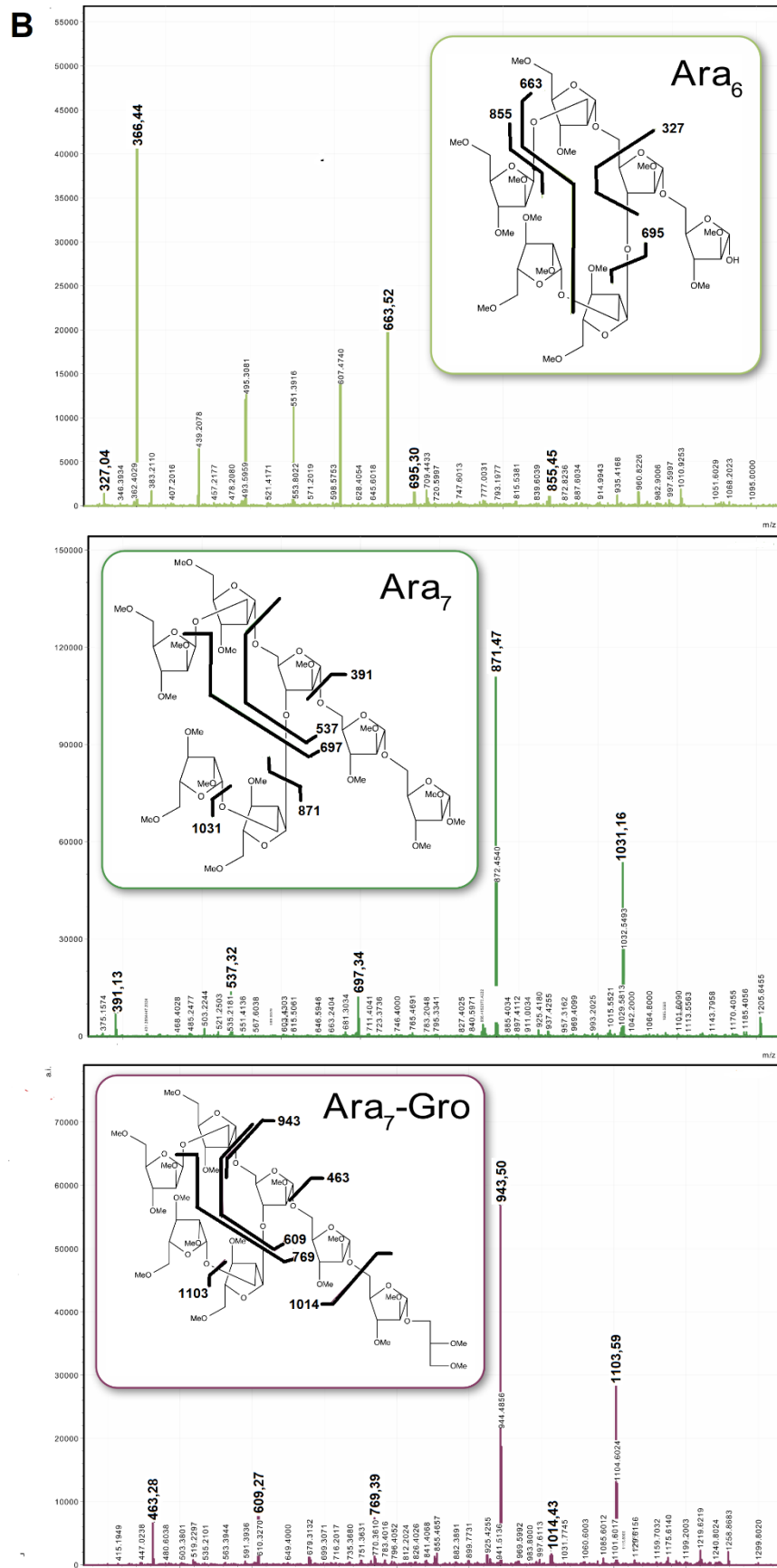


Figure IV.2. Méthode de criblage analytique des activités endo-D-arabinase chez *M. smegmatis*. (A) Chromatogramme HPAEC-PAD de l'hydrolyse de l'AG de *M. smegmatis* avec le lysat protéique soluble total de *M. smegmatis* ainsi que que les chromatogrammes contrôle AG seul et lysat protéique soluble total seul. (B) Spectres de masse MS/MS acquis sur les fractions collectées en HPAEC-PAD.

On remarque donc qu'au vu des différentes familles d'arabinanes obtenues à partir de ce criblage, une activité endo-D-arabinase est effectivement bien présente. En reprenant la structure d'une chaîne arabinane de l'AG, on a en effet une coupure au niveau des résidus α -(3→5)-Araf qui correspondent aux points de ramification d'où la présence de deux familles avec un écart de résidus d'arabinose important (Figure IV.3). Ce résultat n'est pas étonnant car contrairement à la chaîne galactane linéaire, les chaînes arabinane sont ramifiées avec de nombreux types de liaisons impliquées ce qui suggère fortement la présence d'une activité majoritairement endo sur ces chaînes. La possibilité d'activités exo-glycosidasiques sur les chaînes arabinane n'est cependant pas à exclure même si les recherches ne se sont pas orientées vers cette possibilité et que de l'arabinose libre n'a pas été observée sur les chromatogrammes HPAEC-PAD.

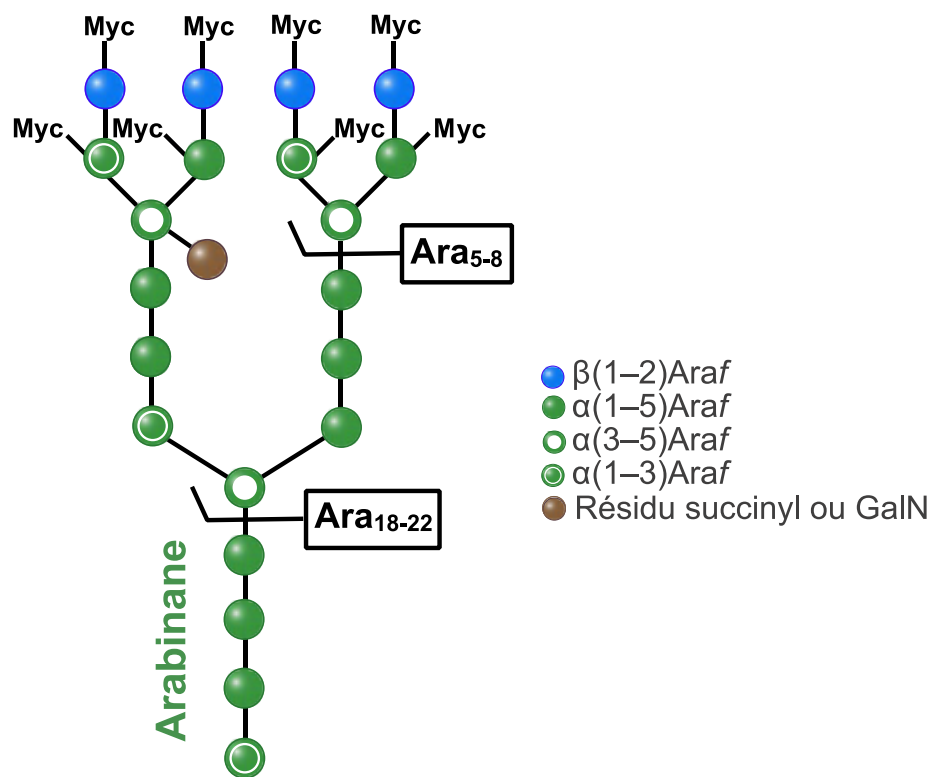


Figure IV.3. Structure d'une chaîne arabinane de l'AG mycobactérien avec les différents sites de coupure retrouvés en HPAEC-PAD suite à l'hydrolyse avec le lysat protéique soluble total de *M. smegmatis*.

*Les familles d'arabinane obtenues après hydrolyse confirment que le lysat protéique soluble total de *M. smegmatis* contient bien une activité endo-D-arabinase.*

En parallèle à cette méthode de criblage, une seconde technique plus rapide et légère a été recherchée afin de permettre un criblage à plus grand débit des fractions en cours de purification. L'analyse de la littérature a montré que la méthode semblant la plus adaptée à notre étude est celle proposée par Anthon G. *et al.* publiée en 2002 [487] qui se base sur le dosage colorimétrique des fonctions réductrices provenant des glycanes à l'aide du réactif MBTH (3-Méthyl-2-BenzoThiazolinone Hydrazone) par mesure de l'absorbance à 620 nm.

Ce test de dosage des fonctions réductrices n'a cependant pas pu être utilisé à cause de sa sensibilité qui s'est avérée insuffisante dans notre cas mais aussi sa faible robustesse à de nombreux composés indispensables lors de l'isolement de protéines. Seule la méthode de criblage par chromatographie et spectrométrie de masse a donc été utilisée tout au long du processus de purification d'une glycosidase d'intérêt endo-D-arabinase malgré la lourdeur de sa mise en oeuvre.

I.3) Purification et recherche d'une activité arabinasique

Avec le lysat protéique soluble total de *M. smegmatis* et une méthode de criblage des activités glycosidasiques acquise, les premières purifications d'une enzyme d'intérêt endo-D-arabinase ont pu être menées. Dans un premier temps, plusieurs techniques chromatographiques ont été sélectionnées sans à priori. En effet, comme mentionné précédemment, un seul article à ce jour a mis en avant l'existence d'une endo-D-arabinase chez *M. smegmatis* [293]. Cela s'explique en partie par le fait que le substrat D-Araf est très peu représenté dans la nature où l'on retrouve plutôt la forme L-Araf et notamment chez les plantes. Par contre, aucune activité n'a pu être observée pour le moment chez *M. bovis* BCG à partir de son lysat protéique total d'où l'utilisation exclusive d'un lysat provenant de *M. smegmatis*.

I.3.a) Etapes chromatographiques préliminaires

La première chromatographie à avoir été envisagée est l'échange d'anions sur support DEAE *Sepharose Fast Flow* comprenant des groupements amine tertiaire échangeurs d'anions faible. Le chromatogramme résultant de l'analyse du lysat de *M. smegmatis* a été reporté sur la Figure IV.4. Plusieurs régions se distinguent sur ce chromatogramme indiquant une première séparation effective des différentes protéines solubles du lysat total. Les fractions d'intérêt ainsi que les protéines non retenues ont ensuite été incubées avec de l'AG total pendant 48 h et la procédure de criblage de l'activité arabinasique a été appliquée comme énoncée précédemment.

Aucune activité n'a été retrouvée lors de l'analyse des différentes fractions (comprenant la fraction non retenue) après hydrolyse ce qui signifie que l'activité endo-D-arabinase a été perdue lors de cette première étape de purification.

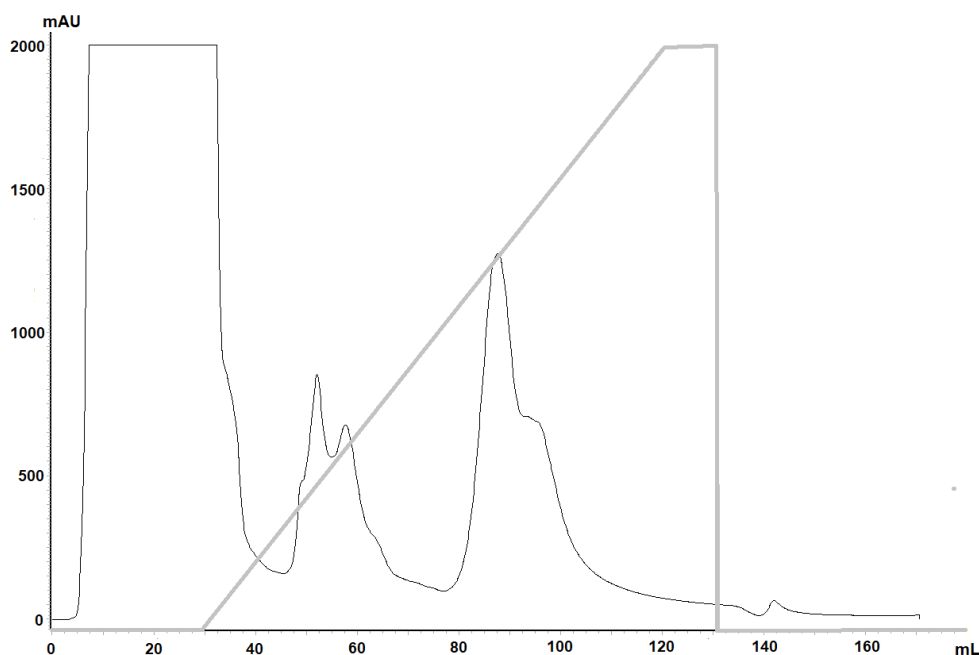


Figure IV.4. Chromatogramme du lysat protéique soluble total de *M. smegmatis* par chromatographie échangeuse d'anions sur support DEAE SFF.

De ce fait, nous avons choisi, à partir du lysat total de départ, d'effectuer un fractionnement subcellulaire afin de séparer les protéines cytosoliques des protéines membranaires (hydrophobes et hydrophiles) et de celles associées à la paroi (hydrophobes et hydrophiles). Ce procédé est déjà bien documenté dans la littérature notamment avec l'utilisation du Triton X-114 [488], [489]. Les 5 fractions protéiques résultantes ont été incubées avec l'AG total puis analysées en HPAEC-PAD. Nous avons observé une activité dans la phase cytosolique alors qu'elle était plutôt attendue dans la phase des protéines membranaires si on se réfère aux autres glycosidases et à Rv3096. Elle a cependant très bien pu se retrouver en phase cytosolique lors de la lyse par presse de French, qui est la meilleure façon de lyser les mycobactéries. La phase cytosolique a donc été choisie pour isolement par chromatographie échangeuse d'anions selon les mêmes conditions que les précédentes analyses. Une fois de plus, l'activité endo-D-arabinase n'a été retrouvée dans aucune des fractions collectées, et ce même dans la fraction non retenue.

Nous avons alors réalisé un nouvel essai par précipitation au sulfate d'ammonium. Selon la série de Hofmeister [490], le sulfate d'ammonium est le meilleur sel avec effet précipitant sur les protéines et a donc été privilégié pour notre étude. Étant donné que nous ne connaissons pas les propriétés de solubilisation de l'enzyme recherché, différentes concentrations saturantes en sulfate d'ammonium ont été ajoutées dans le lysat protéique total de *M. smegmatis*, à savoir 40 %, 70 % et 100 % de saturation dans un premier temps.

Les trois culots (à 40 %, 70 % et 100 % de saturation) de protéines précipitées ainsi obtenus ont été solubilisés directement dans du tampon phosphate puis les sels ont été éliminés par ultrafiltration. Une hydrolyse a ensuite été lancée avec l'AG total pour une analyse en HPAEC-PAD. Cette technique de précipitation au sulfate d'ammonium ne s'est finalement pas montrée plus concluante car l'activité n'a été retrouvée dans aucune des trois fractions analysées. Une chromatographie hydrophobe devait suivre mais n'a donc pas pu être mise en œuvre. Ce résultat est étonnant car c'est cette méthode qui avait été utilisée dans l'article de Xin *et al.* de 1999 pour mettre en avant l'activité endo-D-arabinase [293].

D'autres tests chromatographiques auraient pu être envisagés à ce stade mais il était évident qu'il fallait plutôt agir au préalable sur certaines propriétés de l'enzyme arabinase recherché avant de se lancer dans de nouvelles tentatives de purification du lysat protéique. En effet, de l'expérience du groupe concernant la purification de protéines de mycobactéries et notamment sur Rv3096, il s'avère en fait qu'elles ont souvent tendance à s'agréger et à être facilement perdues lors des étapes critiques (chromatographie, ultrafiltration, ...). Partant de ce constat et au vu des résultats sur les premières purifications, nous avons optimisé le protocole de purification des enzymes en amont.

1.3.b) Optimisation de la stabilité de l'activité enzymatique endo-D-arabinase

Dans un premier temps, nous nous sommes penchés sur l'impact de la culture sur l'activité enzymatique. La courbe de croissance de *M. smegmatis* a été suivie pendant 72 h en mesurant l'absorbance à 600 nm toutes les deux heures avec une A_{600} de départ à 0,1.

Au final, trois points de cinétique ont été retenus. Les cultures associées ont été centrifugées et les cellules lysées pour en extraire le lysat protéique total. Ces points ont été sélectionnés à différentes phases de la croissance cellulaire :

- À $t=4$ h, l' A_{600} a été mesurée à 0,18 ce qui correspond à la phase de croissance dite de lag. Pendant cette période, les mycobactéries s'adaptent aux conditions de croissance et notamment au milieu dans lequel elles évoluent. Elles ne sont pas capables de se diviser pendant cette phase.

- À $t=16$ h, l'absorbance a augmenté de manière significative en passant à 1,2. On est alors ici dans la phase exponentielle de la croissance.

- À $t=40$ h, l' A_{600} a été mesurée à 3,6 et celle-ci n'a plus beaucoup évolué dans les heures qui ont suivies. Cela signifie que les mycobactéries ne sont plus en capacité de se multiplier soit à cause d'un facteur limitant comme le manque d'un nutriment essentiel ou soit par la formation d'un produit inhibiteur. C'est ce qu'on appelle alors la phase stationnaire.

Les trois lysats protéiques extraits à partir de cultures arrêtées à différentes phases de croissance ont été soumis à un test d'activité et ont donc été hydrolysés pendant 48 h avec l'AG puis analysés en HPAEC-PAD (Figure IV.5). Au préalable, un dosage protéique BCA (*BiCinchoninic acid Assay*) a été effectué sur chaque lysat de manière à se retrouver avec la même concentration protéique pour les trois hydrolyses.

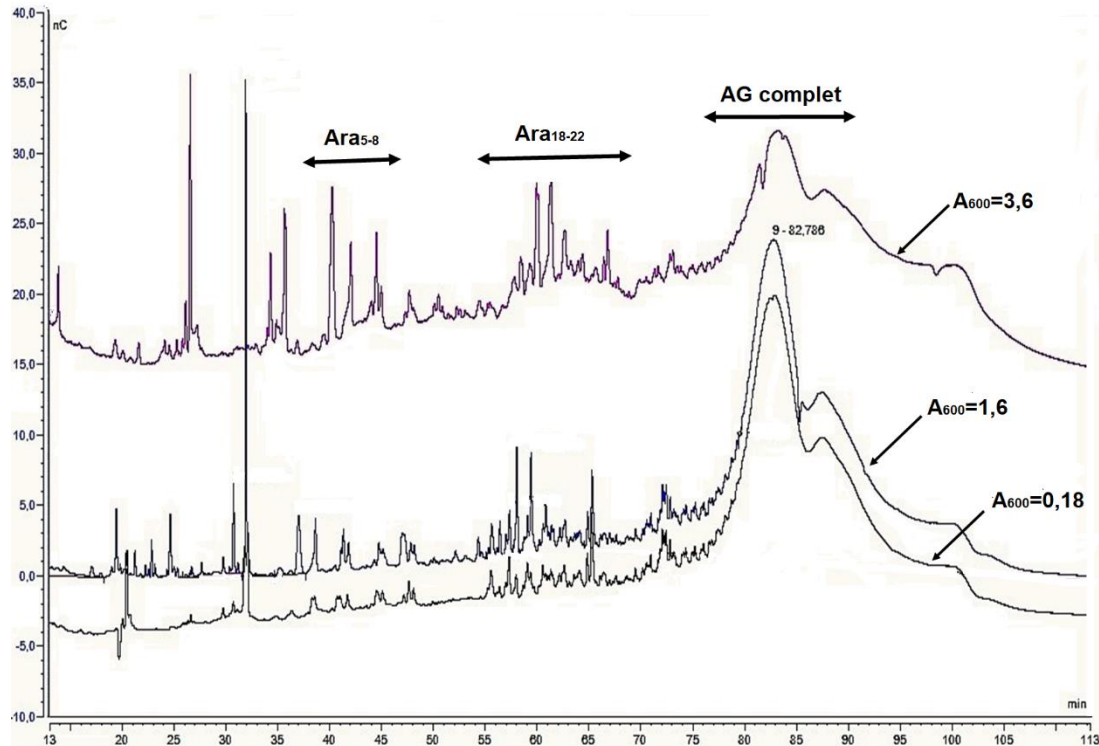


Figure IV.5. Chromatogrammes HPAEC-PAD suite à l'hydrolyse de lysats protéiques totaux de *M. smegmatis* provenant de cultures à différentes phases de croissance avec de l'AG total. Les lysats protéiques totaux ont été normalisés à la même concentration avant incubation avec l'AG total.

On remarque que l'activité endo-D-arabinase la plus importante est observée pour l'hydrolyse du lysat provenant de la culture avec l' A_{600} la plus élevée après normalisation de chacun des lysats à la même concentration. Cela signifie qu'il faut se situer en phase stationnaire pour avoir une activité arabinasique optimale. Cette expérience a été reproduite à deux autres reprises en donnant des résultats similaires. Jusqu'alors, les cultures étaient stoppées en phase exponentielle en pensant que l'activité était plus importante au cours de cette phase de division des cellules et qu'un remodelage de la paroi cellulaire devait plutôt être crucial à ce moment. Les cultures ont donc pour la suite des manipulations été poussées jusqu'en phase stationnaire avant de procéder à la lyse cellulaire.

Dans un second temps, un détergent a été ajouté au lysat protéique car l'enzyme recherchée est très probablement associée à la paroi et possède peut-être des régions hydrophobes qui la rendrait particulièrement sensible à l'aggrégation. L'utilisation d'un

détergent permet ainsi d'éviter cette contrainte et de garder une activité enzymatique lors de la purification. Concernant le choix du détergent, celui-ci s'est tourné vers la LDAO (Lauryldiméthylamine *N*-oxide) en première intention car le même détergent a été choisi et utilisé avec succès pour les purifications de l'exo-galactofuranohydrolase Rv3096.

Afin de vérifier tout d'abord si ce détergent ne détériorait pas l'activité endo-D-arabinase, une hydrolyse de l'AG avec le lysat protéique a été lancée après ajout de 0,5% (p/v) de LDAO dans le lysat (Figure IV.6).

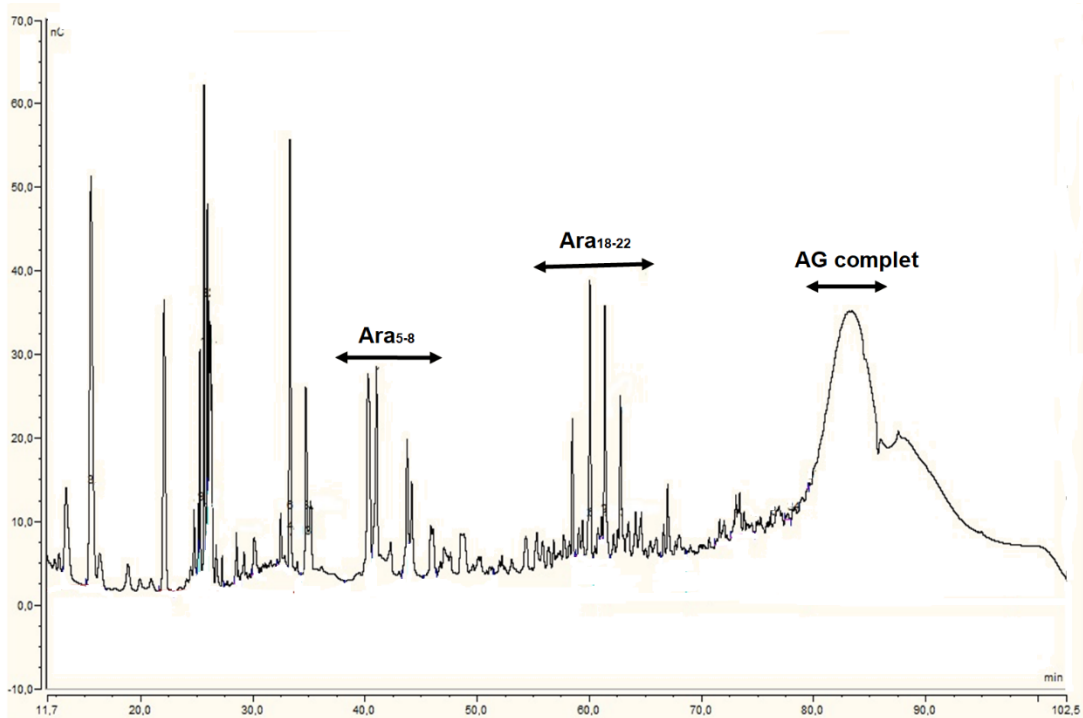


Figure IV.6. Chromatogramme HPAEC-PAD suite à l'hydrolyse du lysat protéique total de *M. smegmatis* après ajout de 0,5% (p/v) du détergent LDAO avec l'AG total.

L'activité est donc bien conservée après l'ajout du détergent LDAO. Ce dernier a donc été ajouté dans chaque lysat protéique avant d'entamer les étapes de purification. Avec l'optimisation de l'activité par la culture et l'ajout de ce détergent, les essais de purification de l'enzyme endo-D-arabinase ont ainsi pu reprendre.

I.3.c) Purification de l'activité endo-D-arabinase

Contrairement à ce qui avait été fait précédemment, la première étape de purification a consisté en une chromatographie d'exclusion stérique qui est généralement privilégiée en fin de purification protéique car il s'agit d'une chromatographie peu résolutive. Le principe repose sur la séparation des protéines en fonction de leur taille et de leur forme. Dans le cadre de l'étude, le fait de privilégier ce type de chromatographie en première intention permet de dégrossir le lysat protéique en conservant la totalité des protéines en fin d'analyse car il n'y a pas d'interaction avec la phase stationnaire. En d'autres termes, si la première étape de

purification du lysat s'avère infructueuse par cette technique, alors il est très peu probable de retrouver l'activité par un autre type de chromatographie. Le support qui a été choisi pour cette chromatographie est la colonne Sephacryl-S200 HR. Son domaine de fractionnement en protéines globulaires est compris entre 5 et 250 kDa ce qui couvre une gamme habituelle de protéines fonctionnelles. En amont de cette séparation, le lysat protéique de *M. smegmatis* supplémenté avec 0,5 % de LDAO a été concentré 5 fois par ultrafiltration sur membrane de 10 kDa afin d'obtenir une concentration finale en lysat d'environ 10 mg/mL. A noter qu'entre-temps, un appareillage Emulsiflex a été acquis au laboratoire pour la lyse des cellules et ce dernier a été utilisé en remplacement de la presse de French mais reste basé sur le même principe de lyse.

Cette première étape a donné de bons résultats sur le lysat protéique de *M. smegmatis* concentré comme en témoigne la Figure IV.7A où ont été reportés le chromatogramme issu de la gel-filtration et l'analyse des fractions collectées en HPAEC-PAD suite à leur hydrolyse avec de l'AG complet pur. On constate en corrélant les fractions ayant montré une activité arabinasique positive en HPAEC-PAD avec le chromatogramme de la séparation des différentes protéines du lysat concentré que l'enzyme d'intérêt sort en milieu d'analyse ce qui indique que celle-ci doit probablement se situer entre 20 à 80 kDa en prenant une fourchette large. Une électrophèse SDS-PAGE (*Sodium DodecylSulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*) avec une coloration au bleu de Coomassie a ensuite été réalisé sur plusieurs fractions (Figure IV.7B). La chromatographie d'exclusion sérique a donc permis une première séparation effective des différentes protéines du lysat total tout en conservant une activité arabinasique.

Avant de passer à l'étape suivante, les fractions positives ont été rassemblées dans un volume final total de 30 mL. Enfin, un dosage BCA a montré que la concentration protéique de cette solution était d'environ 450 µg/mL, soit 13,5 mg de protéines dans la solution au total.

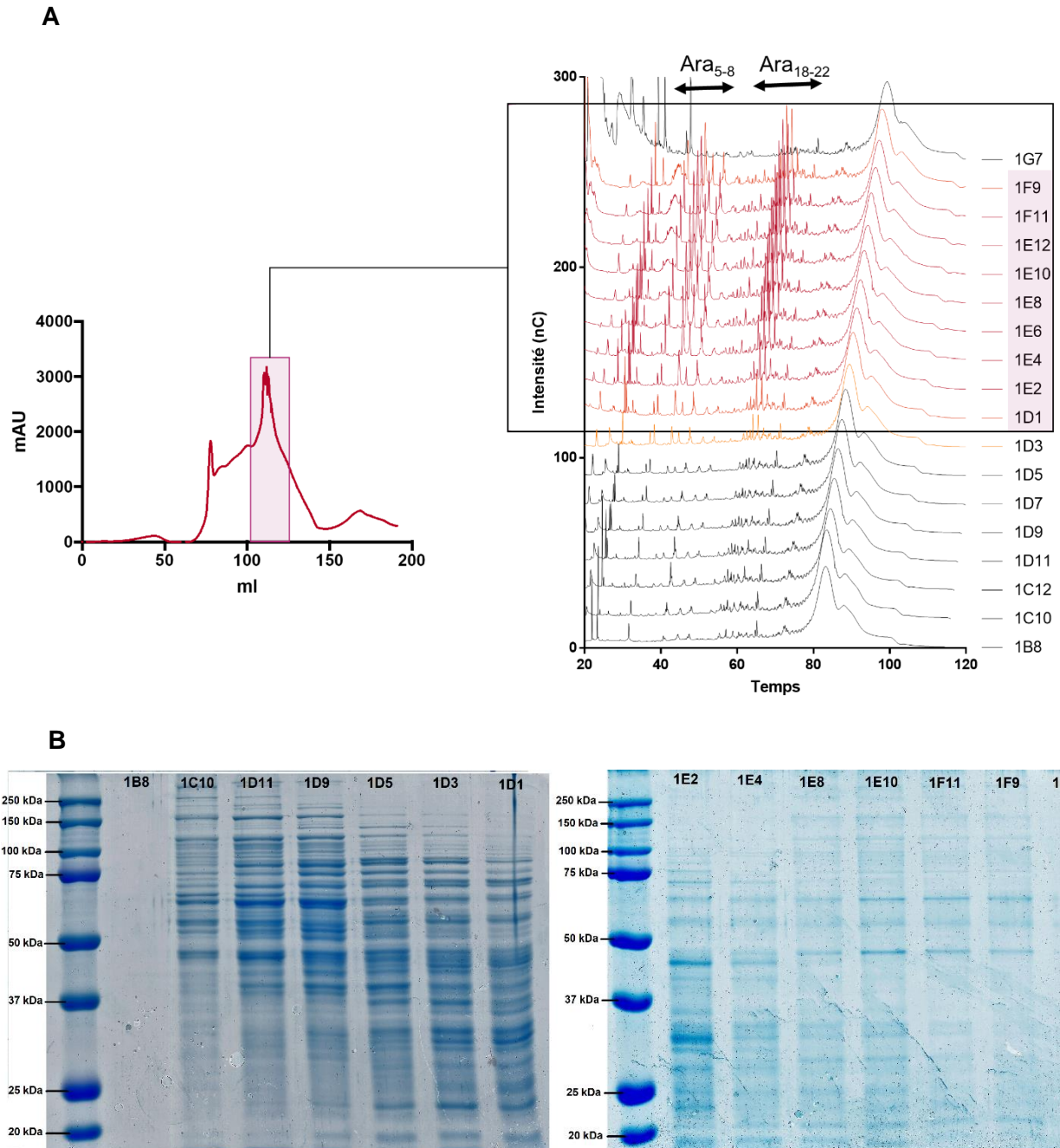


Figure IV.7. (A) Chromatogramme issu de la gel-filtration sur Sephacryl S200 HR du lysat protéique soluble total de *M. smegmatis* et chromatogrammes HPAEC-PAD des fractions associées suite à leur hydrolyse avec l'AG complet. **(B)** Electrophorèse SDS-PAGE avec coloration au bleu de Coomassie des fractions provenant de la gel-filtration.

La seconde étape de purification s'est voulu plus résolutive et la chromatographie échangeuse d'anions a été choisie ici non plus sur support DEAE SFF mais sur MonoQ GL 5/50. La phase stationnaire de ce dernier est constituée de polymère de polystyrène et divinyle benzène offrant un échange d'anions fort. Les données qui ont résulté de cette seconde analyse sont résumées sur la Figure IV.8 selon la même disposition que les résultats qui ont été présentés pour la gel-filtration.

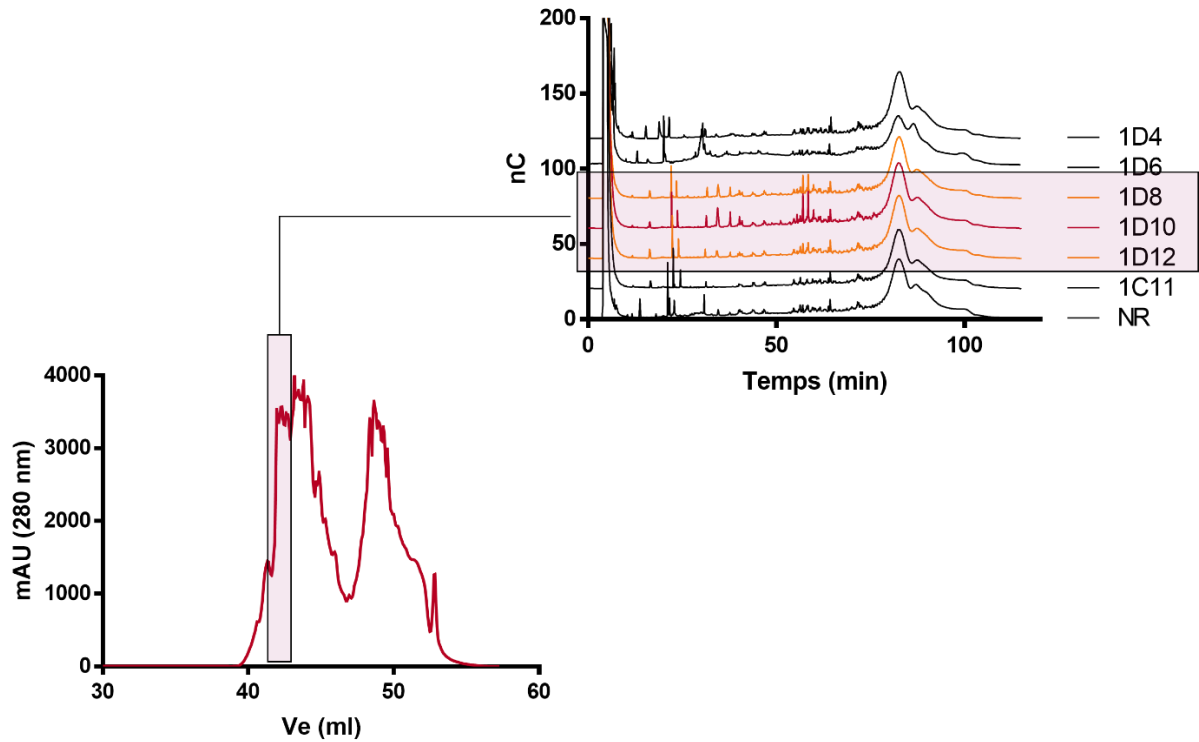
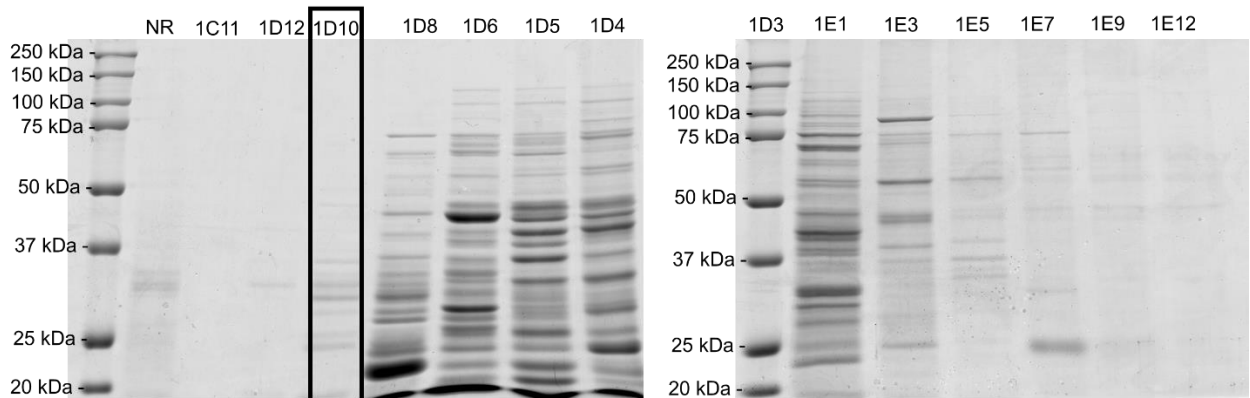
A**B**

Figure IV.8. (A) Chromatogramme issu de la chromatographie échangeuse d'anions sur MonoQ GL 5/50 du lysat préalablement purifié par gel-filtration et chromatogrammes HPAEC-PAD des fractions associées suite à leur hydrolyse avec l'AG complet. (B) Electrophorèse SDS-PAGE avec coloration au bleu de Coomassie des fractions provenant de l'échange d'anions.

Suite à cette seconde étape chromatographique, une seule fraction s'est révélée contenir une activité endo-D-arabinase positive. A noter que sur le chromatogramme de l'échange d'anions de la Figure IV.8A, on remarque que l'enzyme recherché est élué en début de gradient ce qui signifie que son point isoélectrique (pI) doit être relativement bas. Cette observation représente une information importante à prendre en compte pour la suite et notamment pour la sélection de protéines candidates. Sur l'électrophorèse SDS-PAGE de la Figure IV.8B, on s'aperçoit que peu de bandes sont visibles sur la fraction d'intérêt signifiant

alors que les deux phases de purification ont permis un bon isolement de l'enzyme recherché et son activité a bien été conservé sur deux étapes consécutives grâce aux optimisations préalables menées sur cette activité. Partant de ce constat, une étape supplémentaire ne nous a pas paru nécessaire au risque de perdre l'activité endo-D-arabinase. Plusieurs méthodes de caractérisation de la fraction positive ont alors été menées pour identifier les protéines présentes dans celle-ci dans le but de pouvoir isoler certains candidats potentiels.

I.4) Caractérisation des protéines après purification du lysat total

Deux méthodes ont été utilisées pour mener à bien cette caractérisation. La première concerne l'analyse par PMF (*Peptide Mass Fingerprint* ou empreinte peptidique massique) des différentes bandes du gel SDS-PAGE de la fraction retenue. Cette méthode consiste à digérer les différentes bandes du gel par la trypsine avant d'analyser les peptides obtenus par spectrométrie de masse pour obtenir la liste des masses des peptides tryptiques résultants. Ensuite, par comparaison avec les banques de données disponibles en ligne (ici NCBIprot et Swissprot *via* le serveur Mascot dédié spécifiquement à la recherche de protéines à partir de données acquises par spectrométrie de masse), il est possible de remonter à la (ou les) protéine(s) contenue(s) dans la bande du gel grâce aux différentes masses des séquences peptidiques de l'échantillon.

Pour la seconde méthode, la fraction d'intérêt a été soumise à une analyse LC-MS afin d'identifier directement toutes les protéines comprises dans cette dernière.

I.4.a) Analyse par empreinte peptidique massique

Cette analyse a eu lieu directement après l'obtention de la fraction contenant l'activité arabinasique. Si l'on reprend la Figure IV.8A, on remarque que les deux fractions adjacentes (1D8 et 1D12) comportent également une faible activité et ont donc été soumises au même protocole PMF.

Pour améliorer la probabilité d'identification en séparant mieux les différentes bandes du gel de ces trois fractions, un plus grand gel SDS-PAGE (18,5 x 20 cm) a été réalisé puis les bandes ont été découpées selon le marquage décrit sur la Figure IV.9. 27 bandes provenant des trois fractions ont au total été collectées puis soumises au protocole PMF. Les 27 listes de masse correspondant aux séquences peptidiques qui en ont découlées ont été confrontées aux banques de données à partir du serveur MASCOT. Seules deux banques ont été choisies pour cette étude, à savoir SwissProt et NCBI qui sont les banques les mieux annotées et en se limitant à la taxonomie du complexe de *Mycobacterium tuberculosis* qui était la seule disponible pour les mycobactéries.

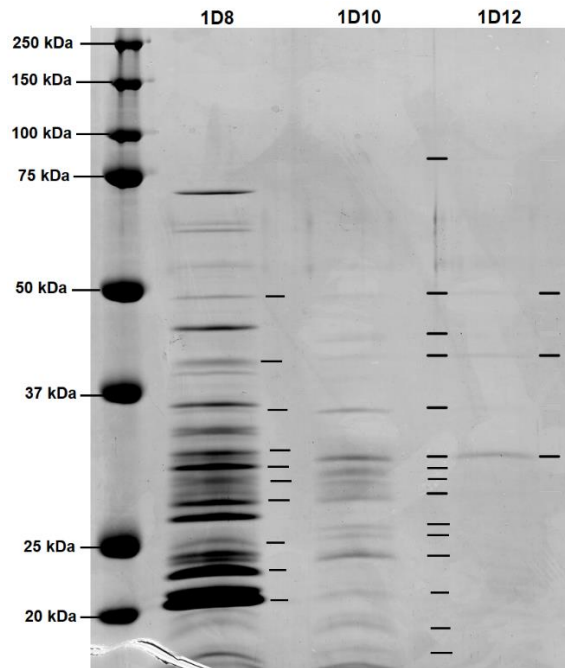


Figure IV.9. Electrophorèse SDS-PAGE avec coloration au bleu de Coomassie réalisée sur un grand gel (18,5 x 20 cm) des trois fractions relevantes suite à la purification du lysat protéique soluble total de *M. smegmatis*.

Les tirets noirs ajoutés correspondent aux bandes qui ont été découpées pour l'analyse PMF, soit 27 bandes au total.

Certains critères doivent également être renseignés afin d'obtenir un résultat le plus affiné possible. Parmi ces paramètres, certains sont propres aux mycobactéries notamment au niveau des modifications (fixes et variables). Par exemple, la modification fixe carboxyméthyl sur les cystéines est généralement ajoutée ce qui signifie que tous les résidus de cystéine peuvent être considérés avec une masse de 161 Da (au lieu de 121). Pour ce qui est des modifications variables, plusieurs combinaisons ont été testées et notamment l'oxydation sur la méthionine ou encore la substitution par un groupement acétyl sur les résidus de lysine. Ensuite, d'autres paramètres sont pris en compte et sont d'une importance cruciale dans l'obtention des résultats, comme le nombre de clivages manqués par la trypsine autorisés mais aussi la tolérance massique entre les données expérimentales et théoriques. L'ensemble de ces critères a été reporté sur la Figure IV.10 ci-dessous par une capture d'écran de la page de recherche PMF provenant du serveur MASCOT.

Your name [] **Email** []

Search title []

Database(s) Plants_EST, Prokaryotes_EST, Rodents_EST, Vertebrates_EST, contaminants

Enzyme Trypsin

Allow up to 1 missed cleavages

Taxonomy All entries

Fixed modifications --- none selected ---

Variable modifications --- none selected ---

Protein mass [] kDa

Peptide tol. ± 1.2 Da

Mass values MH⁺ M_r M-H⁻

Monoisotopic **Average**

Data file Choisir un fichier

Query

Data input []

Decoy

Report top AUTO hits

Start Search ... **Reset Form**

Annotations:

- Banque de donnée sélectionné pour la recherche (ici SwissProt ou NCBI)
- Taxonomie à prendre en compte pour la recherche.
- Informations à fournir pour recevoir les résultats de la recherche.
- Enzyme utilisée pour le clivage protéique. Clivages manqués par la trypsine autorisés.
- Liste des modifications qui peuvent intervenir (fixes ou variables)
- Tolérance autorisée entre les masses théoriques et expérimentales (en ppm ou Da).
- Liste des masses issus du spectre MS après PMF à coller dans ce cadre.

Figure IV.10. Capture d'écran de la page de recherche PMF du serveur MASCOT (http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=PMF).

En modulant ces critères, aucune protéine avec une activité s'apparentant à une glycosidase n'a pu être obtenue. De ce fait, une autre approche a alors été envisagée. Cette fois-ci, la totalité des protéines contenues dans la fraction d'intérêt a été analysée par LC-MS pour une identification avec une bien meilleure sensibilité. Ce travail a été mené par le Dr Jean-Michel Saliou de la plateforme P3M de l'institut Pasteur de Lille.

I.4.b) Caractérisation des protéines par LC-MS

Contrairement à l'approche par PMF, une seule des fractions adjacentes a été transmise à la plateforme ainsi qu'une fraction plus éloignée sans activité arabinasique ayant servi de témoin négatif. Les résultats qui en ont découlés nous ont été transmis sous forme de tableau Excel contenant de nombreuses informations où ont été répertoriées toutes les données des protéines retrouvés dans la fraction d'intérêt (Tableur Excel complet reporté en Annexe 1).

On y retrouve les informations générales sur chaque protéine telles que son poids moléculaire, son activité, son numéro d'accession Uniprot ou encore ses mots-clés appartenant au dictionnaire *Gene Ontology* (GO) et ces derniers ont été divisés en trois termes distincts :

- *Molecular component* : ce terme fait référence à la localisation cellulaire de la protéine, qu'il s'agisse aussi bien du milieu intracellulaire qu'extracellulaire.

- *Molecular function* : ce terme GO caractérise les fonctions structurales ou catalytiques réalisées par la protéine.

- *Molecular process* : domaine des processus biologiques dans lesquels sont impliquées les protéines, par exemple si elles s'intègrent dans un processus métabolique, ou plutôt de transport...

Un système de score est aussi présent dans le tableur Excel fourni où le signal de chaque protéine de la fraction d'intérêt a été confronté à celui retrouvé dans les deux autres fractions analysées ayant servi de contrôle. On obtient un score de pertinence qui a pu être établi et les protéines ont été classées dans ce tableau en fonction de ce score. Plus de 1000 protéines ont ainsi été identifiées dans la fraction d'intérêt grâce à cette méthode. Cependant, un grand nombre d'entre elles ont été écartées à l'aide du score décrit ci-dessus car toutes les protéines avec un score < 3 ont été considérées comme non significatives pour la suite de l'étude. La liste a ainsi pu être réduite à 248 protéines à partir de laquelle il a fallu ensuite procéder à la sélection des protéines candidates à la fonction d'arabinase.

I.4.c) Sélection de protéines candidates à la fonction arabinase

Il est vite apparu qu'aucune des 248 protéines identifiées retenues n'était directement assimilable à une glycosidase que ce soit par ses annotations dans la banque UNIPROT/SwissProt ou par la nature des protéines homologues identifiées par BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) dans la même banque. Ce résultat n'est pas surprenant, une première tentative d'identification du gène codant pour l'arabinase était basée sur la similitude avec des séquences de L-arabinase connues. Elle n'avait pas permis d'identifier le gène codant pour l'arabinase mais celui codant pour la galactosidase Rv3096. Pour revenir sur le BLAST, cet outil sert à trouver des régions de similarité locale entre les séquences. Le programme compare les séquences nucléotidiques ou protéiques aux bases de données de séquences et calcule la signification statistique des correspondances. Il peut être utilisé pour déduire des relations fonctionnelles et évolutives entre les séquences, ainsi que pour aider à identifier des membres de familles de gènes.

Tout d'abord, les séquences protéiques candidates ont été scannées grâce au serveur dbCAN avec les 508 profils HMM (*Hidden Markov Model*) correspondant à la banque CAZy (*dbCAN HMMs 6.0 based on CAZyDB 07/20/2017*) afin d'identifier une protéine dont la séquence primaire correspond à celle d'une glycosidase. Le serveur dbCAN apporte en effet des caractéristiques uniques comparé à la banque de données CAZy :

- Il fournit un domaine de signature explicitement défini pour chaque famille CAZyme ainsi que son emplacement dans toutes les protéines CAZyme relevantes et ce pour tous les génomes séquencés;
- il propose aussi une classification par sous-famille basée sur les similitudes de séquence à partir des familles CAZyme déjà existantes;
- enfin, toutes les données précalculées sont directement disponibles et comprennent les alignements de séquences, les HMM ou encore les phylogénies concernant les domaines de signature dans chaque famille et sous-famille CAZyme.

Cette recherche a aussi été répétée avec le nouveau serveur dbCAN2.0. Malheureusement, aucune des séquences candidates ne présente de signature de glycosidases connues.

C'est pourquoi il a fallu avoir recours à plusieurs outils bioinformatiques pour tenter de consolider un choix de séquences candidates :

- prédiction de fonction via le serveur ESG (*Extended Similarity Group*). Ce serveur propose un classement strict des termes GO pour une séquence candidate donnée basé sur une recherche par PSI (*Position-Specific Iterative*)-BLAST, c'est-à-dire un BLAST comprenant une matrice de notation personnalisée et spécifique à la position ce qui peut aider à trouver des relations évolutives plus lointaines. A noter que seuls les termes GO *Molecular function* ont été pris en compte pour ce criblage;
- modélisation par homologie à l'aide des serveurs Phyre2 et i-Tasser : des structures 3-D peuvent être proposées à partir des séquences candidates grâce à ces serveurs ainsi que les ligands potentiels qui y sont associés. Ont été retenues les séquences candidates pour lesquelles le ligand proposé était de nature glucidique;
- analyse du mécanisme catalytique : recherche de similarités entre le mécanisme catalytique de la fonction proposée pour une séquence candidate et celui d'une glycosidase.

De là, cinq séquences candidates ont été retenues à partir de la liste de 248 protéines. Les critères ayant permis de les retenir sont présentées dans le Tableau IV.1. Un exemple de modélisation en 3D de l'une de ces protéine candidate (A0QQD7) a également été reporté sur la Figure IV.11 avec les ligands monosaccharidiques potentiels associés.

Tableau IV.1. Critères de sélection retenus pour le choix des 5 gènes à partir de la liste des 248 protéines identifiées par LC-MS.

Protéine candidate	Critères de choix					
	Score annotations UNIPROT	Similarité glycosidase CAZy/DbCAN	Homologie (BLAST)	Gene Ontology (ESG)	Similarité du mécanisme catalytique	Ligand potentiel de nature glycanique
A0R1D1	1/5	-	-	+	+	+
A0QQD7	1/5	-	-	+	+/-	+
A0R4Q3	1/5	-	-	+/-	+	+
A0R6L9	1/5	-	-	+	+	-
I7FGR3	1/5	-	+/-	+/-	+/-	-

Ces filtres ont permis de sélectionner cinq protéines de *M. smegmatis* : A0R1D1, A0QQD7, A0R4Q3, A0R6L9 et I7FGR3. Aucune des séquences retenues ne peut être présentée comme une glycosidase. Pour A0R1D1, A0QQD7 et A0R4Q3, c'est la prédiction d'un ligand glycanique, des termes GO *molecular function* comme *carbohydrate binding* ainsi une activité catalytique présentant des analogies avec des glycosidases (nature des résidus impliqués, mécanisme, ...) qui ont permis le choix. Pour A0R6L9, la prédiction ESG propose bien la rupture de liaisons glycosidiques mais par un mécanisme de transglycosylation généralement plutôt associée au catabolisme du peptidoglycane. Enfin pour I7FGR3, ce sont de nouveau les termes GO qui ont abouti à ce choix avec une activité hydrolytique concernant des composés glycaniques.

D'autres données ont également été prises en considération lors de la sélection de ces cinq candidats et se basent sur les résultats expérimentaux obtenus lors des étapes de purification. En effet, la gel-filtration nous a fourni des informations approximatives sur la taille de l'enzyme arabinase d'intérêt qui doit se situer entre 20 et 80 kDa. La chromatographie échangeuse d'anions nous a ensuite apporté des indications sur le pI de l'enzyme recherché et celui-ci doit être assez bas (environ 3 à 5) car l'enzyme sortait en début de gradient d'élution.

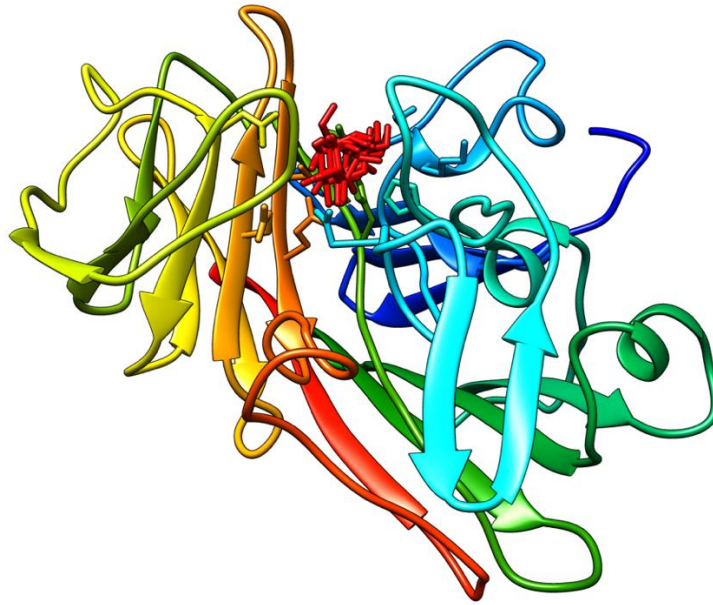


Figure IV.11. Modèle par homologie de la protéine A0QQD7 de *M. smegmatis* (serveur Phyre 2) montrant la liaison de trois ligands monosaccharidique potentiels (en rouge) : galactose (5 hits), fucose et glucose.

A l'issue de la sélection des cinq séquences candidates, il a été décidé d'exprimer les gènes correspondant dans *E. coli* pour tester leur capacité à hydrolyser l'AG de mycobactéries. Les cinq gènes synthétiques ont été commandés auprès de la firme GeneCust. Ils ont été directement clonés dans le vecteur d'expression pET-32a avec une étiquette polyhistidine pour faciliter leur purification.

I.5) Expression des protéines candidates à la fonction endo-D-arabinase et tests d'activité

Dans un premier temps, les 5 protéines recombinantes ont été produites en *Auto Induction Medium* AIM après transformation dans la bactérie compétente BL-21 d'*E. coli*. Par soucis de simplicité, chaque gène a été numéroté de 1 à 5 selon l'ordre suivant : I7FGR3 : 1 / A0R4Q3 : 2 / A0R1D1 : 3 / A0R6L9 : 4 / A0QQD7 : 5. Les masses moléculaires théoriques de chaque protéine sont alors les suivantes : 1 : 27 693 Da / 2 : 28 571 Da / 3 : 25 570 Da / 4 : 33 521 Da / 5 : 31 818 Da. A chacune de ces masses, il faut rajouter celles des différents Tag contenus dans le vecteur d'expression pET-32a (Trx-Tag / S-Tag / Poly-His), à savoir 17 463 Da. Toutes ces données ont été reportées dans le Tableau IV.2 et on y retrouve également les pI théoriques de chaque protéine. On remarque ainsi que leur masse moléculaire et leur pI théorique sont relativement proches et concordent avec les données expérimentales obtenues lors des deux étapes de purification du lysat protéique soluble total de *M. smegmatis*.

Tableau IV.2. Données complémentaires sur les cinq protéines candidates sélectionnées.

Nom de la protéine candidate	Numéro d'accension Uniprot	MSMEG ou MSMEI	Masse moléculaire (Da)	Masse moléculaire avec les Tags (Da)	pl théorique
3:Beta-phosphoglucomutase hydrolase	I7FGR3	MSMEI_1570	28 946	46 409	4,9
Enoyl-CoA hydratase	A0R4Q3	MSMEG_5915	28 573	46 036	5,42
Enoyl-CoA hydratase	A0R1D1	MSMEG_4709	25 570	43 033	5,68
glutamine-binding periplasmic protein	A0R6L9	MSMEG_6595	33 522	50 985	4,88
Aldose 1-epimerase	A0QQD7	MSMEG_0717	31 818	49 281	4,65

Une fois les échantillons préparés, un SDS-PAGE a été réalisé sur les protéines exprimées ainsi que sur les contrôles correspondants non induits. Aucune expression n'a cependant pu être observée pour les 5 protéines. D'autres essais d'induction d'expression ont alors été menés en utilisant les souches d'*E. coli* C41, C43 et *Shuffle*, destinées à l'expression de protéines ne donnant pas de résultats satisfaisants dans une souche classique comme les BL-21. En effet, la souche *Shuffle* facilite le repliement correct des protéines en favorisant la bonne formation des ponts disulfures. Les souches C41 et C43 quant à elles permettent la croissance à haute densité, et continuent de produire des protéines à un niveau élevé sans effet toxique. Un SDS-PAGE a alors été réalisé et les résultats obtenus sur la bactérie compétente C41 sont représentés sur la Figure IV.12.

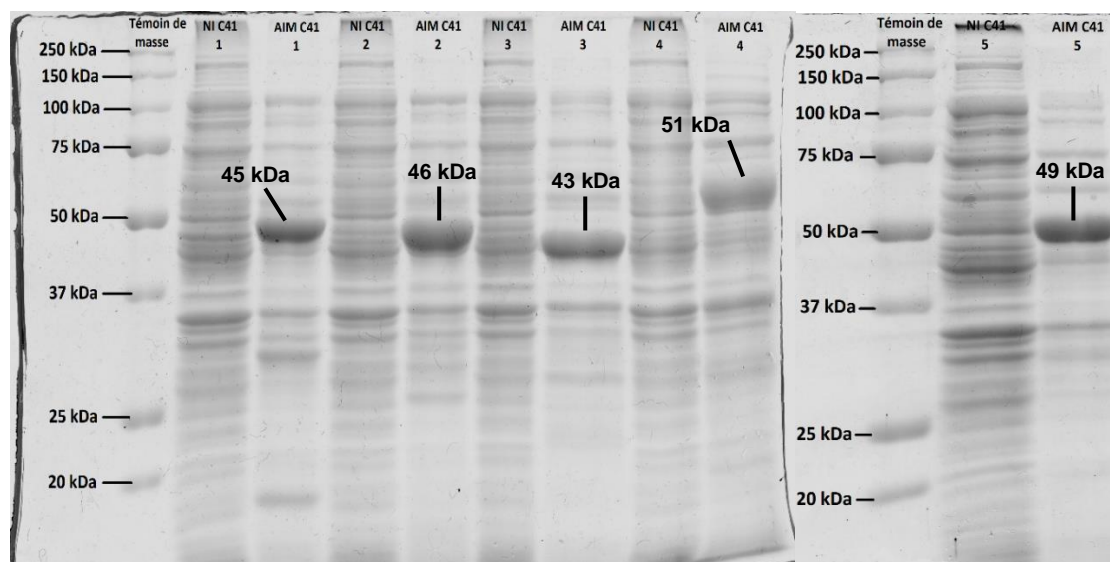


Figure IV.12. Electrophorèse SDS-PAGE avec coloration au bleu de Coomassie correspondant à l'expression des 5 protéines issues des gènes sélectionnés dans la bactérie compétente C41 d'*E. coli*.

Pour chaque induction (AIM), un contrôle non induit (NI) a été réalisé en parallèle. 1^{er} gel ; Puit 1 : Témoin de masse moléculaire / Puits 2-4-6-8 : Protéines non induites, dans l'ordre I7FGR3, A0R4Q3, A0R1D1 et A0R6L9 / Puits : 3-5-7-9 : Protéines exprimées, dans l'ordre I7FGR3, A0R4Q3, A0R1D1 et A0R6L9. 2^e gel ; Puit 1 : Témoin de masse moléculaire / Puit 2 : Protéine A0QQD7 non induite / Puit 3 : Protéine A0QQD7 exprimée.

On remarque que l'expression a bien été effective pour les 5 protéines dans la bactérie C41. Au niveau des autres bactéries compétentes C43 et *Shuffle*, des résultats similaires ont été observés mais c'est finalement la bactérie C41 qui a été choisie pour la suite des manipulations.

Les protéines ayant bien été exprimées, nous avons voulu savoir si celles-ci étaient présentes dans la phase soluble ou insoluble (synonyme de corps d'inclusion). Pour répondre à cette question, le reste des bactéries issues de l'auto-induction a été lysé par sonication. Puis, par centrifugation, les protéines solubles (surnageant) ont été séparées des protéines insolubles (culot). Avant de déposer chacune des phases sur gel SDS-PAGE, il a fallu se placer à concentration similaire entre ces deux phases. Pour ce faire, une partie des protéines de la phase soluble a été précipitée à l'ATCA (Acide Trichloroacétique). Les protéines insolubles ont quant à elles été solubilisées le tampon de Laemmli et une partie a été utilisée pour le dépôt sur gel. Les résultats de l'électrophorèse SDS-PAGE sont reportés sur la Figure IV.13.

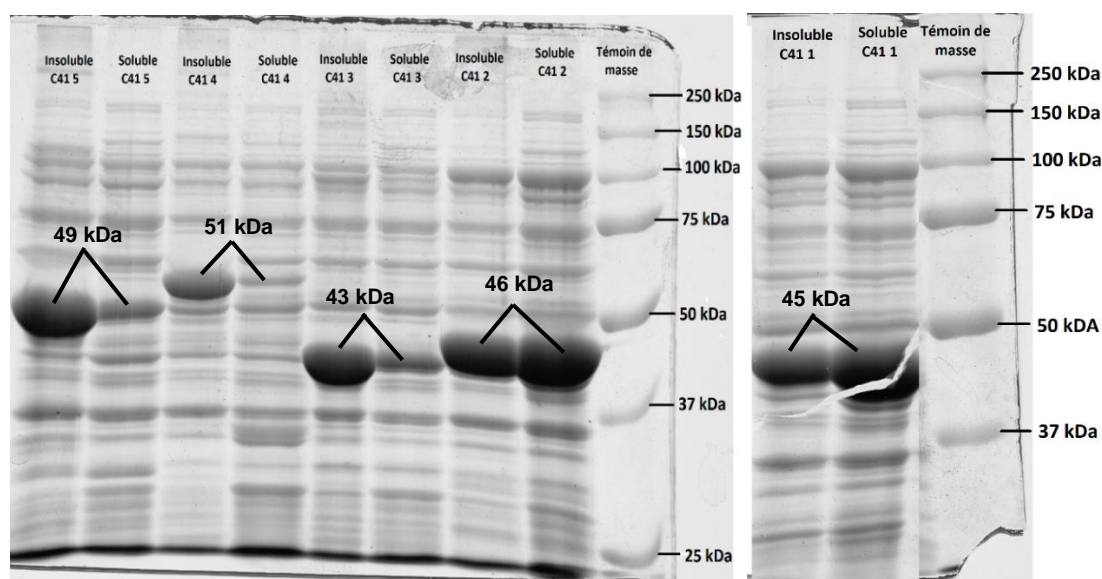


Figure IV.13. Electrophorèse SDS-PAGE avec coloration au bleu de Coomassie des phases solubles et insolubles de chaque protéine exprimée après lyse des bactéries au sonicateur.

1^{er} gel ; Puits 1-3-5-7 : Phase insoluble des protéines exprimées A0R6L9, A0R1D1, A0R4Q3 et I7FGR3, respectivement / Puits 2-4-6-8 : Phase soluble des protéines exprimées A0R6L9, A0R1D1, A0R4Q3 et I7FGR3, respectivement / Puit 9 : Témoin de masse moléculaire. 2^e gel ; Puit 1 : Phase insoluble de la protéine A0QQD7 exprimée / Puit 2 : Phase soluble de la protéine A0QQD7 exprimée / Puit 3 : Témoin de masse moléculaire.

On observe que toutes les protéines exprimées ont été retrouvées dans la phase insoluble mais également dans la phase soluble. Le fait de retrouver ces protéines dans la phase soluble nous a permis de tester leur activité sur le substrat AG. Ici, de l'AG complet pur

a été utilisé pour l'hydrolyse, c'est-à-dire préalablement séparé des fragments incomplets d'AG par gel-filtration.

Après hydrolyse entre la phase soluble de chaque lysat de protéines et l'AG pur, des analyses HPAEC-PAD ont été effectuées. Les chromatogrammes en résultant ont été reportés sur la Figure IV.14.

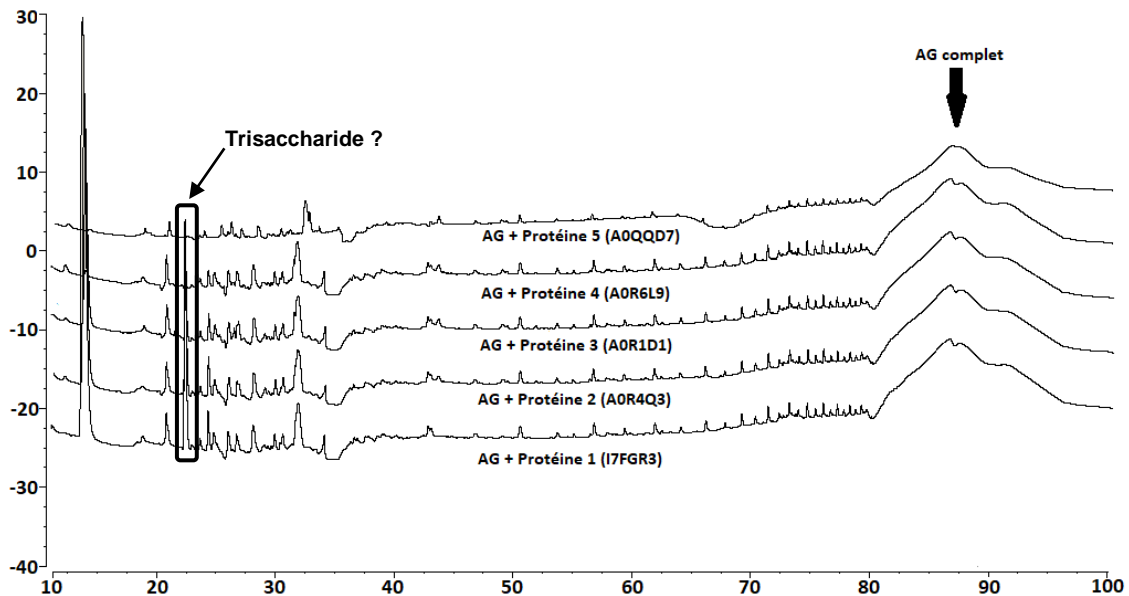


Figure IV.14. Chromatogrammes HPAEC-PAD des cinq protéines candidates exprimées suite à leur hydrolyse avec de l'AG complet.

Aucune activité arabinasique n'a hélas pu être constatée comme en témoigne les chromatogrammes issus des hydrolyses de l'AG et des protéines induites. Une concentration plus importante en protéines solubles a alors été préparée afin de relancer une hydrolyse avec l'AG complet pur. Cependant, les profils chromatographiques qui en ont découlés n'ont toujours pas fait apparaître d'activité arabinasique.

En détaillant les chromatogrammes de la Figure IV.14, on s'aperçoit de la présence d'un pic à 23 min que l'on ne retrouve principalement que sur les deux premiers chromatogrammes. En comparant ce pic avec un standard de Glucidex G19 (hydrolysat d'amidon), il s'avère que le signal correspond à la taille d'un trisaccharide. Des collectes ont alors été réalisées sur ce pic pour une analyse en spectrométrie de masse après perméthylation mais aucun signal d'intérêt n'a été observé.

Suite à ces résultats, une seconde tentative d'isolement de l'arabinase a été démarré en reprenant les mêmes deux premières étapes de chromatographie et en y ajoutant une troisième étape de gel-filtration pour simplifier la fraction finale qui a aussi analysée par LC-MS pour en identifier les protéines présentes. Il a ainsi été possible de croiser les résultats

obtenus avec ceux du premier isolement afin d'affiner au mieux la liste des protéines candidates.

