



HAL
open science

**Relations structure-fonction des
 β -1,2-mannosyltransférases de *Candida albicans* : vers
une meilleure compréhension de la β -mannosylation du
phosphopeptidomannane**

Thomas Hurtaux

► **To cite this version:**

Thomas Hurtaux. Relations structure-fonction des β -1,2-mannosyltransférases de *Candida albicans* : vers une meilleure compréhension de la β -mannosylation du phosphopeptidomannane. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2016. Français. NNT : 2016LIL2S050 . tel-01582602

HAL Id: tel-01582602

<https://theses.hal.science/tel-01582602>

Submitted on 6 Sep 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Lille 2 - Droit et Santé
Ecole doctorale de Biologie - Santé de Lille

THESE DE DOCTORAT

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE 2

Discipline : Biologie moléculaire et structurale, biochimie
Spécialité : Biochimie et biologie moléculaire

Présentée et soutenue publiquement par

Thomas HURTAUX

le 29 novembre 2016

**Relations structure-fonction des β -1,2-
mannosyltransférases de *Candida albicans* : vers une
meilleure compréhension de la β -mannosylation du
phosphopeptidomannane**

Devant le jury composé de :

Présidente : **Docteur Anne HARDUIN-LEPERS**

Rapporteurs : **Docteur Thierry FONTAINE**

Docteur Bernard HENRISSAT

Examineurs : **Docteur Jean-Maurice MALLET**

Docteur Kaoru TAKEGAWA

Directeurs de thèse : **Professeur Boualem SENDID**

Docteur Yann GUERARDEL

Ces travaux ont été réalisés sous la co-direction scientifique :

- du Pr Boualem Sendid au sein du LIRIC (Lille Inflammation Research International Center), UMR 995 Inserm (directeur : Pr Pierre Desreumaux), dans l'équipe « Fungal associated inflammatory and invasive diseases » dirigée par le Pr Boualem Sendid,
- du Dr Yann Guérardel au sein de l'UGSF (Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle), UMR 8576 CNRS (directeur : Pr Christophe D'Hulst) dans l'équipe « Glycobiologie structurale des interactions hôtes-pathogènes » dirigée par le Dr Yann Guérardel.

Remerciements

Je tiens avant tout à remercier l'ensemble des membres du jury d'avoir accepté de participer à l'évaluation de mes travaux de thèse et tout particulièrement le Dr Bernard Henrissat et le Dr Thierry Fontaine d'avoir bien voulu évaluer ces travaux en tant que rapporteurs. Merci également au Dr Anne Harduin-Lepers, au Dr Jean-Maurice Mallet et au Dr Kaoru Takegawa d'avoir accepté, malgré la distance, de venir examiner mon travail de thèse.

Je remercie chaleureusement mes deux directeurs de thèse, le Pr Boualem Sendid et le Dr Yann Guérardel, pour la confiance qu'ils m'ont accordée, et pour leur encadrement scientifique, quotidien ou non, de près comme de loin, mais toujours pertinent et enrichissant.

Je tiens également à remercier le Dr Emeline Fabre et le Dr Chantal Fradin pour m'avoir accompagné au départ de ce long périple commencé il y a quatre ans déjà.

Merci également au Dr Florence Delplace, qui a admirablement repris le flambeau pour m'accompagner jusqu'au bout du chemin, ainsi qu'au Dr Ghenima Sfihi-Loualia pour m'avoir ouvert la voie de si belle manière. J'adresse également mes remerciements au Dr Coralie Bompard pour son aide très appréciée et bienvenue en cristallographie.

Je remercie aussi l'ensemble des membres, passés et présents, de l'équipe « Glycobiologie structurale des interactions hôtes-pathogènes » et de la plateforme PAGès pour leur aide précieuse et leur bonne humeur indispensable pour qui veut évoluer aussi bien scientifiquement qu'humainement : merci à Elisabeth Ellass, Bernadette Coddeville, Frédéric Krzewinski, Emmanuel Maes, Nao Yamakawa, Christophe Biot, Christophe Mariller, Faustine Dubar, Cédric Lion et Isabelle Huvent.

De même, je tiens à remercier mes compagnons d'infortune, Pierre-André Gilormini, Clément Delannoy et Alexandre Méry, ainsi que tous les stagiaires qui participent à la vie de cette équipe. Sans oublier Emma, Justine, Corinne et Ernestine, sans qui les pots seraient nettement moins festifs.

Enfin, je remercie toute ma famille, et plus particulièrement mes parents, pour leur soutien indéfectible tout au long de mes péripéties étudiantes.

Avant-propos

Résumé

Candida albicans est une levure saprophyte présente dans la flore digestive humaine. Elle peut néanmoins devenir pathogène chez des individus immunodéficients et causer des infections sévères associées à de forts taux de mortalité. La paroi de *C. albicans*, en contact avec l'hôte, contient des β -1,2 oligomannosides (β -Man) liés à de multiples molécules pariétales telles que le phospholipomannane (PLM) ou le phosphopeptidomannane (PPM). Ces β -Man sont présents dans les espèces les plus pathogènes de *Candida* (principalement *C. albicans*, mais également *C. glabrata* et *C. tropicalis*) et sont considérés comme des facteurs de virulence. L'identification d'une famille de 9 gènes codant pour des β -mannosyltransférases (CaBmt) a permis une meilleure compréhension du rôle de 6 de ces enzymes. Des études de génétique inverse ont montré que la β -1,2-mannosylation du PPM était assurée par les enzymes CaBmt1 à 4, tandis que CaBmt5 et 6 étaient impliquées dans celle du PLM. Une première enzyme responsable de l'initiation de la β -mannosylation du PPM, CaBmt1, a donc été caractérisée dans l'équipe grâce à l'étude de l'activité d'une forme recombinante soluble.

L'objectif de cette thèse est de caractériser l'activité et la structure de CaBmt3, l'enzyme qui initie la polymérisation des β -Man suite à l'action de CaBmt1, pour mieux comprendre le mécanisme catalytique des β -1,2-mannosyltransférases. Ainsi, nous avons précisément identifié le substrat accepteur de CaBmt3 et défini ses paramètres enzymatiques. Par une approche combinant la diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS), la modélisation moléculaire *in silico* et la mutagenèse dirigée de protéines recombinantes, nous proposons un modèle structural et catalytique de CaBmt3 qui pourrait être étendu à l'ensemble de la famille. En parallèle, nous avons montré que des iminosucres mono- et multivalents étaient capables de moduler l'activité des β -mannosyltransférases. Enfin, nous avons amorcé le travail sur une dernière enzyme, CaBmt4, qui est susceptible de polymériser le β -Man initié par CaBmt1 et CaBmt3.

Pour conclure, ces travaux offrent une meilleure compréhension de la β -mannosylation du PPM de *C. albicans*. Ces études fonctionnelles, couplées aux avancées structurales, pourraient conduire à l'élaboration d'inhibiteurs de CaBmt et développer ainsi de nouvelles approches thérapeutiques contre les candidoses invasives.

Summary

Candida albicans is a saprophytic yeast of human gastro-intestinal tract. It can however become pathogenic in immunocompromised individuals and cause severe infections associated with high mortality rates. The cell wall of *C. albicans*, in contact with the host, contains β -1,2 oligomannosides (β -Man) linked to several parietal molecules such as phospholipomannan (PLM) and phosphopeptidomannan (PPM). These β -Man are found in the most pathogenic *Candida* species (primarily *C. albicans*, but also in non-*albicans* species such as *C. glabrata* and *C. tropicalis*) and are considered as virulence factors. The identification of a family of 9 genes coding for β -mannosyltransferases (CaBmt) led to a better understanding of the role of 6 of these enzymes. Reverse genetics studies showed that CaBmt1-4 were responsible for the β -1,2-mannosylation of PPM, whereas CaBmt5-6 were involved in the β -1,2-mannosylation of PLM. A first enzyme responsible for the initiation of the PPM's β -mannosylation, CaBmt1, was characterized in the lab by studying the activity of its recombinant soluble form.

The goal of this thesis is to characterize both activity and structure of CaBmt3, the enzyme initiating β -Man polymerization following CaBmt1's activity, in order to further the understanding of β -1,2-mannosyltransferases catalytic mechanism. Thus, we precisely identified CaBmt3 acceptor substrate and characterized its enzymatic parameters. Combining small angle X-ray diffraction (SAXS), *in silico* molecular modelization and site-directed mutagenesis of recombinant proteins, we propose a structural and catalytic model of CaBmt3 which could be extended to the whole family. In parallel, we showed that mono- and multivalent iminosugars were able to modulate β -mannosyltransferases activity. Finally, we started to work on one last enzyme, CaBmt4, which could potentially polymerize the β -Man initiated by CaBmt1 and CaBmt3.

In conclusion, the synthesis of these investigations offers a better understanding of the β -mannosylation processes occurring on the PPM of *C. albicans*. Functional studies, in conjunction with structural advances could ultimately lead to the development of CaBmt inhibitors in order to design new therapeutic approaches for the management of invasive candidiasis.

Liste des abréviations

2-AP : 2-aminopyridine

β -Man : β -1,2-oligomannoside

CaBMT3 : gène codant pour la β -1,2-mannosyltransférase 3 de *Candida albicans*

CaBmt3 : β -1,2-mannosyltransférase 3 de *Candida albicans*

CHAPS : 3-[(3-cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propanesulfonate

COSY : correlation spectroscopy

Da : dalton

DDM : dodécyl- β -D-maltoside

DP : degré de polymérisation

FNR : fraction non retenue

FS : fraction soluble

GDP : guanosine diphosphate

HM : heptyl-mannose

HPAEC-PAD : high performance anion-exchange chromatography – pulsed amperometry detection

HPLC : high performance liquid chromatography

HSQC : heteronuclear single quantum coherence

LC : lysat cellulaire

LDAO : dodécyl-NN-diméthylamine-N-oxyde

MALDI-TOF : matrix-assisted laser desorption ionization – time of flight

OBG : octyl- β -glucoside

PLM : phospholipomannane

PPM : phosphopeptidomannane

RMN : résonance magnétique nucléaire

ROESY : rotating frame nuclear Overhauser effect spectroscopy

SDS/PAGE : sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis

TSA : thermal shift assay

TX100 : Triton X-100

WB : western blot

Table des matières

| | |
|--|-----------|
| Avant-propos..... | 4 |
| Liste des abréviations | 7 |
| Liste des figures | 13 |
| Liste des tableaux | 16 |
| Généralités | 17 |
| 1 Candida et candidoses | 18 |
| 1.1 Le genre <i>Candida</i> et ses espèces | 18 |
| 1.2 Candidoses, colonisation et méthodes diagnostiques | 19 |
| 1.3 Pathogénicité et facteurs de virulence de <i>C. albicans</i> | 22 |
| 1.3.1 Dimorphisme | 22 |
| 1.3.2 Stades de colonisation..... | 22 |
| 1.4 <i>Candida</i> et immunité innée | 24 |
| 2 La paroi des champignons | 27 |
| 2.1 Squelette fibrillaire interne | 27 |
| 2.1.1 Couche interne de chitine | 27 |
| 2.1.2 Couche de glucanes | 27 |
| 2.2 Glycoconjugués externes | 28 |
| 2.3 Glycosylation de la paroi fongique | 30 |
| 2.3.1 Synthèse du précurseur au sein du réticulum endoplasmique | 30 |
| 2.3.2 N-glycanes..... | 31 |
| 2.3.3 O-glycanes | 34 |
| 2.3.4 Glycosphingolipides..... | 36 |
| 2.4 Spécificité de glycosylation des levures pathogènes..... | 37 |
| 3 Glycosyltransférases fongiques | 41 |

| | | |
|----------|---|----|
| 3.1 | Classification des glycosyltransférases | 41 |
| 3.2 | Caractéristiques des glycosyltransférases..... | 41 |
| 3.2.1 | Répartition en domaines des glycosyltransférases de type II | 41 |
| 3.2.2 | Mécanismes catalytiques des glycosyltransférases..... | 42 |
| 3.2.3 | Repléments tridimensionnels des glycosyltransférases..... | 44 |
| 3.3 | Les mannosyltransférases fongiques | 47 |
| 3.3.1 | Structure et mécanisme de mannosyltransférases connues | 47 |
| 3.3.2 | Les β -1,2-mannosyltransférases de <i>C. albicans</i> : une nouvelle famille GT91 | 50 |
| 3.3.3 | Caractérisation d'une CaBmt : exemple concret de CaBmt1 | 52 |
| | Objectifs de la thèse | 54 |
| | Résultats | 57 |
| | Partie I : | 58 |
| | Caractérisation enzymatique de CaBmt3 | 58 |
| 1 | Paramètres optimaux et spécificité de substrat | 59 |
| 1.1 | Caractérisation préalable de CaBmt1 | 59 |
| 1.2 | Production d'une forme recombinante de CaBmt3 | 59 |
| 1.2.1 | Clonage et surexpression dans <i>E. coli</i> | 59 |
| 1.2.2 | Correction des codons CTG et transformation dans SHuffle | 62 |
| 1.2.3 | Avantages et raisons du passage chez <i>P. pastoris</i> | 63 |
| 1.2.4 | Clonage et surexpression dans <i>P. pastoris</i> | 65 |
| 1.3 | Solubilisation des enzymes recombinantes | 67 |
| 1.4 | Détermination de l'activité enzymatique | 69 |
| 1.4.1 | Substrats accepteurs | 69 |
| 1.4.2 | Réaction de Bmt3 sur des substrats courts | 70 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 1.4.3 | Action conjointe de Bmt1 et Bmt3..... | 72 |
| 1.5 | Paramètres enzymatiques | 75 |
| 1.6 | Spécificité de substrat..... | 78 |
| 1.7 | Activité sur une mannoprotéine endogène de <i>C. albicans</i> | 78 |
| 2 | Effets des iminosucres | 81 |
| 2.1 | Iminosucres : inhibiteurs de glycosidases...et de glycosyltransférases ? | 81 |
| 2.2 | Iminosucres utilisés | 82 |
| 2.3 | Effets des iminosucres monovalents et multivalents sur les activités de Bmt1 et Bmt3 | 82 |
| 2.4 | Modulation de la spécificité de réaction de Bmt1 | 85 |
| 2.5 | Effets des composés tétra et multivalents sur l'agrégation de Bmt1 et Bmt3..... | 86 |
| | Partie II : | 89 |
| | Caractérisation structurale de CaBmt3 | 89 |
| 1 | Pourquoi CaBmt3 ?..... | 90 |
| 2 | Cristallogénèse et ses écueils | 92 |
| 2.1 | Utilisation de l'enzyme recombinante exprimée chez <i>P. pastoris</i> | 92 |
| 2.1.1 | Choix du système d'expression | 92 |
| 2.1.2 | Purification par chromatographie échangeuse d'ions | 93 |
| 2.1.3 | Purification par chromatographie par affinité | 95 |
| 2.2 | Utilisation de l'enzyme recombinante exprimée chez <i>E. coli</i> | 97 |
| 2.2.1 | Préparation de l'échantillon | 97 |
| 2.2.2 | Essais de cristallogénèse | 102 |
| 2.3 | Formes tronquées : le nouvel espoir ?..... | 103 |
| 3 | Mutagénèse dirigée de CaBmt3 | 106 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 3.1 | Identification de cibles <i>in silico</i> | 106 |
| 3.1.1 | Alignement multiple des séquences de la famille GT91 | 106 |
| 3.1.2 | Modélisation 3D de CaBmt3 | 109 |
| 3.2 | Essais enzymatiques : détermination de résidus catalytiques..... | 111 |
| 3.2.1 | Résidus catalytiques nucléophile-base..... | 111 |
| 3.2.2 | Résidus impliqués dans la spécificité α/β | 114 |
| 4 | Confrontation aux données expérimentales | 119 |
| 4.1 | Alignement entre modélisation et structure connue..... | 119 |
| 4.2 | Diffusion des rayons X aux petits angles..... | 122 |
| | Partie III : | 125 |
| | Caractérisation enzymatique préliminaire de CaBmt4 | 125 |
| 1 | Expression chez <i>E. coli</i> à partir d'un gène synthétique | 127 |
| 2 | Paramètres optimaux et spécificité de substrat : essais préliminaires | 130 |
| | Conclusions et perspectives | 134 |
| | Matériel et méthodes | 140 |
| 1 | Matériel | 141 |
| 2 | Constructions plasmidiques | 141 |
| 2.1 | BMT3..... | 141 |
| 2.2 | BMT3-FT1 et BMT3-FT2 | 142 |
| 2.3 | BMT4..... | 142 |
| 3 | Production dans <i>E. coli</i> et <i>P. pastoris</i> | 142 |
| 3.1 | Expression des formes recombinantes de Bmt3 et Bmt4 dans <i>E. coli</i> | 142 |
| 3.2 | Expression de Bmt1 et Bmt3 dans <i>P. pastoris</i> | 143 |

| | | |
|-----|--|-----|
| 3.3 | Mutagenèse dirigée | 144 |
| 4 | Préparation des enzymes recombinantes | 145 |
| 4.1 | Purification par chromatographie échangeuse de cations | 145 |
| 4.2 | Purification par chromatographie d'affinité..... | 145 |
| 4.3 | Thermal Shift Assay (TSA) | 146 |
| 4.4 | Chromatographie d'exclusion stérique..... | 146 |
| 4.5 | Concentration sur unité d'ultrafiltration | 146 |
| 5 | Méthodes analytiques | 146 |
| 5.1 | Electrophorèse SDS/PAGE | 146 |
| 5.2 | Western blot | 147 |
| 5.3 | Dynamic Light Scattering (DLS)..... | 147 |
| 6 | Essais enzymatiques..... | 147 |
| 6.1 | Composition des milieux réactionnels..... | 147 |
| 6.2 | Traitement aux α -mannosidases | 148 |
| 7 | Analyse des produits de réaction | 148 |
| 7.1 | Par HPAEC-PAD (Dionex)..... | 148 |
| 7.2 | Par HPLC-Fluo (Varian ProStar) | 148 |
| 8 | Activité enzymatique de Bmt3 sur Hwp1 | 149 |
| 8.1 | Essais enzymatiques sur Hwp1 | 149 |
| 8.2 | Analyse par western blot | 150 |
| | Annexes | 151 |
| | Bibliographie | 235 |

Liste des figures

| | |
|--|----|
| Figure 1 : Classification taxonomique des Champignons..... | 18 |
| Figure 2 : Représentation des différents stades de colonisation tissulaire par <i>C. albicans</i> | 23 |
| Figure 3 : Reconnaissance des PAMP fongiques par plusieurs récepteurs PRR de l'immunité innée..... | 24 |
| Figure 4 : Schéma de la paroi des levures et des champignons filamenteux. | 28 |
| Figure 5 : Représentation schématique de la voie de biosynthèse du précurseur Man5GlcNAc2-PP-Dol..... | 31 |
| Figure 6 : Représentation schématique de la partie glycanique des N- et O-mannanes de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 32 |
| Figure 7 : Comparaison de la structure des N-glycanes de levure et d' <i>Aspergillus fumigatus</i> | 33 |
| Figure 8 : Représentation schématique de la diversité des O-glycanes rencontrés chez différentes espèces de levure..... | 35 |
| Figure 9 : Voies de biosynthèse, chez <i>S. cerevisiae</i> et <i>C. albicans</i> , des glycosphingolipides de la famille des MIPC | 37 |
| Figure 10 : Représentation schématique de la partie glycanique des N- et O-mannanes de <i>Candida albicans</i> .. | 38 |
| Figure 11 : Représentation schématique de l'organisation en domaines des glycosyltransférases golgiennes de type II. | 42 |
| Figure 12 : Représentation schématique des mécanismes catalytiques des glycosyltransférases..... | 43 |
| Figure 13 : Représentations tridimensionnelles des deux principaux types de repliement des glycosyltransférases, GT-A et GT-B. | 44 |
| Figure 14 : Représentation tridimensionnelle d'un troisième type de repliement possible des glycosyltransférases, GT-C. | 46 |
| Figure 15 : Structure tridimensionnelle et site actif de ScMnt1/Kre2 et ScMnn9. | 47 |
| Figure 16 : Mécanismes catalytiques possibles pour ScMnt1/Kre2. | 48 |
| Figure 17 : Structure tridimensionnelle de ScKtr4p..... | 50 |
| Figure 18 : Production de Bmt3 chez <i>E. coli</i> dans la souche BL21 Star (DE3)..... | 60 |
| Figure 19 : Essais de solubilisation de la protéine recombinante Bmt3 surexprimée dans la souche BL21 Star (DE3) en présence de différents détergents. | 61 |
| Figure 20 : Représentation du gène BMT3 inséré dans le vecteur pET151/D-TOPO pour son expression dans la souche SHuffle d' <i>E. coli</i> | 63 |
| Figure 21 : Mise en évidence d'une activité mannosidase intrinsèque chez <i>E. coli</i> grâce à l'HPAEC-PAD | 64 |
| Figure 22 : Représentation du gène BMT3 inséré dans le vecteur pPICZαA pour son expression dans <i>P. pastoris</i> | 66 |
| Figure 23 : Production de Bmt3 chez <i>P. pastoris</i> | 67 |
| Figure 24 : Domaines fonctionnels de CaBmt3. | 68 |

| | |
|--|-----|
| Figure 25 : Détermination de la taille des particules des enzymes recombinantes Bmt1 et Bmt3 | 69 |
| Figure 26 : Structure des différents substrats utilisés pour la caractérisation de Bmt3..... | 70 |
| Figure 27 : Détection de l'activité de l'enzyme Bmt3 sur l' α -1-O-méthyl-mannose et sur l' α / β -1-O-méthyl-mannose grâce à la technique de l'HPAEC-PAD..... | 72 |
| Figure 28 : Evaluation de l'activité β -mannosyltransférase de Bmt3 par HPLC à détection par fluorimétrie..... | 73 |
| Figure 29 : Analyse en spectrométrie de masse MALDI-TOF des substrats et produits de réaction de Bmt1 et Bmt3..... | 74 |
| Figure 30 : Analyse RMN du produit de réaction P2. | 75 |
| Figure 31 : Représentation des réactions enzymatiques de Bmt1 et Bmt3 sur leurs substrats accepteurs DP3M-a et DP4M-b en présence de GDP-mannose | 76 |
| Figure 32 : Détermination des paramètres enzymatiques de Bmt3 sur le substrat DP4M-b..... | 77 |
| Figure 33 : β -mannosylation de la protéine recombinante Hwp1 | 80 |
| Figure 34 : Représentations schématiques des iminosucres de synthèse monovalents, multivalents et polyvalents utilisés avec Bmt1 et Bmt3..... | 82 |
| Figure 35 : Effets des différents composés iminosucres (à 20 mM) sur les activités de Bmt1 et Bmt3..... | 83 |
| Figure 36 : Effet du composé 1 à la concentration de 20 mM sur la formation des produits P1 et P2 par l'action de Bmt1 sur son substrat DP4M-a. | 84 |
| Figure 37 : Analyse de l'agrégation de Bmt1 et Bmt3 en présence des composés monovalents 1 et 2 , tétravalent 4 et polyvalent 6 par DLS en mode volume..... | 87 |
| Figure 38 : Alignement entre les motifs PDZ de la protéine NHERF décrits dans la littérature et la région hydrophobe C-terminale retrouvée dans les séquences de Bmt1 et Bmt2..... | 91 |
| Figure 39 : Représentation schématique de la purification de la protéine Bmt3 sur une colonne MonoS par chromatographie échangeuse d'ions..... | 93 |
| Figure 40 : Purification de Bmt3 sur colonne MonoS..... | 94 |
| Figure 41 : Purification de Bmt3 exprimée chez <i>P. pastoris</i> par chromatographie par affinité sur colonne Ni-NTA. Electrophorèse SDS/PAGE et coloration au bleu de Coomassie..... | 95 |
| Figure 42 : Purification de Bmt3 exprimée chez <i>E. coli</i> par chromatographie par affinité sur colonne HisTrap... | 98 |
| Figure 43 : Représentation graphique de la fluorescence du Sypro Orange fixé aux acides aminés hydrophobes de Bmt3 en fonction de la température. | 99 |
| Figure 44 : Séparation des populations monomérique et multimérique de Bmt3 en solution par chromatographie d'exclusion stérique sur colonne Séphacryl S-100 HR..... | 101 |
| Figure 45 : Photographie de la goutte assise contenant Bmt3 à 8 mg/mL dans une solution de Tris/HCl 0.1M pH 8.5 CaCl ₂ 2.2M à J10 après dépôt par le robot Cybio. | 103 |
| Figure 46 : Prédiction de structures secondaires sur les 180 premiers acides aminés de la séquence native de CaBmt3 par le logiciel Phyre2. | 104 |
| Figure 47 : Expression chez <i>E. coli</i> des formes tronquées FT1 et FT2..... | 105 |

| | |
|---|-----|
| Figure 48 : Alignement des séquences protéiques des membres de la famille GT91 grâce au logiciel MAFFT... | 107 |
| Figure 49 : Alignement des séquences nucléiques des neuf CaBMT. | 108 |
| Figure 50 : Modélisation 3D de CaBmt3 en mode cartoon (gris) grâce au logiciel I-TASSER. | 109 |
| Figure 51 : Modélisation 3D du domaine catalytique de CaBmt3 grâce au logiciel I-TASSER..... | 110 |
| Figure 52 : Purification par chromatographie d'affinité des mutants catalytiques nucléophile-base de CaBmt3 exprimés chez E. coli..... | 112 |
| Figure 53 : Analyse de l'agrégation des mutants catalytiques nucléophile-base de CaBmt3 par DLS..... | 113 |
| Figure 54 : Activités enzymatiques des mutants catalytiques de CaBmt3 sur le substrat DP4M-b après 1h d'incubation en conditions standards | 113 |
| Figure 55 : Expression chez E. coli des mutants simples et multiples de la spécificité de substrat de CaBmt3.... | 115 |
| Figure 56 : Expression chez E. coli des mutants simples et multiples de la spécificité de substrat de CaBmt3... 116 | 116 |
| Figure 57 : Réactions enzymatiques des mutants simples, 5M et 6M de la spécificité de substrat α/β sur le substrat accepteur DP3M-a. | 117 |
| Figure 58 : Activités enzymatiques des mutants de Bmt3 simples, 5M et 6M de la spécificité de substrat α/β sur le substrat accepteur DP4M-b après 1h d'incubation en conditions standards. | 118 |
| Figure 59 : Analogie des mécanismes réactionnels entre GH130 et GT91..... | 120 |
| Figure 60 : Alignement tridimensionnel entre la structure résolue de 3WAS (marron clair) et le domaine catalytique de CaBmt3 (bleu)..... | 121 |
| Figure 61 : Représentations graphiques de la structure tridimensionnelle de CaBmt3.. | 123 |
| Figure 62 : Représentation schématique de la cascade enzymatique potentiellement responsable de la β -mannosylation de la fraction acido-stable du PPM de C. albicans..... | 126 |
| Figure 63 : Représentation du gène BMT4 inséré dans le vecteur pET151/D-TOPO pour son expression dans la souche SHuffle d'E. coli. | 127 |
| Figure 64 : Expression de Bmt3 et Bmt4 chez E. coli dans la souche SHuffle..... | 128 |
| Figure 65 : Solubilisation de la protéine recombinante Bmt4 surexprimée dans la souche SHuffle en présence de différents détergents..... | 129 |
| Figure 66 : Cinétique de réaction enzymatique, sur 24h, de la forme recombinante Bmt4 sur le substrat DP5M-b, suivie par HPLC-Fluo..... | 131 |
| Figure 67 : Cinétique de réaction enzymatique, sur 72h, de la forme recombinante Bmt4 sur le substrat DP482-2AP, suivie par HPLC-Fluo..... | 132 |

Liste des tableaux

| | |
|---|----|
| Tableau 1 : Facteurs de risque et tableau clinique associés aux différentes espèces de Candida. | 19 |
| Tableau 2 : Structure des facteurs antigéniques retrouvés chez les différentes espèces de Candida les plus répandues..... | 40 |
| Tableau 3 : Activité de Bmt3 sur différents oligomannosides marqués..... | 78 |
| Tableau 4 : Effets des différents composés iminosucres sur la spécificité de Bmt1, à partir du substrat accepteur DP3M-a. | 85 |

Généralités

1 *Candida* et candidoses

1.1 Le genre *Candida* et ses espèces

Candida albicans est l'espèce majoritaire du genre *Candida*. D'une manière générale, ces levures sont des champignons saprophytes appartenant au phylum des *Ascomycota* et à la classe des *Saccharomycetes* (McManus & Coleman 2014) (Figure 1). *Candida albicans* et *C. glabrata* font partie du microbiote digestif normal présent chez l'Homme. *C. albicans* est retrouvé de manière commensale au niveau de la cavité oro-pharyngée, du tractus digestif ainsi qu'au niveau des muqueuses vaginales, mais peut néanmoins, sous certaines conditions, être responsable de formes cliniques allant de la simple infection cutanéomuqueuse (la plus commune étant le muguet) à des infections plus sévères (profondes) avec dissémination systémique. Les autres levures sont considérées comme des exosaprophytes (comme *C. parapsilosis*) ou des levures apportées par l'alimentation (*C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. kefyr*...). C'est pourquoi on qualifie ces levures de levures pathogènes opportunistes.

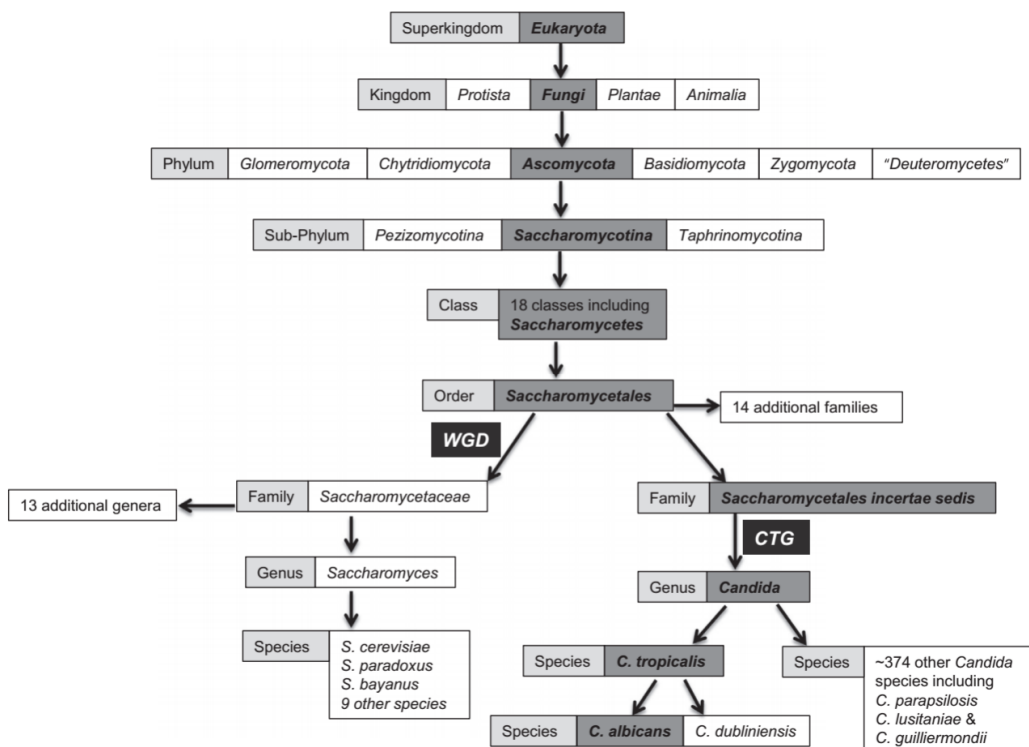


Figure 1 : Classification taxonomique des Champignons. L'espèce *Candida albicans* appartient aux *Saccharomycetales (incertae sedis)* du groupe CTG (adapté de McManus & Coleman 2014).