I.6) Seconde campagne de purification de l'endo-D-arabinase chez *M. smegmatis*

Cette seconde campagne de purification a repris les mêmes étapes chromatographiques, à savoir une gel-filtration sur Sephacryl S200 suivie d'une chromatographie échangeuse d'anions sur MonoQ GL 5/50 à partir d'un nouveau lysat protéique concentré de *M. smegmatis*. Une troisième et dernière étape a ici été ajoutée pour réduire le nombre de protéines retrouvées en fin de purification du lysat total. En effet, plus de 1000 protéines ont été identifiées dans la fraction d'intérêt au cours de la première campagne ce qui représente environ 1/6^e de l'ensemble des protéines de *M. smegmatis*.

Plusieurs types de chromatographie ont été envisagés pour cette étape supplémentaire mais une seconde gel-filtration a finalement été choisie dans un premier temps pour éviter de perdre de nouveau l'activité arabinasique. Le support a cependant différé et s'est orienté vers une colonne Superdex 75 qui possède un domaine de fractionnement plus restreint entre 3 et 70 kDa en protéines globulaires mais une résolution accrue comparée au support Sephacryl S200. Le tampon est resté identique à la première gel-filtration, c'est-à-dire un tampon phosphate à 20 mM pH 7,4.

L'activité endo-D-arabinase a bien été conservée avec l'ajout de cette gel-filtration mais la séparation a été relativement peu effective comparée aux autres étapes chromatographiques.

A ce stade, les fractions positives collectées ont été scindées en deux. Une partie de ces fractions a été soumise à une nouvelle analyse LC-MS par le Dr. Jean-Michel Saliou de la plateforme P3M pour établir une comparaison directe avec le premier tableur issu de la campagne précédente. La seconde moitié des fractions a été utilisée afin de continuer les étapes de purification tout en maintenant l'activité arabinasique. Malheureusement, aucune méthode chromatographique n'a permis de conserver cette activité parmi les nombreuses à avoir été testées comme la chromatographie échangeuse de cations ou encore par une nouvelle étape de gel-filtration. Il semblerait donc que dans les conditions qui ont été élaborées, la purification ne puisse être poursuivie après les trois étapes décrites.

Concernant l'analyse LC-MS, le même système de score a été appliqué et un nombre similaire de protéines a été gardé, soit environ 250 (Tableur Excel en Annexe 2). L'étape de gel-filtration sur Superdex 75 n'aurait donc pas eu l'effet escompté. Dans tous les cas, une comparaison entre les deux campagnes a pu être effectuée et de premier abord, la plupart des protéines ayant obtenues un score élevé lors de la première campagne ne sont cette fois-ci pas retrouvées en haut de tableau. Il a donc été difficile de faire corrélérer les deux tableaux pour

affiner la recherche de protéines candidates à la fonction arabinase. En reprenant le travail bioinformatique qui avait été mené pendant la première campagne et en l'appliquant à cette étude, seules une protéine a été retenue (MSMEG_5830) et une fois encore sans signature de glycosidase apparente. Pour augmenter les chances d'identifier l'arabinase, les orthologues chez *M. smegmatis* des 31 GH identifiées ou prédites de *M. tuberculosis* (voir Tableau III.2 de la partie introductive) ont été recherchées dans le tableau de la seconde campagne de purification. De plus, une recherche de signature de glycosidase chez *M. smegmatis* a été menée sur le serveur dbCAN permettant alors de faire ressortir des GH potentielles supplémentaires. Au total, sept GH potentielles ont pu être retrouvées, à savoir MSMEG_0740, MSMEG_1226, MSMEG_1452, MSMEG_5142, MSMEG_3787, MSMEI_3494, MSMEI_0489 et ont donc été sélectionnées.

Toutes les protéines candidates ont été remises dans le Tableau IV.3 selon le modèle du Tableau IV.2 de la première purification du lysat protéique. Pour simplifier la notation, les protéines ont été annotées de 1 à 8 selon l'ordre du Tableau IV.3.

Tableau IV.3. Données complémentaires sur les huit protéines candidates sélectionnées lors de la seconde campagne de purification.

Nom de la protéine candidate	Numéro d'accèsion Uniprot	MSMEG ou MSMEI	Masse moléculaire (Da)	Masse moléculaire avec les Tags (Da)	pl théorique
Antigen Cfp29	A0R4H0	MSMEG_5830	28 730	46 193	4,72
Glycosyl hydrolase family protein 76	A0QQF8	MSMEG_0740	43 458	60 921	5,01
Sulfatase-modifying factor 1	A0QRT0	MSMEG_1226	31 710	49 173	5,22
Sulfatase-modifying factor 1	A0QSE6	MSMEG_1452	32 545	50 008	5,87
Beta-glucosidase	A0R2K0	MSMEG_5142	52 435	69 898	5
D-aminoacylase	A0QYU2	MSMEG_3787	57 296	74 759	5,13
Alpha amylase catalytic region	I7G353	MSMEI_3494	48 149	65 612	5,45
6-phospho-béta-glucosidase	I7F5U6	MSMEI_0489	49 735	67 198	4,98

Les huit gènes correspondants ont été commandés chez la firme GeneCust dans le même vecteur d'expression pet32a. Les huit protéines ont été exprimées dans la bactérie C41 d'*E. coli* qui avait donné de bons résultats sur les premières protéines candidates. Contrairement à ce qui avait été observé précédemment, la majorité du contenu protéique était présent dans la phase insoluble mais une partie a tout de même été retrouvée dans la phase soluble pour chaque protéine exprimée. Des tests d'activité ont alors été lancés par hydrolyse avec l'AG complet puis analyse en HPAEC-PAD (Figure IV.15). Une fois de plus, aucune activité s'apparentant à une endo-D-arabinase n'a été observée.

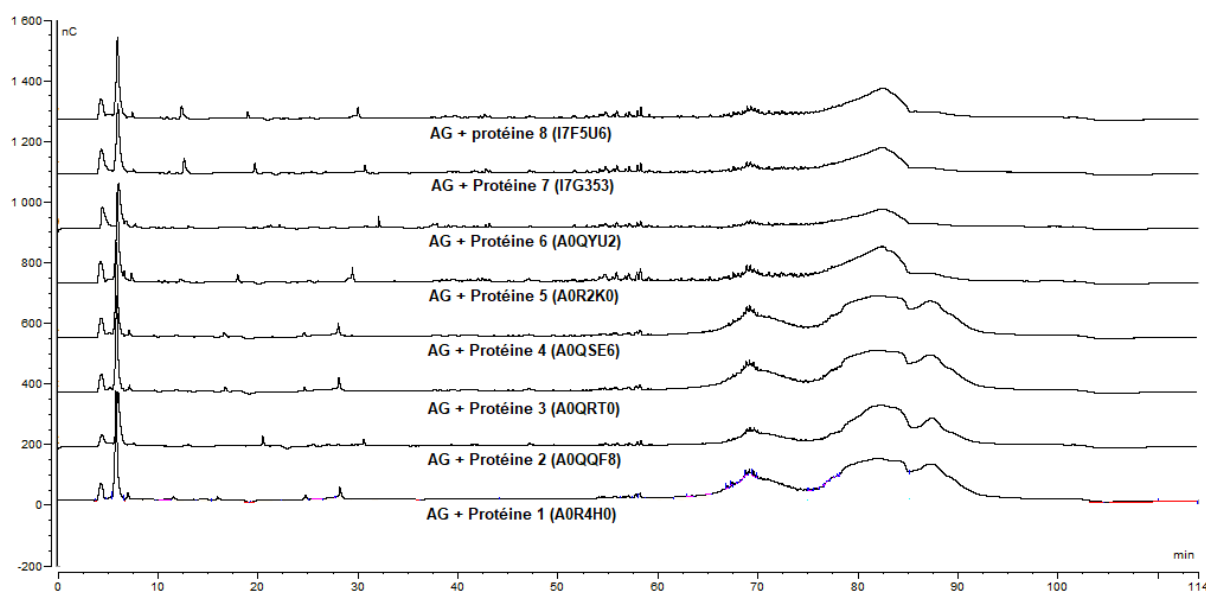


Figure IV.15. Chromatogrammes HPAEC-PAD des huit protéines candidates issues de la seconde campagne de purification exprimées suite à leur hydrolyse avec de l'AG complet.

En conclusion, les deux campagnes de purification qui ont été menées pour identifier une endo-D-arabinase chez *M. smegmatis* ne se sont pas montrées concluantes. En effet, si plusieurs étapes chromatographiques ont pu être effectuées à partir du lysat protéique soluble total extrait, un nombre important de protéines était toujours présent dans la fraction d'intérêt finale comme en a témoigné les résultats obtenus par LC-MS.

Un travail de bioinformatique a alors permis d'isoler quelques protéines candidates à cette fonction d'arabinase mais sans signature glycosidasique directe. Les différentes candidates ont ensuite été exprimées dans la bactérie compétente C41 d'*E. coli* et la totalité d'entre elles ont été observées en phase soluble de manière plus ou moins importante. Toujours est-il que des tests d'activité ont été lancés avec de l'AG complet pur exempt de tout fragment pour une analyse en HPAEC-PAD. C'est d'ailleurs à partir de cette étape qu'il n'a pas été possible d'aller plus loin car l'activité endo-D-arabinase n'a pas été retrouvée et aucune action sur l'AG n'a même été constatée.

La recherche de cette enzyme endo-D-arabinase n'aura donc pas été fructueuse mais aura permis d'avancer sur son identification qui s'est finalement avérée complexe. L'activité associée est très rapidement perdue ce qui met en avant le caractère labile de cette enzyme. De plus, il n'est pas acquis que l'arabinase soit comprise dans la liste des 31 GH qui ont été recensées chez *M. tuberculosis* et serait alors classée dans d'autres groupes d'enzymes de par sa structure et sa conformation inhabituelle.

Il est également important de souligner ici que lors de la recherche de séquences candidates à la fonction d'arabinase, il est apparu que la protéine A0QQD7 de la première

campagne est aussi une candidate à la fonction d'aldose 1-épimérase (galactose mutarotase). Elle est annotée comme telle dans Uniprot, bien qu'il s'agisse d'une annotation prédictive du plus faible score. La modélisation par homologie avec les serveurs Phyre 2 et i-Tasser montre que les patrons retenus sont aussi des aldose 1-épimérases, et la recherche de ligands potentiels propose le galactose en première position (revoir Figure IV.11). Comme il a été mentionné dans la partie introductive, la galactose mutarotase s'intègre très bien dans le sujet car son activité participe au métabolisme du galactose puisqu'elle fait partie de la voie de Leloir et donc indirectement à la biosynthèse de la chaîne galactane de l'AG.

Cette enzyme a donc été étudiée plus en détail dans le but de prouver que son activité est bien associée à celle d'une galactose mutarotase et les résultats qui en ont découlés vont être présentés dans la partie qui suit.

II) Identification d'une galactose mutarotase chez *M. smegmatis*

II.1) Purification de l'enzyme A0QQD7 et mise en place de la caractérisation de son activité

La démonstration de l'activité mutarotase n'est pas des plus aisées car il s'agit de montrer un déplacement d'équilibre entre les formes α et β du galactose. Tout d'abord, A0QQD7 a été produite en plus grande quantité pour réaliser sa purification par chromatographie d'affinité IMAC (*Immobilized Metal Affinity Chromatography*).

Les résultats de cette purification sur A0QQD7 ont été reportés sur la Figure IV.16 où l'on s'aperçoit de la présence d'un pic important au niveau de l'élution. Pour vérifier qu'il s'agissait bien de l'enzyme d'intérêt, une électrophorèse SDS-PAGE a été effectuée et une bande est bien apparue aux alentours des 50 kDa ce qui corrèle bien avec la masse moléculaire de A0QQD7 avec les différentes étiquettes.

Enfin, un dosage BCA a été réalisé sur l'enzyme purifiée et une concentration d'environ 800 $\mu\text{g/mL}$ a été calculée (pour un volume finale de 5 mL, soit 4 mg de protéine purifiée).

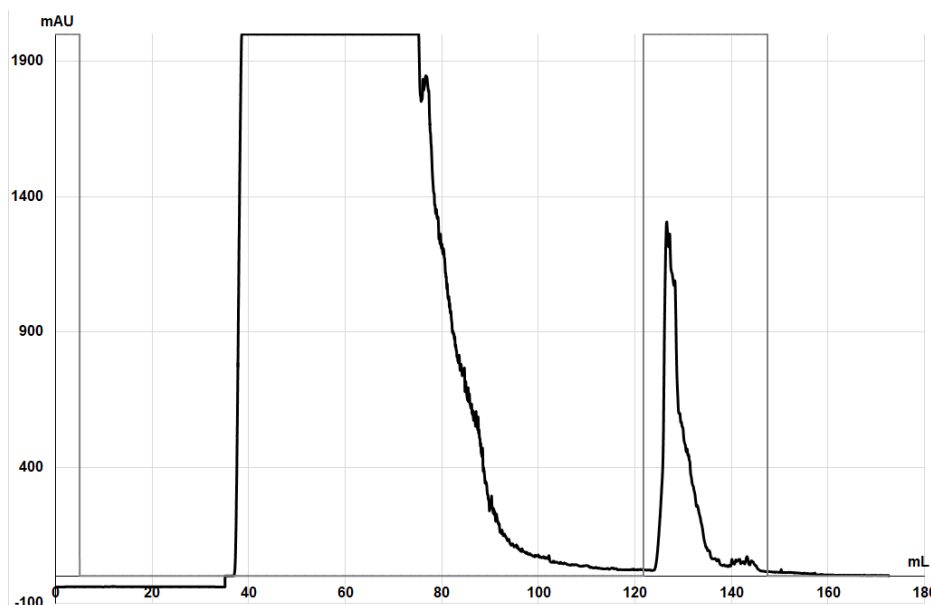


Figure IV.16. Purification de l'enzyme A0QQD7 par chromatographie d'affinité IMAC sur support HisTrap se basant sur le piégeage du Tag histidine.

En gris est représenté le gradient de concentration du tampon B à forte concentration en imidazole.

Suite à cette purification, l'enzyme A0QQD7 a alors été soumise à plusieurs expériences avec son substrat D-Gal afin de confirmer son activité mutarotase par un déplacement d'équilibre α/β . Depuis plusieurs années, la RMN s'est avérée très intéressante pour mettre en avant ce type d'activité par une technique dite de différence de transfert de saturation (STD pour *Saturation Transfer Difference*). Dans son utilisation la plus commune, la RMN-STD permet en effet de caractériser l'interaction d'un ligand (ici le D-Gal) avec une protéine (Figure IV.17A).

De plus, il est également possible dans le cas des monosaccharides de réaliser des analyses de différence de saturation (SD pour *Saturation Difference*) toujours par RMN en venant cette fois-ci saturer le signal du proton anomérique du monosaccharide dans une conformation particulière et de visualiser spécifiquement la mutarotation suite à l'action de l'enzyme (Figure IV.17B).

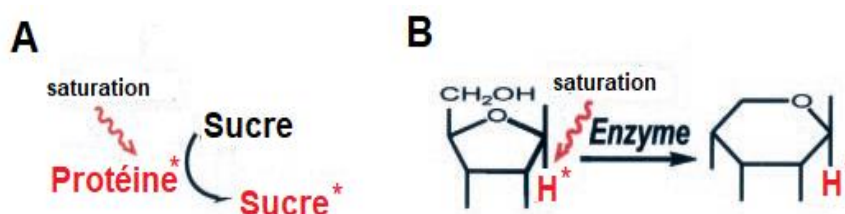


Figure IV.17. Méthodes RMN employées pour la caractérisation de l'activité mutarotase.

(A) Principe de la méthode RMN-STD dans laquelle la protéine est irradiée ce qui engendre un transfert de saturation vers le sucre impliqué dans l'interaction protéine/sucre. (B) Principe de la technique RMN-SD spécifique des monosaccharides où le signal du proton anomérique est saturé au préalable avant ajout de l'enzyme pour visualiser la mutarotation [491].

Pour la caractérisation de l'activité mutarotase de A0QQD7, seule la RMN-SD a été utilisée en se basant sur une publication de Ryu K. *et al.* paru en 2004 [491]. Dans cet article, trois enzymes d'*E. coli* ont été étudiées (RbsD, FucU et YiiL) et ils ont montré que deux d'entre elles (FucU et YiiL) étaient impliquées dans la catalyse de la conversion anomérique de leur monosaccharide respectif (fucose et rhamnose) et que la troisième RbsD catalysait la conversion de la forme furannique du ribose en forme pyranique par RMN-SD. En effet, il est possible grâce à cette méthode de mettre en avant une activité mutarotase mais aussi une éventuelle activité pyranase comme cela a été le cas pour RbsD, c'est-à-dire une enzyme catalysant l'interconversion entre les cycles pyraniques et furaniques.

Pour bien comprendre le principe de la technique, des spectres RMN-SD issus de l'article ont été reportés sur la Figure IV.18 ci-dessous.

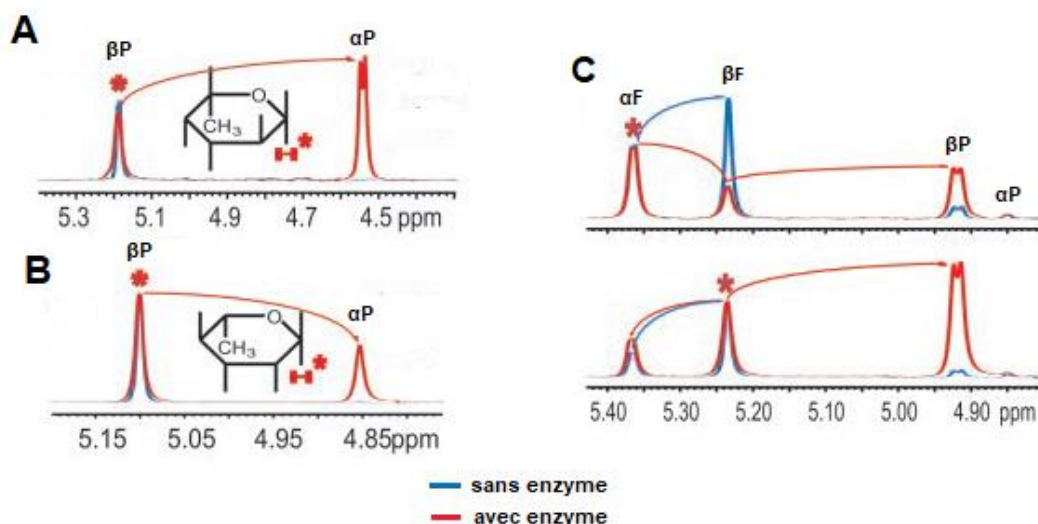


Figure IV.18. Spectres RMN-SD du fucose (A), du rhamnose (B) et du ribose (C) en présence ou non de leur enzyme respective FucU, YiiL et RbsD d'*E. coli* pour mettre en évidence l'activité mutarotase et/ou pyranase.

L'astérisque représente le signal qui a été saturé correspondant à un isomère du monosaccharide. Ces figures ont été reprises directement de l'article de Ryu *et al.* de 2004 [491].

En prenant tout d'abord la Figure IV.18A correspondant au spectre RMN-SD du fucose, on s'aperçoit que lorsque le signal de la forme β -Fucp est saturé (bleu), il n'y a pas de déplacement d'équilibre vers la forme α . En revanche, lorsque l'enzyme FucU est ajouté (orange), un signal important d' α -Fucp apparaît ce qui montre sans équivoque l'activité mutarotase de FucU sur son substrat fucose. Le même constat est également observé pour l'enzyme YiiL avec le rhamnose (Figure IV.18B).

Concernant les spectres RMN-SD du ribose de la Figure IV.18C sans enzyme, on remarque qu'en saturant la forme α -Ribf ou β -Ribf (bleu), un déplacement d'équilibre α/β naturel s'opère. Par contre, en présence de l'enzyme RbsD d'*E. coli*, cet équilibre est déstabilisé pour s'orienter

majoritairement vers la forme β -Ribp. Cela signifie donc que RbsD déplace l'équilibre de la forme furane vers la forme pyrane et qu'elle comporte ainsi une activité pyranase.

Pour revenir maintenant à notre étude sur A0QQD7, divers analyses ont été réalisées en appliquant cette technique RMN-SD afin de mettre en avant son activité mutarotase (voire pyranase).

II.2) Analyses RMN par différence de saturation

Pour commencer, une nouvelle purification de l'enzyme A0QQD7 a été effectuée afin de mettre en place les analyses RMN-SD. Une concentration plus importante que lors de la première purification a été obtenue par dosage BCA avec 1,3 mg d'enzyme pour 4 mL de volume soit environ 5 mg de A0QQD7 purifiée au total.

Cependant, le volume étant trop important pour des analyses RMN-SD, un essai de concentration sur 200 μ L de l'enzyme purifiée a été effectué par ultrafiltration sur membrane de 30 kDa. Une fois celle-ci concentrée deux fois (100 μ L), un nouveau dosage BCA a montré une perte de 22 % de la concentration ce qui correspond à ce que l'on retrouve habituellement lors d'une concentration protéique. L'ensemble de l'échantillon a donc été concentré sur la même membrane d'ultrafiltration.

A0QQD7 concentrée (environ 700 μ L de volume final) a été soumise à un échange de tampon plus adapté à la RMN et qui s'est composé de 150 mM de NaCl et 20 mM de tampon phosphate à pH 7,4 non plus dans l'eau mais dans le D₂O. Cet échange a été mis en œuvre sur une colonne Zeba qui permet le dessalage ainsi que l'échange de tampon sans risque de perte d'activité. Cette méthode a de ce fait permis d'éviter la lyophilisation qui aurait pu engendrer une perte de l'activité enzymatique comme cela a été constaté pour la galactofuranohydrolase Rv3096.

Une fois préparée, l'enzyme échangée dans le D₂O ainsi que du D-Gal échangé lui aussi dans le D₂O ont été remis au Dr. François-Xavier Cantrelle de l'équipe *NMR and Molecular Interactions* de l'UGSF qui s'est chargé des différentes analyses RMN-SD. Ces analyses ont été réalisées par RMN 600MHz à l'Institut Pasteur de Lille selon deux types d'analyse en 2D NOESY (*Nuclear Overhauser Spectroscopy*) puis en 1D ¹H par RMN-SD.

Tout d'abord, il convient de rappeler que le D-Gal est présent sous quatre isomères en solution. Si les proportions de chacun de ces isomères est variable selon la température et le milieu, la forme majoritaire reste le β -D-Galp à environ 65%. On retrouve ensuite principalement l' α -D-Galp qui représente environ 30% des quatre isomères. Les 5% restants se composent des deux formes furaniques β -D-Galf et α -D-Galf avec une proportion plus importante de la forme β . Il y a donc un équilibre naturel qui s'opère en solution mais certaines

enzymes comme la galactose mutarotase sont capables de modifier cet équilibre en favorisant une forme en particulier.

Dans un premier temps, un spectre NOESY qui permet de décrire une interaction à travers l'espace et non pas à travers des liaisons chimiques comme le couplage scalaire a été acquis. Ce spectre a été représenté sur la Figure IV.19 où l'on y retrouve tout d'abord les signaux des quatre isomères avec le signal majoritaire aux alentours des 4,6 ppm correspondant à la forme β -D-Galp. Les trois autres formes sont plus déblindées et sont plutôt comprises entre 5,1 et 5,3 ppm.

Lorsque l'enzyme A0QQD7 est ajouté, on observe l'apparition d'un signal nommé *exchange cross peak* qui montre de manière simple et claire un déplacement d'équilibre α/β par l'enzyme A0QQD7 car cette interaction entre l' α -D-Galp et le β -D-Galp n'apparaît que lorsque l'enzyme est présente dans l'échantillon. Ce signal démontre ainsi clairement que A0QQD7 possède une activité mutarotase.

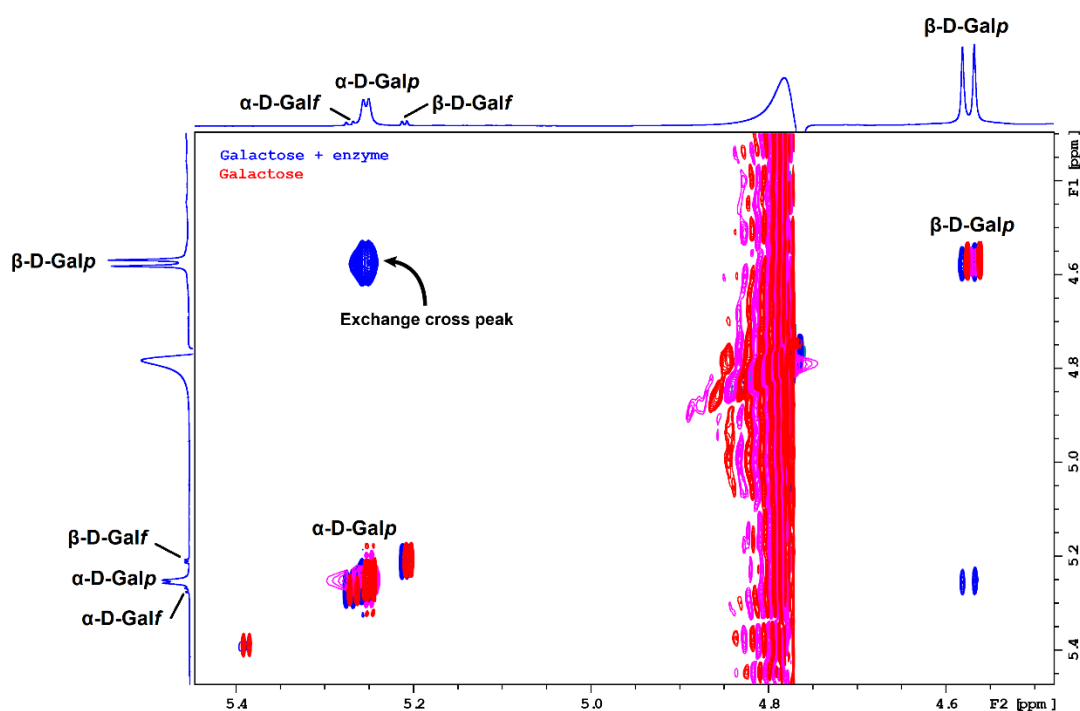


Figure IV.19. Spectre RMN 2D NOESY du D-galactose seul (en rouge) et du D-galactose en présence de l'enzyme A0QQD7 (en bleu).

L'apparition de l'*exchange cross peak* en présence de l'enzyme qui traduit l'interaction entre l' α -Galp et le β -Galp montre que A0QQD7 possède bien une activité mutarotase.

Pour confirmer ce résultat et pour montrer une potentielle activité pyranase, des spectres RMN 1D ^1H ont ensuite été acquis en utilisant la RMN-SD décrite précédemment. Les différents spectres obtenus ont été représentés sur la Figure IV.20 et ont volontairement été zoomés au niveau des signaux des protons anomères qui sont ceux qui nous intéressent ici.

Pour donner un exemple, sur la Figure IV.20C, on voit qu'en saturant le signal de la forme β -D-Galp, la forme α -D-Galp n'est pas visualisée sur le spectre (en rouge). En revanche, lorsque l'enzyme est ajoutée, un signal apparaît au niveau de la forme α au détriment de la forme β (en bleu) qui est de ce fait moins intense comparé au signal issu du spectre du substrat sans enzyme. A l'inverse, quand le signal α -D-Galp est saturé, la forme β -D-Galp est promue (Figure IV.20D).

Pour la Figure IV.20A et IV.20B, ce sont les signaux des formes furane qui sont saturés et l'on peut constater que la saturation est directement déplacée vers la forme pyrane plus stable avant d'observer le déplacement d'équilibre β vers α ou inversement. Néanmoins, l'isomérisation pyrane-furane est indépendante de la présence de A0QQD7.

Grâce à ces expériences de RMN-SD, on a donc maintenant une preuve irréfutable de l'action de A0QQD7 sur le substrat D-Gal en tant que galactose mutarotase. En revanche, l'enzyme ne semble pas posséder d'activité pyranase ce qui n'est cependant pas surprenant d'une part car seulement 30 à 40 % des épimérases possèdent une activité pyranase et d'autre part parce que dans la voie métabolique du galactose, une autre épimérase agit plus tard et celle-ci comporte une activité pyranase confirmée. Il s'agit de l'enzyme UDP-galactose 4-épimérase (GalE) déjà décrite qui entre d'ailleurs également dans la voie de Leloir et qui a été mentionné dans la partie introductive (Figure III.6).

L'activité mutarotase de A0QQD7 ayant été confirmée, la suite de l'étude s'est alors portée sur la galactokinase GalK toujours dans la même espèce *M. smegmatis*. Il s'agit en effet de l'enzyme qui intervient juste après la galactose mutarotase dans la voie de Leloir et qui permet la formation du Gal-1-P. GalK étant déjà bien caractérisée, l'objectif était de visualiser l'accélération de la conversion du Gal en Gal-1-P sous l'effet des deux enzymes A0QQD7 et GalK. En effet, A0QQD7 favorise le déplacement d'équilibre du β -galp vers la forme α dans le cas présent qui est le substrat utilisé par GalK. Cela permettra également de mettre en avant de manière plus concrète l'activité de A0QQD7 qui est l'enzyme qui nous intéresse particulièrement dans l'étude.

Le gène associé à l'enzyme GalK a alors dans un premier été commandé auprès de la firme GeneCust selon les mêmes critères que pour les précédentes enzymes afin de réaliser son expression ainsi que sa purification. Avant de passer à la mise en œuvre du système à double enzyme, l'activité de GalK a d'abord été vérifiée et les résultats obtenus vont être exposés dans la partie suivante.

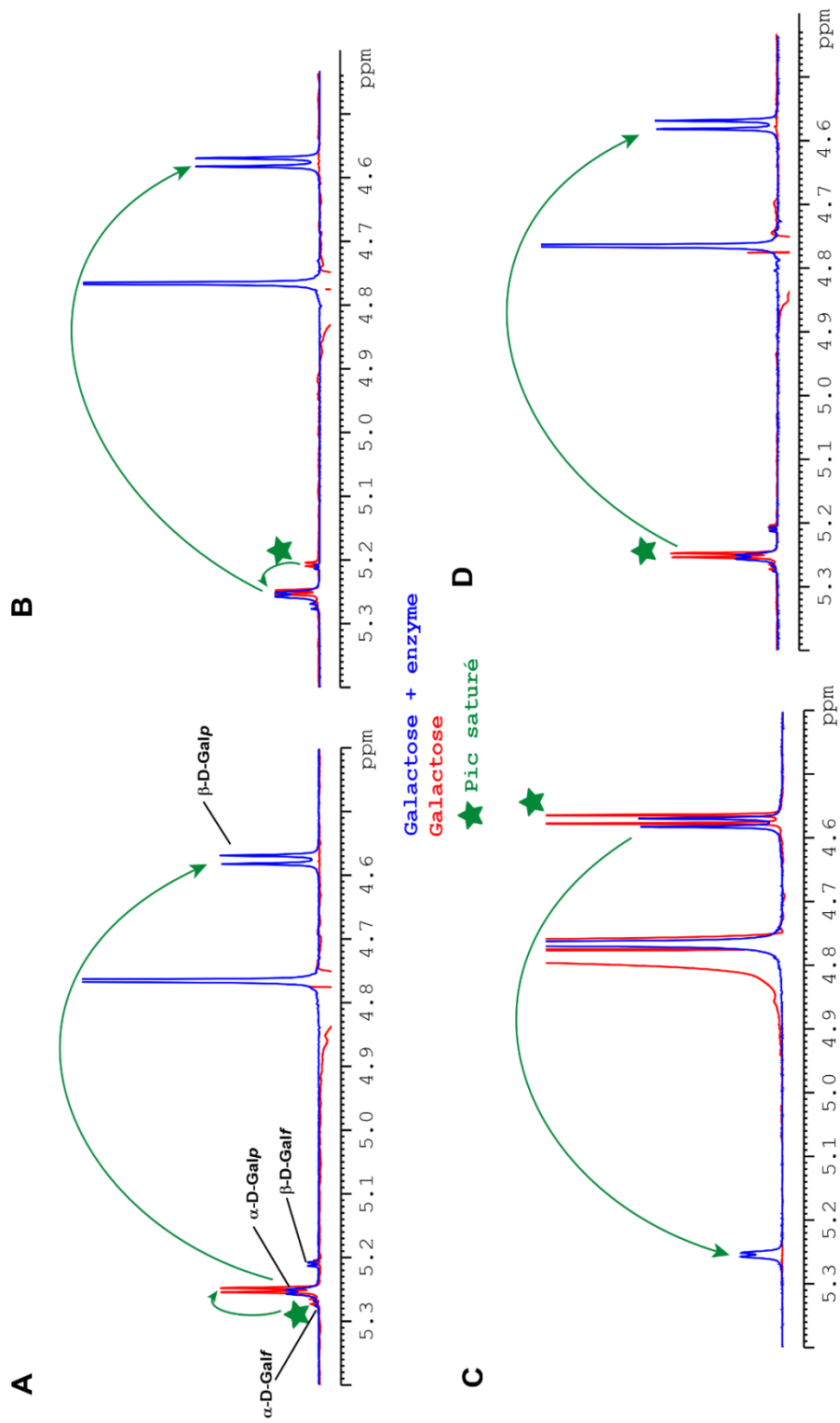


Figure IV.20. Spectres RMN 600MHz 1D ¹H du D-Gal seul (en rouge) et du D-Gal avec l'enzyme A0QQD7 (en bleu). La technique de différence de saturation SD a été utilisée en saturant le signal de l'α-D-Galp (A), du β-D-Galp (B), du β-D-Galp (C) et de l'α-D-Galp (D).

II.3) Purification et test d'activité de l'enzyme GalK de *M. smegmatis*

L'expression de GalK a été effectuée dans la bactérie compétente C41 d'*E. coli* comme pour les autres enzymes. Elle a été purifiée par chromatographie d'affinité IMAC car une étiquette poly-histidine était également comprise dans le vecteur d'expression de GalK. La protéine purifiée a alors été concentrée quatre fois par ultrafiltration pour obtenir un volume final de 1 mL. Le dosage BCA a révélé une concentration de l'ordre de 570 µg/mL.

Avec cette concentration, des analyses étaient envisageables par RMN ³¹P pour visualiser la formation du Gal-1-P mais des analyses en HPAEC-PAD ont finalement été privilégiées en premier lieu pour avoir un test plus rapide. Pour ce faire, des standards de D-Gal et d'α-Gal-1-P ont été analysés en HPAEC-PAD sur colonne PA-1 pour définir les temps de rétention de ces deux monosaccharides. Avec ce support, l'α-Gal-1-P n'était pas visualisable donc le support a été changé pour une PA-200 avec une élution isocratique à 70 mM d'acétate de sodium en plus des 100 mM de NaOH habituels. Ces conditions ont été nécessaires pour observer une bonne séparation des deux monosaccharides (Figure IV.21).

Le D-Gal est observé aux alentours des 5 min et l'α-Gal-1-P est élué quant à lui un peu plus tard vers 10 min. Il est à noter ici que la concentration injectée pour l'α-Gal-1-P a été de 25 µg/mL mais de moins de 1 µg/mL pour le D-Gal indiquant un facteur de réponse très faible pour l'α-Gal-1-P comparé au D-Gal par cette méthode.

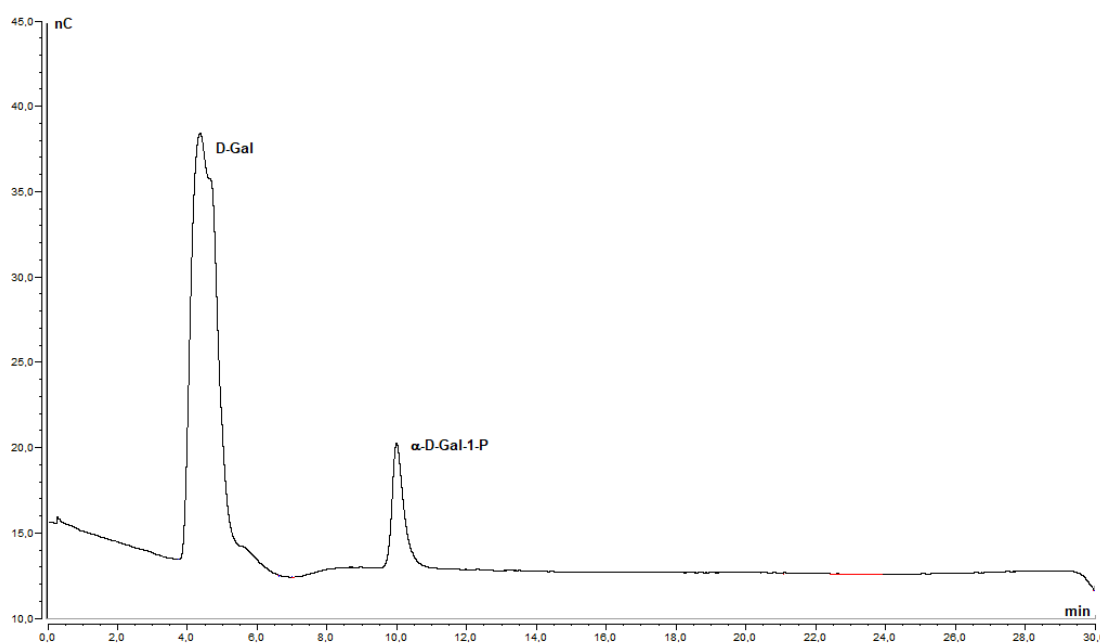


Figure IV.21. Chromatogramme HPAEC-PAD des standards D-Gal et α-D-Gal-1-P.

La méthode ayant été mise au point avec ces deux standards, la réaction du D-Gal avec l'enzyme GalK purifiée a alors été réalisée en se basant sur plusieurs publications et notamment une parue en 1977 par Schell MA. *et al.* qui traite de la purification et des propriétés de la galactokinase homologue chez *S. cerevisiae* [492]. Les conditions décrites dans cette

dernière reposent notamment sur l'utilisation d'un tampon HEPES à 50 mM et à pH 7,5 ainsi que différents réactifs tels que l'ATP, le MgCl₂ ou encore le DTT. La réaction a été réalisée dans un premier temps sur 1 h puis sur 24 h mais n'a pas permis d'observer l'apparition du Gal-1-P en HPAEC-PAD.

Pour vérifier que l'enzyme GalK recombinante purifiée était bien active, une chaîne réactionnelle a alors été mise en place pour un suivi de la dégradation du NADH en UV à 340 nm. Pour ce faire, la même réaction que celle réalisée précédemment a été reproduite ici mais dans un tampon HEPES 20 mM à pH 8. L'ADP alors formé a ensuite été engagé dans une seconde réaction mettant en jeu du phosphénoypyruvate et la pyruvate kinase. Du pyruvate a ainsi été produit et ce dernier a été soumis à une dernière réaction enzymatique avec le NADH et la lactate déhydrogénase pour générer du NAD et de l'acide lactique. C'est d'ailleurs l'oxydation de ce NADH qui a été quantifiée et mesurée à 340 nm sur un lecteur de microplaques. Pour mieux visualiser cette cascade réactionnelle, un schéma des différentes réactions mises en jeu a été représenté sur la Figure IV.22.

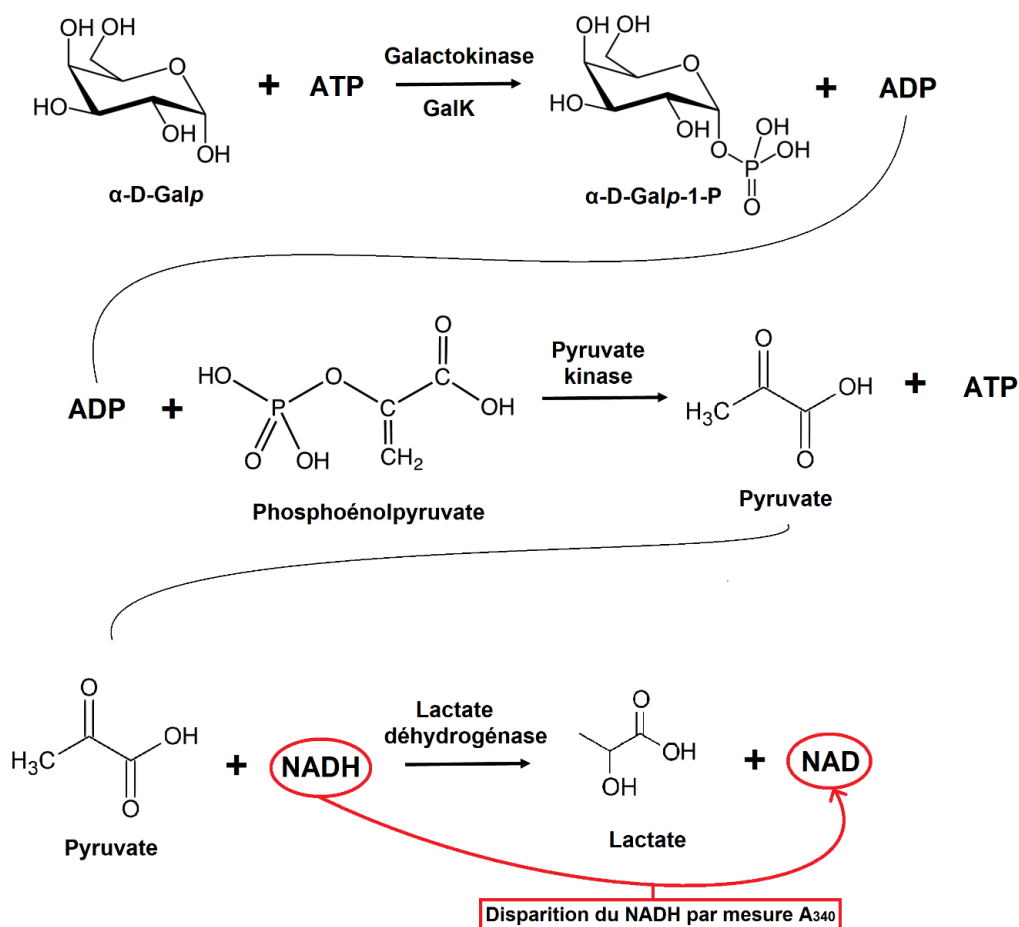


Figure IV.22. Schéma de la cascade réactionnelle réalisée à partir du substrat $\alpha\text{-D-Galp}$ pour visualiser l'activité de GalK par mesure d'absorbance à 340 nm de la disparition du NADH lors de la dernière réaction.

La cinétique a été réalisée en triplicata sur 30 min avec une mesure d'absorbance toutes les minutes. Les courbes découlant de cette cinétique ont été représentées sur la Figure IV.23 pour l'enzyme GalK ainsi que la courbe contrôle issu de l'analyse réalisée sans enzyme. On observe sans ambiguïté une baisse significative de l'absorbance lorsque l'enzyme GalK est ajouté dans l'échantillon par rapport à la courbe contrôle où l'absorbance reste relativement identique tout au long de la cinétique. Cela signifie donc que l'enzyme GalK qui a été purifiée est bien active et que l'absence de Gal-1-P qui a été observée en HPAEC-PAD après action de cette galactokinase sur le D-Gal ne provient ainsi pas d'une perte d'activité de l'enzyme. Il est alors possible que la sensibilité de cette réaction soit trop faible pour que l'on puisse visualiser l'apparition du Gal-1-P en HPAEC-PAD.

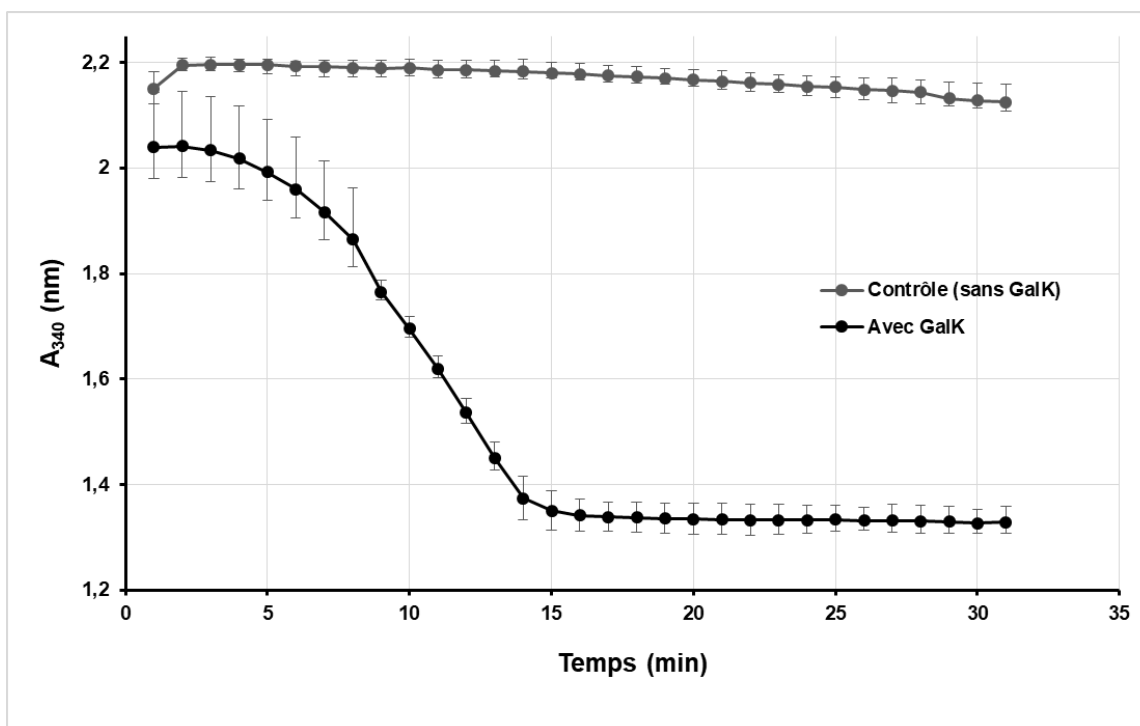


Figure IV.23. Cinétiques d'oxydation du NADH issue de la cascade réactionnelle impliquant les deux enzymes pyruvate kinase et lactate déhydrogénase en présence ou non de l'enzyme GalK par mesure de l'absorbance à 340 nm.

Les données qui ont été reportées correspondent à la valeur moyenne des triplicats.

Les activités des deux enzymes galactose mutarotase (A0QQD7) et galactokinase (GalK) de *M. smegmatis* ont donc bien été visualisées par RMN-SD et par cinétique d'oxydation du NADH respectivement. Il faudra ainsi par la suite mettre en place une méthode impliquant ces deux enzymes afin de visualiser l'accélération de la formation du Gal-1-P. Pour ce faire, la technique qui a été choisie ci-dessus pour l'observation de l'activité GalK pourra être réutilisée en y incluant directement A0QQD7. Il conviendra cependant d'optimiser les conditions réactionnelles pour observer au mieux la différence de cinétique avec ou sans la

galactose mutarotase même si l'avantage ici est que les deux enzymes A0QQD7 et GalK possèdent une activité optimale à un pH relativement proche aux alentours de 7,5-8.

Si cette expérience est positive, alors nous aurons démontré l'activité de la galactose mutarotase A0QQD7 dans son contexte d'implication correspondant à la voie de Leloir chez *M. smegmatis*. En effet, le Gal-1-P formé est ensuite pris en charge par l'action successive d'une galactose-1-phosphate uridylyltransférase (GalT) et d'une UDP-Galp mutase (glf) déjà bien caractérisées pour reformer de l'UDP-D-Galf nécessaire à la biosynthèse des chaînes galactane de l'AG (se référer à la Figure III.7 de la partie introductive).

Pour clore ce chapitre, une dernière partie va traiter de la découverte d'une autre enzyme impliquée dans le catabolisme de l'AG mycobactérien. Celle-ci a été identifiée lors d'une étude réalisée en parallèle à celle de la recherche de l'endo-D-arabinase lorsque de l'AG de *M. bovis* BCG a été purifié puis envoyé au CERMAV de Grenoble dans l'équipe du Dr. William Helbert. En effet, leur laboratoire disposait d'un crible de plus de 1000 enzymes et il semblait intéressant de voir si certaines d'entre elles pouvaient agir sur l'AG afin de tenter de trouver des protéines homologues chez les mycobactéries. Ce dernier a donc servi de substrat pour identifier une ou plusieurs enzymes capables de le dégrader. Le but principal était ici de mettre en évidence une enzyme possédant une activité endo-D-arabinase. C'est ainsi qu'une des enzymes utilisées provenant de *Prevotella brevis* a montré une activité positive sur l'AG. Le plasmide codant l'enzyme en question a été envoyé à notre laboratoire pour permettre sa production et sa purification et ainsi poursuivre la caractérisation de l'activité enzymatique via l'analyse structurale des produits formés.

III) Etude d'une enzyme de *Prevotella brevis* impliquée dans le catabolisme de l'arabinogalactane mycobactérien

III.1) Purification et premiers tests d'activité sur l'enzyme

L'enzyme de *P. brevis* a tout d'abord été exprimée dans les bactéries compétentes BL-21 en milieu AIM. Le culot bactérien a ensuite été soumis à une lyse par presse de French afin de séparer les protéines solubles des insolubles. Une électrophorèse SDS-PAGE a alors été réalisée sur les deux phases (Figure IV.24) et on remarque que cette enzyme est bien présente dans la phase soluble. Sa purification a été réalisée par chromatographie IMAC. La concentration finale après purification s'est avérée être de 4,5 mg/mL (volume totale = 5 mL) par dosage BCA.

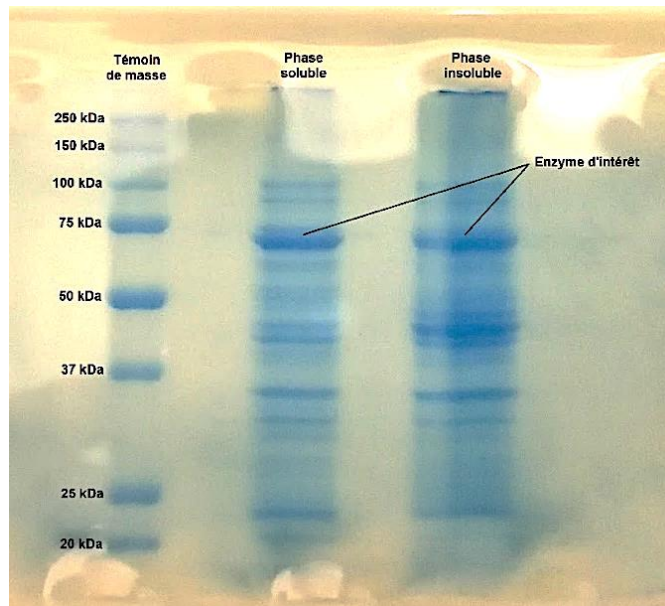


Figure IV.24. Electrophorèse SDS-PAGE avec coloration au bleu de Coomassie des phases solubles et insolubles de l'enzyme d'intérêt de *P. brevis* après lyse des bactéries.

Une fois produite, l'enzyme de *P. brevis* a été incubée avec le substrat AG complet et les produits issus de l'hydrolyse ont ensuite été analysés en HPAEC-PAD comme ce qui est réalisé habituellement (Figure IV.25).

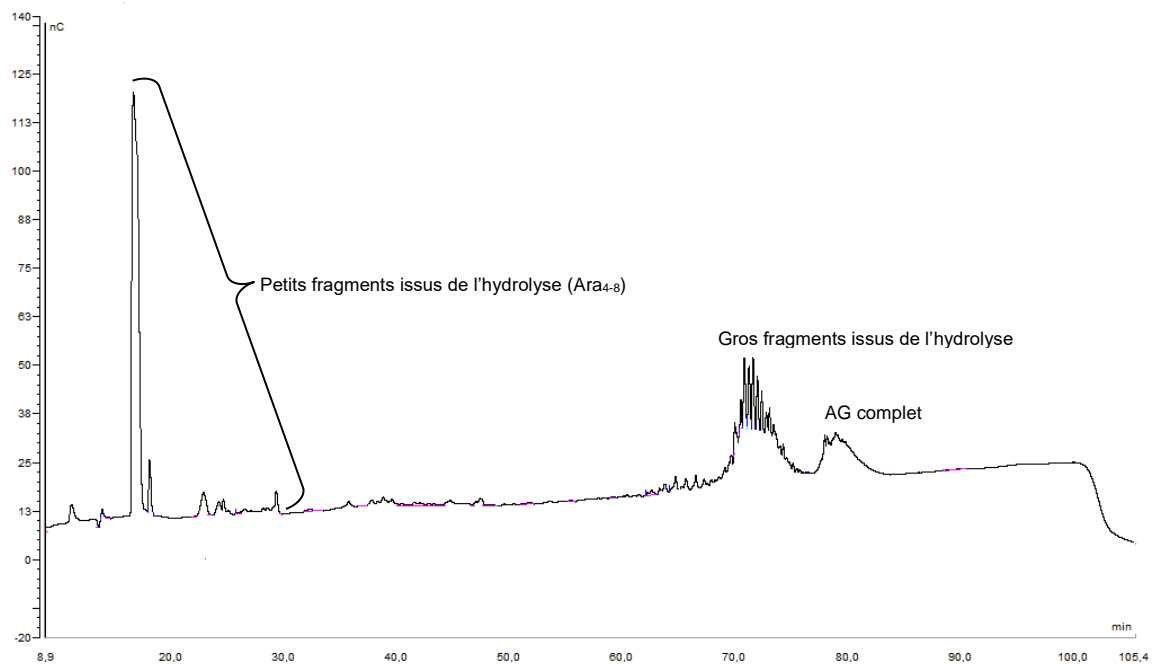


Figure IV.25. Analyse HPAEC-PAD suite à l'hydrolyse de l'enzyme de *P. brevis* purifiée avec de l'AG complet.

Le chromatogramme de la Figure IV.27 confirme donc bien les résultats préliminaires qui avaient été obtenus avec l'enzyme, à savoir une coupure de l'AG générant des fragments de petite et de grande taille.

Suite à ces premiers résultats concluants, une étude structurale complète de ces petits et gros fragments issus de l'hydrolyse a été menée dans le but de déterminer le mode d'action de l'enzyme sur l'AG mycobactérien.

III.2) Analyses structurales des fragments issus de l'hydrolyse

III.2.a) Séparation des produits de dégradation formés

Dans un premier temps, les différents produits résultants de l'hydrolyse ont été séparés. Pour ce faire, une préparation plus importante a été réalisée en partant de 10 mg d'AG et 2 mg d'enzyme purifiée. Ici, de l'AG total de *M. smegmatis* a été privilégié car les quantités nécessaires étaient trop importantes.

Après des essais à différents temps d'incubation, il est apparu que la durée optimale se situait aux alentours des 48 h et que l'AG n'était plus dégradé au-delà.

Après 48 h d'incubation, l'échantillon a alors été soumis à une gel-filtration sur support Bio-Gel P10 (BioRad, Hercules, California, USA) équilibrée à basse pression par 0,1 % acide formique dans l'eau afin de séparer les différents constituants provenant de l'hydrolyse. Les différentes fractions ont été analysées par HPAEC-PAD (Figure IV.26). Cette chromatographie a permis de séparer les produits de l'hydrolyse en 4 fractions :

- Fraction 1 (F1) : petits fragments (structures inconnues).
- Fraction 2 (F2) : fragments incomplets d'AG provenant de l'AG total de *M. smegmatis*.
- Fraction 3 (F3) : gros fragments (structures inconnues).
- Fraction 4 (F4) : AG complet.

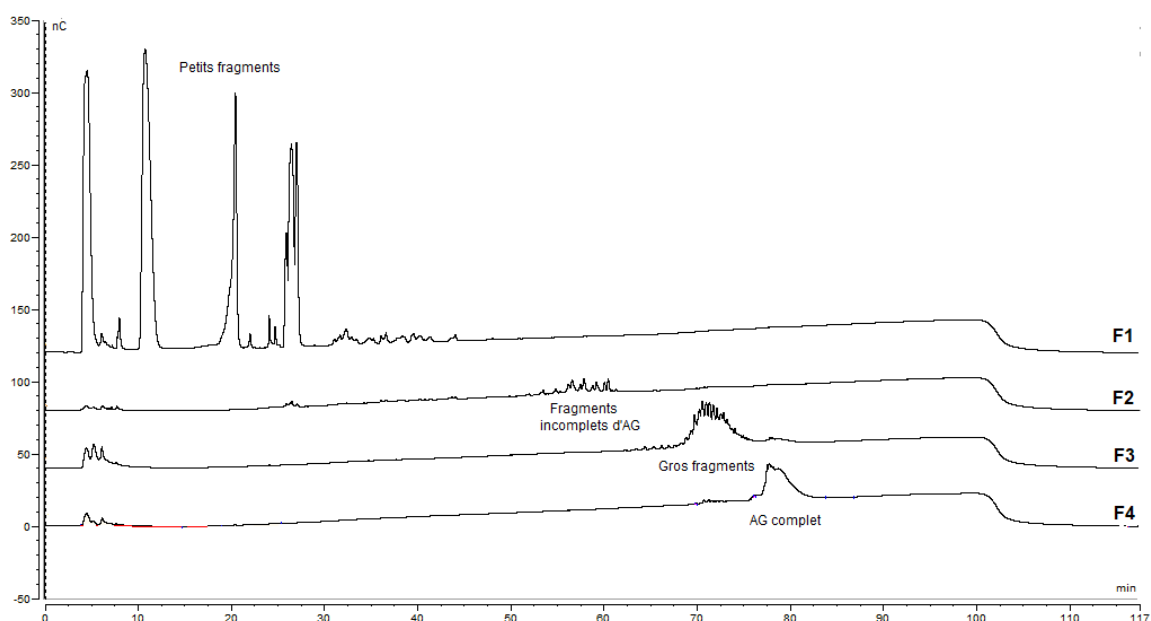


Figure IV.26. Chromatogrammes HPAEC-PAD correspondants aux 4 fractions isolées après gel-filtration sur support P10 de l'échantillon issu de l'hydrolyse AG total *M. smegmatis* et enzyme purifiée de *P. brevis*.

Seules les fractions F1 et F3 ont été soumises à des analyses structurales approfondies car F2 ne provient vraisemblablement pas de l'hydrolyse mais de l'AG total de *M. smegmatis* et la fraction F4 observée à 80 min correspond à celle de l'AG complet comme cela a déjà été constaté sur les précédents chromatogrammes.

III.2.b) Analyses par spectrométrie de masse et RMN

Les fractions F1 et F3 ont tout d'abord été analysées en MS et MS/MS après perméthylation. Les spectres MS et MS/MS de F1 ont été acquis sur MALDI Q-IT TOF (Figure IV.27). Le spectre MS de F3 en revanche a été acquis sur MALDI-TOF/TOF (Figure IV.28) et l'analyse MS/MS n'a pas pu être effectuée à cause de la trop faible intensité obtenue en MS.

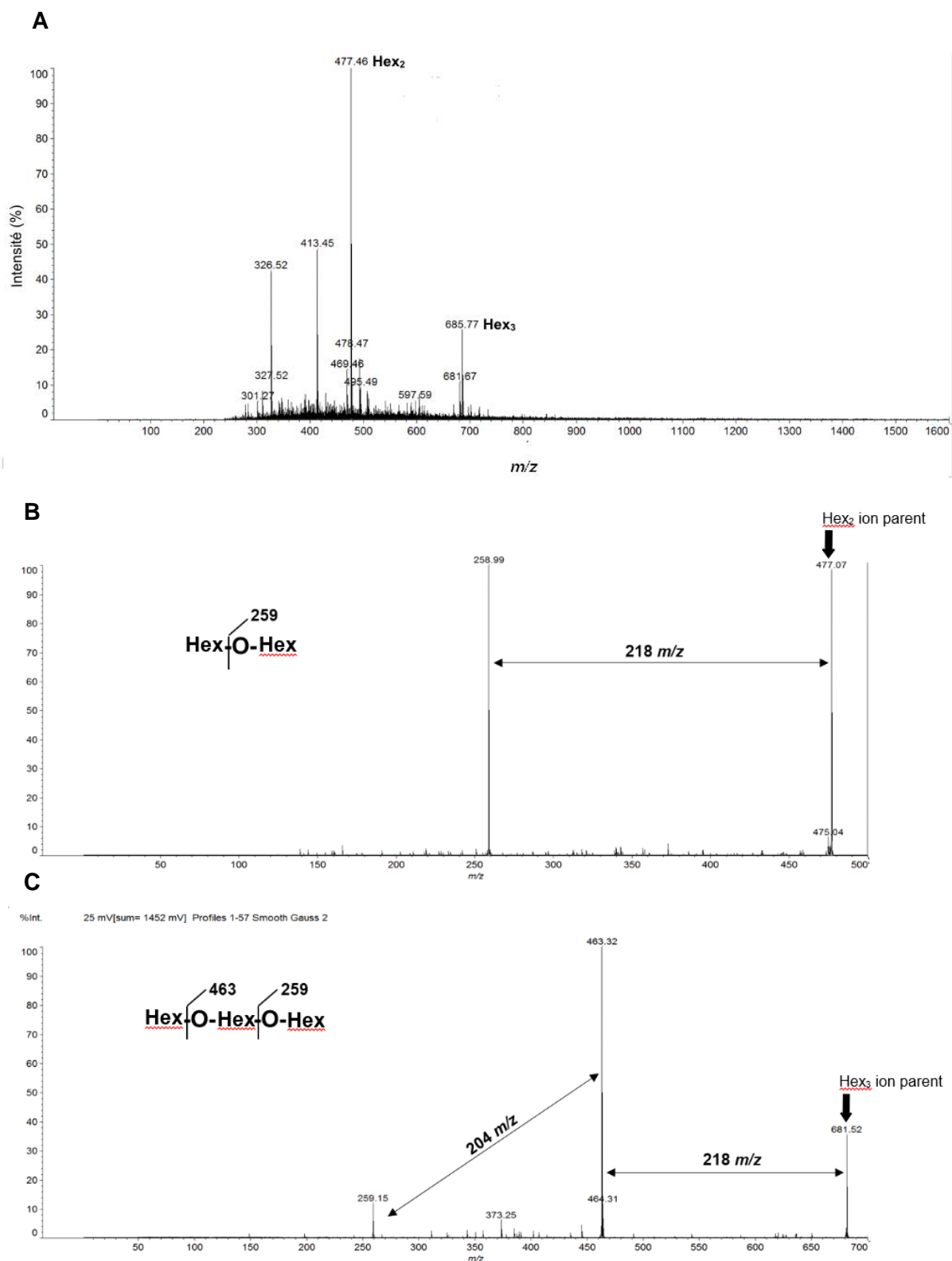


Figure IV.27. Spectre MALDI-QIT MS de la fraction F1 (A). Spectres MS/MS du pic à 477 m/z (B) et du pic à 681 m/z (C) provenant de la MS de la fraction F1.

Ces spectres nous ont appris que les petits fragments libérés lors de l'hydrolyse de l'AG avec l'enzyme purifiée de *P. brevis* sont en fait composés de petits DP (Degré de Polymérisation) d'hexose. On y retrouve de l'Hex₂ et Hex₃. L'enzyme aurait donc une activité endoglycosidasique au vu des fragments observés car on ne retrouve pas de monosaccharide.

Pur valider cette hypothèse, il faut par contre que l'hexose retrouvé corresponde bien à du Gal.

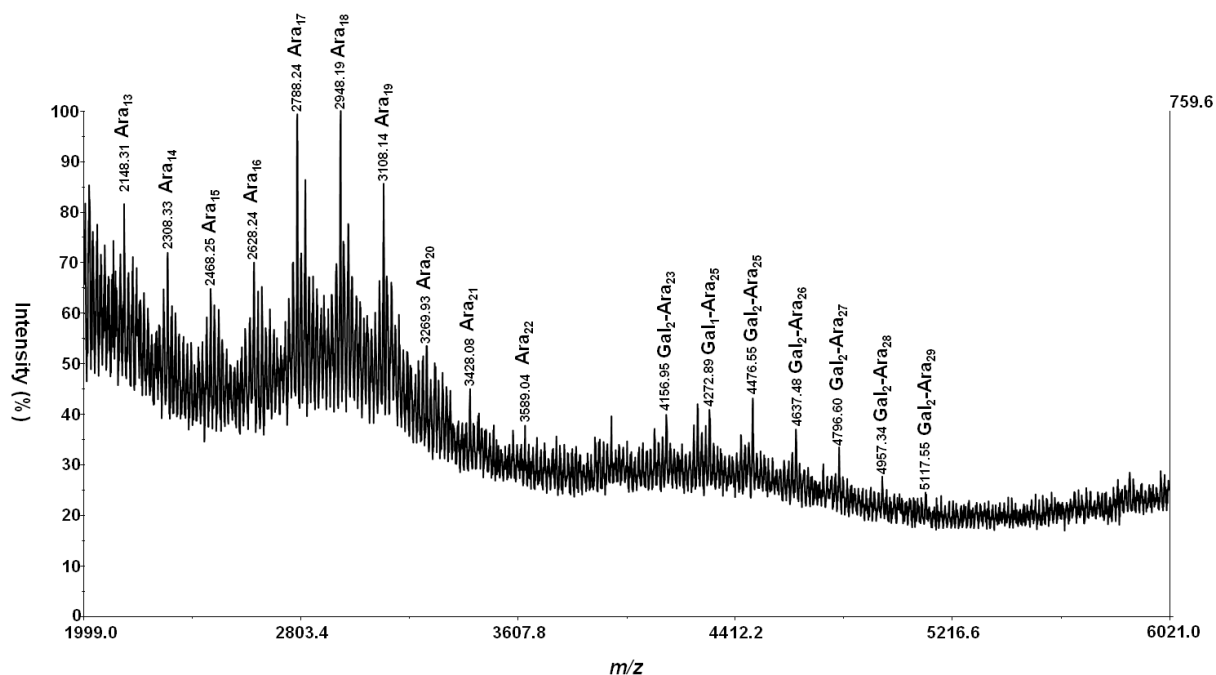


Figure IV.28. Spectre de masse de la fraction F3 acquis en MALDI-TOF/TOF.

Le spectre de la fraction F3 comprend deux régions. Une première correspondant à de l'arabinane et composée de différents DP s'étalant de Ara₁₃ à Ara₂₂ puis une seconde région comprenant également de l'arabinane mais lié à un ou deux résidus de galactose. Ces résultats corrélerent avec ce qui avait été proposé pour la fraction F1. L'enzyme aurait donc bien une activité endo-galactofuranohydrolase. On a en effet d'un côté les petits DP de Gal où l'arabinane est absent et d'un autre les gros fragments correspondant aux longues chaînes d'arabinane libres et celles rattachées aux Gal₂ hydrolysés.

En parallèle, des analyses RMN 400 MHz après échange dans le D₂O ont été réalisées sur les fractions F1 et F3 natives. Des spectres 2D ¹H-¹³C HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Correlation*) permettant de visualiser les corrélations hétéronucléaires et ainsi d'associer un carbone protoné aux hydrogènes qu'il porte (couplages ¹J_{C,H}) a été effectué sur F1. Les spectres en découlant ont permis de confirmer en premier lieu que l'Hex retrouvé en spectrométrie de masse correspond bien à du Gal et ont mis en avant la présence quasi exclusive de Gal₂ présentant une structure β-Galf-(1→6)-α/β-Galp (Figure IV.29).

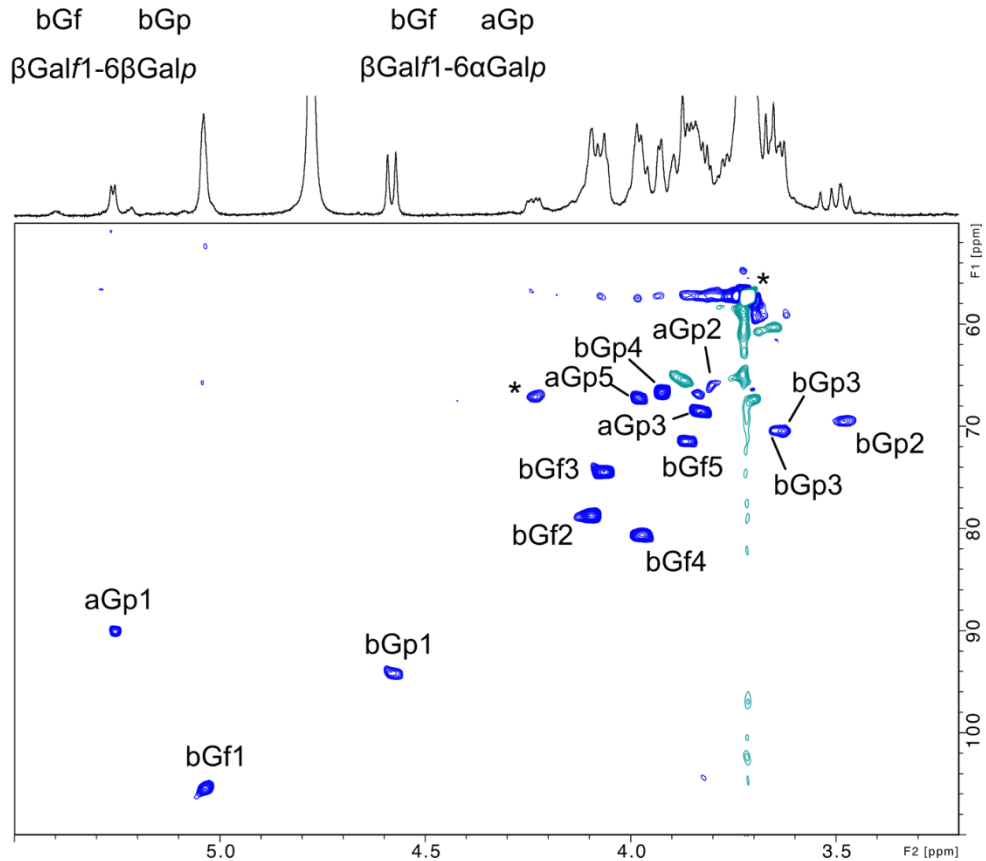
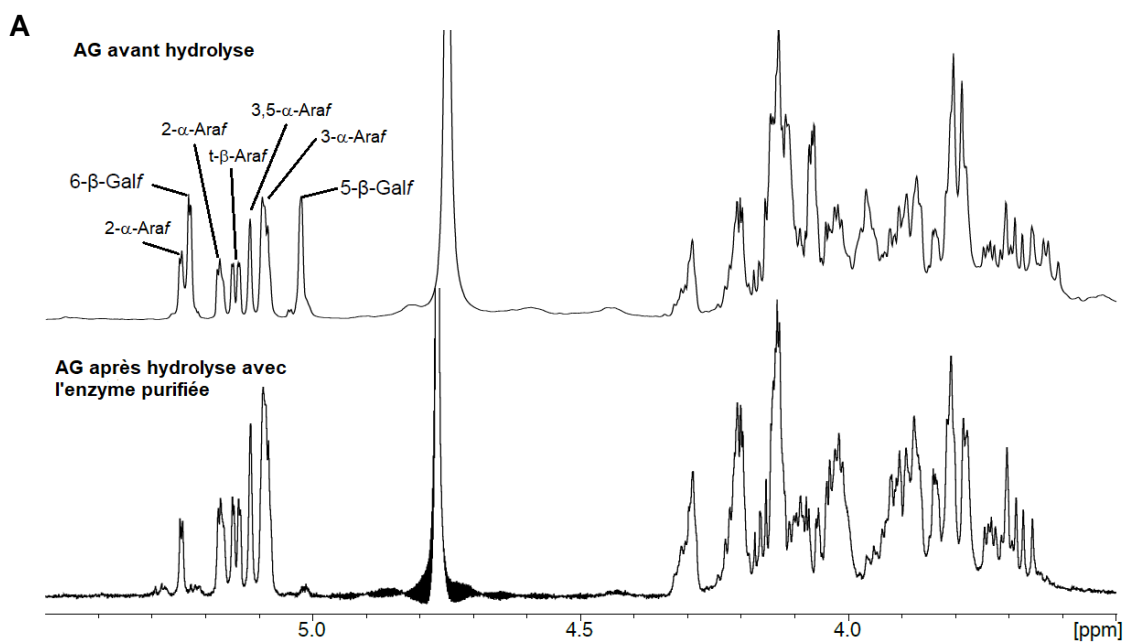


Figure IV.29. Spectre RMN 2D $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQC de la fraction F1 suite à l'hydrolyse de l'AG avec l'enzyme d'intérêt de *P. brevis*.

Des spectres 2D ^1H , $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ HSQC ainsi que des $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY90 ont également été acquis pour la fraction F3 (AG après hydrolyse) et ont été confrontés à ceux de l'AG avant hydrolyse (AG total seul) (Figure IV.30). Les expériences COSY90 permettent de mettre en avant les corrélations homonucléaires entre deux protons vicinaux (couplages $^nJ_{\text{H-H}}$ avec $n \leq 3$).



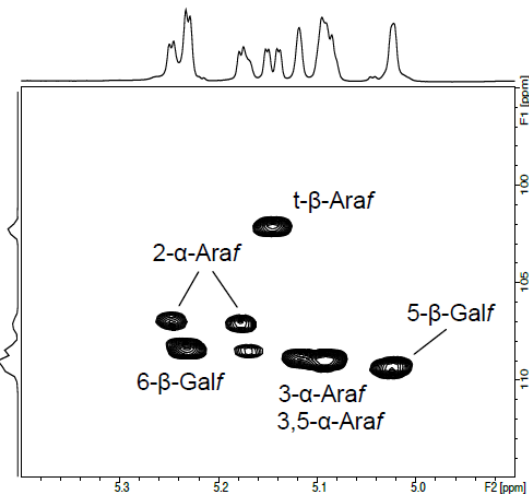
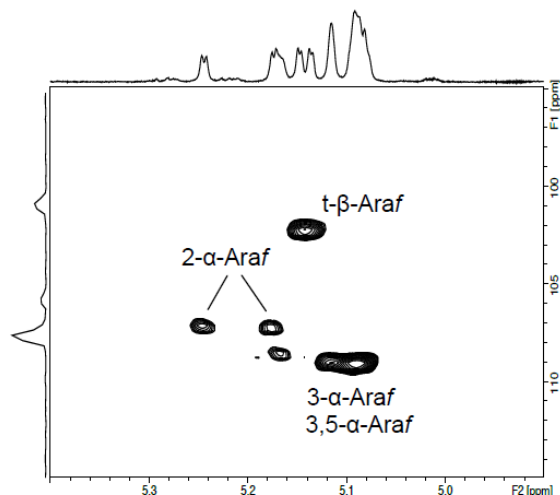
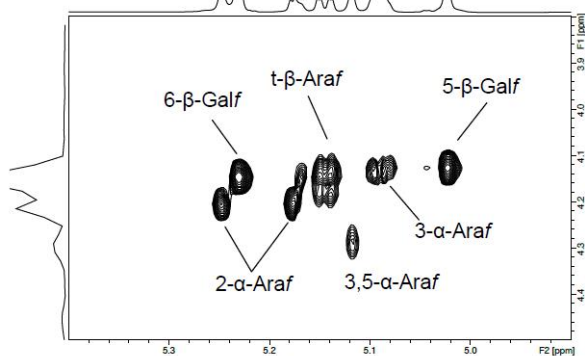
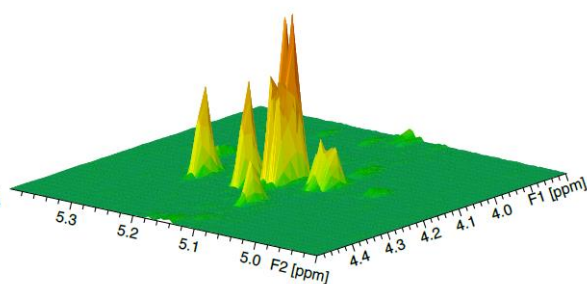
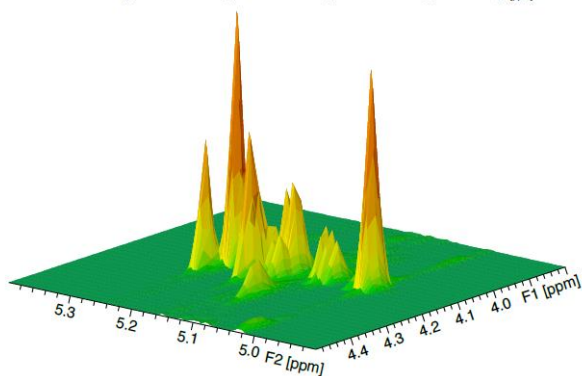
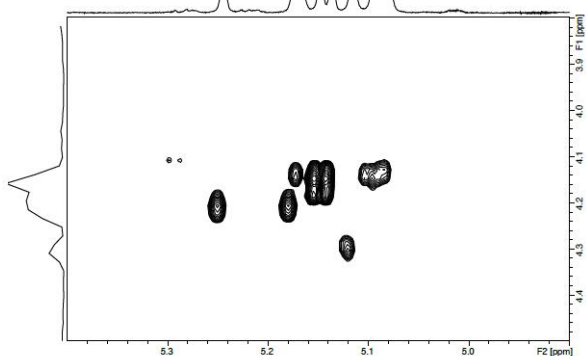
B**AG avant hydrolyse****AG après hydrolyse****C****AG avant hydrolyse****AG après hydrolyse**

Figure IV.30. Spectres RMN 1D ^1H (A), 2D ^1H - ^{13}C HSQC (B) et 2D ^1H - ^1H COSY90 (C) de l'AG seul avant hydrolyse et de l'AG après hydrolyse avec l'enzyme purifiée de *P. brevis* (fraction F3).

On observe sur tous ces spectres RMN une disparition quasi complète du galactose après hydrolyse de l'AG par l'enzyme d'intérêt. Seules quelques traces subsistent et sont de l'ordre de 1 résidu de Gal pour 30 résidus d'Ara. Ces résultats rejoignent ceux obtenus en MS et permettent d'affirmer l'hypothèse de l'activité endo-galactofuranohydrolase de l'enzyme.

III.2.c) Analyses de composition et de liaison

L'activité ayant maintenant été établi, il a fallu déterminer le type de liaison sur lequel l'enzyme vient couper la chaîne galactane, à savoir si c'est la liaison β -(1→5) ou la liaison β -(1→6) qui est impliquée car ce sont les deux seuls types de liaisons retrouvés dans la chaîne galactane de l'AG mycobactérien.

Pour ce faire, des analyses GC-MS ont tout d'abord été réalisées à partir de F1 et F3 natives après dérivation selon deux protocoles :

- un premier permettant une analyse de composition des monosaccharides présents dans l'échantillon. Ce protocole consiste en une méthanolyse des glycannes suivi de leur dérivation par triméthylsilylation (TMS). Les chromatogrammes de F1 et F3 sont reportés sur la Figure IV.31.

- un second permettant une analyse de liaison. Ce protocole démarre par une perméthylation de l'échantillon puis par une dérivation des oligosaccharides par la méthode dite des itols acétate. Cette méthode consiste en une hydrolyse à l'ATFA, une réduction au NaBH_4 ou NaBD_4 et enfin en une peracétylation à l'anhydride acétique. Les chromatogrammes ainsi que les spectres MS associés à certains pics sont présents sur la Figure IV.32.

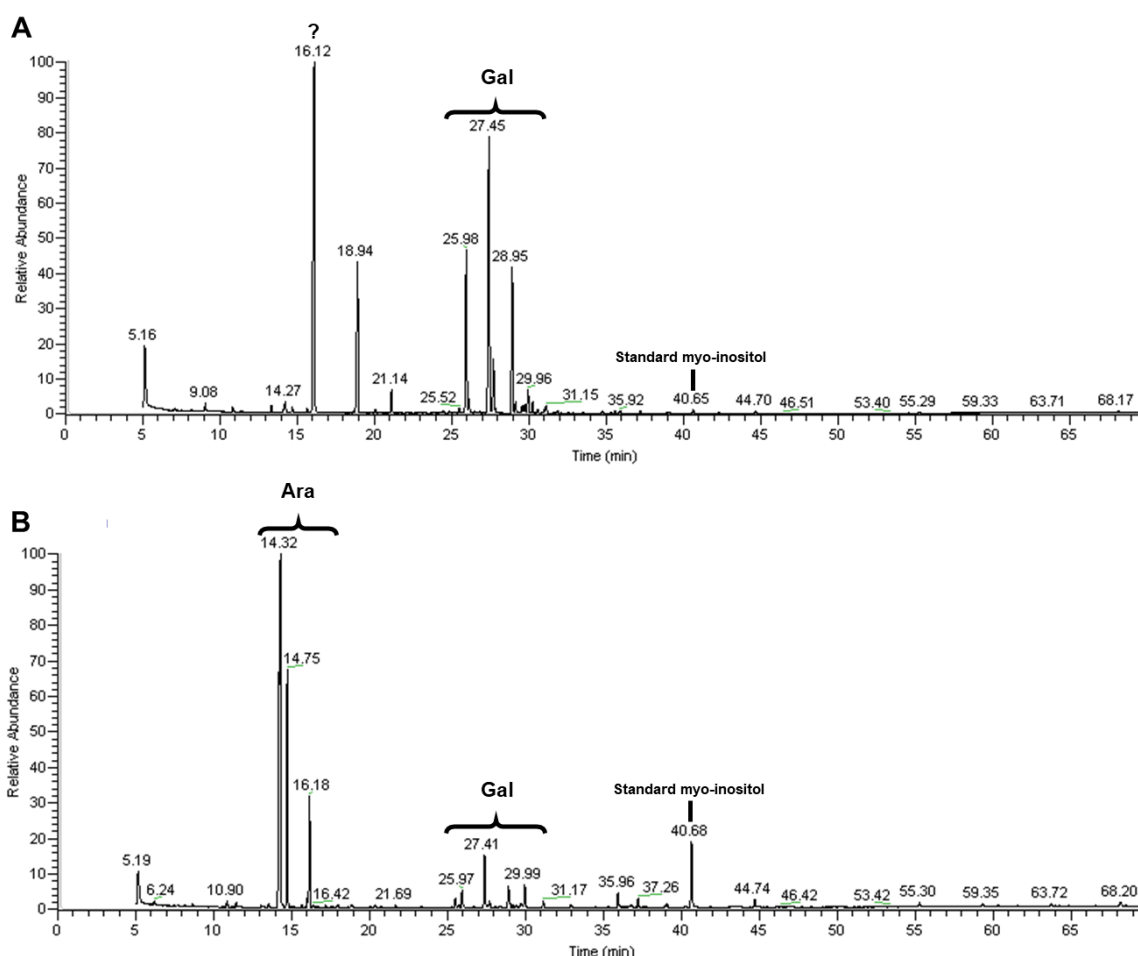
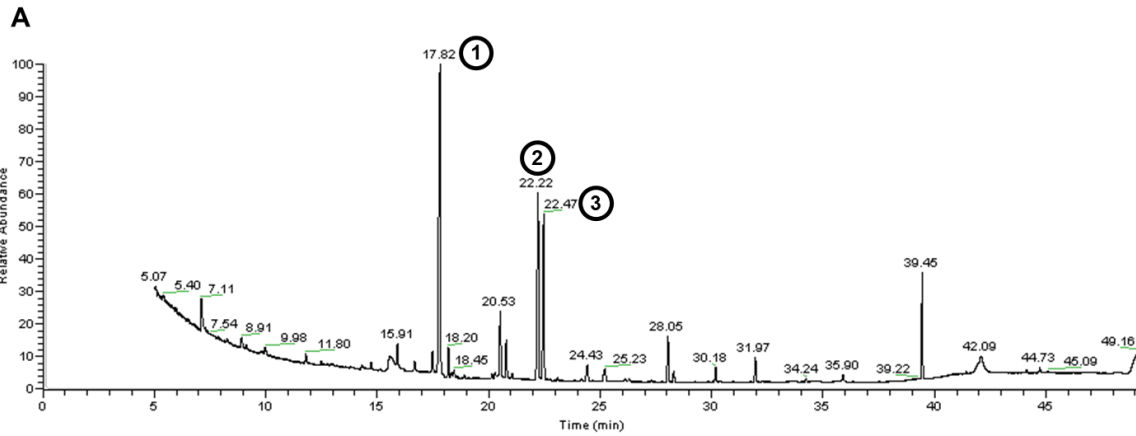
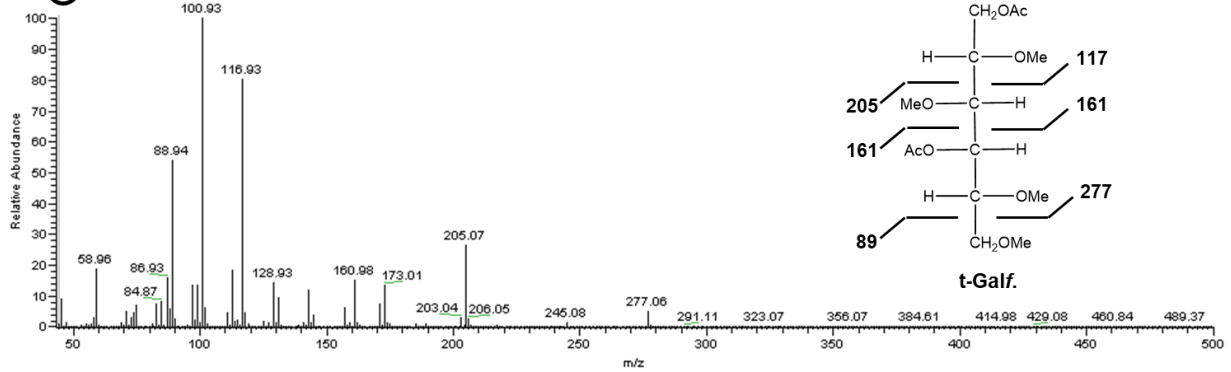


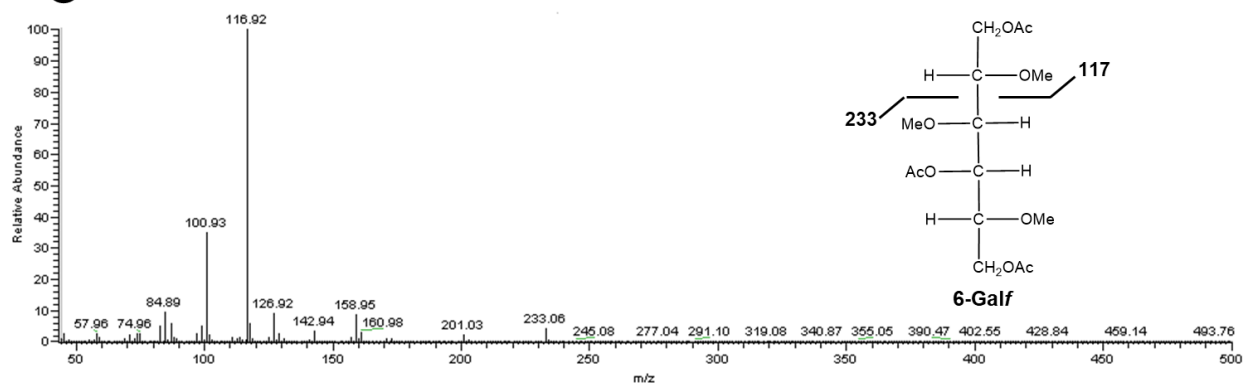
Figure IV.31. Chromatogrammes issus de la GC-MS des fractions F1 (A) et F3 (B) après méthanolyse et dérivation au TriMethylSilyl (TMS).



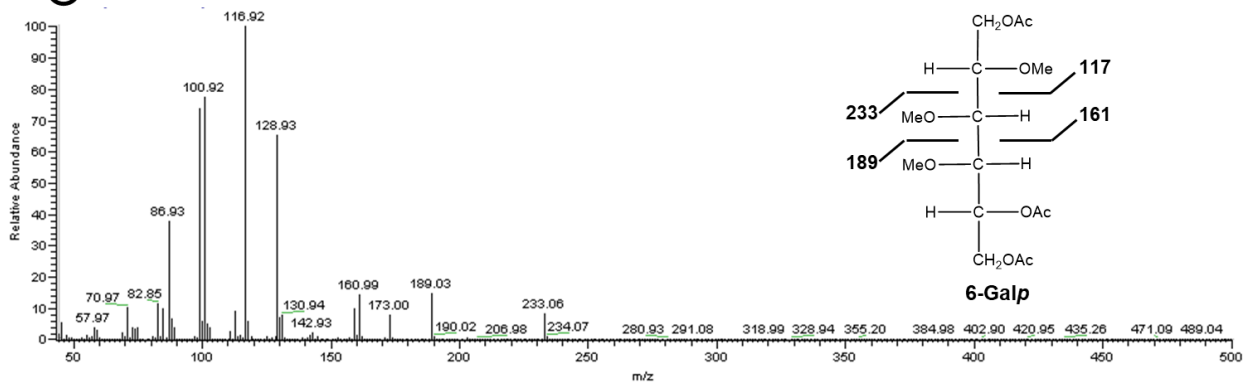
① Temps de rétention : 17.82 min



② Temps de rétention : 22.22 min



③ Temps de rétention : 22.47 min



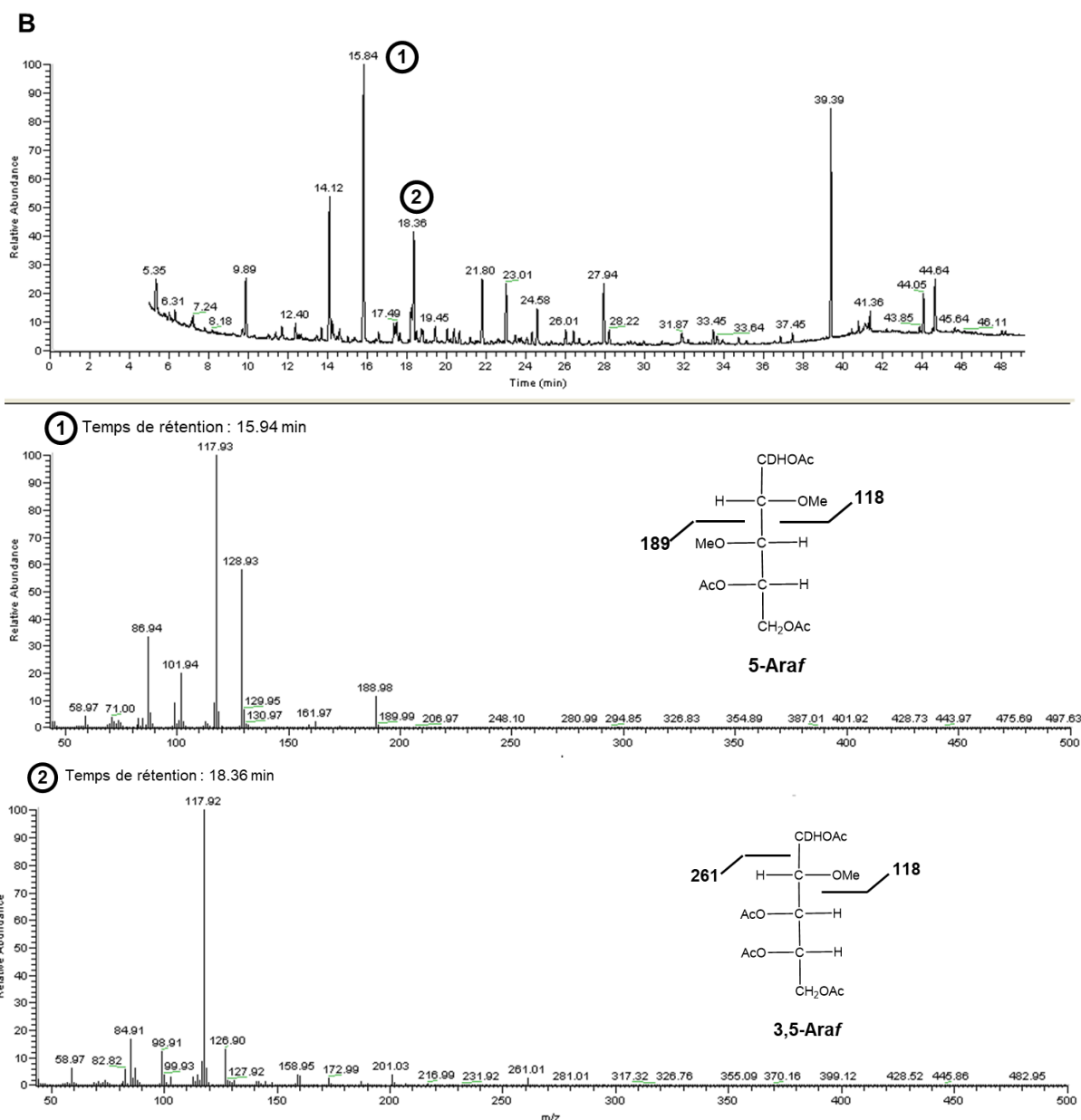


Figure IV.32. Analyses GC-MS des fractions F1 (A) et F3 (B) après perméthylation et application de la méthode des itols acétate.

Les chromatogrammes sont représentés en premier et sont suivis par les différents spectres MS de certains pics associés selon la numérotation établie.

Ces analyses GC-MS apportent peu d'informations nouvelles mais viennent confirmer les résultats précédents. Les analyses TMS (Figure IV.31) ont permis de retrouver tous les monosaccharides attendus sans résidus complémentaires, à savoir le Gal pour F1 et le Gal ainsi que l'Ara pour F3. Le pic à 16,12 min sur le chromatogramme de la Figure IV.31A n'a pas pu être identifié mais ne semble pas correspondre à un monosaccharide d'après les nombreux standards analysés.

La Figure IV.32 quant à elle a mis en évidence les liaisons majoritaires de chaque fraction. Pour F1, du t-Gal sous forme furanose ainsi que du 6-Gal sous forme pyranose et furanose a

été observé. Étonnamment, la forme furanose est présente de manière plus importante que la forme pyranose. Cela est certainement dû à un déplacement d'équilibre suite à la perméthylation. Une information importante émane ainsi de cette analyse sur F1 car l'absence de 5-Gal sur le chromatogramme correspondant nous permet de conclure que l'enzyme de *P. brevis* coupe les liaisons β -(1→5)-Gal. Concernant la fraction F3, toutes les liaisons de l'arabinane de l'AG n'ont pas été retrouvées mais l'observation du résidu 3,5- α -D-Araf nous confirme la présence d'une chaîne arabinane ramifiée.

III.3) Etude de l'enzyme sur substrat synthétique

Pour poursuivre les investigations sur les analyses de liaison et confirmer les résultats obtenus en GC-MS, un substrat synthétique provenant de l'équipe du Pr. Todd L. Lowary de l'Université d'Alberta au Canada a été utilisé. Ce substrat se compose d'une partie linker dont la structure se rapproche de celle de l'AG avec une chaîne carbonée de huit résidus à la place du groupement phosphate. On arrive ainsi à la structure $(CH_2)_8$ -GlcNAc-Rha pour le linker. Ensuite, une chaîne de galactane composée de six résidus de Gal liés alternativement par des liaisons β -(1→5) et β -(1→6) a été greffée au linker, mimant ainsi l'AG mycobactérien (Figure IV.33). Sa structure globale est donc la suivante : β -Gal f -(1→5)- β -Gal f -(1→6)- β -Gal f -(1→5)- β -Gal f -(1→6)- β -Gal f -(1→5)- β -Gal f -(1→4)- β -Rhap-(1→4)- α -GlcNAc p -[1→ $(CH_2)_8$].

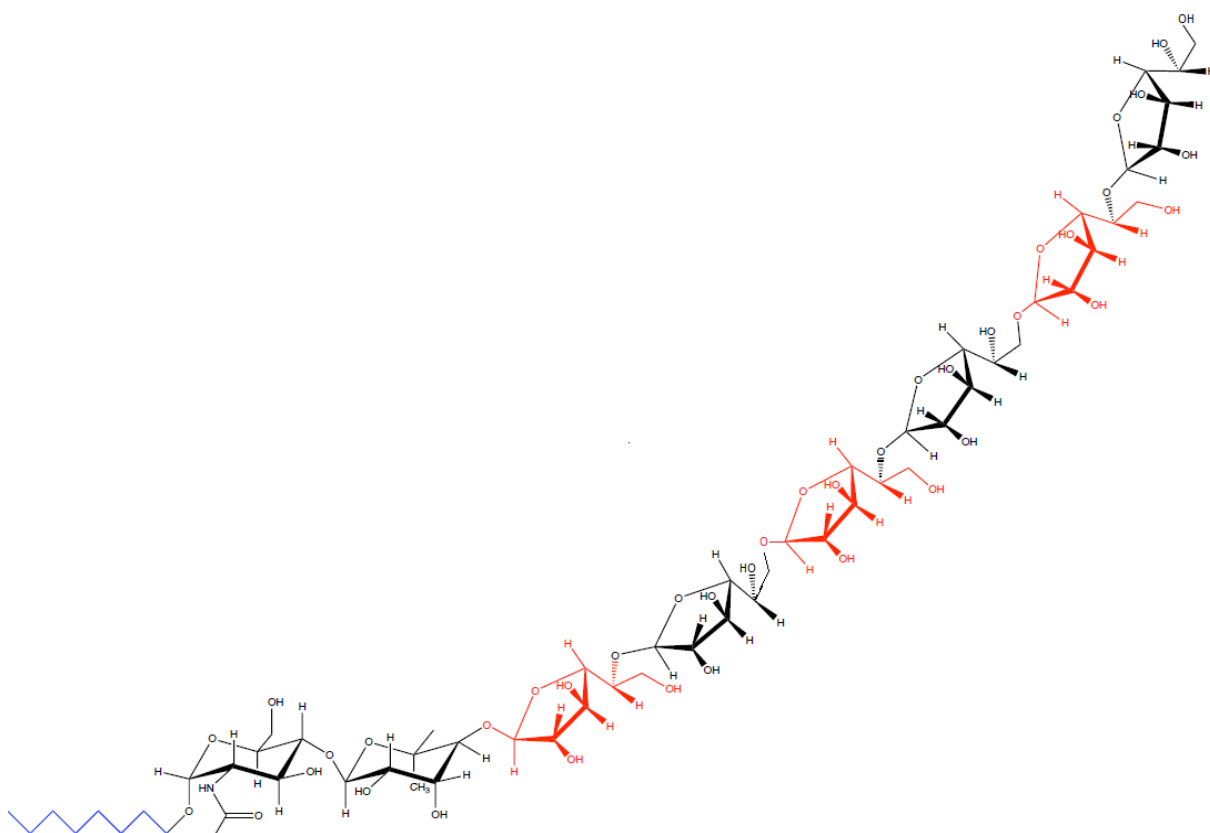


Figure IV.33. Substrat synthétique composé d'une partie Linker $(CH_2)_8$ -GlcNAc-Rha et d'une chaîne galactane avec 6 résidus de Gal liés alternativement par des liaisons β -(1→5) (noir) et β -(1→6) (rouge) [493].

Une petite quantité de ce substrat (100 μg) a été incubé avec l'enzyme purifiée (100 μg) selon les mêmes conditions que pour l'hydrolyse de l'AG mais sur un temps plus court d'environ 2 h. En fin d'hydrolyse, l'échantillon a été perméthylé puis analysé par MS et MS/MS sur MALDI-QIT-TOF (Figure IV.34).

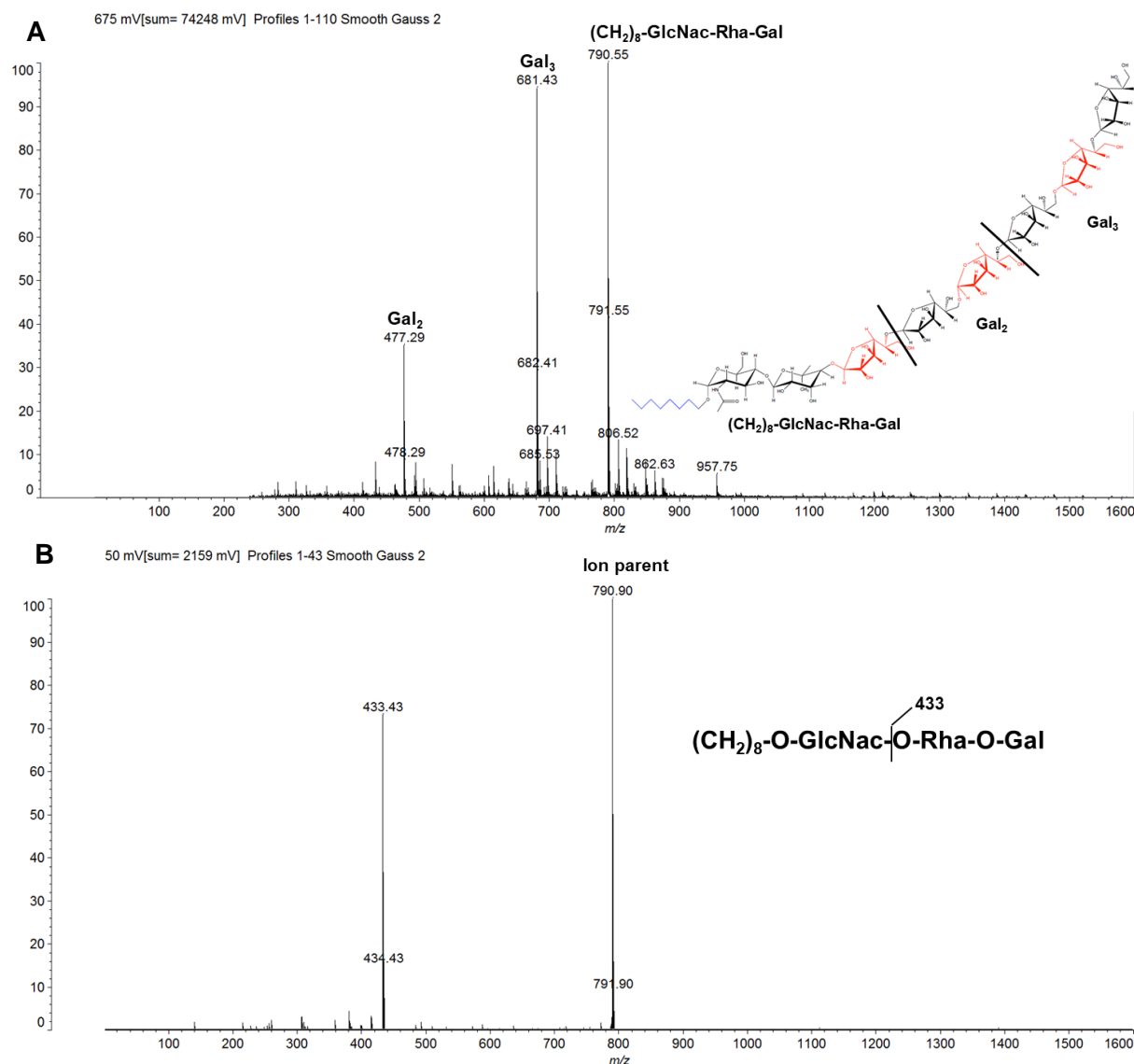


Figure IV.34. Spectre de masse MALDI-QIT-TOF de l'hydrolysate perméthylé issu de l'incubation substrat synthétique linker-Gal₅ et enzyme purifiée (A). Spectre de masse MALDI-QIT-TOF MS/MS de l'ion parent à 790.55 m/z correspondant à la structure (CH₂)₈-GlcNac-Rha-Gal (B).

Le spectre MS de la Figure IV.36A nous apporte des informations importantes. En effet, en plus des pics de Gal₂ et Gal₃, on a ici l'apparition d'un signal à 790,55 m/z qui correspond à la structure du linker lié à un résidu de Gal. La liaison après le premier résidu de Gal étant une liaison β -(1→5), nous pouvons affirmer avec certitude que l'enzyme coupe la chaîne galactane au niveau des liaisons β -(1→5).

De plus, la présence de Gal₃ nous indique que l'enzyme ne coupe pas la dernière liaison β -(1→5) de la chaîne galactane sinon nous aurions observé non pas du Gal₃ mais du Gal₁ et du Gal₂ ce qui en fait donc une enzyme endo-galactosidase stricte.

Pour conclure, toutes ces analyses structurales nous ont permis de déterminer la nature de l'activité de l'enzyme d'intérêt. Celle-ci est une endo- β -(1→5)-galactofuranohydrolase stricte dont le mode d'action sur l'AG mycobactérien a été résumé sur la Figure IV.35.

Si cette enzyme provient de *P. brevis* et n'est ainsi pas en rapport direct avec les mycobactéries, elle n'en reste pas moins une enzyme affectant directement l'AG des mycobactéries comme nous avons pu le montrer dans cette partie. De ce fait, celle-ci peut s'avérer être un outil important dans la poursuite des recherches sur les GH impliqués dans le catabolisme de l'AG mycobactérien en venant enrichir les connaissances dans ce domaine. En effet, les informations inhérentes à l'identification de cette enzyme de *P. brevis* comme sa séquence peptidique ou encore sa structure pourront aider à rechercher des homologues chez *M. tuberculosis* et sûrement apporter de nouvelles pistes pour l'identification d'une endo-D-arabinase par exemple.

Conclusions et perspectives

Tout d'abord, nous avons vu à travers les résultats exposés dans ce chapitre sur la recherche d'une endo-D-arabinase chez *M. smegmatis* que cette dernière n'a pas pu être identifiée. Les études concernant sa caractérisation ont maintenant débuté il y a vingt ans avec l'article de Xin *et al.* de 1999 mais n'ont toujours pas abouti. Des raisons sont forcément liées aux difficultés rencontrées et sont corrélées de notre point de vue et de notre expérience à deux aspects :

- le premier concerne le côté expérimental biochimique de son identification car comme nous avons pu le constater, manipuler cette enzyme est compliquée car son activité est très fragile et se perd facilement. De plus, les études réalisées sur la galactofuranohydrolase Rv3096 ont montré que son activité était également rapidement perdue lors d'étapes critiques comme la chromatographie ou l'ultrafiltration et qu'elle était sujette à l'autoaggrégation. Il est alors fort probable que le même constat soit observé pour l'endo-D-arabinase recherchée;
- le second porte sur la génomique liée à cette enzyme d'intérêt. Aucune D-arabinase n'a été à ce jour identifiée et ce dans tous les organismes vivants et nous n'avons de ce fait aucune piste sur les caractéristiques de ces enzymes. De plus, en criblant l'ensemble des GH de CAZy chez *M. tuberculosis*, aucune d'entre elles ne se rapproche d'une arabinase. Ce constat n'est cependant pas étonnant car il arrive fréquemment que des enzymes se retrouvent dans des familles CAZy ne correspondant pas à leur fonction. On peut citer par exemple le cas de Rv3096 qui a été classé comme cellulase dans la famille GH5 (sous-famille 13) alors que cette enzyme ne possède pas ce type d'activité mais ses caractéristiques en revanche se rapprochent fortement de celles des cellulases.

Pour contourner ces problèmes, il sera par la suite envisagé de sélectionner tous les gènes associés aux GH de CAZy chez *M. tuberculosis* dont les activités n'ont pas été strictement identifiées et de réaliser leur expression ainsi que leur purification pour tenter d'identifier l'activité endo-D-arabinase recherchée en utilisant le même protocole que celui qui a été employé lors du projet de thèse. Pour mettre toutes les chances de notre côté, d'autres expériences seront menées en parallèle en reprenant Rv3096 afin de réaliser une co-purification d'affinité sur cette enzyme. Pour mener à bien cette étude, un substrat non-clivable et pouvant être couplé à un support chromatographique, le 4-aminophényl 1-thio- β -D-galactofuranoside, synthétisé par l'équipe du Pr. Stéphane Vincent est déjà disponible. Il sera alors utilisé dans le cadre de cette co-purification pour mettre en avant les autres GH présentes dans le complexe contenant Rv3096 et peut être ainsi identifier l'endo-D-arabinase. En effet, des protéines interagissant entre elles ont de forte probabilité d'afficher des fonctions similaires, principe du *Guilt by association*. [494].

Concernant les études sur la galactose mutarotase A0QQD7 de *M. smegmatis*, si les expériences sur les enzymes de la voie de Leloir s'avèrent concluantes, il sera alors intéressant pour aller plus loin de lier cette voie dont toutes les enzymes auront été caractérisées chez *M. smegmatis* à l'action en amont de la galactofuranohydrolase MSMEG_5877 (orthologue de Rv3096 chez *M. smegmatis*). Pour rappel, cette enzyme coupe de manière récurrente la chaîne galactane de l'AG en libérant du β -D-Galf libre. Celui-ci peut alors très bien être pris en charge par la galactose mutarotase A0QQD7 pour favoriser la forme α -D-Galf nécessaire à l'action de GalK. C'est d'ailleurs ce que propose le schéma KEGG de la voie métabolique du galactose qui a été reporté ici sur la Figure IV.36 au niveau des enzymes d'intérêt de l'étude. On aurait donc dans ce cas un recyclage complet du galactose qui démarrerait par l'action de l'enzyme MSMEG_5877 sur l'AG suivie de celles de la voie de Leloir pour arriver à la synthèse de l'UDP-Galf avant de démarrer une biosynthèse *de novo* de l'AG.

Pour démontrer ce recyclage, il faudra cependant mettre en œuvre cette fois-ci une méthode enzymatique impliquant trois enzymes (MSMEG_5877, A0QQD7 et GalK) en partant de l'AG pour observer la formation de Gal-1-P en fin de chaîne réactionnelle. La tâche s'annonce plus ardue car au-delà du nombre d'enzymes important mis en jeu, des conditions particulières vont devoir être mises en place car MSMEG_5877 est une enzyme membranaire tandis que les deux autres (A0QQD7 et GalK) sont des enzymes cytosoliques. De plus, MSMEG_5877 est active à pH 4,5 ce qui est bien plus bas que les deux enzymes qui suivent. On pourrait ainsi imaginer un système mimant la membrane plasmique qui permettrait d'opérer un changement de tampon et de pH entre l'action de MSMEG_5877 et celle de A0QQD7.

Pour rebondir sur ces derniers points, il est donc nécessaire d'avoir un transporteur du galactose *in vivo* pour permettre son transport de la membrane plasmique au cytosol. Comme mentionné dans l'introduction, l'existence d'un tel transporteur a déjà été postulée chez *M. smegmatis* comme étant GalP (MSMEG_3689) mais pas chez *M. tuberculosis*. C'est pour cette raison que l'étude s'est portée uniquement sur *M. smegmatis* car le recyclage du galactose proposé n'est pas transférable au complexe *tuberculosis*. Il existe également des transporteurs bactériens capables de reconnaître le Gal sous ses deux formes pyranose et furanose comme c'est le cas par exemple pour le transporteur du Gal YtfQ chez *E. coli* [495]. Ce dernier ne comporte cependant pas d'homologie de séquence avec MSMEG_3689.

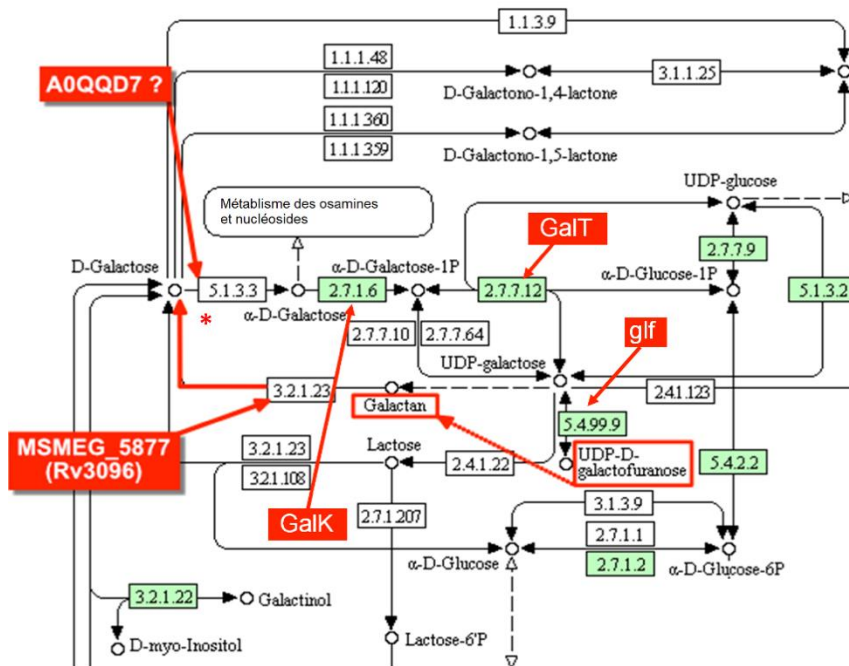


Figure IV.36. Voie KEGG du métabolisme du galactose zoomée au niveau du système de recyclage du galactose avec les enzymes associées (https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?msm00052).

Deux des enzymes proposées dans ce recyclage ont été identifiées au laboratoire et concerne MSMEG_5877 et AQQD7 dont l'activité galactose mutarotase a été prouvée dans le cadre du projet de thèse.

Enfin, l'enzyme de *P. brevis* qui a été identifiée comme une endo-β-(1→5)-galactofuranohydrolase stricte apportera des pistes pour la recherche de l'endo-D-arabinase mais les fragments qu'elle génère auront aussi leur intérêt.

En effet, grâce à cette enzyme, les chaînes d'arabinane pourront être isolées afin de confirmer un point qui avait déjà été mentionné dans la partie introductive et qui concerne le fait que seules les chaînes d'arabinane non mycolylées sont a priori succinylées. Il conviendra cependant au préalable de vérifier que l'enzyme de *P. brevis* identifiée dans cette étude agit bien sur le complexe mAGP. Si tel est le cas, alors il sera possible de vérifier définitivement cette hypothèse puisque l'on sait que l'enzyme de *P. brevis* est capable de libérer de gros fragments composés de deux résidus de Gal lié à une chaîne d'arabinane. Cet effet permettrait ainsi en partant du mAGP d'isoler une chaîne d'arabinane liée ou non aux acides mycoliques puis par des études structurales de déterminer la présence ou l'absence du résidu succinyl pour enfin remonter au lien entre succinylation/mycolylation.

De manière plus générale, connaître finement la structure de l'AG a également une importance dans la compréhension des mécanismes des enzymes qui le régisse. Il reste encore de nombreuses incertitudes quant à la structure de cet AG et si l'on reprend des articles structuraux importants comme ceux de Bhamidi, S. *et al.* de 2008 et 2011 [346], [496], on s'aperçoit que des changements structuraux ont eu lieu entre ces deux publications et que

depuis lors, peu d'évolution a été constatée sans pour autant être certains de la structure finale de l'AG. De plus, des éléments essentiels ont été mis en avant récemment comme le fait que la présence ou l'absence du résidu GalN sur les résidus Araf a une importance cruciale dans la pathogénicité en modifiant la réponse des cellules dendritiques [4]. Il reste apparent que la structure de l'AG comporte encore des zones à éclaircir et que des informations importantes viennent s'ajouter sur les composants déjà identifiées.

D'ailleurs, c'est sur ce point que va être développé le chapitre suivant qui va traiter de la découverte et la caractérisation structurale de fragments incomplets d'AG qui ont été observés lors de la purification de ce dernier.

Chapitre V : Caractérisation structurale des fragments d'arabinogalactane incomplets

Ce chapitre va ici se focaliser sur un aspect beaucoup plus structural du métabolisme de l'arabinogalactane. En effet, lors d'études préliminaires sur l'AG de *M. bovis* BCG réalisées en prélude à mon projet de recherche, des analyses par spectrométrie de masse MALDI-TOF/TOF ont montré que cet AG n'était pas uniquement présent sous sa forme complète décrite dans la littérature mais aussi sous forme tronquée comprenant des fragments de plus petite taille (voir Figure 1 de la partie objectifs).

Cette particularité a tout de suite été prise en considération car ces AG tronqués pourraient très bien provenir d'un remodelage de la paroi et donc être associés à son catabolisme ce qui corrèle parfaitement avec ce versant du projet de thèse. L'identification structurale de ces fragments pourrait aussi donner des indications sur d'éventuelles GH qui auraient agi sur l'AG. L'hypothèse d'une voie alternative de biosynthèse n'a cependant pas été écartée et tout l'enjeu de cette étude repose d'ailleurs sur la question de savoir si ces fragments proviennent d'un mécanisme de remodelage/catabolisme ou s'ils représentent au contraire une voie encore inconnue de biosynthèse. A ce sujet, il est à noter qu'aucun article ne mentionne l'existence d'AG de plus petite taille. Cela est sûrement dû au fait que les analyses structurales ont toujours été réalisées sur l'AG total sans dissociation entre AG complet et fragments incomplets au préalable.

Les investigations ont donc été poursuivies pendant la thèse et ont été divisées en plusieurs objectifs. Le premier a été de vérifier que les fragments incomplets d'AG étaient toujours observés après purification de l'AG total. Ensuite, il a fallu s'assurer que ces AG tronqués ne provenaient pas d'une dégradation lors du protocole de purification qui comporte de nombreuses étapes. Une fois ces étapes de vérification effectuées, l'objectif était de séparer l'AG complet des fragments incomplets pour identifier les structures de tous ces fragments par spectrométrie de masse MALDI-TOF/TOF et par RMN. Enfin, des quantifications relatives ont pu être réalisées à partir des spectres RMN obtenus.

I) Identification et isolement des fragments incomplets d'arabinogalactane

I.1) Identification des AG tronqués chez *M. bovis* BCG

Si de l'AG tronqué avait été retrouvé dans des échantillons d'AG totaux purifiés à partir d'un culot de culture provenant de l'espèce *M. bovis* BCG en spectrométrie de masse MALDI-TOF, il convenait bien évidemment de confirmer en tout premier lieu ces résultats avant d'envisager la poursuite de cette étude. Plusieurs purifications d'AG de *M. bovis* BCG cultivés en milieu Sauton ont alors été entreprises et les AG totaux en découlant ont été analysés

d'abord en HPAEC-PAD sur support S200 selon le même programme que celui qui servait au suivi de l'activité arabinasique. Par cette méthode, il a été ainsi possible de visualiser très rapidement si d'autres pics que celui de l'AG complet situé aux alentours des 80 min étaient présents ou non. Sur la Figure V.1, les chromatogrammes issus de trois purifications d'AG de *M. bovis* BCG ont été reportés.

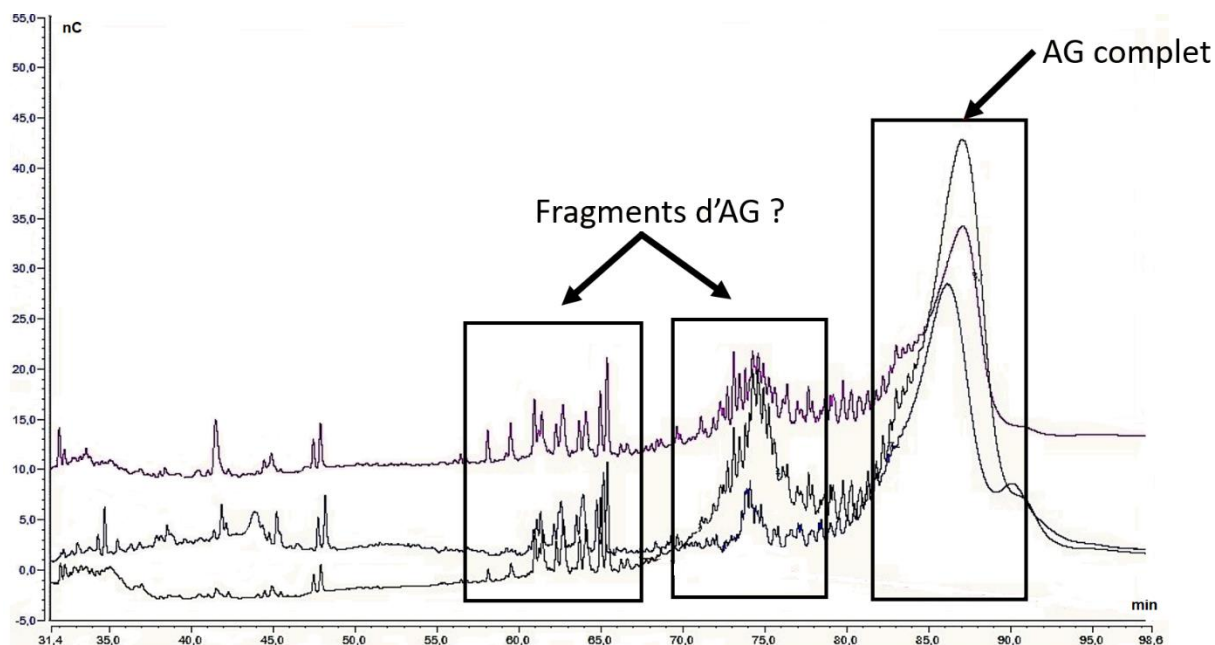


Figure V.1. Chromatogrammes HPAEC-PAD sur support S200 issus de trois purifications d'AG de *M. bovis* BCG.

Ces chromatogrammes provenant des trois purifications d'AG ont donc permis de confirmer la présence de fragments incomplets en plus de l'AG complet. On peut même ici différencier deux régions en ce qui concerne les AG tronqués. On a en effet un massif de pics entre 70 et 80 min semblant s'apparenter à un prolongement du pic de l'AG complet et une autre région centre 57 et 67 min contenant de plus petits fragments et dont les pics sont bien dissociés. De manière plus générale, on observe une bonne reproductibilité des analyses car on retrouve bien les trois régions aux mêmes temps de rétention pour chaque échantillon d'AG total.

Si l'hypothèse des fragments incomplets d'AG a bien été vérifiée, un autre point important a dû être contrôlé. Il a fallu en effet écarter la possibilité que ces fragments potentiels puissent provenir d'une dégradation lors de la purification d'AG et notamment lors de l'étape la plus critique de la lyse alcaline du mAGP (soude 2 M, chauffage à 80 °C pendant 16 h). Pour ce faire, une collecte sur la région de l'AG complet a été réalisée puis cette fraction a été soumise à une seconde lyse alcaline avant d'être une nouvelle fois analysée en HPAEC-PAD (Figure V.2).

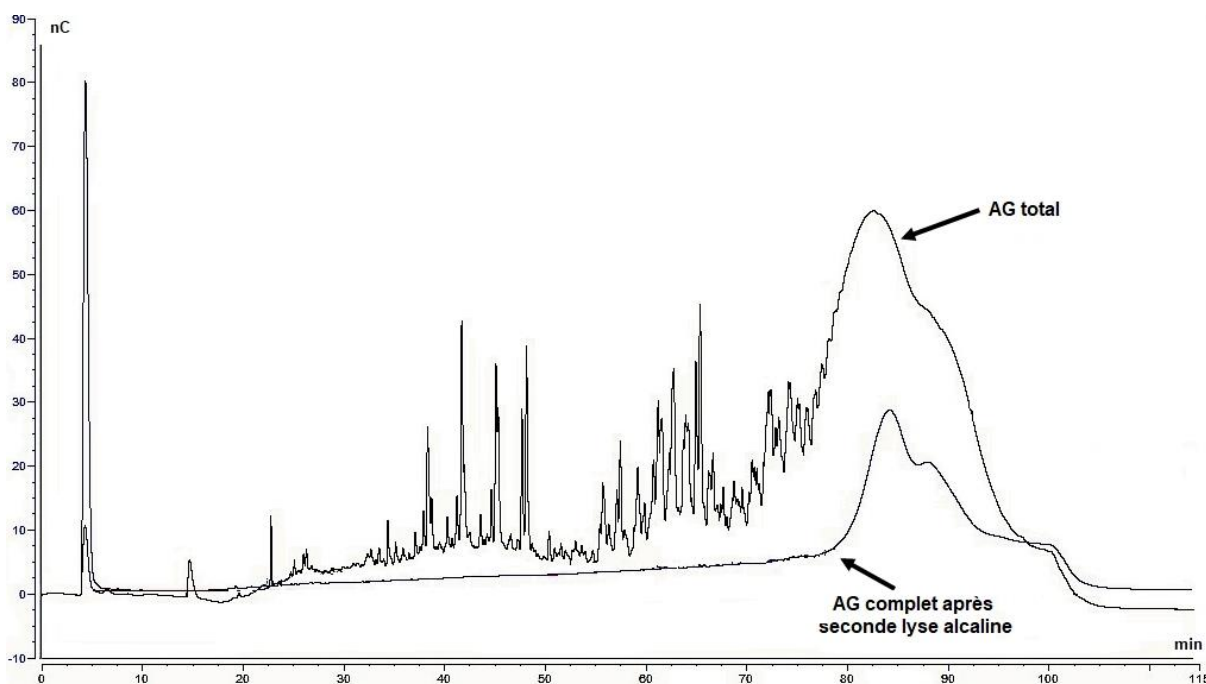


Figure V.2. Chromatogrammes HPAEC-PAD de l'AG complet après lyse alcaline en comparaison avec l'AG total.

Sur la Figure V.2, on voit clairement qu'il n'y a pas d'apparition de pic supplémentaire lorsque l'AG complet subit une nouvelle lyse alcaline. Des contrôles ont également été effectués sur d'autres étapes de la purification mais n'ont pas débouchés non plus sur l'apparition d'AG tronqué. Nous pouvons donc en conclure que l'hydrolyse n'est pas à l'origine de la présence des fragments incomplets d'AG.

Avant de passer à la séparation et à la purification des fragments incomplets, des essais sur de l'AG de *M. smegmatis* ont aussi été menés et ont abouti aux mêmes résultats que pour *M. bovis* BCG, à savoir la distinction de trois régions. Finalement, seul l'AG de *M. bovis* BCG a dans un premier temps été choisi pour la suite de l'étude structural.

Un point important est également à souligner et concerne la collecte en HPAEC-PAD. Si celle-ci nous a permis d'isoler l'AG complet pour des analyses complémentaires, il a été beaucoup plus difficile d'obtenir des résultats homogènes lors de la collecte des fragments d'AG. C'est pour cette raison qu'une séparation par une autre technique chromatographique a été envisagée.

I.2) Séparation des fragments incomplets d'arabinogalactane

La séparation des fragments incomplets d'AG de l'AG complet a été entreprise par chromatographie d'exclusion stérique (ou gel-filtration). Cette chromatographie est idéale ici étant donné que l'on souhaite séparer des composés ayant a priori une structure similaire mais avec des tailles différentes. Le choix du support s'est quant à lui orienté vers une Toyopearl HW-40 qui est composé d'un polymère méthacrylique hydroxylé avec une faible taille de pores

de l'ordre de 5 nm. Il a notamment été choisi pour son domaine de fractionnement compris entre 100-10000 Da en protéine globulaire. En effet, la masse moléculaire de l'AG complet étant de 12 666 Da, il sera normalement compris dans le volume mort alors que les fragments seront séparés.

De l'AG total de *M. bovis* BCG a été fractionné sur une colonne de 30 mL irriguée dans de l'eau ultrapure à un débit de 0,5 mL/min. Sur chacune des fractions collectées, un test à l'orcinol sulfurique a été effectué pour confirmer la présence d'oligosaccharides. Au vu du chromatogramme et du test à l'orcinol, les fractions intéressantes ont été rassemblées en trois fractions majeures : A (volume mort), B (épaulement) et C (Figure V.3)

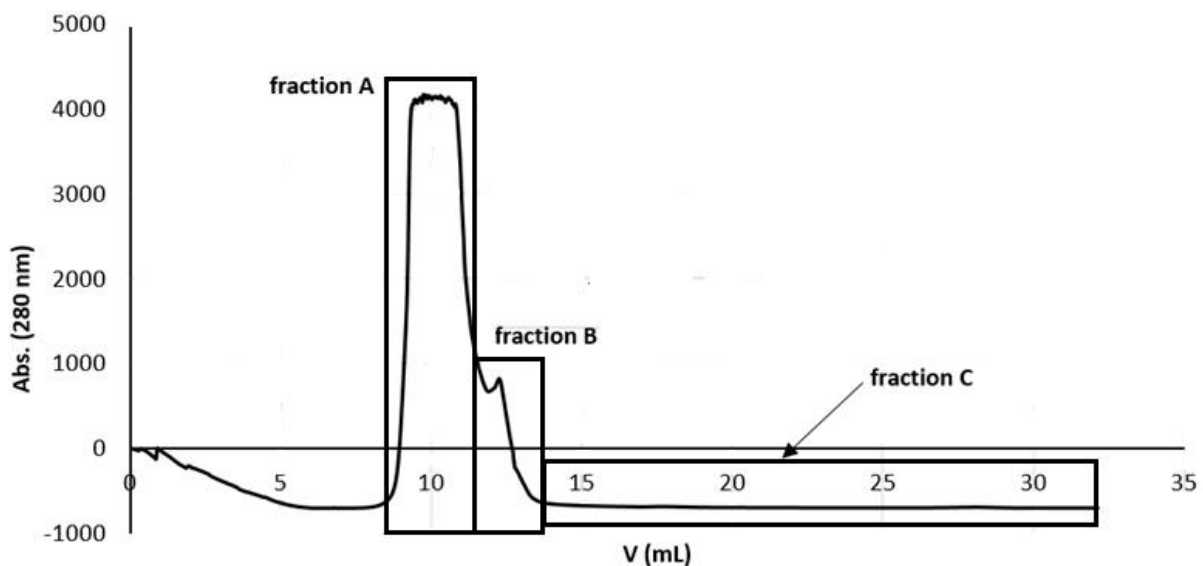


Figure V.3. Chromatogramme de l'AG total de *M. bovis* BCG acquis par gel-filtration sur support Toyopearl HW40.

Chaque fraction collectée a ensuite été analysée en HPAEC-PAD et il en ressorti que la fraction A majoritaire était composé exclusivement d'AG complet comme ce qui était attendu, la fraction B de fragments incomplets potentiels mais avec encore de l'AG complet en majorité et enfin, la fraction C comportant à priori des traces d'AG tronqué. Après lyophilisation, 40,7 mg de la fraction A, 13,1 mg de la fraction B et 1 mg de la fraction C ont été collectées.

La fraction B semble donc ici être la fraction d'intérêt car elle contient la majorité des fragments potentiels d'AG. Cependant, étant donné la présence dans cette fraction de contamination d'AG complet provenant probablement du pic majoritaire de la fraction A, celle-ci a été reanalysée en gel-filtration sur le même support Toyopearl HW40. Le chromatogramme reporté sur la Figure V.4 a ainsi été acquis et a permis une nouvelle séparation de la fraction B en deux sous-fractions B1 et B2. A noter que ce même protocole a été appliqué pour la fraction C mais n'a pas amélioré la séparation dans ce cas.

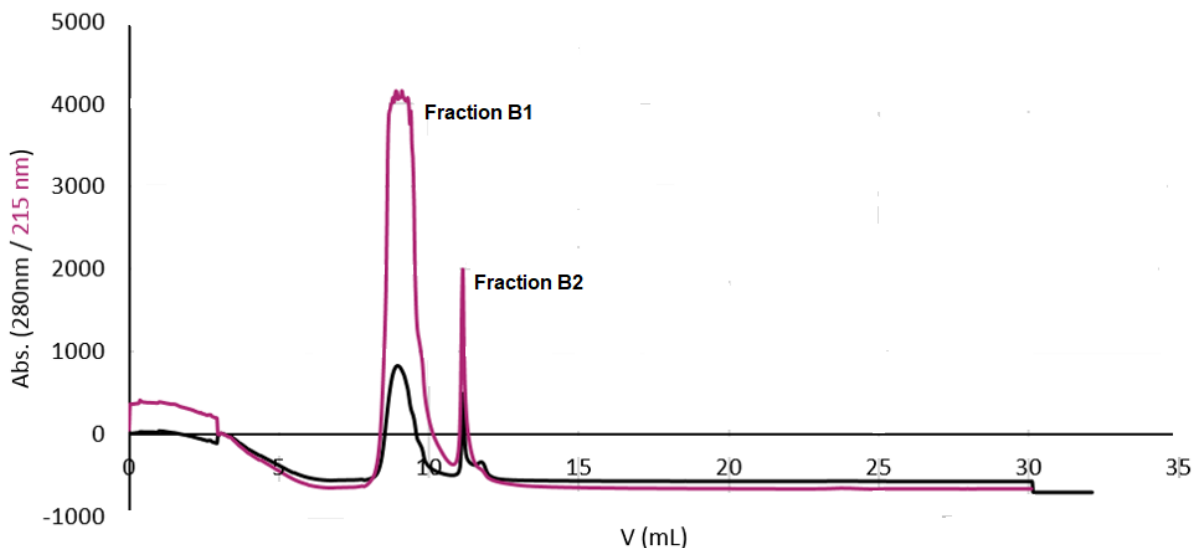


Figure V.4. Chromatogramme de la fraction B analysée par gel-filtration sur le même support Toyopearl HW40.

Les deux sous-fractions ont comme précédemment été analysées en HPAEC-PAD. La seconde séparation a été plus effective car la fraction B1 s'est avérée contenir l'AG complet et la fraction B2 les fragments incomplets avec quelques traces d'AG complet comme en témoigne le chromatogramme de la Figure V.5. En revanche, on s'aperçoit sur ce chromatogramme que seuls les fragments de la première région aux alentours de 60 min ont pu être isolés si l'on se réfère aux chromatogrammes de l'AG total (Figure V.1). La deuxième zone des AG tronqués est en effet généralement très proche de l'AG complet. S'il est possible d'isoler uniquement de l'AG complet, il est en revanche beaucoup plus difficile de dissocier les fragments de la seconde région de ce dernier.

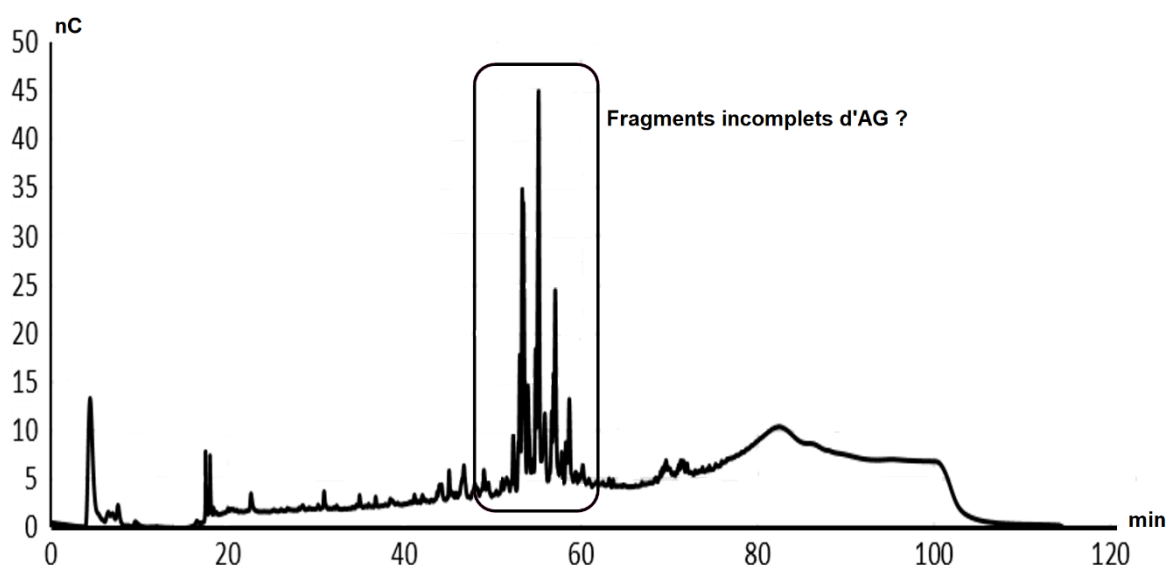


Figure V.5. Chromatogramme HPAEC-PAD de la fraction B2.