Bien que très hétérogène (plus de 150 espèces ont été identifiées), plus de 90% des candidoses invasives sont dues à cinq espèces : principalement *C. albicans*, mais également dans une moindre mesure à *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* et *C. krusei* (Odds 2000; Antinori *et al.* 2016). Néanmoins, ces espèces non-*albicans* sont de plus en plus fréquemment retrouvées dans les prélèvements de patients candidosiques, ce qui fait du genre *Candida* le quatrième agent infectieux le plus retrouvé au niveau des hémocultures (Marchetti *et al.* 2004). Toutes ces évolutions peuvent être dues à plusieurs facteurs : l’allongement de la durée de vie, une meilleure détection, mais également une évolution des pratiques de prise en charge des patients telles que l’utilisation d’antibiotiques à large spectre, le recours à des techniques chirurgicales invasives, ou encore l’usage de thérapies immunosuppressives (Tableau 1).

Tableau 1 : Facteurs de risque et tableau clinique associés aux différentes espèces de *Candida* (adapté de Antinori *et al.* 2016).

| <i>Candida</i> spp. | Facteurs de risque/tableau clinique | Répartition géographique |
|------------------------|---|--|
| <i>C. albicans</i> | Population générale | Etats Unis Europe centrale Europe du nord |
| <i>C. glabrata</i> | Diabète Cancer Atteintes hématologiques Prophylaxie aux azoles Âge avancé | Etats Unis Europe du nord (Danemark) |
| <i>C. parapsilosis</i> | Pose cathéter Nouveau-né Soins intensifs | Amérique du sud (Brésil) Australie Afrique du nord Europe du sud (Espagne) |
| <i>C. krusei</i> | Prophylaxie aux azoles Corticothérapie Atteintes hématologiques | Europe du nord (Finlande) |
| <i>C. tropicalis</i> | Corticothérapie Atteintes hématologiques | Asie (Chine, Taiwan, Thaïlande, Inde) Amérique du sud Europe du nord (Islande) |

1.2 Candidoses, colonisation et méthodes diagnostiques

Le passage de *Candida* du statut commensal à celui de pathogène peut être envisagé par la mise en œuvre de plusieurs mécanismes (Kullberg & Arendrup

2015), qui peuvent être divisés en trois étapes : i) l'adhésion de *Candida* à la barrière épithéliale muqueuse, ii) l'invasion du tissu sous-jacent et iii) la dissémination systémique de *Candida* par voie hématogène. On distingue ainsi différents stades de l'infection profonde. On parle de candidémie lorsque *Candida* est isolé d'une hémoculture. Lorsqu'un site anatomique normalement stérile se retrouve colonisé par *Candida*, on parle de candidose invasive. Enfin, si *Candida* est parvenu à coloniser plusieurs organes, on parle alors de candidose disséminée. Ce dernier stade est de très mauvais pronostic, synonyme de taux de mortalité très élevé, et qui est à corrélérer avec la vitesse de prise en charge. En effet, bien que des traitements antifongiques existent, un grand frein à la baisse du taux de mortalité attribué aux candidoses invasives reste la difficulté d'établir un diagnostic à la fois fiable et précoce. Ainsi, introduire un traitement antifongique 48 heures après la survenue d'une candidémie conduit à un taux de mortalité de 35%. Par contre, si le traitement est instauré dans les 12 heures, le taux de mortalité chute à 10% (**Morrell et al. 2005; Garey et al. 2006**).

Le gold standard du diagnostic des candidoses invasives est l'hémoculture ou toute culture de matériel histopathologique démontrant la présence invasive de l'agent infectieux. Les hémocultures sont généralement performantes chez les patients candidémiques, puisqu'elles se révèlent positives dans 93% des cas d'endocardites, mais elles le sont nettement moins lorsqu'il s'agit de candidoses profondes, avec une chute de la sensibilité en dessous de 50% (**Lefort et al. 2012; Nguyen et al. 2012; Clancy & Nguyen 2013**). De plus, la charge fongique circulant dans le sang dépend de l'espèce considérée (plus élevée pour *C. parapsilosis*, beaucoup moins pour *C. glabrata*) ou encore de l'âge du patient (**Pfeiffer et al. 2011**).

Pour pallier la faible sensibilité des hémocultures en cas de candidose invasive, d'autres méthodes diagnostiques non basées sur la culture ont été développées.

On va alors rechercher la présence de composés issus de *Candida* : des β -1,3-glucanes (constituant majeur de la paroi fongique), des mannanes (autre constituant de la paroi fongique) ou bien encore des acides nucléiques de *Candida* par PCR (Polymerase Chain Reaction) (**Nguyen et al. 2012**). Il a été montré que les techniques

de détection des β -1,3-glucanes et de PCR étaient plus sensibles que les hémocultures lorsqu'il s'agissait de patients candidémiques, mais elles s'avéraient moins sensibles en cas de candidose invasive (**Nguyen et al. 2012**). Néanmoins, en jouant sur le seuil de détection des β -1,3-glucanes, il est possible de se servir de cette test pour anticiper des résultats de culture microbiologique de cinq jours (**Tissot et al. 2013**). Il a donc été suggéré d'utiliser cette technique afin de guider la mise en place d'un traitement antifongique préventif en cas de résultat positif, mais également d'éviter tout traitement empirique s'il s'avère négatif (**Eggimann & Marchetti 2011; Posteraro et al. 2011; Hanson et al. 2012**).

Deux nouvelles techniques semblent également prometteuses pour le diagnostic de candidémie. La première concerne l'utilisation de la résonance magnétique en mode T2 (T2MR). Des particules recouvertes de séquences nucléiques cibles sont ajoutées à l'échantillon analysé. Si cette même molécule cible y est présente, les particules vont s'y lier et s'agglomérer, ce qui entraînera un changement dans l'environnement aqueux de l'échantillon et donc du signal T2MR, trahissant ainsi la présence des séquences cibles (**Pfaller et al. 2015**). Des études précliniques ont montré qu'en utilisant cette technique, il était possible de détecter les cinq espèces majeures de *Candida* à des densités allant de 2.8 à 11.1 UFC/mL (Unité Formant des Colonies), réduisant ainsi le temps nécessaire à l'obtention d'un résultat positif à 3-5 heures (contre une soixantaine pour une hémoculture classique). Combinée à une valeur prédictive négative de 99.4%, cette technique est capable de réduire drastiquement le recours aux traitements empiriques (**Mylonakis et al. 2015**). Une seconde technique est également en cours de développement. Elle est fondée sur l'utilisation de la spectrométrie de masse MALDI-TOF afin de détecter la présence d'un disaccharide particulier, le tréhalose, dans le sérum de patients atteints de candidose invasive (**Sendid et al. 2015; Mery et al. 2016**). Les premiers résultats montrent que cette technique permet un diagnostic précoce des candidoses invasives (avant les résultats d'hémoculture), et que la détection au long cours de ce disaccharide était signe de mauvais pronostic. De plus, cette technique se révèle également efficace pour le diagnostic d'aspergillose invasive (deuxième infection fongique invasive en fréquence, dont le principal agent infectieux est *Aspergillus fumigatus*), ce qui en fait

un marqueur panfongique très intéressant pour le dépistage des patients à haut risque d'infection fongique.

1.3 Pathogénicité et facteurs de virulence de *C. albicans*

1.3.1 Dimorphisme

C. albicans étant responsable de plus de 60% des infections systémiques à *Candida*, nous nous focaliserons sur ce modèle pour développer la pathogénicité des levures. Celle-ci est capable de coloniser son hôte grâce à son dimorphisme. Elle existe sous trois formes : levure, pseudo-hyphe et hyphe (ou mycélium), selon les conditions de son environnement (température, pH, hypoxie, stress génotoxique). La forme hyphale peut être considérée comme la forme « virulente » de *C. albicans*. En effet, des mutants incapables de produire ce mycélium se sont révélés non-invasifs et non virulents *in vitro* (**Rahman et al. 2007**). C'est également cette forme qui va favoriser la formation d'un biofilm, structure possédant une résistance accrue aux antifongiques.

1.3.2 Stades de colonisation

1.3.2.1 Adhésion épithéliale

Première étape de l'infection à *Candida*, l'adhésion aux cellules épithéliales va amorcer la colonisation tissulaire (**Figure 2**). Pour cela, ce pathogène opportuniste bénéficie de protéines de surface, les adhésines. Deux grandes familles d'adhésines peuvent être distinguées : la famille des Als (Agglutinin-like sequence) au nombre de neuf, et la famille Hwp1 (Hyphal wall protein 1). L'adhésion à différents types cellulaires est permise par l'expression d'une ou plusieurs adhésines particulières. Als1 et als3 vont ainsi être impliquées dans l'adhérence à l'épithélium buccal, tandis qu'Als2 et als4 vont permettre l'adhérence à l'endothélium vasculaire.

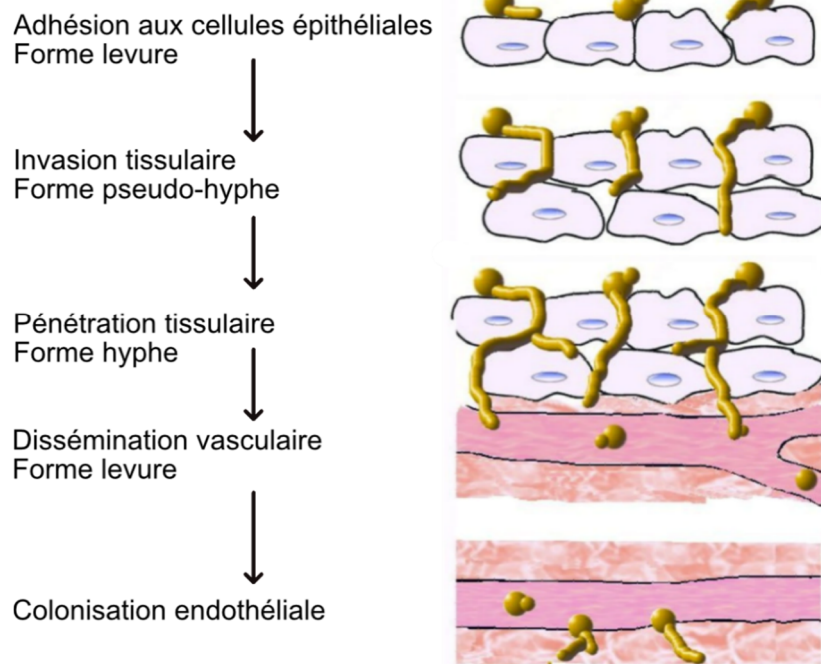


Figure 2 : Représentation des différents stades de colonisation tissulaire par *C. albicans* et rendue possible par son dimorphisme (adapté de Gow *et al.* 2011).

1.3.2.2 Invasion tissulaire

La colonisation se poursuit par la rupture de la barrière épithéliale. Cette invasion tissulaire est hyphes-dépendante et fait intervenir deux mécanismes : une endocytose induite et la production d'enzymes hydrolytiques telles que des protéases, phospholipases, lipases, ou encore hémolysines (**Mayer *et al.* 2013**). Celles-ci vont faciliter la progression de l'organisme au sein de la muqueuse, jusqu'à arriver au niveau de la circulation sanguine (**Silva *et al.* 2012**). Une autre hypothèse a été également proposée récemment impliquant notamment le passage des levures par les jonctions serrées (**Goyer *et al.* 2016**).

1.3.2.3 Dissémination par voie hématogène

Sous sa forme levure, *C. albicans* se multiplie dans le sang et dissémine à d'autres organes tels que le foie, le rein, la rate ou les poumons par exemple. Cette dissémination se fait par voies hématogène et lymphatique. Ce dernier stade correspond à la candidose invasive, qui est généralement synonyme de mauvais pronostic. En effet, une fois ce stade atteint, les taux de mortalité peuvent atteindre 40-50%.

1.4 *Candida* et immunité innée

Un dialogue entre *Candida* et les cellules de l'hôte impliquées dans l'immunité innée s'instaure dès les premières minutes de l'interaction. Les monocytes, les neutrophiles et les macrophages tissulaires expriment une série de récepteurs, appelés PRR (Pattern Recognition Receptor), capables de reconnaître des ligands spécifiques exprimés sur les enveloppes microbiennes. Ces ligands, appelés PAMP (Pathogen-associated Molecular Pattern), sont reconnus par trois classes de PRR : i) les TLR (Toll-like Receptor), ii) les CLR (C-type Lectin Receptor) et iii) les NLR (NOD-like Receptor) (**Jouault *et al.* 2003; Netea *et al.* 2008**).

En ce qui concerne *C. albicans*, la majorité des PAMP sont de nature oligosaccharidique et peuvent être retrouvés au niveau de sa paroi. Parmi les plus étudiés, on peut citer les N- et O-glycanes présents sur les glycoconjugués pariétaux (le phosphopeptidomannane - PPM - et le phospholipomannane - PLM - en particulier) ou encore les β -1,3 glucanes pariétaux (**Erwig & Gow 2016**) (**Figure 3**).

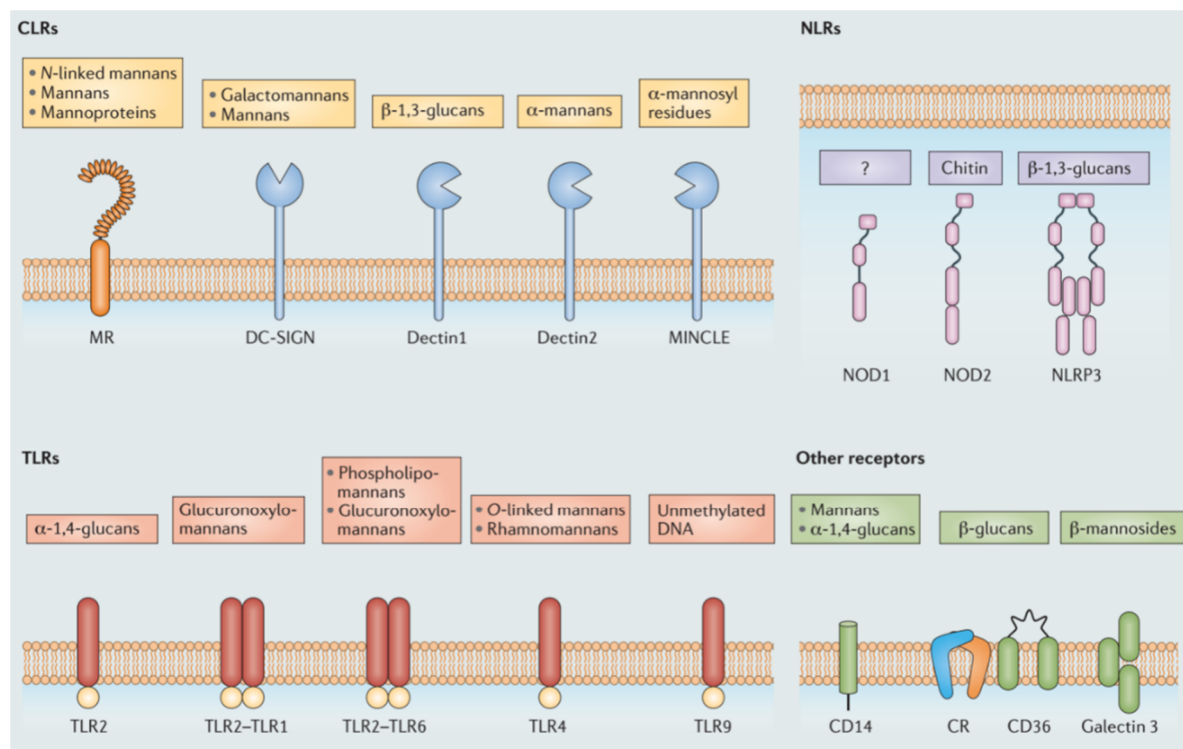


Figure 3 : Reconnaissance des PAMP fongiques par plusieurs récepteurs PRR de l'immunité innée (adapté de Erwig & Gow 2016).

Un type de ligand nous intéresse plus particulièrement dans le cadre de ces travaux. Il s'agit d'un motif β -1,2-mannosidique présent aux extrémités glycaniques des glycoconjugués pariétaux d'une grande partie des champignons pathogènes. Ces β -1,2-mannosides (β -Man) ont fait l'objet de plusieurs études sur cette dernière décennie et nous reparlerons en détails de sa voie de biosynthèse (ainsi que de celles des autres glycoconjugués cités plus haut) dans un paragraphe spécifique. Ce que l'on peut dire à la suite de ces études est que ces β -Man semblent impliqués dans les mécanismes de virulence propres aux levures pathogènes dont fait partie le genre *Candida*. Ces β -Man sont reconnus par la cellule hôte grâce à certains PRR décrits précédemment. En l'occurrence, la galectine-3, une lectine, aux fonctions pléiotropes exprimée par de nombreux types cellulaires, est capable de reconnaître ces β -Man (**Fradin et al. 2000**). Suite à une exposition à *C. albicans*, l'association galectine-3 et récepteur TLR2 va induire une production de cytokines chez l'hôte, production qui n'est pas observée en réponse à une exposition à *S. cerevisiae* (levure non pathogène dépourvue de β -Man) (**Jouault et al. 2006**).

Il a également été montré chez la souris que l'ingestion préalable de β -1,2-tétramannosides synthétiques protégeait contre la colonisation intestinale par *C. albicans*, sans que celle-ci ne soit affectée en cas d'ingestion d' α -1,2-tétramannosides (**Dromer et al. 2002**). Une autre étude décrit chez la souris le développement d'anticorps dirigés contre un motif β -1,2-mannotriose et qui conduirait à une immunisation contre *C. albicans* (taux de survie accrus, charge fongique réduite au niveau rénal) (**Xin et al. 2012**). Une autre approche dans l'étude de l'importance de ces β -Man comme facteur de virulence a été d'invalider les gènes codant pour les protéines impliquées dans leur biosynthèse. Après inactivation de différentes enzymes chez *C. albicans* (**Mille et al. 2004**) ou *C. glabrata* (**Jawhara et al. 2012**), plusieurs travaux ont ainsi rapporté une diminution de virulence ou de colonisation intestinale après inoculation de ces mutants chez la souris. Nous pouvons donc en déduire que ces β -Man pourraient être impliqués dans la virulence du genre *Candida*.

Il convient néanmoins de pondérer l'impact de toutes ces études. En effet, une étude récente a montré que les β -Man ne semblaient pas indispensables à une infection par *C. albicans* (**Courjol et al. 2015**). L'inactivation de trois β -1,2-

mannosyltransférases a permis l'expression d'un phénotype mutant complètement dépourvu de β -Man. L'inoculation de ce mutant chez la souris n'a pas entraîné, comme on aurait pu s'y attendre, de réduction de virulence. Il semblerait donc que le rôle de ces β -Man n'est pas aussi clair que l'on pensait. Il semblerait en outre que leur rôle soit différent au niveau épithélial et systémique (travaux non publiés).

Il n'en reste pas moins qu'élucider complètement ses voies de biosynthèse ainsi que le fonctionnement précis des enzymes responsables permettrait de faire un grand pas dans la compréhension générale de la pathogénicité du genre *Candida*.

2 La paroi des champignons

A l'interface entre la cellule et l'environnement extérieur, la paroi des champignons permet de maintenir une certaine rigidité et une protection indispensables pour résister aux différents stress extérieurs. Elle présente néanmoins une plasticité nécessaire à son remodelage, notamment lors des transitions entre ses différentes formes (blastospore, pseudo-hyphe ou hyphe). Elle est également en interaction avec la surface tissulaire de l'hôte. Bien que de multiples spécificités existent selon les différentes espèces de champignons, il est possible de faire ressortir une organisation structurale commune aux champignons.

2.1 Squelette fibrillaire interne

2.1.1 Couche interne de chitine

La chitine est un polymère de résidus de N-acétylglucosamine liés en β -1,4, assurant une certaine rigidité à la paroi (**Bowman & Free 2006**) (**Figure 4**). Elle ne représente cependant qu'1 à 2% de la paroi chez les levures, mais jusque 10-20% pour les champignons filamenteux (**Fontaine et al. 2000**).

2.1.2 Couche de glucanes

Les glucanes, polymères de résidus de D-glucose, sont un composant majeur de la paroi (50 à 60% de la paroi). Ils sont essentiellement liés en β -1,3 (associés à la chitine) mais peuvent également être liés en α -1,3, α -1,4, β -1,4 ou β -1,6, selon les types de champignons (**Perez-Garcia 2012; Gow & Hube 2012**) (**Figure 4**). On retrouve plus particulièrement les liaisons β -1,6 chez les levures comme *Saccharomyces cerevisiae* ou *Candida albicans* par exemple, alors qu'elles sont absentes des champignons filamenteux tels qu'*Aspergillus fumigatus*. On peut également retrouver chez les champignons filamenteux des glycoaminoglycane (GAG) et des galactomannanes (**Erwig & Gow 2016**). Certains champignons filamenteux expriment également des motifs α -1,3 glucanes (**Bernard & Latgé 2001**). Ensemble, ces deux couches de chitine et de β -glucanes confèrent à la paroi sa forme et sa résistance mécanique (**Bowman & Free 2006**).

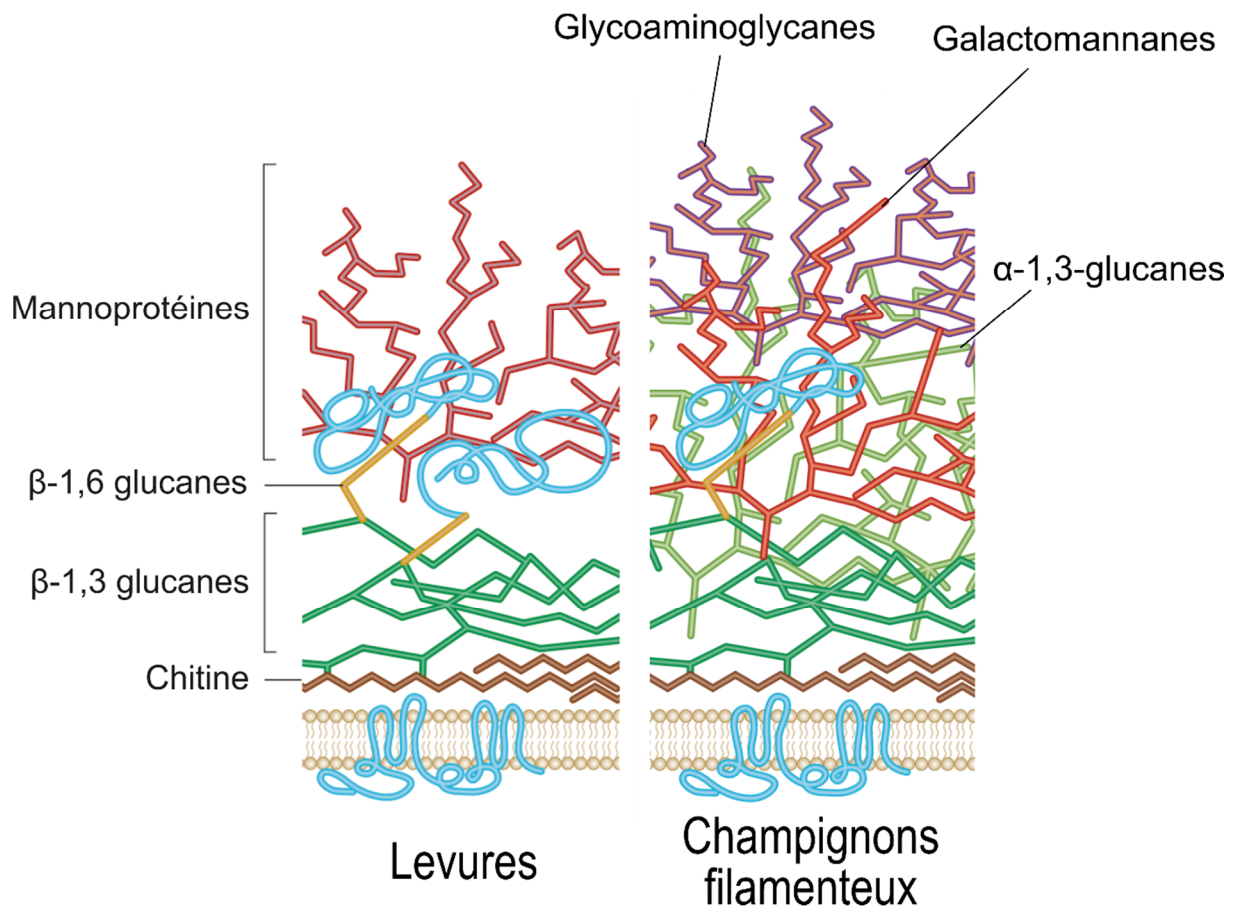


Figure 4 : Schéma de la paroi des levures (à gauche) et des champignons filamenteux (à droite), avec une répartition en couches successives de chitine, β-glucanes et mannoprotéines, de l'intérieur vers l'extérieur, et d'une épaisseur totale d'environ 150 nm. Les champignons filamenteux présentent également au niveau de leur couche intermédiaire des α-1,3-glucanes ainsi que des glycoaminoglycane et des galactomannanes dans leur couche externe (adapté de Erwig & Gow 2016).

2.2 Glycoconjugués externes

Plusieurs types de glycoconjugués peuvent se retrouver au niveau de la partie externe de la paroi. De nature protéique (glycoprotéines) ou lipidique (glycolipides), ils ont été très largement étudiés chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* et présentent chez cet organisme des fractions glycaniques qui peuvent être considérées comme socle commun à bon nombre de champignons, qu'ils soient levure ou champignon filamenteux. Nous préciserons tout d'abord les voies de biosynthèse mises en œuvre lors de l'élaboration de ce socle commun. Les spécificités de glycosylation propres à certains organismes seront explicitées au fur et à mesure, et nous insisterons plus loin sur *Candida albicans* qui nous intéresse plus particulièrement pour ces travaux.

Les glycoprotéines peuvent représenter 35 à 40% de la paroi. Elles sont i) indirectement reliées via un reliquat d'ancre GPI aux β -1,3 glucanes, par l'intermédiaire des β -1,6 glucanes, ii) directement reliées aux β -1,3 glucanes de manière covalente, ou iii) liées de manière covalente ou non à d'autres protéines *via* des ponts disulfure (**Fradin *et al.* 2008**). Avant d'opérer leur translocation au niveau de la paroi, ces protéines subissent, dans la lumière du réticulum endoplasmique puis dans celle de l'appareil de Golgi, différentes modifications post-traductionnelles : l'addition de polysaccharides riches en mannose liés de manière covalente à des résidus de sérine ou de thréonine par une liaison ester (O-glycosylation), ou à des résidus d'asparagine par une liaison amide (N-glycosylation). Les O-mannanes sont composés au maximum de cinq résidus de D-mannose liés en α -1,2 (et parfois en α -1,3, voire en α -1,6 selon les types de champignons). Les N-mannanes peuvent être beaucoup plus massifs, jusqu'à 200 résidus (**Perez-Garcia 2012; Gow & Hube 2012**). Un de ses représentants majeurs (10% du poids sec total d'une levure) est le phosphopeptidomannane (PPM), souvent appelé mannane. Il comporte un noyau interne $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$, constitué d'un dimère de N-acétylglucosamine et de 8 résidus mannose liés en β -1,4, α -1,6, α -1,3 et α -1,2, et lié à l'asparagine. Le reste du squelette mannosidique est constitué d'une longue chaîne de résidus de mannoses liés en α -1,6, sur lesquels peuvent se brancher des chaînes latérales de résidus mannose liés en α -1,2. On peut également retrouver des résidus mannose liés en α -1,3 en position terminale de ces chaînes latérales. Selon sa sensibilité à l'hydrolyse acide, le squelette mannosidique peut être différencié en fraction acido-stable et fraction acido-labile, cette dernière étant reliée à la fraction acido-stable par une liaison phosphodiester.

En sus des mannoprotéines, on peut également remarquer au sein de cette paroi des structures glycolipidiques beaucoup plus libres que l'on peut retrouver aussi bien au niveau interne qu'externe. Ces glycosphingolipides sont eux aussi mannosylés et proviennent de la famille des mannose-inositol-phosphoryl-ceramide (MIPC).

Les voies de glycosylation de ces différents glycoconjugués pariétaux seront décrites en détails dans les paragraphes qui suivent.

2.3 Glycosylation de la paroi fongique

2.3.1 Synthèse du précurseur au sein du réticulum endoplasmique

Comme abordé précédemment, N- et O-glycosylation sont initiées au niveau du réticulum endoplasmique par la liaison du noyau interne $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ à un résidu d'asparagine et le transfert d'un résidu mannose sur le groupement hydroxyle d'une sérine ou d'une thréonine, respectivement. En ce qui concerne la N-glycosylation, un précurseur oligosaccharidique lié au dolichol-phosphate (ancré dans la membrane réticulaire) est assemblé par addition successive de 14 résidus monosaccharidiques. Les 7 premiers (2 résidus N-acétylglucosamine (GlcNAc) et 5 résidus mannose) sont ajoutés côté cytosolique par des glycosyltransférases de la famille ALG (Asparagine Linked Glycosylation). Il s'agit d'Alg7 *et* *alg13/14* utilisant le nucléotide sucre UDP-GlcNAc, et d'Alg1, Alg2 et Alg11 utilisant le nucléotide sucre GDP-mannose. L'intermédiaire $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-PP}$ ainsi formé est alors transloqué dans la lumière réticulaire où 4 résidus mannose supplémentaires et 3 résidus glucose sont ajoutés. Le précurseur $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PP-dol}$ est alors transféré par une oligosaccharyl transférase (OST) sur un résidu asparagine au niveau d'une séquence consensus N-X-S/T d'une protéine néo-formée. Immédiatement après ce transfert, les résidus glucose sont clivés par les glucosidases GSL-I et GSL-II. Le clivage d'un résidu mannose par la mannosidase-I (Man-I) va déclencher la sortie de la glycoprotéine du réticulum (**Pourcq *et al.* 2010**) (**Figure 5**).