La séparation successive de l'AG total par gel-filtration s'est en tout cas révélée concluante car elle a permis d'isoler de potentiels fragments d'AG incomplets condensés dans la fraction B2. Des analyses sur cette fraction mais aussi sur les fractions A et C provenant de la première gel-filtration ont alors été menées par spectrométrie de masse MALDI-TOF/TOF et par RMN 800 MHz (fractions B2 et C) et 900 MHz (fraction A) dans le but de confirmer la structure retrouvée en HPAEC-PAD pour les fractions A et C mais surtout pour élucider la structure des AG tronqués.

II) Détermination de la structure des fragments incomplets d'arabinogalactane

II.1) Analyses par spectrométrie de masse MALDI-TOF/TOF

Les trois fractions A, B2 et C natives ont dans un premier temps été analysées directement par spectrométrie de masse MALDI-TOF/TOF en mode *réflectron* pour les fractions B2 et C et en mode linéaire pour la fraction A, le tout en mode positif et à l'aide de la matrice DHB. Le signal de l'AG complet n'a pas été retrouvé dans la fraction A et cela s'explique par le fait que sa masse moléculaire très importante rend difficile son observation en spectrométrie de masse MALDI-TOF/TOF. La fraction C quant à elle n'a donné que quelques signaux de pentose à différents DP ce qui laisse à penser que cette fraction serait en fait constituée de fragments plus petits que ceux recherchés, probablement d'arabinane.

En revanche, l'analyse de la fraction d'intérêt B2 a fait ressortir de nombreux signaux intéressants comme en témoigne le spectre de masse obtenu et reporté sur la Figure V.6. Si l'on observe de manière globale ce spectre de masse, on s'aperçoit que deux massifs de pics d'allure gaussienne se dégagent. Dans chacun de ces massifs, les pics sont séparés d'un rapport m/z de 132 qui correspond à l'écart d'un pentose. Par contre, un écart de 133 m/z est observé entre ces deux massifs ce qui signifie qu'ils seraient bien constitués de structures différentes formant alors deux régions distinctes.

Sur la base de la structure de l'AG, les valeurs de m/z de la seconde région correspondent à une famille de composés allant du *Linker*-Galactose₈-Arabinose₄ (L-Gal₈-Ara₄) au *Linker*-Galactose₈-Arabinose₉ (L-Gal₈-Ara₉) peuvent ainsi être proposées. Pour rappel, l'unité *linker* de l'AG est composée de la séquence α -L-Rhap-(1→3)- α -D-GlcNAc-(1→P).

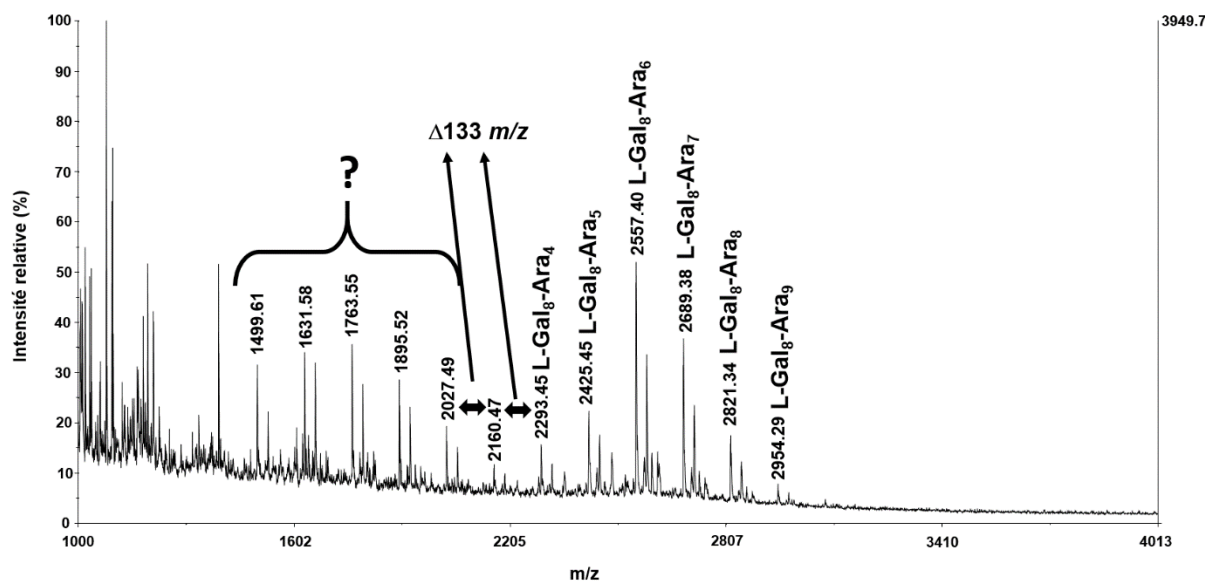


Figure V.6. Spectre de masse MALDI-TOF/TOF de la fraction B2 acquis en mode réflectron positif.

Pour confirmer ces résultats, d'autres analyses par spectrométrie de masse MALDI-TOF/TOF ont été réalisées mais en réalisant au préalable une perméthylation à l'iodométhane ($\text{CH}_3\text{-I}$). Après perméthylation d'une partie de la fraction B2 au $\text{CH}_3\text{-I}$, un nouveau spectre a été acquis (Figure V.7).

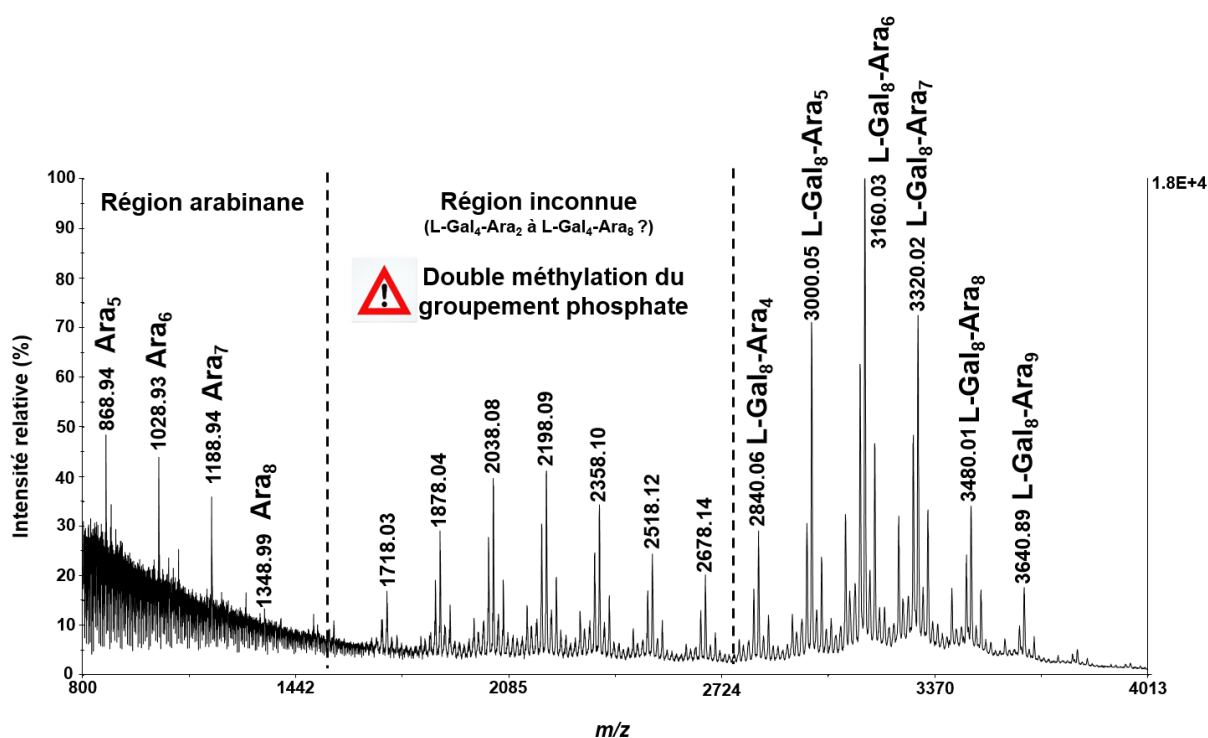


Figure V.7. Spectre de masse MALDI-TOF/TOF de la fraction B2 perméthylée acquis en mode réflectron positif.

On distingue cette fois-ci trois régions différentes :

- une première région qui n'était pas présente sur le spectre de masse de la fraction native correspond à des chaînes de portant de 5 à 8 résidus de pentoses. L'hypothèse s'est alors portée vers la présence de quelques résidus de chaînes d'arabinane provenant probablement d'une dégradation de l'AG complet lors de l'analyse. Ce n'est d'ailleurs pas étonnant de les retrouver ici puisque ces arabinanes avaient déjà été observés dans la fraction C analysée en MALDI-TOF/TOF;

- la seconde région est composée d'un massif ayant une allure de gaussienne comme ce qui avait été retrouvé sur le spectre de masse natif. Contrairement à l'analyse de la fraction B2 native, il a ici été possible après perméthylation de proposer les structures L-Gal₄-Ara₂₋₈ concordantes avec l'AG (Figure V.8A). Cependant, plusieurs points posent problème pour affirmer avec certitude ces structures d'où le fait qu'elles soient affichées comme étant hypothétiques sur le spectre de masse de la Figure V.7. On ne peut en effet pas faire correspondre ces structures avec les signaux observés en natif. De plus, pour que celles-ci correspondent aux signaux du spectre de masse de B2 perméthylée, il faut considérer que le groupement phosphate de l'unité *linker* est doublement méthylé ce qui est possible structurellement parlant même si ce groupement est dans la majorité des cas simplement méthylé;

- enfin, la troisième région à allure gaussienne correspond parfaitement à l'analyse des structures d'AG incomplet L-Gal₈-Ara₄₋₉ dans lesquelles le groupement phosphate est méthylé sur un seul oxygène (Figure V.8B). Il est important de préciser aussi que les deux régions gaussiennes n'ont pas de lien car un écart de m/z 162 a été constaté au lieu de 160 attendu. Il est alors fort probable qu'il s'agisse de deux familles de structures bien distinctes ou que la deuxième région corresponde à une dégradation des oligosaccharides L-Gal₈-Ara₄₋₉.

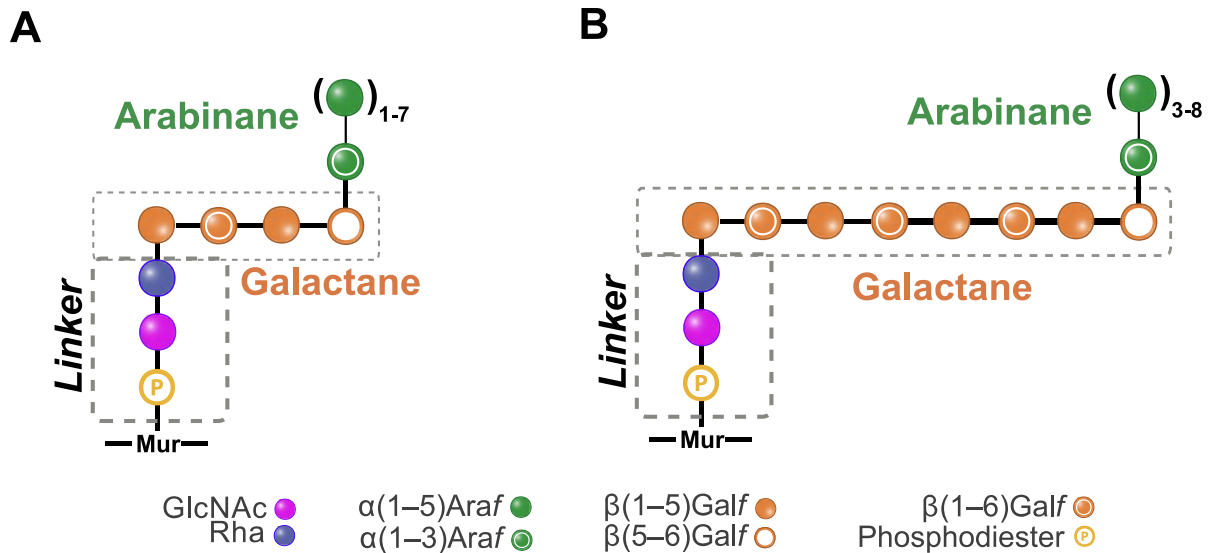


Figure V.8. Structures des fragments incomplets L-Gal₄-Ara₂₋₈ (**A**) et L-Gal₈-Ara₄₋₉ (**B**) proposées suite à leur analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF/TOF.

Avant de passer aux autres analyses, il convient dans un souci de clarté de bien répertorier tous les éléments ayant permis l'identification des structures à partir des signaux acquis en spectrométrie de masse. Pour cela, le Tableau V.1 reprend les différentes m/z théoriques (monoisotopiques) de chaque monosaccharide retrouvé dans l'AG ainsi que les masses théoriques et expérimentales de chacune des structures qui ont été proposées. Dans ce Tableau V.1 ont également été calculés les écarts de rapport m/z entre les valeurs théoriques et les valeurs expérimentales obtenus sur les spectres de masse de la fraction B2 native et perméthylée. Toutes les structures n'ont pas été reportées dans le tableau mais l'exemple du pic majoritaire de chaque massif a été choisi dans les deux cas.

Les structures L-Gal₈-Ara₆ qui ont été proposées pour la dernière région présentent des écarts de m/z d'environ 1,5 Da, que ce soit pour le spectre de masse acquis en natif ou après perméthylation, ce qui reste cohérent pour valider ces structures.

En revanche, pour la seconde structure L-Gal₄-Ara₅, l'écart de m/z entre les valeurs théoriques et expérimentales après perméthylation est inférieur à 1 Da ce qui colle parfaitement mais ce n'est pas du tout le cas pour les écarts de m/z en natif qui affichent une différence de plus de 15 Da. Il n'est donc pas possible de valider cette hypothèse pour le premier massif gaussien.

Tableau V.1. Valeurs des rapports m/z monoisotopiques théoriques et expérimentaux obtenus sur la fraction B2 native et perméthylée.

Les écarts entre les valeurs de m/z théoriques et expérimentales sont les données les plus significatives de ce tableau. Elles ont été représentées en vert lorsque l'écart est suffisamment faible pour que l'hypothèse structurale soit recevable et en rouge lorsque l'écart est trop important pour corrélérer avec la structure proposé.

$L_{(1)}$ signifie que le groupement phosphate n'est méthylé qu'une seule fois lors de la perméthylation et $L_{(2)}$ lorsqu'il est doublement méthylé.

	Rapport m/z monoisotopique théorique natif			Rapport m/z monoisotopique théorique perméthylé		
Hexose	180,0634			250,1416		
Pentose	150,0528			206,1154		
HexNAc	221,0899			291,1682		
Déoxyhexose	164,0685			220,1311		
HexNac-P	301,1062			355,1032		
	Rapport m/z $[M+Na]^+$ monoisotopique théorique natif	Rapport m/z $[M+Na]^+$ natif expérimental (Figure V.6)	Ecart entre valeur m/z théorique et expérimentale	Rapport m/z $[M+Na]^+$ monoisotopique théorique perméthylé	Rapport m/z $[M+Na]^+$ expérimental perméthylé (Figure V.7)	Ecart entre valeur m/z théorique et expérimentale
$L_{(1)}$ -Gal ₈ -Ara ₆	2558,9987	2557,4	1,5987	3161,4527	3160,03	1,4227
$L_{(2)}$ -Gal ₄ -Ara ₅	1778,6923	1763,55	15,1423	2198,996	2198,09	0,906

Plusieurs informations émanent donc de cette double analyse de la fraction B2. D'une part, au-delà des avantages offerts par la perméthylation, cette dernière a ici également permis d'établir une comparaison directe avec l'analyse native de B2 comme nous venons de le faire. Des structures s'apparentant à de l'AG tronquée ont alors été mises en avant et se composent des séquences L-Gal₈-Ara₄ à L-Gal₈-Ara₉. En revanche, d'autres structures incomplètes d'AG semblent bien présentes mais n'ont pas pu être élucidées avec ces analyses. Des dernières analyses en spectrométrie de masse ont alors été menées et ont consisté au préalable à perméthyliser la fraction B2 non plus avec du CH₃-I mais avec du CD₃-I. Le protocole reste identique à celui de la perméthylation classique mais en remplaçant l'iodométhane par de l'iodométhane deutéré. Le spectre de masse qui en a découlé est représenté sur la Figure V.9 et la gamme de masse a été raccourcie en commençant à 1500 m/z car aucun pic d'intérêt n'était présent en amont.

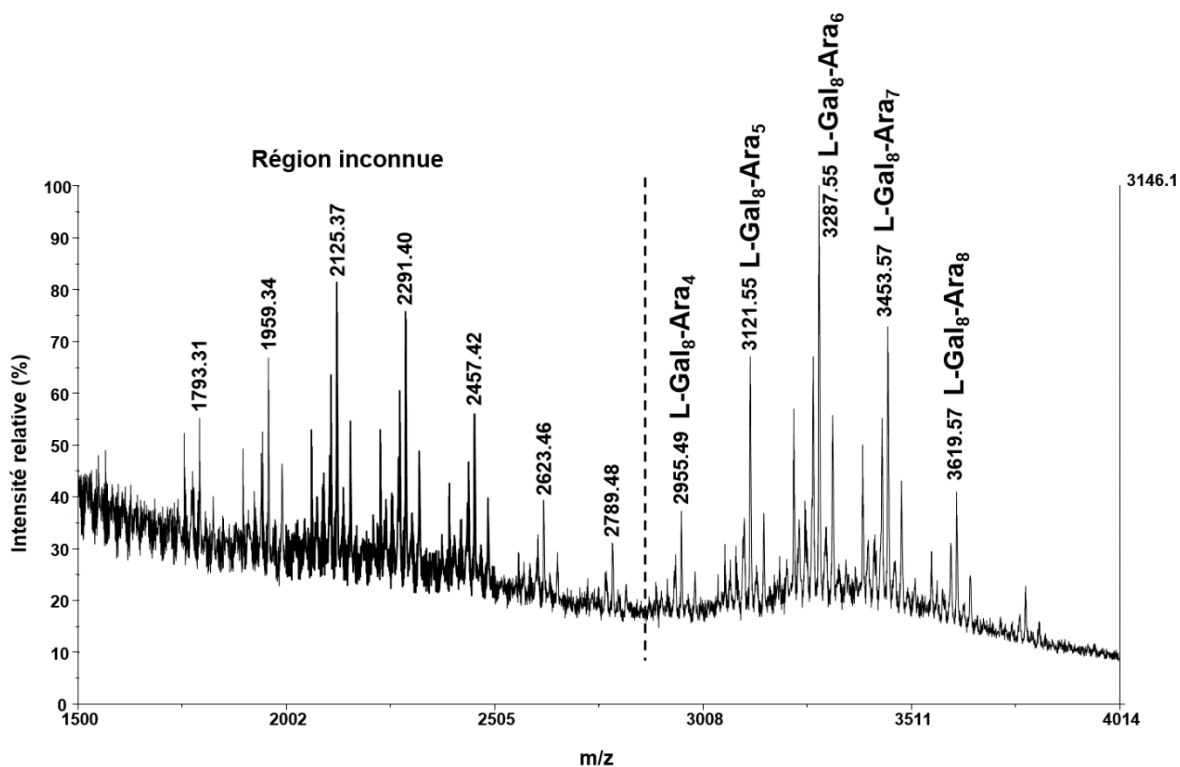


Figure V.9. Spectre de masse MALDI-TOF/TOF MS de la fraction B2 perméthylée au CD₃-I acquis en mode réflectron positif.

De manière globale, on retrouve les deux mêmes gaussiennes que lors des précédentes analyses. Pour l'attribution des différentes structures, l'idée a donc été de reprendre celles qui avaient été proposées pour la fraction B2 perméthylée afin d'établir une comparaison directe car le changement entre les deux dérivations se base uniquement sur la substitution des atomes d'hydrogène par des atomes de deutérium au niveau des positions méthylables. En d'autres termes, une différence de trois unités de masse atomique (3 u.m.a) doit être observée pour chaque groupement avec un proton mobile entre la perméthylation au CH₃-I et la perméthylation au CD₃-I. L'exemple du β-D-galactofuranose a été repris sur la Figure V.10 pour illustrer cette différence.

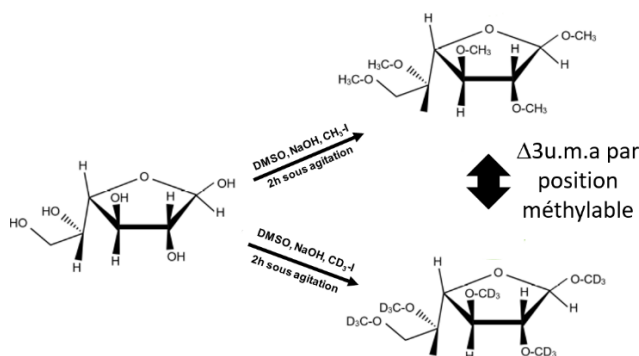


Figure V.10. Exemple de perméthylation au CH₃-I et au CD₃-I sur le β-D-galactofuranose.

Ensuite, il faut prendre en compte le nombre de positions méthylables possibles sur chaque monosaccharide de l'AG et on peut ainsi déterminer le nombre de méthylations sur les structures des fragments potentiels d'AG énoncées lors de l'analyse suite à la perméthylation au CH₃-I (Tableau V.2).

Enfin, après avoir établi les sites méthylés sur ces structures, on peut à l'aide des spectres de masse de la fraction B2 perméthylée au CH₃-I et au CD₃-I retrouver expérimentalement ce nombre de sites et le comparer avec ceux déterminés par le calcul (Tableau V.2).

En reprenant l'exemple du L₍₂₎-Gal₄-Ara₅ de la première région, des *m/z* de 2198 et 2291 ont été obtenus pour la perméthylation au CH₃-I et au CD₃-I respectivement. L'écart du rapport *m/z* entre ces deux valeurs est alors de 93 Da ce qui correspond à 31 positions méthylables. Or, théoriquement, on ne devrait retrouver que 30 positions méthylables ce qui signifie une fois de plus que les structures qui ont été émises pour cette région ne sont pas correctes et peuvent donc être définitivement abandonnées.

En ce qui concerne le second massif, le pic majoritaire associé à du L₍₁₎-Gal₈-Ara₆ comprend 42 sites méthylables d'après les écarts de *m/z* ce qui corrèle cette fois avec le nombre de sites théoriques.

Tableau V.2. Récapitulatif du nombre de sites méthylables lors de la perméthylation pour les monosaccharides présents dans l'AG et les structures potentielles proposées.

Structures glycaniques	Nombre de sites méthylés théorique	Nombre de sites méthylés expérimentaux (à partir des spectres CH ₃ -I et CD ₃ -I)
Gal	3	/
Ara	2 (ou 3 en fin de chaîne)	
Phosphate	1 ou 2	
GlcNAc	3	
Rha	2	
L₍₂₎-Gal₄-Ara₅	30	31
L₍₁₎-Gal₈-Ara₆	42	42

Pour résumer toutes ces analyses de spectrométrie de masse MALDI-TOF, des structures incomplètes d'AG ont pu être identifiées dans la fraction B2 et correspondant aux séquences L-Gal₈-Ara₄₋₉. Ces structures ont d'ailleurs été retrouvées dans chacune des analyses réalisées, à savoir en natif mais aussi après perméthylation au CH₃-I et au CD₃-I. Par contre, nous avons pu nous apercevoir que d'autres fragments d'AG étaient contenus dans cette fraction mais leurs structures n'ont pas pu être élucidées. De plus, des traces de contamination d'arabinane semblent également encore présentes dans B2. Pour tenter de résoudre ces interrogations et pour confirmer les premières structures, des analyses par RMN ont alors été menées.

II.2) Analyses par RMN

Comme pour la spectrométrie de masse, les analyses par RMN se sont d'abord concentrées sur les fractions A et C provenant de la première séparation en gel-filtration sur Toyopearl HW40. Dans un premier temps, des spectres RMN 1D du proton ^1H ont été acquis pour ces deux fractions, à 800 MHz pour la fraction C et 900 MHz pour la fraction A (Figure V.11).

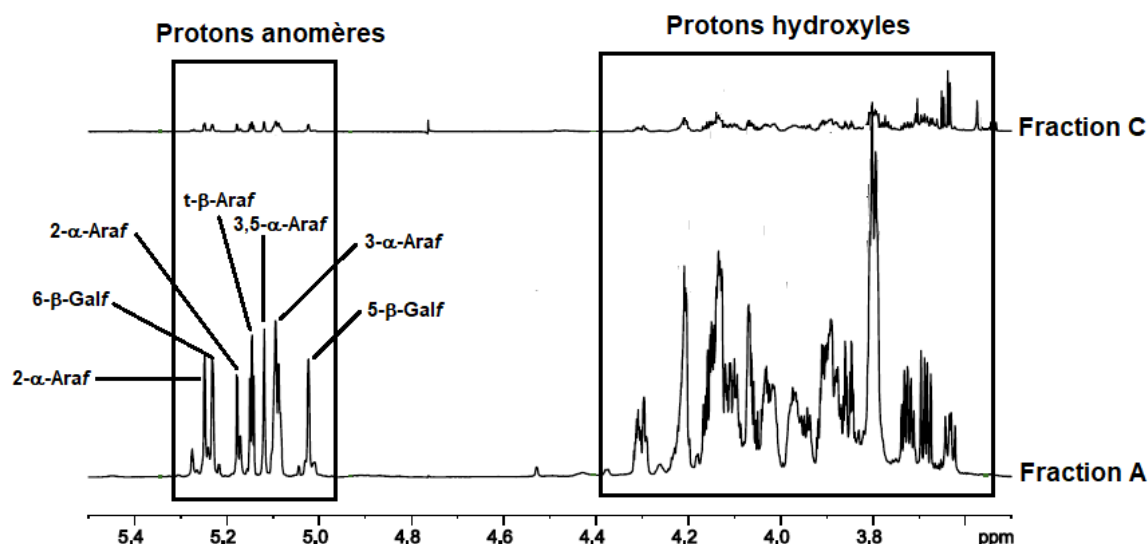


Figure V.11. Spectres RMN 1D ^1H de la fraction A (900MHz) et C (800 MHz).

De manière générale, le spectre RMN ^1H de la fraction C n'a pas donné de signaux interprétables. Pour la fraction A en revanche, de nombreux signaux d'intérêt sont ressortis du spectre associé. Le spectre reporté sur la Figure V.11 a été zoomé sur les pics les plus importants. On y trouve aux alentours des 4 ppm les protons hydroxyles des cycles monosaccharidiques et entre 4,8 et 5,5ppm les protons anomères. Grâce aux tables d'identification, il est alors possible d'attribuer les différents signaux des protons anomères et ces derniers correspondent bien à ce qui présent dans l'AG. En effet, des résidus caractéristiques de l'AG complet soit 2- α -Araf, 3- α -Araf, 3,5- α -Araf, t- α -Araf, 5- β -Galf et 6- β -Galf ont bien été retrouvés.

D'autres analyses RMN ont été effectuées sur cette fraction A et notamment de la RMN 2D ^1H - ^1H COSY90 (non reporté) pour les corrélations homonucléaires $^3\text{J}_{\text{H,H}}$ et 2D ^1H - ^{13}C HSQC (Figure V.12) pour les corrélations hétéronucléaires $^1\text{J}_{\text{C,H}}$. A l'aide de la table des déplacements chimiques du ^1H et du ^{13}C spécifiques de l'AG figurant dans la publication de Lee RE *et al.* de 2005 [497], l'identification des différents résidus Galf et Araf, leur anomérie et les carbones impliqués dans les liaisons entre les monosaccharides a pu être effectuée. Ainsi, pour la

fraction A, les mêmes résidus que ceux provenant du spectre ^1H ont été retrouvés sur le spectre ^1H - ^{13}C HSQC.

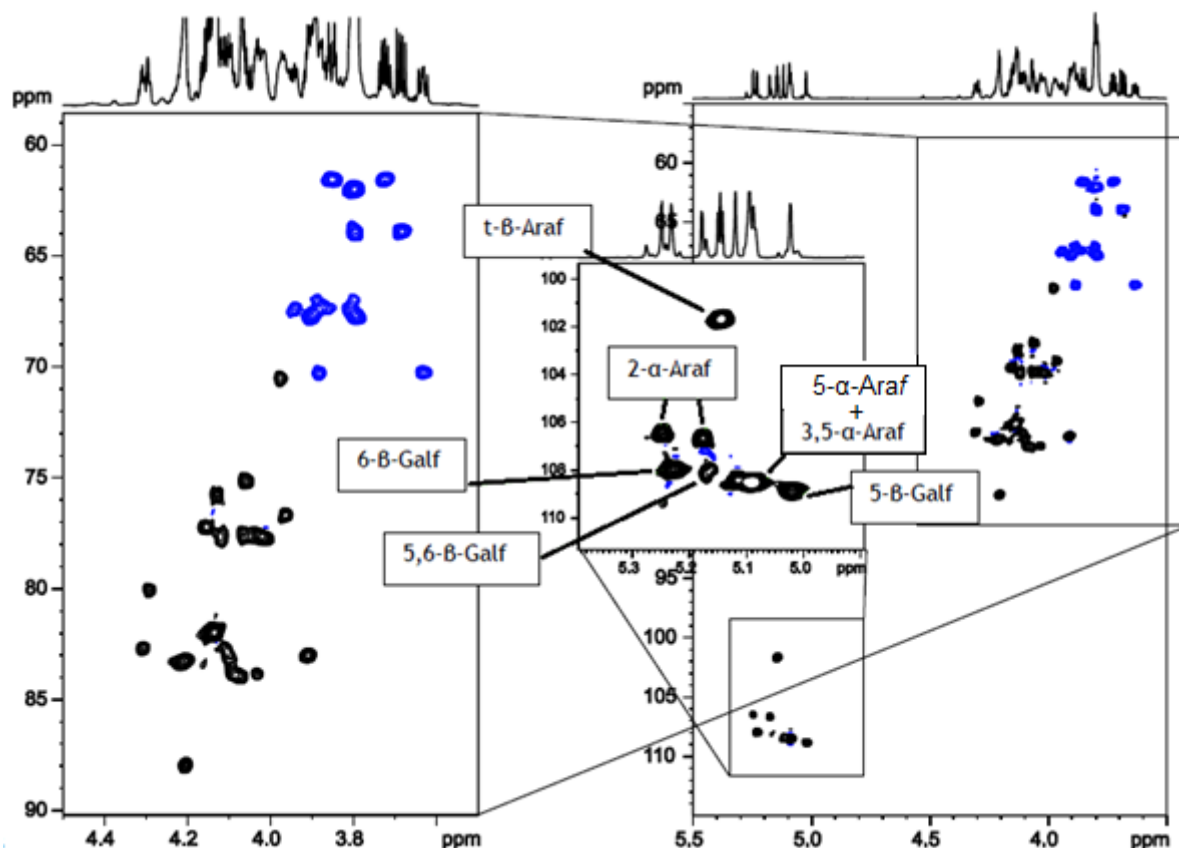


Figure V.12. Spectre RMN 2D ^1H - ^{13}C HSQC de la fraction A (900MHz).

Les informations fournies par la fraction A en RMN vont être d'une aide précieuse pour l'analyse de la fraction d'intérêt B2 car tous les signaux caractéristiques de l'AG complet ont été visualisés sur les différents spectres acquis. Ainsi, il sera plus simple d'attribuer les signaux contenus dans la fraction B2 et de confirmer les structures hypothétiques des fragments incomplets d'AG émises à partir de la spectrométrie de masse.

La fraction B2 a été soumise aux mêmes analyses RMN que la fraction A, à savoir la RMN 1D ^1H mais aussi 2D ^1H - ^1H COSY90 et ^1H - ^{13}C HSQC. Seul le spectre HSQC a ici été reporté sur la Figure V.13 et les différents signaux ont été comparés à ceux qui avaient été obtenus pour l'AG complet de la fraction A. On retrouve sur ce spectre les résidus glycaniques contenus dans les structures L-Gal₈-Ara₄₋₉. Malheureusement, la présence de traces d'AG complet ne nous permet pas de conclure avec certitude. En effet, la présence de t-β-Araf n'est pas cohérente avec la structure proposée puisqu'il s'agit du résidu retrouvé en bout de chaîne arabinane. Ils peuvent provenir soit de l'AG complet ou alors peut être des chaînes arabinanes libres retrouvées sur le spectre MALDI-TOF/TOF. Il est également possible que les AG

incomplets soient composés de chaînes arabinanes courtes de séquences différentes de celles des AG complets.

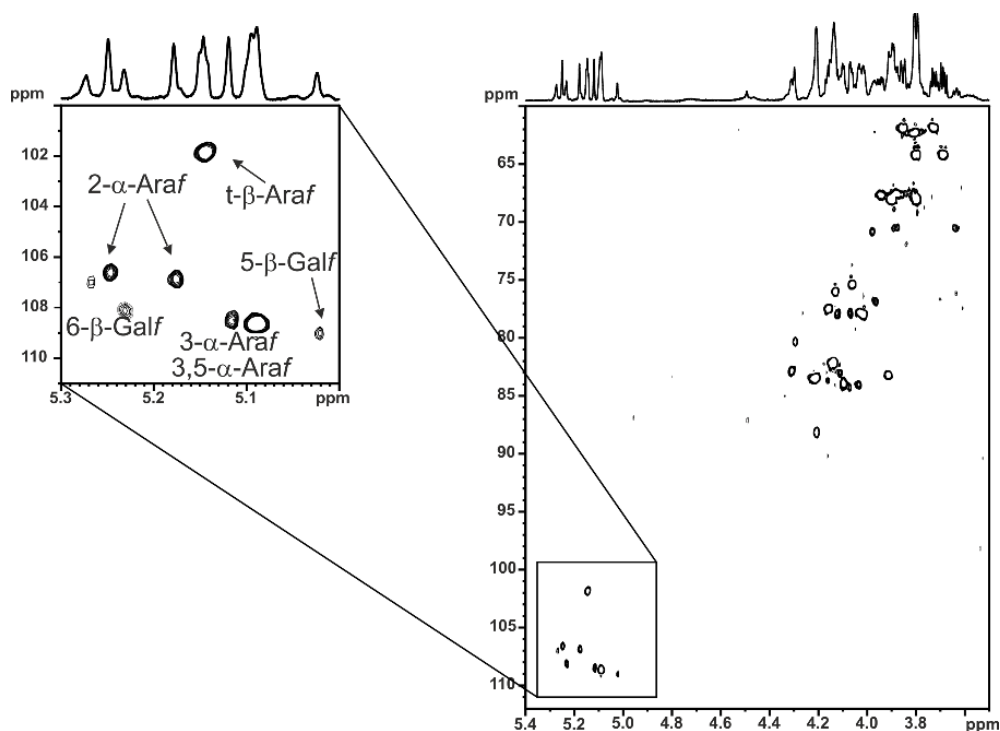


Figure V.13. Spectre RMN 2D ^1H - ^{13}C HSQC de la fraction B2 (800MHz).

En conclusion de cette partie, la chromatographie de gel-filtration sur Toyopearl-HW40 à partir de l'AG total a permis d'isoler une fraction contenant des fragments incomplets d'AG intéressant. La spectrométrie de masse MALDI-TOF/TOF avec perméthylation au ICH_3 et ICD_3 appliquées sur cette fraction a révélé la présence notamment de deux ensembles de fragments. L'exploitation des résultats nous a alors d'identifier un ensemble de fragments dont la structure de base est *Linker-Gal₈-Ara₄₋₉*. La RMN n'a pas pu apporter d'informations complémentaires sur ces structures car des traces d'AG complet notamment étaient encore présentes.

L'ensemble des techniques d'analyse effectuées à ce stade de l'étude ne nous ont donc pas permis d'établir une structure finale pour le deuxième ensemble de fragments. Il a alors été nécessaire d'améliorer dans un premier temps la purification de la fraction B2 afin d'isoler ces deux ensembles de fragments d'intérêt et d'éliminer l'AG complet et les chaînes de pentoses libres.

L'objectif a donc été d'identifier sans ambiguïté les résidus glycaniques des fragments incomplets d'AG (par chromatographie en phase gazeuse après méthanolyse et dérivation), leur anomérie et leur branchement par RMN 1D et 2D. Avec une purification, il est également envisageable de quantifier de manière relative les résidus glycaniques par RMN 1D et par

GC-MS en fixant comme référence unitaire le résidu Rha ou GlcNAc par exemple ou de faire un rapport Ara/Gal.

Enfin, les investigations ont été reprises sur *M. smegmatis* en parallèle à celles de *M. bovis* BCG dans le but d'obtenir une vision globale de la présence de ces structures sur deux espèces de mycobactéries aux caractéristiques bien distinctes (vitesse de croissance, caractère pathogène, ...). De plus, *M. smegmatis* est la mycobactérie de référence si la poursuite du travail nécessite une approche génomique.

III) Optimisation de la séparation des fragments incomplets d'AG et analyses complémentaires

L'objectif pour cette troisième partie a été de purifier les fragments incomplets d'AG de sorte à ne plus retrouver d'AG complet. En effet, les fragments incomplets d'AG doivent être exempts de toute contamination pour réaliser une quantification par RMN.

Au départ, l'idée a été de réaliser des purifications successives par gel-filtration en utilisant différents support et notamment Toyopearl-HW40 mais aussi Sephacryl-S200 HR. Ce dernier a déjà été mentionné dans le chapitre précédent mais s'est avéré moins résolutif que la colonne Toyopearl-HW40 dans ce cas. Le fait d'effectuer plusieurs séparations ne s'est pas montré concluant non plus car des pertes importantes ont été constatées après plusieurs purifications.

Pour éviter ces pertes de matériel, un support Bio-Gel P10 à basse pression a de ce fait été envisagé en espérant une meilleure séparation malgré le temps d'analyse environ 10 fois plus long dû au faible débit. Son domaine de fractionnement compris entre 1500 et 20 000 Da (protéines globulaires) en fait en tout cas déjà un support de choix dans le cadre de l'étude sur les fragments incomplets. Les fractions ont été directement analysées en HPAEC-PAD afin de déterminer les différentes régions de l'AG séparées. Quelques exemples de chromatogrammes les plus significatifs ont ainsi été reportés sur la Figure V.14A.

Les résultats observés sur ces chromatogrammes se sont montrés très intéressants avec une séparation à priori plus optimisée qu'avec le support Toyopearl-HW40. La même séparation a alors été menée sur l'espèce *M. smegmatis* et des chromatogrammes similaires ont été observés comme témoigne la Figure V.14B.

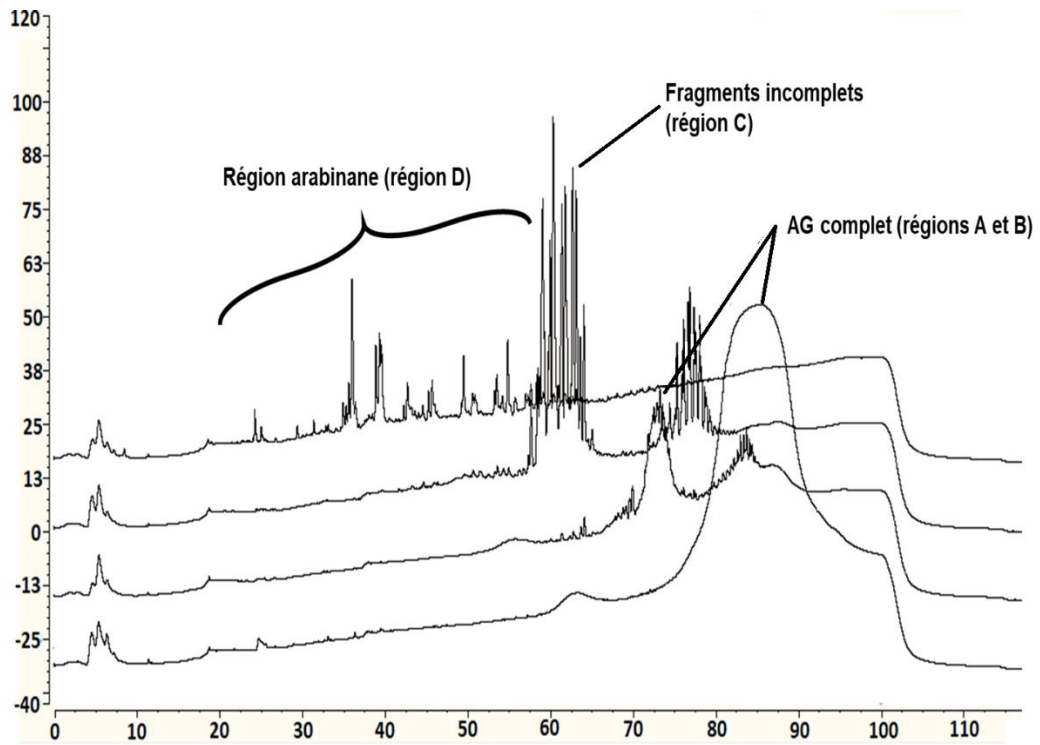
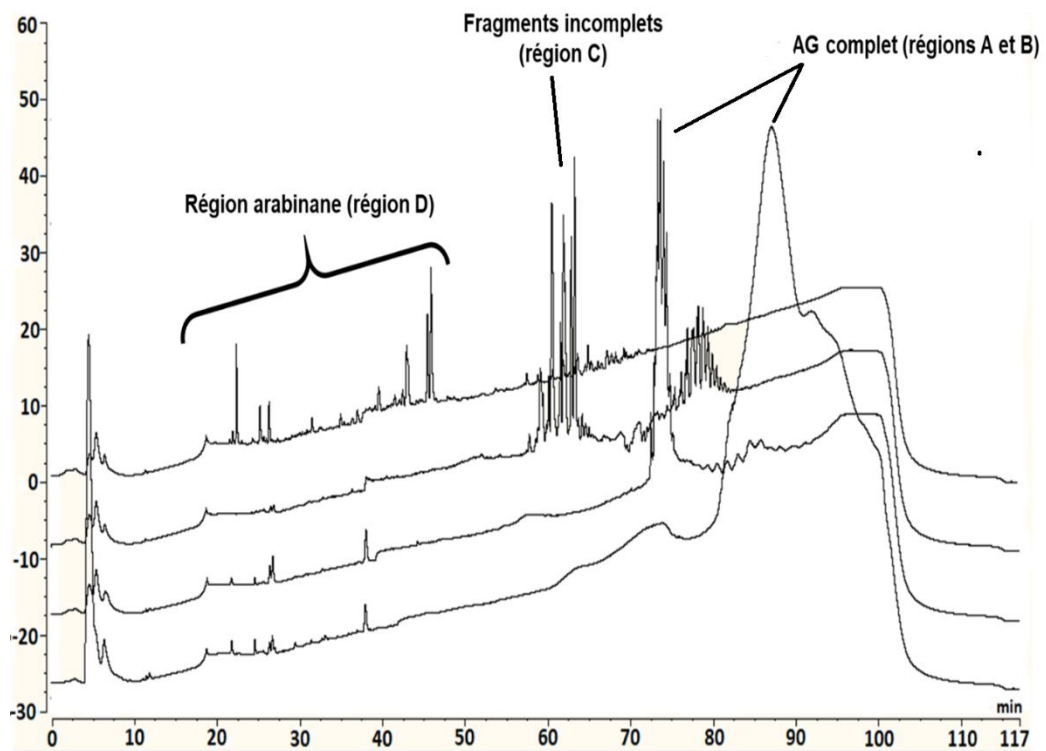
A**B**

Figure V.14. Chromatogrammes HPAEC obtenus après purification de l'AG total de *M. bovis* BCG. (A) et *M. smegmatis* (B). Seules les fractions les plus pertinentes ont été représentées ici.

Quatre régions distinctes ont été identifiées dans les chromatogrammes, que ce soit pour *M. smegmatis* ou *M. bovis* BCG où les profils sont finalement similaires. On a une première région A s'apparentant à l'AG complet pur puis une seconde région B constituée de la seconde partie de l'AG complet. Ensuite, on retrouve dans la 3^e région C les fragments incomplets d'AG potentiels. Enfin, une dernière région D a également été visualisée avec des fragments plus petits, probablement d'arabinane si l'on compare avec les précédents résultats. Les fractions ont comme précédemment été réunies en fonction de leurs profils respectifs puis lyophilisées. La région C a ensuite été perméthylée puis analysée en spectrométrie de masse MALDI-TOF/TOF. Le spectre de masse de cette région chez *M. bovis* BCG a été représenté sur la Figure V.15.

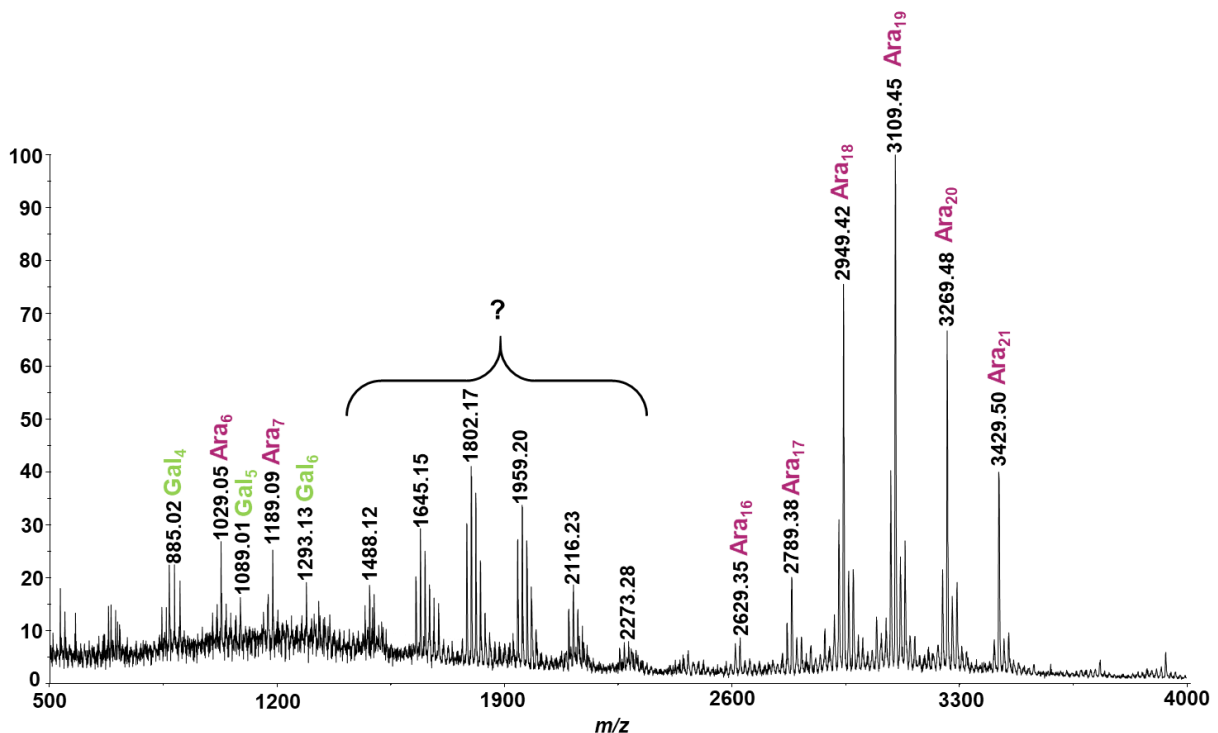


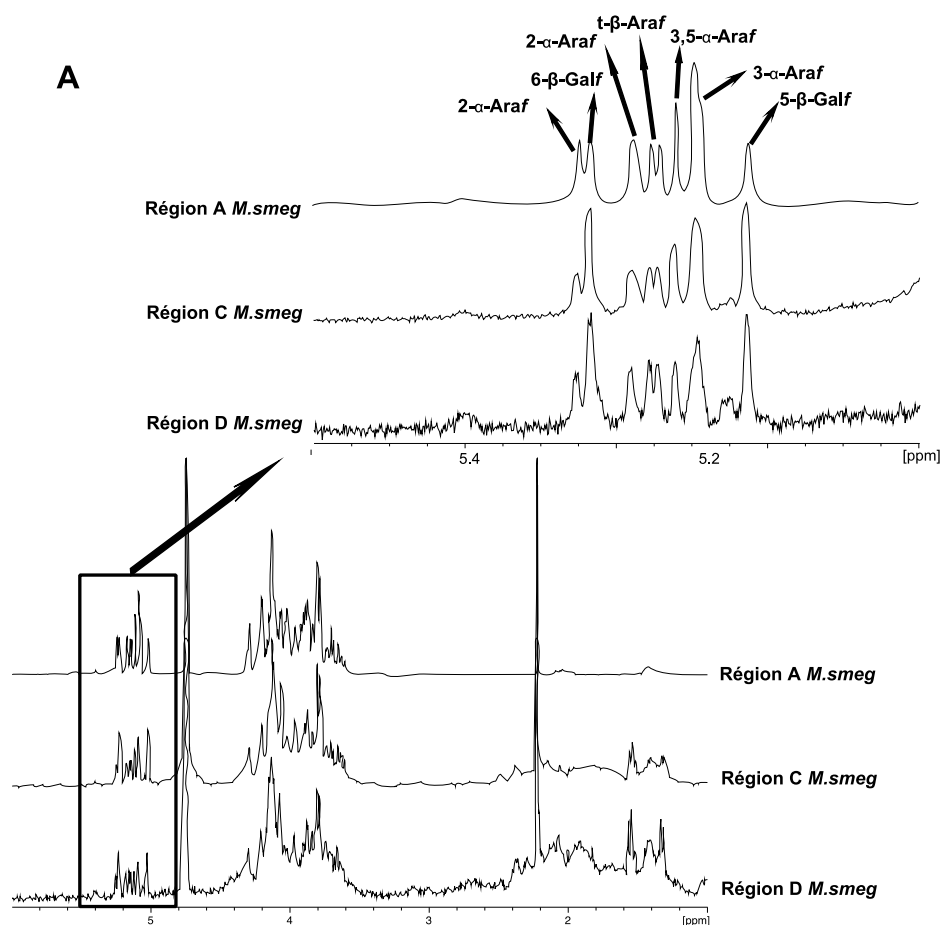
Figure V.15. Spectre de masse MALDI-TOF/TOF MS de la fraction C perméthylée de *M. bovis* BCG après gel-filtration sur P10 à basse pression.

Contrairement à ce qu'on avait l'habitude d'observer, on ne retrouve pas ici la structure qui avait été proposée précédemment, à savoir L-Gal₈-Ara₄₋₉. Malgré les 3 régions toujours bien distinctes sur le spectre de masse avec notamment les deux gaussiennes, les *m/z* ne sont plus les mêmes et s'apparentent ici à des chaînes arabinane allant jusqu'à l'Ara₂₁ et galactane (Gal₄₋₆). La piste de la dégradation a alors été envisagée et celle-ci a pu se produire lors de la séparation sur P10 au vu des résultats qui se sont d'ailleurs montrés similaires pour *M. smegmatis*.

Pour vérifier si une dégradation ne s'est pas produite, de l'AG total de *M. bovis* BCG a été purifié sur support Toyopearl-HW40 pour reprendre les conditions initiales. Malheureusement, aucun changement n'a été observé par rapport aux résultats obtenus sur support P10. Tous les échantillons perméthylés ont également été analysés sur un autre spectromètre de masse MALDI-QIT-TOF récemment acquis au sein du laboratoire mais sans succès.

Les résultats de spectrométrie de masse n'étant pas convaincants, nous avons décidé d'effectuer quelques analyses RMN sur le 400 MHz en 1D ^1H sur les différentes régions collectées (hormis la région B qui était redondante avec la région A de l'AG complet). Les spectres ont été représentés sur la Figure V.16.

De manière générale, les profils sont similaires mais on remarque que le ratio entre le galactose et l'arabinose n'est pas le même en fonction des régions, que ce soit pour *M. smegmatis* ou *M. bovis* BCG. Le Tableau V.3 récapitule les différents ratios Gal/Ara obtenus sur chaque spectre à partir de l'aire totale de tous les galactoses sur tous les arabinoses impliqués. L'aire totale du galactose a ensuite été ramenée à 1 pour plus de clarté.



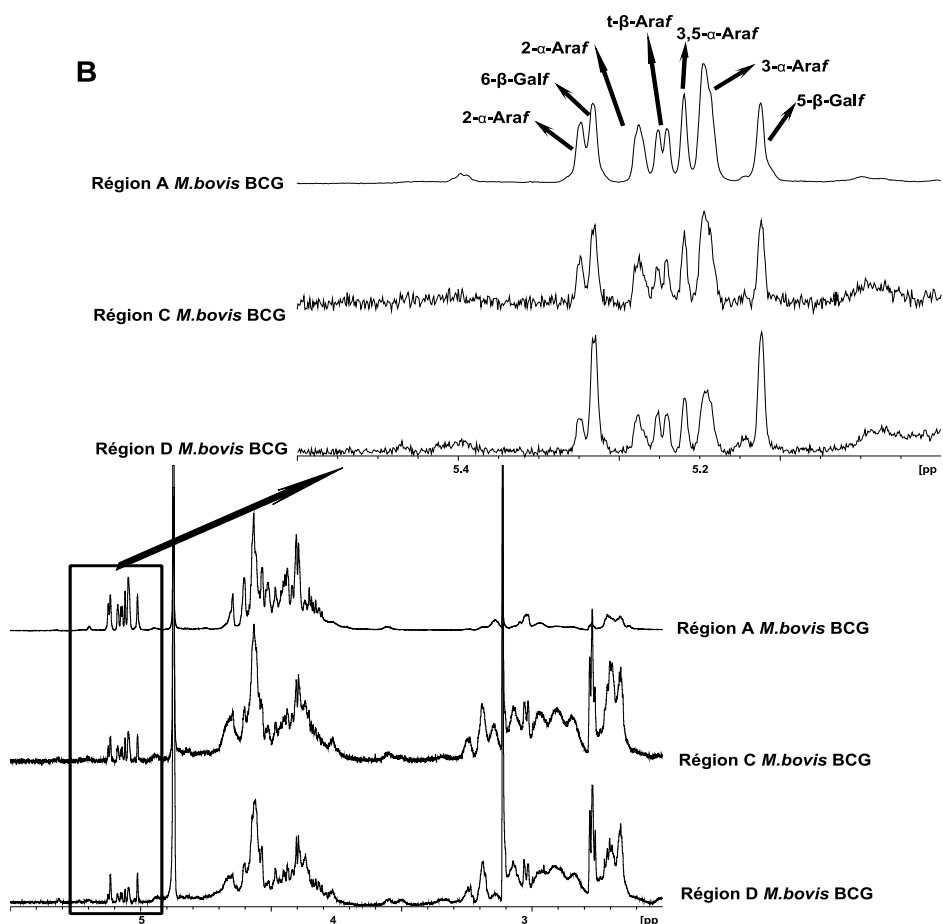


Figure V.16. Spectres RMN 400MHZ 1D ^1H obtenus suite à la séparation de l'AG total de *M. smegmatis* et *M. bovis* BCG par gel-filtration sur P10 à basse pression. Un zoom sur les signaux des protons anomères est également visible.

Tableau V.3. Ratios entre le Galactose et l'Arabinose issus des spectres RMN 400 MHz ^1H pour chaque région analysée sur les espèces *M. smegmatis* et *M. bovis* BCG.

	Ratios Aires Gal/Ara	
	<i>M.smeg.</i>	<i>M.bovis</i> BCG
Région A	1 : 3,9	1 : 2,81
Région C	1 : 1,8	1 : 2,52
Région D	1 : 1,17	1 : 1,17

On s'aperçoit que le taux de galactose est beaucoup plus élevé dans la fraction contenant les fragments incomplets (région C) comparé à celui observé dans la fraction contenant l'AG complet pur (région A) chez *M. smegmatis*. En revanche, dans *M. bovis* BCG, le taux d'arabinose entre ces deux régions par rapport au galactose est quasiment identique. Cela s'explique sûrement en partie par les concentrations entre l'AG complet et les fragments incomplets qui ne sont pas normalisés comme en témoigne les spectres où l'intensité du signal reste relativement faible pour la région C des AG tronqués.

Des traces d'AG complet semblent également encore présentes dans la fraction C des fragments incomplets et une purification plus complète doit être effectuée afin de réaliser une quantification plus fine en RMN.

Conclusions et perspectives

Au vu des différents résultats présentés, ce chapitre sur l'identification des structures incomplètes d'AG peut finalement se diviser en deux phases.

La première d'entre elle concerne les essais qui ont été réalisés sur l'AG total de *M. bovis* BCG uniquement. En se basant sur une étude préliminaire à l'ANR ayant montré que l'AG total purifié comportait de l'AG complet, c'est-à-dire en corrélation avec la littérature mais aussi des AG de plus petites tailles dont les structures n'ont jamais été étudiées, des analyses structurales ont été menées pendant le projet de thèse. En effet, ces AG tronqués peuvent très bien provenir d'une voie d'anabolisme encore inconnue et sont donc dans la continuité de cette partie de la thèse portant sur le catabolisme de la paroi mycobactérienne.

Après avoir écarté l'hypothèse d'une dégradation lors de la purification de l'AG total, les différents composants de ce dernier ont été séparés par chromatographie d'exclusion stérique. Des fractions d'intérêts ont alors été collectées et analysées par spectrométrie de masse MALDI-TOF/TOF et RMN. L'ensemble des résultats obtenus a permis de faire ressortir principalement des structures L-Gal₈-Ara₄₋₉ et qui s'apparente bien à des fragments incomplets d'AG.

Si l'on reprend maintenant ce qui a été décrit dans la littérature sur la structure de l'AG, les chaînes d'arabinane viennent se greffer sur les galactoses en position 8, 10 et 12 de la chaîne galactane. Les structures incomplètes qui ont été proposées sont composées de huit résidus de galactose où viennent s'ajouter ensuite les résidus d'arabinose ce qui est ainsi bien en concordance avec la structure que l'on retrouve dans la littérature (Figure V.16). En revanche, il a également été établi que les trois chaînes d'arabinane se placent sur la chaîne galactane une fois la biosynthèse de cette dernière achevée. Cet aspect n'est donc pas corrélé avec la structure qui a été trouvée dans laquelle des résidus d'arabinose se sont déjà greffés à la chaîne galactane encore incomplète et composée uniquement de huit résidus de galactose.

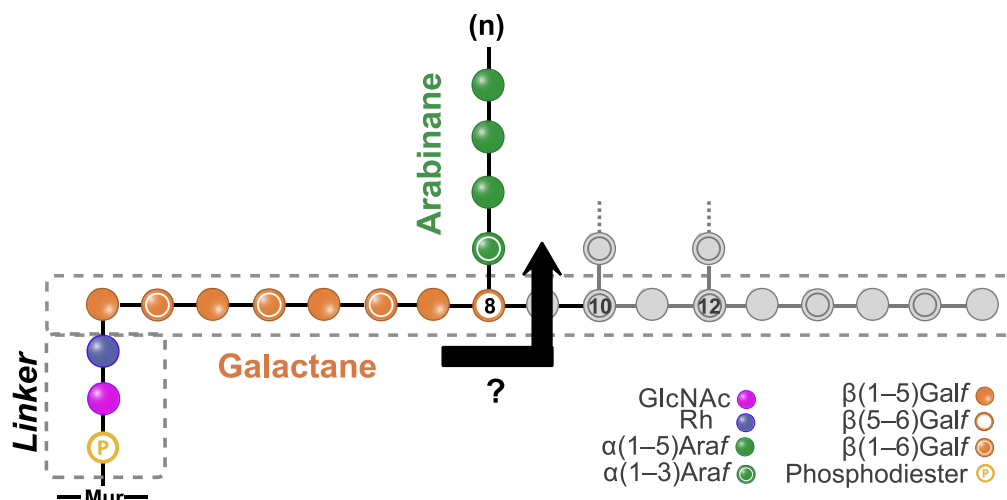


Figure V.16. Structure des fragments d'AG retrouvés en spectrométrie de masse et leur lien avec la description de l'AG dans la littérature.

A partir de ces données, on peut alors imaginer deux scénarios : soit ces structures proviennent d'une nouvelle voie de biosynthèse encore inconnue soit d'un remodelage/catabolisme de l'AG faisant intervenir des glycosidases spécifiques qui viendraient couper la chaîne galactane juste en amont des branchements avec les chaînes arabinanes.

Avant de s'intéresser à cet aspect, il a fallu confirmer les structures qui ont été envisagées par de nouvelles purifications d'AG total provenant de *M. bovis* BCG mais aussi de *M. smegmatis*. Pour réaliser des analyses plus détaillées notamment pour de la quantification relative en RMN, il était également nécessaire d'améliorer la séparation et de purifier au maximum la fraction d'intérêt afin de la rendre exempt de toute contamination, que ce soit par l'AG complet ou de chaînes d'arabinose libres.

Si la séparation a pu être optimisée grâce notamment à l'utilisation d'un support BioGel P10 à basse pression, les analyses qui ont suivies n'ont pas été à la hauteur des attentes et principalement en ce qui concerne la spectrométrie de masse. En effet, les structures préalablement trouvées n'ont pas été observées dans ce cas pour les deux espèces malgré des profils globaux très similaires avec les deux gaussiennes bien présentes mais des structures s'apparentant maintenant à des fragments d'arabinane et de galactane. Les protocoles de départ ont alors été repris mais sans plus de réussite.

Pour les analyses RMN, des premières quantifications ont été effectuées grâce à une meilleure purification mais malheureusement, quelques traces d'AG subsistaient encore.

Suite aux nouvelles investigations menées sur les fragments incomplets d'AG, il n'est donc pas possible de conclure définitivement. Si les premières structures proposées sont très prometteuses, elles n'ont pour le moment pas été retrouvées et notamment en spectrométrie de masse. Il est pourtant clair que ces structures existent puisqu'elles ont été mises en avant selon plusieurs analyses différentes. La première hypothèse a alors été de se demander si des soucis techniques en spectrométrie de masse n'étaient pas la cause de ces pertes. Des analyses sur d'autres spectromètres de masse et notamment sur MALDI-QIT n'ont pas donné plus de résultats. Nous avons alors fait appel à l'expertise de l'équipe du Pr. Khoo (*Academia Sinica*, Taipei, Taïwan) afin de vérifier de manière certaine cette hypothèse. Les mêmes chaînes libres de galactose et d'arabinose ont été observées prouvant ainsi que le problème ne se situe pas au niveau de la spectrométrie de masse.

S'agit-il alors d'un problème en amont des analyses, peut être au niveau des cultures de mycobactéries qui rendraient plus fragiles ces fragments et qui pourraient se dégrader ? C'est vers ces pistes qu'il faudra se pencher pour la suite de l'étude afin de retrouver les

premières structures d'AG tronqué. Pour faire le lien avec le chapitre précédent, l'enzyme endo- β -(1 \rightarrow 5)-galactofuranohydrolase de *P. brevis* qui a été identifiée pourra également être utilisée sur les fragments incomplets isolés afin de vérifier que celle-ci est bien active sur ces derniers.

Il conviendra enfin d'isoler ces fragments des dernières traces d'AG complet qui persistent encore. Il sera alors possible à partir de là de mettre au point des expériences permettant d'éclaircir la question de la biosynthèse ou du catabolisme. S'il s'avère qu'ils proviennent du catabolisme, alors de nouvelles enzymes pourraient être identifiées dans ce processus et notamment de potentielles glycosidases. Des inhibiteurs pourraient de ce fait voir le jour pour des traitements anti-tuberculeux novateurs.

Si en revanche il s'agit d'une nouvelle voie de biosynthèse, un sujet à part pourrait émerger car aucune découverte de voies alternatives n'a été faite à ce jour concernant ce versant. Cela pourrait ainsi venir bouleverser l'ordre établi selon lequel les chaînes d'arabinane viennent se greffer à la chaîne galactane de l'AG une fois la synthèse de cette dernière terminée.

Matériels et méthodes

I) Culture des mycobactéries

I.1) Préparation des milieux de culture

- Milieu Middlebrok 7H9 : dans un flacon à stériliser de 1 L, ajouter 4,7g de Middlebrook 7H9 en poudre (Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA) / 2,5 mL de tyloxapol à 20 % v/v / 10 mL de glycérol à 50 % v/v et ajuster le volume à 900 mL avec de l'eau désionisée. Stériliser à 120 °C pendant 10 min en autoclave. Après stérilisation, ajouter 100 mL d'OADC (*Oleic Albumin Dextrose Catalase*) déjà stérilisé sous Poste de Sécurité Microbiologique (PSM).

- Milieu Sauton liquide : dans un flacon à stériliser de 1 L, ajouter 0,5 g de KH_2PO_4 / 0,5 g de MgSO_4 / 4 g de L-asparagine / 2 g d'acide citrique / 50 mg de citrate d'ammonium ferrique / 60 mL de glycérol / 100 μL de ZnSO_4 à 1 % p/v et ajuster le volume avec 900 mL d'eau désionisée puis le pH à 7. Stériliser à 120 °C pendant 10 min en autoclave. Ajouter 2,5 mL de Tween 80 à 20 % v/v après stérilisation sur membrane de 0,22 μm sous PSM.

I.2) Culture mycobactérienne en milieu liquide

Les cultures sont réalisées en milieu liquide à partir d'une solution glycérol stock de 1 mL. *M. smegmatis* a été cultivée dans du milieu 7H9 et OADC puis a ensuite été cultivée exclusivement dans du milieu Sauton. L'espèce *M. bovis* BCG a quant à elle également été cultivée en milieu Sauton.

Tout d'abord, la solution stock est transférée dans un flacon de culture de 25 cm² avec 4 mL de milieu de culture. Lorsque l'absorbance à 600 nm (A_{600}) est mesurée aux alentours de 3 (c'est-à-dire en phase stationnaire), la culture est diluée dans un nouveau flacon de culture plus important de 75 cm² pour revenir à une absorbance se situant entre 0,6 et 0,8. La même opération est ensuite réalisée en passant cette fois-ci à un flacon de culture de 175 cm² correspondant à la taille de flaconnage maximale à avoir été utilisée. Les mycobactéries sont alors divisées par la suite lorsque l' A_{600} se situe en phase stationnaire et le restant de culture est centrifugé à 4000 tr.min⁻¹ pendant 10 min à 4 °C. Le culot contenant les mycobactéries est alors repris dans du tampon PBS 1 X pour lavage. Enfin, après une nouvelle centrifugation, le culot mycobactérien est conservé à -20°C pour purification ultérieure.

Les absorbances ont été mesurées en cuve de 1 cm de trajet optique sur un spectrophotomètre Jasco V-630 Bio (Jasco International CO. Ltd., Tokyo, Japon).

II) Purification de l'arabinogalactane mycobactérien

II.1) Lyse des mycobactéries

Les mycobactéries provenant du culot conservé à -20 °C sont tout d'abord lysées. Pour ce faire, environ 5 g de culot est repris dans 20 mL de tampon de lyse composé de 2 mM MgCl₂ et 2 mM de DTT (Dithiothréitol) dans du PBS 1 X. Les cellules sont ensuite lysées par presse de French (2 passages à 1650 psi) ou par Emulsiflex.

Une fois les cellules lysées, celles-ci sont centrifugées à 14 000 tr.min⁻¹ pendant 30 min à 4 °C après transfert dans des tubes en polypropylène de 30 mL qui peuvent supporter jusqu'à 50 000 x g. Le culot C1 résultant de cette centrifugation sert pour la suite des manipulations et le surnageant S1 a été stocké à -20 °C et correspond au lysat protéique soluble total mycobactérien.

II.2) Extraction des protéines membranaires et obtention du complexe mycolyl-arabinogalactane-peptidoglycane

Le culot issu de la lyse est repris dans un tampon d'extraction composé de 2 % v/v de Triton X-100 dans du PBS 1 X pour une extraction sur roller pendant une nuit à 4°C. Suite à cette extraction, l'échantillon est centrifugé à 14 000 tr.min⁻¹ (rotor Beckman JA-20) pendant 30 min toujours dans les tubes en polypropylène de 30 mL. Le surnageant S2 découlant de cette centrifugation contient les LAMs, LMs et PIMs mais n'a pas été utilisé dans le cadre du projet de thèse. Le culot C2 en revanche est nécessaire pour les étapes suivantes de purification de l'AG.

Ce culot C2 est transféré dans un tube en verre (Corex 8445) de 30 mL après ajout d'un second tampon d'extraction constitué de 2 % de SDS p/v dans du PBS 1 X car des chauffages sont réalisés lors de cette étape. Trois extractions successives sont ainsi effectuées à 95 °C pendant 1 h avec entre chaque extraction une centrifugation à 10 000 tr.min⁻¹ (rotor Beckman JA-20) pendant 30 min pour reprendre le culot dans du tampon neuf.

Enfin, le culot est lavé dans l'eau puis dans un mélange 80 % acétone/20 % H₂O v/v et pour terminer dans 100 % d'acétone. Ce dernier est alors séché pour donner le mAGP.

II.3) Isolement de l'arabinogalactane total

Le mAGP obtenu est dans un premier temps soumis à une saponification des acides mycoliques par du KOH à 2 % p/v dans le toluène/méthanol 1:1 pendant 48 h à 70 °C sous

agitation et reflux. Une centrifugation à 10 000 tr.min⁻¹ (rotor Beckman JA-20) pendant 30 min à 20 °C dans des tubes en verre suite à cette saponification permet de distinguer le surnageant contenant les esters méthyliques d'acides mycoliques qui n'ont pas été conservés du culot constitué de l'AGP.

Ce dernier est repris dans 2 M de NaOH pour une lyse alcaline à 80 °C sous agitation pendant 16 h. Une centrifugation dans les mêmes conditions que celles employées précédemment permet de récupérer l'AG total dans le surnageant et le PG dans le culot qui n'a pas été gardé non plus. Par la suite, seule l'étape de la lyse alcaline a été effectuée directement sur le mAGP sans passer par l'étape de saponification pour arriver à l'AG total. En effet, les acides mycoliques n'ayant pas été utilisés, la première lyse plus douce qui permet de les récupérer spécifiquement a pu être enlevée.

Après la lyse alcaline, il convient de neutraliser le surnageant avec de l'HCl puis une nouvelle centrifugation est réalisée pour éliminer les dernières traces de PG. Enfin, l'AG est dialysé sur membrane de 1 kDa pendant 3 jours avec un changement d'eau Ultrapure toutes les demi-journées puis il est lyophilisé pour récupérer environ 60 mg d'AG total purifié en moyenne en partant d'un culot humide de 5 g de mycobactéries.

II.4) Séparation des différents composants de l'arabinogalactane total

Pour la séparation de l'AG complet des fragments incomplets, des chromatographies d'exclusion stérique (ou gels filtration) sont effectuées sur deux types de support différents avec les programmes suivants :

- Toyopearl HW-40 (Tosoh Bioscience, Tokyo, Japon) : colonne de 30 mL (25 x 1,2 cm) utilisée à un débit de 0,5 mL/min en eau Ultrapure. L'équilibration de la colonne est réalisée sur 1 CV (*Column Volume*) et l'élution sur 1,2 CV avec un suivi par mesure de l'absorbance à 215 et 280 nm. Les fractions sont récupérées dans une plaque 96 puits avec 500 µL dans chaque fraction soit 72 fractions collectées au total.

- Sephacryl-S200 HR (GE Healthcare, Chicago, Illinois, USA) : colonne de 20 mL (25 x 1 cm) avec un débit de 0,5 mL/min en eau Ultrapure. L'équilibration de la colonne est réalisée sur 1 CV et l'élution sur 1,2 CV avec un suivi par mesure de l'absorbance à 215 et 280 nm. Les fractions sont récupérées dans une plaque 96 puits avec 500 µL dans chaque fraction soit 48 fractions collectées au total.

III) Purification du lysat protéique soluble totale de *M. smegmatis*

III.1) Chromatographies d'exclusion stérique

Pour la première et troisième étape de purification du lysat protéique soluble total de *M. smegmatis*, deux supports différents sont requis :

- Sephacryl-S200 HR : Les conditions sont les mêmes que celles décrites ci-dessus pour la séparation de l'AG total mais le tampon utilisé ici est du tampon phosphate à 20 mM pH7,4 avec 0,05 % de Tween 80 v/v pour une meilleure solubilité des protéines.

- Superdex 75 (GE Healthcare, Chicago, Illinois, USA) : Comme les autres gels filtration, un programme isocratique est créé avec ici un débit de 1 mL/min en tampon phosphate 20 mM pH 7,4 avec du Tween 80 0,05 % v/v pour un volume total de colonne de 120 mL (60 x 1,6 cm). L'équilibration de la colonne est réalisée sur 1 CV et l'élution sur 1,2 CV avec un suivi par mesure de l'absorbance à 215 et 280 nm. Les fractions sont récupérées dans une plaque 96 puits avec 2 mL dans chaque fraction soit 72 fractions collectées au total.

III.2) Chromatographie échangeuse d'anions

Le support privilégié pour la seconde étape de purification du lysat total est la MonoQ GL 5/50 (GE Healthcare, Chicago, Illinois, USA). Deux tampons sont préparés pour réaliser un gradient d'élution avec les compositions suivantes : Tampon A : TrisHCl 20 mM pH 8 / Tampon B : TrisHCl 20 mM et NaCl 1 M pH 8. Le débit choisi pour toute l'analyse est de 1 mL/min.

Le programme se déroule ensuite comme suit :

- équilibration de la colonne : 5 CV à 100 % de tampon A;
 - chargement de l'échantillon par la boucle d'injection : 20 mL;
 - lavage des protéines non retenues : 2 CV à 100 % de tampon A;
 - élution des protéines : 20 CV selon un gradient linéaire pour atteindre 100 % de tampon B;
- Les fractions sont collectées durant cette élution avec un volume de 2 mL pour chacune d'entre elles soit 40 fractions recueillies au total;
- lavage de la colonne : 5 CV à 100 % de tampon B;
 - rééquilibration de la colonne : 5 CV à 100 % de tampon A.

III.3) Fractionnement subcellulaire des protéines mycobactériennes

Le fractionnement des protéines se fait à partir du surnageant S1 (lysate protéique soluble) issu de la lyse cellulaire des mycobactéries mais aussi du culot C1.

Le surnageant S1 est soumis à deux ultracentrifugations sur un appareillage Optima-XE-90 (Beckman Coulter, Brea, Californie, USA) à 100 000 x g de 3 h chacune à l'aide d'un rotor

Beckman SW41 TI. Les deux surnageants en découlant contiennent les protéines cytosoliques.

Le culot total provenant des ultracentrifugations est quant à lui repris dans 4 % de Triton X-114 (v/v) dans du tampon PBS 1 X puis mis sous agitation douce à 4 °C pendant 2 h. L'opération est répétée une seconde fois et les surnageants sont rassemblés puis placés à l'étuve pendant 15 min à 37 °C pour extraction. La phase aqueuse contient les protéines membranaires hydrophiles et la phase au Triton X-114 se compose des protéines membranaires hydrophobes.

Le culot C1 est exposé au même protocole que pour les protéines membranaires avec l'extraction au Triton X-114. La phase aqueuse est constituée ici des protéines de la paroi hydrophiles et la phase au détergent Triton X-114 contient les protéines de la paroi hydrophobes.

IV) Production et purification de protéines recombinantes

Pour cette production, il est important de distinguer les candidates potentielles à la fonction arabinase commandés auprès de la firme GeneCust et l'enzyme de *P. brevis* fourni par l'équipe du Dr. William Helbert et dont le protocole ne démarre qu'à partir de la section IV.3.

IV.1) Amplification des plasmides

Les différents plasmides sont reçus sous forme lyophilisés avec plusieurs étiquettes contenues dans le vecteur d'expression pET-32a d'*E. coli* (Trx-Tag / S-Tag / Poly-His) et ils sont tous ampicilline-résistants. Ces plasmides sont tout d'abord amplifiés selon le protocole qui va être décrit ci-après. Les plasmides qui sont reçus sous forme lyophilisée sont centrifugés à 13 000 tr.min⁻¹ (rotor Beckman JA-20) pendant 1 min avant d'être repris dans 20 µL de tampon TE (TrisEDTA 1 mM à pH 8). Un µL de chaque est ensuite transféré dans un tube de 1,5 mL dans lequel est ajouté 2 µL d'eau Ultrapure suivi de 90 µL de bactéries compétentes XL-1 *blue* d'*E.coli* contenues dans une solution glycérol stock. Le mélange réactionnel est alors laissé dans la glace pendant 10 min puis placé à 42 °C pendant 45 s sans agitation pour transformer la bactérie compétente avec le plasmide et enfin remis dans la glace pendant 10 min. Six cents µL de milieu LB (*Lysogeny Broth*) sont ensuite ajoutés et le tout est placé à 37 °C pendant 45 min avec agitation à 160 tr.min⁻¹.

Deux cents µL du mélange final est prélevé pour réaliser une culture en fiole de 250 mL et le restant est déposé sur boîte LB-Agar ampicilline résistante. Pour la culture en fiole, 100 mL de milieu LB ainsi que 100 µL d'une solution à 100 mg/mL d'ampicilline dans l'eau sont ajoutés et le tout est incubé à 37 °C 160 tr.min⁻¹ sur une nuit.

La préparation du milieu LB liquide s'effectue en mélangeant 10 g de tryptone, 10 g de NaCl et 5 g d'extrait de levure dans 1L de volume finale complété avec de l'eau désionisée. Pour le LB-Agar, la même préparation est réalisée mais en y ajoutant 12 à 15 g/L d'Agar. Les deux milieux sont ensuite autoclavés à 120°C pendant 20 min. Pour le LB-Agar, il faut le couler dans des boîtes de Pétri avec l'antibiotique adéquate (100 µg/mL pour l'ampicilline) lorsqu'il est encore chaud puisqu'il se solidifie à froid.

IV.2) Purification de l'ADN plasmidique

Les 100 mL de la culture en fiole issus du protocole précédent sont utilisés pour purification de l'ADN du plasmide. Pour ce faire, le kit NucleoBond® Xtra plasmid purification (Macherey-Nagel, Düren, Allemagne) a été utilisé en suivant le protocole *Midi* du fabricant associé. En fin de protocole, 160 µL de plasmide dans du tampon TE est obtenu et les concentrations sont mesurées grâce au spectrophotomètre NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA).

IV.3) Induction de l'expression des protéines recombinantes

Avant de passer à l'induction, le même protocole que celui utilisé pour la multiplication du plasmide est reproduit sur 1 µL de plasmide purifié et en utilisant d'autres souches de bactéries compétentes comme les BL-21, C41, C43 ou encore *Shuffle* d'*E. coli*. De plus, seule la culture sur boîte de Pétri est effectuée en fin de protocole sur les 680 µL d'échantillon. C'est à partir de ce point que le plasmide de l'enzyme de *P. brevis* a été travaillé car ce dernier a été reçu directement sur boîte de Pétri. Le vecteur d'expression contient quant à lui uniquement une étiquette 6His minimale. La bactérie compétente utilisée pour l'induction a également différé puisqu'il s'agit de Rosetta pLysS d'*E.coli* qui est un dérivé de BL-21 et le plasmide est ici kanamycine/chloramphénicol résistant.

Dans tous les cas, à partir de la culture sur boîte de Pétri, les inductions ont été lancées avec les contrôles associés en suivant le protocole décrit ci-dessous :

- préparation des échantillons contrôles (non induits) : 1 à 2 colonies sont prélevées sur la boîte de Pétri et transférées dans une flasque de culture de 5 mL contenant 1 mL de milieu LB (+ 1 µL de kanamycine à 50 mg/mL dans l'eau et 1 µL de chloramphénicol à 34 mg/mL dans l'éthanol pour le plasmide de l'enzyme de *P. brevis* ou 1 µL d'ampicilline à 100 mg/mL dans l'eau pour les autres plasmides) avant une remise en culture à 37 °C pendant 2 à 3 h à 160 tr.min⁻¹. L'A₆₀₀ est ensuite mesurée et doit idéalement se situer entre 0,5 et 0,8 puis le rapport 100/A₆₀₀ est réalisé pour connaître le volume à prélever en µL et ainsi préparer 2 à 3 aliquotes dans des tubes de 1,5 mL. Enfin, ces tubes sont centrifugés 5 min à 13 000 tr.min⁻¹

(rotor Beckman JA-20) et le surnageant est éliminé. Le culot est conservé à -20 °C pour un dépôt sur gel SDS-PAGE ultérieur [498];

- échantillons issus de l'induction de l'expression des protéines : 1 à 2 colonies sont prélevées sur la boîte de Pétri et transférées dans une flasque de culture de 5 mL contenant 1 mL de milieu AIM (*Auto Induction Medium*) (+ 2 µL de la solution mère à 1000 X du ou des antibiotique(s) correspondant(s)) avant une remise en culture à 37 °C pendant 2 à 3 h à 160 tr.min⁻¹. Une centrifugation est alors réalisée à 3900 tr.min⁻¹ (rotor Eppendorf A-4-44) pendant 10 min à 4 °C et le surnageant est éliminé. Le culot est transféré dans un tube à centrifuger de 50 mL grâce à 10 mL de milieu AIM et le tout est remis en culture pendant une nuit à 37 °C 160 tr.min⁻¹. L'A₆₀₀ est ensuite mesurée puis le rapport 100/A₆₀₀ est effectué pour connaître le volume à prélever en µL et ainsi préparer 2 à 3 aliquotes dans des tubes de 1,5 mL (le restant est centrifugé à 3900 tr.min⁻¹ (rotor Eppendorf A-4-44) pendant 10 min à 4°C et le culot est conservé à -20°C pour être utilisé ultérieurement). Enfin, ces tubes sont centrifugés 5 min à 13 000 tr.min⁻¹ et le surnageant est éliminé. Le culot est conservé à -20 °C pour un dépôt sur gel SDS-PAGE ultérieur.

Il est à noter que pour tous les antibiotiques utilisés, une solution mère à 1000 X est toujours préparée et que 0,1 % du volume final de la solution à préparer est ensuite prélevé afin de se retrouver avec une concentration finale en antibiotique à 1 X (soit 100 µg/mL pour l'ampicilline, 500 µg/mL pour la kanamycine et 340 µg/mL pour le chloramphénicol).

La préparation du milieu AIM utilisée pour l'induction de l'expression des différentes protéines s'effectue en mélangeant 10 g de tryptone, 5 g d'extrait de levure, 3,3 g de (NH₄)₂SO₄, 6,8 g de KH₂PO₄, 7,1 g de Na₂HPO₄ (.2H₂O), 0,5 g de glucose, 2 g de lactose et 0,15 g de MgSO₄ (.7H₂O) dans un flacon Schott de 1 L complété avec de l'eau désionisée jusqu'au 1L. Le milieu est ensuite autoclavé à 120°C pendant 20 min.

En parallèle à ces inductions, des solutions glycérol stock sont réalisées à partir des cultures sur boîte de Pétri en prélevant 1 à 2 colonies pour les transférer dans une flasque de culture de 5 mL contenant 2 mL de milieu LB (+ 3 µL de l'antibiotique correspondant à 1000 X). Le tout est ensuite incubé à 37°C pendant 8 h à 160 tr.min⁻¹ avant d'y ajouter 1 mL de glycérol stérile. Enfin, 3 aliquotes sont préparés dans des flacons de 1,8 mL contenant chacun 1 mL de la culture afin d'être conservés à -80°C.

IV.4) Electrophorèse SDS-PAGE

Les échantillons induits ainsi que les contrôles non induits sont analysés par électrophorèse SDS-PAGE. Pour ce faire, les échantillons sont repris dans 15 µL d'eau Ultrapure et 5 µL de tampon Laemmli 4 X. Ils sont ensuite agités au vortex puis centrifugés à

13 000 tr.min⁻¹ pendant 3 min. Enfin, les échantillons sont chauffés à 95 °C pendant 5 min avant d'être déposés sur un gel SDS-PAGE 10% (1 mm d'espace entre les plaques).

IV.5) Lyse des bactéries compétentes

Lors de l'induction, le restant du culot provenant de la culture en milieu AIM conservé à -20 °C est utilisé pour réaliser la lyse des bactéries. Cette lyse est effectuée après reprise du culot dans 7 mL de tampon PBS 1 X et transfert dans un tube à centrifuger de 15 mL par sonication (10 min, 0,5 s de pulse et 0,5 s de repos à 95% de puissance).

Une fois lysées, les cellules sont centrifugées à 3900 tr.min⁻¹ pendant 10 min à 4°C. Le culot contenant les protéines insolubles est repris dans 1 mL d'eau Ultrapure et 20 µL de la solution est transféré dans un tube de 1,5 mL pour centrifugation à 13 000 tr.min⁻¹ (rotor Beckman JA-20) pendant 3 min. Le culot est alors déposé sur gel SDS-PAGE selon le protocole décrit ci-dessus.

Quarante µL du surnageant contenant les protéines solubles est quant à lui transféré dans un eppendorf dans lequel est ajouté 40 µL de TCA à 100 % p/v pour précipiter les protéines à -20°C pendant 10 min. Après centrifugation à 3900 tr.min⁻¹ (rotor Eppendorf A-4-44) pendant 10 min à 4 °C, le surnageant est éliminé et le culot est lavé 2 à 3 fois à l'acétone. Enfin, ce culot est déposé sur SDS-PAGE toujours selon le même protocole.

IV.6) Expression des protéines recombinantes pour purification

Pour purifier les protéines recombinantes, il faut au préalable réaliser une culture à plus grande échelle afin de récupérer un maximum de matériel. Pour ce faire, deux pré-cultures sont lancées sur la journée dans des tubes à centrifuger de 50 mL en partant d'une à deux colonies sur boîte de Pétri et en y ajoutant 10 mL de milieu AIM (et 20 µL de l'antibiotique associé) pour incubation à 37°C et 160 tr.min⁻¹. En fin de journée, les deux tubes sont centrifugés à 3900 tr.min⁻¹ (rotor Eppendorf A-4-44) pendant 10 min et les culots sont repris dans du nouveau milieu AIM. Ensuite, ces derniers sont transférés dans une fiole de 5 L contenant 1 L de milieu AIM au total (et 2 mL de l'antibiotique correspondant) pour incubation une nuit à 37°C 160 tr.min⁻¹. Le lendemain, la culture est centrifugée à 5000 tr.min⁻¹ pendant 30 min dans des bouchons spécifiques pour rotor JLA 8.1000.

Le culot est transféré dans un tube à centrifuger de 50 mL pour une seconde centrifugation à 3900 tr.min⁻¹ (rotor Eppendorf A-4-44) pendant 10 min à 4°C dans 20 mL de tampon PBS 1 X. Une lyse est alors effectuée par sonication selon les conditions décrites ci-dessus après reprise du culot dans du tampon PBS 1 X frais. Une dernière centrifugation est réalisée à 3900 tr.min⁻¹ (rotor Eppendorf A-4-44) pendant 10 min à 4°C pour ne garder que le surnageant contenant les protéines solubles.

Enfin, ce surnageant est soumis à une chromatographie IMAC sur système Äkta Start (GE healthcare, Chicago, Illinois, USA) pour purification de la protéine recombinante d'intérêt possédant une chaîne poly-His selon le protocole de la partie suivante.

IV.7) Purification des protéines recombinantes par chromatographie IMAC

Préparation des tampons :

- tampon A (tampon de lavage) : 500 mM de NaCl, 20 mM d'imidazole et 0,05% (v/v) de Tween 20 sont ajoutés dans du tampon phosphate 20 mM pH 7,4 pour un volume total de 1L;
- tampon B (tampon d'éluion) : 500 mM de NaCl, 250 mM d'imidazole et 0,05% (v/v) de Tween 20 sont ajoutés dans du tampon phosphate 20 mM pH 7,4 pour un volume total de 50 mL;
- tampon de dessalage : 150 mM de NaCl et 0,1 % (p/v) de NaN₃ sont ajoutés dans du tampon TrisHCl 40 mM pH 7,4 pour un volume total de 250 mL.

La première étape requiert un support HiTrap HP de 5 mL (GE healthcare, Chicago, Illinois, USA) utilisée à un débit de 1 mL/min selon le programme suivant :

- équilibration de la colonne : 5 mL du tampon A et 5 mL du tampon B;
- chargement de l'échantillon : en général environ 40 mL en utilisant l'injection par la pompe.
- lavage de la colonne : 10 CV à 100 % de tampon A;
- volume d'éluion isocratique : 5 CV à 100 % de tampon B avec collecte des fractions dans des eppendorfs de 1,5 mL (1 mL de l'éluat dans chaque fraction);
- rééquilibration de la colonne : 5 CV à 100 % de tampon A.

Les fractions d'intérêt sont assemblées puis soumises à une seconde purification sur support HiTrap HP de 1 mL en utilisant les mêmes paramètres que la première purification mais avec 15 CV de lavage de colonne au lieu de 10 et les fractions sont collectées par volume de 500 µL par tube. Les fractions positives sont également réunies mais cette fois-ci par deux pour arriver à un volume de 1 mL.

La dernière étape consiste à dessaler les fractions à l'aide du support *Desalting HiTrap* 5 mL (GE healthcare, Chicago, Illinois, USA) et du tampon de dessalage. Le programme est déjà préétabli et l'injection se fait ici par la boucle (1 mL). Enfin, les différentes fractions positives sont réunies contenant l'enzyme d'intérêt purifiée et dessalée.

IV.8) Dosage des protéines par le test BCA (*Bicinchoninic Acid*)

Tous les dosages protéiques ont été effectués par la méthode micro BCA sur microplaque 96 puits. Tout d'abord, une gamme étalon d'albumine de sérum bovin (SAB) est réalisée comme décrit dans le tableau ci-dessous :

SAB à 500 µg/mL (uL)	Tampon PBS 1 X (uL)	Concentration finale en SAB (ug/mL)
0	100	0
5	95	25
10	90	50
20	80	100
40	60	200
60	40	300
80	20	400
100	0	500

Ensuite, le réactif colorimétrique pour le dosage est préparé à partir du kit *Micro BCA™ Protein Assay* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) en suivant le protocole du fabricant.

Dans chaque puit, 25 µL de la solution étalon à doser est déposée avec 200 µL de réactif en triplicata. De la même manière, la solution protéique dont on souhaite connaître la concentration est également déposée selon plusieurs dilutions. La microplaque est enfin incubée à 37 °C pendant 30 min et une lecture de l'absorbance est effectuée à 562 nm.

V) Méthodes analytiques

V.1) HPAEC-PAD

Les analyses HPAEC-PAD ont nécessité l'utilisation de deux tampons avec la composition suivante : Tampon A : NaOH 100 mM et tampon B : NaOH 100 mM + AcNa 1 M. Ensuite, un gradient est réalisé sur colonne PA-200 (3 mm x 250 mm) avec colonne de garde PA-200 (3 mm x 50 mm) selon le programme suivant :

- de 0 à 58 min : 100 % de tampon A à 0,250 mL/min;
- de 58 à 88 min : 60 % de tampon A / 40 % de tampon B à 0,250 mL/min;
- de 88 à 95 min : 20 % de tampon A / 80 % de tampon B à 0,250 mL/min;
- de 95 à 115 min : Retour à 100 % de tampon A à 0,250 mL/min;
- de 115 à 117 min : Passage à 0,050 mL/min toujours à 100 % de tampon A.

Les produits issus de la chromatographie peuvent être collectés grâce à un système de collecte automatique par temps de rétention ou par pic.

V.2) Spectrométrie de masse (MS)

Les échantillons sont analysés de manière native ou sont perméthylés toujours selon la méthode de Ciucanu et Kerek [213] avant l'analyse par spectrométrie de masse.

Les échantillons natifs ou perméthylés sont ensuite mélangés à une matrice d'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (10 mg/mL dissout dans un mélange ACN/H₂O (1:1 v/v)) puis déposés sur une plaque MALDI. Les analyses sont menées sur un spectromètre de masse MALDI TOF/TOF ABI 4800 (Applied Biosystems, Foster City, Californie, USA) ou par MALDI-QIT-TOF

(Shimadzu, Kyoto, Japon). Les spectromètres opèrent en mode réflectron positif et pour chaque spectre, 5000 impacts laser sont accumulés. Les spectres de masse sont retraités par le logiciel Data Explorer® d'Applied Biosystems pour le TOF/TOF et par le logiciel Shimadzu Biotech MALDI MS pour le QIT-TOF.

V.3) Résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les analyses RMN sont acquises sur plusieurs spectromètres différents selon les expériences :

- un spectromètre Bruker Avance II 400 MHz (Bruker, Billerica, Massachusetts, USA) équipé d'une sonde BBO de 5 mm résonant à 400 MHz pour le ^1H et 100,6 MHz pour le ^{13}C ;
- un spectromètre Bruker Avance III 800 MHz équipé d'une sonde BBI résonant à 800 MHz pour le ^1H et à 201,2 MHz pour le ^{13}C ;
- un spectromètre Bruker Avance III 900 MHz avec une sonde BBO résonant à 900 MHz pour le ^1H et à 226,3 MHz pour le ^{13}C .

Les échantillons sont dissouts dans 500 μL de $^2\text{H}_2\text{O}$ (99,96 % ^2H , Eurisotop®) et les expériences RMN sont réalisées à 293 K. Les déplacements chimiques du ^1H sont exprimés en ppm et sont corrélés au signal méthyl de l'acétone (δ ^1H 2,225 ppm et δ ^{13}C 31,55 ppm) utilisé comme standard interne. Enfin, les expériences ^1H - ^1H COSY 90 et ^1H - ^{13}C HSQC sont effectuées en utilisant des séquences standard de Bruker et optimisées pour chaque analyse.

V.4) Chromatographie en phase gazeuse (GC)

V.4.a) Dérivation des échantillons

Les glycanes doivent être dérivés pour les rendre volatils en effectuant une perméthylation comme décrit précédemment, par triméthylsilylation (TMS) ou encore par la méthode des itols-acétates.

La dérivation au TMS se compose de 3 étapes :

- 1- méthanolyse : 0,5 à 5 μg de glycanes sont lyophilisés dans un tube en verre avec un bouchon en téflon et 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de mésoinositol sont ajoutés comme standard interne. Les glycanes sont méthanolysés dans 500 μL de méthanol/HCl 0,5 M anhydre et chauffés à 80°C pendant 24 h;
- 2- N-réacétylation : cette étape est nécessaire uniquement si le glycanne comporte des groupements N-acétylés. Après refroidissement, la solution est neutralisée par addition à la pointe de spatule du carbonate d'argent $\text{Ag}_2\text{CO}_3^{4-}$ jusqu'à pH 6-7. Les molécules sont N-réacétylées par 20 μL d'anhydride acétique pur pendant une nuit à température ambiante à

l'obscurité. Le tube est centrifugé à 2000 x g pendant 5 min de manière à sédimenter le carbonate d'argent. Le surnageant est transféré dans un tube pyrex à bouchon téflon; 3- silylation : 10 µL de pyridine et 20 µL de BSTFA (bis-silyl-trifluoroacétamide) sont ajoutés puis les monosaccharides sont dérivés pendant 2 h à température ambiante pour injection en GC.

La méthode des itols-acétates se décompose quant à elle en 4 étapes :

1- hydrolyse : 5 à 10 µg de glycanes sont lyophilisés avec 10 µL d'une solution à 1 mg/mL de mésoinositol comme standard interne. 1 mL d'ATFA 4M sont ajoutés puis après agitation, l'échantillon est chauffé à 100°C pendant 4 h. Ce dernier est ensuite évaporé sous courant d'azote et le restant d'ATFA est co-distillé 4 fois avec du méthanol puis mis dans un dessiccateur sous vide en présence de soude ou de P₂O₅;

2- réduction : 0,5 mL d'une solution à 10 mg/mL de NaBH₄ ou NaBD₄ dans l'ammoniaque 1 M est ajouté et l'échantillon est laissé 4 h à température ambiante. La réduction est arrêtée par quelques gouttes d'acide acétique pur jusqu'à arrêt du bullage (le pH doit également être acide). L'échantillon est alors séché sous courant d'azote puis placé sous dessiccateur une nuit;

3- co-distillation des borates de méthyl : 1 à 2 mL de méthanol/acide acétique 10 % est ajouté puis l'ensemble est évaporé à sec sous courant d'azote. Cette opération est répétée 3 fois et une dernière évaporation est réalisée par 1 mL de méthanol pur;

4- péracétylation : 0,5 mL d'anhydride acétique est ajouté et l'échantillon est agité puis mis à 100 °C pendant 4 h. Une évaporation est ensuite effectuée sous azote sans excès car les glycanes sont très volatils à ce stade. Une extraction au chloroforme est réalisée suivie de 4 lavages à l'eau Ultrapure. La phase chloroformique est enfin transvasée dans un tube de type vial et séchée sous azote avant d'être reprise par 20 à 50 µL de chloroforme pour analyse en GC;

V.4.b) Analyses en GC et GC-MS

Le même type d'appareillage que pour les analyses du pan de thèse *Candida* sont utilisées ici.

Pour les glycanes dérivés au TMS, le programme chromatographique démarre à 120 °C avec un gradient de température à 2 °C/min jusqu'à 240 °C suivi d'un palier de 10 min à cette température. Pour les glycanes dérivés avec la méthode des itols-acétates, le programme commence à 120 °C avec un gradient de température à 3 °C/min jusqu'à 230 °C puis d'un second gradient à 10 °C/min pour atteindre 270 °C et enfin d'un palier à 270 °C pendant 10 min.

ANNEXE 1

**Tableau récapitulatif des analyses LC-MS
issues de la première campagne de purification
de l'arabinase de *M. smegmatis***

Le tableau présenté dans cette Annexe 1 contient les différentes informations issues des analyses LC-MS qui ont été réalisées par la Plateforme de Protéomique et Peptides Modifiés P3M de l'Institut Pasteur de Lille lors de la première campagne de purification de l'endo-D-arabinase chez *M. smegmatis*.

Les échantillons qui ont été fournis pour ces analyses se sont composés de trois fractions provenant du lysat protéique total soluble de *M. smegmatis* préalablement purifié par gel-filtration puis par chromatographie échangeuse d'anions. La fraction 1D8 est la fraction contenant la majorité de l'activité endo-D-arabinase identifiée et constitue donc la fraction d'intérêt; la fraction 1D4 est une fraction adjacente à 1D8 ne possédant aucune activité endo-D-arabinase (fraction contrôle négatif) et la fraction 1D10 est également une fraction adjacente à 1D8 mais possédant une faible activité endo-D-arabinase (fraction contrôle positif).

Les analyses de ces fractions a permis d'établir un score de pertinence et les protéines identifiées dans la fraction d'intérêt ont été classées dans le tableau reporté ci-dessous en fonction de ce score.

Deux cents quarante huit protéines ont ainsi été retenues grâce à ce système de score et ont été soumises à un travail bioinformatique afin de sélectionner 5 candidates potentielles à la fonction endo-D-arabinase (encadrées en rouge dans le tableau)

Protein name	Annotation UniProtKB	Protein accession numbers	Protein molecular weight (Da)	pI	Protein Name	Symbol	Total number of peptide		Percentage of sequence coverage		Number of shared peptide		Total number of spectrum		Total number of spectrum		1D8/ID10 +	1D8/(mox1 D4-1D10)	1D8/ID10 +	Function	GO terms	Process
							1D4-1D8	1D10+	1D4-1D8	1D10+	1D4-1D8	1D10+	1D4-1D8	1D10+	1D4-1D8	1D10+						
Enoyl-CoA hydratase OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700884 / mc2115) GN=MSMEG_4709 PE=3 SV=1	*	t1AAR1D1 AAR1D1_MYCS2	25 570	5.68	ADR1D1_MYCS2	MSMEG_4709	12	0	67%	0	37	0.5	37	0.5	37	74	74	74	GO:0003824: catalytic activity	GO:0008152: metabolic process	GO:0008152: metabolic process	
Uncharacterized protein OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700884 / mc2115) GN=MSMEG_4347 PE=4 SV=1	*	t1AAR0D4 AAR0D4_MYCS2	39 834	6.15	ADR0D4_MYCS2	MSMEG_4347	15	0	58%	0	29	0.5	29	0.5	29	58	58	58	GO:0008168: methyltransferase activity	GO:0032259: methylation	GO:0032259: methylation	
Bacterial extracellular solute-binding protein, family protein 5 OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700884 / mc2115) GN=MSMEG_4999 PE=4 SV=1	*	t1AAR261 AAR261_MYCS2	61 077	4.92	ADR261_MYCS2	MSMEG_4999	16	0	48%	0	29	0.5	29	0.5	29	58	58	58	GO:0043199: ATP-binding cassette (ABC) transporter complex	GO:0055985: transmembrane transport	GO:0055985: transmembrane transport	
Tryptophan-tRNA ligase OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700884 / mc2115) GN=trpS PE=3 SV=1	**	t1AAR326 AAR326_MYCS2	36 810	6	AAR326_MYCS2	trpS	1	16	4%	60%	4%	0	0	1	55	1	55	1	GO:000168: nucleotide binding	GO:0006412: translation	GO:0006412: translation	
Carnitiny-CoA dehydratase OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700884 / mc2115) GN=MSMEG_5198 PE=3 SV=1	*	t1AAR206 AAR206_MYCS2	27 924	5.39	AAR206_MYCS2	MSMEG_5198	14	0	65%	0	27	0.5	27	0.5	27	54	54	54	GO:0003824: catalytic activity	GO:0008152: metabolic process	GO:0008152: metabolic process	
4-oxalotransaminase OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700884 / mc2115) GN=MSMEG_3279 PE=4 SV=1	*	t1AAR091 AAR091_MYCS2	15 959	5.57			8	0	73%	6	25	0.5	25	0.5	25	50	50	50				
Translation initiation inhibitor OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700884 / mc2115) GN=MSMEG_264 PE=4 SV=1	*	t1AAR056 AAR056_MYCS2	16 003	6.19			6	1	68%	9%	0	0	37	1	0.5	37	74	49	37			
Enoyl-CoA hydratase OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700884 / mc2115) GN=MSMEG_2641 PE=1 SV=1	*	t1AAR060 AAR060_MYCS2	26 979	5.27	AAR060_MYCS2	MSMEG_2641	11	0	46%	0	20	0.5	20	0.5	20	40	40	40	GO:0003824: catalytic activity	GO:0008152: metabolic process	GO:0008152: metabolic process	
Cis-3-chloroacetic acid dehalogenase, putative OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700884 / mc2115) GN=MSMEG_3339 PE=4 SV=1	*	t1AAR088 AAR088_MYCS2	16 931	5.82			6	0	62%	6	20	0.5	20	0.5	20	40	40	40				
Pyridoxamine 5'-phosphate oxidase family protein OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700884 / mc2115) GN=MSMEG_6526 PE=4 SV=1	*	t1AAR61 AAR61_MYCS2	15 761	6.13	AAR61_MYCS2	MSMEG_6526	4	0	64%	0	19	0.5	19	0.5	19	38	38	38	GO:0048037: cofactor binding			
DegN family protein OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700884 / mc2115) GN=MSMEG_457 PE=4 SV=1	*	t1AAR108 AAR108_MYCS2	29 185	5.92			1	12	68%	0	1	28	1	28	0.5	28	37	37				
Uncharacterized protein OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700884 / mc2115) GN=MSMEG_2032 PE=1 SV=1	*	t1AAR006 AAR006_MYCS2	27 681	5.64			1	9	6%	49%	5%	0	0	1	37	1	37	37				
Transcription elongation factor GreA OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700884 / mc2115) GN=greA PE=1 SV=1	**	sp1AAR2X1 GREA_MYCS2	18 005	4.57	GREA_MYCS2	greA	1	9	7%	72%	6%	0	0	1	36	1	36	36	GO:000351: transcription, DNA-templated	GO:000635: regulation of transcription, DNA-templated	GO:000635: regulation of transcription, DNA-templated	
Glyoxalase family protein OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700884 / mc2115) GN=MSMEG_0608 PE=3 SV=1	*	t1AAR030 AAR030_MYCS2	21 696	5.27	AAR030_MYCS2	MSMEG_0608	5	0	48%	0	18	0.5	18	0.5	18	36	36	36	GO:000824: catalytic activity	GO:0008152: metabolic process	GO:0008152: metabolic process	
Transcription elongation factor OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700884 / mc2115) GN=MSMEG_6292 PE=4 SV=1	*	t1AAR523 AAR523_MYCS2	17 076	4.76	AAR523_MYCS2	MSMEG_6292	7	0	73%	0	18	0.5	18	0.5	18	36	36	36	GO:000374: regulation of DNA-templated transcription, elongation	GO:000635: regulation of transcription, DNA-templated	GO:000635: regulation of transcription, DNA-templated	
Enoyl-CoA hydratase OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700884 / mc2115) GN=MSMEG_5913 PE=4 SV=1	*	t1AAR403 AAR403_MYCS2	28 573	5.42	AAR403_MYCS2	MSMEG_5913	11	1	58%	5%	0	0	25	1	0.5	25	1	33	25	GO:000677: DNA binding	GO:000374: regulation of DNA-templated transcription, elongation	GO:000374: regulation of DNA-templated transcription, elongation
Uridyl-DNA-glycosylase OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700884 / mc2115) GN=MSMEG_4933 PE=4 SV=1	**	t1AAR076 AAR076_MYCS2	29 634	8.82			8	0	38%	0	15	0.5	15	0.5	15	30	30	30	GO:0003824: catalytic activity	GO:0008152: metabolic process	GO:0008152: metabolic process	
Methylhydroxymethylase AhpD core OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700884 / mc2115) GN=MSMEG_5319 PE=4 SV=1	**	t1AAR327 AAR327_MYCS2	16 038	5.69	AAR327_MYCS2	MSMEG_5319	7	0	62%	0	13	0.5	13	0.5	13	26	26	26	GO:000601: peroxidase activity	GO:0005114: oxidation-reduction process	GO:0005114: oxidation-reduction process	
Antidioxidant 3 OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700884 / mc2115) GN=MSMEG_0263 PE=4 SV=1	*	t1AAR040 AAR040_MYCS2	45 394	5.79	AAR040_MYCS2	MSMEG_0263	14	1	44%	4%	0	0	19	1	0.5	19	1	38	19	GO:001649: oxidoreductase activity	GO:0008689: cellular oxidant detoxification	GO:0008689: cellular oxidant detoxification
Response regulator receiver domain protein OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700884 / mc2115) GN=MSMEG_3246 PE=4 SV=1	*	t1AAR5M4 AAR5M4_MYCS2	16 537	6.08			1	10	9%	71%	7%	0	0	1	25	1	25	25	GO:0016810: hydrolase activity, acting on carbon-nitrogen (but not peptide) bonds			
Response regulator OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700884 / mc2115) GN=MSMEG_3246 PE=4 SV=1	*	t1AAR0B9 AAR0B9_MYCS2	23 174	4.92	AAR0B9_MYCS2	MSMEG_3246	1	16	3	6%	78%	18%	0	0	1	87	6	87	GO:000723: RNA binding	GO:000622: intracellular	GO:000622: intracellular	

Protein name	Annotation UniProtKB	Protein accession numbers	Protein molecular weight (Da)	PI	Protein Name	Symbol	Total number of peptide		Percentage sequence coverage		Number of shared peptide		Total number of spectrum				1D8/1D10 +	1D8/(no)1D4-(1D10)	Function	Process					
							1D4-1D8	1D10+	1D4-1D8	1D10+	1D4-1D8	1D10+	1D4-1D8	1D10+											
HIT family protein hydrolase OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc2(915)) GN=M_SMEG_2932 PE=4 SV=1	*	tr AQW33 AQW33_MYCS2	22 525	5.8	AQW33_MYCS2	MSMEG_2932	5	21%	0	12	0	5	12	0.5	12	0.5	24	24	GO:0003924: catalytic activity GO:0016787: hydrolase activity	---					
Gamma-glutamyltransferase OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc2(915)) GN=ggf PE=4 SV=1	*	tr AQW44 AQW44_MYCS2	66 412	5.13	AQW44_MYCS2	ggf	9	23%	0	12	0	12	0.5	12	0.5	24	24	GO:0003940: obsoleted gamma-glutamyltransferase activity GO:0016740: transferase activity GO:0016746: transferase activity, transferring GO:0035324: glutathione hydrolase activity	GO:0006508: proteolysis GO:0006751: glutathione catabolic process						
Phosphoglycerate mutase OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc2(915)) GN=M_SMEG_4305 PE=4 SV=1	*	tr AOR04 AOR04_MYCS2	39 033	5.54	AOR04_MYCS2	MSMEG_4305	9	28%	0	12	0	12	0.5	12	0.5	24	24	GO:0006776: nucleic acid binding GO:0004523: RNA-DNA hybrid ribonuclease activity	GO:0006502: RNA phosphodiester bond hydrolysis, endonucleolytic						
Uncharacterized protein OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc2(915)) GN=MSMEI_3592 PE=3 SV=1	*	tr IFF07 IFF07_MYCS2	17 868	5.04	IFF07_MYCS2	MSMEI_3592	6	47%	0	12	0	12	0.5	12	0.5	24	24	GO:0016787: hydrolase activity	---						
Beta-glucanase-like protein OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc2(915)) GN=MSMEI_9739 PE=4 SV=1	*	tr AQQJ5 AQQJ5_MYCS2	26 547	6.04	AQJ5_MYCS2	MSMEI_3592	1	7%	0	1	18	1	18	0.5	18	0.5	24	24	GO:0006726: tetrahydrobiopterin biosynthetic process	GO:0006726: tetrahydrobiopterin biosynthetic process					
Purative pterin-4-alpha-carboximino dehydratase OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc2(915)) GN=MSMEI_5150 PE=1 SV=1	**	sp AAR2K7 PHS_MYCS2	10 464	5.04	PHS_MYCS2	MSMEI_5150	5	61%	0	11	0	11	0.5	11	0.5	22	22	GO:0006726: tetrahydrobiopterin biosynthetic process	GO:0006726: tetrahydrobiopterin biosynthetic process						
Uncharacterized protein OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc2(915)) GN=MSMEI_2500 PE=4 SV=1	*	tr AQR0V AQR0V_MYCS2	43 828	5.8	AQR0V_MYCS2	MSMEI_2500	10	31%	0	11	0	11	0.5	11	0.5	22	22	GO:0016740: transferase activity GO:0016787: hydrolase activity	---						
Uncharacterized protein OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc2(915)) GN=MSMEI_2500 PE=4 SV=1	*	tr AQR0V AQR0V_MYCS2	7 866	4.98	AQR0V_MYCS2	MSMEI_2500	3	73%	0	11	0	11	0.5	11	0.5	22	22	GO:0006726: tetrahydrobiopterin biosynthetic process	GO:0006726: tetrahydrobiopterin biosynthetic process						
Alpha-helical coiled-coil protein OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc2(915)) GN=MSMEI_4518 PE=4 SV=1	*	tr AQR0V AQR0V_MYCS2	19 042	4.84	AQR0V_MYCS2	MSMEI_4518	6	42%	0	11	0	11	0.5	11	0.5	22	22	GO:0006726: tetrahydrobiopterin biosynthetic process	GO:0006726: tetrahydrobiopterin biosynthetic process						
Glutamine amidotransferase class I OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc2(915)) GN=MSMEI_6690 PE=4 SV=1	*	tr AQR6W AQR6W_MYCS2	28 881	4.88	AQR6W_MYCS2	MSMEI_6690	1	9%	48%	13%	0	0	1	42	3	42	21	14	GO:0006726: tetrahydrobiopterin biosynthetic process	GO:0006726: tetrahydrobiopterin biosynthetic process					
Thioredoxin OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc2(915)) GN=ATC_P5 SV=1	**	tr AQR7J AQR7J_MYCS2	11 623	4.54	AQR7J_MYCS2	trx	2	23%	47%	29%	0	0	3	51	2	3	51	17	26	GO:0006662: glycerol ether metabolic process GO:0045454: cell redox homeostasis GO:0055114: oxidation-reduction process	GO:0006662: glycerol ether metabolic process GO:0045454: cell redox homeostasis GO:0055114: oxidation-reduction process				
Transferase OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc2(15)) GN=M_SMEG_0184 PE=4 SV=1	*	tr AQRN1 AQRN1_MYCS2	62 293	6.11	AQRN1_MYCS2	MSMEG_0184	6	15%	0	10	0	10	0.5	10	0.5	20	20	GO:0016740: transferase activity GO:0035747: glutathione hydrolase activity	GO:0006508: proteolysis GO:0006751: glutathione catabolic process						
Alpha-methylacyl-CoA lyase Mcr OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc2(15)) GN=MSMEI_5184 PE=4 SV=1	*	tr AQR2P2 AQR2P2_MYCS2	39 048	5.13	AQR2P2_MYCS2	MSMEI_5184	5	21%	0	10	0	10	0.5	10	0.5	20	20	GO:0003924: catalytic activity	---						
Exodeoxyribonuclease III OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc2(915)) GN=xth PE=4 SV=1	*	tr AQR2S2 AQR2S2_MYCS2	30 137	5.35	AQR2S2_MYCS2	xth	1	5%	38%	0	1	15	1	15	0.5	15	20	30	GO:0004916: nuclease activity GO:0006683: exodeoxyribonuclease III activity GO:0016787: hydrolase activity	GO:0006821: DNA repair GO:0009095: nucleic acid phosphodiester bond hydrolysis					
Purative phenylalanine aminotransferase OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc2(915)) GN=xth PE=4 SV=1	**	sp AQR5H PATR_MYCS2	38 872	5.56	PATR_MYCS2	pat	2	8%	42%	0	0	2	23	2	23	0.5	12	18	GO:0004400: histidino-phosphate transaminase activity GO:0004483: transaminase activity GO:0016740: transferase activity GO:0035747: pyridoxal phosphate binding on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen	GO:0001105: histidine biosynthetic process GO:0004852: metabolic process GO:0009095: biosynthetic process					
Uncharacterized protein OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc2(915)) GN=MSMEI_0215 PE=3 SV=1	*	tr AQR5G3 AQR5G3_MYCS2	35 266	6.05	AQR5G3_MYCS2	MSMEI_1475	1	10	8	4%	56%	44%	1	10	8	1	90	9	18	10	GO:0005114: oxidation-reduction process	GO:0005114: oxidation-reduction process			
Pirin-like protein OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc2(915)) GN=MSMEI_0215 PE=3 SV=1	*	tr AQRN2 AQRN2_MYCS2	25 529	5.06	AQRN2_MYCS2	MSMEI_0215	6	40%	0	9	0	9	0.5	9	0.5	18	18	18	18	GO:000166: nucleic acid binding GO:0003924: catalytic activity GO:0006751: glutathione hydrolase activity GO:0016740: transferase activity GO:0019205: nucleobase-containing compound kinase activity	GO:000166: nucleic acid binding GO:0003924: catalytic activity GO:0006751: glutathione hydrolase activity GO:0016740: transferase activity GO:0019205: nucleobase-containing compound kinase activity				
Uncharacterized protein OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc2(915)) GN=MSMEI_3733 PE=4 SV=1	*	tr AQRYP5 AQRYP5_MYCS2	9 861	4.87	AQRYP5_MYCS2	MSMEI_3733	5	2	65%	25%	0	0	22	2	0.5	22	2	44	18	11	GO:000166: nucleic acid binding GO:0003924: catalytic activity GO:0006751: glutathione hydrolase activity GO:0016740: transferase activity GO:0019205: nucleobase-containing compound kinase activity	GO:000166: nucleic acid binding GO:0003924: catalytic activity GO:0006751: glutathione hydrolase activity GO:0016740: transferase activity GO:0019205: nucleobase-containing compound kinase activity			
Adenylate kinase OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc2(915)) GN=adk PE=1 SV=1	*** (reviewed)	sp AQRSHK ADK_MYCS2	19 872	4.77	ADK_MYCS2	adk	3	25	12	14%	92%	72%	0	0	3	235	24	3	235	24	78	17	10	GO:0005737: cytoplasm	GO:000166: nucleic acid binding GO:0003924: catalytic activity GO:0006751: glutathione hydrolase activity GO:0016740: transferase activity GO:0019205: nucleobase-containing compound kinase activity
MaoC-like dehydrogenase OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc2(915)) GN=MSMEI_3940 PE=4 SV=1	*	tr AQR4T0 AQR4T0_MYCS2	30 351	5.01	AQR4T0_MYCS2	MSMEI_3940	1	8	5%	34%	0	0	1	13	1	13	0.5	13	17	26	GO:0006751: glutathione hydrolase activity GO:0016740: transferase activity GO:0019205: nucleobase-containing compound kinase activity	GO:0006751: glutathione hydrolase activity GO:0016740: transferase activity GO:0019205: nucleobase-containing compound kinase activity			
Siderophore utilization protein OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc2(15)) GN=MSMEI_2511 PE=4 SV=1	*	tr AQRV81 AQRV81_MYCS2	31 265	5.09	AQRV81_MYCS2	MSMEI_2511	3	7	19%	33%	0	0	3	30	3	30	0.5	10	17	60	GO:0016491: oxidoreductase activity	GO:0005114: oxidation-reduction process			
Short-chain dehydrogenase/reductase SDR OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc2(15)) GN=MSMEI_0209 PE=3 SV=1	*	tr IF4Z2 IF4Z2_MYCS2	26 460	5.2	IF4Z2_MYCS2	MSMEI_0209	2	9	10%	46%	2	8	2	21	2	21	0.5	11	17	42	GO:0016491: oxidoreductase activity, acting on NAD(P)+	GO:0005114: oxidation-reduction process			
Lactate-like protein OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc2(915)) GN=MSMEI_1439 PE=4 SV=1	*	tr IFP41 IFP41_MYCS2	33 216	6.11	IFP41_MYCS2	MSMEI_1439	1	11	9	4%	63%	51%	1	10	8	1	91	10	17	9	GO:0016705: oxidoreductase activity, acting on iron-sulfur centers, with incorporation or reduction of molecular oxygen	GO:0005114: oxidation-reduction process			

Protein name	Annotation UniProtKB	Protein accession numbers	Protein molecule weight (Da)	PI	Protein Name	Symbol	Total number of peptide		Percentage sequence coverage		Number of shared peptide		Total number of spectrum		1D8/ID10 +	1D8/(moy1 D4-1D10) +	GO terms				
							1D4-1D8 +	1D10 +	1D4-1D8 +	1D10 +	1D4-1D8 +	1D10 +	Component	Function			Process				
Beta-lactamase, OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155) GN=MSMEG_2658 PE=4 SV=1	*	tr AQVQV7 AQVQV7_MYCS2	31 096	5	AQVQV7_MYCS2	MSMEG_2658	8	17	8	41%	0	0	8	154	11	19	16	14	GO:0008900: beta-lactamase activity GO:0016787: hydrolase activity GO:0046877: response to antibiotic		
Uncharacterized protein OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155) GN=MSMEI_2908 PE=4 SV=1	*	tr JTG129 JTG129_MYCS2	16 404	4.74			2	2	26%	0	0	20	2	0.5	20	2	40	16	GO:0008977: DNA binding GO:0003700: transcription factor activity, sequence-specific DNA binding GO:0049914: transition metal ion binding GO:0049893: protein dimerization activity		
Iron-dependent repressor IdeR OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155) GN=MSMEI_PEA4 SV=1	*	tr AQVQV2 AQVQV2_MYCS2	25 415	5.19	AQVQV2_MYCS2	MSMEG_2790	7	1	38%	6%	0	0	12	1	0.5	12	1	24	16	GO:0006351: transcription, DNA-templated GO:0006355: regulation of transcription, DNA-templated	
Thiamine bisphosphate protein THS OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155) GN=MSMEI_PEA4 SV=1	*	tr AQVQK9 AQVQK9_MYCS2	7 226	/			2		38%		0	0	8	0.5	8	0.5	16	16			
Uncharacterized protein OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155) GN=MSMEI_PEA4 SV=1	*	tr AQVQSS2 AQVQSS2_MYCS2	16 590	5.11			3		32%		0	0	8	0.5	8	0.5	16	16			
5-carboxymethyl-2-hydroxymuconate delta-isomerase OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155) GN=MSMEI_PEA4 SV=1	*	tr AQVY6 AQVY6_MYCS2	27 650	5.16	AQVY6_MYCS2	MSMEG_2382	4		25%		0	0	8	0.5	8	0.5	16	16	GO:0003924: catalytic activity GO:0016853: isomerase activity GO:0008152: metabolic process		
Saccharophin dehydrogenase OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155) GN=MSMEI_PEA4 SV=1	*	tr AR157 AR157_MYCS2	43 634	5.83	AR157_MYCS2	MSMEG_4632	5		18%		0	0	8	0.5	8	0.5	16	16	GO:0003754: saccharophin dehydrogenase (forming acyl) activity GO:0016491: oxidoreductase activity		
Uncharacterized protein OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155) GN=MSMEI_PEA4 SV=1	*	tr AR411 AR411_MYCS2	9 816	4.94			6		60%		0	0	8	0.5	8	0.5	16	16			
Lipoprotein OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155) GN=MSMEI_PEA4 SV=1	*	tr AQVQV0 AQVQV0_MYCS2	26 639	4.55			3	8	13%	36%	0	0	3	27	3	27	0.5	9	15	54	
Uncharacterized protein OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155) GN=MSMEI_PEA4 SV=1	*	tr AQVQV3 AQVQV3_MYCS2	44 642	5.28			1	8	5%	28%	0	0	1	11	1	11	0.5	11	15	22	
Peptidoglycan cleavage isomerase OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155) GN=MSMEI_PEA4 SV=1	**	tr AQVQV6 AQVQV6_MYCS2	18 726	5.42	AQVQV6_MYCS2	MSMEG_0024	9	17	69%	99%	0	0	33	546	42	33	546	42	17	15	13
Pyridoxamine 5'-phosphate family protein OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155) GN=MSMEI_PEA4 SV=1	*	tr AQVQV8 AQVQV8_MYCS2	18 885	5.05	AQVQV8_MYCS2	MSMEG_0048	2	6	19%	55%	0	0	4	32	4	32	0.5	8	14	64	
Hemerythrin HFE cation binding domain protein OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155) GN=MSMEI_PEA4 SV=1	*	tr AQVQV9 AQVQV9_MYCS2	16 490	5.02	AQVQV9_MYCS2	MSMEG_3004	1	10	7	8%	88%	0	0	1	91	12	91	14	8		
Uncharacterized protein OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155) GN=MSMEI_PEA4 SV=1	*	tr AQVQV0 AQVQV0_MYCS2	41 078	4.98	AQVQV0_MYCS2	MSMEG_2820	1	11	2	3%	38%	0	0	1	21	2	21	14	11	GO:0016020: membrane or membrane component	
Dioxygenase OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155) GN=MSMEI_PEA4 SV=1	*	tr AQVQV8 AQVQV8_MYCS2	31 031	5.48	AQVQV8_MYCS2	MSMEG_0291	6		26%		0	0	7	0.5	7	0.5	14	14	14	14	
Pyridoxamine 5'-phosphate oxidase family protein OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155) GN=MSMEI_PEA4 SV=1	*	tr AR4F9 AR4F9_MYCS2	15 605	6.09	AR4F9_MYCS2	MSMEG_5819	4		33%		0	0	7	0.5	7	0.5	14	14	14	14	
ABC-type transporter, periplasmic component OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155) GN=MSMEI_PEA4 SV=1	*	tr AR336 AR336_MYCS2	31 744	5.05	AR336_MYCS2	MSMEG_0050	6		22%		0	0	7	0.5	7	0.5	14	14	14	14	
Ribosome-recycling factor OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155) GN=MSMEI_PEA4 SV=1	**	sp AQVQV6 RRF_MYCS2	20 825	5.31	RRF_MYCS2	trr	5	16	7	35%	76%	0	0	13	169	12	13	169	12	13	14
N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155) GN=MSMEI_PEA4 SV=1	**	tr AQVQV8 AQVQV8_MYCS2	39 466	5.3	AQVQV8_MYCS2	nagA	1	13	2	3%	57%	0	0	1	20	2	20	13	10	GO:0008448: N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase activity GO:0016787: hydrolase activity GO:0016810: hydrolase activity, acting on carbon-nitrogen (but not peptide) bonds GO:0003755: peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity GO:0016853: isomerase activity	
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155) GN=MSMEI_PEA4 SV=1	**	tr AQVQV0 AQVQV0_MYCS2	20 355	3.77	AQVQV0_MYCS2	MSMEG_3434	4	1	46%	5%	0	0	10	1	0.5	10	1	20	13	10	10
3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155) GN=MSMEI_PEA4 SV=1	*	tr AQVQV2 AQVQV2_MYCS2	27 026	5.2	AQVQV2_MYCS2	MSMEG_0216	2	8	10%	38%	2	8	2	16	2	16	0.5	8	13	32	
Uncharacterized protein OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155) GN=MSMEI_PEA4 SV=1	***	sp AQVQV4 CH62_MYCS2	56 151	4.9	CH62_MYCS2	groL2	2	17	2	4%	34%	4%	1	3	38	3	13	13	13	13	
Pyridoxamine 5'-phosphate oxidase family protein OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155) GN=MSMEI_PEA4 SV=1	*	tr AR462 AR462_MYCS2	15 873	5.53	AR462_MYCS2	MSMEG_5717	11	6	80%	43%	0	0	88	14	0.5	88	14	176	6	6	6
Uncharacterized protein OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155) GN=MSMEI_PEA4 SV=1	***	tr AQVQV5 AQVQV5_MYCS2	10 225	4.6	ESXB_MYCS2	esxB	2		43%		1		6	0.5	6	0.5	12	12	12	12	
Hemerythrin HFE cation binding region OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155) GN=MSMEI_PEA4 SV=1	*	tr AQVQV7 AQVQV7_MYCS2	21 261	4.82			3		25%		0	0	6	0.5	6	0.5	12	12	12	12	
Uncharacterized protein OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155) GN=MSMEI_PEA4 SV=1	*	tr AQVQV0 AQVQV0_MYCS2	32 351	5.26	AQVQV0_MYCS2	MSMEG_3173	4		16%		0	0	6	0.5	6	0.5	12	12	12	12	
Uncharacterized protein OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155) GN=MSMEI_PEA4 SV=1	*	tr AQVQV6 AQVQV6_MYCS2	53 740	4.62	tr AQVQV6 AQVQV6_MYCS2	tr AQVQV6 AQVQV6_MYCS2	6		20%		0	0	6	0.5	6	0.5	12	12	12	12	

Protein name	Annotation UniProtKB	Protein accession numbers	Protein molecular weight (Da)	pI	Protein Name	Symbol	Total number of peptide		Percentage sequence coverage		Number of shared peptide		Total number of spectrum				Component	Function	GO terms	
							ID4-1D8	ID10+	ID4-1D8	ID10+	ID4-1D8	ID10+	ID4-1D8	ID10+	ID8(moy1D4-1D10+)	ID6/ID10+				
Flavin-nucleotide-binding protein OS-Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155) GN=MSMEG_4875 PE=4 SV=1	*	tr A0R238 A0R238_MYCS2	23 751	5.02	A0R238_MYCS2	MSMEG_4875	3	1	22%	0	6	0.5	6	0.5	12	12	12	GO:0048037: collector binding	Process	
Purified cyanamide hydratase OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155) GN=MSMEG_5764 PE=4 SV=1	*	tr A0R449 A0R449_MYCS2	21 792	5.55	A0R449_MYCS2	MSMEG_0484	5	1	34%	0	6	0.5	6	0.5	12	12	12	GO:0004328: formamidase activity GO:0016787: hydrolase activity GO:0016817: hydrolase activity, acting on carbon-nitrogen bonds, in linear amides	---	
Formamidase OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155) GN=MSMEG_0484 PE=4 SV=1	*	tr A0R449 A0R449_MYCS2	39 217	5.31	A0R449_MYCS2	MSMEG_0484	7	1	3%	0	1	9	0.5	9	12	18	18	GO:0004328: formamidase activity GO:0016787: hydrolase activity GO:0016817: hydrolase activity, acting on carbon-nitrogen bonds, in linear amides	---	
UFPO225 protein MSMEG_1821(MSMEI_1880 OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155) GN=MSMEG_1821 PE=3 SV=1	*	tr A0QT9 A0QT9_MYCS2	14 288	5.3	A0QT9_MYCS2		1	5	8%	0	1	9	0.5	9	12	18	18	GO:0004674: protein serine/threonine kinase activity GO:0016301: kinase activity GO:0016740: transferase activity	GO:0006868: amino acid transport	
Extracellular ligand-binding receptor OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155) GN=MSMEG_2962 PE=4 SV=1	*	tr A0QWL3 A0QWL3_MYCS2	45 300	4.75	A0QWL3_MYCS2	MSMEG_2982	1	8	5%	0	1	9	0.5	9	12	18	18	GO:0016705: oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen GO:0006468: protein phosphorylation GO:0009401: phosphoenolpyruvate-dependent sugar-phosphotransferase system GO:0016310: phosphorylation	GO:0006868: amino acid transport	
Uncharacterized protein OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155) GN=MSMEG_1513 PE=4 SV=1	*	tr A0SKV A0SKV_MYCS2	30 163	5.05	A0SKV_MYCS2	MSMEG_1513	9	11	41%	0	13	188	19	13	188	19	14	12	10	10
Phosphocarrier protein HPr OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155) GN=MSMEG_0084 PE=3 SV=1	*	tr A0QNL3 A0QNL3_MYCS2	8 387	4.09	A0QNL3_MYCS2	MSMEG_0084	2	1	32%	0	0	14	2	0.5	14	2	28	11	7	7
Erythryls/GSyr/nG family protein OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155) GN=MSMEG_0929 PE=4 SV=1	*	tr A0QZL A0QZL_MYCS2	48 058	4.47	A0QZL_MYCS2	MSMEG_0929	1	5	2%	0	1	8	1	8	0.5	8	11	16	16	16
Bifunctional FAD synthetase/hydrolyase biosynthesis protein ribF: riboflavin kinase + FMN adenylyl transferase OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155) GN=ribF PE=4 SV=1	***	tr A0QVQ3 A0QVQ3_MYCS2	35 721	5.85	A0QVQ3_MYCS2	ribF	1	5	5%	0	1	8	1	8	0.5	8	11	16	16	16
Serine/threonine-protein kinase PknB OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155) GN=pknB PE=1 SV=1	**** (reviewed)	sp A0QNG1 PKNB_MYCS2	66 316	5.15	PKNB_MYCS2	pknB	2	8	3%	0	2	26	3	2	26	3	13	10	9	9
Acetyltransferase OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155) GN=MSMEG_0356 PE=4 SV=1	*	tr A0QPD1 A0QPD1_MYCS2 tr F5E017 F5E017_MYCS2	10 369	5.1	A0QPD1_MYCS2	MSMEG_0356	2	10	46%	0	5	0.5	5	0.5	10	10	10	10	10	10
Allaniloxase OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155) GN=MSMEG_1294 PE=4 SV=1	*	tr A0RZ8 A0RZ8_MYCS2	18 799	4.23	A0RZ8_MYCS2		3	3	26%	0	5	0.5	5	0.5	10	10	10	10	10	10
Cultivate supernatant protein OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155) GN=MSMEG_1403 PE=4 SV=1	*	tr A0S40 A0S40_MYCS2 tr F537 F537_MYCS2	31 273	4.58	A0S40_MYCS2	MSMEG_1403	5	5	32%	0	5	0.5	5	0.5	10	10	10	10	10	10
Enoyl-CoA hydratase/isomerase OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155) GN=MSMEG_3139 PE=3 SV=1	*	tr A0QX16 A0QX16_MYCS2 tr G181 G181_MYCS2	29 466	6.09	A0QX16_MYCS2	MSMEG_3139	5	5	19%	0	5	0.5	5	0.5	10	10	10	10	10	10
Diaminopimelate decarboxylase OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155) GN=MSMEG_6197 PE=3 SV=1	*	tr A0RSH9 A0RSH9_MYCS2	49 104	5.49	A0RSH9_MYCS2	MSMEG_6197	5	5	12%	0	5	0.5	5	0.5	10	10	10	10	10	10
Quinone oxidoreductase OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155) GN=MSMEG_6362 PE=4 SV=1	*	tr A0R5Y8 A0R5Y8_MYCS2	33 299	5.58	A0R5Y8_MYCS2	MSMEG_6362	4	4	17%	0	0	5	0.5	5	0.5	10	10	10	10	10
60 kDa chaperonin 1 OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155) GN=groL1 PE=1 SV=1	*** (reviewed)	sp A0QJ5C A0QJ5C tr H601_MYCS2	56 488	4.81	H601_MYCS2	groL1	5	21	11%	1	2	6	145	24	6	145	24	10	6	6
Octanoyltransferase OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155) GN=lipB PE=3 SV=1	*** (reviewed)	sp A0R074 LIPB_MYCS2	24 413	5.49	LIPB_MYCS2	lipB	5	1	25%	0	0	7	1	0.5	7	1	14	9	7	7
Uncharacterized protein OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155) GN=MSMEG_2127 PE=4 SV=1	*	tr A0QU97 A0QU97_MYCS2	13 418	5.58	A0QU97_MYCS2		4	1	45%	0	0	7	1	0.5	7	1	14	9	7	7
Hisidinol dehydrogenase OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155) GN=hisD PE=3 SV=1	***	tr A0QX81 A0QX81_MYCS2	46 701	5.19	A0QX81_MYCS2	hisD	1	7	4%	1	7	1	7	0.5	7	9	14	14	14	14
Hisidinol dehydrogenase OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155) GN=hisD PE=3 SV=1	***	tr F537 F537_MYCS2	46 325	5.19	F537_MYCS2	hisD	1	7	4%	1	7	1	7	0.5	7	9	14	14	14	14