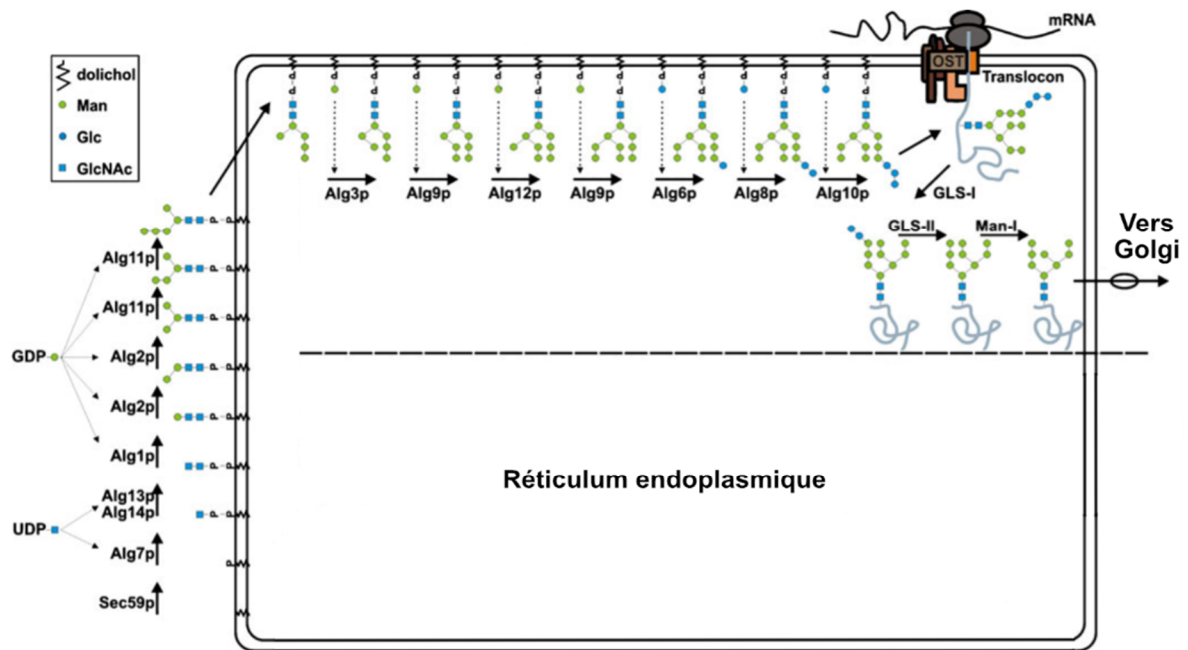


Figure 5 : Représentation schématique de la voie de biosynthèse du précurseur Man5GlcNAc2-PP-Dol sur la face cytosolique du réticulum endoplasmique et de sa maturation en noyau interne Man8GlcNAc2-Asp qui sera dirigé vers l'appareil de Golgi (adapté de Pourcq *et al.* 2010).

Les N- et O-glycoprotéines sont ensuite transportées au niveau de l'appareil de Golgi via des vésicules COPII (coat protein complex II), puis de saccule en saccule grâce aux transporteurs protéiques Sec18/NSF. A chaque compartiment traversé, de nouveaux résidus glycaniques sont ajoutés (**Barlowe 2000**). Toutes ces étapes de glycosylation nécessitent l'intervention de multiples mannosyltransférases, dont le substrat donneur est le GDP-mannose. Ce dernier est transporté au niveau du Golgi par un transporteur spécifique, Vrg4 (**Dean *et al.* 1997**).

2.3.2 N-glycanes

Une fois dans le Golgi, la N-mannosylation débute par le transfert d'un résidu mannose en α -1,6 sur le noyau par l'enzyme Och1 (**Lehle *et al.* 1995; Bates *et al.* 2006**), qui sera ensuite allongé pour former une chaîne linéaire en α -1,6. Le complexe multi-enzymatique M-Pol I (mannan polymérase I), composé des enzymes Mnn9 et Van1, va ajouter les 10 premiers résidus α -1,6-mannose, tandis qu'un deuxième complexe, M-Pol II (Mnn9, Anp1, Mnn10, Mnn11 et Hoc1) va transférer jusque 50 résidus supplémentaires (**Yip *et al.* 1994; Jungmann & Munro 1998; Stolz & Munro**

2002; Striebeck *et al.* 2013). Sur cet axe α -1,6, des chaînes latérales vont être transférées. Il s'agira généralement d'homopolymères de mannose liés en α -1,2, mais on peut également retrouver des hétéropolymères de mannose liés en α -1,2/ α -1,3 comme cela a été décrit pour *Saccharomyces cerevisiae*. Le premier résidu α -1,2 est ajouté par l'enzyme Mnn2 (Rayner & Munro 1998), les suivants étant ajoutés par Mnn5 (Cohen *et al.* 1980; Rayner & Munro 1998). Les éventuels résidus α -1,3 terminaux peuvent, quant à eux, être ajoutés par Mnn1 (Graham *et al.* 1994). Une décoration supplémentaire au niveau d'un résidu en α -1,2 peut également avoir lieu. Il s'agit d'une phosphomannosylation par l'enzyme Mnn6 (Wang *et al.* 1997), qui conduit à la formation de la fraction acido-labile décrite plus haut. Toutes ces étapes ont lieu successivement, au fur et à mesure de l'acheminement des mannoprotéines dans les différents compartiments golgiens, du cis-Golgi au trans-Golgi (Figure 6).

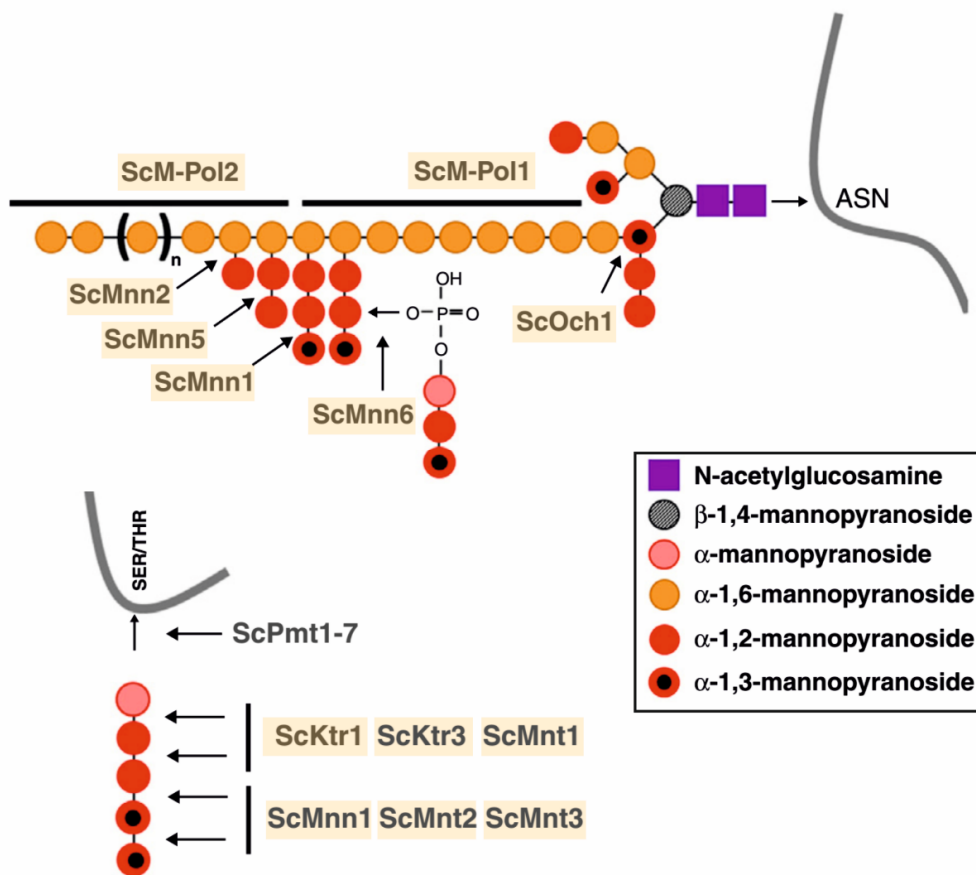


Figure 6 : Représentation schématique de la partie glycanne des N- et O-mannanes de *Saccharomyces cerevisiae*. Les enzymes responsables de ces voies de mannosylation sont également indiquées (adapté de Fabre *et al.* 2014a).

Chez les champignons filamenteux, notamment *Aspergillus fumigatus*, le précurseur $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ synthétisé au niveau du réticulum endoplasmique est exporté tel quel vers l'appareil de Golgi, sans subir l'action d'une ultime mannosidase comme cela a été décrit précédemment. Ce précurseur va alors suivre une maturation différente. En effet, au lieu de retrouver des glycoprotéines hautement mannosylées comme chez les levures, on va retrouver le motif majoritaire $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$, mais également des motifs $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ et $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ (Zhang *et al.* 2008). Il est également possible de retrouver, outre ces motifs courts, des motifs plus longs comme $\text{Hex}_{5-13}\text{HexNAc}_2$ au niveau des galactomannanes ou encore des motifs $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ ou $\text{Gal}_{11}\text{Man}_{5-7}\text{GlcNAc}_2$ sur des glycoprotéines sécrétées (Morelle *et al.* 2005; Schmalhorst *et al.* 2008) (Figure 7).

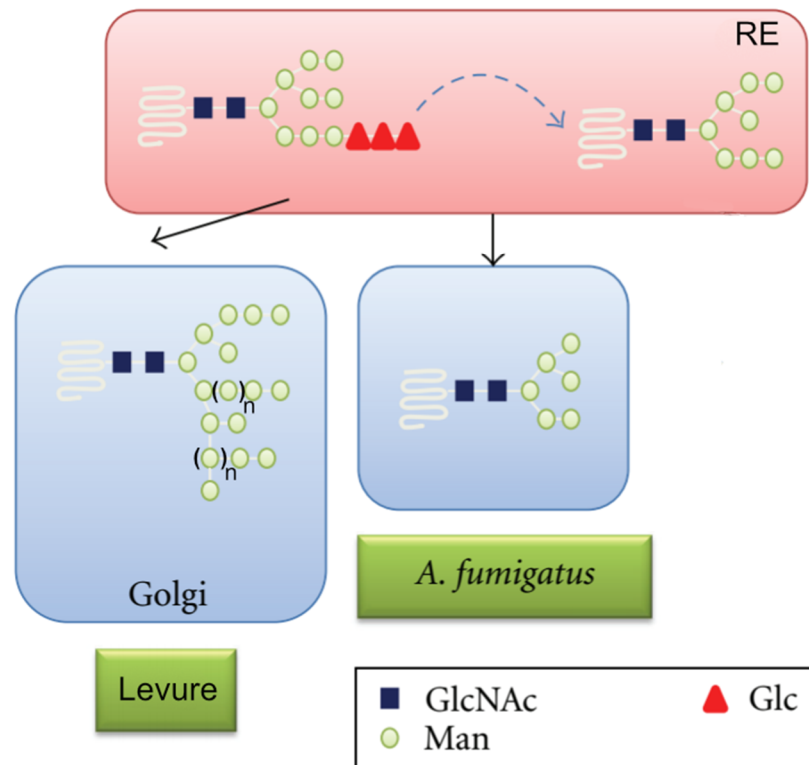


Figure 7 : Comparaison de la structure des N-glycanes de levure et d'*Aspergillus fumigatus*. Dans l'appareil de Golgi, les N-glycanes de levure sont hautement mannosylés (jusque 200 résidus), alors que ceux d'*Aspergillus fumigatus* sont beaucoup plus courts ($\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$) (adapté de Jin 2012).

De façon similaire, on peut retrouver des motifs particuliers chez un autre type de champignon, les levures dite « à fission » telles que *Schizosaccharomyces pombe*.

En effet, le précurseur $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ va être dirigé tel quel vers l'appareil de Golgi pour y être allongé via l'ajout de divers hexoses. *S. pombe* dispose d'au moins deux galactosyltransférases qui vont lui permettre de rajouter des résidus galactose sur la chaîne linéaire de mannoses liés en α -1,6 de ses N-glycanes. Ces résidus galactose peuvent être liés en α -1,2 (grâce à l' α -1,2-galactosyltransférase Gma12 (**Ziegler et al. 1999**) ou α -1,3 (grâce aux α -1,3-galactosyltransférases Otg1-3 (**Ohashi et al. 2012**)). De plus, il est intéressant de remarquer que *S. pombe* est également capable d'ajouter sur ces résidus α -1,3-galactose du pyruvate, ce qui est rarement rencontré au niveau des oligosaccharides eucaryotes (**Gemmill & Trimble 1996**).

2.3.3 O-glycanes

En regard de la N-mannosylation, la O-mannosylation est moins complexe. Toutes les levures étudiées jusqu'à présent disposent d'un motif commun de type $\text{Man}(\alpha 1-2)\text{Man}(\alpha 1-2)\text{Man}(\alpha 1-)\text{Ser/Thr}$. Comme pour les N-glycanes, en fonction des espèces considérées, des spécificités peuvent apparaître. Ainsi, chez *S. cerevisiae*, des résidus mannose liés en α -1,3 sont ajoutées, au contraire de *Pichia pastoris* qui n'est capable d'ajouter que des $\text{Man}(\alpha 1-2)$. *C. albicans*, nous le verrons plus en détail plus loin, transfèrent également des résidus mannose liés en β -1,2. Egalement, *S. pombe* se caractérise par l'addition d'un ou deux résidus galactose menant à la synthèse de motifs ramifiés (**Gemmill & Trimble 1999; Tanaka et al. 2001; Lommel & Strahl 2009**) (**Figure 8**).

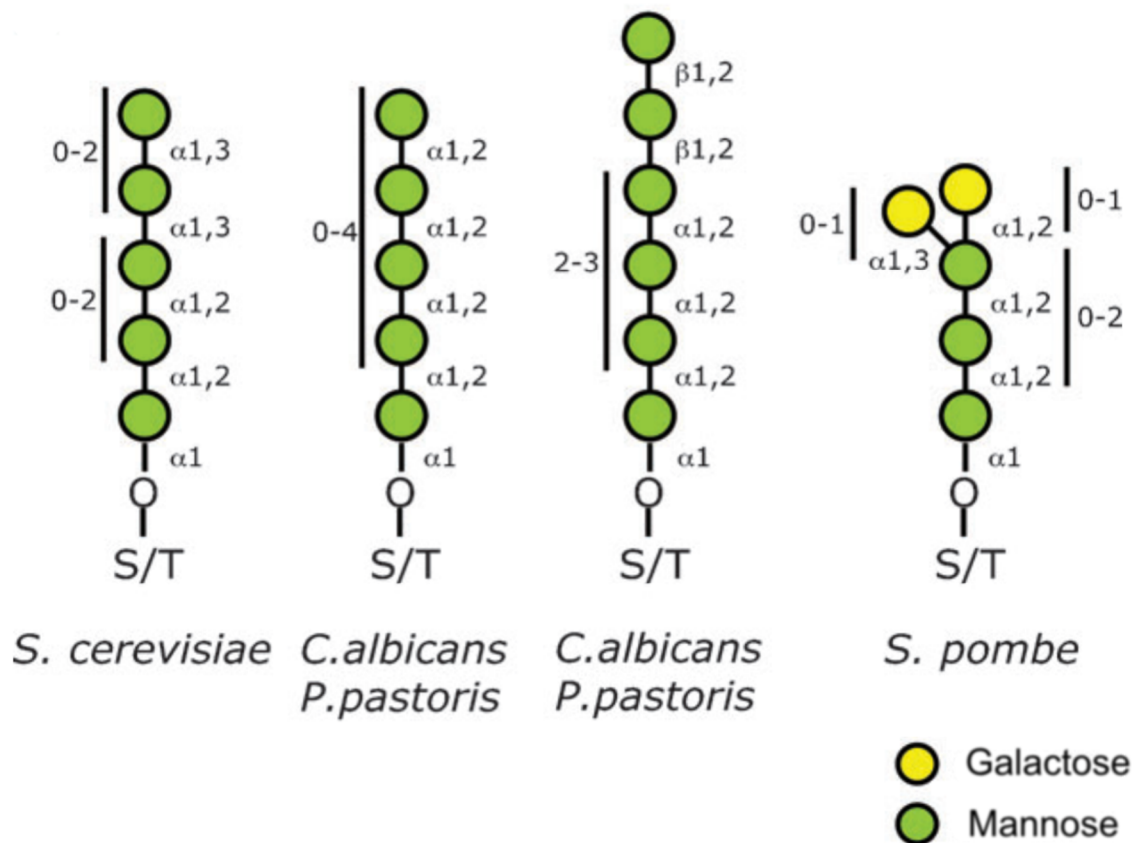


Figure 8 : Représentation schématique de la diversité des O-glycanes rencontrés chez différentes espèces de levure (adapté de Lommel & Strahl 2009).

Comme indiqué précédemment, l'initiation de la O-mannosylation a lieu dans la lumière réticulaire par le transfert d'un résidu mannose sur le peptide néo-formé, grâce à une famille de mannosyltransférases, les Pmt (**Lengeler et al. 2007**). Celles-ci n'utilisent pas de nucléotide sucre comme substrat donneur, mais le Dol-P-Man, synthétisé par la Dol-P-Man synthase, elle-même sous la dépendance unique du gène DPM1 (**Strahl-Bolsinger et al. 1999**). De nombreuses isoformes sont présentes chez les différentes espèces de levure. On en retrouve sept chez *S. cerevisiae*, regroupées en trois sous familles : Pmt1 (Pmt1, Pmt5 et Pmt7), Pmt2 (Pmt2, Pmt3 et Pmt6) et Pmt4. Seulement cinq isoformes ont été identifiées chez *C. albicans* et *P. pastoris* (**Nett et al. 2013**), et trois chez *S. pombe* (**Tanaka et al. 2005**). Tous les membres de cette famille PMT présentent des profils d'hydrophobicité similaires qui en font des

glycosyltransférases intégralement enchâssées dans la membrane du réticulum endoplasmique. De plus, il a été montré que ces Pmt s'associaient en complexe multienzymatique hétéromérique, comme Pmt1/Pmt2 par exemple, pour assurer leur fonction d'O-mannosylation (**Strahl-Bolsinger et al. 1999**).

Par la suite, les autres résidus de mannose sont transférés par des enzymes golgiennes de la famille Mnt/Ktr, appartenant à la famille CAZy GT15. Chez *S. cerevisiae*, les deuxième et troisième mannoses, liés en α -1,2, sont ajoutés par Mnt1/Kre2, Ktr1 et Ktr3 dans le Golgi médian (**Häusler et al. 1992; Romero et al. 1997; Lussier et al. 1997**), tandis que les quatrième et cinquième mannoses liés en α -1,3 sont ajoutés par Mnn1, Mnt2 et Mnt3 d'abord dans le Golgi médian puis dans le trans-Golgi (**Graham et al. 1994; Romero et al. 1999**) (**Figure 6**).

2.3.4 Glycosphingolipides

Les céramides sont transportés du réticulum endoplasmique au Golgi par transport vésiculaire (via COPII) ou non (**Funato & Riezman 2001; Perry & Ridgway 2005**). De manière générale, les glycosphingolipides sont obtenus par l'addition d'un résidu glucose ou galactose au groupement hydroxyl en C1 du céramide (**Merrill Jr. & Sandhoff 2002**). C'est l'addition d'autres résidus glycosidiques qui conduit à la formation des différents types de glycosphingolipides. Par exemple, chez *S. cerevisiae*, l'inositol-phosphorylceramide (IPC) synthase Aur1 catalyse l'addition du phosphoryl-inositol au céramide dans le Golgi médian (**Nagiec et al. 1997; Dickson et al. 1997; Levine et al. 2000**). L'IPC formé est transporté dans la lumière golgienne pour y être mannosylé et produire ainsi le mannosyl-inositol-phosphorylceramide (MIPC) grâce à deux IPC mannosyltransférases aux activités redondantes, Csg1 et Csh1 (**Lisman et al. 2004**). Une enzyme chélatrice de Ca^{2+} , Csg2, peut également former un complexe avec chacune de ces deux enzymes afin de réguler leur stabilité et leur transport (**Uemura et al. 2007**). Dans la lumière golgienne, un deuxième phosphoryl-inositol peut également être transféré sur le MIPC par une autre inositol-phosphoryl transférase, Ipt1, et générer ainsi un mannosyl-diinositol-phosphorylceramide (M(IP)₂C) (**Dickson et al. 1997**) (**Figure 9**). MIPC et M(IP)₂C peuvent ensuite être adressés à la membrane plasmique, au contraire des IPC non glycosylés qui sont transportés vers une vacuole.

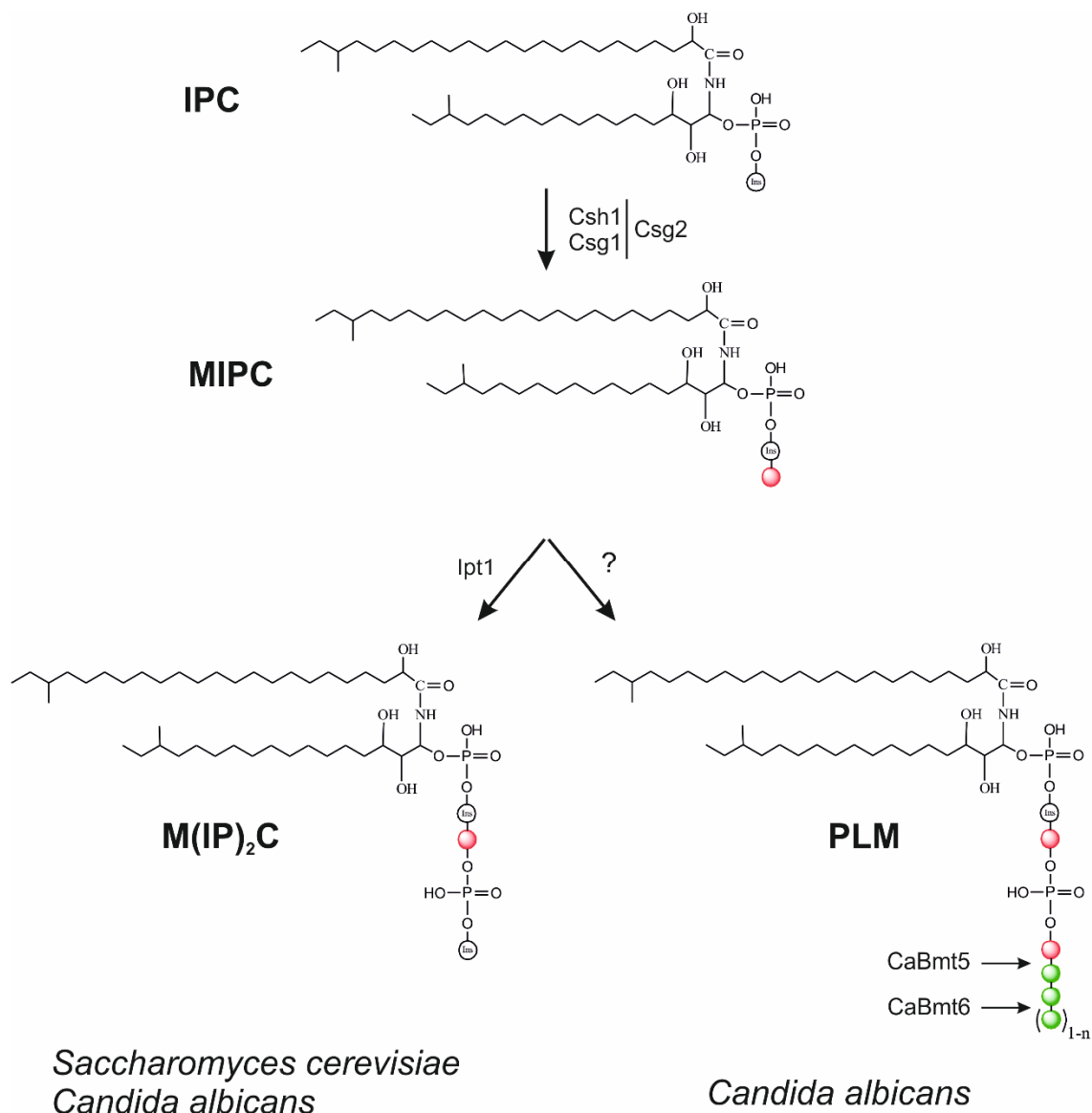


Figure 9 : Voies de biosynthèse, chez *S. cerevisiae* et *C. albicans*, des glycosphingolipides de la famille des MIPC (adapté de Fabre *et al.* 2014a).

2.4 Spécificité de glycosylation des levures pathogènes

Le chapitre précédent décrit la composition et la formation de la partie glycanique des glycoconjugués de la paroi des levures en général. Il s'agit d'un socle commun à la majorité des levures, dont le représentant le plus étudié est la levure non-pathogène *Saccharomyces cerevisiae*. Néanmoins, en étudiant la paroi de levures pathogènes, certaines différences de glycosylation ont été mises en évidence. Celles-ci ont été principalement étudiées chez *Candida albicans*, mais elles seraient

communes à d'autres levures pathogènes telles que *C. glabrata* et *C. tropicalis*. Il est également intéressant à noter que ces particularités de glycosylation, avant d'être démontrées chez *C. albicans*, ont initialement été rapportées suite à l'étude d'une levure non-pathogène, *Pichia pastoris*.

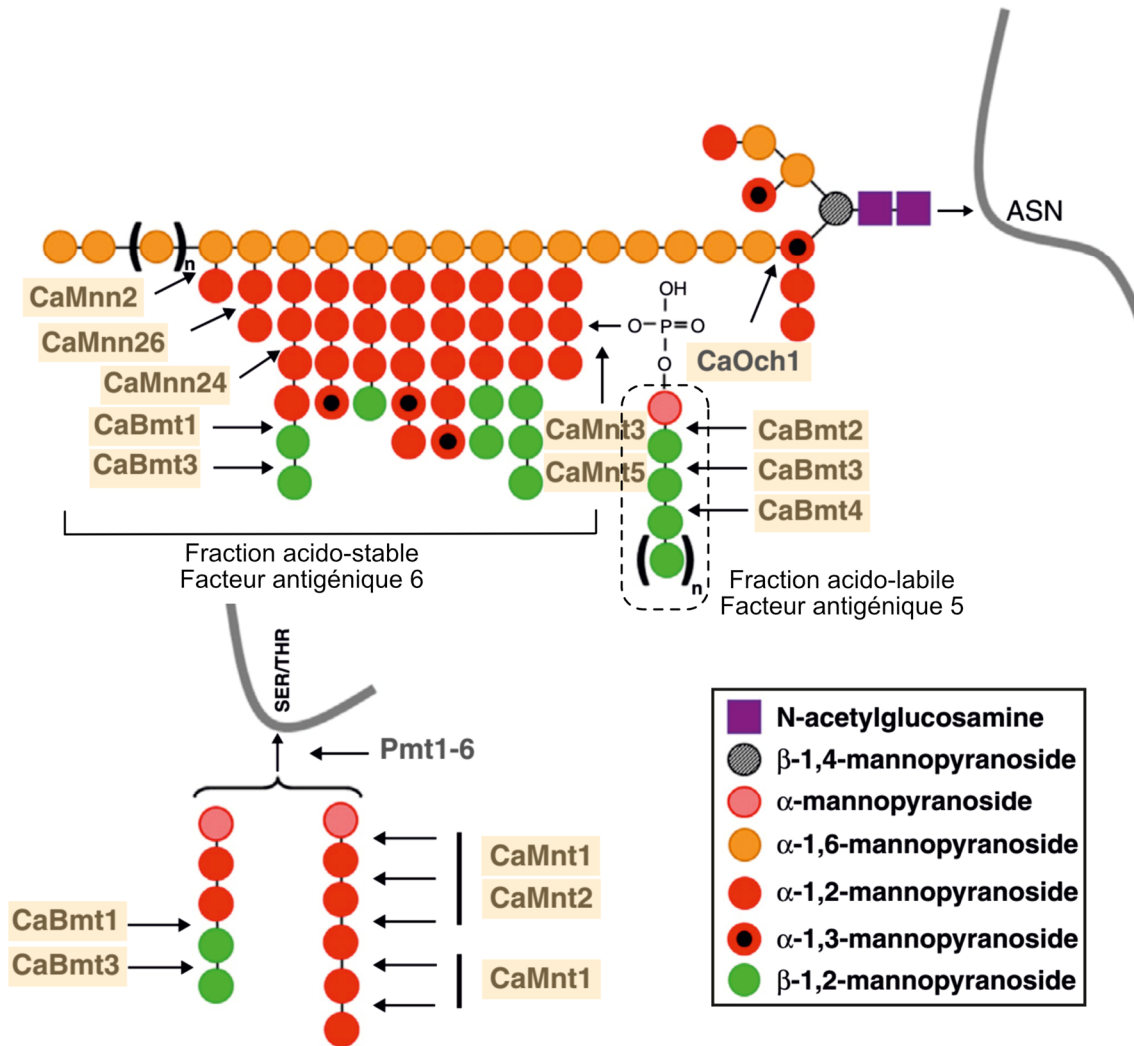


Figure 10 : Représentation schématique de la partie glycanne des N- et O-mannanes de *Candida albicans*. Les enzymes responsables de ces voies de mannosylation sont également indiquées (adapté de Fabre *et al.* 2014a).

D'une manière générale, le socle commun N-mannosidique de *S. cerevisiae* est retrouvé chez *C. albicans*. Des orthologues enzymatiques sont responsables de sa biosynthèse. On retrouve par exemple CaOch1, orthologue de Och1 chez *C. albicans*, qui ajoute le premier résidu mannose en α-1,6 sur le noyau interne (Lehle *et al.* 1995;

Bates et al. 2006). De même, le branchement des chaînes latérales en α -1,2 par Mnn2 et Mnn5 chez *S. cerevisiae* est réalisé par des enzymes de la famille MNN2 (famille GT71 dans la classification CAZy) telles que CaMnn2 et CaMnn26 (pour le premier résidu mannose en α -1,2 sur l'axe en α -1,6), ou encore CaMnn21, CaMnn22, CaMnn23 et CaMnn24 (pour les résidus α -1,2-mannose suivants) (**Hall et al. 2013**). La phosphomannosylation conduisant à la formation de la fraction acido-labile est quant à elle réalisée par CaMnt3 et CaMnt5, orthologues de Mnn6 (**Mora-Montes et al. 2010**) (**Figure 10**).

A ce socle commun donc, peuvent se rajouter d'autres résidus glycosidiques propres aux levures opportunistes, et à *C. albicans* plus particulièrement. Ainsi, on peut retrouver aux extrémités de ces chaînes latérales polymannosidiques en α -1,2 des résidus de mannose liés en β -1,2. L'ajout de ces β -1,2-mannosyles est réalisé par différentes β -1,2-mannosyltransférases qui peuvent être regroupées au sein d'une même famille, les CaBmt. Cette activité β -1,2-mannosyltransférase a été initialement démontrée par Suzuki et collaborateurs dans des fractions insolubles issues de cultures de *C. albicans* (**Suzuki et al. 1995**). Après incubation avec un mannopentaose $\text{Man}(\beta$ 1-2) $\text{Man}(\alpha$ 1-2) $_3\text{Man}$ en présence de GDP-mannose, ils ont mis en évidence par HPLC (High Performance Liquid Chromatography) la formation d'un mannohexaose. Son analyse par RMN ^1H (Résonance Magnétique Nucléaire du proton) a prouvé qu'il s'agissait bien d'un produit $\text{Man}(\beta$ 1-2) $\text{Man}(\beta$ 1-2) $\text{Man}(\alpha$ 1-2) $_3\text{Man}$, démontrant ainsi la présence d'une activité β -1,2-mannosyltransférase chez *C. albicans*. Il avait également été montré précédemment par RMN ^1H et ^{13}C , au sein des mannanes pariétaux de *C. albicans*, la présence d'oligo-mannosides liés en β -1,2 (**Shibata et al. 1993**), et des études plus récentes de RMN haute résolution en rotation à l'angle magique (HR-MAS) ont permis de confirmer ces observations sur ces cellules entières (**Maes et al. 2009**).

Comme nous l'avons vu précédemment, plusieurs espèces de *Candida*, dont *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* ou encore *C. lusitaniae*, présentent ces motifs β -Man au niveau des fractions acido-stable et acido-labile de leur PPM. Ceci a été mis en évidence grâce à l'utilisation d'anticorps polyclonaux (issus de l'immunisation de lapins avec une souche de levure, puis sur l'appréciation de l'activité agglutinante du

sérum vis-à-vis des blastospores de diverses espèces par rapport à l'espèce homologue après adsorption par des espèces hétérologues) dirigés contre ces épitopes β -1,2-mannosidiques (**Suzuki 1997**) (**Tableau 2**). C'est ainsi que l'on a pu montrer l'existence de sérotypes différents chez *C. albicans*. En effet, la présence du motif comprenant jusqu'à quatre résidus mannose liés en β -1,2 sur la fraction acido-stable, également appelé antigène facteur 6, en plus de leur présence sur la fraction acido-labile, détermine le sérotype A de *C. albicans*. A l'inverse, si ce motif n'est présent que sur la fraction acido-labile (également appelé antigène facteur 5) et non sur la fraction acido-stable, on parle alors du sérotype B de *C. albicans* (**Miyakawa et al. 1992; Shibata et al. 1992, 2003, 2012**) (**Figure 10, Tableau 2**).

Tableau 2 : Structure des facteurs antigéniques retrouvés chez les différentes espèces de *Candida* les plus répandues.

| Facteurs antigéniques | Structure | Espèces de <i>Candida</i> porteuses |
|-----------------------|--|---|
| Facteur 1 | $\text{Man}(\alpha 1-2)\text{Man}(\alpha 1-2)_n\text{Man}$ | <i>C. albicans</i> sérotype A <i>C. albicans</i> sérotype B <i>C. tropicalis</i> <i>C. glabrata</i> <i>C. guilliermondii</i> <i>C. krusei</i> <i>C. parapsilosis</i> <i>C. kefyr</i> |
| Facteur 34 | $\text{Man}(\alpha 1-3)\text{Man}(\alpha 1-2)\text{Man}(\alpha 1-2)_n\text{Man}$ | <i>C. glabrata</i> |
| Facteur 4 | $\text{Man}(\alpha 1-3)[\text{Man}(\alpha 1-6)]\text{Man}(\alpha 1-2)\text{Man}(\alpha 1-2)_n\text{Man}$ | <i>C. albicans</i> sérotype A <i>C. albicans</i> sérotype B <i>C. tropicalis</i> <i>C. glabrata</i> <i>C. guilliermondii</i> |
| Facteur 6 | $\text{Man}(\beta 1-2)\text{Man}(\beta 1-2)_n\text{Man}(\alpha 1-2)\text{Man}(\alpha 1-2)_n\text{Man}$ | <i>C. albicans</i> sérotype A <i>C. tropicalis</i> <i>C. glabrata</i> |
| Facteur 9 | $\text{Man}(\beta 1-2)\text{Man}(\beta 1-2)_n\text{Man}(\alpha 1-3)[\text{Man}(\alpha 1-6)]\text{Man}(\alpha 1-2)\text{Man}(\alpha 1-2)_n\text{Man}$ | <i>C. guilliermondii</i> |
| Facteur 5 | $\text{Man}(\beta 1-2)\text{Man}(\beta 1-2)_n\text{Man}(\alpha 1-)\text{PO}_4^-$ | <i>C. albicans</i> sérotype A <i>C. albicans</i> sérotype B <i>C. tropicalis</i> <i>C. krusei</i> <i>C. parapsilosis</i> |

3 Glycosyltransférases fongiques

3.1 Classification des glycosyltransférases

Par le passé, les enzymes catalysant le transfert de glycosyls étaient classées selon leur substrat donneur, leur substrat accepteur et leur spécificité de réaction. Mais avec l'avènement des études génomiques, de nombreuses séquences génomiques putatives ont été mises en évidence sans que l'on sache leur attribuer une quelconque fonction biochimique. Une nouvelle classification a donc dû être mise au point. Elle regroupe en familles des protéines dont la séquence en acides aminés présente des similarités avec celle d'enzymes dont l'activité biochimique a déjà été décrite. Pour les glycosyltransférases qui nous concernent ici, et plus généralement pour toutes les enzymes qui dégradent, modifient ou créent des liaisons glycosidiques, une base de données spécifique a été mise sur pied. Cette base de données, CAZy (Carbohydrate-Active enZYme) (**Lombard et al. 2014**) regroupe ainsi des séquences protéiques en 5 classes : les glycoside hydrolases (135), les glycosyltransférases (101), les polysaccharide lyases (24), les carbohydrate estérases (16) et les enzymes à activité auxiliaire (13), pour un total actuel de 289 familles. Il est à noter que de nombreuses séquences ne sont classées dans aucune famille. Néanmoins, au sein d'une même famille, les séquences ont de bonnes chances de présenter des repliements tridimensionnels similaires. Par conséquent, si on parvient à caractériser la structure tridimensionnelle d'un membre d'une famille en particulier, on peut estimer qu'une autre séquence de cette même famille, à condition que sa séquence soit suffisamment similaire, va se replier de manière similaire. Par extension, on peut également supputer que le mécanisme catalytique décrit pour une enzyme est conservé au sein d'une même famille.

3.2 Caractéristiques des glycosyltransférases

3.2.1 Répartition en domaines des glycosyltransférases de type II

Les glycosyltransférases golgiennes sont majoritairement décrites comme étant de type II. A ce titre, elles disposent d'une répartition en domaine relativement bien conservée (**Yuan & Teasdale 2002; Banfield 2011**). Du côté N-terminal, on retrouve

un court domaine cytosolique d'une dizaine d'acides aminés puis un domaine transmembranaire simple d'une vingtaine ou trentaine d'acides aminés qui permet d'ancrer l'enzyme dans la membrane golgienne. Ensuite, la séquence se prolonge par un domaine tige d'environ 150 acides aminés, typiquement désordonné. Enfin, en C-terminal, dans la lumière golgienne, un domaine catalytique globulaire, d'environ 500 acides aminés, bien conservé au sein d'une même famille (**Figure 11**).

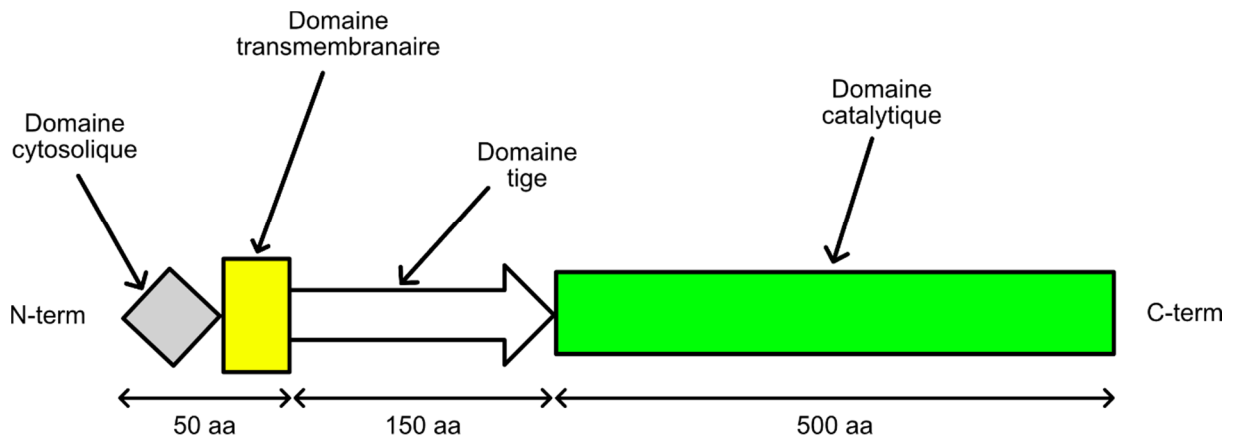


Figure 11 : Représentation schématique de l'organisation en domaines des glycosyltransférases golgiennes de type II.

3.2.2 Mécanismes catalytiques des glycosyltransférases

Le transfert d'un résidu glycosyl d'une molécule à une autre peut survenir selon deux mécanismes, par inversion ou rétention de la stéréochimie du carbone asymétrique du substrat donneur par rapport au produit formé (**Chang et al. 2011; Breton et al. 2012; Albesa-Jove et al. 2014**). Le mécanisme catalytique à l'origine de cette orientation stéréochimique va donc différer selon qu'il s'agit d'une glycosyltransférase par inversion ou par rétention. D'une manière générale, le mécanisme par inversion est relativement bien décrit. Il s'agit d'une réaction de type S_N2 . La chaîne latérale basique d'un résidu situé dans le site actif va déprotoner l'accepteur nucléophile, facilitant ainsi la substitution nucléophile de type 2 (départ du groupement phosphate et entrée de l'accepteur de manière concertée) (**Lairson et al. 2008**) (**Figure 12a**).

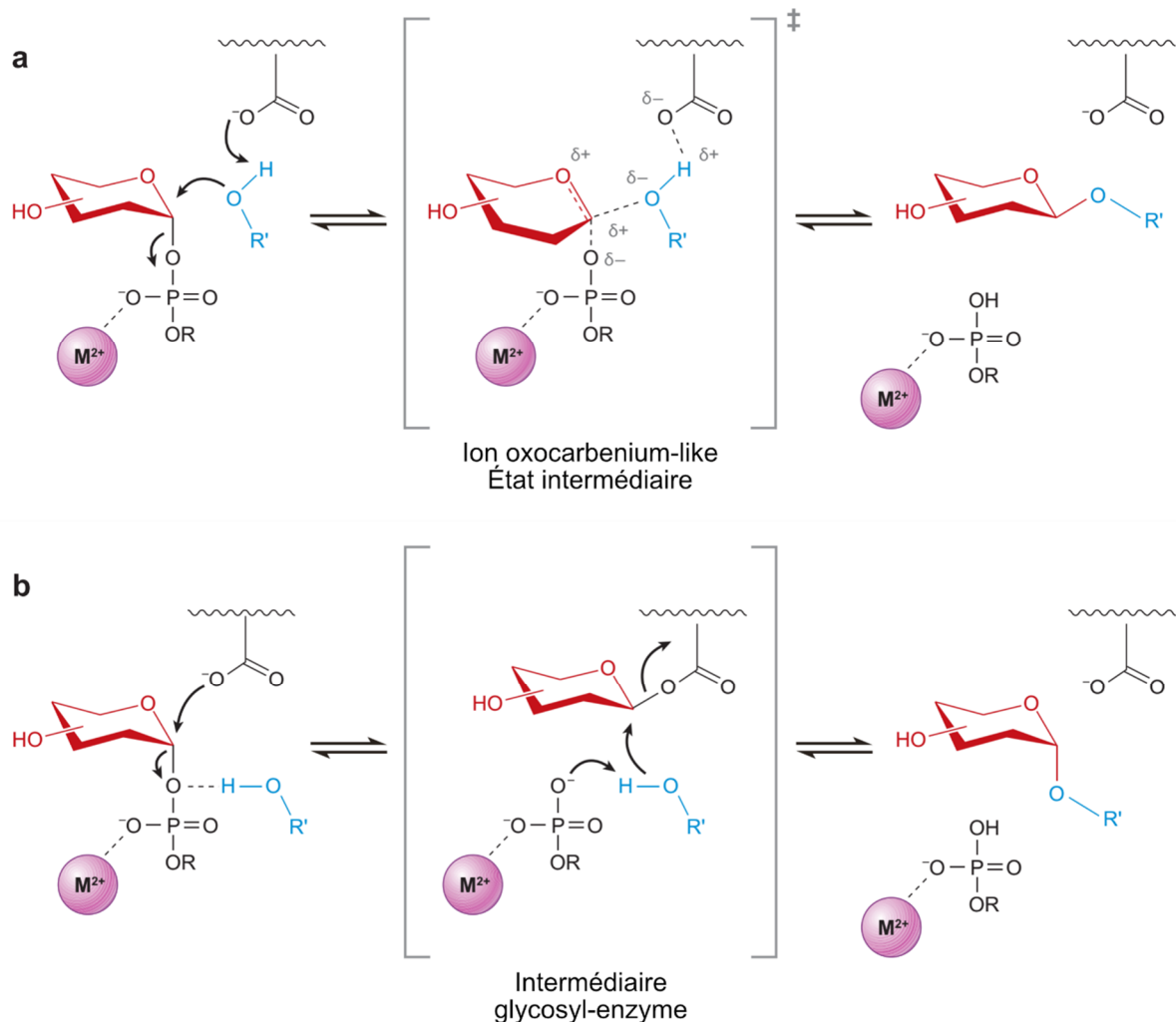


Figure 12 : Représentation schématique des mécanismes catalytiques des glycosyltransférases. a) Mécanisme par inversion de conformation de type S_N2-like. b) Mécanisme par rétention de conformation passant par un intermédiaire glycosyl-enzyme (adapté de Lairson *et al.* 2008).

Le mécanisme par rétention est quant à lui plus controversé. Un mécanisme à double déplacement impliquant la formation d'une liaison covalente et d'un intermédiaire glycosyl donneur-enzyme a été proposé (**Figure 12b**). Mais plutôt qu'une liaison covalente, il pourrait également être possible qu'il y ait formation d'un intermédiaire transitoire conduisant à une rétention de configuration stéréochimique.

La présence d'un ion métallique divalent en tant que cofacteur est souvent décrite comme nécessaire à l'action des glycosyltransférases. Une fois que celui-ci et/ou le substrat donneur se fixe au niveau du site actif de l'enzyme, la conformation de ce dernier va être modifiée grâce à des boucles flexibles. Un site de liaison pour le substrat accepteur va ainsi apparaître. Le transfert du résidu glycosyl sur le substrat

accepteur est suivi par la libération, d'un côté du produit, et de l'autre du substrat donneur désormais dépourvu de sa partie glycosidique. La boucle peut dès lors se replacer et le site actif retrouver sa conformation initiale (Klutts *et al.* 2006).

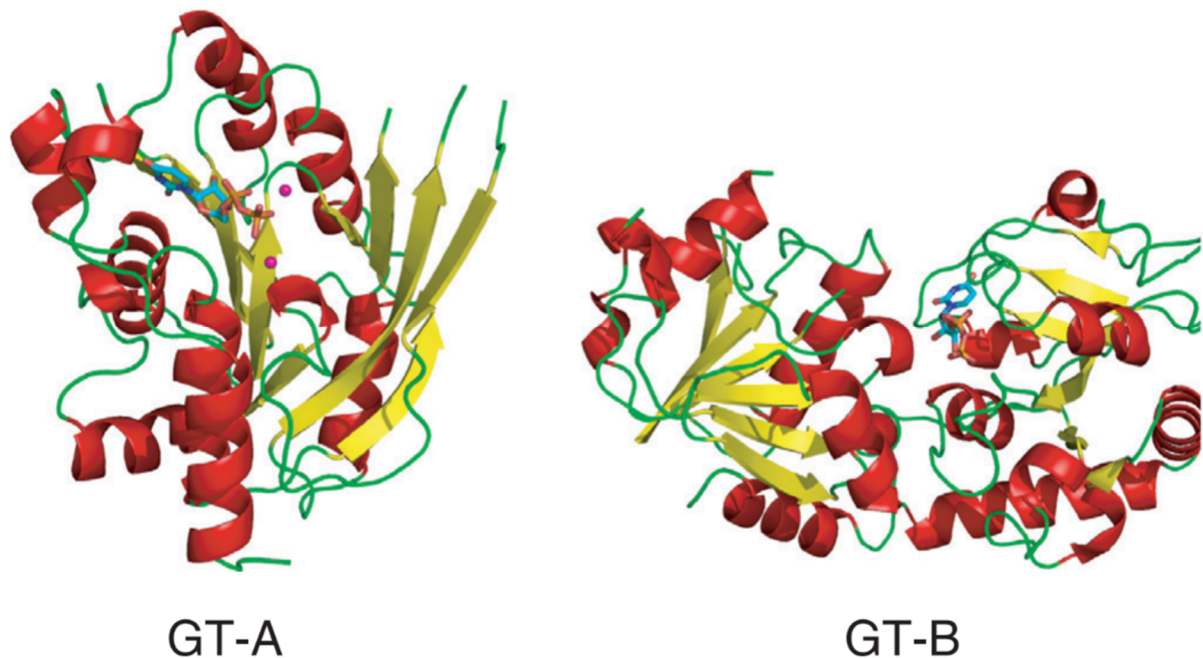
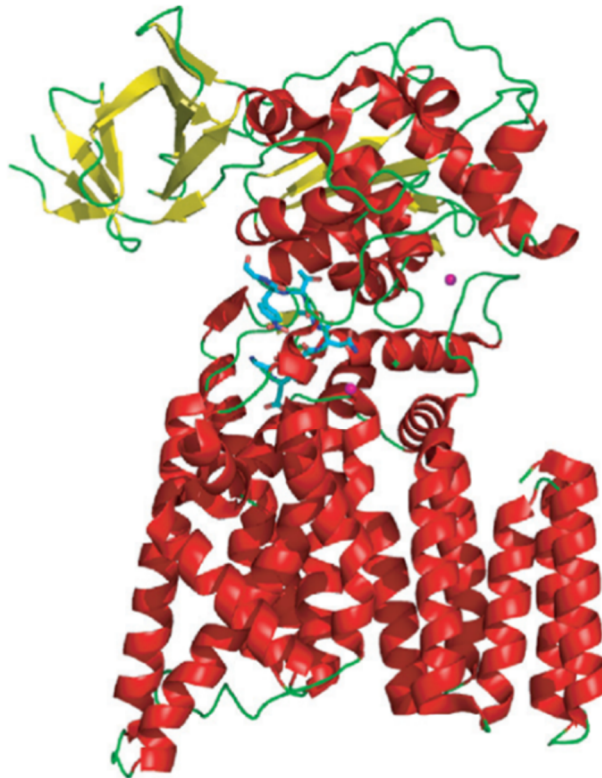


Figure 13 : Représentations tridimensionnelles des deux principaux types de repliement des glycosyltransférases, GT-A et GT-B. Constitués de deux domaines Rossmann, ceux-ci peuvent être soit étroitement associés (GT-A : SpsA de *Bacillus subtilis* en complexe avec de l'UDP et du magnésium) ou plus éloignés via la présence d'un linker (GT-B : β -glucosyltransférase du phage T4 en complexe avec de l'UDP) (adapté de Gloster 2014).

3.2.3 Repléments tridimensionnels des glycosyltransférases

D'un point de vue structural, deux types de repliements ont été majoritairement décrits. Basés sur des variations du domaine de liaison aux nucléotides, ils ont été nommés GT-A et GT-B (Coutinho *et al.* 2003; Lairson *et al.* 2008; Gloster 2014) (Figure 13). Ces domaines de liaison aux nucléotides, encore appelés repliements de Rossmann, sont constitués d'un enchaînement de feuillets β et d'hélices α sous la forme $\beta/\alpha/\beta$ (Albesa-Jove *et al.* 2014). Le repliement de type GT-A consiste en l'association étroite entre deux domaines Rossmann, de tailles variables, formant ainsi un feuillet β continu. Le côté N-terminal participe à la reconnaissance du substrat nucléotidique donneur, tandis que le côté C-terminal va interagir avec le substrat accepteur. Une des caractéristiques des enzymes possédant un repliement GT-A est qu'elles disposent d'un motif Asp-X-Asp, également connu sous le nom DXD, qui peut

permettre, via un ou les deux groupements carboxyliques, la coordination d'un cation divalent. Ce dernier va alors permettre de stabiliser le groupement phosphate du substrat donneur (**Coutinho et al. 2003**). Le repliement GT-B est lui aussi composé de deux domaines Rossmann. Au lieu d'être étroitement liés, ceux-ci vont cependant être séparés par un court domaine de liaison, ce qui va ainsi délimiter un sillon inter-domaine. C'est à l'interface entre ces deux domaines Rossmann que le site actif va être défini. A l'inverse du repliement GT-A, il est généralement admis, pour le repliement GT-B, que le substrat nucléotidique donneur va se lier au côté C-terminal, alors que le substrat accepteur va se placer du côté N-terminal (**Albesa-Jove et al. 2014**). La spécificité de substrat d'une glycosyltransférase GT-B, étant donné le très grand nombre possible de substrats accepteurs différents, va donc dépendre de la variabilité et des réarrangements possibles de structure secondaire au niveau de son domaine de Rossmann N-terminal (à l'inverse du repliement GT-A, où ce sera plutôt le domaine de Rossmann C-terminal). Contrairement au repliement GT-A, la présence d'un cation divalent au niveau du site actif n'apparaît pas nécessaire à l'activité d'une enzyme GT-B.



GT-C

Figure 14 : Représentation tridimensionnelle d'un troisième type de repliement possible des glycosyltransférases, GT-C. Il s'agit ici de l'exemple de l'oligosaccharyltransférase de *Campylobacter lari* en complexe avec du magnésium et le substrat peptidique (adapté de Gloster 2014).

Un troisième type de repliement, appelé GT-C, a également été initialement prédit sur la base d'alignements de séquence itératifs, puis mis en évidence par cristallographie notamment au sein de la famille GT66. Il regroupe les glycosyltransférases intégralement membranaires, possédant 8 à 13 hélices transmembranaires et qui ont besoin de substrats donneurs de nature lipo-phosphate activés (**Figure 14**). Il est important de noter qu'il est possible de retrouver des enzymes d'inversion et de rétention disposant de repliements GT-A ou GT-B. Ceci suggère une absence de corrélation entre le type de repliement d'une glycosyltransférase et son mécanisme catalytique. A ce jour, toutes les enzymes susceptibles de posséder un repliement GT-C sont des enzymes d'inversion. De plus, certaines glycosyltransférases ne sont compatibles avec aucun de ces trois types de repliements.

3.3 Les mannosyltransférases fongiques

3.3.1 Structure et mécanisme de mannosyltransférases connues

3.3.1.1 *ScMnt1/Kre2*

ScMnt1/Kre2 est la première α -1,2-mannosyltransférase dont la structure 3D a été décrite chez *S. cerevisiae*. Elle appartient à la famille GT15 et présente un repliement se rapprochant du type GT-A (**Figure 15**). Elle dispose d'un motif DXD légèrement altéré (EPD) qui lui permet néanmoins de fixer le cation divalent Mn^{2+} via l'acide glutamique également impliqué dans la réaction de catalyse.

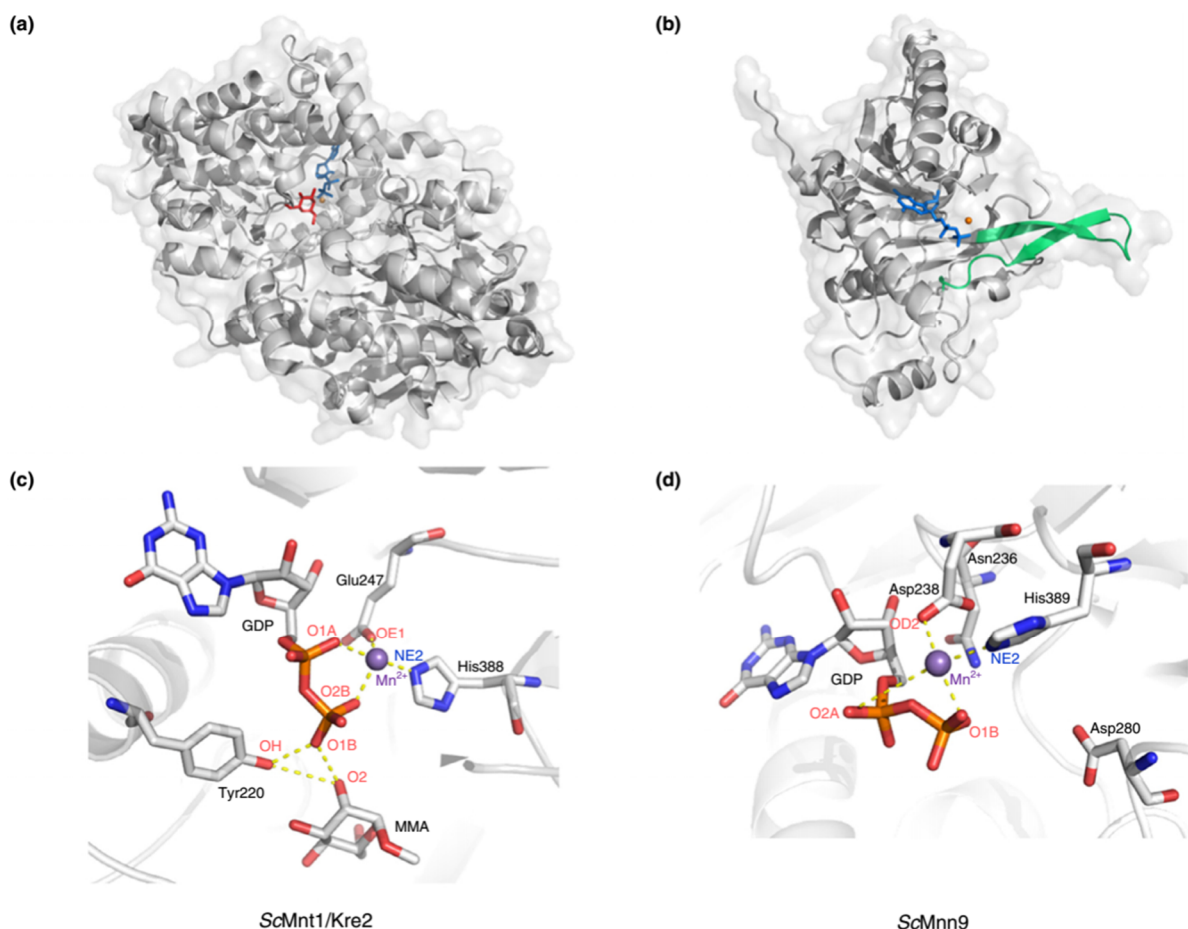


Figure 15 : Structure tridimensionnelle et site actif de ScMnt1/Kre2 et ScMnn9. En haut : représentation de a) ScMnt1/Kre2 en complexe avec du GDP, de l' α -méthylmannose et du Mn^{2+} (Lobsanov *et al.* 2004); b) ScMnn9 en complexe avec du GDP et du Mn^{2+} (Striebeck *et al.* 2013). En bas : Gros plan du site actif de c) ScMnt1/Kre2 et d) ScMnn9.

Deux mécanismes catalytiques ont été proposés sur la base des structures 3D obtenues, de la modélisation, de mutagenèse dirigée et d'analyses cinétiques. Le

premier est un mécanisme à double déplacement où le groupement hydroxyl du résidu tyrosine Tyr²²⁰ joue le rôle du nucléophile. Le second est un mécanisme de type S_Ni (substitution nucléophile aliphatique) où le résidu Tyr²²⁰ va positionner les substrats donneur et accepteur pour leur catalyse (Lobsanov *et al.* 2004) (Figure 16).

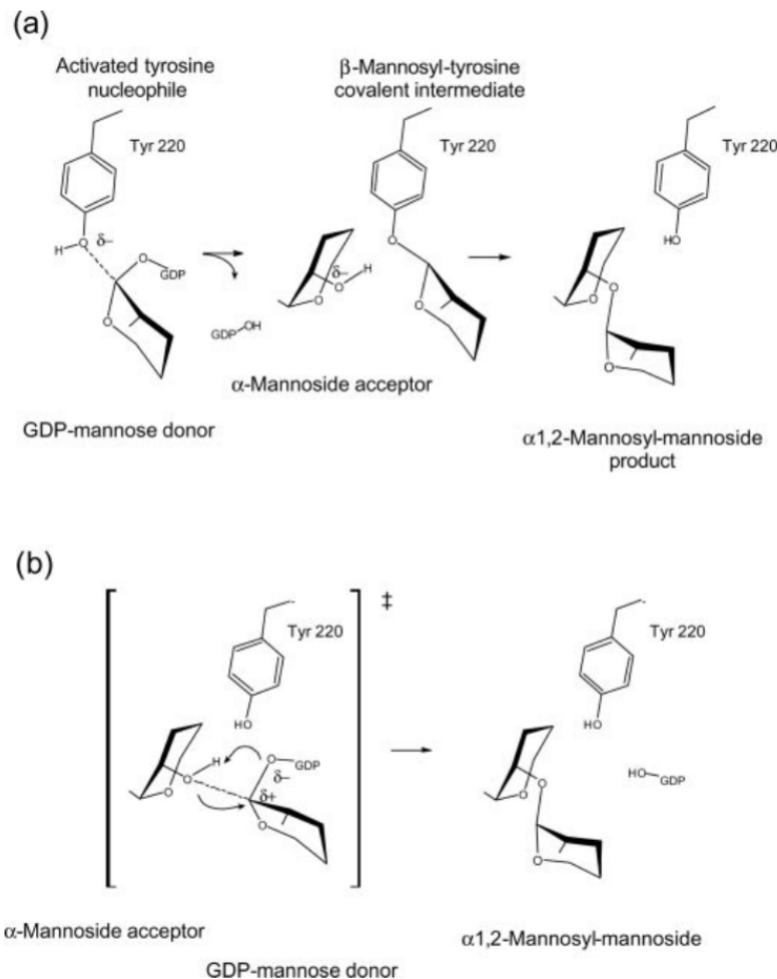


Figure 16 : Mécanismes catalytiques possibles pour ScMnt1/Kre2. a) Double déplacement selon un mécanisme S_Ni-like où Tyr²²⁰ joue le rôle de nucléophile. b) Tyr²²⁰ positionne les substrats donneur et accepteur pour leur catalyse (adapté de Lobsanov *et al.* 2004).