Protein name	Annotation UniprotKB	Protein accession numbers	Protein molecular weight (Da)	PI	Protein Name	Symbol	Total number of peptide		Percentage sequence coverage		Number of shared peptide		Total number of spectrum		1D8/ID10	1D8/(moy1 D4-1D10)	1D8/ID10	Function	Process			
							1D4-1D8	1D10	1D4-1D8	1D10	1D4-1D8	1D10	1D4-1D8	1D10								
Cytochrome b5, OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc2(155) GN:M5MEG_0317 PE-4 SV=1	**	tr AQYQ1 AQYQ1_MYCS2	23.536	4.81	AQYQ1_MYCS2	cmk	2	13	6	12%	81%	42%	0	0	2	63	12	32	9	5	GO:000168: nucleotide binding GO:000524: hydrolase activity GO:000522: ATPase activity GO:001830: kinase activity GO:0016740: transferase activity	GO:000138: nucleobase-containing compound metabolic process GO:000224: pyrimidine nucleotide metabolic process GO:000522: ATPase activity GO:001830: kinase activity GO:0016740: transferase activity
Tetratricopeptide repeat domain protein OSMycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc2(155) GN:M5MEG_4817 PE-4 SV=1	*	tr AQR15 AQR15_MYCS2	31.122	4.65	AQR15_MYCS2	MSMEG_4817	5	13	4	25%	81%	21%	0	0	6	49	5	8	9	10	GO:000484: uracil DNA N-glycosylase activity GO:000528: base-excision repair GO:000674: cellular response to DNA damage stimulus	GO:000484: uracil DNA N-glycosylase activity GO:000528: base-excision repair GO:000674: cellular response to DNA damage stimulus
Uracil-DNA glycosylase OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc2(155) GN:ung PE-3 SV=1	** (reviewed)	sp AQO101 UNG_MYCS2	24.968	5.86	UNG_MYCS2	ung	8	2	47%	12%	0	0	11	2	0.5	11	2	22	9	6	GO:0016787: hydrolase activity GO:0016792: hydrolase activity, hydrolysing N-glycosyl compounds	GO:0016787: hydrolase activity GO:0016792: hydrolase activity, hydrolysing N-glycosyl compounds
Pyridoxine 5'-phosphate oxidase-related FMN-binding protein OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc2(155) GN:M5MEG_0882 PE-4 SV=1)	*	tr AQQU7 AQQU7_MYCS2	13.637	5.7	AQQU7_MYCS2	MSMEG_0882	4	2	46%	23%	0	0	11	2	0.5	11	2	22	9	6	GO:004897: cofactor binding	GO:004897: cofactor binding
3-hydroxy-pentanoate hydrolase OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc2(155) GN:M5MEG_5940 PE-4 SV=1)	*	tr AQR58 AQR58_MYCS2	28.029	4.48	AQR58_MYCS2	MSMEG_5940	3	6	15%	30%	0	0	3	15	3	15	0.5	5	9	30	GO:000524: catalytic activity	GO:000524: catalytic activity
HAD superfamily hydrolyase subfamily A, variant 3581e-phosphoglucomutase hydrolase OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc2(155) GN:M5MEG_1570 PE-4 SV=1)	*	tr IFGR3 IFGR3_MYCS2	28.946	5.14	IFGR3_MYCS2	MSMEG_1570	1	14	3	3%	52%	16%	0	0	1	21	4	21	8	5	GO:0016787: hydrolase activity	GO:0016787: hydrolase activity
HisH OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc2(155) GN:hisH PE-3 SV=1)	***	tr AQX64 AQX64_MYCS2	21.506	5.16	AQX64_MYCS2	hisH	8	4	61%	28%	0	0	23	5	0.5	23	5	46	8	5	GO:000107: imidazoleglycerol-phosphate lyase activity GO:0016740: transferase activity GO:0016757: transferase activity, transferring glycoyl groups GO:0016763: transferase activity, transferring phosphoryl groups	GO:000107: imidazoleglycerol-phosphate lyase activity GO:0016740: transferase activity GO:0016757: transferase activity, transferring glycoyl groups GO:0016763: transferase activity, transferring phosphoryl groups
Beta-1,4-N-acetylglucosaminidase OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc2(155) GN:M5MEG_5198 PE-4 SV=1)	*	tr AQR204 AQR204_MYCS2	25.675	4.2	AQR204_MYCS2		3	8	2	14%	51%	10%	0	0	6	33	2	6	8	17	GO:000168: heparidine biosynthetic process GO:0016740: transferase activity GO:000541: glutamine metabolic process GO:000852: cellular amino acid biosynthetic process	GO:000168: heparidine biosynthetic process GO:0016740: transferase activity GO:000541: glutamine metabolic process GO:000852: cellular amino acid biosynthetic process
Response regulator receiver protein OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc2(155) GN:M5MEG_204 PE-4 SV=1)	*	tr AQJ37 AQJ37_MYCS2	14.105	4.79	AQJ37_MYCS2	MSMEG_2064	4	1	38%	7%	0	0	6	1	0.5	6	1	12	6	6	GO:000562: intracellular	GO:000562: intracellular
Thioesterase family protein OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc2(155) GN:M5MEG_2929 PE-4 SV=1)	*	tr AQQW6 AQQW6_MYCS2	22.632	6.38	AQQW6_MYCS2		1	8	2	8%	80%	17%	0	0	2	16	2	8	8	8	GO:000573: cytoplasm	GO:000573: cytoplasm
OsmC-like protein OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc2(155) GN:M5MEG_0552 PE-4 SV=1)	*	tr AQXP9 AQXP9_MYCS2	17.736	5.32	AQXP9_MYCS2		3	3	30%	0	0	0	4	0.5	4	0.5	8	8	8	8	GO:000169: phosphorylation signal transduction system	GO:000169: phosphorylation signal transduction system
Adose 1-epimerase OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc2(155) GN:M5MEG_0717 PE-4 SV=1)	*	tr AQGD7 AQGD7_MYCS2	31.818	4.65	AQGD7_MYCS2	MSMEG_0717	4	4	19%	0	0	4	0.5	4	0.5	8	8	8	8	8	GO:000324: catalytic activity GO:001683: isomerase activity GO:001626: carbohydrate binding	GO:000324: catalytic activity GO:001683: isomerase activity GO:001626: carbohydrate binding
Pseudouridine synthase OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc2(155) GN:rluB PE-3 SV=1)	**	tr AQYQ1 AQYQ1_MYCS2	27.010	/	AQYQ1_MYCS2	rluB	4	4	19%	0	0	4	0.5	4	0.5	8	8	8	8	8	GO:000372: RNA binding GO:000982: pseudouridine synthase activity GO:001683: isomerase activity GO:001686: intramolecular transference activity	GO:000372: RNA binding GO:000982: pseudouridine synthase activity GO:001683: isomerase activity GO:001686: intramolecular transference activity
Fatty-acid-CoA ligase FadD6 OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc2(155) GN:fadD6 PE-4 SV=1)	*	tr AQR2E8 AQR2E8_MYCS2	63.835	6.87	AQR2E8_MYCS2	MSMEG_5086	2	2	5%	0	0	4	0.5	4	0.5	8	8	8	8	8	GO:000324: catalytic activity GO:000467: long-chain fatty acid-CoA ligase activity	GO:000324: catalytic activity GO:000467: long-chain fatty acid-CoA ligase activity
Serine-type D-Ala-D-Ala carboxypeptidase OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc2(155) GN:lpkK PE-4 SV=1)	*	tr IFG151 IFG151_MYCS2	48.093	/	IFG151_MYCS2	lpkK	3	3	10%	0	0	4	0.5	4	0.5	8	8	8	8	8	GO:000467: long-chain fatty acid-CoA ligase activity GO:001629: succinate-CoA ligase activity GO:000460: carboxypeptidase activity GO:0016787: hydrolase activity	GO:000467: long-chain fatty acid-CoA ligase activity GO:001629: succinate-CoA ligase activity GO:000460: carboxypeptidase activity GO:0016787: hydrolase activity
Uncharacterized protein OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc2(155) GN:M5MEG_8019 PE-4 SV=1)	*	tr IFG47 IFG47_MYCS2	26.857	5.7	IFG47_MYCS2		3	3	27%	0	0	4	0.5	4	0.5	8	8	8	8	8	GO:000367: DNA binding GO:000372: RNA binding GO:000458: ribonuclease activity GO:000456: ribonuclease activity GO:0016787: hydrolase activity GO:000467: long-chain fatty acid-CoA ligase activity	GO:000367: DNA binding GO:000372: RNA binding GO:000458: ribonuclease activity GO:000456: ribonuclease activity GO:0016787: hydrolase activity GO:000467: long-chain fatty acid-CoA ligase activity
Ribonuclease VapC OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc2(155) GN:vapC PE-1 SV=1)	**** (reviewed)	sp AQR56 VAPC_MYCS2	13.910	4.94	VAPC_MYCS2	vapC	1	2	13%	25%	0	0	1	6	1	6	0.5	6	8	12	GO:000367: DNA binding GO:000372: RNA binding GO:000458: ribonuclease activity GO:000456: ribonuclease activity GO:0016787: hydrolase activity GO:000467: long-chain fatty acid-CoA ligase activity	GO:000367: DNA binding GO:000372: RNA binding GO:000458: ribonuclease activity GO:000456: ribonuclease activity GO:0016787: hydrolase activity GO:000467: long-chain fatty acid-CoA ligase activity
ABC-type transport system periplasmic substrate-binding protein OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc2(155) GN:M5MEG_1216 PE-4 SV=1)	*	tr AQR50 AQR50_MYCS2	44.535	4.59	AQR50_MYCS2	FXR2 FXR2_MYCS2	2	6	8%	25%	0	0	2	10	2	10	0.5	5	8	20	GO:000324: catalytic activity GO:000432: fructose-bisphosphate aldolase activity	GO:000324: catalytic activity GO:000432: fructose-bisphosphate aldolase activity
Fructose-bisphosphate aldolase OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc2(155) GN:M5MEG_3507 PE-4 SV=1)	*	tr AQR23 AQR23_MYCS2	31.926	4.81	AQR23_MYCS2	MSMEG_3507	9	23	6	39%	95%	27%	0	0	22	122	9	6	8	14	GO:000324: catalytic activity GO:000432: fructose-bisphosphate aldolase activity	GO:000324: catalytic activity GO:000432: fructose-bisphosphate aldolase activity
Glutamine ABC transporter, glutamine-binding protein OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc2(155) GN:M5MEG_5938 PE-3 SV=1)	*	tr AQR63 AQR63_MYCS2	33.522	4.88	AQR63_MYCS2	MSMEG_6956	6	10	4	30%	43%	17%	0	0	6	39	4	7	8	10	GO:000615: transporter activity	GO:000615: transporter activity

Protein name	Annotation UniProtKB	Protein accession numbers	Protein molecular weight (Da)	PI	Protein Name	Symbol	Total number of peptide		Percentage sequence coverage		Number of shared peptide		Total number of spectrum			1D8/ID10	1D8/moy1 D4-1D10(4)	1D8/ID10	Component	Function	Process
							1D4-1D8	1D10	1D4-1D8	1D10	1D4-1D8	1D10	1D4-1D8	1D10	1D8/ID10						
Nitrogen regulatory protein P-I OS-Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700884 / mc(2)155) GN:ngnB PE:3 SV:1	*	tr A0QV28 A0QV28_MYCS2	12 115	5.82	A0QV28_MYCS2	MSMEG_2426	3	11	4	29%	0	0	3	41	8	14	5	---	GO:0003234: enzyme regulator activity GO:0008086: regulation of nitrogen utilization GO:005790: regulation of catalytic activity	GO:0006351: transcription, DNA-templated GO:0006355: regulation of transcription, DNA-templated GO:0008086: regulation of nitrogen utilization GO:005790: regulation of catalytic activity	
Phosphate-binding protein PstS OS-Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700884 / mc(2)155) GN:pstS PE:3 SV:1	**	tr A0RAC3 A0RAC3_MYCS2	38 003	4.58	A0RAC3_MYCS2	pstS	7	17	5	29%	0	0	16	78	5	5	16	GO:005105: ATP-binding cassette (ABC) transporter complex	GO:0008177: phosphate ion transport GO:005435: phosphate ion transmembrane transport	GO:0008177: phosphate ion transport GO:005435: phosphate ion transmembrane transport	
Hydrolase of the alpha/beta superfamily protein OS-Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700884 / mc(2)155) GN:MSMEG_6597 PE:4 SV:1	*	tr A0R6M1 A0R6M1_MYCS2	27 016	6.24	A0R6M1_MYCS2	MSMEG_6597	3	7	21%	50%	0	0	6	24	0.5	4	7	---	GO:0016797: hydrolase activity	---	
Acyltransferase, wsl/gal/mgt subfamily protein OS-Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700884 / mc(2)155) GN:MSMEG_4705 PE:4 SV:1	**	tr A0R1C8 A0R1C8_MYCS2	51 880	5.42	A0R1C8_MYCS2	MSMEG_4705	7	2	23%	5%	0	0	9	2	0.5	2	18	---	GO:0004144: diacylglycerol O-acyltransferase activity GO:0016746: transferase activity GO:0016748: transferase activity, transferring acyl groups	GO:0006671: glycerol metabolic process GO:0006629: lipid metabolic process GO:0019432: triglyceride biosynthetic process GO:0045017: glycerolipid biosynthetic process	
MecC-like dehydratase OS-Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 70084 / mc(2)155) GN:MSMEG_0948 PE:3 SV:1	*	tr A0QR13 A0QR13_MYCS2	19 568	4.91	A0QR13_MYCS2		2	6	16%	35%	0	0	2	9	0.5	5	7	---	GO:0006281: DNA repair GO:0006284: base-excision repair	GO:0006281: DNA repair GO:0006284: base-excision repair	
Base excision DNA repair protein, HhH-GPD family OS-Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700884 / mc(2)155) GN:MSMEG_5156 PE:4 SV:1	*	tr A0R2L4 A0R2L4_MYCS2	20 882	6.75	A0R2L4_MYCS2	MSMEG_5156	5	4	28%	28%	0	0	23	6	0.5	6	46	---	GO:000324: catalytic activity	GO:0006281: DNA repair GO:0006284: base-excision repair	
D-3-phosphoglycerate dehydrogenase OS-Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700884 / mc(2)155) GN:narA PE:3 SV:1	**	tr A0QUY2 A0QUY2_MYCS2	54 357	4.9	A0QUY2_MYCS2	serA	1	6	4%	17%	2%	0	1	1	1	7	7	---	GO:0004677: phosphoglycerate dehydrogenase activity GO:0016491: oxidoreductase activity GO:0016492: oxidoreductase activity, NAD or NADP on the CH-OH group of donor, NAD or NADP as acceptor	GO:0006594: L-serine biosynthetic process GO:0006152: metabolic process GO:0006592: aromatic amino acid biosynthetic process GO:0055114: oxidation-reduction process	
Indole-3-glycerol phosphate synthase OS-Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700884 / mc(2)155) GN:trpC PE:4 SV:1	** (reviewed)	sp A0Q951 TRPC_MYCS2	28 371	5.15	TRPC_MYCS2	trpC	12	17	4	55%	85%	15%	0	0	22	90	4	---	GO:0003824: catalytic activity GO:0004677: phosphoglycerate dehydrogenase activity GO:0016491: oxidoreductase activity GO:0016492: oxidoreductase activity, NAD or NADP on the CH-OH group of donor, NAD or NADP as acceptor	GO:0006594: L-serine biosynthetic process GO:0006152: metabolic process GO:0006592: aromatic amino acid biosynthetic process GO:0055114: oxidation-reduction process	
D-ribose-binding periplasmic protein OS-Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700884 / mc(2)155) GN:MSMEG_3095 PE:4 SV:1	*	tr A0QW33 A0QW33_MYCS2	32 063	4.37	A0QW33_MYCS2	MSMEG_3095	5	10	27%	48%	0	0	6	22	0.5	4	44	---	GO:0005407: ATPase activity GO:0016740: transferase activity GO:0016757: transferase activity, transferring glycosyl groups	GO:0005407: ATPase activity GO:0016740: transferase activity GO:0016757: transferase activity, transferring glycosyl groups	
Erythromycin esterase OS-Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700884 / mc(2)155) GN:MSMEG_4215 PE:4 SV:1	*	tr A0R004 A0R004_MYCS2	24 464	5.01	A0R004_MYCS2	MSMEG_4215	2	1	10%	4%	0	0	5	1	0.5	1	10	---	GO:0008152: metabolic process GO:0008652: cellular amino acid biosynthetic process GO:0016829: lyase activity GO:0016831: carboxylase activity	GO:0008152: metabolic process GO:0008652: cellular amino acid biosynthetic process GO:0016829: lyase activity GO:0016831: carboxylase activity	
Carboxymethylene butanolidase OS-Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700884 / mc(2)155) GN:MSMEG_3558 PE:4 SV:1	*	tr A0QY73 A0QY73_MYCS2	32 967	4.83	A0QY73_MYCS2	MSMEG_3558	4	8	17%	41%	0	0	4	15	0.5	4	30	---	GO:0005407: ATPase activity GO:0016740: transferase activity GO:0016757: transferase activity, transferring glycosyl groups	GO:0005407: ATPase activity GO:0016740: transferase activity GO:0016757: transferase activity, transferring glycosyl groups	
Thiopyruvate S-methyltransferase (Tpm) superfamily protein OS-Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700884 / mc(2)155) GN:MSMEG_6235 PE:4 SV:1	*	tr A0RSL6 A0RSL6_MYCS2	24 501	4.98	A0RSL6_MYCS2	MSMEG_6235	4	10	5	27%	67%	36%	0	0	6	49	9	---	GO:0005168: methyltransferase activity GO:0016740: transferase activity	GO:0005168: methyltransferase activity GO:0016740: transferase activity	
Conserved hypothetical alanine rich protein OS-Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700884 / mc(2)155) GN:MSMEG_2622 PE:4 SV:1	*	tr A0QW11 A0QW11_MYCS2	16 519	4.56	A0QW11_MYCS2		7	2	50%	14%	0	0	8	2	0.5	2	16	---	---	---	
Periplasmic binding protein/Laci transcriptional regulator OS-Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700884 / mc(2)155) GN:MSMEG_6004 PE:4 SV:1	*	tr A0R773 A0R773_MYCS2	34 003	4.62	A0R773_MYCS2		6	9	24%	42%	0	0	7	24	7	24	0.5	3	---	---	---
Pyridoxamine 5'-phosphate oxidase-related FMN-binding protein OS-Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700884 / mc(2)155) GN:MSMEG_3380	*	tr A0QXP8 A0QXP8_MYCS2	14 630	6.1	A0QXP8_MYCS2	MSMEG_3380	3	5	1	32%	37%	13%	0	0	5	19	1	---	GO:00048037: cofactor binding	---	
Electron transfer flavin subunit OS-Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700884 / mc(2)155) GN:narB PE:4 SV:1	*	tr A0QUV6 A0QUV6_MYCS2	27 787	4.74	A0QUV6_MYCS2	erfB	7	5	23%	19%	0	0	23	7	0.5	23	7	---	GO:0008055: electron carrier activity	---	
Uncharacterized protein OS-Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700884 / mc(2)155) GN:MSMEG_4306 PE:4 SV:1	*	tr A0R095 A0R095_MYCS2	27 143	4.92	A0R095_MYCS2		6	11	29%	56%	0	0	7	23	7	23	0.5	3	---	---	---
DNA protection during starvation protein OS-Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700884 / mc(2)155) GN:npsA PE:1 SV:1	*** (reviewed)	sp A0R692 DPS_MYCS2	20 270	5.44	DPS_MYCS2	dps	2	2	18%	---	0	0	3	0.5	0.5	6	6	---	GO:0003677: DNA binding GO:0008199: ferric iron binding GO:0016491: oxidoreductase activity, oxidizing metal ions GO:0006950: response to stress GO:0055114: oxidation-reduction process	GO:0003677: DNA binding GO:0008199: ferric iron binding GO:0016491: oxidoreductase activity, oxidizing metal ions GO:0006950: response to stress GO:0055114: oxidation-reduction process	
Oxidoreductase, 2OG-F50L oxypyruvate family OS-Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700884 / mc(2)155) GN:MSMEG_0414 PE:3 SV:1	*	tr A0QPI9 A0QPI9_MYCS2	36 624	5.04	A0QPI9_MYCS2	MSMEG_0414	2	2	8%	---	0	0	3	0.5	0.5	6	6	---	GO:0016491: oxidoreductase activity GO:00046872: metal ion binding	GO:0016491: oxidoreductase activity GO:00046872: metal ion binding	
Periplasmic binding protein OS-Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700884 / mc(2)155) GN:MSMEG_0438 PE:1 SV:1	*	tr A0QPL3 A0QPL3_MYCS2	33 659	4.56	A0QPL3_MYCS2		2	2	8%	---	0	0	3	0.5	0.5	6	6	---	---	---	

Protein name	Annotation UniProtKB	Protein accession numbers	Protein molecular weight (Da)	pI	Protein Name	Symbol	Total number of peptide		Percentage sequence coverage		Number of shared peptide		Total number of spectrum		ID8/ID10	ID8/(mev1 D4-1D10+)	ID8/ID10	ID8/ID10	Function	Process		
							1D4-1D8	1D10	1D4-1D8	1D10	1D4-1D8	1D10	1D4-1D8	1D10								
NusA anti-termination factor O5-Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc2(155) GN:nusA PE=3 SV=1	**	tr A0QVM4 A0QVM4_MYCS2	36 729	5.78	A0QVM4_MYCS2	nusA	3	3	11%	0	3	0.5	3	0.5	6	6	6	GO:000376: nucleic acid binding GO:000370: transcription factor activity, sequence-specific DNA binding GO:000372: RNA binding	GO:000635: transcription, DNA-templated GO:000353: DNA-templated transcription GO:000635: regulation of transcription, DNA-templated GO:001554: regulation of DNA-templated transcription, termination			
Gnrf, family transcriptional regulator O5-Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc2(155) GN:msMEG_2794 PE=4 SV=1	*	tr A0QW37 A0QW37_MYCS2	25 535	5.1	A0QW37_MYCS2	msMEG_2794	3	3	15%	0	3	0.5	3	0.5	6	6	6	GO:000697: DNA binding GO:000370: transcription factor activity, sequence-specific DNA binding	GO:000635: transcription, DNA-templated GO:000355: regulation of transcription, DNA-templated			
Uncharacterized protein O5-Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc2(155) GN:msMEG_3408 PE=4 SV=1)	*	tr A0QX53 A0QX53_MYCS2	21 500	9.29	A0QX53_MYCS2		2	2	11%	0	3	0.5	3	0.5	6	6	6					
Hypoxase, isochorismase family protein O5-Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc2(155) GN:msMEG_4126 PE=3 SV=1)	*	tr A0QZ50 A0QZ50_MYCS2;tr FGE8 FGE8_MYCS2	25 517	5.45	A0QZ50_MYCS2	msMEG_4126	2	2	13%	0	3	0.5	3	0.5	6	6	6	GO:0003824: catalytic activity GO:0016787: hydrolase activity	GO:0006152: metabolic process			
Gpi1 O5-Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc2(155) GN:msMEG_4245 PE=4 SV=1)	**	tr A0R034 A0R034_MYCS2	19 852	6.07	A0R034_MYCS2	msMEG_4245	3	3	21%	0	3	0.5	3	0.5	6	6	6	GO:0003676: nucleic acid binding GO:0004518: nucleic acid activity GO:000457: exonuclease activity GO:0004532: exonuclease activity GO:0008408: 5'-3' exonuclease activity GO:0016787: hydrolase activity GO:004672: metal ion binding	GO:0006152: metabolic process			
Enoyl-CoA hydratase/isomerase O5-Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc2(155) GN:msMEG_4299 PE=4 SV=1)	*	tr A0R088 A0R088_MYCS2	27 316	5.12	A0R088_MYCS2	msMEG_4299	3	3	14%	0	3	0.5	3	0.5	6	6	6	GO:0003824: catalytic activity GO:0016853: isomerase activity	GO:0006152: metabolic process			
Septum formation initiator subfamily protein, putative O5-Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc2(155) GN:msMEG_5414 PE=4 SV=1)	*	tr A0R387 A0R387_MYCS2	41 829	7.04	A0R387_MYCS2	msMEG_5414	3	3	10%	3	3	0.5	3	0.5	6	6	6	GO:0016020: membrane GO:0016021: integral component of membrane	GO:0007049: cell cycle			
Uncharacterized protein O5-Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc2(155) GN:msMEG_1528 PE=4 SV=1)	*	tr A0R579 A0R579_MYCS2	17 534	5.21	A0R579_MYCS2		3	3	24%	3	3	0.5	3	0.5	6	6	6					
Cutinase O5-Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc2(155) GN:msMEG_1528 PE=4 SV=1)	**	tr A0QSM2 A0QSM2_MYCS2	22 430	6.03	A0QSM2_MYCS2	msMEG_1528	5	5	31%	0	7	2	0.5	7	2	14	14	GO:0016787: hydrolase activity GO:0004525: catabolic activity GO:0004508: carboxylester hydrolase activity	GO:0006152: metabolic process			
Puative tuberculin related peptide O5-Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc2(155) GN:msMEG_0834 PE=4 SV=1)	*	tr A0Q000 A0Q000_MYCS2	16 849	4.23	A0Q000_MYCS2		2	3	22%	0	2	7	2	7	0.5	4	4					
4-Hydroxybenzoyl-CoA thioesterase O5-Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc2(155) GN:msMEG_3534 PE=4 SV=1)	*	tr A0Q494 A0Q494_MYCS2	16 132	5.26	A0Q494_MYCS2		2	4	13%	0	2	7	2	7	0.5	4	4					
30S ribosomal protein S4 O5-Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc2(155) GN:msMEG_3534 PE=4 SV=1)	** (reviewed)	sp A0QSL7 RS4_MYCS2	23 376	10.1	RS4_MYCS2	rspD	4	1	24%	0	4	1	0.5	4	1	8	5	GO:000522: intracellular GO:0005840: ribosome GO:0019303: small ribosomal subunit GO:0005625: intracellular ribonucleoprotein complex	GO:0006412: translation			
Asparaginase O5-Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc2(155) GN:msMEG_3534 PE=4 SV=1)	**	tr A0R5N8 A0R5N8_MYCS2	44 458	4.79	A0R5N8_MYCS2	msMEG_6257	3	1	9%	0	4	1	0.5	4	1	8	5	4	GO:000852: cellular amino acid biosynthetic process GO:000908: three on the biosynthetic process GO:000908: lysine biosynthetic process via diaminopimelate GO:0016310: phosphorylation	GO:0006152: metabolic process GO:0006412: translation		
3-oxoacyl-(acyl-carrier-protein) reductase FabG O5-Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc2(155) GN:msMEG_3534 PE=4 SV=2)	** (reviewed)	sp P1433 FABG_MYCS2	26 641	6.12	FABG_MYCS2	fabG	1	3	5%	0	1	4	1	4	0.5	4	5	8	GO:000472: aspartate kinase activity GO:0016301: kinase activity GO:0016740: transferase activity GO:0004316: 3-oxoacyl-(acyl-carrier-protein) reductase (NADPH) activity GO:0016491: oxidoreductase activity GO:000661: NADP binding GO:0012151: 3-oxo-acyl-(acyl) methyl ester reductase activity GO:0012132: 3-oxo-acyl-(acyl) methyl ester reductase activity	GO:0006152: metabolic process GO:0006412: translation		
Uncharacterized protein O5-Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc2(155) GN:msMEG_3235 PE=3 SV=1)	*	tr A0R746 A0R746_MYCS2	15 231	4.43	A0R746_MYCS2		3	2	48%	0	17	6	0.5	17	6	34	5	3	GO:0006228: dUMP biosynthetic process GO:0009117: nucleotide metabolic process GO:004688: dUMP metabolic process	GO:0006152: metabolic process		
Deoxydinine 5'-ribose phosphate nucleotidyltransferase O5-Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc2(155) GN:msMEG_3235 PE=3 SV=1)	** (reviewed)	sp A0QW08 DUT_MYCS2	15 935	5.23	DUT_MYCS2	dut	1	5	11%	0	13	4	1	13	4	13	5	3	GO:0004776: dUTP diphosphatase activity GO:0016787: hydrolase activity GO:004682: metal ion binding	GO:0006152: metabolic process		
ABC-type amino acid transport system, secreted component O5-Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc2(155) GN:msMEG_3235 PE=3 SV=1)	*	tr A0QXB0 A0QXB0_MYCS2	30 706	4.45	A0QXB0_MYCS2	msMEG_3235	8	12	42%	0	0	16	52	4	16	52	4	3	5	13	GO:0006215: transporter activity	GO:0006152: metabolic process
56S ribosomal protein L7/L12 O5-Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc2(155) GN:msMEG_3235 PE=3 SV=1)	**	tr A0Q863 A0Q863_MYCS2	13 459	4.55	A0Q863_MYCS2	rpL	6	4	38%	0	0	35	14	0.5	35	14	70	5	3	GO:000522: intracellular ribosome GO:0005840: ribosome GO:0005625: intracellular ribonucleoprotein complex	GO:0006412: translation	
RNA polymerase-binding transcription factor Card O5-Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc2(155) GN:msMEG_3235 PE=3 SV=1)	** (reviewed)	sp A0R5E1 CARD_MYCS2	17 934	5.48	CARD_MYCS2	card	5	2	41%	0	0	6	2	0.5	6	2	12	5	3	GO:000515: protein binding	---	

Protein name	Annotation UniProtKB	Protein accession numbers	Protein molecular weight (Da)	PI	Protein Name	Symbol	Total number of peptide		Percentage sequence coverage		Number of shared peptide		Total number of spectrum		Total number of spectrum		ID8/mov1D4-1D10+	ID8/mov1D4-1D10+	ID8/ID10+	GO terms	Function	Component	Process
							1D4-1D8	1D10+	1D4-1D8	1D10+	1D4-1D8	1D10+	1D4-1D8	1D10+	1D4-1D8	1D10+							
Glyoxalase II-like protein OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155) GN=MSMEG_4873 PE=4 SV=1	*	tr AQR236 AQR236_MYCS2	14 327	5.24	AQR236_MYCS2	MSMEG_4873	1	3	9%	33%	0	0	2	6	2	6	0.5	3	5	12	GO:005114: oxidation-reduction process	GO:005114: oxidation-reduction process	
Orotate phosphoribosyltransferase OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155) GN=MSMEG_4873 PE=4 SV=1	***	tr AQR6E5 AQR6E5_MYCS2	20 836	5.68	AQR6E5_MYCS2	pyrE	2	10	6%	72%	0	0	2	50	2	50	19	25	5	3	GO:000287: magnesium ion binding GO:0004588: orotate phosphoribosyltransferase activity GO:0016740: transferase activity GO:0016757: transferase activity, transferring glycosyl groups	GO:0051213: dioxynase activity GO:000287: magnesium ion binding GO:0004588: orotate phosphoribosyltransferase activity GO:0016740: transferase activity GO:0016757: transferase activity, transferring glycosyl groups	
2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155) GN=spgma PE=3 SV=1	***	tr AQR000 AQR000_MYCS2	27 301	5.24	AQR000_MYCS2	gpmA	11	18	42%	73%	0	0	17	41	17	41	0.5	2	5	82	GO:0004619: phosphoglycerate mutase activity GO:0016853: isomerase activity GO:0016868: intramolecular transferase activity, phosphotransferases GO:0046538: 2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase activity	GO:0006094: gluconeogenesis GO:0006096: glycolytic process GO:0008152: metabolic process	
Anti-sigma factor antagonist OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155) GN=nsfB PE=3 SV=1	*	tr AQR5B0 AQR5B0_MYCS2	12 028	4.33	AQR5B0_MYCS2	MSMEG_0127	3	6	2%	40%	0	0	4	14	2	4	14	2	4	5	7	GO:0006355: regulation of transcription, DNA-templated	GO:0006355: regulation of transcription, DNA-templated
Uncharacterized protein OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155) GN=MSMEG_6006 PE=4 SV=1	*	tr AQR4Z1 AQR4Z1_MYCS2	22 563	5.64	AQR4Z1_MYCS2	tpx	9	6	51%	33%	0	0	15	6	0.5	15	6	30	5	3	GO:0005623: cell		
Uncharacterized protein OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155) GN=MSMEG_6332 PE=4 SV=1		tr AQR5X9 AQR5X9_MYCS2	17 451	5.06	AQR5X9_MYCS2	tpx	4	3	36%	20%	0	0	8	3	0.5	8	3	16	5	3	GO:0004601: peroxidase activity GO:0008379: thiol peroxidase activity GO:0016209: antioxidant activity GO:0016491: oxidoreductase activity GO:0016684: oxidoreductase activity, acting on peroxide as acceptor	GO:0004601: peroxidase activity GO:0008379: thiol peroxidase activity GO:0016209: antioxidant activity GO:0016491: oxidoreductase activity GO:0016684: oxidoreductase activity, acting on peroxide as acceptor	
Probable lipid peroxidase OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155) GN=tpx PE=3 SV=1		tr AQR4Z5 AQR4Z5_MYCS2	16 832	4.39	AQR4Z5_MYCS2	tpx	1	5	8%	63%	0	0	3	25	8	3	25	8	5	3	GO:0004601: peroxidase activity GO:0008379: thiol peroxidase activity GO:0016209: antioxidant activity GO:0016491: oxidoreductase activity GO:0016684: oxidoreductase activity, acting on peroxide as acceptor	GO:0004601: peroxidase activity GO:0008379: thiol peroxidase activity GO:0016209: antioxidant activity GO:0016491: oxidoreductase activity GO:0016684: oxidoreductase activity, acting on peroxide as acceptor	
Antibiotic biosynthesis monooxygenase OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155) GN=MSMEG_5006 PE=4 SV=1		tr AQR569 AQR569_MYCS2	11 437	5.3	AQR569_MYCS2	MSMEG_5006	7	6	91%	88%	0	0	101	44	0.5	101	44	202	5	2	GO:0004497: monooxygenase activity	GO:0004497: monooxygenase activity	
Two-component system response regulator OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155) GN=MSMEI_3158 PE=4 SV=1		tr I7G1H8 I7G1H8_MYCS2	23 267	5.62	I7G1H8_MYCS2	MSMEL_3158	10	8	56%	56%	0	0	35	15	0.5	35	15	70	5	2	GO:0005622: intracellular	GO:0005622: intracellular	
Transaldolase OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155) GN=tal PE=4 SV=1		sp A0QW93T tal_MYCS2	39 937	4.74	TAL_MYCS2	tal	15	19	50%	64%	0	0	38	86	38	86	0.5	2	4	172	GO:0003824: catalytic activity GO:0004801: sedoheptulose-7-phosphate-D-glyceraldehyde-3-phosphate glycerone transferase activity GO:0016740: transferase activity	GO:0003824: catalytic activity GO:0004801: sedoheptulose-7-phosphate-D-glyceraldehyde-3-phosphate glycerone transferase activity GO:0016740: transferase activity	
Uncharacterized protein OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155) GN=MSMEG_1063 PE=4 SV=1		tr AQR C1 AQR C1_MYCS2	12 021	4.69	AQR C1_MYCS2	MSMEG_5734	6	4	56%	50%	0	0	10	4	0.5	10	4	20	4	3	GO:0003824: catalytic activity GO:0008111: alpha-methylacyl-CoA racemase activity GO:0016853: isomerase activity	GO:0003824: catalytic activity GO:0008111: alpha-methylacyl-CoA racemase activity GO:0016853: isomerase activity	
Elicitor transfer flavoprotein alpha-subunit OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155) GN=etfA PE=4 SV=1		tr I7FZ16 I7FZ16_MYCS2	32 089	/	I7FZ16_MYCS2	etfA	10	9	48%	35%	8	8	35	17	0.5	35	17	70	4	2	GO:0006065: electron carrier activity GO:0006660: iron-sulfur dithiolate binding	GO:0006065: electron carrier activity GO:0006660: iron-sulfur dithiolate binding	
Iron-dependent peroxidase OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155) GN=MSMEG_5567 PE=4 SV=1		tr AQR6J2 AQR6J2_MYCS2	43 385	5.68	AQR6J2_MYCS2	MSMEG_5567	9	4	31%	12%	0	0	11	5	0.5	11	5	22	4	2	GO:0004601: peroxidase activity GO:0020037: heme binding	GO:0004601: peroxidase activity GO:0020037: heme binding	
ParB-like partition proteins OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155) GN=parB PE=4 SV=1		tr AQR7J3 AQR7J3_MYCS2	37 514	5.38	AQR7J3_MYCS2	MSMEG_6938	6	3	20%	12%	0	0	7	3	0.5	7	3	14	4	2	GO:0003877: DNA binding	GO:0003877: DNA binding	
Beta-lactamase OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155) GN=ppw PE=4 SV=1		tr AQR788 AQR788_MYCS2	31 775	/	AQR788_MYCS2	MSMEG_6997	4	2	18%	10%	0	0	5	2	0.5	5	2	10	4	3	GO:0003877: DNA binding	GO:0003877: DNA binding	
Ribosome-binding factor A OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155) GN=rfa PE=3 SV=1		sp AQV8B rfa_MYCS2	16 595	4.9	RFA_MYCS2	rfa	3	1	23%	6%	0	0	3	1	0.5	3	1	6	4	3	GO:0003877: DNA binding GO:0003916: DNA topoisomerase activity GO:0003918: DNA topoisomerase type II (ATP-hydrolyzing) activity GO:000524: ATP binding GO:0016853: isomerase activity GO:0034335: DNA supercoiling activity GO:0046872: metal ion binding	GO:0003877: DNA binding GO:0003916: DNA topoisomerase activity GO:0003918: DNA topoisomerase type II (ATP-hydrolyzing) activity GO:000524: ATP binding GO:0016853: isomerase activity GO:0034335: DNA supercoiling activity GO:0046872: metal ion binding	
Transcriptional regulator, Fis family OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155) GN=MSMEG_0833 PE=4 SV=1		tr AQR9P9 AQR9P9_MYCS2	11 862	9.68	AQR9P9_MYCS2	MSMEG_0833	1	1	16%	16%	0	0	3	1	0.5	3	1	6	4	3	GO:0003877: DNA binding GO:0003916: DNA topoisomerase activity GO:0003918: DNA topoisomerase type II (ATP-hydrolyzing) activity GO:000524: ATP binding GO:0016853: isomerase activity GO:0034335: DNA supercoiling activity GO:0046872: metal ion binding	GO:0003877: DNA binding GO:0003916: DNA topoisomerase activity GO:0003918: DNA topoisomerase type II (ATP-hydrolyzing) activity GO:000524: ATP binding GO:0016853: isomerase activity GO:0034335: DNA supercoiling activity GO:0046872: metal ion binding	
Transcriptional regulator OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155) GN=gyrB PE=4 SV=1		sp AQNE0 gyrB_MYCS2	74 513	5.74	GYRB_MYCS2	gyrB	1	4	1%	7%	0	0	4	1	1	4	1	4	4	4	GO:0005684: chromosome GO:0005737: cytoplasm	GO:0005684: chromosome GO:0005737: cytoplasm	
DNA gyrase subunit B OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155) GN=gyrB PE=1 SV=1		sp AQNE0 gyrB_MYCS2	74 513	5.74	GYRB_MYCS2	gyrB	1	4	1%	7%	0	0	4	1	1	4	1	4	4	4	GO:0005684: chromosome GO:0005737: cytoplasm	GO:0005684: chromosome GO:0005737: cytoplasm	

Protein name	Annotation UniProtKB	Protein accession numbers	Protein molecule weight (Da)	pI	Protein Name	Symbol	Total number of peptide		Percentage sequence coverage		Number of shared peptide		Total number of spectrum		1D8/ID4	1D8/(mox)1-D4-1'D10	1D8/ID10	Function	Process
							1D4-1D8	1D10	1D4-1D8	1D10	1D4-1D8	1D10	1D4-1D8	1D10					
Deoxydiphosphate triphosphate deaminase OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155) GN=dcd PE=1 SV=1		sp A0Q089 DCD_MYCS2	20 640	5.5	DCD_MYCS2	dcd	1	1	9%	0	2	0.5	2	0.5	4	4	4	GO:0008226: dUMP biosynthetic process GO:0008228: dUTP biosynthetic process GO:0016797: lysozyme activity	GO:0008226: dUMP biosynthetic process GO:0008228: dUTP biosynthetic process GO:0016797: lysozyme activity
Toxin Doc OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155) GN=doc PE=1 SV=1		sp A0QRV0 DOC_MYCS2	13 972	4.45	DOC_MYCS2	doc	2	2	28%	0	2	0.5	2	0.5	4	4	4	GO:0016301: kinase activity	GO:0016301: kinase activity
Ribosome maturation factor RlmM OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155) GN=rmm PE=1 SV=1		sp A0QV29 RMM_MYCS2	18 366	4.66	RMM_MYCS2	rmm	2	2	16%	0	2	0.5	2	0.5	4	4	4	GO:005322: ribosome binding	GO:005322: ribosome binding
Cell wall synthesis protein WagS1 OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155) GN=wagS1 PE=1 SV=1		sp A0R060 WAGS1_MYCS2	29 545	4.57	WAGS1_MYCS2	wagS1	2	2	8%	0	2	0.5	2	0.5	4	4	4	GO:0007489: cell cycle	GO:0007489: cell cycle
Oxidoreductase, FAD-linked OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155) GN=msmEG_0521 PE=4 SV=1		tr A0QP46 A0QPM6_MYCS2	42 395	/			2	2	37%	0	2	0.5	2	0.5	4	4	4		
GntR-family protein transcriptional regulator OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155) GN=MSMEG_0535 PE=4 SV=1		tr A0QPV8 A0QPV8_MYCS2;tr G123 G123_MYCS2	23 532	5.34	A0QPV8_MYCS2	MSMEG_0535	1	2	6%	0	2	0.5	2	0.5	4	4	4	GO:000677: DNA binding GO:0003700: transcription factor activity, sequence-specific DNA binding	GO:000677: DNA binding GO:0003700: transcription factor activity, sequence-specific DNA binding
Mpr protein OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155) GN=MSMEG_1236 PE=4 SV=1		tr A0QRT9 A0QRT9_MYCS2	22 959	4.52	A0QRT9_MYCS2	MSMEG_1236	2	2	15%	0	2	0.5	2	0.5	4	4	4	GO:0016020: membrane of membrane	---
ZOG-Fe(II) oxygenase OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155) GN=MSMEG_1299 PE=4 SV=1		tr A0Q301 A0Q301_MYCS2	38 340	5.16	A0Q301_MYCS2	MSMEG_1299	2	2	7%	0	2	0.5	2	0.5	4	4	4	GO:0016491: oxidoreductase activity	GO:0055114: oxidation-reduction process
Universal stress protein family protein OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155) GN=MSMEG_1624 PE=4 SV=1		tr A0QSH3 A0QSH3_MYCS2	30 825	5.63	A0QSH3_MYCS2	MSMEG_1624	2	2	8%	0	2	0.5	2	0.5	4	4	4	GO:0006960: response to stress	GO:0006960: response to stress
L-Donate 5-dehydrogenase OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155) GN=MSMEG_2914 PE=3 SV=1		tr A0QWE4 A0QWE4_MYCS2	32 709	5.3	A0QWE4_MYCS2	MSMEG_2914	2	2	6%	0	2	0.5	2	0.5	4	4	4	GO:0008270: zinc ion binding GO:0016491: oxidoreductase activity GO:0046872: metal ion binding GO:0050572: L-donate 5-dehydrogenase activity	GO:0008270: zinc ion binding GO:0016491: oxidoreductase activity GO:0046872: metal ion binding GO:0050572: L-donate 5-dehydrogenase activity
Conserved membrane glycoprotein rich protein OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155) GN=MSMEG_3000 PE=4 SV=1		tr A0QW09 A0QW09_MYCS2	31 421	4.7			2	2	9%	0	2	0.5	2	0.5	4	4	4		
ABC transporter solute-binding protein OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155) GN=MSMEG_4834 PE=4 SV=1		tr A0QXF3 A0QXF3_MYCS2	43 077	4.47	A0QXF3_MYCS2	MSMEG_3280	2	2	9%	0	2	0.5	2	0.5	4	4	4	GO:0042397: periplasmic space	GO:0015846: polyamine transport
Uncharacterized protein OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155) GN=MSMEG_4834 PE=4 SV=1		tr A0R0S8 A0R0S8_MYCS2	10 050	4.29	A0R0S8_MYCS2	MSMEG_4484	2	2	18%	0	2	0.5	2	0.5	4	4	4	GO:0003824: catalytic activity	---
Uncharacterized protein OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155) GN=MSMEG_4831 PE=4 SV=1		tr A0R156 A0R156_MYCS2;tr G07 G07_MYCS2	19 915	4.07			2	2	14%	0	2	0.5	2	0.5	4	4	4	GO:0003576: nucleic acid binding GO:000677: DNA binding GO:003884: damage-DNA binding GO:0003824: catalytic activity GO:0003906: DNA-dependent or pyrimidinic nucleic acid binding GO:0016797: lysozyme activity GO:0016798: hydrolase activity, acting on glycosyl bonds GO:0016799: hydrolase activity, hydrolyzing N-glycosyl compounds GO:0016828: lyase activity GO:0046872: metal ion binding	GO:0003576: nucleic acid binding GO:000677: DNA binding GO:003884: damage-DNA binding GO:0003824: catalytic activity GO:0003906: DNA-dependent or pyrimidinic nucleic acid binding GO:0016797: lysozyme activity GO:0016798: hydrolase activity, acting on glycosyl bonds GO:0016799: hydrolase activity, hydrolyzing N-glycosyl compounds GO:0016828: lyase activity GO:0046872: metal ion binding
Uncharacterized protein OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155) GN=MSMEG_5822 PE=4 SV=1		tr A0R1Y9 A0R1Y9_MYCS2	11 461	10.72			1	1	14%	0	2	0.5	2	0.5	4	4	4		
Isochorismate synthase OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155) GN=MSMEG_5876 PE=4 SV=1		tr A0R239 A0R239_MYCS2	20 689	4.63	A0R239_MYCS2	MSMEG_4976	2	2	15%	0	2	0.5	2	0.5	4	4	4	GO:0003824: catalytic activity GO:0016797: hydrolase activity	GO:0003824: catalytic activity GO:0016797: hydrolase activity
Uncharacterized protein OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155) GN=MSMEG_5884 PE=4 SV=1		tr A0R344 A0R344_MYCS2	6 052	5.76			1	1	25%	0	2	0.5	2	0.5	4	4	4		
Transcriptional regulatory protein OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155) GN=MSMEG_5784 PE=4 SV=1		tr A0R4C4 A0R4C4_MYCS2;tr GEU0 GEU0_MYCS2	27 883	5.11	A0R4C4_MYCS2	MSMEG_5784	1	2	5%	0	2	0.5	2	0.5	4	4	4	GO:000677: DNA binding	GO:000677: DNA binding
Uncharacterized protein OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155) GN=MSMEG_5784 PE=4 SV=1		tr A0R4D7 A0R4D7_MYCS2	6 429	5.26			1	1	46%	0	2	0.5	2	0.5	4	4	4		
LjPDE protein OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155) GN=MSMEG_6076 PE=4 SV=1		tr A0R562 A0R562_MYCS2	19 107	4.26			1	1	7%	0	2	0.5	2	0.5	4	4	4		

Protein name	Annotation UniprotKB	Protein accession numbers	Protein molecular weight (Da)	PI	Protein Name	Symbol	Total number of peptide			Percentage sequence coverage			Number of shared peptide			Total number of spectrum			1D8/ID 4-	1D8/(moy1 D4-(1D10)+	1D8/ID10 +	Component	Function	Process
							1D4-1D8	1D10+	1D4-1D8	1D10+	1D4-1D8	1D10+	1D4-1D8	1D10+	1D4-1D8	1D10+	1D4-1D8	1D10+						
Purative membrane-anchored thiooxidin-like protein (Thio-difluide interchange related protein) OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700884 / mc(2)155) GN=MSMEG_5188 PE=4 SV=1		tr A0R5G8 A0R5G8_MYCS2	22739	4.57	A0R5G8_MYCS2	MSMEG_6186	2		7%	0	0	0	2	0.5	2	0.5	2	4	4	4	GO:005523: cell process	GO:004554: cell redox homeostasis GO:005114: oxidation-reduction process GO:009882: cellular oxidant detoxification		
Uncharacterized protein OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700884 / mc(2)155) GN=MSMEG_6475 PE=4 SV=1		tr A0R6M0 A0R6M0_MYCS2	18745	5.22			2		16%	0	0	0	2	0.5	2	0.5	2	4	4	4				
Transcriptional regulator, XRE family, OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700884 / mc(2)155) GN=MSMEI_5389 PE=4 SV=1		tr I7FKK4 I7FKK4_MYCS2	12132	6.07	I7FKK4_MYCS2	MSMEI_5389	2		23%	0	0	0	2	0.5	2	0.5	2	4	4	4	GO:003877: DNA binding GO:004356: sequence-specific DNA binding	---		
Uncharacterized protein OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700884 / mc(2)155) GN=MSMEI_2948 PE=4 SV=1		tr I7G15I I7G15I_MYCS2	27994	6.24			1		7%	0	0	0	2	0.5	2	0.5	2	4	4	4				
Pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzyme, beta subunit OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700884 / mc(2)155) GN=MSMEI_3453 PE=4 SV=1		tr I7G9WH I7G9WH_MYCS2	34993	6.02			2		8%	0	0	0	2	0.5	2	0.5	2	4	4	4				
ATP synthase subunit alpha OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700884 / mc(2)155) GN=MSMEI_3904 PE=1 SV=1		sp A0R202 A0R202_MYCS2	59889	4.84	ATPA_MYCS2	atpA	1	3	2%	0	0	0	1	3	1	3	0.5	3	4	4	GO:000588: plasma membrane GO:001620: membrane GO:0045261: proton-transporting ATP synthase complex, catalytic core (F1)	GO:000165: nucleotide binding GO:000540: ATP binding GO:001598: ATP synthesis coupled proton transport GO:001592: proton transport GO:0046034: ATP metabolic process GO:009132: ATP hydrolysis coupled cation transmembrane transport		
3-isopropylmalate dehydratase small subunit OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700884 / mc(2)155) GN=MSMEI_2738 PE=4 SV=1		tr A0QVY4 A0QVY4_MYCS2	86193	4.06	A0QVY4_MYCS2	MSMEG_2738	1	3	3%	0	0	0	1	3	1	3	0.5	3	4	6	GO:000361: 3-isopropylmalate dehydratase activity GO:001622: lyase activity	GO:000152: metabolic process GO:000652: cellular amino acid biosynthetic process GO:009362: branched-chain amino acid biosynthetic process GO:000908: lactic biosynthetic process		
Conserved transmembrane alanine and glycine rich protein OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700884 / mc(2)155) GN=MSMEG_3904 PE=4 SV=1		tr A0QZ56 A0QZ56_MYCS2	19244	4.35			1	3	9%	0	0	0	1	3	1	3	0.5	3	4	6	GO:001620: membrane of membrane	---		
Purative transcriptional regulator family protein OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700884 / mc(2)155) GN=MSMEG_3013 PE=4 SV=1		tr A0QWP3 A0QWP3_MYCS2	17461	6.3	A0QWP3_MYCS2	MSMEG_3013	3	4	25%	0	0	0	3	8	1	3	8	1	3	4	8	GO:000633: transcription, DNA-templated GO:006325: regulation of transcription, DNA-templated		
Uncharacterized protein OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700884 / mc(2)155) GN=MSMEG_0901 PE=4 SV=1		tr A0QVW6 A0QVW6_MYCS2	16541	4.63			3	4	24%	0	0	0	6	14	1	6	14	1	2	4	14			
Alpha-beta hydrolase fold protein OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700884 / mc(2)155) GN=MSMEG_6906 PE=4 SV=1		tr A0R7G7 A0R7G7_MYCS2	33317	5.37	A0R7G7_MYCS2	MSMEG_6906	3	5	16%	0	0	0	3	7	3	7	0.5	2	4	14	GO:001678: hydrolase activity	---		
30S ribosomal protein S2 OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700884 / mc(2)155) GN=MSMEG_3070 PE=4 SV=1		sp A0QVW8 A0QVW8_MYCS2	30108	5.83	RS2_MYCS2	rpsB	4	8	16%	0	0	0	6	13	6	13	0.5	2	4	26	GO:000562: intracellular GO:000540: ribosome GO:001593: small ribosomal subunit GO:003628: intracellular ribonucleoprotein complex	GO:000642: translation		
LipG protein OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700884 / mc(2)155) GN=MSMEG_6906 PE=4 SV=1		tr A0R7G7 A0R7G7_MYCS2	24108	4.46	LPRG_MYCS2	lprG	4	7	5%	0	0	0	8	30	8	30	8	4	4	4	GO:000628: plasma membrane	GO:000810: transport GO:000698: lipid transport		
Purative thioisolate sulfurtransferase OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700884 / mc(2)155) GN=MSMEG_5789 PE=1 SV=1		sp A0R4C9 I7HTR_MYCS2	30986	4.97	THTR_MYCS2	MSMEG_5789	2	20	16%	0	0	0	2	190	104	2	190	104	95	4	2	GO:000473: thioisolate sulfurtransferase activity GO:001740: transferase activity	---	
Steroid Delta-isomerase OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700884 / mc(2)155) GN=MSMEG_5789 PE=1 SV=1		tr A0R2W6 A0R2W6_MYCS2	13253	4.55	A0R2W6_MYCS2	MSMEG_5258	2	5	21%	0	0	0	4	8	4	8	0.5	2	4	16	GO:000478: steroid delta-isomerase activity GO:001653: isomerase activity	---		
Hydroxylase, catalytic domain protein OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700884 / mc(2)155) GN=MSMEG_0924 PE=4 SV=1		tr A0QY19 A0QY19_MYCS2	27750	4.87	A0QY19_MYCS2	MSMEG_0924	1	5	3%	0	0	0	1	7	3	1	7	3	7	4	2	GO:000607: hydroxylase activity GO:0016810: hydroxylase activity, acting on carbon-nitrogen (but not peptide) bonds	GO:000697: nitrogen compound metabolic process	
Sulfate-binding lipoprotein Sblp OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700884 / mc(2)155) GN=MSMEG_4533 PE=4 SV=1		tr A0R0W7 A0R0W7_MYCS2	36663	4.79	A0R0W7_MYCS2	MSMEG_4533	9	13	37%	0	0	0	25	44	25	44	0.5	2	3	88	3	GO:0015419: Atase-coupled sulfate transmembrane transporter activity	GO:000572: sulfate transport GO:009133: ATP hydrolysis coupled cation transmembrane transport GO:190258: sulfate transmembrane transport	
Glutathione peroxidase OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700884 / mc(2)155) GN=MSMEG_5837 PE=3 SV=1		tr A0R4H6 A0R4H6_MYCS2	17204	4.54	A0R4H6_MYCS2	MSMEG_5837	4	5	2	39%	0	0	5	13	3	5	13	3	4	4	4	GO:000460: peroxidase activity GO:0004602: glutathione peroxidase activity GO:0016491: oxidoreductase activity	GO:000679: response to oxidative stress GO:005114: oxidation-reduction GO:009882: cellular oxidant detoxification	

Protein name	Annotation UniProtKB	Protein accession numbers	Protein molecular weight (Da)	PI	Protein Name	Symbol	Total number of peptide		Percentage sequence coverage		Number of shared peptide		Total number of spectrum				1D8/ID10		1D8/ID10		Component	Function	Process				
							1D4-1D8	1D10	1D4-1D8	1D10	1D4-1D8	1D10	1D4-1D8	1D10	1D4-1D8	1D10	1D4-1D8	1D10	1D4-1D8	1D10				1D4-1D8	1D10	1D4-1D8	1D10
Uncharacterized oxidoreductase MSMEG_2408/MSMEI_2347 OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc2155) GN=MSMEG_2408 PE=1 SV=1		sp AQ01V1 Y2408_MYCS2	30 222	5.06	Y2408_MYCS2	MSMEG_2408	5	8	30%	83%	0	0	18	30	18	30	0.5	2	3	60	---	GO:0016491: oxidoreductase activity	GO:0055114: oxidation-reduction process				
RNA polymerase-binding protein Rbpa OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc2155) GN=rbaA PE=1 SV=2		sp AQ0211 RBP_A_MYCS2	13 057	5.47	RBP_A_MYCS2	rbaA	1	6	14%	42%	0	0	1	8	4	1	8	4	3	2	---	GO:0001000: bacterial-type RNA polymerase core enzyme binding	GO:0006351: transcription, DNA-templated GO:0006355: regulation of transcription, DNA-templated GO:0048983: positive regulation of transcription, DNA-templated GO:0055114: oxidation-reduction process GO:0069531: response to antibiotic				
GNR-family protein transcriptional regulator OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc2155) PE=4 SV=1		tr AQ0UD9 AQ0UD9_MYCS2	25 285	5.38	AQ0UD9_MYCS2	MSMEG_2173	4	2	27%	10%	0	0	4	2	0.5	4	2	8	3	2	---	GO:0003677: DNA binding GO:0003700: transcription factor activity, sequence-specific DNA binding	GO:0006351: transcription, DNA-templated GO:0006355: regulation of transcription, DNA-templated				
Bacterial extracellular solute-binding protein, family protein 5 OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc2155) GN=MSMEG_2363 PE=4 SV=1		tr AQ0V41 AQ0V41_MYCS2	58 292	4.84			2	4	6%	8%	0	0	2	4	2	4	0.5	2	3	8	---						
Cupin 2, conserved barrel OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc2155) GN=MSMEG_2671 PE=3 SV=1		tr AQ0V60 AQ0V60_MYCS2	10 948	5.19			8	7	79%	77%	0	0	35	35	0.5	55	35	110	3	2	---						
Short chain alcohol dehydrogenase (NADP+) OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc2155) GN=MSMEG_3819 PE=4 SV=1		tr AQ0YD1 AQ0YD1_MYCS2	23 464	5.08			11	14	66%	87%	0	0	21	33	21	33	0.5	2	3	66	---						
Uncharacterized protein OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc2155) GN=MSMEG_1936 PE=4 SV=1		tr AQ0YR4 AQ0YR4_MYCS2	37 341	5.21	AQ0YR4_MYCS2	MSMEG_1936	1	3	4%	12%	0	0	1	3	1	1	3	1	3	3	3	GO:0016020: membrane GO:0016021: integral component of membrane	GO:0004827: metalloprotease activity GO:0006270: zinc ion binding				
3'(2',5')-bisphosphate nucleotidase, putative OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc2155) GN=MSMEG_4977 PE=4 SV=1		tr AQ0Z40 AQ0Z40_MYCS2	25 921	4.92	AQ0Z40_MYCS2	MSMEG_4977	4	6	20%	31%	7%	0	5	9	1	5	9	1	2	3	9	---	GO:000654: phosphatidylcholine phosphorylation				
Phosphoserine isomerase OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc2155) GN=MSMEG_3541		tr AQ0Z68 AQ0Z68_MYCS2	26 409	4.55	AQ0Z68_MYCS2	priA	4	4	24%	23%	0	0	5	8	5	8	0.5	2	3	16	---	GO:0003824: catalytic activity GO:0004849: L-tyrosine phosphatase activity GO:0005737: cytoplasm GO:000654: phosphatidylcholine phosphorylation GO:0006545: metabolic process GO:0006546: metabolic process GO:0006547: metabolic process GO:0006548: cellular amino acid biosynthetic process GO:0006549: aromatic amino acid biosynthetic process GO:0006550: family biosynthetic process					
Translation initiation factor IF-3 OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc2155) GN=IFC3 PE=3 SV=1		tr IFG568 IFG568_MYCS2	30 619	/	IFG568_MYCS2	ifc3	7	5	31%	23%	0	0	15	10	0.5	15	10	30	3	2	GO:0005737: cytoplasm	GO:0004745: translation initiation factor activity GO:0006543: translational initiation					
Lysin domain protein OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc2155) GN=MSMEG_2862 PE=4 SV=1		tr AQ0YH7 AQ0YH7_MYCS2	21 922	4.54	AQ0YH7_MYCS2	MSMEG_2862	3	7	26%	40%	24%	0	0	8	20	6	8	6	3	3	3	---	GO:0030246: carbohydrate binding				
Glucosaminide-6-phosphate deaminase OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc2155) GN=nagB PE=1 SV=1		sp AQ0U88 nagB_MYCS2	28 038	5.44	nagB_MYCS2	nagB	3	3	13%	17%	0	0	3	5	3	5	0.5	2	3	10	---	GO:0004342: glucosamine-6-phosphate deaminase activity GO:0016787: hydrolase activity	GO:0006545: carbohydrate metabolic process GO:0006044: N-acetylglucosamine metabolic process GO:0019262: N-acetylneuraminate catabolic process				
Cullinase Curt OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc2155) GN=cur1 PE=4 SV=1		tr AQ0NX2 AQ0NX2_MYCS2	24 080	4.41	AQ0NX2_MYCS2	MSMEG_0194	3	2	18%	14%	0	0	3	5	3	5	0.5	2	3	10	---	GO:0016787: hydrolase activity	GO:0006545: metabolic process				
Riboflavin synthase alpha chain OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc2155) GN=rbsA PE=1 SV=1		tr AQ0WU9 AQ0WU9_MYCS2	20 809	4.76	AQ0WU9_MYCS2	rbsA	2	4	14%	25%	0	0	3	5	3	5	0.5	2	3	10	---	GO:0004746: riboflavin synthase activity GO:0016491: oxidoreductase activity GO:0016740: transferase activity	GO:0055114: oxidation-reduction process				
Triosephosphate isomerase OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc2155) GN=tpaA PE=3 SV=1		tr AQ0WV4 AQ0WV4_MYCS2	27 377	5.5	AQ0WV4_MYCS2	tpaA	9	20	51%	83%	82%	0	0	14	162	105	14	162	105	12	2	---	GO:0003824: catalytic activity GO:0004807: triose-phosphate isomerase activity GO:0016853: isomerase activity	GO:0006984: glycolysis GO:0006986: glycolysis GO:0006988: pentose-phosphate shunt			
Electron transfer flavoprotein, alpha subunit OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc2155) GN=etfA PE=4 SV=1		tr AQ0U77 AQ0U77_MYCS2	31 557	4.77	AQ0U77_MYCS2	etfA	8	8	44%	31%	8	8	22	16	0.5	22	16	44	3	1	---	GO:0009655: electron carrier activity GO:0009660: flavin adenine dinucleotide binding	GO:0008150: transport				
Oxidoreductase FAD-binding region OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc2155) GN=ihdA PE=5 SV=1		tr IFRW33 IFRW33_MYCS2	43 510	6.07	IFRW33_MYCS2	MSMEI_0702	1	3	4%	13%	7%	0	0	1	4	2	1	4	2	3	2	---	GO:0003440: oxygen transporter activity GO:0016491: oxidoreductase activity GO:0019825: oxygen binding GO:0030246: carbohydrate binding GO:0046872: metal ion binding	GO:0006810: transport GO:0015571: oxygen transport GO:0055114: oxidation-reduction process			
Puative RNA binding protein, contains S1 domain (Puative transcriptional accessory protein, RNA binding) OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc2155) GN=MSMEI_2765 PE=4 SV=1		tr ITG9M1 ITG9M1_MYCS2	85 835	5.84	ITG9M1_MYCS2	MSMEI_2765	1	4	2%	8%	3%	0	0	1	4	2	1	4	2	4	3	2	---	GO:0006139: nucleobase-containing compound metabolic process			
5S ribosomal protein L11 OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc2155) GN=rplK PE=1 SV=1		sp AQ0S45 R11_MYCS2	15 003	9.52	R11_MYCS2	rplK	1	1	10%	10%	0	0	2	1	0.5	2	1	4	3	2	---	GO:0003723: RNA binding GO:0006735: structural constituent of ribosome GO:0019843: RNA binding	GO:0006412: translation				
30S ribosomal protein S8 OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc2155) GN=rpsH PE=1 SV=1		sp AQ0S33 R38_MYCS2	14 471	/	R38_MYCS2	rpsH	1	1	12%	9%	0	0	2	1	0.5	2	1	4	3	2	---	GO:0003723: RNA binding GO:0006735: structural constituent of ribosome GO:0019843: RNA binding	GO:0006412: translation				
Gp36 protein OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc2155) GN=MSMEG_2142 PE=4 SV=1		tr AQ0UB1 AQ0UB1_MYCS2 tr G9S1 G9S1_MYCS2	25 734	5.63			2	1	11%	6%	0	0	2	1	0.5	2	1	4	3	2	---						

Protein name	Annotation UniProtKB	Protein accession numbers	Protein molecule weight (Da)	PI	Protein Name	Symbol	Total number of peptide			Percentage sequence coverage			Number of shared peptide			Total number of spectrum			1D8/ID 4-	1D8(moxy1 D4-1D10b) +	1D8/ID10 +	Component	Function	Process
							1D4-1D8 +	1D10 +	1D4-1D8 +	1D10 +	1D4-1D8 +	1D10 +	1D4-1D8 +	1D10 +	1D4-1D8 +	1D10 +								
Purified secreted protein OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 70084 / mcd(2155) GN=MSMEG_3494 PE=4 SV=1		tr AAQY10 AAQY10_MYCS2.tr I7G9S9 I7G9S9_MYCS2	17 534	6,27			2	1	14%	0	0	2	1	0,5	2	1	4	3	2					
Exonuclease III OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 70084 / mcd(2155) GN=nth PE=3 SV=1		tr AQR5G9 AQR5G9_MYCS2	28 834	9,3	AQR5G9_MYCS2	nth	2	1	9%	0	0	2	1	0,5	2	1	4	3	2				GO:000877: DNA binding GO:000324: catalytic activity GO:000398: DNA-dependent or ATP-dependent lyase activity GO:000439: nuclease activity GO:001672: hydrolase activity GO:001678: hydrolase activity, acting on glycosyl bonds GO:001682: lyase activity GO:001904: DNA N-glycosylase activity GO:0046872: metal ion binding GO:0051536: iron-sulfur cluster binding GO:0051538: 4 iron, 4 sulfur cluster binding	GO:0005961: DNA repair GO:0006284: base excision repair GO:0006974: cellular response to DNA damage stimulus GO:0008152: metabolic process GO:0009305: nucleic acid phosphodiester bond hydrolysis
Translation initiation factor IF-2 OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 70084 / mcd(2155) GN=iMB PE=3 SV=1		tr I7FJV9 I7FJV9_MYCS2	96 885	6,84	I7FJV9_MYCS2	iMB	2	1	2%	0	0	2	1	0,5	2	1	4	3	2				GO:000168: nucleotide binding GO:0003743: translation initiation factor activity GO:0003924: GTPase activity GO:0005225: GTP binding	GO:0006412: translation GO:0006413: translational initiation
Uncharacterized protein OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 70084 / mcd(2155) GN=MSMEI_1847 PE=4 SV=1		tr I7G9N9 I7G9N9_MYCS2	14 856	4,41			1	1	10%	0	0	2	1	0,5	2	1	4	3	2					
50S ribosomal protein L29 OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 70084 / mcd(2155) GN=rpnc PE=3 SV=1		sp AAQSD9 RL29_MYCS2	8 778	5,49	RL29_MYCS2	rpnc	1	2	13%	0	0	1	2	1	2	0,5	2	3	4				GO:0005522: intracellular ribosome GO:0005523: ribosome GO:0005525: ribonucleoprotein complex	GO:0003735: structural constituent of ribosome GO:0006412: translation
Alkaline phosphatase OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 70084 / mcd(2155) GN=MSMEG_102 PE=3 SV=1		tr AQR75 AQR75_MYCS2	53 697	4,5	AQR75_MYCS2	MSMEG_102	1	1	2%	0	0	1	2	1	2	0,5	2	3	4				GO:0003824: catalytic activity GO:0004035: alkaline phosphatase activity GO:0016787: hydrolase activity GO:0016791: phosphatase activity	GO:0008152: metabolic process GO:0016311: dephosphorylation
Uncharacterized protein OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 70084 / mcd(2155) GN=MSMEG_1961 PE=4 SV=1		tr AAQT19 AAQT19_MYCS2	29 221	5,29			1	2	4%	0	0	1	2	1	2	0,5	2	3	4					
MerR-family protein transcriptional regulator OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 70084 / mcd(2155) GN=MSMEG_2194 PE=4 SV=1		tr AQCUP9 AQCUP9_MYCS2	29 146	5,05	AQCUP9_MYCS2	MSMEG_2194	1	2	7%	0	0	1	2	1	2	0,5	2	3	4				GO:0006355: regulation of transcription, DNA-templated	
Uncharacterized protein OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 70084 / mcd(2155) GN=MSMEG_2647 PE=4 SV=1		tr AQCVP6 AQCVP6_MYCS2	37 441	5,9	AQCVP6_MYCS2	MSMEG_2647	1	2	5%	0	0	1	2	1	2	0,5	2	3	4				GO:0016787: hydrolase activity	
Uncharacterized protein OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 70084 / mcd(2155) GN=MSMEG_4476 PE=4 SV=1		tr AQR0R1 AQR0R1_MYCS2	11 694	5,26			1	1	11%	0	0	1	2	1	2	0,5	2	3	4					
Uncharacterized protein OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 70084 / mcd(2155) GN=MSMEG_6365 PE=4 SV=1		tr AQR5Z0 AQR5Z0_MYCS2	18 945	4,52	BPA_MYCS2	bpa	1	2	6%	0	0	1	2	1	2	0,5	2	3	4				GO:0006922: proteasome complex	GO:0006136: regulation of proteasomal protein catabolic process
Methionine-S-adenosyltransferase OS=Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 70084 / mcd(2155) GN=msrB PE=4 SV=1		tr AQCWZ7 AQCWZ7_MYCS2	15 459	5,2	AQCWZ7_MYCS2	msrB	4	6	31%	0	0	6	9	1	6	9	1	2	3	9			GO:0016491: oxidoreductase activity GO:0016571: oxidoreductase activity, acting on a sulfur group of donors, disulfide as acceptor GO:0033745: peptide-methionine (R)-S-oxide hydrolase activity GO:0046872: metal ion binding	GO:0006979: response to oxidative stress GO:0030091: protein repair GO:0051714: oxidation-reduction process

ANNEXE 2

Tableau récapitulatif des protéines candidates de *M. smegmatis* sélectionnées pour la fonction endo-D-arabinase à partir des analyses LC-MS de la première et seconde campagne de purification.

Le tableau présenté ci-dessous contient uniquement les protéines candidates ayant été retenues suite à la seconde campagne de purification de l'endo-D-arabinase chez *M. smegmatis* et aux analyses LC-MS. Cette seconde campagne a été réalisée selon les mêmes conditions que la première en ajoutant ici une troisième étape de purification par gel-filtration.

Les données qui ont été répertoriées dans ce tableau concernent trois fractions comme précédemment (ici 1H3 fraction d'intérêt, 1H1 fraction adjacente positive et 1H6 fraction adjacente négative). Les différentes valeurs qui avaient été obtenues lors de la première campagne ainsi que le score ont également été remis dans le tableau pour comparaison.

BIBLIOGRAPHIE

1. *Essentials of Glycobiology*; Varki, A., Cummings, R.D., Esko, J.D., Freeze, H.H., Stanley, P., Bertozzi, C.R., Hart, G.W., Etzler, M.E., Eds.; 2nd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor (NY), 2009; ISBN 978-0-87969-770-9.
2. Poole, J.; Day, C.J.; von Itzstein, M.; Paton, J.C.; Jennings, M.P. Glycointeractions in bacterial pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology* **2018**, *16*, 440–452.
3. Springer, S.A.; Gagneux, P. Glycan Evolution in Response to Collaboration, Conflict, and Constraint. *Journal of Biological Chemistry* **2013**, *288*, 6904–6911.
4. Wheat, W.H.; Dhouib, R.; Angala, S.K.; Larrouy-Maumus, G.; Dobos, K.; Nigou, J.; Spencer, J.S.; Jackson, M. The Presence of a Galactosamine Substituent on the Arabinogalactan of Mycobacterium tuberculosis Abrogates Full Maturation of Human Peripheral Blood Monocyte-Derived Dendritic cells and Increases Secretion of IL-10. *Tuberculosis (Edinb)* **2015**, *95*, 476–489.
5. Tra, V.N.; Dube, D.H. Glycans in pathogenic bacteria – potential for targeted covalent therapeutics and imaging agents. *Chem Commun (Camb)* **2014**, *50*, 4659–4673.
6. Hippocrate The genuine work of Hippocrates. *Williams and Wilkins* **1939**.
7. Roux, G. Contribution à l'étude de la morphologie et de la biologie du champignon du Muguet. *Publications de la Société Linnéenne de Lyon* **1889**, *7*, 29–37.
8. Berg, F. Om Torsk hos Barn. *Royal College of Physicians, London* **1846**.
9. Montagna, M.T.; Caggiano, G.; Lovero, G.; De Giglio, O.; Coretti, C.; Cuna, T.; Iatta, R.; Giglio, M.; Dalfino, L.; Bruno, F.; et al. Epidemiology of invasive fungal infections in the intensive care unit: results of a multicenter Italian survey (AURORA Project). *Infection* **2013**, *41*, 645–653.
10. Pappas, P.G. Invasive Candidiasis. *Infectious Disease Clinics of North America* **2006**, *20*, 485–506.
11. Kett, D.H.; Azoulay, E.; Echeverria, P.M.; Vincent, J.-L.; Extended Prevalence of Infection in ICU Study (EPIC II) Group of Investigators Candida bloodstream infections in intensive care units: analysis of the extended prevalence of infection in intensive care unit study. *Crit. Care Med.* **2011**, *39*, 665–670.
12. Vincent, J.-L.; Rello, J.; Marshall, J.; Silva, E.; Anzueto, A.; Martin, C.D.; Moreno, R.; Lipman, J.; Gomersall, C.; Sakr, Y.; et al. International Study of the Prevalence and Outcomes of Infection in Intensive Care Units. *JAMA* **2009**, *302*, 2323–2329.
13. Colombo, A.L.; Guimarães, T.; Sukienik, T.; Pasqualotto, A.C.; Andreotti, R.; Queiroz-Telles, F.; Nouér, S.A.; Nucci, M. Prognostic factors and historical trends in the epidemiology of candidemia in critically ill patients: an analysis of five multicenter studies sequentially conducted over a 9-year period. *Intensive Care Med* **2014**, *40*, 1489–1498.
14. Schelenz, S.; Barnes, R.A.; Barton, R.C.; Cleverley, J.R.; Lucas, S.B.; Kibbler, C.C.; Denning, D.W. British Society for Medical Mycology best practice recommendations for the diagnosis of serious fungal diseases. *The Lancet Infectious Diseases* **2015**, *15*, 461–474.
15. Clancy, C.J.; Nguyen, M.H. Finding the “missing 50%” of invasive candidiasis: how nonculture diagnostics will improve understanding of disease spectrum and transform patient care. *Clin. Infect. Dis.* **2013**, *56*, 1284–1292.
16. Karageorgopoulos, D.E.; Vouloumanou, E.K.; Ntziora, F.; Michalopoulos, A.; Rafailidis, P.I.; Falagas, M.E. β -D-glucan assay for the diagnosis of invasive fungal infections: a meta-analysis. *Clin. Infect. Dis.* **2011**, *52*, 750–770.
17. Mikulska, M.; Calandra, T.; Sanguinetti, M.; Poulain, D.; Viscoli, C.; Third European Conference on Infections in Leukemia Group The use of mannan antigen and anti-mannan antibodies in the

- diagnosis of invasive candidiasis: recommendations from the Third European Conference on Infections in Leukemia. *Crit Care* **2010**, *14*, R222.
18. Mylonakis, E.; Clancy, C.J.; Ostrosky-Zeichner, L.; Garey, K.W.; Alangaden, G.J.; Vazquez, J.A.; Groeger, J.S.; Judson, M.A.; Vinagre, Y.-M.; Heard, S.O.; et al. T2 magnetic resonance assay for the rapid diagnosis of candidemia in whole blood: a clinical trial. *Clin. Infect. Dis.* **2015**, *60*, 892–899.
 19. Santos, M.A.; Tuite, M.F. The CUG codon is decoded in vivo as serine and not leucine in *Candida albicans*. *Nucleic Acids Res* **1995**, *23*, 1481–1486.
 20. Fitzpatrick, D.A.; Logue, M.E.; Stajich, J.E.; Butler, G. A fungal phylogeny based on 42 complete genomes derived from supertree and combined gene analysis. *BMC Evolutionary Biology* **2006**, *15*.
 21. Byrne, K.P.; Wolfe, K.H. Consistent patterns of rate asymmetry and gene loss indicate widespread neofunctionalization of yeast genes after whole-genome duplication. *Genetics* **2007**, *175*, 1341–1350.
 22. Muñoz, P.; Sánchez-Somolinos, M.; Alcalá, L.; Rodríguez-Créixems, M.; Peláez, T.; Bouza, E. *Candida krusei* fungaemia: antifungal susceptibility and clinical presentation of an uncommon entity during 15 years in a single general hospital. *J. Antimicrob. Chemother.* **2005**, *55*, 188–193.
 23. Butler, G.; Rasmussen, M.D.; Lin, M.F.; Santos, M.A.S.; Sakthikumar, S.; Munro, C.A.; Rheinbay, E.; Grabherr, M.; Forche, A.; Reedy, J.L.; et al. Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature* **2009**, *459*, 657–662.
 24. Bougnoux, M.-E.; Tavanti, A.; Bouchier, C.; Gow, N. a. R.; Magnier, A.; Davidson, A.D.; Maiden, M.C.J.; D’Enfert, C.; Odds, F.C. Collaborative consensus for optimized multilocus sequence typing of *Candida albicans*. *J. Clin. Microbiol.* **2003**, *41*, 5265–5266.
 25. Dodgson, A.R.; Pujol, C.; Denning, D.W.; Soll, D.R.; Fox, A.J. Multilocus sequence typing of *Candida glabrata* reveals geographically enriched clades. *J. Clin. Microbiol.* **2003**, *41*, 5709–5717.
 26. Tavanti, A.; Davidson, A.D.; Johnson, E.M.; Maiden, M.C.J.; Shaw, D.J.; Gow, N.A.R.; Odds, F.C. Multilocus Sequence Typing for Differentiation of Strains of *Candida tropicalis*. *Journal of Clinical Microbiology* **2005**, *43*, 5593–5600.
 27. Hull, C.M.; Johnson, A.D. Identification of a mating type-like locus in the asexual pathogenic yeast *Candida albicans*. *Science* **1999**, *285*, 1271–1275.
 28. Hull, C.M.; Raisner, R.M.; Johnson, A.D. Evidence for mating of the “asexual” yeast *Candida albicans* in a mammalian host. *Science* **2000**, *289*, 307–310.
 29. Magee, B.B.; Magee, P.T. Induction of Mating in *Candida albicans* by Construction of MTL α and MTL α Strains. *Science* **2000**, *289*, 310–313.
 30. Slutsky, B.; Staebell, M.; Anderson, J.; Risen, L.; Pfaller, M.; Soll, D.R. “White-opaque transition”: a second high-frequency switching system in *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* **1987**, *169*, 189–197.
 31. Miller, M.G.; Johnson, A.D. White-opaque switching in *Candida albicans* is controlled by mating-type locus homeodomain proteins and allows efficient mating. *Cell* **2002**, *110*, 293–302.
 32. Bennett, R.J.; Johnson, A.D. Mating in *Candida albicans* and the search for a sexual cycle. *Annu. Rev. Microbiol.* **2005**, *59*, 233–255.
 33. Bennett, R.J.; Uhl, M.A.; Miller, M.G.; Johnson, A.D. Identification and characterization of a *Candida albicans* mating pheromone. *Mol. Cell. Biol.* **2003**, *23*, 8189–8201.

34. Forche, A.; Alby, K.; Schaefer, D.; Johnson, A.D.; Berman, J.; Bennett, R.J. The parasexual cycle in *Candida albicans* provides an alternative pathway to meiosis for the formation of recombinant strains. *PLoS Biol.* **2008**, *6*, e110.
35. Bennett, R.J. Coming of Age—Sexual Reproduction in *Candida* Species. *PLoS Pathog* **2010**, *6*.
36. Alby, K.; Schaefer, D.; Bennett, R.J. Homothallic and heterothallic mating in the opportunistic pathogen *Candida albicans*. *Nature* **2009**, *460*, 890–893.
37. Lohse, M.B.; Johnson, A.D. White-opaque switching in *Candida albicans*. *Curr. Opin. Microbiol.* **2009**, *12*, 650–654.
38. Huang, G.; Srikantha, T.; Sahni, N.; Yi, S.; Soll, D.R. CO(2) regulates white-to-opaque switching in *Candida albicans*. *Curr. Biol.* **2009**, *19*, 330–334.
39. Huang, G.; Yi, S.; Sahni, N.; Daniels, K.J.; Srikantha, T.; Soll, D.R. N-Acetylglucosamine Induces White to Opaque Switching, a Mating Prerequisite in *Candida albicans*. *PLOS Pathogens* **2010**, *6*, e1000806.
40. Reedy, J.L.; Floyd, A.M.; Heitman, J. Mechanistic plasticity of sexual reproduction and meiosis in the *Candida* pathogenic species complex. *Curr. Biol.* **2009**, *19*, 891–899.
41. Papon, N.; Courdavault, V.; Clastre, M.; Bennett, R.J. Emerging and Emerged Pathogenic *Candida* Species: Beyond the *Candida albicans* Paradigm. *PLoS Pathog* **2013**, *9*.
42. Pfaller, M.A.; Diekema, D.J. Epidemiology of Invasive Candidiasis: a Persistent Public Health Problem. *Clin Microbiol Rev* **2007**, *20*, 133–163.
43. Jones, T.; Federspiel, N.A.; Chibana, H.; Dungan, J.; Kalman, S.; Magee, B.B.; Newport, G.; Thorstenson, Y.R.; Agabian, N.; Magee, P.T.; et al. The diploid genome sequence of *Candida albicans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, *101*, 7329–7334.
44. Braun, B.R.; Hoog, M. van het; d’Enfert, C.; Martchenko, M.; Dungan, J.; Kuo, A.; Inglis, D.O.; Uhl, M.A.; Hogues, H.; Berriman, M.; et al. A Human-Curated Annotation of the *Candida albicans* Genome. *PLOS Genetics* **2005**, *1*, e1.
45. Stenderup, A.; Pedersen, G.T. Yeasts of human origin. *Acta Pathol Microbiol Scand* **1962**, *54*, 462–472.
46. Fidel, P.L.; Vazquez, J.A.; Sobel, J.D. *Candida glabrata*: Review of Epidemiology, Pathogenesis, and Clinical Disease with Comparison to *C. albicans*. *Clin Microbiol Rev* **1999**, *12*, 80–96.
47. Li, L.; Redding, S.; Dongari-Bagtzoglou, A. *Candida glabrata*: an emerging oral opportunistic pathogen. *J. Dent. Res.* **2007**, *86*, 204–215.
48. Nucci, M.; Colombo, A.L. Candidemia due to *Candida tropicalis*: clinical, epidemiologic, and microbiologic characteristics of 188 episodes occurring in tertiary care hospitals. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2007**, *58*, 77–82.
49. Colombo, A.L.; Guimarães, T.; Silva, L.R.B.F.; de Almeida Monfardini, L.P.; Cunha, A.K.B.; Rady, P.; Alves, T.; Rosas, R.C. Prospective observational study of candidemia in São Paulo, Brazil: incidence rate, epidemiology, and predictors of mortality. *Infect Control Hosp Epidemiol* **2007**, *28*, 570–576.
50. Porman, A.M.; Hirakawa, M.P.; Jones, S.K.; Wang, N.; Bennett, R.J. MTL-independent phenotypic switching in *Candida tropicalis* and a dual role for *Wor1* in regulating switching and filamentation. *PLoS Genet.* **2013**, *9*, e1003369.
51. Trofa, D.; Gácsér, A.; Nosanchuk, J.D. *Candida parapsilosis*, an Emerging Fungal Pathogen. *Clin Microbiol Rev* **2008**, *21*, 606–625.

52. Voss, A.; Hollis, R.J.; Pfaller, M.A.; Wenzel, R.P.; Doebbeling, B.N. Investigation of the sequence of colonization and candidemia in nonneutropenic patients. *Journal of Clinical Microbiology* **1994**, *32*, 975.
53. Tavanti, A.; Davidson, A.D.; Gow, N.A.R.; Maiden, M.C.J.; Odds, F.C. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. To Replace *Candida parapsilosis* Groups II and III. *J Clin Microbiol* **2005**, *43*, 284–292.
54. Riccombeni, A.; Vidanes, G.; Proux-Wéra, E.; Wolfe, K.H.; Butler, G. Sequence and Analysis of the Genome of the Pathogenic Yeast *Candida orthopsilosis*. *PLOS ONE* **2012**, *7*, e35750.
55. Papon, N.; Savini, V.; Lanoue, A.; Simkin, A.J.; Crèche, J.; Giglioli-Guivarc’h, N.; Clastre, M.; Courdavault, V.; Sibirny, A.A. *Candida guilliermondii*: biotechnological applications, perspectives for biological control, emerging clinical importance and recent advances in genetics. *Curr. Genet.* **2013**, *59*, 73–90.
56. Savini, V.; Catavittello, C.; Onofrillo, D.; Masciarelli, G.; Astolfi, D.; Balbinot, A.; Febbo, F.; D’Amario, C.; D’Antonio, D. What do we know about *Candida guilliermondii*? A voyage throughout past and current literature about this emerging yeast. *Mycoses* **2011**, *54*, 434–441.
57. Gow, N.A.R.; van de Veerdonk, F.L.; Brown, A.J.P.; Netea, M.G. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nature Reviews Microbiology* **2012**, *10*, 112–122.
58. Berman, J.; Sudbery, P.E. *Candida Albicans*: a molecular revolution built on lessons from budding yeast. *Nat. Rev. Genet.* **2002**, *3*, 918–930.
59. Soll, D.R. Why does *Candida albicans* switch? *FEMS Yeast Res.* **2009**, *9*, 973–989.
60. Odds, F.C. *Candida and candidosis: a review and bibliography*. 2nd edition. *Candida and candidosis: a review and bibliography. 2nd edition.* **1988**.
61. Jacobsen, I.D.; Wilson, D.; Wächtler, B.; Brunke, S.; Naglik, J.R.; Hube, B. *Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target. *Expert Rev Anti Infect Ther* **2012**, *10*, 85–93.
62. Saville, S.P.; Lazzell, A.L.; Monteagudo, C.; Lopez-Ribot, J.L. Engineered control of cell morphology in vivo reveals distinct roles for yeast and filamentous forms of *Candida albicans* during infection. *Eukaryotic Cell* **2003**, *2*, 1053–1060.
63. Lo, H.J.; Köhler, J.R.; DiDomenico, B.; Loebenberg, D.; Cacciapuoti, A.; Fink, G.R. Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell* **1997**, *90*, 939–949.
64. Garcia, M.C.; Lee, J.T.; Ramsook, C.B.; Alsteens, D.; Dufrêne, Y.F.; Lipke, P.N. A Role for Amyloid in Cell Aggregation and Biofilm Formation. *PLOS ONE* **2011**, *6*, e17632.
65. Phan, Q.T.; Myers, C.L.; Fu, Y.; Sheppard, D.C.; Yeaman, M.R.; Welch, W.H.; Ibrahim, A.S.; Edwards, J.E.; Filler, S.G. Als3 Is a *Candida albicans* Invasin That Binds to Cadherins and Induces Endocytosis by Host Cells. *PLoS Biol* **2007**, *5*.
66. Staab, J.F.; Bradway, S.D.; Fidel, P.L.; Sundstrom, P. Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* Hwp1. *Science* **1999**, *283*, 1535–1538.
67. Zhu, W.; Filler, S.G. Interactions of *Candida albicans* with epithelial cells. *Cell. Microbiol.* **2010**, *12*, 273–282.
68. Sun, J.N.; Solis, N.V.; Phan, Q.T.; Bajwa, J.S.; Kashleva, H.; Thompson, A.; Liu, Y.; Dongari-Bagtzoglou, A.; Edgerton, M.; Filler, S.G. Host Cell Invasion and Virulence Mediated by *Candida albicans* Ssa1. *PLOS Pathogens* **2010**, *6*, e1001181.
69. Naglik, J.R.; Moyes, D.L.; Wächtler, B.; Hube, B. *Candida albicans* interactions with epithelial cells and mucosal immunity. *Microbes Infect.* **2011**, *13*, 963–976.

70. Dalle, F.; Wächtler, B.; L'Ollivier, C.; Holland, G.; Bannert, N.; Wilson, D.; Labruère, C.; Bonnin, A.; Hube, B. Cellular interactions of *Candida albicans* with human oral epithelial cells and enterocytes. *Cell. Microbiol.* **2010**, *12*, 248–271.
71. Martinez-Lopez, R.; Park, H.; Myers, C.L.; Gil, C.; Filler, S.G. *Candida albicans* Ecm33p is important for normal cell wall architecture and interactions with host cells. *Eukaryotic Cell* **2006**, *5*, 140–147.
72. Park, H.; Myers, C.L.; Sheppard, D.C.; Phan, Q.T.; Sanchez, A.A.; Edwards, J.; Filler, S.G. Role of the fungal Ras-protein kinase A pathway in governing epithelial cell interactions during oropharyngeal candidiasis. *Cell. Microbiol.* **2005**, *7*, 499–510.
73. Naglik, J.R.; Moyes, D.; Makwana, J.; Kanzaria, P.; Tsihklaki, E.; Weindl, G.; Tappuni, A.R.; Rodgers, C.A.; Woodman, A.J.; Challacombe, S.J.; et al. Quantitative expression of the *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase gene family in human oral and vaginal candidiasis. *Microbiology* **2008**, *154*, 3266–3280.
74. Theiss, S.; Ishdorj, G.; Brenot, A.; Kretschmar, M.; Lan, C.-Y.; Nichterlein, T.; Hacker, J.; Nigam, S.; Agabian, N.; Köhler, G.A. Inactivation of the phospholipase B gene PLB5 in wild-type *Candida albicans* reduces cell-associated phospholipase A2 activity and attenuates virulence. *Int. J. Med. Microbiol.* **2006**, *296*, 405–420.
75. Fanning, S.; Mitchell, A.P. Fungal Biofilms. *PLoS Pathogens* **2012**, *8*, e1002585.
76. Douglas, L.J. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol.* **2003**, *11*, 30–36.
77. Andes, D.; Nett, J.; Oschel, P.; Albrecht, R.; Marchillo, K.; Pitula, A. Development and characterization of an in vivo central venous catheter *Candida albicans* biofilm model. *Infect. Immun.* **2004**, *72*, 6023–6031.
78. Uppuluri, P.; Chaturvedi, A.K.; Srinivasan, A.; Banerjee, M.; Ramasubramaniam, A.K.; Köhler, J.R.; Kadosh, D.; Lopez-Ribot, J.L. Dispersion as an important step in the *Candida albicans* biofilm developmental cycle. *PLoS Pathog.* **2010**, *6*, e1000828.
79. Robbins, N.; Uppuluri, P.; Nett, J.; Rajendran, R.; Ramage, G.; Lopez-Ribot, J.L.; Andes, D.; Cowen, L.E. Hsp90 Governs Dispersion and Drug Resistance of Fungal Biofilms. *PLOS Pathogens* **2011**, *7*, e1002257.
80. Finkel, J.S.; Mitchell, A.P. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. *Nat Rev Microbiol* **2011**, *9*, 109–118.
81. Ding, C.; Butler, G. Development of a Gene Knockout System in *Candida parapsilosis* Reveals a Conserved Role for BCR1 in Biofilm Formation. *Eukaryot Cell* **2007**, *6*, 1310–1319.
82. Mulhern, S.M.; Logue, M.E.; Butler, G. *Candida albicans* transcription factor Ace2 regulates metabolism and is required for filamentation in hypoxic conditions. *Eukaryotic Cell* **2006**, *5*, 2001–2013.
83. Mavor, A.L.; Thewes, S.; Hube, B. Systemic fungal infections caused by *Candida* species: epidemiology, infection process and virulence attributes. *Curr Drug Targets* **2005**, *6*, 863–874.
84. Koh, A.Y.; Köhler, J.R.; Coggshall, K.T.; Rooijen, N.V.; Pier, G.B. Mucosal Damage and Neutropenia Are Required for *Candida albicans* Dissemination. *PLOS Pathogens* **2008**, *4*, e35.
85. Egi, M.; Bellomo, R.; Stachowski, E.; French, C.J.; Hart, G.K.; Hegarty, C.; Bailey, M. Blood glucose concentration and outcome of critical illness: the impact of diabetes. *Crit. Care Med.* **2008**, *36*, 2249–2255.
86. Lorenz, M.C.; Bender, J.A.; Fink, G.R. Transcriptional response of *Candida albicans* upon internalization by macrophages. *Eukaryotic Cell* **2004**, *3*, 1076–1087.

87. Brown, A.J.P.; Haynes, K.; Gow, N.A.R.; Quinn, J. Stress Responses in Candida. *Candida and Candidiasis, Second Edition* **2012**, 225–242.
88. Wächtler, B.; Wilson, D.; Haedicke, K.; Dalle, F.; Hube, B. From Attachment to Damage: Defined Genes of *Candida albicans* Mediate Adhesion, Invasion and Damage during Interaction with Oral Epithelial Cells. *PLOS ONE* **2011**, *6*, e17046.
89. Martchenko, M.; Alarco, A.-M.; Harcus, D.; Whiteway, M. Superoxide Dismutases in *Candida albicans*: Transcriptional Regulation and Functional Characterization of the Hyphal-induced SOD5 Gene. *Mol Biol Cell* **2004**, *15*, 456–467.
90. Hromatka, B.S.; Noble, S.M.; Johnson, A.D. Transcriptional response of *Candida albicans* to nitric oxide and the role of the YHB1 gene in nitrosative stress and virulence. *Mol. Biol. Cell* **2005**, *16*, 4814–4826.
91. Brown, A.J.P.; Brown, G.D.; Netea, M.G.; Gow, N.A.R. Metabolism impacts upon *Candida* immunogenicity and pathogenicity at multiple levels. *Trends in Microbiology* **2014**, *22*, 614–622.
92. Casadevall, A.; Pirofski, L. The damage-response framework of microbial pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology* **2003**, *1*, 17–24.
93. Qin, Y.; Zhang, L.; Xu, Z.; Zhang, J.; Jiang, Y.; Cao, Y.; Yan, T. Innate immune cell response upon *Candida albicans* infection. *Virulence* **2016**, *7*, 512–526.
94. Netea, M.G.; Brown, G.D.; Kullberg, B.J.; Gow, N.A.R. An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *Nat. Rev. Microbiol.* **2008**, *6*, 67–78.
95. Janeway, C.A.; Medzhitov, R. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* **2002**, *20*, 197–216.
96. Naglik, J.R.; Moyes, D. Epithelial Cell Innate Response to *Candida albicans*. *Adv Dent Res* **2011**, *23*, 50–55.
97. Akira, S.; Takeda, K. Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* **2004**, *4*, 499–511.
98. Sasai, M.; Yamamoto, M. Pathogen recognition receptors: ligands and signaling pathways by Toll-like receptors. *Int. Rev. Immunol.* **2013**, *32*, 116–133.
99. Gauglitz, G.G.; Callenberg, H.; Weindl, G.; Korting, H.C. Host defence against *Candida albicans* and the role of pattern-recognition receptors. *Acta Derm. Venereol.* **2012**, *92*, 291–298.
100. Netea, M.G.; Maródi, L. Innate immune mechanisms for recognition and uptake of *Candida* species. *Trends Immunol.* **2010**, *31*, 346–353.
101. Netea, M.G.; van de Veerdonk, F.; Verschuere, I.; van der Meer, J.W.M.; Kullberg, B.J. Role of TLR1 and TLR6 in the host defense against disseminated candidiasis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **2008**, *52*, 118–123.
102. van de Veerdonk, F.L.; Netea, M.G.; Jansen, T.J.; Jacobs, L.; Verschuere, I.; van der Meer, J.W.M.; Kullberg, B.J. Redundant role of TLR9 for anti-*Candida* host defense. *Immunobiology* **2008**, *213*, 613–620.
103. Biondo, C.; Malara, A.; Costa, A.; Signorino, G.; Cardile, F.; Midiri, A.; Galbo, R.; Papasergi, S.; Domina, M.; Pugliese, M.; et al. Recognition of fungal RNA by TLR7 has a nonredundant role in host defense against experimental candidiasis. *Eur. J. Immunol.* **2012**, *42*, 2632–2643.
104. Zelensky, A.N.; Gready, J.E. The C-type lectin-like domain superfamily. *FEBS J.* **2005**, *272*, 6179–6217.
105. Hardison, S.E.; Brown, G.D. C-type lectin receptors orchestrate antifungal immunity. *Nat. Immunol.* **2012**, *13*, 817–822.

106. Plato, A.; Hardison, S.E.; Brown, G.D. Pattern recognition receptors in antifungal immunity. *Semin Immunopathol* **2015**, *37*, 97–106.
107. Ferwerda, B.; Ferwerda, G.; Plantinga, T.S.; Willment, J.A.; van Sriel, A.B.; Venselaar, H.; Elbers, C.C.; Johnson, M.D.; Cambi, A.; Huysamen, C.; et al. Human Dectin-1 Deficiency and Mucocutaneous Fungal Infections. *New England Journal of Medicine* **2009**, *361*, 1760–1767.
108. Iliev, I.D.; Funari, V.A.; Taylor, K.D.; Nguyen, Q.; Reyes, C.N.; Strom, S.P.; Brown, J.; Becker, C.A.; Fleshner, P.R.; Dubinsky, M.; et al. Interactions between commensal fungi and the C-type lectin receptor Dectin-1 influence colitis. *Science* **2012**, *336*, 1314–1317.
109. Saijo, S.; Ikeda, S.; Yamabe, K.; Kakuta, S.; Ishigame, H.; Akitsu, A.; Fujikado, N.; Kusaka, T.; Kubo, S.; Chung, S.; et al. Dectin-2 recognition of alpha-mannans and induction of Th17 cell differentiation is essential for host defense against *Candida albicans*. *Immunity* **2010**, *32*, 681–691.
110. Whibley, N.; Jaycox, J.R.; Reid, D.; Garg, A.V.; Taylor, J.A.; Clancy, C.J.; Nguyen, M.H.; Biswas, P.S.; McGeachy, M.J.; Brown, G.D.; et al. Delinking CARD9 and IL-17: CARD9 Protects against *Candida tropicalis* Infection through a TNF- α -Dependent, IL-17-Independent Mechanism. *J. Immunol.* **2015**, *195*, 3781–3792.
111. Heinsbroek, S.E.M.; Taylor, P.R.; Martinez, F.O.; Martinez-Pomares, L.; Brown, G.D.; Gordon, S. Stage-specific sampling by pattern recognition receptors during *Candida albicans* phagocytosis. *PLoS Pathog.* **2008**, *4*, e1000218.
112. Lee, S.J.; Zheng, N.-Y.; Clavijo, M.; Nussenzweig, M.C. Normal host defense during systemic candidiasis in mannose receptor-deficient mice. *Infect. Immun.* **2003**, *71*, 437–445.
113. Kohatsu, L.; Hsu, D.K.; Jegalian, A.G.; Liu, F.-T.; Baum, L.G. Galectin-3 induces death of *Candida* species expressing specific beta-1,2-linked mannans. *J. Immunol.* **2006**, *177*, 4718–4726.
114. Tamai, R.; Kiyoura, Y. *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* rapidly up-regulate galectin-3 secretion by human gingival epithelial cells. *Mycopathologia* **2014**, *177*, 75–79.
115. Cambi, A.; Gijzen, K.; de Vries, I.J.M.; Torensma, R.; Joosten, B.; Adema, G.J.; Netea, M.G.; Kullberg, B.-J.; Romani, L.; Figdor, C.G. The C-type lectin DC-SIGN (CD209) is an antigen-uptake receptor for *Candida albicans* on dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* **2003**, *33*, 532–538.
116. Yamasaki, S.; Matsumoto, M.; Takeuchi, O.; Matsuzawa, T.; Ishikawa, E.; Sakuma, M.; Tateno, H.; Uno, J.; Hirabayashi, J.; Mikami, Y.; et al. C-type lectin Mincle is an activating receptor for pathogenic fungus, *Malassezia*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2009**, *106*, 1897–1902.
117. Rudkin, F.M.; Bain, J.M.; Walls, C.; Lewis, L.E.; Gow, N.A.R.; Erwig, L.P. Altered dynamics of *Candida albicans* phagocytosis by macrophages and PMNs when both phagocyte subsets are present. *MBio* **2013**, *4*, e00810-00813.
118. Miramón, P.; Dunker, C.; Windecker, H.; Bohovych, I.M.; Brown, A.J.P.; Kurzai, O.; Hube, B. Cellular responses of *Candida albicans* to phagocytosis and the extracellular activities of neutrophils are critical to counteract carbohydrate starvation, oxidative and nitrosative stress. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e52850.
119. Wright, H.L.; Moots, R.J.; Bucknall, R.C.; Edwards, S.W. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. *Rheumatology (Oxford)* **2010**, *49*, 1618–1631.
120. Gresnigt, M.S.; Joosten, L.A.B.; Verschueren, I.; van der Meer, J.W.M.; Netea, M.G.; Dinarello, C.A.; van de Veerdonk, F.L. Neutrophil-mediated inhibition of proinflammatory cytokine responses. *J. Immunol.* **2012**, *189*, 4806–4815.
121. Amulic, B.; Cazalet, C.; Hayes, G.L.; Metzler, K.D.; Zychlinsky, A. Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annu. Rev. Immunol.* **2012**, *30*, 459–489.

122. Ramirez-Ortiz, Z.G.; Means, T.K. The role of dendritic cells in the innate recognition of pathogenic fungi (*A. fumigatus*, *C. neoformans* and *C. albicans*). *Virulence* **2012**, *3*, 635–646.
123. Cambi, A.; Netea, M.G.; Mora-Montes, H.M.; Gow, N.A.R.; Hato, S.V.; Lowman, D.W.; Kullberg, B.-J.; Torensma, R.; Williams, D.L.; Figdor, C.G. Dendritic cell interaction with *Candida albicans* critically depends on N-linked mannan. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 20590–20599.
124. de Repentigny, L.; Lewandowski, D.; Jolicoeur, P. Immunopathogenesis of oropharyngeal candidiasis in human immunodeficiency virus infection. *Clin. Microbiol. Rev.* **2004**, *17*, 729–759, table of contents.
125. Naglik, J.R. *Candida* Immunity. *New Journal of Science* **2014**, *2014*, 1–27.
126. Chaffin, W.L. *Candida albicans* Cell Wall Proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2008**, *72*, 495–544.
127. van de Veerdonk, F.L.; Netea, M.G. T-cell Subsets and Antifungal Host Defenses. *Curr Fungal Infect Rep* **2010**, *4*, 238–243.
128. Ripeau, J.-S.; Aumont, F.; Belhumeur, P.; Ostrosky-Zeichner, L.; Rex, J.H.; Repentigny, L. de Effect of the Echinocandin Caspofungin on Expression of *Candida albicans* Secretory Aspartyl Proteinases and Phospholipase In Vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2002**, *46*, 3096–3100.
129. Bal, A.M. The echinocandins: three useful choices or three too many? *Int. J. Antimicrob. Agents* **2010**, *35*, 13–18.
130. Cannon, R.D.; Lamping, E.; Holmes, A.R.; Niimi, K.; Baret, P.V.; Keniya, M.V.; Tanabe, K.; Niimi, M.; Goffeau, A.; Monk, B.C. Efflux-mediated antifungal drug resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **2009**, *22*, 291–321, Table of Contents.
131. Hitchcock, C.A.; Dickinson, K.; Brown, S.B.; Evans, E.G.; Adams, D.J. Interaction of azole antifungal antibiotics with cytochrome P-450-dependent 14 alpha-sterol demethylase purified from *Candida albicans*. *Biochem J* **1990**, *266*, 475–480.
132. Martin, M.V. The use of fluconazole and itraconazole in the treatment of *Candida albicans* infections: a review. *J Antimicrob Chemother* **1999**, *44*, 429–437.
133. Barker, K.S.; Rogers, P.D. Recent insights into the mechanisms of antifungal resistance. *Curr Infect Dis Rep* **2006**, *8*, 449–456.
134. Vermes, A.; Guchelaar, H.J.; Dankert, J. Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. *J. Antimicrob. Chemother.* **2000**, *46*, 171–179.
135. Abaci, O.; Haliki-Uztan, A. Investigation of susceptibility of *Candida* species isolated from denture wearers to different antifungal antibiotics. *ResearchGate* **2011**.
136. Espinel-Ingroff, A. Mechanisms of resistance to antifungal agents: yeasts and filamentous fungi. *Rev Iberoam Micol* **2008**, *25*, 101–106.
137. Papon, N.; Noël, T.; Florent, M.; Gibot-Leclerc, S.; Jean, D.; Chastin, C.; Villard, J.; Chapeland-Leclerc, F. Molecular Mechanism of Flucytosine Resistance in *Candida lusitanae*: Contribution of the *FCY2*, *FCY1*, and *FUR1* Genes to 5-Fluorouracil and Fluconazole Cross-Resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **2007**, *51*, 369–371.
138. Kollef, M.; Micek, S.; Hampton, N.; Doherty, J.A.; Kumar, A. Septic shock attributed to *Candida* infection: importance of empiric therapy and source control. *Clin. Infect. Dis.* **2012**, *54*, 1739–1746.

139. Morrell, M.; Fraser, V.J.; Kollef, M.H. 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.* **2005**, *49*, 3640–3645.
140. Klis, F.M.; Groot, P.D.; Hellingwerf, K. Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans*. *Medical Mycology* **2001**, *8*.
141. Mio, T.; Adachi-Shimizu, M.; Tachibana, Y.; Tabuchi, H.; Inoue, S.B.; Yabe, T.; Yamada-Okabe, T.; Arisawa, M.; Watanabe, T.; Yamada-Okabe, H. Cloning of the *Candida albicans* homolog of *Saccharomyces cerevisiae* GSC1/FKS1 and its involvement in beta-1,3-glucan synthesis. *J. Bacteriol.* **1997**, *179*, 4096–4105.
142. Kondoh, O.; Tachibana, Y.; Ohya, Y.; Arisawa, M.; Watanabe, T. Cloning of the RHO1 gene from *Candida albicans* and its regulation of beta-1,3-glucan synthesis. *J. Bacteriol.* **1997**, *179*, 7734–7741.
143. Campbell, J.A.; Davies, G.J.; Bulone, V.; Henrissat, B. A classification of nucleotide-diphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* **1997**, *326* (Pt 3), 929–939.
144. Douglas, C.M. Fungal beta(1,3)-D-glucan synthesis. *Med. Mycol.* **2001**, *39 Suppl 1*, 55–66.
145. Walker, L.A.; Munro, C.A.; Bruijn, I. de; Lenardon, M.D.; McKinnon, A.; Gow, N.A.R. Stimulation of Chitin Synthesis Rescues *Candida albicans* from Echinocandins. *PLOS Pathogens* **2008**, *4*, e1000040.
146. Mouyna, I.; Fontaine, T.; Vai, M.; Monod, M.; Fonzi, W.A.; Diaquin, M.; Popolo, L.; Hartland, R.P.; Latgé, J.P. Glycosylphosphatidylinositol-anchored glucanosyltransferases play an active role in the biosynthesis of the fungal cell wall. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 14882–14889.
147. Mühlischlegel, F.A.; Fonzi, W.A. PHR2 of *Candida albicans* encodes a functional homolog of the pH-regulated gene PHR1 with an inverted pattern of pH-dependent expression. *Mol. Cell. Biol.* **1997**, *17*, 5960–5967.
148. Fonzi, W.A. PHR1 and PHR2 of *Candida albicans* encode putative glycosidases required for proper cross-linking of beta-1,3- and beta-1,6-glucans. *J. Bacteriol.* **1999**, *181*, 7070–7079.
149. Klippel, N.; Cui, S.; Groebe, L.; Bilitewski, U. Deletion of the *Candida albicans* histidine kinase gene CHK1 improves recognition by phagocytes through an increased exposure of cell wall beta-1,3-glucans. *Microbiology (Reading, Engl.)* **2010**, *156*, 3432–3444.
150. Gantner, B.N.; Simmons, R.M.; Underhill, D.M. Dectin-1 mediates macrophage recognition of *Candida albicans* yeast but not filaments. *The EMBO Journal* **2005**, *24*, 1277–1286.
151. Wheeler, R.T.; Kombe, D.; Agarwala, S.D.; Fink, G.R. Dynamic, Morphotype-Specific *Candida albicans* β -Glucan Exposure during Infection and Drug Treatment. *PLoS Pathog* **2008**, *4*.
152. Herrero, A.B.; Magnelli, P.; Mansour, M.K.; Levitz, S.M.; Bussey, H.; Abeijon, C. KRE5 gene null mutant strains of *Candida albicans* are avirulent and have altered cell wall composition and hypha formation properties. *Eukaryotic Cell* **2004**, *3*, 1423–1432.
153. Rubin-Bejerano, I.; Abeijon, C.; Magnelli, P.; Grisafi, P.; Fink, G.R. Phagocytosis by human neutrophils is stimulated by a unique fungal cell wall component. *Cell Host Microbe* **2007**, *2*, 55–67.
154. Munro, C.A.; Gow, N.A. Chitin synthesis in human pathogenic fungi. *Med. Mycol.* **2001**, *39 Suppl 1*, 41–53.
155. Minke, R.; Blackwell, J. The structure of α -chitin. *Journal of Molecular Biology* **1978**, *120*, 167–181.

156. Baker, L.G.; Specht, C.A.; Donlin, M.J.; Lodge, J.K. Chitosan, the Deacetylated Form of Chitin, Is Necessary for Cell Wall Integrity in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell* **2007**, *6*, 855–867.
157. Munro, C.A.; Winter, K.; Buchan, A.; Henry, K.; Becker, J.M.; Brown, A.J.; Bulawa, C.E.; Gow, N.A. Chs1 of *Candida albicans* is an essential chitin synthase required for synthesis of the septum and for cell integrity. *Mol. Microbiol.* **2001**, *39*, 1414–1426.
158. Lenardon, M.D.; Whitton, R.K.; Munro, C.A.; Marshall, D.; Gow, N.A.R. Individual chitin synthase enzymes synthesize microfibrils of differing structure at specific locations in the *Candida albicans* cell wall. *Mol Microbiol* **2007**, *66*, 1164–1173.
159. Gow, N.A.; Robbins, P.W.; Lester, J.W.; Brown, A.J.; Fonzi, W.A.; Chapman, T.; Kinsman, O.S. A hyphal-specific chitin synthase gene (CHS2) is not essential for growth, dimorphism, or virulence of *Candida albicans*. *PNAS* **1994**, *91*, 6216–6220.
160. Mora-Montes, H.M.; Netea, M.G.; Ferwerda, G.; Lenardon, M.D.; Brown, G.D.; Mistry, A.R.; Kullberg, B.J.; O'Callaghan, C.A.; Sheth, C.C.; Odds, F.C.; et al. Recognition and blocking of innate immunity cells by *Candida albicans* chitin. *Infect. Immun.* **2011**, *79*, 1961–1970.
161. Da Silva, C.A.; Chalouni, C.; Williams, A.; Hartl, D.; Lee, C.G.; Elias, J.A. Chitin is a size-dependent regulator of macrophage TNF and IL-10 production. *J. Immunol.* **2009**, *182*, 3573–3582.
162. Mora-Montes, H.M.; Ponce-Noyola, P.; Villagómez-Castro, J.C.; Gow, N.A.; Flores-Carreón, A.; López-Romero, E. Protein glycosylation in *Candida*. *Future Microbiology* **2009**, *4*, 1167–1183.
163. Prill, S.K.-H.; Klinkert, B.; Timpel, C.; Gale, C.A.; Schröppel, K.; Ernst, J.F. PMT family of *Candida albicans*: five protein mannosyltransferase isoforms affect growth, morphogenesis and antifungal resistance. *Mol. Microbiol.* **2005**, *55*, 546–560.
164. Munro, C.A.; Bates, S.; Buurman, E.T.; Hughes, H.B.; MacCallum, D.M.; Bertram, G.; Atrih, A.; Ferguson, M.A.J.; Bain, J.M.; Brand, A.; et al. Mnt1p and Mnt2p of *Candida albicans* are partially redundant alpha-1,2-mannosyltransferases that participate in O-linked mannosylation and are required for adhesion and virulence. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 1051–1060.
165. Mora-Montes, H.M.; Bates, S.; Netea, M.G.; Díaz-Jiménez, D.F.; López-Romero, E.; Zinker, S.; Ponce-Noyola, P.; Kullberg, B.J.; Brown, A.J.P.; Odds, F.C.; et al. Endoplasmic reticulum alpha-glycosidases of *Candida albicans* are required for N glycosylation, cell wall integrity, and normal host-fungus interaction. *Eukaryotic Cell* **2007**, *6*, 2184–2193.
166. Bates, S.; Hughes, H.B.; Munro, C.A.; Thomas, W.P.H.; MacCallum, D.M.; Bertram, G.; Atrih, A.; Ferguson, M.A.J.; Brown, A.J.P.; Odds, F.C.; et al. Outer chain N-glycans are required for cell wall integrity and virulence of *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 90–98.
167. Rayner, J.C.; Munro, S. 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.* **1998**, *273*, 26836–26843.
168. Mora-Montes, H.M.; Bates, S.; Netea, M.G.; Castillo, L.; Brand, A.; Buurman, E.T.; Díaz-Jiménez, D.F.; Jan Kullberg, B.; Brown, A.J.P.; Odds, F.C.; et al. A multifunctional mannosyltransferase family in *Candida albicans* determines cell wall mannan structure and host-fungus interactions. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 12087–12095.
169. 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. Identification of a new family of genes involved in beta-1,2-mannosylation of glycans in *Pichia pastoris* and *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 9724–9736.

170. Trinel, P.-A.; Maes, E.; Zanetta, J.-P.; Delplace, F.; Coddeville, B.; Jouault, T.; Strecker, G.; Poulain, D. *Candida albicans* phospholipomannan, a new member of the fungal mannose inositol phosphoceramide family. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 37260–37271.
171. Mille, C.; Janbon, G.; Delplace, F.; Ibata-Ombetta, S.; Gaillardin, C.; Strecker, G.; Jouault, T.; Trinel, P.-A.; Poulain, D. Inactivation of CaMIT1 inhibits *Candida albicans* phospholipomannan beta-mannosylation, reduces virulence, and alters cell wall protein beta-mannosylation. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 47952–47960.
172. Netea, M.; Gow, N.; Munro, C.; Bates, S.; Collins, C.; Fewerda, G.; Hobson, R.; Bertram, G.; Hughes, H.; Jansen, T.; et al. Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors. *J Clin Invest.* **2006**, *116*, 1642–1650.
173. Murciano, C.; Villamon, E.; Gozalbo, D.; Roig, P.; O'Connor, J.E.; Gil, M.L. Toll-like receptor 4 defective mice carrying point or null mutations do not show increased susceptibility to *Candida albicans* in a model of hematogenously disseminated infection. *Med. Mycol.* **2006**, *44*, 149–157.
174. Kéry, V.; Krepinský, J.J.; Warren, C.D.; Capek, P.; Stahl, P.D. Ligand recognition by purified human mannose receptor. *Arch. Biochem. Biophys.* **1992**, *298*, 49–55.
175. McGreal, E.P.; Rosas, M.; Brown, G.D.; Zamze, S.; Wong, S.Y.C.; Gordon, S.; Martinez-Pomares, L.; Taylor, P.R. The carbohydrate-recognition domain of Dectin-2 is a C-type lectin with specificity for high mannose. *Glycobiology* **2006**, *16*, 422–430.
176. Ibata-Ombetta, S.; Idziorek, T.; Trinel, P.-A.; Poulain, D.; Jouault, T. *Candida albicans* phospholipomannan promotes survival of phagocytosed yeasts through modulation of bad phosphorylation and macrophage apoptosis. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 13086–13093.
177. Jouault, T.; Ibata-Ombetta, S.; Takeuchi, O.; Trinel, P.-A.; Sacchetti, P.; Lefebvre, P.; Akira, S.; Poulain, D. *Candida albicans* phospholipomannan is sensed through toll-like receptors. *J. Infect. Dis.* **2003**, *188*, 165–172.
178. Staab, J.F.; Bahn, Y.-S.; Tai, C.-H.; Cook, P.F.; Sundstrom, P. Expression of transglutaminase substrate activity on *Candida albicans* germ tubes through a coiled, disulfide-bonded N-terminal domain of Hwp1 requires C-terminal glycosylphosphatidylinositol modification. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 40737–40747.
179. Staab, J.F.; Sundstrom, P. Genetic organization and sequence analysis of the hypha-specific cell wall protein gene HWP1 of *Candida albicans*. *Yeast* **1998**, *14*, 681–686.
180. Kapteyn, J.C.; Hoyer, L.L.; Hecht, J.E.; Müller, W.H.; Andel, A.; Verkleij, A.J.; Makarow, M.; Van Den Ende, H.; Klis, F.M. The cell wall architecture of *Candida albicans* wild-type cells and cell wall-defective mutants. *Mol. Microbiol.* **2000**, *35*, 601–611.
181. Coleman, D.A.; Oh, S.-H.; Manfra-Maretta, S.L.; Hoyer, L.L. A monoclonal antibody specific for *Candida albicans* Als4 demonstrates overlapping localization of Als family proteins on the fungal cell surface and highlights differences between Als localization in vitro and in vivo. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **2012**, *64*, 321–333.
182. Argüelles, J.C. Physiological roles of trehalose in bacteria and yeasts: a comparative analysis. *Arch. Microbiol.* **2000**, *174*, 217–224.
183. Richards, A.B.; Krakowka, S.; Dexter, L.B.; Schmid, H.; Wolterbeek, A.P.M.; Waalkens-Berendsen, D.H.; Shigoyuki, A.; Kurimoto, M. Trehalose: a review of properties, history of use and human tolerance, and results of multiple safety studies. *Food and Chemical Toxicology* **2002**, *40*, 871–898.

184. Colaço, C.A.L.S.; Roser, B. Trehalose-a multifunctional additive for food preservation. *Food Packaging and Preservation* **1994**, 123–140.
185. Crowe, J.H.; Crowe, L.M. Preservation of mammalian cells-learning nature's tricks. *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18*, 145–146.
186. Thammahong, A.; Puttikamonkul, S.; Perfect, J.R.; Brennan, R.G.; Cramer, R.A. Central Role of the Trehalose Biosynthesis Pathway in the Pathogenesis of Human Fungal Infections: Opportunities and Challenges for Therapeutic Development. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2017**, *81*.
187. Cabib, E.; Leloir, L.F. The biosynthesis of trehalose phosphate. *J. Biol. Chem.* **1958**, *231*, 259–275.
188. Thevelein, J.M. Regulation of trehalose mobilization in fungi. *Microbiol Rev* **1984**, *48*, 42–59.
189. Zaragoza, O.; Blazquez, M.A.; Gancedo, C. Disruption of the *Candida albicans* TPS1 gene encoding trehalose-6-phosphate synthase impairs formation of hyphae and decreases infectivity. *J. Bacteriol.* **1998**, *180*, 3809–3815.
190. Zaragoza, O.; González-Párraga, P.; Pedreño, Y.; Alvarez-Peral, F.J.; Argüelles, J.-C. Trehalose accumulation induced during the oxidative stress response is independent of TPS1 mRNA levels in *Candida albicans*. *Int. Microbiol.* **2003**, *6*, 121–125.
191. Alvarez-Peral, F.J.; Zaragoza, O.; Pedreño, Y.; Argüelles, J.-C. Protective role of trehalose during severe oxidative stress caused by hydrogen peroxide and the adaptive oxidative stress response in *Candida albicans*. *Microbiology (Reading, Engl.)* **2002**, *148*, 2599–2606.
192. Maidan, M.M.; De Rop, L.; Rellosio, M.; Diez-Orejas, R.; Thevelein, J.M.; Van Dijck, P. Combined inactivation of the *Candida albicans* GPR1 and TPS2 genes results in avirulence in a mouse model for systemic infection. *Infect. Immun.* **2008**, *76*, 1686–1694.
193. Cornely, O.A.; Bassetti, M.; Calandra, T.; Garbino, J.; Kullberg, B.J.; Lortholary, O.; Meersseman, W.; Akova, M.; Arendrup, M.C.; Arikan-Akdagli, S.; et al. ESCMID* guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: non-neutropenic adult patients. *Clin. Microbiol. Infect.* **2012**, *18 Suppl 7*, 19–37.
194. Ellepola, A.N.B.; Morrison, C.J. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. *J. Microbiol.* **2005**, *43 Spec No*, 65–84.
195. Horvath, L.L.; George, B.J.; Hospenthal, D.R. Detection of fifteen species of *Candida* in an automated blood culture system. *J. Clin. Microbiol.* **2007**, *45*, 3062–3064.
196. Lacroix, C.; Gicquel, A.; Sendid, B.; Meyer, J.; Accoceberry, I.; François, N.; Morio, F.; Desoubieux, G.; Chandenier, J.; Kauffmann-Lacroix, C.; et al. Evaluation of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) systems for the identification of *Candida* species. *Clin. Microbiol. Infect.* **2014**, *20*, 153–158.
197. Khot, P.D.; Fredricks, D.N. PCR-based diagnosis of human fungal infections. *Expert Rev Anti Infect Ther* **2009**, *7*, 1201–1221.
198. Yaman, G.; Akyar, I.; Can, S. Evaluation of the MALDI TOF-MS method for identification of *Candida* strains isolated from blood cultures. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2012**, *73*, 65–67.
199. Novitsky, T.J. Biomedical Applications of *Limulus* Amebocyte Lysate. In *Biology and Conservation of Horseshoe Crabs*; Tanacredi, J.T., Botton, M.L., Smith, D., Eds.; Springer US: Boston, MA, 2009; pp. 315–329 ISBN 978-0-387-89959-6.
200. Mennink-Kersten, M.A.S.H.; Verweij, P.E. Non-culture-based diagnostics for opportunistic fungi. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **2006**, *20*, 711–727, viii.

201. Tran, T.; Beal, S.G. Application of the 1,3- β -D-Glucan (Fungitell) Assay in the Diagnosis of Invasive Fungal Infections. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* **2016**, *140*, 181–185.
202. Hanson, K.E.; Pfeiffer, C.D.; Lease, E.D.; Balch, A.H.; Zaas, A.K.; Perfect, J.R.; Alexander, B.D. β -D-glucan Surveillance with Preemptive Anidulafungin for Invasive Candidiasis in Intensive Care Unit Patients: A Randomized Pilot Study. *PLoS One* **2012**, *7*.
203. Wheat, L.J. Approach to the diagnosis of invasive aspergillosis and candidiasis. *Clin. Chest Med.* **2009**, *30*, 367–377, viii.
204. Guitard, J.; Isnard, F.; Tabone, M.-D.; Antignac, M.; Brissot, E.; Senghor, Y.; Petit, A.; Leverger, G.; Hennequin, C. Usefulness of β -D-glucan for diagnosis and follow-up of invasive candidiasis in onco-haematological patients. *J. Infect.* **2018**, *76*, 483–488.
205. Jaijakul, S.; Vazquez, J.A.; Swanson, R.N.; Ostrosky-Zeichner, L. (1,3)- β -D-glucan as a prognostic marker of treatment response in invasive candidiasis. *Clin. Infect. Dis.* **2012**, *55*, 521–526.
206. Obayashi, T.; Negishi, K.; Suzuki, T.; Funata, N. Reappraisal of the serum (1 \rightarrow 3)-beta-D-glucan assay for the diagnosis of invasive fungal infections--a study based on autopsy cases from 6 years. *Clin. Infect. Dis.* **2008**, *46*, 1864–1870.
207. Clancy, C.J.; Nguyen, M.-L.; Cheng, S.; Huang, H.; Fan, G.; Jaber, R.A.; Wingard, J.R.; Cline, C.; Nguyen, M.H. Immunoglobulin G responses to a panel of *Candida albicans* antigens as accurate and early markers for the presence of systemic candidiasis. *J. Clin. Microbiol.* **2008**, *46*, 1647–1654.
208. Sendid, B.; Tabouret, M.; Poirot, J.L.; Mathieu, D.; Fruit, J.; Poulain, D. New enzyme immunoassays for sensitive detection of circulating *Candida albicans* mannan and antimannan antibodies: useful combined test for diagnosis of systemic candidiasis. *J. Clin. Microbiol.* **1999**, *37*, 1510–1517.
209. Sendid, B.; Jouault, T.; Coudriau, R.; Camus, D.; Odds, F.; Tabouret, M.; Poulain, D. Increased sensitivity of mannanemia detection tests by joint detection of alpha- and beta-linked oligomannosides during experimental and human systemic candidiasis. *J. Clin. Microbiol.* **2004**, *42*, 164–171.
210. Yera, H.; Sendid, B.; Francois, N.; Camus, D.; Poulain, D. Contribution of serological tests and blood culture to the early diagnosis of systemic candidiasis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2001**, *20*, 864–870.
211. Avni, T.; Leibovici, L.; Paul, M. PCR Diagnosis of Invasive Candidiasis: Systematic Review and Meta-Analysis. *J Clin Microbiol* **2011**, *49*, 665–670.
212. Lau, A.; Halliday, C.; Chen, S.C.-A.; Playford, E.G.; Stanley, K.; Sorrell, T.C. Comparison of whole blood, serum, and plasma for early detection of candidemia by multiplex-tandem PCR. *J. Clin. Microbiol.* **2010**, *48*, 811–816.
213. Ciucanu, I.; Kerek, F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydrate Research* **1984**, *131*, 209–217.
214. Daniel, T.M. The history of tuberculosis. *Respiratory Medicine* **2006**, *100*, 1862–1870.
215. Wilson, L.G. Commentary: Medicine, population, and tuberculosis. *International Journal of Epidemiology* **2005**, *34*, 521–524.
216. Vynnycky, E.; Fine, P.E. Interpreting the decline in tuberculosis: the role of secular trends in effective contact. *Int J Epidemiol* **1999**, *28*, 327–334.
217. Gagneux, S. Host–pathogen coevolution in human tuberculosis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **2012**, *367*, 850–859.

218. Schatz, A.; Bugle, E.; Waksman, S.A. Streptomycin, a Substance Exhibiting Antibiotic Activity Against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria.*†. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **1944**, *55*, 66–69.
219. American Thoracic Society/Centers for Disease Control and Prevention/Infectious Diseases Society of America. *Am J Respir Crit Care Med* **2003**, *167*, 603–662.
220. Chaisson, R.E.; Martinson, N.A. Tuberculosis in Africa — Combating an HIV-Driven Crisis. *New England Journal of Medicine* **2008**, *358*, 1089–1092.
221. Zignol, M.; Hosseini, M.S.; Wright, A.; Weezenbeek, C.L.; Nunn, P.; Watt, C.J.; Williams, B.G.; Dye, C. Global Incidence of Multidrug-Resistant Tuberculosis. *The Journal of Infectious Diseases* **2006**, *194*, 479–485.
222. World Health Organization *Global tuberculosis report 2017*; 2017; ISBN 978-92-4-156551-6.
223. Gandhi, N.R.; Nunn, P.; Dheda, K.; Schaaf, H.S.; Zignol, M.; Soolingen, D. van; Jensen, P.; Bayona, J. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: a threat to global control of tuberculosis. *The Lancet* **2010**, *375*, 1830–1843.
224. Karl Bernhard Lehmann, R.O.N. *Atlas und Grundriss der Bakteriologie und Lehrbuch der speziellen bakteriologischen Diagnostik ...*; Lehmann, 1896;
225. Runyon, E.H. Mycobacteria: an overview. *Rev. Infect. Dis.* **1981**, *3*, 819–821.
226. Yuen, C.M.; Kurbatova, E.V.; Click, E.S.; Cavanaugh, J.S.; Cegielski, J.P. Association between Mycobacterium tuberculosis Complex Phylogenetic Lineage and Acquired Drug Resistance. *PLOS ONE* **2013**, *8*, e83006.
227. Rodriguez-Campos, S; Smith, N. H; Boniotti, M. B; Aranaz, A Overview and phylogeny of Mycobacterium tuberculosis complex organisms: Implications for diagnostics and legislation of bovine tuberculosis - ScienceDirect. *Research in veterinary science* **2014**.
228. Tebruegge, M.; Pantazidou, A.; MacGregor, D.; Gonis, G.; Leslie, D.; Sedda, L.; Ritz, N.; Connell, T.; Curtis, N. Nontuberculous Mycobacterial Disease in Children – Epidemiology, Diagnosis & Management at a Tertiary Center. *PLoS One* **2016**, *11*.
229. Benwill, J.L.; Wallace, R.J. *mycobacterium abscessus*: challenges in diagnosis and treatment. *Current Opinion in Infectious Diseases* **2014**, *27*, 506–510.
230. Falkinham, J.O. Environmental Sources of Nontuberculous Mycobacteria. *Clinics in Chest Medicine* **2015**, *36*, 35–41.
231. Tortoli, E. Clinical manifestations of nontuberculous mycobacteria infections. *Clinical Microbiology and Infection* **2009**, *15*, 906–910.
232. Jung, S.-Y.; Kim, B.G.; Kwon, D.; Park, J.-H.; Youn, S.-K.; Jeon, S.; Um, H.-Y.; Kwon, K.-E.; Kim, H.-J.; Jung, H.-J.; et al. An outbreak of joint and cutaneous infections caused by non-tuberculous mycobacteria after corticosteroid injection. *International Journal of Infectious Diseases* **2015**, *36*, 62–69.
233. Johnson, M.M.; Odell, J.A. Nontuberculous mycobacterial pulmonary infections. *J Thorac Dis* **2014**, *6*, 210–220.
234. Griffith, D.E.; Aksamit, T.; Brown-Elliott, B.A.; Catanzaro, A.; Daley, C.; Gordin, F.; Holland, S.M.; Horsburgh, R.; Huitt, G.; Iademarco, M.F.; et al. An Official ATS/IDSA Statement: Diagnosis, Treatment, and Prevention of Nontuberculous Mycobacterial Diseases. *Am J Respir Crit Care Med* **2007**, *175*, 367–416.
235. King, G.M. Uptake of Carbon Monoxide and Hydrogen at Environmentally Relevant Concentrations by Mycobacteria†. *Appl Environ Microbiol* **2003**, *69*, 7266–7272.

236. Fedrizzi, T.; Meehan, C.J.; Grottola, A.; Giacobazzi, E.; Fregni Serpini, G.; Tagliazucchi, S.; Fabio, A.; Bettua, C.; Bertorelli, R.; De Sanctis, V.; et al. Genomic characterization of Nontuberculous Mycobacteria. *Scientific Reports* **2017**, *7*, 45258.
237. Uys, P.W.; Warren, R.M.; van Helden, P.D. A Threshold Value for the Time Delay to TB Diagnosis. *PLoS One* **2007**, *2*.
238. Glickman, M.S.; Jacobs, W.R. Microbial Pathogenesis of Mycobacterium tuberculosis: Dawn of a Discipline. *Cell* **2001**, *104*, 477–485.
239. Blanco, M.; Ratzan, J.; Cabello-Inchausti, B.; Fernandes, L. Necrotizing granulomas in B-cell chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma. *Ann Diagn Pathol* **2002**, *6*, 216–221.
240. Basu, S.; Galvani, A.P. The evolution of tuberculosis virulence. *Bull. Math. Biol.* **2009**, *71*, 1073–1088.
241. Kaufmann, S.H.E.; Cole, S.T.; Mizrahi, V.; Rubin, E.; Nathan, C. Mycobacterium tuberculosis and the host response. *J Exp Med* **2005**, *201*, 1693–1697.
242. Dannenberg, A.M. Roles of cytotoxic delayed-type hypersensitivity and macrophage-activating cell-mediated immunity in the pathogenesis of tuberculosis. *Immunobiology* **1994**, *191*, 461–473.
243. Cosma, C.L.; Humbert, O.; Ramakrishnan, L. Superinfecting mycobacteria home to established tuberculous granulomas. *Nat. Immunol.* **2004**, *5*, 828–835.
244. Russell, D.G. Who puts the tubercle in tuberculosis? *Nature Reviews Microbiology* **2007**, *5*, 39–47.
245. Vynnycky, E. Lifetime Risks, Incubation Period, and Serial Interval of Tuberculosis. *American Journal of Epidemiology* **2000**, *152*, 247–263.
246. Lienhardt, C. Investigation of Environmental and Host-related Risk Factors for Tuberculosis in Africa. I. Methodological Aspects of a Combined Design. *American Journal of Epidemiology* **2002**, *155*, 1066–1073.
247. Lillebaek, T.; Dirksen, A.; Baess, I.; Strunge, B.; Thomsen, V.Ø.; Andersen, Å.B. Molecular Evidence of Endogenous Reactivation of *Mycobacterium tuberculosis* after 33 Years of Latent Infection. *The Journal of Infectious Diseases* **2002**, *185*, 401–404.
248. Rieder, H.L.; Zellweger, J.-P.; Raviglione, M.C.; Keizer, S.T.; Migliori, G.B. Tuberculosis control in Europe and international migration. *European Respiratory Journal* **1994**, *7*, 1545–1553.
249. Kaufmann, S.H.E. Protection against tuberculosis: cytokines, T cells, and macrophages. *Annals of the Rheumatic Diseases* **2002**, *61*, 54ii–5458.
250. Hogan, L.H.; Heninger, E.; Elsner, R.A.; Vonderheid, H.A.; Hulseberg, P.; Co, D.; Sandor, M. Requirements for CD4+ T cell levels in acute Mycobacterium bovis strain bacille Calmette Guerin (BCG)-induced granulomas differ for optimal mycobacterial control versus granuloma formation. *International Immunology* **2007**, *19*, 627–633.
251. Tamhane, A.; Chheng, P.; Dobbs, T.; Mak, S.; Sar, B.; Kimerling, M.E. Predictors of smear-negative pulmonary tuberculosis in HIV-infected patients, Battambang, Cambodia. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **2009**, *13*, 347–354.
252. Wuhao, L.; Ran, C.; Xujin, H.; Zhongdao, W.; Dekumyoy, P.; Zhiyue, L. Parasites and asthma. *Parasitol Res* **2017**, *116*, 2373–2383.
253. Haoues, M.; Essafi, M. [The macrophage: chief of tuberculosis immune response]. *Archives de l'Institut Pasteur de Tunis* **2012**, *89*, 3–21.

254. Herrmann, J.-L.; Belloy, M.; Porcher, R.; Simonney, N.; Aboutaam, R.; Lebourgeois, M.; Gaudelus, J.; De LosAngeles, L.; Chadelat, K.; Scheinmann, P.; et al. Temporal Dynamics of Interferon Gamma Responses in Children Evaluated for Tuberculosis. *PLoS ONE* **2009**, *4*, e4130.
255. Choi, J.C.; Shin, J.W.; Kim, J.Y.; Park, I.W.; Choi, B.W.; Lee, M.-K. The Effect of Previous Tuberculin Skin Test on the Follow-up Examination of Whole-Blood Interferon- γ Assay in the Screening for Latent Tuberculosis Infection. *CHEST* **2008**, *133*, 1415–1420.
256. Sharma, M.; Sharma, S.; Roy, S.; Varma, S.; Bose, M. Pulmonary epithelial cells are a source of interferon-c in response to Mycobacterium tuberculosis infection. *Immunology and Cell Biology* **9**.
257. Lahey, T.; Matee, M.; Mtei, L.; Bakari, M.; Pallangyo, K.; von Reyn, C.F. Lymphocyte proliferation to mycobacterial antigens is detectable across a spectrum of HIV-associated tuberculosis. *BMC Infectious Diseases* **2009**, *9*.
258. Nayak, S.; Acharjya, B. Mantoux test and its interpretation. *Indian Dermatol Online J* **2012**, *3*, 2–6.
259. Cohn, D.L. The Effect of BCG Vaccination on Tuberculin Skin Testing. *Am J Respir Crit Care Med* **2001**, *164*, 915–916.
260. Tiwari, R.P.; Hattikudur, N.S.; Bharmal, R.N.; Kartikeyan, S.; Deshmukh, N.M.; Bisen, P.S. Modern approaches to a rapid diagnosis of tuberculosis: Promises and challenges ahead. *Tuberculosis* **2007**, *87*, 193–201.
261. David, H.L. Probability Distribution of Drug-Resistant Mutants in Unselected Populations of Mycobacterium tuberculosis. *Appl Microbiol* **1970**, *20*, 810–814.
262. Joshi, J.M. Tuberculosis chemotherapy in the 21st century: Back to the basics. *Lung India* **2011**, *28*, 193–200.
263. Hong Kong Chest Service/British Medical Research Council Controlled trial of 6-month and 8-month regimens in the treatment of pulmonary tuberculosis: The results up to 24 months. *Tubercle* **1979**, *60*, 201–210.
264. Controlled Trial of 2, 4, and 6 Months of Pyrazinamide in 6-Month, Three-Times-Weekly Regimens for Smear-positive Pulmonary Tuberculosis, Including an Assessment of a Combined Preparation of Isoniazid, Rifampin, and Pyrazinamide: Results at 30 Months. *Am Rev Respir Dis* **1991**, *143*, 700–706.
265. Campbell, E.A.; Korzheva, N.; Mustaev, A.; Murakami, K.; Nair, S.; Goldfarb, A.; Darst, S.A. Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial rna polymerase. *Cell* **2001**, *104*, 901–912.
266. Archambault, J.; Friesen, J.D. Genetics of eukaryotic RNA polymerases I, II, and III. *Microbiol Rev* **1993**, *57*, 703–724.
267. Heil, A.; Zillig, W. Reconstitution of bacterial DNA-dependent RNA-polymerase from isolated subunits as a tool for the elucidation of the role of the subunits in transcription. *FEBS Letters* **1970**, *11*, 165–168.
268. Heep, M.; Rieger, U.; Beck, D.; Lehn, N. Mutations in the Beginning of the rpoB Gene Can Induce Resistance to Rifamycins in both Helicobacter pylori and Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother* **2000**, *44*, 1075–1077.
269. Banerjee, A.; Dubnau, E.; Quemard, A.; Balasubramanian, V.; Um, K.S.; Wilson, T.; Collins, D.; Lisle, G. de; Jacobs, W.R. inhA, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in Mycobacterium tuberculosis. *Science* **1994**, *263*, 227–230.