3.3.1.2 ScMnn9

ScMnn9, deuxième glycosyltransférase fongique à avoir été cristallisée (Striebeck *et al.* 2013), fait partie de la famille GT62. Il s'agit d'une α-1,6-mannosyltransférase dont le repliement avait été prédit comme étant de type GT-A, ce qui a été confirmé grâce à la détermination de sa structure 3D (Figure 15). Il est intéressant de noter la présence d'une boucle en épingle faite de deux feuillettes β anti-parallèles qui pourrait agir comme une règle moléculaire et définir ainsi la longueur de

la chaîne de mannose formée, ou alors comme guide pour la reconnaissance et le positionnement des N-glycanes lors du transfert des résidus mannosidiques. Elle présente des similitudes structurales avec les familles GT15 (dont ScMnt1/Kre2) et GT78. Sans l'obtention d'une structure de ScMnn9 en complexe avec le substrat donneur GDP-mannose, il a été impossible de déterminer le site de liaison au mannose. Il a été néanmoins prédit que le résidu d'asparagine Asp²⁸⁰ puisse être impliqué dans la liaison au mannose sur la base de la superposition de la structure de ScMnn9 et de celle de la mannosylglycérate synthase de *Rhodothermus marinus* (un membre de la famille GT76) et du fait qu'il se trouve positionné proche du groupement hydroxyle. La conversion d'Asp²⁸⁰ vers Asn²⁸⁰ par mutagénèse dirigée a conduit à l'inactivation de l'enzyme, ce qui suggère un rôle important de ce résidu. De plus, il a été montré que les résidus Glu²⁴⁷/His³⁸⁸ chez ScMnt1/Kre2 et Asp²³⁶/His³⁸⁹ chez ScMnn9 étaient capables de fixer le manganèse, Glu et Asp correspondant chacun à la première position du motif DXD décrit comme étant caractéristique du repliement GT-A.

3.3.1.3 ScKtr4p

Plus récemment, un autre représentant de la famille GT15 a vu sa structure 3D résolue. Il s'agit de ScKtr4p, dont l'activité enzymatique semble être la même que ScMnt1/Kre2, à savoir une α -1,2-mannosyltransférase (**Possner et al. 2015**). De manière semblable à cette dernière, ScKtr4p dispose d'un repliement faisant penser à un repliement de type GT-A et fixe le manganèse grâce à son motif EPD (**Figure 17**). En outre, la superposition de ces deux structures montre de très grandes similitudes au niveau de leur site actif. Là encore, sans l'obtention de cristaux d'enzyme en complexe avec le GDP-mannose, il est difficile d'avancer des certitudes, mais il semblerait qu'une poche de taille suffisante et bien positionnée puisse accueillir la partie sucre du substrat donneur.

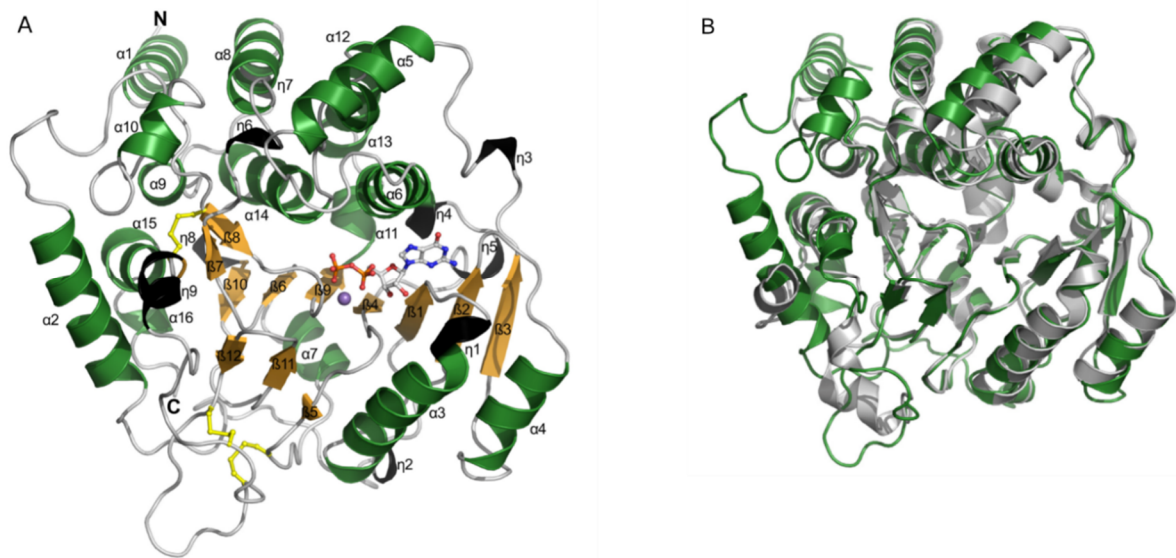


Figure 17 : Structure tridimensionnelle de ScKtr4p A) en complexe avec du GDP et du Mn²⁺. B) Superposition des structures de ScKtr4p (vert) et de ScMnt1/Kre2 (gris) (adapté de Possner *et al.* 2015).

3.3.2 Les β -1,2-mannosyltransférases de *C. albicans* : une nouvelle famille GT91

Nous avons vu que des motifs β -1,2-mannosidiques étaient retrouvés chez bon nombre de levures pathogènes comme *C. albicans*, *C. glabrata* ou *C. tropicalis*. Ces β -Man sont présents au niveau des glycoconjugués pariétaux de ces organismes et participent à leur pathogénicité, notamment pour leur rôle dans la colonisation des muqueuses. Ils sont transférés sur ces molécules grâce à l'action d'une famille d'enzymes possédant une activité β -1,2-mannosyltransférase, les CaBmt, grâce au substrat donneur GDP-mannose. Les voies de biosynthèse de la paroi des levures ont été initialement étudiées chez *S. cerevisiae*, qui comme nous l'avons vu précédemment ne possède pas de β -Man. Longtemps ces β -1,2-mannosyltransférases sont ainsi restées inconnues. La mise en évidence par RMN de motifs β -1,2 mannosylés chez *C. albicans* sur le PPM (**Suzuki *et al.* 1995**) puis sur le PLM (**Trinel *et al.* 1999**) a suscité l'intérêt. Cela a ensuite permis l'identification, chez *P. pastoris*, de quatre gènes BMT par recherche d'homologie de séquence avec des mannosyltransférases fongiques connues (**Mille *et al.* 2008**). Par la suite, des homologues à ces séquences de *P. pastoris* ont été cherchés et trouvés dans d'autres organismes, dont *C. albicans*. En tout, neuf gènes ont été identifiés chez *C. albicans*,

codant pour neuf enzymes, dont six ont vu leur fonction partiellement identifiée. En effet, étudiées par génétique inverse (inactivation des gènes) puis analyse du phénotype pariétal résultant (par spectrométrie de masse et RMN), il en ressort que ces enzymes agissent à différents niveaux (**Mille et al. 2008, 2012**). Sur la fraction acido-stable, CaBmt1 est en charge de l'ajout du premier résidu de mannose en β -1,2 sur la chaîne latérale en α -1,2, tandis que CaBmt3 va ajouter le ou les résidus β -1,2 suivants, vraisemblablement jusqu'à un maximum de 3 au total. Concernant la fraction acido-labile, on retrouve également des résidus mannose liés en β -1,2. CaBmt2 est responsable de l'ajout du premier résidu mannose en β -1,2 sur le phosphomannosyl, CaBmt3 et CaBmt4 étant en charge de l'élongation du motif β -1,2-mannose (**Figure 10**). Cette spécificité de mannosylation en β -1,2 est présente au niveau des N-mannanes, mais également au niveau des O-mannanes et des glycosphingolipides. CaBmt1 et CaBmt3 assurent l'initiation et l'élongation, respectivement, de ce motif sur les O-mannanes, tandis que CaBmt5 et CaBmt6 font de même pour les glycosphingolipides. Plus précisément, à partir du MIPC phosphomannosylé, CaBmt5 va ajouter le premier résidu en β -1,2, et éventuellement le deuxième. CaBmt6 va ensuite allonger le motif jusqu'à un total maximum de 16 résidus mannose en β -1,2 (**Figure 9**). Ce glycosphingolipide β -1,2-mannosylé, également appelé phospholipomannane (PLM), dispose de propriétés pro-inflammatoires directement dépendantes de la présence de ce motif β -1,2-mannoside ainsi que de son degré de polymérisation (**Devillers et al. 2013**).

Concernant les enzymes CaBmt7, CaBmt8 et CaBmt9, les études par génétique inverse ne nous ont fourni aucune indication sur leurs éventuels rôles dans la β -1,2-mannosylation chez *C. albicans*. S'agit-il juste de gènes redondants, de vestiges de recombinaisons homologues ? Ou bien encore pourrait-il s'agir de partenaires protéiques, ne possédant pas directement d'activité β -1,2-mannosyltransférase, mais facilitant l'activité des autres CaBmt ?

Quant à *P. pastoris*, les quatre gènes BMT identifiés codent bien pour quatre protéines Bmt, leur inactivation entraînant un défaut de β -mannosylation pariétale. Néanmoins, le rôle spécifique à chacune de ces quatre enzymes demeure inconnu.

De manière intéressante, toutes ces Bmt, que ce soit chez *C. albicans* ou *P. pastoris*, présentent une homologie de séquence relativement bien conservée, surtout au niveau de leur domaine C-terminal (jusqu'à 85% d'identité entre les CaBmt1 à 4 au niveau de leur domaine catalytique). Néanmoins, l'alignement de leurs séquences avec d'autres mannosyltransférases connues, telles que ScMnt1 (α -1,2-mannosyltransférase) ou ScMnn9 (α -1,6-mannosyltransférase) décrites au chapitre 3.3.1, montre que ces Bmt présentent des caractéristiques de séquence (et donc potentiellement de structure) tout à fait spécifiques. Elles présentent également toutes (pour celles dont on connaît leur fonction) une activité β -1,2-mannosyltransférase. La classification CAZy a donc choisi, il y a plusieurs années, de créer une nouvelle famille de glycosyltransférases, la famille GT91. Depuis, en plus des Bmt de *C. albicans* et *P. pastoris*, d'autres protéines ont été intégrées dans cette famille, pour un total à l'heure actuelle de 117. Il est à noter que toutes ces protéines sont issues d'organismes fongiques. Cependant, à ce jour, aucune de ces protéines GT91 n'a vu sa structure tridimensionnelle résolue.

Il apparaît donc important de parvenir à la caractérisation non seulement fonctionnelle, mais également structurale de ces CaBmt afin d'élucider le mécanisme catalytique spécifique aux membres de la famille GT91.

3.3.3 Caractérisation d'une CaBmt : exemple concret de CaBmt1

Après avoir étudié par génétique inverse l'action de ces CaBmt, il a été décidé d'entreprendre au sein de l'équipe leur caractérisation enzymatique. Pour cela, CaBmt1, enzyme initiateur du motif β -Man sur la fraction acido-stable du PPM, a été choisie en premier lieu. D'une longueur totale de 685 acides aminés, cette enzyme a dû d'abord être produite de manière recombinante, et tronquée dans sa partie N-terminale de ses domaines cytosolique et transmembranaire afin d'accroître sa solubilité pour une longueur finale de 636 acides aminés. Exprimée comme protéine sécrétée par la levure méthylothrophique *Pichia pastoris*, elle a ainsi été mise en présence de substrats oligosaccharidiques fonctionnalisés de divers origines et degrés de polymérisation. Ceux-ci pouvaient être soit d'origine naturelle et isolés de la paroi

de *S. cerevisiae* ou de mutants de *C. albicans* dépourvus de l'enzyme CaBmt1 (et donc de toute β -1,2-mannosylation sur la fraction acido-stable du PPM), soit d'origine synthétique sous forme d' α -oligomannosides. Il s'est ainsi avéré que cette enzyme CaBmt1 recombinante était capable d'utiliser préférentiellement comme substrat accepteur des mannotriose et mannotétraose liés linéairement en α -1,2. Elle catalysait ainsi le transfert de deux résidus mannose sur ces accepteurs. L'analyse par spectrométrie de masse et par RMN des produits ainsi formés a permis de déterminer que ces résidus transférés étaient bien des β -1,2-mannosyls (**Fabre *et al.* 2014b**).

Objectifs de la thèse

L'étude des voies de biosynthèse des β -1,2-mannosides de *Candida albicans* a débuté au sein de l'équipe dès 2010, et a été à l'origine de multiples collaborations regroupant les domaines biochimique, chimique, immunologique et clinique. La caractérisation des β -1,2-mannosyltransférases de *C. albicans* représente donc un travail de longue haleine dans lequel s'est fondu très naturellement mon projet de thèse. Au départ de ce sujet, la caractérisation de CaBmt1, enzyme d'initiation de la β -1,2-mannosylation de la fraction acido-stable du phosphopeptidomannane, a permis de développer et de mettre au point différentes techniques d'expression et d'analyse des produits primordiales dans l'étude de ces CaBmt. Cette démarche, rassemblant expression recombinante chez *P. pastoris*, utilisation de substrats accepteurs très divers et analyse des produits formés par spectrométrie de masse et RMN a ainsi prouvé sa robustesse dans la caractérisation enzymatique de ces CaBmt.

L'objectif de mes travaux de thèse était donc de poursuivre et finaliser la caractérisation des voies de biosynthèse de la β -mannosylation de la fraction acido-stable du PPM. Pour ce faire, nous avons :

- caractérisé l'activité enzymatique de CaBmt3 et identifié de nouveaux outils de modulation de l'activité des CaBmt (partie I),
- étudié la structure tridimensionnelle de CaBmt3 comme modèle de l'organisation structurale de la famille GT91 (partie II),
- initié la caractérisation enzymatique de CaBmt4 (partie III).

Nous avons ainsi entrepris la caractérisation enzymatique de CaBmt3. Fort de l'obtention des paramètres cinétiques de cette enzyme et globalement d'une meilleure compréhension des activités de CaBmt1 et CaBmt3, nous avons également eu l'opportunité de mettre en place une collaboration avec une équipe de chimistes afin d'étudier l'influence d'iminosucres sur ces deux enzymes. Ces iminosucres ont été décrits comme pouvant inhiber l'activité de nombreuses glycosidases. Il nous est apparu intéressant d'étudier leur potentiel inhibiteur sur des glycosyltransférases, en l'occurrence CaBmt1 et CaBmt3. Ces deux aspects du projet ont permis d'obtenir des

résultats qui ont fait l'objet de deux publications, reprises en annexe (**Sfihi-Loualia et al. 2016; Hurtaux et al. 2016**).

Lors de la caractérisation enzymatique de CaBmt3, nous avons pu constater que cette dernière présentait beaucoup plus de facilité d'expression et de stabilité que CaBmt1. Dans l'optique de mieux comprendre le mécanisme catalytique des CaBmt, il était crucial de parvenir à la caractérisation structurale d'une de ces enzymes. Notre choix s'est donc porté sur CaBmt3, beaucoup plus soluble et stable que CaBmt1. L'idée première de ce nouvel objectif était d'obtenir la structure tridimensionnelle de CaBmt3 *via* la diffraction aux rayons X d'un cristal de cette enzyme. Cette étape de cristallogenèse est particulièrement indécise. Une autre stratégie a ainsi été menée en parallèle, mettant en jeu deux approches combinées. Tout d'abord, l'utilisation de diffraction aux rayons X non pas d'un cristal, mais de la protéine en solution a permis d'obtenir des informations structurales donnant une première idée de l'organisation tridimensionnelle globale de CaBmt3. Ensuite, une approche *in silico* de modélisation ainsi que l'identification de cibles de mutagenèse dirigée au niveau du site actif ont permis d'avancer encore plus dans la compréhension du mécanisme catalytique de CaBmt3, et potentiellement de la famille GT91 dans son ensemble.

Enfin, au vu des résultats obtenus lors de la caractérisation enzymatique de CaBmt3, il nous a semblé opportun de débiter l'étude d'une troisième enzyme, CaBmt4. En effet, nous avons vu que CaBmt3 n'était capable de catalyser l'ajout que d'un résidu β -1,2-mannosyl sur son substrat. Or, une analyse de la structure du PPM de *C. albicans* montre que la fraction acido-stable peut être porteuse de motifs contenant plus de deux résidus β -1,2-mannosyl. CaBmt4 étant susceptible d'allonger le motif β -Man sur la fraction acido-labile, nous avons voulu savoir si elle serait également responsable de l'élongation du motif sur la fraction acido-stable, à la suite de CaBmt1 et CaBmt3.

Résultats

Partie I :

Caractérisation enzymatique de CaBmt3

Les travaux portant sur *Candida albicans* au sein du laboratoire se sont concentrés sur la caractérisation des activités enzymatiques des CaBmt, dans le but de mieux comprendre leurs mécanismes catalytiques. L'étude préalable de l'enzyme CaBmt1 a permis de mettre au point des techniques d'expression et d'analyse des produits qui ont été utilisées pour la caractérisation de CaBmt3. Celle-ci a conduit à la détermination des paramètres catalytiques optimaux et de la spécificité de substrat de cette enzyme. Une fois ces informations obtenues, l'utilisation de composés inhibiteurs de glycosidases, les iminosucres, nous a permis d'étudier leurs effets sur l'activité des glycosyltransférases. L'ensemble de ces résultats a fait l'objet de deux publications en co-premier auteur (**Sfihi-Loualia et al. 2016** pour la caractérisation enzymatique de Bmt3 ; **Hurtaux et al. 2016** pour les iminosucres), reprises en annexe.

1 Paramètres optimaux et spécificité de substrat

1.1 Caractérisation préalable de CaBmt1

Les précédents travaux de thèse du Dr. Ghenima Sfihi-Loualia ont entre autres conduit à la caractérisation enzymatique de CaBmt1 (**Sfihi-Loualia 2015**). L'utilisation d'une forme recombinante a permis de démontrer que cette enzyme était responsable de l'initiation de la β -mannosylation de la fraction acido-stable du PPM. Nous avons ainsi pu appliquer la même stratégie à CaBmt3. Une forme recombinante a été produite chez *Pichia pastoris* et des oligomannosides de différentes origines ont été isolés afin de servir de substrats accepteurs potentiels et déterminer ainsi son activité *in vitro*.

1.2 Production d'une forme recombinante de CaBmt3

1.2.1 Clonage et surexpression dans *E. coli*

Le gène BMT3 a été prédit pour coder pour une glycosyltransférase golgienne de type II de 63 kDa, pour un total de 549 acides aminés. Elle présente donc à ce titre, du côté N-terminal, un court domaine cytoplasmique de 38 résidus, suivi d'un domaine transmembranaire de 21 résidus. Grâce à l'utilisation d'un logiciel de prédiction de structure secondaire (Phyre 2), les résidus 61 à 132 sont décrits comme appartenant

à une région désordonnée correspondant à un domaine « tige ». Les acides aminés restants (133 à 549) définissent donc le domaine catalytique C-terminal (**Figure 24**).

Afin de limiter les risques d'insolubilité inhérents à la production recombinante de glycosyltransférases, nous avons décidé de tronquer la séquence en se débarrassant des domaines cytosolique et transmembranaire (résidus 1 à 59) et en conservant les domaines tige et catalytique (résidus 60 à 549). Nous avons donc inséré ce nouveau gène BMT3 dans le vecteur pET151/D-TOPO. Nous avons ensuite procédé à la transformation de la souche BL21 Star (DE3) d'*E. coli* (souche utilisée pour l'expression protéique car dépourvue de deux protéases clés et dont la RNase E a été rendue incompetente) afin de réaliser un premier essai de production de l'enzyme recombinante Bmt3. La visualisation d'une bande à 57 kDa montre bien une surexpression de l'enzyme (correspondant à la protéine Bmt3 proprement dite (53 kDa) à laquelle il faut ajouter l'étiquette 6xHis et les sites de clivage en N-terminal) après induction par l'IPTG, et ce dès une heure d'induction (**Figure 18**). Chaque production de Bmt3 chez *E. coli* a été réalisée en parallèle de la production d'un témoin positif d'expression, qui joue aussi le rôle de témoin négatif d'activité enzymatique. Il s'agit d'une souche d'*E. coli* transformée par un vecteur contenant le gène de la β -galactosidase (120 kDa). Cette enzyme a pour substrat le galactose, qui était absent de nos milieux réactionnels.

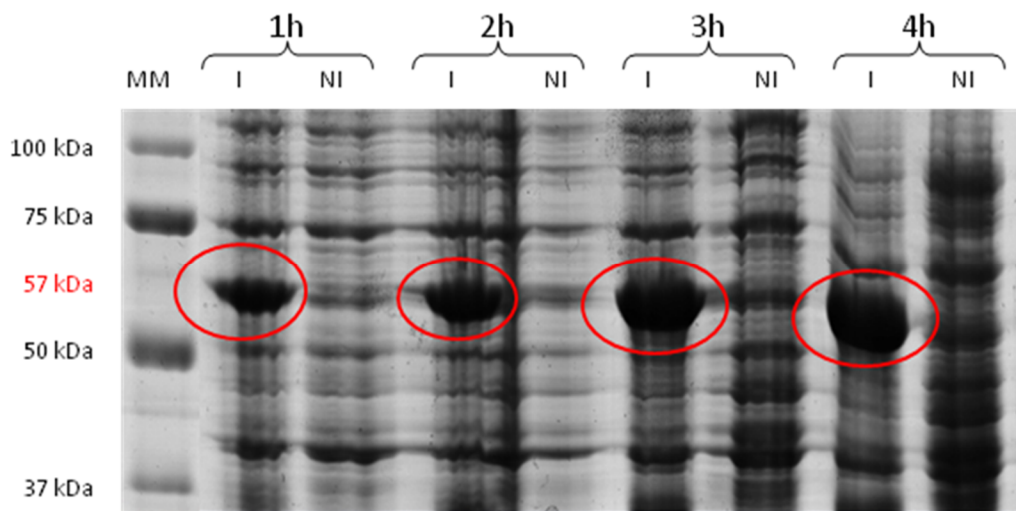


Figure 18 : Production de Bmt3 chez *E. coli* dans la souche BL21 Star (DE3). Migration des extraits bruts obtenus après induction par l'IPTG pendant 1, 2, 3 et 4 heures. Comparaison selon deux conditions : induit (I) et non induit (NI). La protéine Bmt3 (de masse moléculaire théorique, avec l'étiquette 6xHis, de 57 kDa) est bien retrouvée dans les pistes « induites », dès 1 heure d'induction. Electrophorèse SDS/PAGE, coloration au bleu de Coomassie.

L'étape suivante a été de déterminer s'il était possible de solubiliser cette enzyme Bmt3. Nous avons donc préparé les extraits bruts issus de la production de Bmt3 (après 1h d'induction) dans différents détergents (Triton X-100, Tween 20, CHAPS, DDM, OBG, HM, LDAO), à une concentration supérieure de 10% à leur concentration micellaire critique (CMC), ainsi que sans détergent, pour ensuite déterminer si l'on retrouve Bmt3 au niveau de la fraction soluble. Malheureusement, à CMC+10%, aucun des détergents testés ne parvient à solubiliser la protéine, et il en va de même sans détergent. Nous décidons donc de recommencer la manipulation en augmentant la concentration en détergent à 0.5%. Nous parvenons cette fois-ci à solubiliser la protéine dans un détergent, le dodécyl- β -D-maltoside (DDM) (**Figure 19A**). Pour finir, nous déterminons la concentration minimale en DDM nécessaire à la solubilisation de Bmt3. A une concentration en DDM de 0.3%, on retrouve toujours l'enzyme dans la fraction soluble (**Figure 19B**).

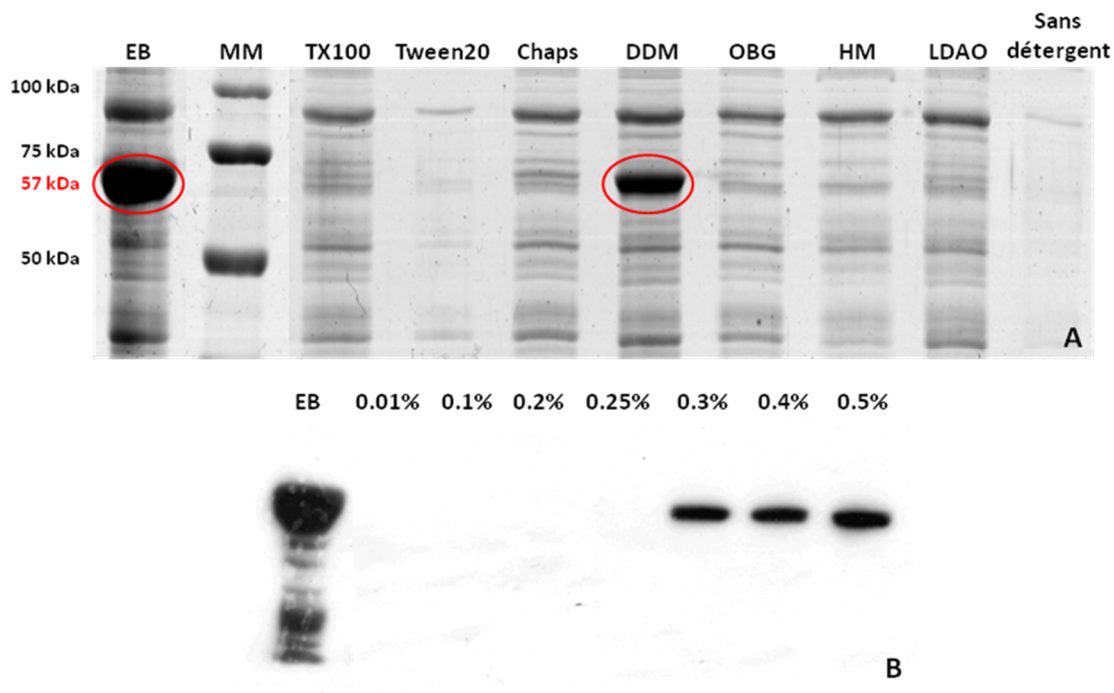


Figure 19 : Essais de solubilisation de la protéine recombinante Bmt3 surexprimée dans la souche BL21 Star (DE3) en présence de différents détergents. **A** : électrophorèse SDS/PAGE, coloration au bleu de Coomassie. Test de différents détergents à concentration 0.5%. La solubilisation n'est observée que dans le DDM. **B** : Western-blot anti-6xHis. Test de solubilisation dans des concentrations croissantes en DDM (de 0.01% à 0.5%). Bmt3 est soluble à partir de 0.3%. EB : extrait brut ; MM : marqueur de masse ; CHAPS : 3-[(3-cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propanesulfonate ; TX100 : Triton X100 ; DDM : dodécyl- β -D-maltoside ; OBG : octyl- β -glucoside ; HM : heptylmannose ; LDAO : dodécyl-NN-diméthylamine-N-oxyde.

Au final, nous avons décidé d'utiliser le DDM à 0.5% pour toutes nos futures productions recombinantes de Bmt3 chez *E. coli* afin d'obtenir la meilleure solubilité possible.

1.2.2 Correction des codons CTG et transformation dans SHuffle

Une des particularités de *C. albicans* se situe au niveau de son code génétique. Celui-ci va traduire un codon CTG par une sérine, alors que dans les autres organismes tels que *P. pastoris* ou *E. coli*, le codon CTG est traduit par une leucine, un acide aminé hydrophobe. Ceci peut conduire à des défauts de mise en conformation de la protéine surexprimée, pouvant ainsi expliquer en partie les difficultés de solubilisation. Nous avons donc procédé, par mutagenèse dirigée, à la modification des codons CTG présents dans la séquence de BMT3 pour qu'ils codent pour une sérine. Il s'avère qu'un seul codon CTG est présent dans la séquence native de BMT3, en position 460. Après avoir dessiné les amorces complémentaires sens et anti-sens contenant la modification (CTG → TCT), nous avons alors pu effectuer une PCR inverse à partir du plasmide pET151-BMT3 et obtenir ainsi un plasmide muté pour son codon CTG (**Figure 20**). Ce nouveau plasmide a permis ensuite la transformation d'une nouvelle souche d'*E. coli*, SHuffle. Cette souche a la particularité de faciliter la formation des ponts di-sulfures lors du repliement de la protéine, assurant ainsi une meilleure conformation (9 cystéines sont présentes dans la séquence recombinante de Bmt3, soit 4 ponts di-sulfures éventuels) et donc potentiellement une meilleure activité et solubilité de notre enzyme surexprimée. Après extraction de l'ADN plasmidique, nous avons pu vérifier l'efficacité de notre mutagenèse dirigée par profil de restriction grâce à l'enzyme AseI ainsi que par séquençage.

La protéine ainsi exprimée, bien que nécessitant toujours l'ajout de détergent DDM, est potentiellement mieux conformée, sans erreur de traduction sérine/leucine. Nous tentons ainsi de maximiser son activité enzymatique afin de mieux l'étudier.