270. Quemard, A.; Sacchetti, J.C.; Dessen, A.; Vilcheze, C.; Bittman, R.; Jacobs, W.R.; Blanchard, J.S. Enzymic Characterization of the Target for Isoniazid in Mycobacterium tuberculosis. *Biochemistry* **1995**, *34*, 8235–8241.
271. Cohn, D.L.; Bustreo, F.; Raviglione, M.C. Drug-resistant tuberculosis: review of the worldwide situation and the WHO/IUATLD Global Surveillance Project. International Union Against Tuberculosis and Lung Disease. *Clin. Infect. Dis.* **1997**, *24 Suppl 1*, S121-130.
272. Heym, B.; Honoré, N.; Schurra, C.; Cole, S.T.; Heym, B.; Truffot-Pernot, C.; Grosset, J.H.; Banerjee, A.; Jacobs, W.R.; Embden, J.D.A. van Implications of multidrug resistance for the future of short-course chemotherapy of tuberculosis: a molecular study. *The Lancet* **1994**, *344*, 293–298.
273. Takayama, K.; Kilburn, J.O. Inhibition of synthesis of arabinogalactan by ethambutol in Mycobacterium smegmatis. *Antimicrob Agents Chemother* **1989**, *33*, 1493–1499.
274. Zhang, Y.; Yew, W.W. Mechanisms of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis [State of the art series. Drug-resistant tuberculosis]. *Int J Tuberc Lung Dis* **2009**, *13*, 1320–1330.
275. Telenti, A.; Philipp, W.J.; Sreevatsan, S.; Bernasconi, C.; Stockbauer, K.E.; Wieles, B.; Musser, J.M.; Jacobs, W.R. The emb operon, a gene cluster of Mycobacterium tuberculosis involved in resistance to ethambutol. *Nat. Med.* **1997**, *3*, 567–570.
276. Ramaswamy, S.V.; Amin, A.G.; Göksel, S.; Stager, C.E.; Dou, S.-J.; El Sahly, H.; Moghazeh, S.L.; Kreiswirth, B.N.; Musser, J.M. Molecular Genetic Analysis of Nucleotide Polymorphisms Associated with Ethambutol Resistance in Human Isolates of Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother* **2000**, *44*, 326–336.
277. Alcaide, F.; Pfyffer, G.E.; Telenti, A. Role of embB in natural and acquired resistance to ethambutol in mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother* **1997**, *41*, 2270–2273.
278. Zhang, Y.; Shi, W.; Zhang, W.; Mitchison, D. Mechanisms of Pyrazinamide Action and Resistance. *Microbiol Spectr* **2013**, *2*, 1–12.
279. Fox, W.; Ellard, G.A.; Mitchison, D.A. Studies on the treatment of tuberculosis undertaken by the British Medical Research Council Tuberculosis Units, 1946–1986, with relevant subsequent publications. *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.* **1999**, *3*, S231–S279.
280. Hu, Y.; Coates, A.R.; Mitchison, D.A. Sterilising action of pyrazinamide in models of dormant and rifampicin-tolerant Mycobacterium tuberculosis. *6*.
281. Zimhony, O.; Cox, J.S.; Welch, J.T.; Vilchèze, C.; Jacobs, W.R. Pyrazinamide inhibits the eukaryotic-like fatty acid synthetase I (FASI) of Mycobacterium tuberculosis. *Nat. Med.* **2000**, *6*, 1043–1047.
282. Shi, W.; Zhang, X.; Jiang, X.; Ruan, H.; Barry, C.E.; Wang, H.; Zhang, W.; Zhang, Y. Pyrazinamide inhibits trans-translation in Mycobacterium tuberculosis: a potential mechanism for shortening the duration of tuberculosis chemotherapy. *Science* **2011**, *333*, 1630–1632.
283. Carter, A.P.; Clemons, W.M.; Brodersen, D.E.; Morgan-Warren, R.J.; Wimberly, B.T.; Ramakrishnan, V. Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. *Nature* **2000**, *407*, 340–348.
284. Ruiz, P.; Rodríguez-Cano, F.; Zerolo, F.J.; Casal, M. Investigation of the in vitro activity of streptomycin against Mycobacterium tuberculosis. *Microb. Drug Resist.* **2002**, *8*, 147–149.
285. Loiez-Durocher, C.; Vachée, A.; Lemaitre, N. La résistance de Mycobacterium tuberculosis aux antituberculeux : méthodes diagnostiques. *Annales de Biologie Clinique* **2000**, *58*, 291–7.

286. Waksman, S.A. Streptomycin: Background, Isolation, Properties, and Utilization. *Science* **1953**, *118*, 259–266.
287. Alan R. Hinman; James M. Hughes; Jr, D.E.S.; Mitchell L. Cohen Meeting the Challenge of Multidrug-Resistant Tuberculosis: Summary of a Conference. *Morbidity and Mortality Weekly Report* **1992**, *41*, 51–57.
288. Ben Amor, Y.; Day, M.S.; Schluger, N.W. Preventing the next generation of extensively drug-resistant tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* **2010**, *14*, 525–527.
289. Migliori, G.B.; Iaco, G.D.; Besozzi, G.; Centis, R.; Cirillo, D.M. First tuberculosis cases in Italy resistant to all tested drugs. *Weekly releases (1997–2007)* **2007**, *12*, 3194.
290. Farley, J.E.; Ram, M.; Pan, W.; Waldman, S.; Cassell, G.H.; Chaisson, R.E.; Weyer, K.; Lancaster, J.; Van der Walt, M. Outcomes of Multi-Drug Resistant Tuberculosis (MDR-TB) among a Cohort of South African Patients with High HIV Prevalence. *PLoS One* **2011**, *6*.
291. Kim, H.-R.; Hwang, S.S.; Kim, H.J.; Lee, S.M.; Yoo, C.-G.; Kim, Y.W.; Han, S.K.; Shim, Y.-S.; Yim, J.-J. Impact of extensive drug resistance on treatment outcomes in non-HIV-infected patients with multidrug-resistant tuberculosis. *Clin. Infect. Dis.* **2007**, *45*, 1290–1295.
292. Uplekar, M.; Weil, D.; Lonroth, K.; Jaramillo, E.; Lienhardt, C.; Dias, H.M.; Falzon, D.; Floyd, K.; Gargioni, G.; Getahun, H.; et al. WHO's new End TB Strategy. *The Lancet* **2015**, *385*, 1799–1801.
293. Xin, Y.; Huang, Y.; McNeil, M.R. The presence of an endogenous endo-D-arabinase in *Mycobacterium smegmatis* and characterization of its oligoarabinoside product. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* **1999**, *1473*, 267–271.
294. Kieser, K.J.; Rubin, E.J. How sisters grow apart: mycobacterial growth and division. *Nature Reviews Microbiology* **2014**, *12*, 550–562.
295. Minnikin, D.E.; Lee, O.Y.-C.; Wu, H.H.T.; Nataraj, V.; Donoghue, H.D.; Ridell, M.; Watanabe, M.; Alderwick, L.; Bhatt, A.; Besra, G.S. Pathophysiological Implications of Cell Envelope Structure in *Mycobacterium tuberculosis* and Related Taxa. In *Tuberculosis - Expanding Knowledge*; Ribon, W., Ed.; InTech, 2015 ISBN 978-953-51-2139-8.
296. Barry, C.E.; Crick, D.C.; McNeil, M.R. Targeting the Formation of the Cell Wall Core of *M. tuberculosis*. *Infect Disord Drug Targets* **2007**, *7*, 182–202.
297. Jackson, M.; McNeil, M.R.; Brennan, P.J. Progress in targeting cell envelope biogenesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *Future Microbiol* **2013**, *8*.
298. Hoffmann, C.; Leis, A.; Niederweis, M.; Plitzko, J.M.; Engelhardt, H. Disclosure of the mycobacterial outer membrane: Cryo-electron tomography and vitreous sections reveal the lipid bilayer structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008**, *105*, 3963–3967.
299. Zuber, B.; Chami, M.; Houssin, C.; Dubochet, J.; Griffiths, G.; Daffe, M. Direct Visualization of the Outer Membrane of *Mycobacteria* and *Corynebacteria* in Their Native State. *Journal of Bacteriology* **2008**, *190*, 5672–5680.
300. Jarlier, V.; Nikaido, H. Mycobacterial cell wall: Structure and role in natural resistance to antibiotics. *FEMS Microbiology Letters* **1994**, *123*, 11–18.
301. Lemassu, A.; Daffé, M. Structural features of the exocellular polysaccharides of *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochem J* **1994**, *297*, 351–357.
302. Sani, M.; Houben, E.N.G.; Geurtsen, J.; Pierson, J.; Punder, K. de; Zon, M. van; Wever, B.; Piersma, S.R.; Jiménez, C.R.; Daffé, M.; et al. Direct Visualization by Cryo-EM of the Mycobacterial Capsular Layer: A Labile Structure Containing ESX-1-Secreted Proteins. *PLoS Pathogens* **2010**, *6*, e1000794.

303. Ortalo-Magne, A.; Dupont, M.-A.; Lemassu, A.; Andersen, A.B.; Gounon, P.; Mamadou, D. Molecular composition of the outermost capsular material of the tubercle bacillus. *Microbiology* **1995**, *141*, 1609–1620.
304. Dinadayala, P.; Lemassu, A.; Granovski, P.; Cérantola, S.; Winter, N.; Daffé, M. Revisiting the Structure of the Anti-neoplastic Glucans of *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guérin: Structural analysis of the extracellular and boiling water extract-derived glucans of the vaccine substrains. *Journal of Biological Chemistry* **2004**, *279*, 12369–12378.
305. Daffé, M.; Etienne, G. The capsule of *Mycobacterium tuberculosis* and its implications for pathogenicity. *Tuberculosis* **1999**, *79*, 153–169.
306. Torrelles, J.B.; Schlesinger, L.S. Diversity in *M. tuberculosis* mannosylated cell wall determinants impacts adaptation to the host. *Tuberculosis (Edinb)* **2010**, *90*, 84–93.
307. Jankute, M.; Cox, J.A.G.; Harrison, J.; Besra, G.S. Assembly of the Mycobacterial Cell Wall. *Annual Review of Microbiology* **2015**, *69*, 405–423.
308. Schleifer, K.H.; Kandler, O. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol Rev* **1972**, *36*, 407–477.
309. Heijenoort, J. v. Formation of the glycan chains in the synthesis of bacterial peptidoglycan. *Glycobiology* **2001**, *11*, 25R-36R.
310. Brennan, P.J.; Nikaido, H. The Envelope of Mycobacteria. *Annual Review of Biochemistry* **1995**, *64*, 29–63.
311. Mahapatra, S.; Scherman, H.; Brennan, P.J.; Crick, D.C. N Glycolylation of the Nucleotide Precursors of Peptidoglycan Biosynthesis of *Mycobacterium* spp. Is Altered by Drug Treatment. *J Bacteriol* **2005**, *187*, 2341–2347.
312. Raymond, J.B.; Mahapatra, S.; Crick, D.C.; Pavelka, M.S. Identification of the *namH* Gene, Encoding the Hydroxylase Responsible for the N -Glycolylation of the Mycobacterial Peptidoglycan. *Journal of Biological Chemistry* **2005**, *280*, 326–333.
313. Lavollay, M.; Arthur, M.; Fourgeaud, M.; Dubost, L.; Marie, A.; Veziris, N.; Blanot, D.; Gutmann, L.; Mainardi, J.-L. The Peptidoglycan of Stationary-Phase *Mycobacterium tuberculosis* Predominantly Contains Cross-Links Generated by l,d-Transpeptidation. *J Bacteriol* **2008**, *190*, 4360–4366.
314. Kim, D.H.; Lees, W.J.; Kempell, K.E.; Lane, W.S.; Duncan, K.; Walsh, C.T. Characterization of a Cys115 to Asp substitution in the *Escherichia coli* cell wall biosynthetic enzyme UDP-GlcNAc enolpyruvyl transferase (MurA) that confers resistance to inactivation by the antibiotic fosfomycin. *Biochemistry* **1996**, *35*, 4923–4928.
315. Benson, T.E.; Walsh, C.T.; Hogle, J.M. The structure of the substrate-free form of MurB, an essential enzyme for the synthesis of bacterial cell walls. *Structure* **1996**, *4*, 47–54.
316. Munshi, T.; Gupta, A.; Evangelopoulos, D.; Guzman, J.D.; Gibbons, S.; Keep, N.H.; Bhakta, S. Characterisation of ATP-Dependent Mur Ligases Involved in the Biogenesis of Cell Wall Peptidoglycan in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLOS ONE* **2013**, *8*, e60143.
317. Kurosu, M.; Mahapatra, S.; Narayanasamy, P.; Crick, D.C. Chemoenzymatic synthesis of Park's nucleotide: toward the development of high-throughput screening for *MraY* inhibitors. *Tetrahedron Letters* **2007**, *48*, 799–803.
318. Eniyan, K.; Dharavath, S.; Vijayan, R.; Bajpai, U.; Gourinath, S. Crystal structure of UDP-N-acetylglucosamine-enolpyruvate reductase (MurB) from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **2018**, *1866*, 397–406.

319. Mahapatra, S.; Crick, D.C.; Brennan, P.J. Comparison of the UDP-N-Acetylmuramate:L-Alanine Ligase Enzymes from *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium leprae*. *Journal of Bacteriology* **2000**, *182*, 6827–6830.
320. Basavannacharya, C.; Robertson, G.; Munshi, T.; Keep, N.H.; Bhakta, S. ATP-dependent MurE ligase in *Mycobacterium tuberculosis*: Biochemical and structural characterisation. *Tuberculosis* **2010**, *90*, 16–24.
321. Bouhss, A.; Mengin-Lecreulx, D.; Beller, D.L.; Heijenoort, J.V. Topological analysis of the MraY protein catalysing the first membrane step of peptidoglycan synthesis. *Molecular Microbiology* **1999**, *34*, 576–585.
322. Trunkfield, A.E.; Gurcha, S.S.; Besra, G.S.; Bugg, T.D.H. Inhibition of *Escherichia coli* glycosyltransferase MurG and *Mycobacterium tuberculosis* Gal transferase by uridine-linked transition state mimics. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2010**, *18*, 2651–2663.
323. Ruiz, N. Bioinformatics identification of MurJ (MviN) as the peptidoglycan lipid II flippase in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008**, *105*, 15553–15557.
324. Mohammadi, T.; van Dam, V.; Sijbrandi, R.; Vernet, T.; Zapun, A.; Bouhss, A.; Diepeveen-de Bruin, M.; Nguyen-Distèche, M.; de Kruijff, B.; Breukink, E. Identification of FtsW as a transporter of lipid-linked cell wall precursors across the membrane. *EMBO J* **2011**, *30*, 1425–1432.
325. Sham, L.-T.; Butler, E.K.; Lebar, M.D.; Kahne, D.; Bernhardt, T.G.; Ruiz, N. MurJ is the flippase of lipid-linked precursors for peptidoglycan biogenesis. *Science* **2014**, *345*, 220–222.
326. Kumar, V.; Saravanan, P.; Arvind, A.; Mohan, C.G. Identification of hotspot regions of MurB oxidoreductase enzyme using homology modeling, molecular dynamics and molecular docking techniques. *J Mol Model* **2011**, *17*, 939–953.
327. Barreteau, H.; Kovač, A.; Boniface, A.; Sova, M.; Gobec, S.; Blanot, D. Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiology Reviews* **2008**, *32*, 168–207.
328. Tomašić, T.; Zidar, N.; Kovač, A.; Turk, S.; Simčič, M.; Blanot, D.; Müller-Premru, M.; Filipič, M.; Grdadolnik, S.G.; Zega, A.; et al. 5-Benzylidenethiazolidin-4-ones as Multitarget Inhibitors of Bacterial Mur Ligases. *ChemMedChem* **2010**, *5*, 286–295.
329. Hrast, M.; Sosič, I.; Šink, R.; Gobec, S. Inhibitors of the peptidoglycan biosynthesis enzymes MurA-F. *Bioorganic Chemistry* **2014**, *55*, 2–15.
330. Hett, E.C.; Chao, M.C.; Rubin, E.J. Interaction and Modulation of Two Antagonistic Cell Wall Enzymes of *Mycobacteria*. *PLoS Pathogens* **2010**, *6*, e1001020.
331. Chang, Y.H.; Labgold, M.R.; Richards, J.H. Altering enzymatic activity: recruitment of carboxypeptidase activity into an RTEM beta-lactamase/penicillin-binding protein 5 chimera. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1990**, *87*, 2823–2827.
332. Calvanese, L.; Falcigno, L.; Maglione, C.; Marasco, D.; Ruggiero, A.; Squeglia, F.; Berisio, R.; D’Auria, G. Structural and binding properties of the PASTA domain of PonA2, a key penicillin binding protein from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biopolymers* **2014**, *101*, 712–719.
333. Cordillot, M.; Dubée, V.; Triboulet, S.; Dubost, L.; Marie, A.; Hugonnet, J.-E.; Arthur, M.; Mainardi, J.-L. *In Vitro* Cross-Linking of *Mycobacterium tuberculosis* Peptidoglycan by l,d-Transpeptidases and Inactivation of These Enzymes by Carbapenems. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2013**, *57*, 5940–5945.
334. Sacco, E.; Hugonnet, J.-E.; Josseaume, N.; Cremniter, J.; Dubost, L.; Marie, A.; Patin, D.; Blanot, D.; Rice, L.B.; Mainardi, J.-L.; et al. Activation of the l,d-transpeptidation peptidoglycan cross-

- linking pathway by a metallo-d,d-carboxypeptidase in *Enterococcus faecium*. *Molecular Microbiology* **2010**, *75*, 874–885.
335. Schoonmaker, M.K.; Bishai, W.R.; Lamichhane, G. Nonclassical Transpeptidases of *Mycobacterium tuberculosis* Alter Cell Size, Morphology, the Cytosolic Matrix, Protein Localization, Virulence, and Resistance to β -Lactams. *J Bacteriol* **2014**, *196*, 1394–1402.
336. Reynolds, P.E. Structure, biochemistry and mechanism of action of glycopeptide antibiotics. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **1989**, *8*, 943–950.
337. Wiedemann, I.; Breukink, E.; van Kraaij, C.; Kuipers, O.P.; Bierbaum, G.; de Kruijff, B.; Sahl, H.-G. Specific Binding of Nisin to the Peptidoglycan Precursor Lipid II Combines Pore Formation and Inhibition of Cell Wall Biosynthesis for Potent Antibiotic Activity. *Journal of Biological Chemistry* **2001**, *276*, 1772–1779.
338. Lo, M.-C.; Men, H.; Branstrom, A.; Helm, J.; Yao, N.; Goldman, R.; Walker, S. A New Mechanism of Action Proposed for Ramoplanin. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 3540–3541.
339. Prigozhin, D.M.; Mavrici, D.; Huizar, J.P.; Vansell, H.J.; Alber, T. Structural and Biochemical Analyses of *Mycobacterium tuberculosis* N-Acetylmuramyl-L-alanine Amidase Rv3717 Point to a Role in Peptidoglycan Fragment Recycling. *J Biol Chem* **2013**, *288*, 31549–31555.
340. Böth, D.; Schneider, G.; Schnell, R. Peptidoglycan Remodeling in *Mycobacterium tuberculosis*: Comparison of Structures and Catalytic Activities of RipA and RipB. *Journal of Molecular Biology* **2011**, *413*, 247–260.
341. S. Kaprelyants, A.; V. Mukamolova, G.; Ruggiero, A.; A. Makarov, V.; R. Demina, G.; O. Shleeva, M.; D. Potapov, V.; A. Shramko, P. Resuscitation-promoting Factors (Rpf): In Search of Inhibitors. *Protein & Peptide Letters* **2012**, *19*, 1026–1034.
342. Molle, V.; Kremer, L. Division and cell envelope regulation by Ser/Thr phosphorylation: *Mycobacterium* shows the way. *Molecular Microbiology* **2010**, *75*, 1064–1077.
343. McNeil, M.; Wallner, S.J.; Hunter, S.W.; Brennan, P.J. Demonstration that the galactosyl and arabinosyl residues in the cell-wall arabinogalactan of *Mycobacterium leprae* and *Mycobacterium tuberculosis* are furanoid. *Carbohydrate Research* **1987**, *166*, 299–308.
344. Daffe, M.; Brennan, P.J.; McNeil, M. Predominant structural features of the cell wall arabinogalactan of *Mycobacterium tuberculosis* as revealed through characterization of oligoglycosyl alditol fragments by gas chromatography/mass spectrometry and by ^1H and ^{13}C NMR analyses. *Journal of Biological Chemistry* **1990**, *265*, 6734–6743.
345. McNeil, M.; Daffe, M.; Brennan, P.J. Evidence for the nature of the link between the arabinogalactan and peptidoglycan of mycobacterial cell walls. *Journal of Biological Chemistry* **1990**, *265*, 18200–18206.
346. Bhamidi, S.; Scherman, M.S.; Rithner, C.D.; Prenni, J.E.; Chatterjee, D.; Khoo, K.-H.; McNeil, M.R. The Identification and Location of Succinyl Residues and the Characterization of the Interior Arabinan Region Allow for a Model of the Complete Primary Structure of *Mycobacterium tuberculosis* Mycolyl Arabinogalactan. *Journal of Biological Chemistry* **2008**, *283*, 12992–13000.
347. Alderwick, L.J.; Seidel, M.; Sahm, H.; Besra, G.S.; Eggeling, L. Identification of a Novel Arabinofuranosyltransferase (AftA) Involved in Cell Wall Arabinan Biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Biological Chemistry* **2006**, *281*, 15653–15661.
348. McNeil, M.; Daffe, M.; Brennan, P.J. Location of the Mycolyl Ester Substituents in the Cell Walls of *Mycobacteria*. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 17–23.
349. Draper, P.; Khoo, K.H.; Chatterjee, D.; Dell, A.; Morris, H.R. Galactosamine in walls of slow-growing mycobacteria. *Biochem J* **1997**, *327*, 519–525.

350. Lee, A.; Wu, S.-W.; Scherman, M.S.; Torrelles, J.B.; Chatterjee, D.; McNeil, M.R.; Khoo, K.-H. Sequencing of Oligoarabinosyl Units Released from Mycobacterial Arabinogalactan by Endogenous Arabinanase: Identification of Distinctive and Novel Structural Motifs †. *Biochemistry* **2006**, *45*, 15817–15828.
351. Peng, W.; Zou, L.; Bhamidi, S.; McNeil, M.R.; Lowary, T.L. The Galactosamine Residue in Mycobacterial Arabinogalactan Is α -Linked. *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 9826–9832.
352. Angala, S.K.; Belardinelli, J.M.; Huc-Claustre, E.; Wheat, W.H.; Jackson, M. The cell envelope glycoconjugates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **2014**, *49*, 361–399.
353. Mikusová, K.; Mikus, M.; Besra, G.S.; Hancock, I.; Brennan, P.J. Biosynthesis of the Linkage Region of the Mycobacterial Cell Wall. *Journal of Biological Chemistry* **1996**, *271*, 7820–7828.
354. Jin, Y.; Xin, Y.; Zhang, W.; Ma, Y. Mycobacterium tuberculosis Rv1302 and Mycobacterium smegmatis MSMEG_4947 have WecA function and MSMEG_4947 is required for the growth of M. smegmatis. *FEMS Microbiology Letters* **2010**, *310*, 54–61.
355. Mills, J.A.; Motichka, K.; Jucker, M.; Wu, H.P.; Uhlik, B.C.; Stern, R.J.; Scherman, M.S.; Vissa, V.D.; Pan, F.; Kundu, M.; et al. Inactivation of the Mycobacterial Rhamnosyltransferase, Which Is Needed for the Formation of the Arabinogalactan-Peptidoglycan Linker, Leads to Irreversible Loss of Viability. *Journal of Biological Chemistry* **2004**, *279*, 43540–43546.
356. Wu, Q.; Zhou, P.; Qian, S.; Qin, X.; Fan, Z.; Fu, Q.; Zhan, Z.; Pei, H. Cloning, expression, identification and bioinformatics analysis of Rv3265c gene from Mycobacterium tuberculosis in Escherichia coli. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* **2011**, *4*, 266–270.
357. Li, W.; Xin, Y.; McNeil, M.R.; Ma, Y. rmlB and rmlC genes are essential for growth of mycobacteria. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2006**, *342*, 170–178.
358. Ma, Y.; Pan, F.; McNeil, M. Formation of dTDP-Rhamnose Is Essential for Growth of Mycobacteria. *Journal of Bacteriology* **2002**, *184*, 3392–3395.
359. Ishizaki, Y.; Hayashi, C.; Inoue, K.; Igarashi, M.; Takahashi, Y.; Pujari, V.; Crick, D.C.; Brennan, P.J.; Nomoto, A. Inhibition of the First Step in Synthesis of the Mycobacterial Cell Wall Core, Catalyzed by the GlcNAc-1-phosphate Transferase WecA, by the Novel Caprazamycin Derivative CPZEN-45. *J Biol Chem* **2013**, *288*, 30309–30319.
360. Mitachi, K.; Siricilla, S.; Yang, D.; Kong, Y.; Skorupinska-Tudek, K.; Swiezewska, E.; Franzblau, S.G.; Kurosu, M. Fluorescence-based Assay for Polyprenyl phosphate-GlcNAc-1-phosphate transferase (WecA) and Identification of novel antimycobacterial WecA inhibitors. *Anal Biochem* **2016**, *512*, 78–90.
361. Grzegorzewicz, A.E.; Ma, Y.; Jones, V.; Crick, D.; Liav, A.; McNeil, M.R. Development of a microtiter plate based assay for lipid linked glycosyl transferase products using the mycobacterial cell wall rhamnosyl transferase, WbbL. *Microbiology* **2008**, *154*, 3724–3730.
362. Kremer, L.; Dover, L.G.; Morehouse, C.; Hitchin, P.; Everett, M.; Morris, H.R.; Dell, A.; Brennan, P.J.; McNeil, M.R.; Flaherty, C.; et al. Galactan Biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*: Identification of a bifunctional UDP-galactofuranosyltransferase. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 26430–26440.
363. Belanova, M.; Dianiskova, P.; Brennan, P.J.; Completo, G.C.; Rose, N.L.; Lowary, T.L.; Mikusova, K. Galactosyl Transferases in Mycobacterial Cell Wall Synthesis. *Journal of Bacteriology* **2008**, *190*, 1141–1145.

364. Szczepina, M.G.; Zheng, R.B.; Completo, G.C.; Lowary, T.L.; Pinto, B.M. STD-NMR studies of two acceptor substrates of GlfT2, a galactofuranosyltransferase from *Mycobacterium tuberculosis*: Epitope mapping studies. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2010**, *18*, 5123–5128.
365. Levensgood, M.R.; Splain, R.A.; Kiessling, L.L. Monitoring Processivity and Length Control of a Carbohydrate Polymerase. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 12758–12766.
366. May, J.F.; Splain, R.A.; Brotschi, C.; Kiessling, L.L. A tethering mechanism for length control in a processive carbohydrate polymerization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2009**, *106*, 11851–11856.
367. Braibant, M.; Gilot, P.; Content, J. The ATP binding cassette (ABC) transport systems of *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiology Reviews* **2000**, *24*, 449–467.
368. Dianišková, P.; Korduláková, J.; Škovierová, H.; Kaur, D.; Jackson, M.; Brennan, P.J.; Mikušová, K. Investigation of ABC transporter from mycobacterial arabinogalactan biosynthetic cluster. *Gen Physiol Biophys* **2011**, *30*, 239–250.
369. Wolucka, B.A.; McNeil, M.R.; Hoffmann, E. de; Chojnacki, T.; Brennan, P.J. Recognition of the lipid intermediate for arabinogalactan/arabinomannan biosynthesis and its relation to the mode of action of ethambutol on mycobacteria. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 23328–23335.
370. Alderwick, L.J.; Lloyd, G.S.; Lloyd, A.J.; Lovering, A.L.; Eggeling, L.; Besra, G.S. Biochemical characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* phosphoribosyl-1-pyrophosphate synthetase. *Glycobiology* **2011**, *21*, 410–425.
371. Alderwick, L.J.; Radmacher, E.; Seidel, M.; Gande, R.; Hitchen, P.G.; Morris, H.R.; Dell, A.; Sahm, H.; Eggeling, L.; Besra, G.S. Deletion of Cg- *emb* in *Corynebacteriaceae* Leads to a Novel Truncated Cell Wall Arabinogalactan, whereas Inactivation of Cg- *ubiA* Results in an Arabinan-deficient Mutant with a Cell Wall Galactan Core. *Journal of Biological Chemistry* **2005**, *280*, 32362–32371.
372. Kolly, G.S.; Mukherjee, R.; Kilacsková, E.; Abriata, L.A.; Raccaud, M.; Blaško, J.; Sala, C.; Dal Peraro, M.; Mikušová, K.; Cole, S.T. GtrA Protein Rv3789 Is Required for Arabinosylation of Arabinogalactan in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol* **2015**, *197*, 3686–3697.
373. Jiang, T.; He, L.; Zhan, Y.; Zang, S.; Ma, Y.; Zhao, X.; Zhang, C.; Xin, Y. The effect of MSMEG_6402 gene disruption on the cell wall structure of *Mycobacterium smegmatis*. *Microbial Pathogenesis* **2011**, *51*, 156–160.
374. Meniche, X.; de Sousa-d’Auria, C.; Van-der-rest, B.; Bhamidi, S.; Huc, E.; Huang, H.; De Paepe, D.; Tropis, M.; McNeil, M.; Daffé, M.; et al. Partial redundancy in the synthesis of the D-arabinose incorporated in the cell wall arabinan of *Corynebacteriaceae*. *Microbiology* **2008**, *154*, 2315–2326.
375. Crellin, P.K.; Brammananth, R.; Coppel, R.L. Decaprenylphosphoryl-β-D-Ribose 2'-Epimerase, the Target of Benzothiazinones and Dinitrobenzamides, Is an Essential Enzyme in *Mycobacterium smegmatis*. *PLOS ONE* **2011**, *6*, e16869.
376. Shi, L.; Zhou, R.; Liu, Z.; Lowary, T.L.; Seeberger, P.H.; Stocker, B.L.; Crick, D.C.; Khoo, K.-H.; Chatterjee, D. Transfer of the First Arabinofuranose Residue to Galactan Is Essential for *Mycobacterium smegmatis* Viability. *Journal of Bacteriology* **2008**, *190*, 5248–5255.
377. Escuyer, V.E.; Lety, M.-A.; Torrelles, J.B.; Khoo, K.-H.; Tang, J.-B.; Rithner, C.D.; Frehel, C.; McNeil, M.R.; Brennan, P.J.; Chatterjee, D. The Role of the *embA* and *embB* Gene Products in the Biosynthesis of the Terminal Hexaarabinofuranosyl Motif of *Mycobacterium smegmatis* Arabinogalactan. *Journal of Biological Chemistry* **2001**, *276*, 48854–48862.

378. Birch, H.L.; Alderwick, L.J.; Appelmelk, B.J.; Maaskant, J.; Bhatt, A.; Singh, A.; Nigou, J.; Eggeling, L.; Geurtsen, J.; Besra, G.S. A truncated lipoglycan from mycobacteria with altered immunological properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2010**, *107*, 2634–2639.
379. Zhang, J.; Angala, S.K.; Pramanik, P.K.; Li, K.; Crick, D.C.; Liav, A.; Jozwiak, A.; Swiezewska, E.; Jackson, M.; Chatterjee, D. Reconstitution of Functional Mycobacterial Arabinosyltransferase AftC Proteoliposome and Assessment of Decaprenylphosphorylarabinose Analogues as Arabinofuranosyl Donors. *ACS Chem Biol* **2011**, *6*, 819–828.
380. Škovierová, H.; Larrouy-Maumus, G.; Zhang, J.; Kaur, D.; Barilone, N.; Korduláková, J.; Gilleron, M.; Guadagnini, S.; Belanová, M.; Prevost, M.-C.; et al. AftD, a novel essential arabinofuranosyltransferase from mycobacteria. *Glycobiology* **2009**, *19*, 1235–1247.
381. Belisle, J.T.; Vissa, V.D.; Sievert, T.; Takayama, K.; Brennan, P.J.; Besra, G.S. Role of the Major Antigen of Mycobacterium tuberculosis in Cell Wall Biogenesis. *Science* **1997**, *276*, 1420–1422.
382. Seidel, M.; Alderwick, L.J.; Birch, H.L.; Sahm, H.; Eggeling, L.; Besra, G.S. Identification of a Novel Arabinofuranosyltransferase AftB Involved in a Terminal Step of Cell Wall Arabinan Biosynthesis in Corynebacteriaceae, such as *Corynebacterium glutamicum* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Biological Chemistry* **2007**, *282*, 14729–14740.
383. Sacksteder, K.A.; Protopopova, M.; Barry, C.E.; Andries, K.; Nacy, C.A. Discovery and development of SQ109: a new antitubercular drug with a novel mechanism of action. *Future Microbiol* **2012**, *7*, 823–837.
384. Bogatcheva, E.; Hanrahan, C.; Nikonenko, B.; Samala, R.; Chen, P.; Gearhart, J.; Barbosa, F.; Einck, L.; Nacy, C.A.; Protopopova, M. Identification of New Diamine Scaffolds with Activity against Mycobacterium tuberculosis. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 3045–3048.
385. Birch, H.L.; Alderwick, L.J.; Bhatt, A.; Rittmann, D.; Krumbach, K.; Singh, A.; Bai, Y.; Lowary, T.L.; Eggeling, L.; Besra, G.S. Biosynthesis of mycobacterial arabinogalactan: identification of a novel $\alpha(1\rightarrow3)$ arabinofuranosyltransferase. *Mol Microbiol* **2008**, *69*, 1191–1206.
386. Škovierová, H.; Larrouy-Maumus, G.; Pham, H.; Belanová, M.; Barilone, N.; DasGupta, A.; Mikušová, K.; Gicquel, B.; Gilleron, M.; Brennan, Patrick.J.; et al. Biosynthetic Origin of the Galactosamine Substituent of Arabinogalactan in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Biological Chemistry* **2010**, *285*, 41348–41355.
387. Scherman, H.; Kaur, D.; Pham, H.; Škovierová, H.; Jackson, M.; Brennan, P.J. Identification of a Polyprenylphosphomannosyl Synthase Involved in the Synthesis of Mycobacterial Mannosides. *J Bacteriol* **2009**, *191*, 6769–6772.
388. Harrison, J.; Lloyd, G.; Joe, M.; Lowary, T.L.; Reynolds, E.; Walters-Morgan, H.; Bhatt, A.; Lovering, A.; Besra, G.S.; Alderwick, L.J. Lcp1 Is a Phosphotransferase Responsible for Ligating Arabinogalactan to Peptidoglycan in Mycobacterium tuberculosis. *mBio* **2016**, *7*.
389. Jackson, M.; Raynaud, C.; Lanéelle, M.-A.; Guilhot, C.; Laurent-Winter, C.; Ensergueix, D.; Gicquel, B.; Daffé, M. Inactivation of the antigen 85C gene profoundly affects the mycolate content and alters the permeability of the Mycobacterium tuberculosis cell envelope. *Molecular Microbiology* **1999**, *31*, 1573–1587.
390. Kacem, R. Importance of mycoloyltransferases on the physiology of *Corynebacterium glutamicum*. *Microbiology* **2004**, *150*, 73–84.
391. Rombouts, Y.; Brust, B.; Ojha, A.K.; Maes, E.; Coddeville, B.; Ellass-Rochard, E.; Kremer, L.; Guerardel, Y. Exposure of Mycobacteria to Cell Wall-inhibitory Drugs Decreases Production of Arabinoglycerolipid Related to Mycolyl-arabinogalactan-peptidoglycan Metabolism. *Journal of Biological Chemistry* **2012**, *287*, 11060–11069.

392. Ellass-Rochard, E.; Rombouts, Y.; Coddeville, B.; Maes, E.; Blervaque, R.; Hot, D.; Kremer, L.; Guérardel, Y. Structural Determination and Toll-like Receptor 2-dependent Proinflammatory Activity of Dimycolyl-diarabino-glycerol from *Mycobacterium marinum*. *Journal of Biological Chemistry* **2012**, *287*, 34432–34444.
393. Tuekam, B.A.; Park, Y.-I.; Unkefer, C.J.; Gander, J.E. Relationship of Exo- β -D-Galactofuranosidase Kinetic Parameters to the Number of Phosphodiester in *Penicillium fellutanum* Peptidophosphogalactomannan: Enzyme Purification and Kinetics of Glycopeptide and Galactofuran Chain Hydrolysis. *Applied and Environmental Microbiology* **2001**, *67*, 4648–4656.
394. Matsunaga, E.; Higuchi, Y.; Mori, K.; Yairo, N.; Oka, T.; Shinozuka, S.; Tashiro, K.; Izumi, M.; Kuhara, S.; Takegawa, K. Identification and Characterization of a Novel Galactofuranose-Specific β -D-Galactofuranosidase from *Streptomyces* Species. *PLOS ONE* **2015**, *10*, e0137230.
395. Watanabe, M.; Aoyagi, Y.; Ridell, M.; Minnikin, D.E. Separation and characterization of individual mycolic acids in representative mycobacteria. *Microbiology* **2001**, *147*, 1825–1837.
396. Watanabe, M.; Fujita, T.; Ridell, M.; Mitome, H.; Minnikin, D.E.; Naoki, H.; Aoyagi, Y. Location of functional groups in mycobacterial meromycolate chains; the recognition of new structural principles in mycolic acids. *Microbiology* **2002**, *148*, 1881–1902.
397. Liu, J.; Barry, C.E.; Besra, G.S.; Nikaido, H. Mycolic Acid Structure Determines the Fluidity of the Mycobacterial Cell Wall. *Journal of Biological Chemistry* **1996**, *271*, 29545–29551.
398. Dubnau, E.; Chan, J.; Rayaud, C.; Mohan Vellore, P.; Lan  elle, M.-A.; Yu Keming; Qu  mard, A.; Smith, I.; Daff  , M. Oxygenated mycolic acids are necessary for virulence of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Molecular Microbiology* **2000**, *36*, 630–637.
399. Cole, S.T.; Brosch, R.; Parkhill, J.; Garnier, T.; Churcher, C.; Harris, D.; Gordon, S.V.; Eiglmeier, K.; Gas, S.; III, C.E.B.; et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. **1998**, *396*, 27.
400. Kremer, L.; Nampoothiri, K.M.; Lesjean, S.; Dover, L.G.; Graham, S.; Betts, J.; Brennan, P.J.; Minnikin, D.E.; Locht, C.; Besra, G.S. Biochemical Characterization of Acyl Carrier Protein (AcpM) and Malonyl-CoA:AcpM Transacylase (mtFabD), Two Major Components of *Mycobacterium tuberculosis* Fatty Acid Synthase II. *Journal of Biological Chemistry* **2001**, *276*, 27967–27974.
401. Choi, K.-H.; Kremer, L.; Besra, G.S. Identification and Substrate Specificity of β -Ketoacyl-[Acyl Carrier Protein] Synthase III (mtFabH) from *Mycobacterium tuberculosis*. **2000**, 33.
402. Labesse, G.; Daff  , M.; Qu  mard, A.; Emorine, L.; Charpentier, X.; Marrakchi, H.; Montrozier, H.; Margeat, E.; Ducasse, S. MabA (FabG1), a *Mycobacterium tuberculosis* protein involved in the long-chain fatty acid elongation system FAS-II. *Microbiology* **2002**, *148*, 951–960.
403. Sacco, E.; Covarrubias, A.S.; O'Hare, H.M.; Carroll, P.; Eynard, N.; Jones, T.A.; Parish, T.; Daff  , M.; B  ckbro, K.; Qu  mard, A. The missing piece of the type II fatty acid synthase system from *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2007**, *104*, 14628–14633.
404. Kremer, L.; Dover, L.G.; Carr  re, S.; Nampoothiri, K.M.; Lesjean, S.; Brown, A.K.; Brennan, P.J.; Minnikin, D.E.; Locht, C.; Besra, G.S. Mycolic acid biosynthesis and enzymic characterization of the beta-ketoacyl-ACP synthase A-condensing enzyme from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochem J* **2002**, *364*, 423–430.
405. Barkan, D.; Rao, V.; Sukenick, G.D.; Glickman, M.S. Redundant Function of cmaA2 and mmaA2 in *Mycobacterium tuberculosis* cis Cyclopropanation of Oxygenated Mycolates. *J Bacteriol* **2010**, *192*, 3661–3668.
406. Trivedi, O.A.; Arora, P.; Sridharan, V.; Tickoo, R.; Mohanty, D.; Gokhale, R.S. Enzymic activation and transfer of fatty acids as acyl-adenylates in mycobacteria. *Nature* **2004**, *428*, 441–445.

407. Portevin, D.; de Sousa-D'Auria, C.; Houssin, C.; Grimaldi, C.; Chami, M.; Daffé, M.; Guilhot, C. A polyketide synthase catalyzes the last condensation step of mycolic acid biosynthesis in mycobacteria and related organisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2004**, *101*, 314–319.
408. Bhatt, A.; Brown, A.K.; Singh, A.; Minnikin, D.E.; Besra, G.S. Loss of a Mycobacterial Gene Encoding a Reductase Leads to an Altered Cell Wall Containing β -oxo- Mycolic Acid Analogs and Accumulation of Ketones. *Chem Biol* **2008**, *15*, 930–939.
409. Takayama, K.; Wang, C.; Besra, G.S. Pathway to Synthesis and Processing of Mycolic Acids in *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Rev* **2005**, *18*, 81–101.
410. Grzegorzewicz, A.E.; Pham, H.; Gundi, V.A.K.B.; Scherman, M.S.; North, E.J.; Hess, T.; Jones, V.; Grupp, V.; Born, S.E.M.; Korduláková, J.; et al. Inhibition of mycolic acid transport across the *Mycobacterium Tuberculosis* plasma membrane. *Nat Chem Biol* **2012**, *8*, 334–341.
411. Kremer, L.; Pawełczyk, J. The Molecular Genetics of Mycolic Acid Biosynthesis. *Microbiology Spectrum* **2014**, *2*.
412. Gilleron, M.; Jackson, M.; Nigou, J.; Puzo, G. Structure, Biosynthesis, and Activities of the Phosphatidyl-myo-Inositol-Based Lipoglycans. *The Mycobacterial Cell Envelope* **2008**, 75–105.
413. Mishra, A.K.; Driessen, N.N.; Appelmelk, B.J.; Besra, G.S. Lipoarabinomannan and related glycoconjugates: structure, biogenesis and role in *Mycobacterium tuberculosis* physiology and host–pathogen interaction. *FEMS Microbiol Rev* **2011**, *35*, 1126–1157.
414. Khoo, K.H.; Dell, A.; Morris, H.R.; Brennan, P.J.; Chatterjee, D. Structural definition of acylated phosphatidylinositol mannosides from *Mycobacterium tuberculosis*: definition of a common anchor for lipomannan and lipoarabinomannan. *Glycobiology* **1995**, *5*, 117–127.
415. Kaur, D.; Obregón-Henao, A.; Pham, H.; Chatterjee, D.; Brennan, P.J.; Jackson, M. Lipoarabinomannan of *Mycobacterium*: Mannose capping by a multifunctional terminal mannosyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008**, *105*, 17973–17977.
416. Guérardel, Y.; Maes, E.; Ellass, E.; Leroy, Y.; Timmerman, P.; Besra, G.S.; Locht, C.; Strecker, G.; Kremer, L. Structural Study of Lipomannan and Lipoarabinomannan from *Mycobacterium chelonae*: Presence of unusual components with α 1,3-mannopyranose side chains. *Journal of Biological Chemistry* **2002**, *277*, 30635–30648.
417. McNeil, M.R.; Robuck, K.G.; Harter, M.; Brennan, P.J. Enzymatic evidence for the presence of a critical terminal hexa-arabinoside in the cell walls of *Mycobacterium tuberculosis*. *Glycobiology* **1994**, *4*, 165–173.
418. Nigou, J.; Gilleron, M.; Puzo, G. Lipoarabinomannans: from structure to biosynthesis. *Biochimie* **2003**, *85*, 153–166.
419. Joe, M.; Sun, D.; Taha, H.; Completo, G.C.; Croudace, J.E.; Lammas, D.A.; Besra, G.S.; Lowary, T.L. The 5-Deoxy-5-methylthio-xylofuranose Residue in Mycobacterial Lipoarabinomannan. Absolute Stereochemistry, Linkage Position, Conformation, and Immunomodulatory Activity. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 5059–5072.
420. Delmas, C.; Gilleron, M.; Brando, T.; Vercellone, A.; Gheorghiu, M.; Riviere, M.; Puza, G. Comparative structural study of the mannosylated-lipoarabinomannans from *Mycobacterium bovis* BCG vaccine strains: characterization and localization of succinates. *Glycobiology* **1997**, *7*, 811–817.
421. Shi, L.; Berg, S.; Lee, A.; Spencer, J.S.; Zhang, J.; Vissa, V.; McNeil, M.R.; Khoo, K.-H.; Chatterjee, D. The Carboxy Terminus of EmbC from *Mycobacterium smegmatis* Mediates Chain Length Extension of the Arabinan in Lipoarabinomannan. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 19512–19526.

422. Dinadayala, P.; Kaur, D.; Berg, S.; Amin, A.G.; Vissa, V.D.; Chatterjee, D.; Brennan, P.J.; Crick, D.C. Genetic Basis for the Synthesis of the Immunomodulatory Mannose Caps of Lipoarabinomannan in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 20027–20035.
423. Henrissat, B.; Sulzenbacher, G.; Bourne, Y. Glycosyltransferases, glycoside hydrolases: surprise, surprise! *Current Opinion in Structural Biology* **2008**, *18*, 527–533.
424. Laine, R.A. A calculation of all possible oligosaccharide isomers both branched and linear yields 1.05×10^{12} structures for a reducing hexasaccharide: the Isomer Barrier to development of single-method saccharide sequencing or synthesis systems. *Glycobiology* **1994**, *4*, 759–767.
425. Doerks, T.; Noort, V. van; Minguéz, P.; Bork, P. Annotation of the *M. tuberculosis* Hypothetical Orfeome: Adding Functional Information to More than Half of the Uncharacterized Proteins. *PLOS ONE* **2012**, *7*, e34302.
426. Wolfenden, R. Benchmark reaction rates, the stability of biological molecules in water, and the evolution of catalytic power in enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* **2011**, *80*, 645–667.
427. Committee, I.U. of B. and M.B.N.; Webb, E.C. *Enzyme nomenclature 1992: recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the nomenclature and classification of enzymes*; Published for the International Union of Biochemistry and Molecular Biology by Academic Press, 1992; ISBN 978-0-12-227164-9.
428. Henrissat, B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J* **1991**, *280*, 309–316.
429. Cantarel, B.L.; Coutinho, P.M.; Rancurel, C.; Bernard, T.; Lombard, V.; Henrissat, B. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Res* **2009**, *37*, D233–D238.
430. Henrissat, B.; Bairoch, A. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J* **1993**, *293*, 781–788.
431. Johnson, L.N.; Phillips, D.C. Structure of some crystalline lysozyme-inhibitor complexes determined by X-ray analysis at 6 Angstrom resolution. *Nature* **1965**.
432. Davies, G.; Henrissat, B. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure* **1995**, *3*, 853–859.
433. Kötzler, M.P.; Hancock, S.M.; Withers, S.G. *Glycosidases: Functions, Families and Folds*. In *eLS*; John Wiley & Sons Ltd, Ed.; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK, 2014 ISBN 978-0-470-01590-2.
434. Taylor, G. Sialidases: structures, biological significance and therapeutic potential. *Current Opinion in Structural Biology* **1996**, *6*, 830–837.
435. Sugihara, H.; Nagao, M.; Harada, T.; Nakajima, Y.; Tanimura-Inagaki, K.; Okajima, F.; Tamura, H.; Inazawa, T.; Otonari, T.; Kawakami, M.; et al. Comparison of three α -glucosidase inhibitors for glycemic control and bodyweight reduction in Japanese patients with obese type 2 diabetes. *J Diabetes Investig* **2014**, *5*, 206–212.
436. Asano, N. Glycosidase inhibitors: update and perspectives on practical use. *Glycobiology* **2003**, *13*, 93R – 104.
437. von Itzstein, M. The war against influenza: discovery and development of sialidase inhibitors. *Nat. Rev Drug Discov* **2007**, *6*, 967.
438. Koshland, E.; Stein, S. Correlation of bond breaking with enzyme specificity. Cleavage point of invertase. 11.

439. Rempel, B.P.; Withers, S.G. Covalent inhibitors of glycosidases and their applications in biochemistry and biology. *Glycobiology* **2008**, *18*, 570–586.
440. Brás, N.F.; Fernandes, P.A.; Ramos, M.J. QM/MM Studies on the β -Galactosidase Catalytic Mechanism: Hydrolysis and Transglycosylation Reactions. *J Chem Theory Comput.* **2010**, *6*, 421–433.
441. He, Y.; Macauley, M.S.; Stubbs, K.A.; Vocadlo, D.J.; Davies, G.J. Visualizing the Reaction Coordinate of an O-GlcNAc Hydrolase. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 1807–1809.
442. Mark, B.L.; Vocadlo, D.J.; Knapp, S.; Triggs-Raine, B.L.; Withers, S.G.; James, M.N.G. Crystallographic Evidence for Substrate-assisted Catalysis in a Bacterial β -Hexosaminidase. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 10330–10337.
443. Vasella, A.; Davies, G.J.; Böhm, M. Glycosidase mechanisms. *Current Opinion in Chemical Biology* **2002**, *6*, 619–629.
444. Koshland, D.E. Stereochemistry and the Mechanism of Enzymatic Reactions. *Biological Reviews* **1953**, *28*, 416–436.
445. Brás, N.F.; Fernandes, P.A.; Ramos, M.J. Docking and molecular dynamics studies on the stereoselectivity in the enzymatic synthesis of carbohydrates. *Theor Chem Account* **2009**, *122*, 283.
446. Rajan, S.S.; Yang, X.; Collart, F.; Yip, V.L.Y.; Withers, S.G.; Varrot, A.; Thompson, J.; Davies, G.J.; Anderson, W.F. Novel Catalytic Mechanism of Glycoside Hydrolysis Based on the Structure of an NAD⁺/Mn²⁺-Dependent Phospho- α -Glucosidase from *Bacillus subtilis*. *Structure* **2004**, *12*, 1619–1629.
447. De Smet, K.A.; Weston, A.; Brown, I.N.; Young, D.B.; Robertson, B.D. Three pathways for trehalose biosynthesis in mycobacteria. *Microbiology* **2000**, *146*, 199–208.
448. Pan, Y.T.; Koroth Edavana, V.; Jourdian, W.J.; Edmondson, R.; Carroll, J.D.; Pastuszak, I.; Elbein, A.D. Trehalose synthase of *Mycobacterium smegmatis*: Purification, cloning, expression, and properties of the enzyme. *European Journal of Biochemistry* **2004**, *271*, 4259–4269.
449. van Wyk, N.; Drancourt, M.; Henrissat, B.; Kremer, L. Current perspectives on the families of glycoside hydrolases of *Mycobacterium tuberculosis*: their importance and prospects for assigning function to unknowns. *Glycobiology* **2016**, *27*, 112–122.
450. Antoine, A.D.; Tepper, B.S. Environmental Control of Glycogen and Lipid Content of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol* **1969**, *100*, 538–539.
451. Garg, S.K.; Alam, Md.S.; Kishan, K.V.R.; Agrawal, P. Expression and characterization of α -(1,4)-glucan branching enzyme Rv1326c of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Protein Expression and Purification* **2007**, *51*, 198–208.
452. Asención Díez, M.D.; Demonte, A.M.; Syson, K.; Arias, D.G.; Gorelik, A.; Guerrero, S.A.; Bornemann, S.; Iglesias, A.A. Allosteric regulation of the partitioning of glucose-1-phosphate between glycogen and trehalose biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochim Biophys Acta* **2015**, *1850*, 13–21.
453. Sambou, T.; Dinadayala, P.; Stadthagen, G.; Barilone, N.; Bordat, Y.; Constant, P.; Levillain, F.; Neyrolles, O.; Gicquel, B.; Lemassu, A.; et al. Capsular glucan and intracellular glycogen of *Mycobacterium tuberculosis*: Biosynthesis and Impact on the Persistence in mice. *Mol Microbiol* **2008**, *70*, 762–774.
454. Schwebach, J.R.; Glatman-Freedman, A.; Gunther-Cummins, L.; Dai, Z.; Robbins, J.B.; Schneerson, R.; Casadevall, A. Glucan Is a Component of the *Mycobacterium tuberculosis* Surface That Is Expressed In Vitro and In Vivo. *Infect Immun* **2002**, *70*, 2566–2575.

455. Dinadayala, P.; Sambou, T.; Daffe, M.; Lemassu, A. Comparative structural analyses of the -glucan and glycogen from *Mycobacterium bovis*. *Glycobiology* **2008**, *18*, 502–508.
456. Kalscheuer, R.; Jacobs, W.R. The significance of GlgE as a new target for tuberculosis. *Drug News Perspect.* **2010**, *23*, 619–624.
457. Stam, M.R.; Danchin, E.G.J.; Rancurel, C.; Coutinho, P.M.; Henrissat, B. Dividing the large glycoside hydrolase family 13 into subfamilies: towards improved functional annotations of alpha-amylase-related proteins. *Protein Eng. Des. Sel.* **2006**, *19*, 555–562.
458. Uhland, K.; Mondigler, M.; Spiess, C.; Prinz, W.; Ehrmann, M. Determinants of Translocation and Folding of TreF, a Trehalase of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 23439–23445.
459. Squeglia, F.; Ruggiero, A.; Berisio, R. Exit from mycobacterial dormancy: a structural perspective. *Curr. Med. Chem.* **2015**, *22*, 1698–1709.
460. Tufariello, J.M.; Mi, K.; Xu, J.; Manabe, Y.C.; Kesavan, A.K.; Drumm, J.; Tanaka, K.; Jacobs, W.R.; Chan, J. Deletion of the *Mycobacterium tuberculosis* Resuscitation-Promoting Factor Rv1009 Gene Results in Delayed Reactivation from Chronic Tuberculosis. *Infect Immun* **2006**, *74*, 2985–2995.
461. Hett, E.C.; Chao, M.C.; Deng, L.L.; Rubin, E.J. A Mycobacterial Enzyme Essential for Cell Division Synergizes with Resuscitation-Promoting Factor. *PLoS Pathogens* **2008**, *4*, e1000001.
462. Höltje, J.V.; Mirelman, D.; Sharon, N.; Schwarz, U. Novel type of murein transglycosylase in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **1975**, *124*, 1067–1076.
463. Koeck, D.E.; Pechtl, A.; Zverlov, V.V.; Schwarz, W.H. Genomics of cellulolytic bacteria. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2014**, *29*, 171–183.
464. Varrot, A.; Leydier, S.; Pell, G.; Macdonald, J.M.; Stick, R.V.; Henrissat, B.; Gilbert, H.J.; Davies, G.J. *Mycobacterium tuberculosis* Strains Possess Functional Cellulases. *Journal of Biological Chemistry* **2005**, *280*, 20181–20184.
465. Mba Medie, F.; Vincentelli, R.; Drancourt, M.; Henrissat, B. *Mycobacterium tuberculosis* Rv1090 and Rv1987 encode functional β -glucan-targeting proteins. *Protein Expression and Purification* **2011**, *75*, 172–176.
466. Kato, S.; Haruta, S.; Cui, Z.J.; Ishii, M.; Igarashi, Y. Stable Coexistence of Five Bacterial Strains as a Cellulose-Degrading Community. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 7099–7106.
467. Trivedi, A.; Mavi, P.S.; Bhatt, D.; Kumar, A. Thiol reductive stress induces cellulose-anchored biofilm formation in *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature Communications* **2016**, *7*, 11392.
468. Limoli, D.H.; Jones, C.J.; Wozniak, D.J. Bacterial Extracellular Polysaccharides in Biofilm Formation and Function. *Microbiol Spectr* **2015**, *3*.
469. Van Wyk, N.; Navarro, D.; Blaise, M.; Berrin, J.-G.; Henrissat, B.; Drancourt, M.; Kremer, L. Characterization of a mycobacterial cellulase and its impact on biofilm- and drug-induced cellulose production. *Glycobiology* **2017**, *27*, 392–399.
470. Frey, P.A. The Leloir pathway: a mechanistic imperative for three enzymes to change the stereochemical configuration of a single carbon in galactose. *The FASEB Journal* **1996**, *10*, 461–470.
471. Holden, H.M.; Rayment, I.; Thoden, J.B. Structure and Function of Enzymes of the Leloir Pathway for Galactose Metabolism. *Journal of Biological Chemistry* **2003**, *278*, 43885–43888.
472. Novelli, G.; Reichardt, J.K. Molecular basis of disorders of human galactose metabolism: past, present, and future. *Mol. Genet. Metab.* **2000**, *71*, 62–65.

473. SzumiÅ, T. The catabolism of d-galactose and its derivatives by non-pathogenic *Mycobacterium* species. *FEMS Microbiology Letters* **1981**, *11*, 171–173.
474. Wallenfels, K.; Hucho, F.; Herrmann, K. Enzymatically catalyzed mutarotation of aldoses. Studies on aldose-1-epimerase from *E. coli*. *Biochem Z* **1965**, *343*, 307–325.
475. Bouffard, G.G.; Rudd, K.E.; Adhya, S.L. Dependence of Lactose Metabolism upon Mutarotase Encoded in the gal Operon in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology* **1994**, *244*, 269–278.
476. Hucho, F.; Wallenfels, K. The Enzymatically Catalyzed Mutarotation. *European Journal of Biochemistry* **1971**, *23*, 489–496.
477. Jacobson, R.H.; Zhang, X.-J.; DuBose, R.F.; Matthews, B.W. Three-dimensional structure of β -galactosidase from *E. coli*. *Nature* **1994**, *369*, 761–766.
478. Thoden, J.B.; Kim, J.; Raushel, F.M.; Holden, H.M. The catalytic mechanism of galactose mutarotase. *Protein Sci* **2003**, *12*, 1051–1059.
479. Timson, D.J.; Reece, R.J. Identification and characterisation of human aldose 1-epimerase. *FEBS Letters* **2003**, *543*, 21–24.
480. Thoden, J.B.; Holden, H.M. The Molecular Architecture of Galactose Mutarotase/UDP-Galactose 4-Epimerase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* **2005**, *280*, 21900–21907.
481. Frey, P.A.; Hegeman, A.D. Chemical and Stereochemical Actions of UDP-Galactose 4-Epimerase. *Accounts of Chemical Research* **2013**, *46*, 1417–1426.
482. Dalrymple, S.A.; Ko, J.; Sheoran, I.; Kaminskyj, S.G.W.; Sanders, D.A.R. Elucidation of Substrate Specificity in *Aspergillus nidulans* UDP-Galactose-4-Epimerase. *PLoS One* **2013**, *8*.
483. Kavanagh, K.L.; Jörnvall, H.; Persson, B.; Oppermann, U. Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families. *Cell Mol Life Sci* **2008**, *65*, 3895–3906.
484. Liu, Z.-J.; Sun, Y.-J.; Rose, J.; Chung, Y.-J.; Hsiao, C.-D.; Chang, W.-R.; Kuo, I.; Perozich, J.; Lindahl, R.; Hempel, J.; et al. The first structure of an aldehyde dehydrogenase reveals novel interactions between NAD and the Rossmann fold. *Nature Structural Biology* **1997**, *4*, 317.
485. Dong, X.; Bhamidi, S.; Scherman, M.; Xin, Y.; McNeil, M.R. Development of a Quantitative Assay for Mycobacterial Endogenous Arabinase and Ensuing Studies of Arabinase Levels and Arabinan Metabolism in *Mycobacterium smegmatis*. *Applied and Environmental Microbiology* **2006**, *72*, 2601–2605.
486. Besra, G.S. Preparation of Cell-Wall Fractions from Mycobacteria. *Methods Mol Biol.* **1998**, *101*, 91–107.
487. Anthon, G.E.; Barrett, D.M. Determination of Reducing Sugars with 3-Methyl-2-benzothiazolinonehydrazone. *Analytical Biochemistry* **2002**, *305*, 287–289.
488. Mawuenyega, K.G.; Forst, C.V.; Dobos, K.M.; Belisle, J.T.; Chen, J.; Bradbury, E.M.; Bradbury, A.R.; Chen, X. Mycobacterium tuberculosis functional network analysis by global subcellular protein profiling. *Molecular Biology of the cell* **2005**, *16*, 396–404.
489. Ma alen, H.; Pathak, S.; Softeland, T.; De Souza, G.A.; Wiker, H.G. Definition of novel cell envelope associated proteins in Triton X-114 extracts of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *BMC microbiology* **2010**, *10*, 1.
490. Hofmeister, F. Zur Lehre von der Wirkung der Salze. *Archiv f. experiment. Pathol. u. Pharmakol* **1888**, *24*, 247–260.

491. Ryu, K.-S.; Kim, C.; Kim, I.; Yoo, S.; Choi, B.-S.; Park, C. NMR Application Probes a Novel and Ubiquitous Family of Enzymes That Alter Monosaccharide Configuration. *Journal of Biological Chemistry* **2004**, *279*, 25544–25548.
492. Schell, M.A.; Wilson, D.B. Purification and properties of galactokinase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **1977**, *252*, 1162–1166.
493. Joe, M.; Lowary, T.L. Synthesis of a homologous series of galactofuranose-containing mycobacterial arabinogalactan fragments. *Canadian Journal of Chemistry* **2016**, *94*, 976–988.
494. Semple, J.I. The jury is out on “guilt by association” trials. *Briefings in Functional Genomics and Proteomics* **2002**, *1*, 40–52.
495. Horler, R.S.P.; Müller, A.; Williamson, D.C.; Potts, J.R.; Wilson, K.S.; Thomas, G.H. Furanose-specific Sugar Transport: Characterization of a bacterial galactofuranose-binding protein. *Journal of Biological Chemistry* **2009**, *284*, 31156–31163.
496. Bhamidi, S.; Scherman, M.S.; Jones, V.; Crick, D.C.; Belisle, J.T.; Brennan, P.J.; McNeil, M.R. Detailed Structural and Quantitative Analysis Reveals the Spatial Organization of the Cell Walls of in Vivo Grown *Mycobacterium leprae* and in Vitro Grown *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* **2011**, *286*, 23168–23177.
497. Lee, R.E.B.; Li, W.; Chatterjee, D.; Lee, R.E. Rapid structural characterization of the arabinogalactan and lipoarabinomannan in live mycobacterial cells using 2D and 3D HR-MAS NMR: structural changes in the arabinan due to ethambutol treatment and gene mutation are observed. *Glycobiology* **2005**, *15*, 139–151.
498. Laemmli, U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **1970**, *227*, 680–685.

Les glycanes sont des acteurs essentiels des relations hôtes-pathogènes qui s'établissent lors d'une infection et l'influence de ces composés complexes est loin d'être élucidée. Dans ce projet, ces relations ont été étudiées en se focalisant sur les glycanes provenant de deux organismes pathogènes majeurs pour l'Homme, à savoir *Candida albicans* et *Mycobacterium tuberculosis*.

D'un côté, *Candida albicans* a été étudié dans le cadre des candidoses invasives (CI) rencontrées principalement dans les services de réanimation. Cette infection fongique est très préoccupante car les taux de mortalité restent extrêmement élevés due à un diagnostic précoce qui fait cruellement défaut. En effet, l'outil de référence aujourd'hui utilisé pour leur diagnostic est l'hémoculture mais celle-ci n'est positive que dans 50 % des cas. D'autres tests diagnostiques ont été développés en ciblant notamment les composants de la paroi cellulaire de *Candida* comme les β -D-(1 \rightarrow 3)-glucanes ou encore les mannanes mais ces derniers représentent un coût exorbitant pour les hôpitaux et ils sont très hétérogènes en termes de performance. C'est donc dans ce cadre que nous avons participé à l'élaboration d'un test de diagnostic des CI basé sur l'analyse et la quantification par spectrométrie de masse d'un disaccharide sérique provenant du métabolisme des glycanes de *C. albicans*. Différentes cohortes locales mais aussi européennes ont été mises en place pour l'étude des performances de ce nouveau test. Un versant plus fondamental a également permis de mettre en avant le tréhalose comme étant le disaccharide retrouvé dans les sérums de patients infectés.

D'un autre côté, *Mycobacterium tuberculosis*, qui cause la tuberculose humaine, est la première cause de décès dans le monde lié à un seul pathogène et l'émergence de souches multi-résistantes a mis en avant le besoin urgent de nouvelles cibles médicamenteuses. Dans ce contexte, nos travaux ont porté sur la recherche de glycosidases impliquées dans le catabolisme de la paroi mycobactérienne et plus particulièrement de l'arabinogalactane (AG) qui représente un versant très peu documenté de la biologie de la paroi mycobactérienne à l'heure actuelle. Les investigations ont d'abord permis d'identifier une exo-galactofuranohydrolase mais aussi, dans le cadre de cette thèse, une galactose mutarotase impliquée dans le recyclage du galactose de la chaîne galactane de l'AG suite à l'action de la première enzyme.

Mots-clés: relations hôte-pathogène, mycobactéries, *Candida*, paroi cellulaire, glycanes, biochimie, bioanalytique, microbiologie.



The glycans are essential actors of the host-pathogen connections that are established during the infection and the influence of these complex compounds is far from being elucidated. In this project, these interactions were studied by focusing on glycans from two major pathogenic organisms for humans, namely *Mycobacterium tuberculosis* and *Candida albicans*.

On one side, *Candida albicans* has been studied in the context of invasive candidiasis (IC) encountered mainly in intensive care units. This fungal infection is very worrying because mortality rates remain extremely high due to an early diagnosis that is sorely lacking. Indeed, the gold standard used for their diagnosis is the blood culture but it is only positive in 50 % of cases. Other diagnostic tests have been developed by targeting *Candida* cell wall components such as β -D-(1 \rightarrow 3)-glucans or mannan, but they represent an exorbitant cost for hospitals and are very heterogeneous in term of performance. It is therefore in this context that we participated in the development of an IC diagnostic test based on mass spectrometry analysis and quantification of a serum disaccharide derived from the metabolism of *C. albicans* glycans. Different local but also European cohorts have been set up to study the performance of this new test. A more fundamental side also highlighted trehalose as the disaccharide found in the sera of infected patients.

On the other hand, *Mycobacterium tuberculosis*, which causes human tuberculosis, is the leading cause of death in the world linked to a single pathogen and the emergence of multi-resistant strains has highlighted the urgent need of new drug targets. In this context, our work focused on the research of glycosidases involved in the catabolism of the mycobacterial cell wall and more particularly of arabinogalactan (AG), which represents a very little documented side of mycobacterial cell wall biology for the moment. The investigations allowed us to identify an exo-galactofuranohydrolase but also, in the context of this thesis, a galactose mutarotase involved in the recycling of galactose from the galactan chain of AG following the action of the first enzyme.

Keywords: Host-pathogen connections, mycobacteria, *Candida*, cell wall, glycans, biochemistry, bioanalytic, microbiology.