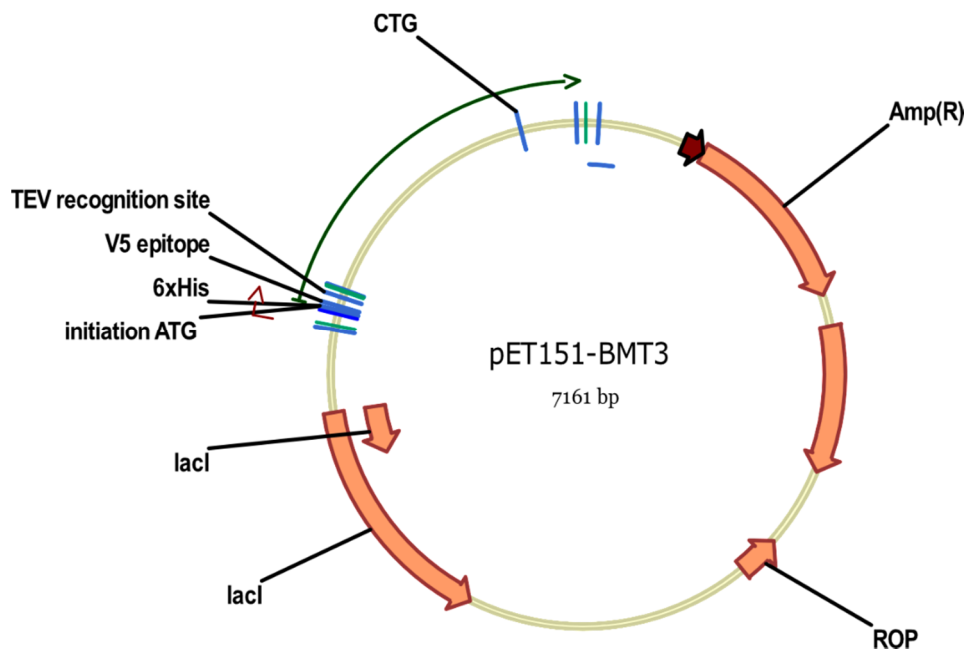


Figure 20 : Représentation du gène BMT3 inséré dans le vecteur pET151/D-TOPO pour son expression dans la souche SHuffle d'*E. coli*.

1.2.3 Avantages et raisons du passage chez *P. pastoris*

La nécessité d'utiliser un détergent pour solubiliser la protéine va se révéler problématique pour la suite de l'étude de l'enzyme Bmt3, notamment lorsqu'il s'agira de procéder aux essais cristallographiques. De plus, un autre problème lié au système de production dans la souche SHuffle d'*E. coli* a été mis en évidence. Nous nous sommes aperçus de la présence d'une activité mannosidasiqye propre à *E. coli* lors des tests d'activité (**Figure 21**).

Pour pouvoir déterminer la présence d'une activité enzymatique de Bmt3, il a fallu tout d'abord synthétiser un substrat accepteur potentiel. Nous avons donc fait agir Bmt1 sur son substrat DP3 α (3 résidus mannose liés en α -1,2) pour former les produits DP4 β et DP5 $\beta\beta$ (3 résidus mannose liés en α -1,2 auxquels s'ajoutent 1 ou 2 résidus mannose en β -1,2). Ce milieu réactionnel, comprenant donc un mélange de DP3 α , DP4 β et DP5 $\beta\beta$ peut être appelé « MR1 » pour « Milieu Réactionnel issu de l'action de Bmt1 », la réaction étant stoppée par chauffage à 100°C pendant 10 minutes (**Figure 21**). Le DP4 β ainsi formé doit théoriquement pouvoir servir de substrat pour Bmt3. L'emploi d' α -mannosidases sur MR1 permet de s'assurer que les produits DP4 β et DP5 $\beta\beta$ formés sont bien porteurs de résidus β -1,2-mannosyl (puisque résistants).

Ainsi, nous avons constaté que les produits DP3 α , DP4 β et DP5 $\beta\beta$ présents dans le milieu réactionnel disparaissaient après 48 heures d'incubation à 28°C, et ce même en présence du témoin négatif, *E. coli* codant pour la β -galactosidase (**Figure 21**). En effet, la disparition de ces composés, et l'apparition concomitante du mannose (DP1), traduit donc l'existence d'une activité mannosidasique au sein de cette souche SHuffle d'*E. coli*. Cette constatation est très surprenante en ce qui concerne le DP4 β et le DP5 $\beta\beta$ car la présence d'une activité β -mannosidasique n'a jusqu'à présent jamais été rapportée chez cette bactérie. Une telle activité s'avère par conséquent incompatible avec l'étude de celle de Bmt3 car elle dégrade les substrats mais aussi potentiellement les produits de celle-ci, rendant très complexe l'interprétation des résultats.

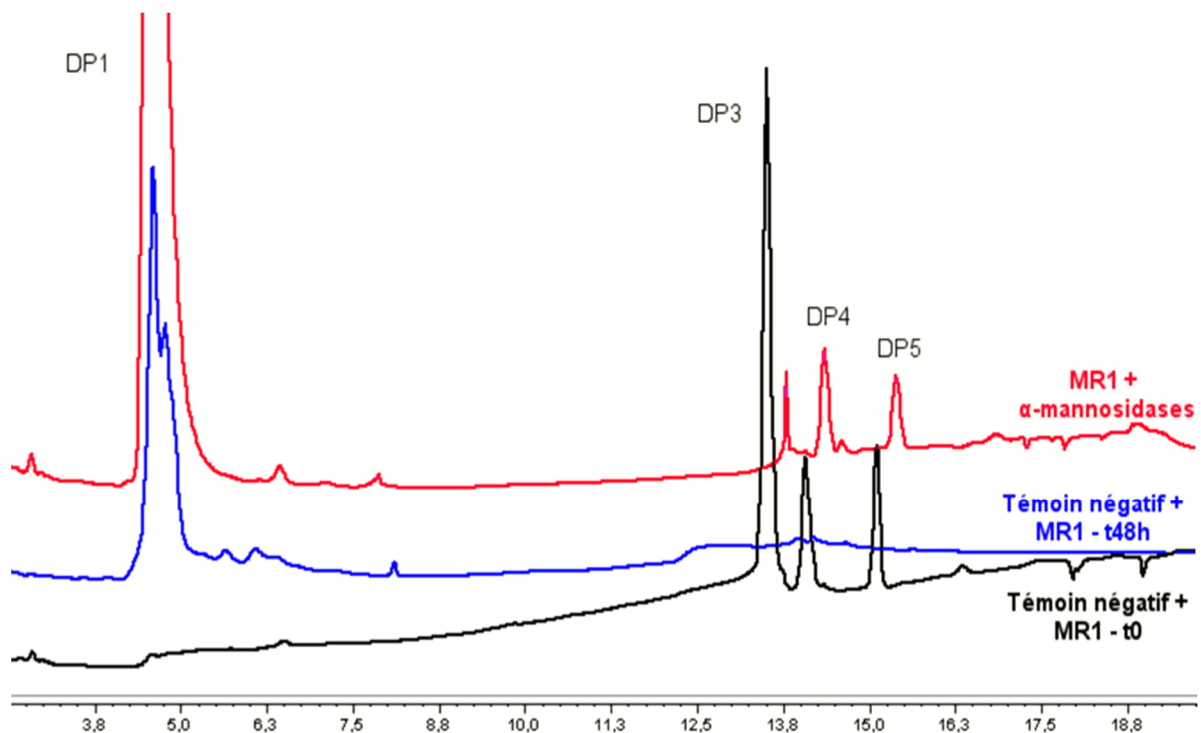


Figure 21 : Mise en évidence d'une activité mannosidasique intrinsèque chez *E. coli* grâce à l'HPAEC-PAD (High Performance Anion-Exchange Chromatography – Pulsed Amperometry Detection). DP : degré de polymérisation ; MR1 : milieu réactionnel issu de l'action de l'enzyme Bmt1 (produite dans *P. pastoris*) contenant du DP3 α , DP4 β et du DP5 $\beta\beta$; témoin négatif : extrait brut d'*E. coli* transformée par le plasmide codant pour la β -galactosidase. A t0 (en noir), le milieu MR1 présente bien 3 pics, DP3 étant le substrat de Bmt1, et DP4 et DP5 (ajout d'1 ou 2 mannose en β à l'extrémité du DP3) étant les produits résistants aux α -mannosidases (en rouge). Après 48h d'incubation à 28°C (en bleu), les 3 pics DP3, DP4 et DP5 ont disparu, mais un pic de DP1 est apparu.

Le passage chez *P. pastoris* va ainsi permettre de contourner plusieurs problèmes. Tout d'abord, la protéine d'intérêt surexprimée est excrétée par la levure dans le surnageant de culture.

Cette protéine est donc en quelque sorte pré-purifiée dès l'étape de surexpression. De plus, cela implique qu'il n'est plus nécessaire de casser les cellules pour en extraire la protéine d'intérêt (comme c'est le cas chez *E. coli*), évitant ainsi de contaminer le surnageant de culture par d'éventuelles enzymes pouvant soit dégrader la protéine surexprimée, soit entrer en conflit avec l'activité de cette dernière. Enfin, la production d'une protéine eucaryote dans un système eucaryote (*P. pastoris*) plutôt que procaryote (*E. coli*) présente notamment l'avantage de faciliter la mise en conformation ou encore les modifications post-traductionnelles de l'enzyme surexprimée. La production chez *P. pastoris* pourrait ainsi permettre de s'affranchir de l'utilisation de détergent pour solubiliser la protéine, ce qui peut s'avérer indispensable pour de futures études cristallographiques.

1.2.4 Clonage et surexpression dans *P. pastoris*

La première étape du clonage dans *P. pastoris* est le passage du gène d'intérêt dans le vecteur navette pPICZ α A puis la transformation par électroporation d'*E. coli* TOP10 F' électro-compétentes. Le but ensuite est de produire suffisamment de matériel (au moins 10 μ g) pour effectuer la transformation de la souche X33 de *P. pastoris* par pPICZ α A-BMT3 (et par pPICZ α A vide comme témoin négatif). Différentes concentrations en Zéocine sont employées lors de la culture sur milieu solide pour sélectionner le meilleur clone producteur.

Lors du passage dans le vecteur navette pPICZ α A, une séquence codant pour le signal de sécrétion α -factor de *S. cerevisiae* a été placée du côté N-terminal (afin de permettre l'expression de la protéine d'intérêt dans le milieu extracellulaire) et la protéine de fusion qui en résulte a été placée sous le contrôle du promoteur de l'alcool oxydase 1 (AOX1) inductible au méthanol (**Figure 22**).

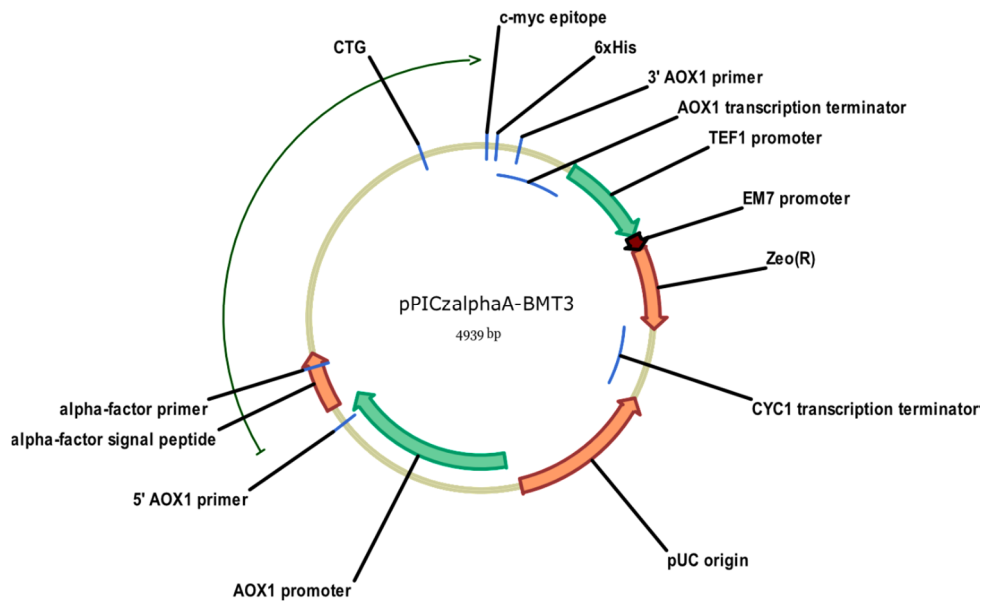


Figure 22 : Représentation du gène BMT3 inséré dans le vecteur pPICZαA pour son expression dans *P. pastoris*.

Contrairement à la forme recombinante exprimée chez *E. coli*, il n'y a plus ici d'étiquette 6xHis en N-terminal. L'étiquette présente en C-terminal sur le schéma en figure 22 se situe en aval du codon stop et n'est donc pas exprimée, ce qui explique la différence de masse moléculaire entre les formes recombinantes produites chez *E. coli* (57 kDa) ou *P. pastoris* (54 kDa). L'enzyme recombinante Bmt3, d'une masse moléculaire de 54 kDa, a été exprimée dans le milieu de culture. Aucune trace de cette protéine n'a été retrouvée dans le milieu de culture des cellules contrôles transformées par un vecteur vide (ne contenant pas le gène BMT3). Nous avons pu déterminer la concentration de Bmt3 dans le milieu de culture par mesure de la densitométrie observée sur gel SDS/PAGE. Nous avons ainsi estimé le taux de production de Bmt3 à environ 35 mg par litre de milieu de culture (**Figure 23**).

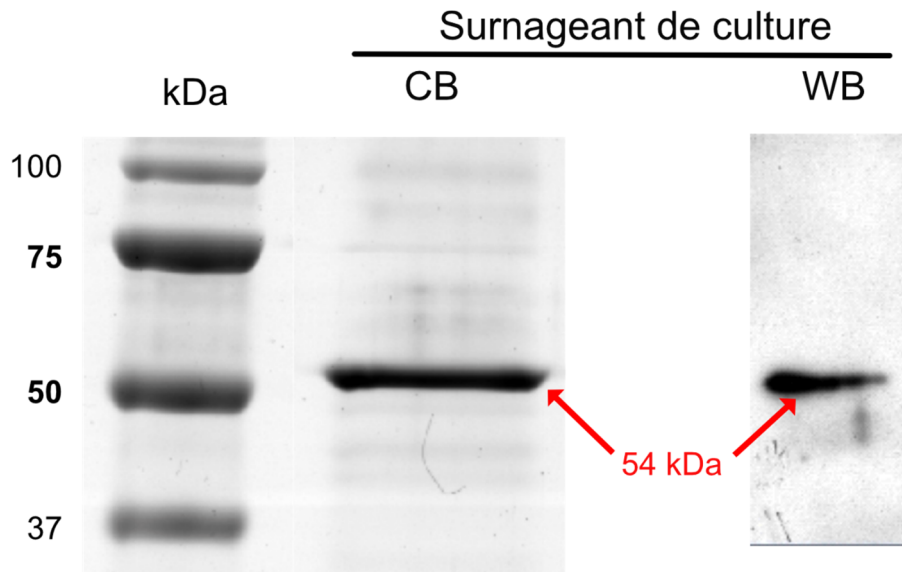


Figure 23 : Production de Bmt3 chez *P. pastoris*. Le surnageant de culture a été analysé par SDS/PAGE. Les protéines sont détectées par coloration au Bleu de Coomassie (CB) ou par Western blot grâce à un anticorps anti-Bmt3 (WB).

1.3 Solubilisation des enzymes recombinantes

Lors des précédentes études sur Bmt1, nous avons pu constater que pour rester soluble, l'enzyme recombinante exprimée dans le surnageant de culture nécessitait l'ajout de détergents : l'introduction de Tween 20 à 0.05% dans le milieu de culture au moment de l'induction, et surtout l'ajout de Triton X-100 à 0.5% à l'arrêt de l'expression. Cette nécessité est vraisemblablement due à la présence dans la séquence de CaBmt1, d'une région très hydrophobe au niveau du domaine catalytique C-terminal. En revanche, en analysant le profil d'hydrophobicité de CaBmt3, nous nous sommes aperçus que le domaine catalytique ne présentait pas de région hydrophobe (**Figure 24**).

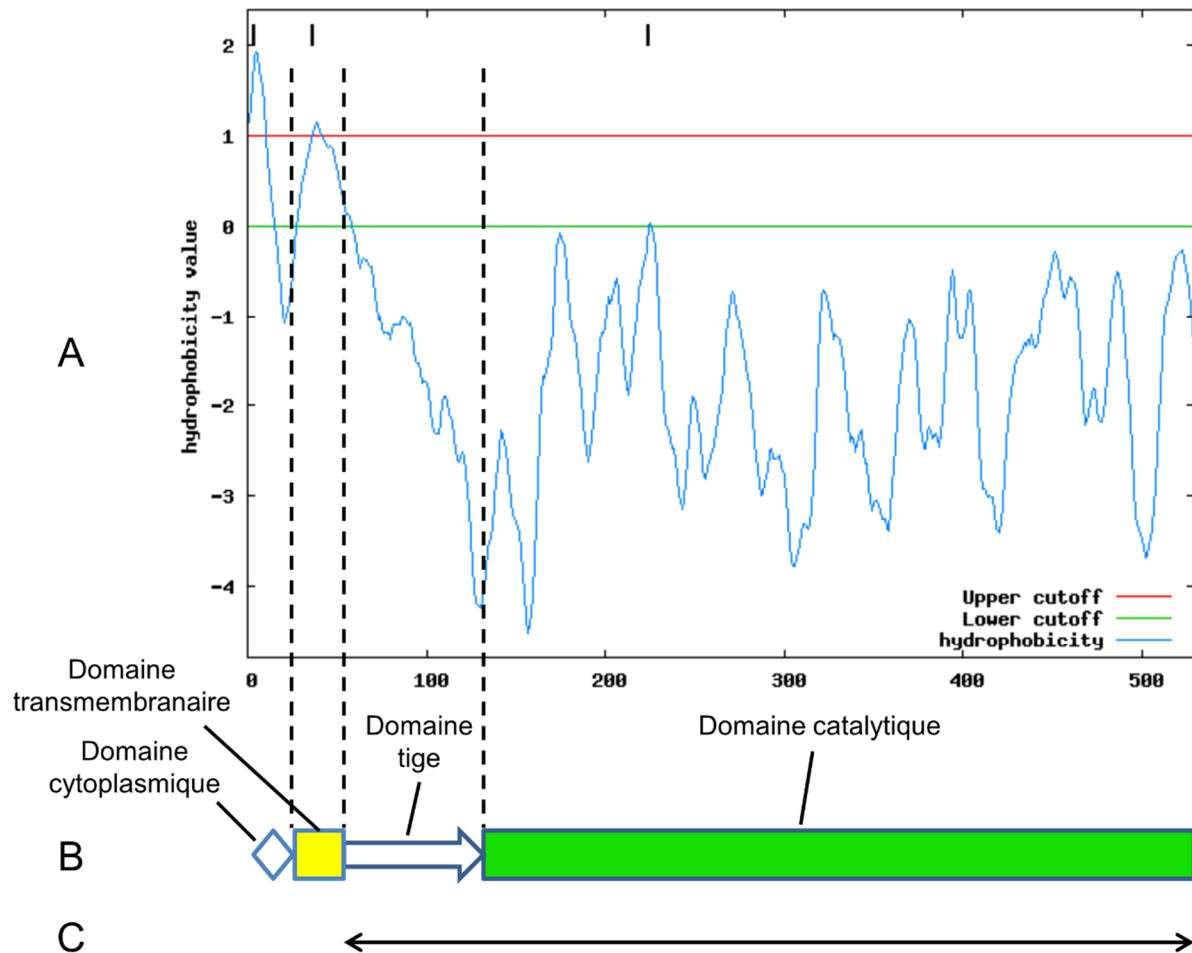


Figure 24 : Domaines fonctionnels de CaBmt3. **A** : profil d'hydrophobicité de la séquence complète de CaBmt3. **B** : domaines fonctionnels prédits de CaBmt3 (glycosyltransférase golgienne de type II). **C** : forme tronquée recombinante de Bmt3 telle qu'exprimée dans *P. pastoris*.

Ainsi, nous avons pu produire l'enzyme Bmt3 chez *P. pastoris* sans avoir besoin d'ajouter de détergent autre que le Tween 20 à 0.05% lors de l'induction. Nous avons visualisé cette différence de solubilité entre Bmt1 et Bmt3 par analyse DLS (Dynamic Light Scattering). Grâce à cette technique, nous pouvons mesurer la taille des particules dans une solution donnée. Nous avons donc analysé par DLS la taille des particules de Bmt1 puis de Bmt3, en absence ou en présence de Triton X-100 à 0.5%. En mode volume, nous constatons que sans détergent, Bmt1 forme des agrégats de 30 à 1000 nm de rayon (**Figure 25A**). Pour pouvoir atteindre des particules de rayon proche de 4 nm, qui est le rayon prédit pour un monomère de Bmt1, il faut donc ajouter du Triton X-100 à 0.5% (**Figure 25B**). Pour ce qui est de Bmt3, nous pouvons voir que même en absence de détergent, elle reste sous forme monomérique (5 nm de rayon

environ) (**Figure 25C**). Il est à noter que cette absence de détergent (mis à part le Tween 20 à 0.05%) ne modifie en rien l'activité de l'enzyme.

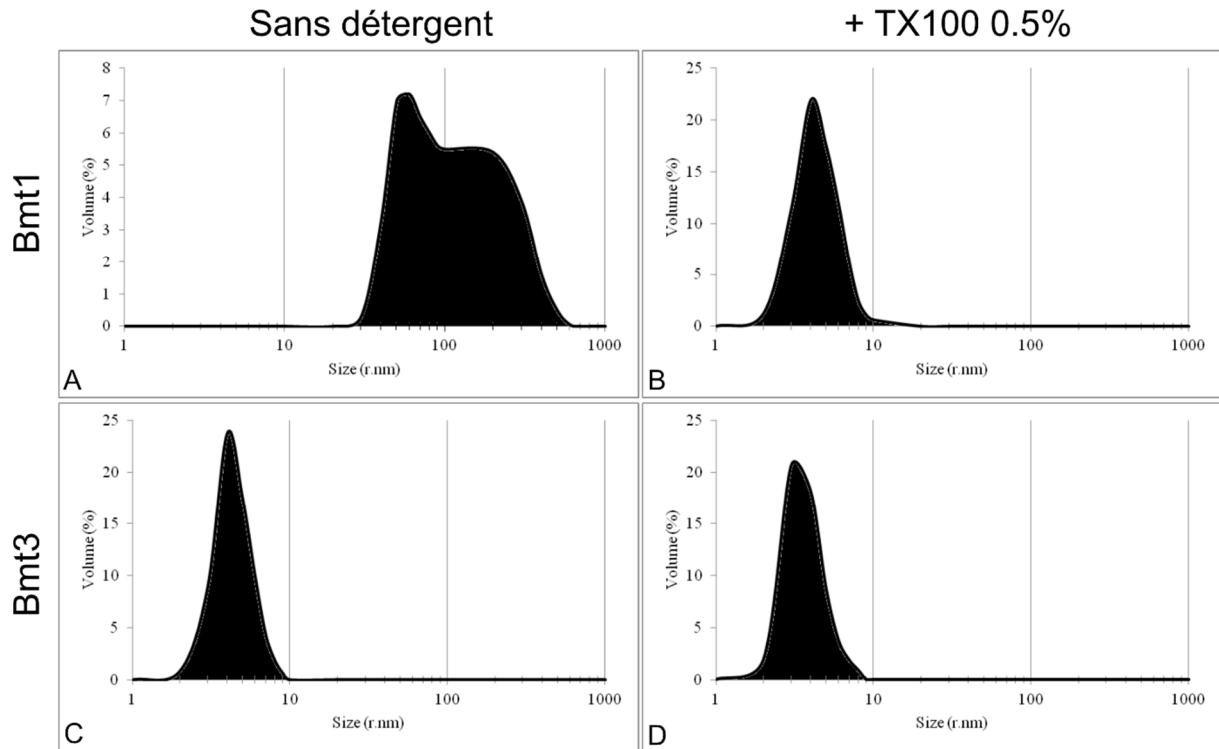


Figure 25 : Détermination de la taille des particules des enzymes recombinantes Bmt1 (**A** et **B**) et Bmt3 (**C** et **D**), en absence (**A** et **C**) ou en présence (**B** et **D**) de Triton X-100, par mesure DLS (Dynamic Light Scattering) en mode volume.

1.4 Détermination de l'activité enzymatique

1.4.1 Substrats accepteurs

Afin de caractériser l'activité enzymatique de Bmt3, dont le substrat donneur est le GDP-mannose, il a d'abord fallu établir tout un panel de substrats accepteurs potentiels, de tailles et de séquences très variées (de DP (degré de polymérisation) 1 à 4). Des α -oligomannosides naturels ont été préparés à partir de PPM isolés de *S. cerevisiae* ainsi que de la souche mutante *bmt1Δ* de *C. albicans*. Des β -Man ont également été purifiés à partir de la fraction acido-labile du PPM de cette même souche mutante *bmt1Δ*. Ces oligomannosides naturels ont pu être utilisés en l'état grâce à la technique d'HPAEC-PAD (High Performance Anion Exchange Chromatography – Pulsed Amperometry Detection), mais ils ont aussi été couplés à

un marqueur fluorescent (2-aminopyridine) pour pouvoir suivre la réaction par HPLC (High Performance Liquid Chromatography) à détection fluorimétrique. Enfin, trois composés marqués au mantyl (marqueur fluorescent) ont été produits par chimie de synthèse par l'équipe de Dr Jean-Maurice Mallet (ENS, Paris) : un trimannoside $\text{Man}\alpha 1\text{-}2\text{Man}\alpha 1\text{-}2\text{Man}\alpha 1\text{-}2\text{-Mantyl}$ (DP3M-a), un tétramannoside $\text{Man}\alpha 1\text{-}2\text{Man}\alpha 1\text{-}2\text{Man}\alpha 1\text{-}2\text{Man}\alpha\text{-Mantyl}$ (DP4M-a) (**Pourcelot *et al.* 2013**) et un tétramannoside $\text{Man}\beta 1\text{-}2\text{Man}\alpha 1\text{-}2\text{Man}\alpha 1\text{-}2\text{Man}\alpha\text{-Mantyl}$ (DP4M-b) (**Cattiaux *et al.* 2016**) contenant un résidu β -1,2-mannosyl à son extrémité non réductrice (**Figure 26**). Toutes ces étapes de production (hormis la synthèse proprement dite des composés mantylés), de purification et de caractérisation de ces substrats accepteurs ont été réalisées au sein de l'équipe par le Dr Ghenima Sfihi-Loualia au cours de ses travaux de thèse (**Sfihi-Loualia 2015**).

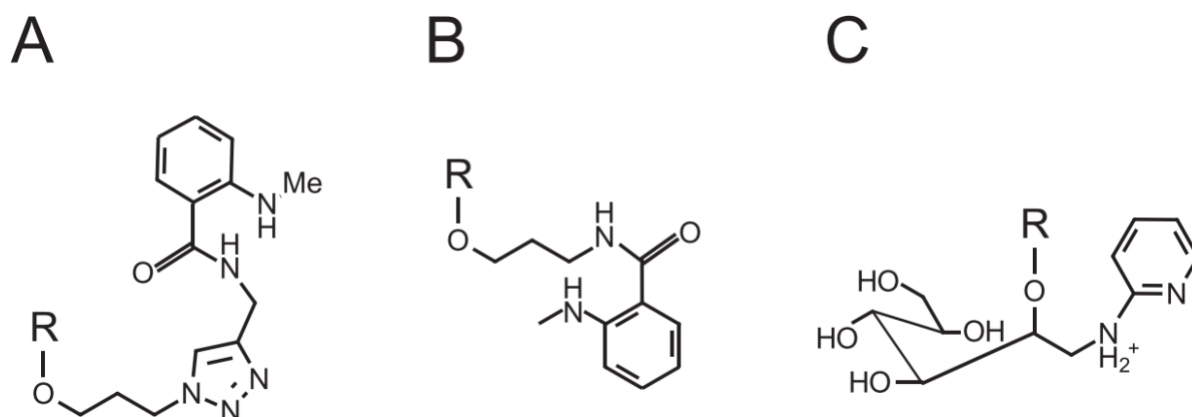


Figure 26 : Structure des différents substrats utilisés pour la caractérisation de Bmt3. **A** : α -oligomannosides synthétiques couplés au mantyl DP3M-a et DP4M-a. **B** : tétramannoside synthétique couplé au mantyl DP4M-b. **C** : oligomannosides issus du PPM couplés à la 2-aminopyridine. R = mannoside.

1.4.2 Réaction de Bmt3 sur des substrats courts

L'action de Bmt3 sur les substrats courts (DP1 à 3) non couplés a été étudiée par HPAEC-PAD. Concernant les substrats de DP1, nous avons employé du mannose (en équilibre anomérique), de l' α -1-O-méthylmannoside et de l' α/β -1-O-méthylmannoside (mélange obtenu par méthanolyse et contenant 10% d'anomère β). Afin de s'assurer que les signaux observés sur les chromatogrammes correspondent bien à l'ajout d'un résidu β -1,2-mannosyl par Bmt3 sur le substrat de départ, les produits formés avec l'ensemble de ces substrats ont été soumis à l'action d' α -mannosidases. Les résultats les plus significatifs ont été obtenus pour l' α/β -1-O-

méthylmannoside (**Figure 27**). En effet, selon les rapports d'aires de pics (produit résistant formé) / (substrat initial), nous avons obtenu un taux de production 4 fois supérieur à celui obtenu pour l' α -1-O-méthylmannose. Néanmoins, la présence de ce signal résistant aux α -mannosidases avec le substrat α -1-O-méthylmannose peut sembler aller à l'encontre de ce qui est attendu. En effet, Bmt3 n'est censée pouvoir agir que sur un substrat possédant à son extrémité non-réductrice un résidu mannosyl lié en β -1,2. Ceci peut s'expliquer par deux raisons complémentaires.

Tout d'abord, la forme recombinante Bmt3 a été exprimée chez *P. pastoris* et sécrétée dans le milieu de culture. A l'arrêt de l'expression, lors de la centrifugation pour récupérer le surnageant de culture contenant l'enzyme d'intérêt, il est possible qu'une fraction des cellules ait subi une lyse, libérant ainsi le contenu intracellulaire. Nous avons vu précédemment que *P. pastoris*, bien que non pathogène, était une levure présentant des motifs β -Man au niveau de sa paroi, et des gènes codant pour des β -1,2-mannosyltransférases y ont été mis en évidence. La présence dans le surnageant de culture d'une très faible proportion d'enzymes autre que l'enzyme surexprimée Bmt3 et possédant également une activité β -1,2-mannosyltransférase est donc envisageable.

La deuxième raison pouvant expliquer cette faible réaction avec un substrat lié en α tient à la durée d'incubation de 48h. Avec un temps de réaction aussi long, il apparaît plausible que la très faible quantité d'enzymes endogènes de *P. pastoris* ait été capable de catalyser l'ajout d'un résidu β -1,2-mannosyl sur l' α -1-O-méthylmannose, rendant ainsi le produit résistant aux α -mannosidases. L'activité de Bmt3 sur du Mannobiose ou Mannotriose liés en α -1,2 a également été testée par cette méthode et s'est révélée nulle.

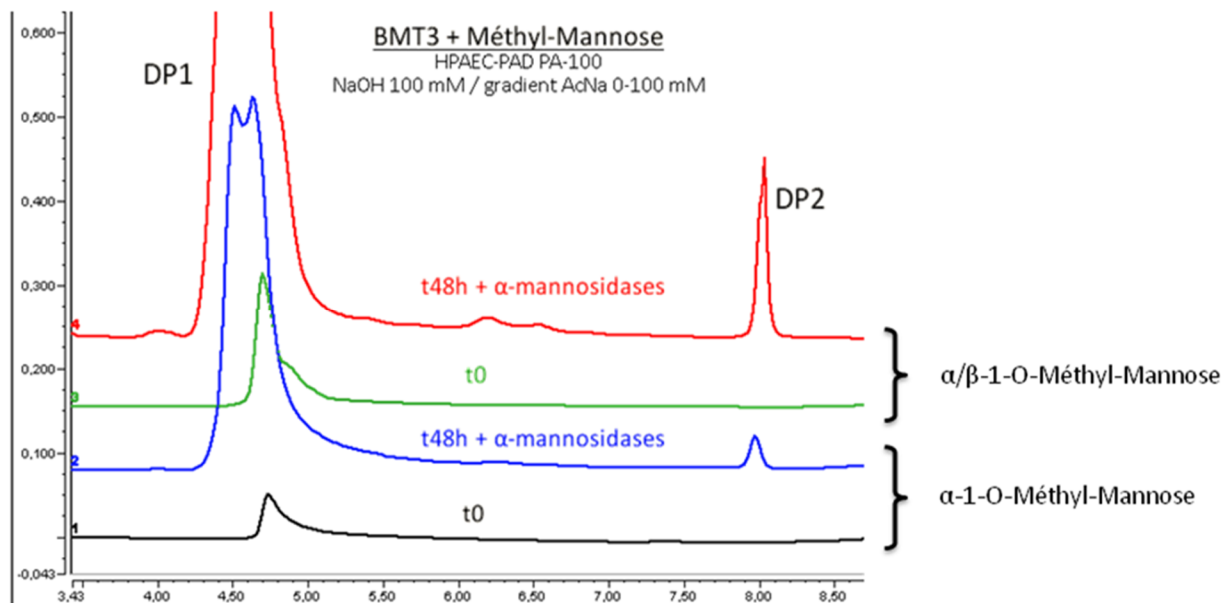


Figure 27 : Détection de l'activité de l'enzyme Bmt3 sur l' α -1-O-méthyl-mannose et sur l' α/β -1-O-méthyl-mannose grâce à la technique de l'HPAEC-PAD. Bmt3 ne réagit que très faiblement avec l' α -1-O-méthyl-mannose pour former du DP2, tandis qu'avec l' α/β -1-O-méthyl-mannose, une production 4 fois plus importante et résistante aux α -mannosidases est observée après 48h d'incubation. L'augmentation du pic de DP1 observée après 48h d'incubation et action des α -mannosidases (courbes rouge et bleue) par rapport au t0 (courbes verte et noire) est due à la libération importante de mannose en provenance du substrat donneur (GDP-Mannose) présent dans le milieu réactionnel et non visible sur le chromatogramme.

1.4.3 Action conjointe de Bmt1 et Bmt3

Les études menées précédemment sur les CaBmt nous ont conduits à formuler l'hypothèse que Bmt1 et Bmt3 pouvaient agir séquentiellement sur un oligomannoside lié en α -1,2 et ajouter ainsi deux résidus β -Man. Nous avons ainsi testé cette hypothèse en incubant ces deux enzymes, soit de manière séquentielle, soit de manière simultanée, en présence du substrat accepteur DP3M-a (Man α 1-2Man α 1-2Man-Mantyl). Par soucis de cohérence, nous avons utilisé les conditions standards de réaction décrites pour Bmt1 (28°C, pH 6.5) à différents temps d'incubation. La **figure 28A** correspond au t₀. Les produits de réaction formés ont ainsi été suivis par HPLC-Fluo. Après 48h d'incubation, Bmt1, en présence de DP3M-a et de son substrat donneur le GDP-mannose, a catalysé la formation de deux produits P1 (majoritaire) et P2 (minoritaire) résistants aux α -mannosidases (**Figure 28B**). La caractérisation de ces produits a été réalisée précédemment et montre qu'il s'agit comme attendu du DP3M-a coiffé d'un ou deux résidus β -Man, Bmt1 étant capable in vitro de rajouter

jusqu'à deux résidus β -Man sur son substrat (Fabre *et al.* 2014b). Après inactivation (100°C, 10 min), ce milieu réactionnel contenant P1 et P2 a été utilisé comme substrat accepteur pour Bmt3, toujours dans les conditions standards de réaction, le suivi se faisant là encore par HPLC-Fluo. Progressivement et dès 1h d'incubation, nous avons pu constater que la proportion du produit P2 augmentait, au détriment du produit P1, jusqu'à complète disparition du produit P1 au profit de P2 au bout de 48h (**Figure 28C**). Aucun signal supplémentaire pouvant correspondre à un troisième produit n'est apparu. P2 ne peut donc être utilisé comme un substrat par Bmt3. De manière similaire à ce qui a été observé par HPAEC-PAD, Bmt3 s'est également révélée incapable d'utiliser le DP3M-a comme substrat accepteur.

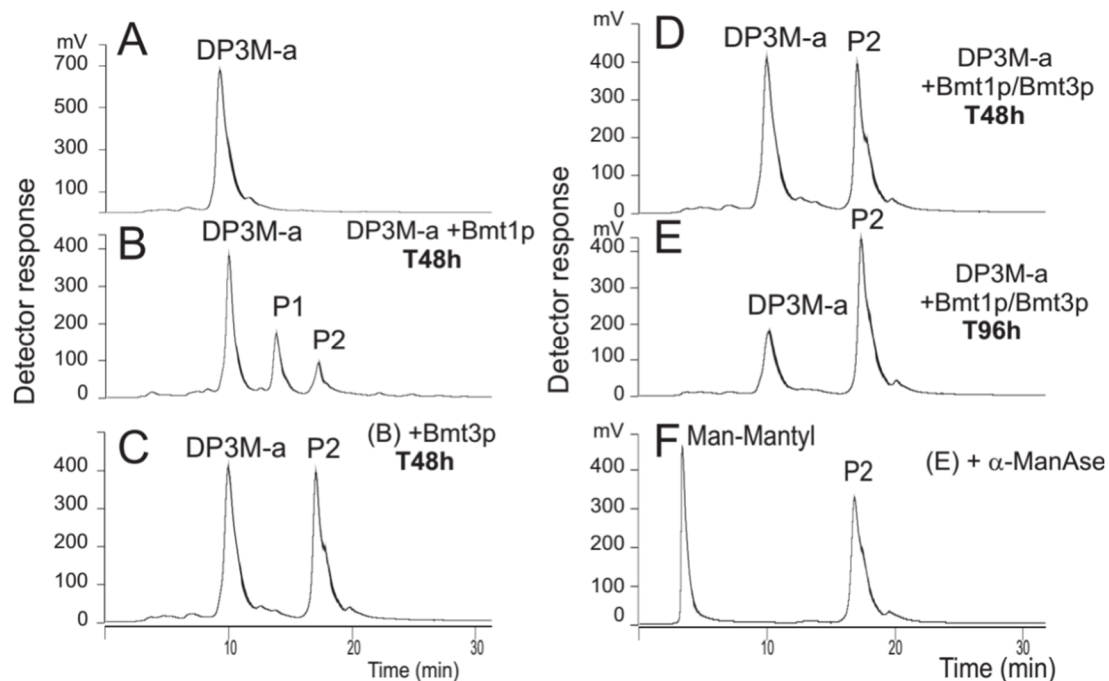


Figure 28 : Evaluation de l'activité β -mannosyltransférase de Bmt3 par HPLC à détection par fluorimétrie. Réaction des enzymes Bmt1 et Bmt3 sur le substrat accepteur DP3M-a de manière séquentielle (**A**, **B** et **C**) ou simultanée (**D**, **E** et **F**).

Nous avons aussi expérimenté une incubation simultanée de Bmt1 et Bmt3 avec le substrat DP3M-a. On retrouve là aussi une accumulation du produit P2 au bout de 48h, ce qui peut être expliqué par une utilisation immédiate de P1 par Bmt3 dès sa formation par Bmt1 (**Figure 28D**). Une incubation plus longue (96h) a également été effectuée, conduisant à une consommation accrue du substrat DP3M-a jusqu'à 75%

(**Figure 28E**). Nous avons enfin confirmé que le produit P2 accumulé était bel et bien résistant aux α -mannosidases (**Figure 28F**).

Afin de s'assurer que le produit P2 formé correspondait bien au produit attendu, des analyses en spectrométrie de masse en mode MALDI-TOF ainsi que des analyses RMN ont été menées au sein de l'équipe (**Figures 29 et 30**). Il a été établi que ce produit P2 était un pentamannoside $\text{Man}\beta 1-2\text{Man}\beta 1-2\text{Man}\alpha 1-2\text{Man}\alpha 1-2\text{Man}\alpha$ -Mantyl, montrant ainsi qu'une incubation commune en présence d'une chaîne d' α -mannane conduisait à l'ajout par Bmt1 d'un premier résidu β -Man, tandis que Bmt3 transférait un second β -Man à sa suite, pour former au final un motif $\text{Man}\beta 1-2\text{Man}\beta 1-2\text{Man}\alpha 1-2[\text{Man}\alpha 1-2]_n$.

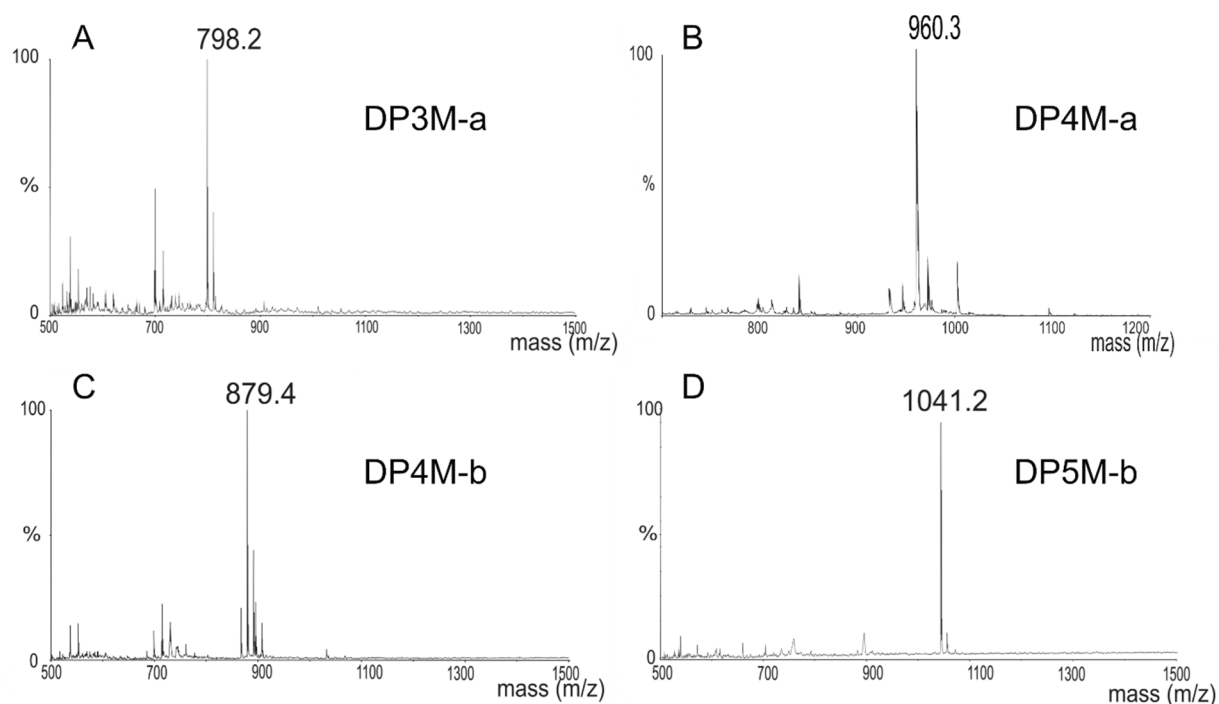


Figure 29 : Analyse en spectrométrie de masse MALDI-TOF des substrats et produits de réaction de Bmt1 et Bmt3. **A** : substrat DP3M-a. **B** : substrat DP4M-a. **C** : substrat DP4M-b. **D** : produit de réaction DP5M-b résultant de l'action de Bmt3 sur DP4M-b. Les spectres représentent les adduits $[M + \text{Na}]^+$.

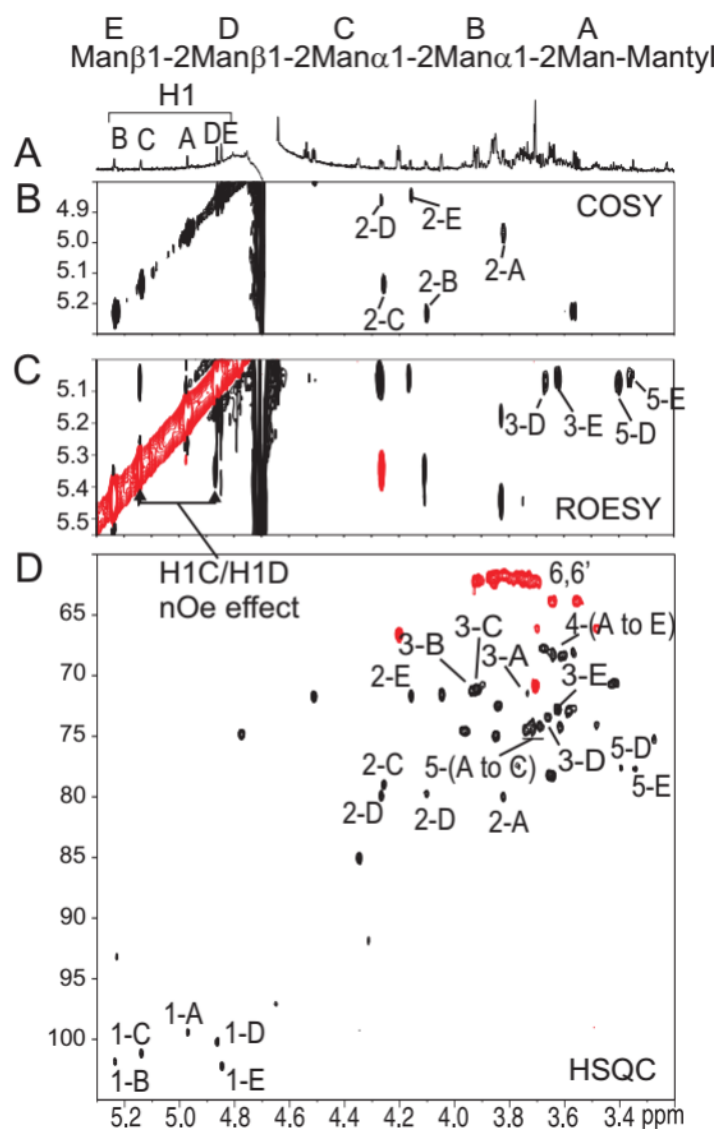


Figure 30 : Analyse RMN du produit de réaction P2. **A** : spectre RMN ^1H . **B** : spectre COSY ^1H - ^1H . **C** : spectre ROESY ^1H - ^1H . **D** : spectre HSQC ^1H - ^{13}C .

1.5 Paramètres enzymatiques

La détermination des paramètres enzymatiques de Bmt3 a nécessité la synthèse d'un substrat accepteur susceptible d'être spécifique à cette enzyme. Sur la base des résultats précédents, ainsi que sur les travaux plus anciens de génétique inverse (**Mille *et al.* 2008**), le composé de synthèse DP4M-b a été produit grâce à la collaboration avec l'équipe du Dr Jean-Maurice Mallet (ENS Paris). La synthèse de ce composé a fait l'objet d'une publication (**Cattiaux *et al.* 2016**).

L'incubation de Bmt3, dans les conditions standards déterminées lors de la caractérisation de Bmt1, en présence du substrat accepteur DP4M-b et du substrat donneur GDP-mannose, a permis la formation très rapide (dès 10 minutes) d'un seul produit détecté par HPLC-Fluo et d'un temps de rétention supérieur au substrat que nous appellerons DP5M-b (**Figure 31**). Résistant aux α -mannosidases, son analyse en spectrométrie de masse MALDI-TOF a confirmé qu'il s'agissait bien d'un pentahexose couplé au mantyl (**Figure 29D**). Bien que l'analyse RMN se soit révélée infructueuse étant donné les faibles quantités de produit récoltées, il est très vraisemblable que Bmt3 ait transféré un résidu β -Man sur le substrat DP4M-b, comme il avait pu le faire sur le substrat P1 auparavant.

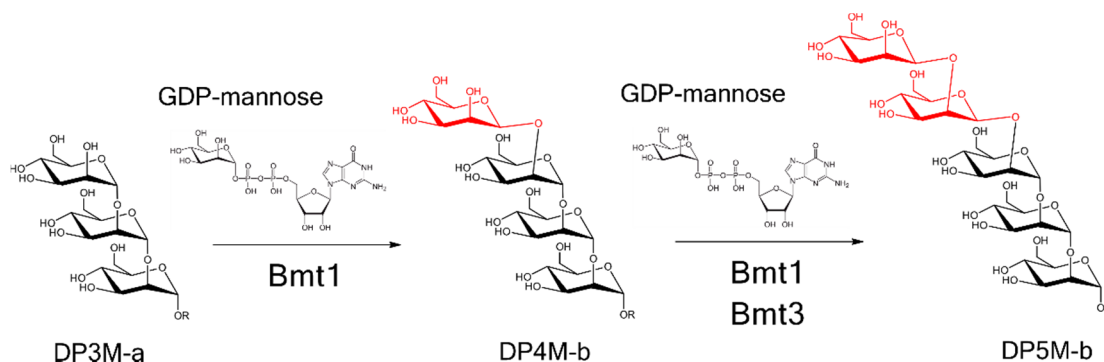


Figure 31 : Représentation des réactions enzymatiques de Bmt1 et Bmt3 sur leurs substrats accepteurs DP3M-a et DP4M-b en présence de GDP-mannose, avec la formation du produit final DP5M-b. R = groupement mantyl.

Un suivi cinétique de la réaction sur un total de 3h à 28°C a permis de déterminer une vitesse de catalyse pour Bmt3 d'environ 7 $\mu\text{mol/h}$ par mg de protéine (**Figure 32A**). Le contrôle négatif, le surnageant de *P. pastoris* transformé par un vecteur vide, n'a montré aucune activité mannosyltransférase sur le substrat DP4M-b dans des conditions de réaction identiques. Il est intéressant de remarquer que la vitesse de catalyse de Bmt3 est largement supérieure à celle observée pour Bmt1. En effet, celle-ci avait été estimée à 40 nmol/h par mg de protéine (Fabre *et al.* 2014b), ce qui correspond à une augmentation d'un facteur de plus de 100 pour Bmt3.

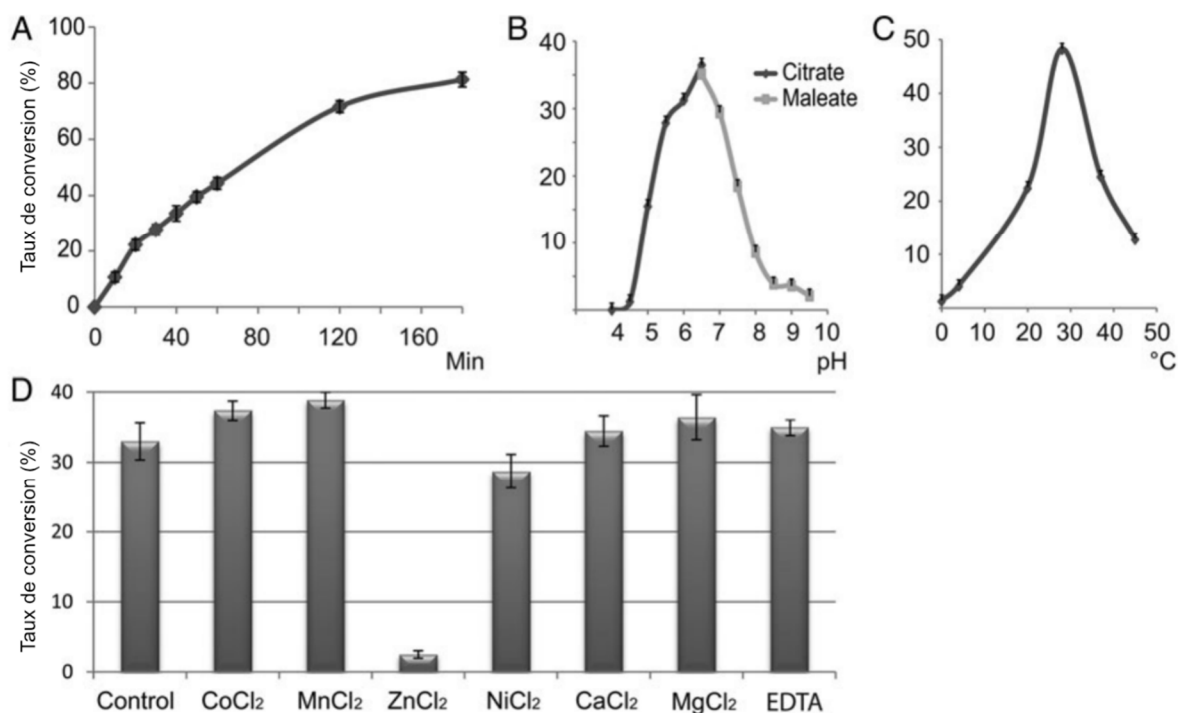


Figure 32 : Détermination des paramètres enzymatiques de Bmt3 sur le substrat DP4M-b. **A** : cinétique de formation du produit DP5M-b, exprimée en pourcentage de conversion du substrat. **B** : effets du pH à 28°C. **C** : effets de la température dans le tampon citrate pH 6.5. **D** : effets des cations divalents et de l'EDTA (20 mM) à 28°C, pH 6.5.

Les conditions optimales de réaction ont été déterminées avec le substrat DP4M-b. Trois paramètres ont ainsi été étudiés indépendamment les uns des autres : le pH, la température et les cations divalents métalliques. Les effets du pH ont été analysés grâce à deux tampons : i) citrate de sodium/acide citrique à 100 mM entre pH 4 et pH 6.5 et ii) Tris/maléate à 100 mM entre pH 6.5 et pH 9.5. Le maximum d'activité a été atteint à pH 6.5 (**Figure 32B**). L'étude des effets de la température a montré que Bmt3 présentait une activité maximale à 28°C (**Figure 32C**). Ces deux paramètres sont équivalents à ce qui a été observé pour Bmt1. Enfin, l'effet des cations divalents Co^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Ca^{2+} and Mg^{2+} sur l'activité de Bmt3 a été analysé (**Figure 32D**). Globalement, les cations divalents n'ont pas d'effet notable sur l'activité de Bmt3, à l'exception du Ni^{2+} (très légère inhibition) et du Zn^{2+} (inhibition complète). L'EDTA n'a également eu aucun effet sur l'activité. Nous pouvons donc en conclure que Bmt3 n'a vraisemblablement pas besoin de cation divalent pour catalyser sa réaction de transfert. L'effet négligeable du Ni^{2+} sur Bmt3 est intéressant dans l'optique d'une purification IMAC (Immobilized Metal ion Affinity Chromatography).

1.6 Spécificité de substrat

Nous connaissons donc dorénavant les paramètres optimaux de réaction de Bmt3 : 30 min, à 28°C, pH 6.5, en présence de CaCl₂ à 20 mM. Afin de déterminer avec précision la spécificité de substrat de cette enzyme, nous avons utilisé le panel de substrats potentiels à notre disposition (**Tableau 3**). Les résultats nous montrent qu'un seul type de substrat (DP4 $\alpha\beta$) permet l'obtention d'un produit suite à l'action de Bmt3. Si l'oligosaccharide ne présente que des liaisons α -1,2 (DP2 α , DP3 α , DP4 α 2), Bmt3 est incapable de l'utiliser comme substrat. S'il présente à son extrémité non-réductrice une liaison α -1,3 plutôt que α -1,2 (DP4 α 3), aucune réaction n'est observée. Si à l'inverse toutes les liaisons sont en β -1,2 (DP2 β , DP4 β 2), là encore toujours aucune réaction. Nous pouvons donc dire qu'*in vitro*, Bmt3 nécessite la présence d'un motif Man β 1-2Man α du côté de l'extrémité non-réductrice afin de pouvoir catalyser le transfert d'un résidu β -1,2-mannosyl.

Tableau 3 : Activité de Bmt3 sur différents oligomannosides marqués (exprimée en pourcentage de substrat consommé).

1 : dérivation par la 2-aminopyridine ; 2 : dérivation par le mantyl

| Oligomannoside | Substrat | Structure | Activité (%) |
|---|--------------------------------|---|--------------|
| α -1,2-mannobiose | DP2 α ¹ | Ma1-2 M | 0% |
| β -1,2-mannobiose | DP2 β ¹ | M β 1-2 M | 0% |
| α -1,2-mannotriose | DP3 α ^{1,2} | Ma1-2 Ma1-2 M | 0% |
| α -1,2-mannotétraose | DP4 α 2 ^{1,2} | Ma1-2 Ma1-2 Ma1-2 M | 0% |
| α -1,3-mannosyl- α -1,2-mannotriose | DP4 α 3 ¹ | Ma1-3 Ma1-2 Ma1-2 M | 0% |
| β -1,2-mannotétraose | DP4 β 2 ¹ | M β 1-2 M β 1-2 M β 1-2 M | 0% |
| β -1,2-mannosyl- α -1,2-mannotriose | DP4 $\alpha\beta$ ² | M β 1-2 Ma1-2 Ma1-2 M | ~ 35% |

1.7 Activité sur une mannoprotéine endogène de *C. albicans*

Nous avons vu que l'action combinée de Bmt1 et Bmt3 est capable d'entraîner la β -mannosylation d'oligomannosides liés en α -1,2 et générer ainsi des épitopes Man β 1-2Man β 1-2[Man α 1-2]_n. Nous avons voulu étendre l'investigation aux glycoprotéines. Pour cela, nous avons utilisé la forme recombinante de la mannoprotéine pariétale d'adhésion de *C. albicans*, Hwp1. Surexprimées sous une

forme soluble dans une souche sauvage (Hwp1pWT) ou dans une souche mutante délétée de son gène BMT1 (Hwp1pbmt1Δ), elles ont été mises en présence de Bmt1 et Bmt3 dans les conditions standards de réaction (**Figure 33**).

Hwp1pWT et Hwp1pbmt1Δ sont toutes deux reconnues, autour de 60 et 50 kDa respectivement, par la lectine Concanavaleine A (ConA), spécifique de résidus α-D-mannosyl terminaux (pistes 1 et 2). La différence de migration électrophorétique observée peut s'expliquer par une mannosylation moindre de Hwp1pbmt1Δ due à un défaut de β-mannosylation (car produite dans une souche ne possédant pas l'enzyme d'initiation CaBmt1). Ces mannoprotéines ont également été exposées à l'anticorps monoclonal (MAb) B6.1 spécifique des β-Man (pistes 7 et 8). Nous pouvons constater que seule Hwp1pWT a été reconnue par MAb B6.1, ce qui confirme l'absence de β-mannosylation sur Hwp1pbmt1Δ. Des cinétiques d'incubation (12 et 48h) de Hwp1pbmt1Δ en présence de Bmt1 et Bmt3 n'ont pas montré de modification notable de la glycoprotéine reconnue par la ConA aux alentours de 50 kDa (pistes 5 et 6). En revanche, ces incubations ont entraîné l'apparition spécifique de bandes aux alentours de 50 kDa reconnue par MAb B6.1 (pistes 11 et 12), alors que rien n'est reconnu dans cette zone par MAb B6.1 lorsque Hwp1pbmt1Δ ou Bmt1/Bmt3 sont incubés seuls (piste 8, 9 et 10). Les signaux les plus intenses ont été obtenus après 48h d'incubation. Les bandes fortement détectées vers 40 et 70 kDa par MAb B6.1 (pistes 9 à 12) correspondent à des mannoprotéines β-mannosylées endogènes présentes dans le surnageant de *P. pastoris*.

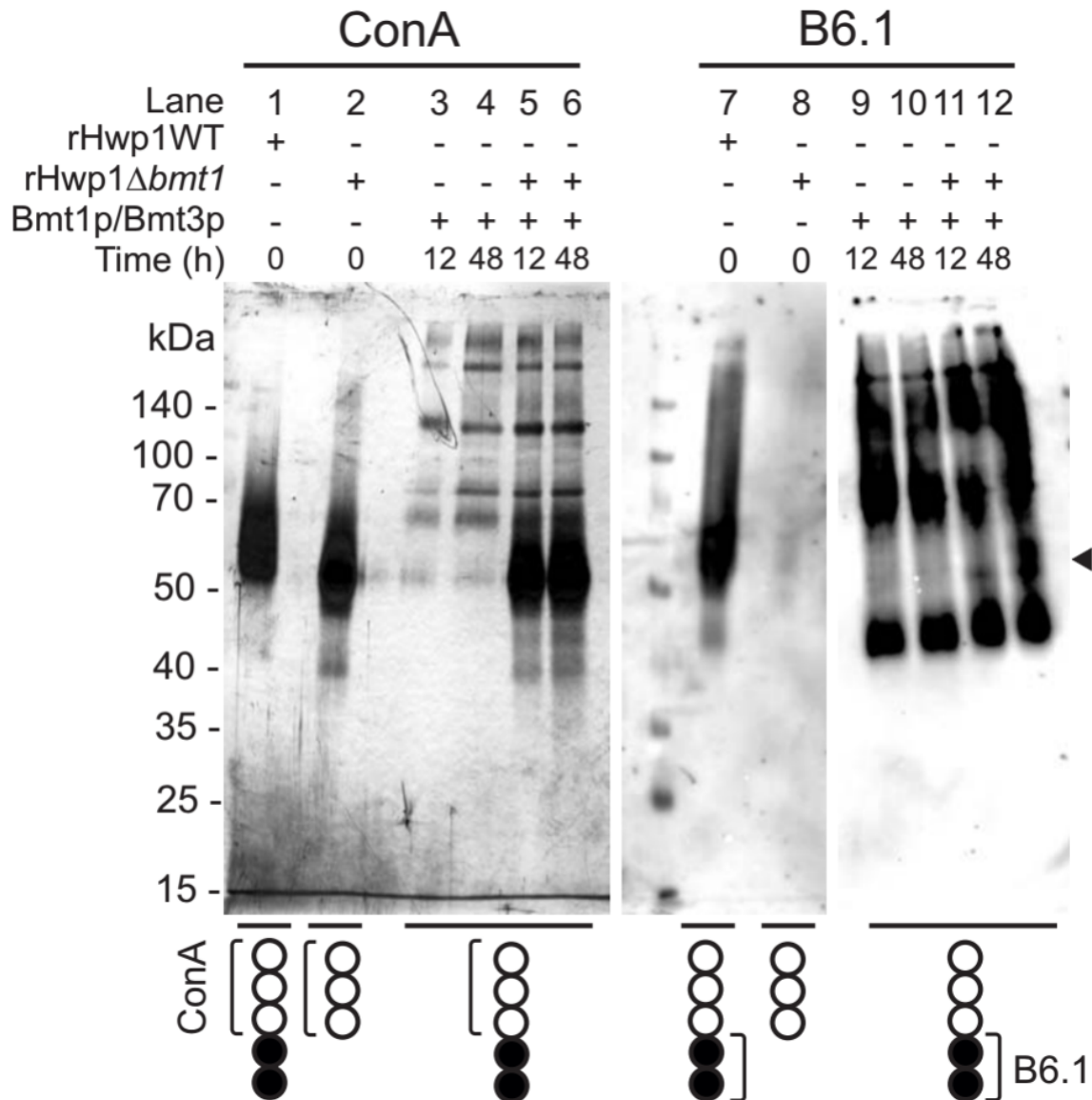


Figure 33 : β -mannosylation de la protéine recombinante Hwp1 exprimée dans une souche sauvage (Hwp1pWT) ou délétée de son gène BMT1 (Hwp1pbmt1 Δ) de *C. albicans*.

Nous avons ainsi montré que les enzymes recombinantes Bmt1 et Bmt3 étaient capables de β -mannosyler des mannoprotéines endogènes de *C. albicans*.

2 Effets des iminosucres

2.1 Iminosucres : inhibiteurs de glycosidases... et de glycosyltransférases ?

Les iminosucres monovalents ont depuis longtemps été étudiés comme inhibiteurs de glycosidases (**Lillelund et al. 2002**). Deux d'entre eux nous concernent plus particulièrement. Le déoxynojirimycine (DNJ) et le déoxymannojirimycine (DMJ) sont connus pour être des inhibiteurs puissants des α -glucosidases et des α -mannosidases, et disposent d'un spectre d'action relativement large. Ils présentent néanmoins quelques spécificités vis-à-vis de certaines enzymes. Ainsi, le DMJ inhibe *in vitro* l'action de la mannosidase I golgienne, mais n'a aucun effet sur l' α -mannosidase du réticulum endoplasmique (**Bischoff & Kornfeld 1984**).

Par ailleurs, la notion de multivalence est apparue récemment lors de l'élaboration de composés visant l'inhibition d'enzymes catalysant des réactions glycosidiques (**Compain & Bodlener 2014; Gouin 2014; Kanfar et al. 2015**). Dans cette optique, des iminosucres ont été greffés en grand nombre sur diverses structures pour former des inhibiteurs multivalents. Ceux-ci se sont avérés beaucoup plus efficaces, à molarité équivalente, que leurs analogues monovalents. Des travaux récents ont été menés pour étudier les effets de composés polymériques à base de DMJ et de DNJ sur plusieurs glycoside-hydrolases (**Brissonnet et al. 2015**). Il a ainsi été montré que ces iminosucres polyvalents étaient non seulement capables d'inhiber ces enzymes, mais également d'améliorer l'activité de certaines d'entre elles. De plus, d'autres travaux ont montré que le pouvoir inhibiteur des iminosucres ne se limitait pas seulement aux glycosidases, mais qu'ils pouvaient également agir sur les glycosyltransférases (**Qiao et al. 1996; Durka et al. 2012; Lee et al. 2012**). Pour toutes ces raisons, il nous est apparu intéressant d'étudier, grâce à une collaboration avec l'équipe du Dr Sébastien Gouin (CEISAM, Nantes) les effets de ces iminosucres DMJ et DNJ, sous différentes formes (monovalente, tétravalente et polyvalente), sur les activités des deux β -1,2-mannosyltransférases Bmt1 et Bmt3 caractérisées au sein de l'équipe.

2.2 Iminosucre utilisés

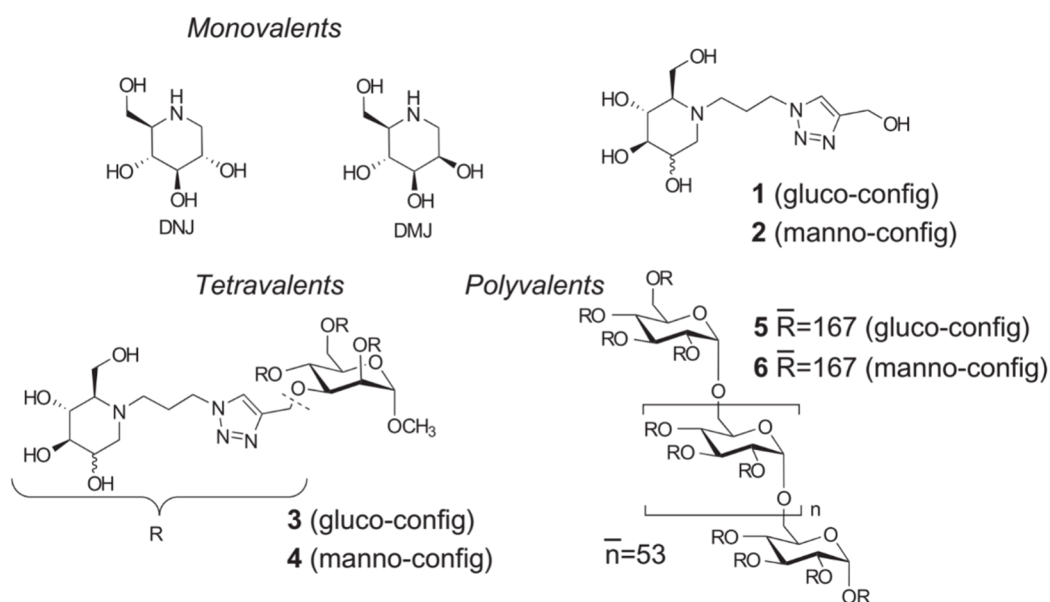


Figure 34 : Représentations schématiques des iminosucre de synthèse monovalents, multivalents et polyvalents utilisés avec Bmt1 et Bmt3.

La synthèse chimique de ces différents composés a été réalisée par l'équipe du Dr Sébastien Gouin. Brièvement, les iminosucre ont été activés par une fonction azoture puis transférés sur une fonction alcyne par cyclisation au cuivre. Les formes polyvalentes ont été synthétisées par fonctionnalisation d'un dextrane d'origine commerciale d'environ 55 unités de glucose liées à 95% en α -1,6. L'intégralité des groupements hydroxyl libres ont ainsi été fonctionnalisés soit avec le DMJ, soit avec le DNJ, pour obtenir au final une structure polymérique présentant environ 167 unités iminosucre (**Figure 34**).

2.3 Effets des iminosucre monovalents et multivalents sur les activités de Bmt1 et Bmt3

Comme cela a été détaillé précédemment, les activités enzymatiques des protéines recombinantes Bmt1 et Bmt3 ont été caractérisées. *In vitro*, Bmt1 catalyse le transfert successif de deux résidus β -Man sur son substrat DP3M-a et forme deux produits P1 (DP4M-b) et P2 (DP5M-b), tandis que Bmt3 ajoute un résidu β -Man sur son substrat DP4M-b et forme un seul produit P2 (DP5M-b) (**Figure 31**).

Pour évaluer les effets des différents composés iminosucres sur ces enzymes, les activités respectives de Bmt1 et Bmt3 ont été mesurées dans les conditions standards décrites précédemment, les milieux réactionnels sans aucun iminosucre étant considérés comme contrôles. Ces composés iminosucres mono- (DNJ, DMJ, **1** et **2**), tétra- (**4**) et polyvalents (**5** et **6**) ont été utilisés à différentes concentrations, de 0.1 à 20 mM. L'avancement des réactions a été suivi par HPLC-Fluo, par quantification des produits formés. Chacune des réactions avec iminosucre a été rapportée au résultat de la réaction contrôle (sans iminosucre) (**Figure 35**). Il est apparu assez rapidement que la majorité des composés, même à la concentration très élevée de 20 mM, n'ont que très peu d'effet sur les activités de Bmt1 et Bmt3, voire aucun. Seul le composé **1** inhibe l'action de Bmt1 sur son substrat DP3M-a, jusqu'à 95% à 20 mM, avec une valeur d'IC₅₀ de 5 mM. Nous avons également voulu vérifier si la longueur de chaîne du substrat pouvait influencer sur l'effet inhibiteur du composé **1** sur Bmt1. Il apparaît que sur un substrat de DP supérieur (DP4M-a : Man α 1-2Man α 1-2Man α 1-2Man α -Mantyl), Bmt1 est également inhibée par le composé **1** (**Figure 36**).

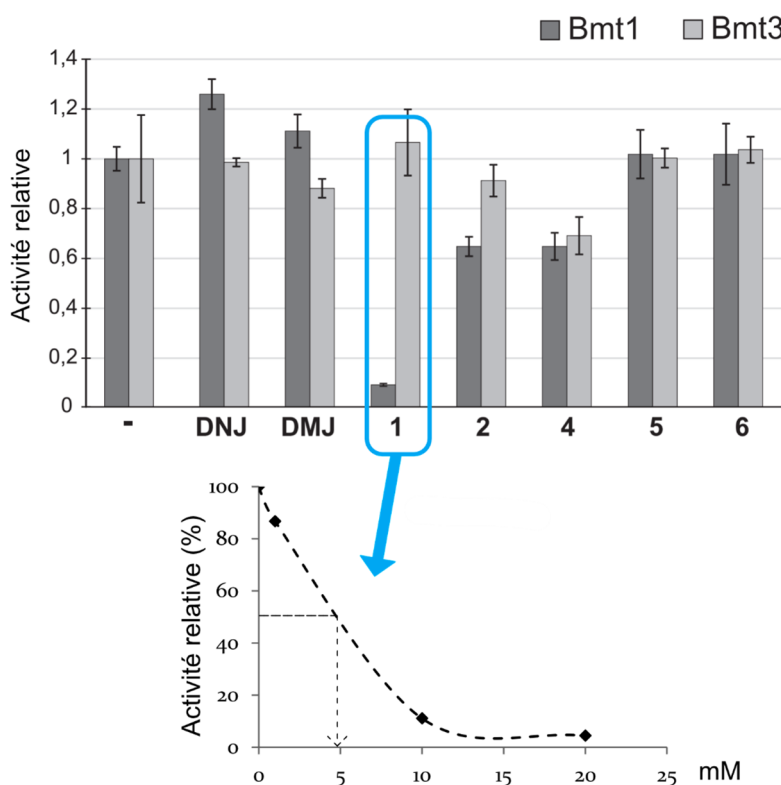


Figure 35 : Effets des différents composés iminosucres (à 20 mM) sur les activités de Bmt1 et Bmt3.

En analysant plus en détail ces résultats, nous pouvons dégager plusieurs enseignements. Les différentes caractéristiques structurales de chaque composé ont chacune un impact sur l'effet inhibiteur, que ce soit la présence d'un noyau triazole, la nature de l'épimère (configuration mannose ou glucose), ou encore la structure et la valence des composés multivalents. Pour ce qui est du noyau triazole greffé au monomère (composés **1** et **2**), il suffit de constater que l'effet inhibiteur observé avec le composé **1** disparaît complètement avec le DNJ. Cet effet n'est néanmoins que partiellement conservé avec le composé **2** disposant d'une configuration mannose, ce qui illustre l'influence de la configuration épimérique dans l'effet inhibiteur. Enfin, la différence de structure et de valence entre les composés **4** et **6** se traduit par une différence dans l'effet inhibiteur.

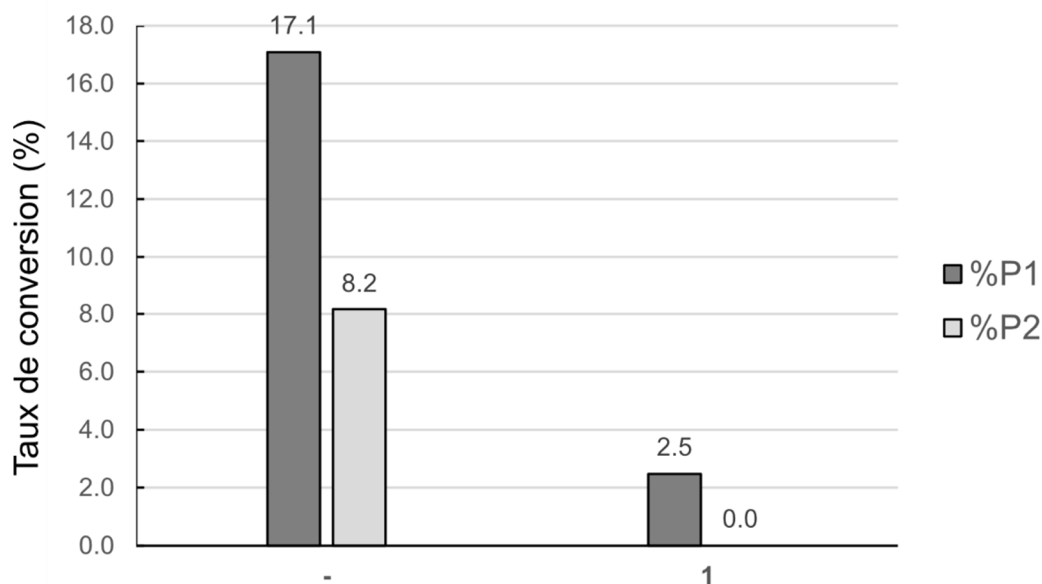


Figure 36 : Effet du composé **1** à la concentration de 20 mM sur la formation des produits P1 et P2 par l'action de Bmt1 sur son substrat DP4M-a.

Mis bout à bout, tous ces éléments montrent qu'une interaction, certes faible, existe entre le composé **1** et Bmt1 et qu'elle semble être dépendante à la fois de la partie « iminosucre » et du noyau triazole qui y est greffé. Les autres composés dérivés du DMJ et du DNJ n'ont montré qu'une influence marginale sur l'activité de Bmt1 et Bmt3.

2.4 Modulation de la spécificité de réaction de Bmt1

Nous savons que l'action *in vitro* de Bmt1 sur son substrat conduit à la formation de deux produits P1 et P2. Etant donné l'effet plus marqué des iminosucres sur Bmt1, nous avons voulu savoir si ceux-ci étaient capables d'orienter la formation d'un produit plutôt que l'autre (**Tableau 4**). En conditions standards, sans iminosucre, Bmt1 catalyse la conversion de 54% du substrat de départ DP3M-a en P1 (17.5%) et P2 (36.5%), avec une vitesse de réaction de 30 nmol/h par mg de protéine. En présence du composé **1**, Bmt1 ne convertit plus que 5% du substrat, pour une vitesse de réaction de 2.5 nmol/h par mg de protéine, soit une réduction d'un facteur 12. Cependant, si l'on observe la proportion P1/P2 qui traduit le tropisme de catalyse de Bmt1, on s'aperçoit qu'elle reste sensiblement la même avec ou sans composé **1** (0.67 contre 0.48 pour le contrôle). Autrement dit, Bmt1 forme jusqu'à deux fois plus de P2 que de P1 après 48h d'incubation, même en présence du composé **1**. *A contrario*, les dérivés mono- et polyvalents **2**, **4** et **6** modulent clairement la proportion P1/P2 au bénéfice de P1. En particulier, les composés **2** et **4** conduisent à la formation d'une très grande majorité de P1 (P1/P2 égal à 17.5 et 7.5 respectivement). Les composés **5** et **6** quant à eux n'orientent pas aussi spécifiquement la réaction vers la formation de P1 (P1/P2 = 2.11 et 5.22 respectivement), mais on peut noter qu'ils entraînent un taux de conversion global accru (56% du substrat est consommé) avec des taux de formation de P1 les plus élevés (38% et 47%, respectivement).

Tableau 4 : Effets des différents composés iminosucres sur la spécificité de Bmt1, à partir du substrat accepteur DP3M-a. P1 (Man β 1-2Man α 1-2Man α 1-2Man α -Mantyl) et P2 (Man β 1-2Man β 1-2Man α 1-2Man α 1-2Man α -Mantyl) sont les deux produits de réaction. %P1 et %P2 représentent le pourcentage de conversion du substrat accepteur en produits P1 et P2 respectivement. sd, déviation standard calculée à partir de trois réactions indépendantes.

| | % P1 (sd) | % P2 (sd) | P1/P2 |
|------------|------------|------------|-------|
| - | 17.5 (5.4) | 36.5 (1.4) | 0.48 |
| DNJ | 25 (2.5) | 42 (1) | 0.60 |
| DMJ | 24 (3) | 37 (1.5) | 0.65 |
| 1 | 2 (0.5) | 3 (0.5) | 0.67 |
| 2 | 35 (3) | 2 (1.5) | 17.50 |
| 4 | 30 (4) | 4 (2.5) | 7.50 |
| 5 | 38 (4) | 18 (2) | 2.11 |
| 6 | 47 (4.5) | 9 (2.5) | 5.22 |

Ces composés sont donc non seulement capables d'améliorer l'efficacité de transfert d'un résidu β -1,2-mannosyl sur le DP3M-a par Bmt1, mais également d'inhiber le transfert d'un second résidu β -1,2-mannosyl sur le premier produit formé. Nous pouvons donc dire que ces iminosucres mono- et multivalents permettent de moduler la spécificité de substrat de Bmt1 vers l'utilisation d'un oligomannoside lié en α -1,2. Les taux de conversion accrus en présence des iminosucres polyvalents 5 et 6 montrent à nouveau le potentiel intéressant de cette nouvelle classe de composés. Enfin, nous pouvons noter que les composés multivalents basés sur le DMJ (configuration mannose) bloquent nettement plus la formation de P2 que les composés basés sur le DNJ (configuration glucose).

2.5 Effets des composés tétra et multivalents sur l'agrégation de Bmt1 et Bmt3

Pour essayer de mieux comprendre comment ces iminosucres polyvalents sont capables d'orienter les CaBmt vers une accumulation de P1, qui correspond à l'étape d'initiation de la β -mannosylation, nous avons entrepris l'analyse par DLS (Dynamic Light Scattering) de l'interaction entre ces enzymes et chacun des composés (**Figure 37**). Les enzymes seules, comme décrit précédemment, se présentent sous forme monomérique avec des particules d'environ 8-9 nm de diamètre. Les composés **1** et **2**, étant donné leur nature monovalente, n'induisent aucune agrégation. En revanche, les composés multivalents **4**, **5** et **6** disposent d'un pouvoir agrégatif conséquent. Prenons l'exemple du composé **6**. Sa présence dans le milieu en concentrations croissantes conduit à la formation d'agrégats de haute masse moléculaire, à la fois pour Bmt1 et Bmt3. A 140 μ M, ces enzymes sont toujours retrouvées sous leur forme monomérique, mais à 180 μ M se forment des agrégats d'environ 800 nm de diamètre, pouvant potentiellement contenir une centaine de particules monomériques. Ces effets d'agrégation avaient été précédemment rapportés pour l' α -mannosidase de *Canavalia ensiformis* (*Jack bean*) en présence des dérivés tétravalents du DNJ (**Brissonnet et al. 2013**).

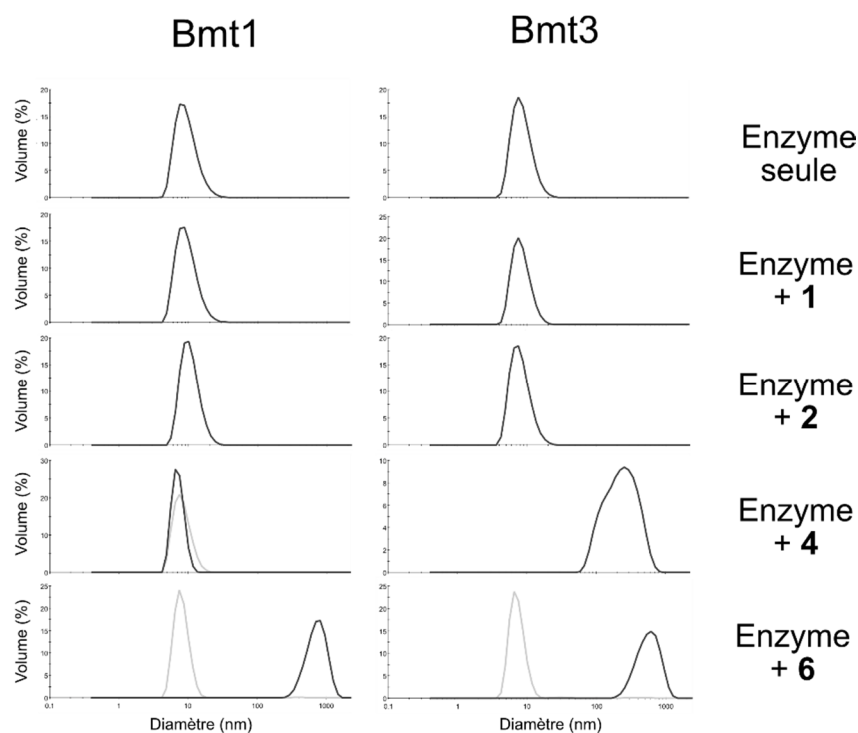


Figure 37 : Analyse de l'agrégation de Bmt1 et Bmt3 en présence des composés monovalents **1** et **2**, tétravalent **4** et polyvalent **6** par DLS en mode volume. Bmt1 et Bmt3, en absence d'iminosucre mais également en présence de **1** et **2**, sont présents sous forme monomérique (environ 8 nm de diamètre), mais présentent différents profils d'agrégation en fonction de la nature et de la concentration en iminosucres multivalents. Les enzymes ont été incubées en présence d'iminosucres à 140 μ M (gris) et 180 μ M (noir).

Le composé **4** présente quant à lui des effets agrégatifs moindres, puisque même à 180 μ M, Bmt1 reste majoritairement sous forme monomérique et Bmt3 présente des agrégats de taille restreinte (200 à 250 nm de diamètre). Ces mêmes agrégats de 200-250 nm de diamètre peuvent néanmoins être observés pour Bmt1 en mode intensité. Dans ce mode, l'intensité du signal observé est dépendante de la taille de la particule : plus celle-ci est grosse, plus l'intensité sera élevée, même si elle ne représente qu'une faible proportion de l'échantillon. Le composé **5** présente quant à lui des résultats similaires à ceux observés pour le composé **6**, ce qui tend à montrer que l'influence de la configuration épimérique glucose/mannose n'aurait que peu d'effet sur le pouvoir agrégatif de ces composés. Afin de s'assurer de l'importance de la partie « iminosucre » de ces composés dans l'agrégation observée, nous avons également mis les enzymes Bmt1 et Bmt3 en présence d'un dextrane dépourvu d'unités iminosucres, sans constater la moindre agrégation, quelle que soit la concentration employée.

Enfin, il est intéressant de faire le parallèle entre les concentrations employées pour obtenir une modulation de l'activité de Bmt1 par le composé **6** (20 mM) et celles employées pour observer l'agrégation (180 μ M). Ceci suggère que la formation de cluster de Bmt1 n'apparaît pas essentielle à la modulation de son activité. De plus, ce même composé **6** entraîne une agrégation de Bmt3, mais est incapable de modifier son activité. Les propriétés modulatrices de ces iminosucres semblent donc plus dépendre de leur ressemblance avec les substrats natifs hautement mannosylés que de leur capacité à induire la formation d'agrégats.

Pour conclure, ces iminosucres mono-, tétra- et polyvalents, et particulièrement le composé **6** polyvalent DMJ (à configuration mannose), se révèlent être des agents modulateurs à la fois de la vitesse de catalyse mais également de la spécificité de substrat de Bmt1. A ce titre, ils peuvent être extrêmement intéressants dans la perspective d'une biosynthèse contrôlée et maîtrisée de β -1,2-mannosides dont les propriétés immuno-modulatrices font l'objet de nombreuses études.

Partie II :

Caractérisation structurale de CaBmt3

Les enzymes responsables de la β -mannosylation de la fraction acido-stable du PPM, CaBmt1 et CaBmt3, ont donc été toutes deux étudiées *in vitro*. Nous en savons donc plus sur leurs spécificités de substrats respectives, ainsi que sur leurs paramètres cinétiques optimaux. Néanmoins, afin d'avancer dans la compréhension du mécanisme catalytique de ces CaBmt, voire de la famille CAZy GT91 à laquelle elles appartiennent, il apparaît crucial d'étudier leurs caractéristiques structurales.

1 Pourquoi CaBmt3 ?

L'étude de cette famille GT91 avait débuté par la caractérisation de CaBmt1. Dès lors, les premières approches pour tenter de comprendre le mécanisme catalytique de ces enzymes avaient été réalisées sur la forme recombinante Bmt1. Le but était d'obtenir des cristaux protéiques de Bmt1 afin de les soumettre à la diffraction aux rayons X, ou cristallographie. Cette technique, somme toute classique pour qui souhaite obtenir des informations précises sur l'organisation tridimensionnelle à l'échelle atomique du site actif d'une enzyme afin d'en élucider le mécanisme catalytique, nécessite que la protéine d'intérêt satisfasse à plusieurs paramètres pour l'étape initiale de cristallogenèse. Cette protéine, initialement en solution, doit être stable, homogène, monodisperse et en concentration de l'ordre du mg/mL.

Nous avons vu que Bmt1 présentait une solubilité moindre par rapport à Bmt3, qui se traduisait par l'ajout impératif de détergent (Triton X-100 à 0.5%) pour assurer sa solubilisation sous forme monomérique. Ce défaut de solubilité s'avère préjudiciable pour la cristallogenèse de Bmt1, puisque le caractère monodisperse et homogène n'est pas garanti. Ceci peut s'expliquer par la présence d'une région hydrophobe au niveau du domaine catalytique C-terminal de CaBmt1. Il est à noter que CaBmt2, responsable de l'initiation du motif β -Man sur la fraction acido-labile du PPM, possède également une région hydrophobe au niveau de son domaine catalytique. Cette zone hydrophobe présente des similitudes avec le motif PDZ (**Figure 38**), qui est une séquence bien décrite dans la littérature et dédiée au recrutement de partenaires protéiques (**Chi et al. 2012**). Une des caractéristiques des motifs PDZ est la présence d'une séquence consensus GLGF. Elle est retrouvée chez NHERF (Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor) sous la forme GYGF, et chez

2 Cristallogenèse et ses écueils

2.1 Utilisation de l'enzyme recombinante exprimée chez *P. pastoris*

2.1.1 Choix du système d'expression

La détermination des paramètres enzymatiques de Bmt3 a été réalisée grâce à sa production chez *P. pastoris*. Nous avons donc à notre disposition une enzyme dont le mode de sécrétion dans le milieu de culture nous assurait une étape de « pré-purification ». En effet, la protéine d'intérêt étant sous la dépendance du promoteur AOX1, dans des conditions de production optimales (sans lyse cellulaire), la seule protéine présente dans le surnageant de culture est la protéine surexprimée. Ceci s'est plus ou moins vérifié selon les productions, comme en atteste le gel SDS/PAGE coloré au bleu de Coomassie montré précédemment (**Figure 23**). Seules quelques bandes contaminantes de faibles intensités sont visibles. De plus, la production d'une protéine eucaryote dans un système eucaryote (*P. pastoris*) plutôt que procaryote (*E. coli*) présente l'avantage de faciliter la mise en conformation de l'enzyme surexprimée et de permettre la synthèse de modifications post-traductionnelles plus proches de la protéine originale.

Au tout début du projet d'étude des CaBmt, des tentatives d'expression de Bmt1 chez *Escherichia coli* avaient été entreprises, mais s'étaient révélées infructueuses. En effet, la formation systématique de corps d'inclusion est restée problématique, d'autant plus qu'aucune activité enzymatique n'a pu être détectée lors de ces productions en système procaryote. La présence d'étiquette 6xHis côté C-terminal semblait en être responsable. La production d'une forme recombinante possédant l'étiquette 6xHis côté N-terminal n'a cependant pas donné de résultats probants. C'est pourquoi la forme recombinante de CaBmt1 produite chez *P. pastoris* (et surexprimée dans le milieu extracellulaire) ne présente au final aucune étiquette 6xHis. De la même manière, la forme recombinante de CaBmt3 produite chez *P. pastoris* (et surexprimée dans le milieu extracellulaire) est elle aussi dépourvue de toute étiquette 6xHis.

2.1.2 Purification par chromatographie échangeuse d'ions

Les premiers essais de cristallogenèse ont donc été entrepris sur la forme recombinante de CaBmt3 exprimée chez *P. pastoris* et qui ne nécessite pas d'ajout de détergent autre que le Tween 20 à 0.05% au moment de l'induction. Nous avons estimé nécessaire la réalisation d'une étape préalable de purification.

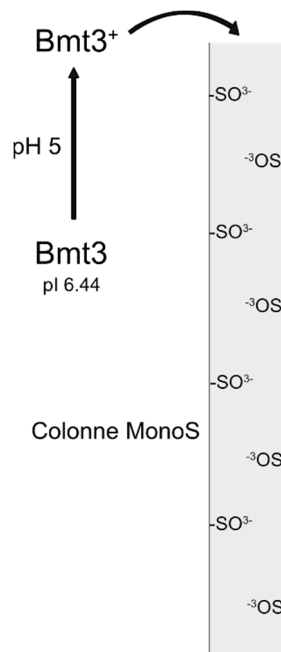


Figure 39 : Représentation schématique de la purification de la protéine Bmt3 sur une colonne MonoS par chromatographie échangeuse d'ions.

Comme expliqué, cette forme recombinante ne possède aucune étiquette 6xHis. Ceci nous a amené à privilégier une purification sur colonne par chromatographie échangeuse d'ions. Nous avons ici choisi d'utiliser une colonne échangeuse de cations (ici, une colonne HiTrap SP FF de GE Healthcare Life Sciences) qui va présenter de nombreuses charges négatives. En outre, nous avons déterminé le point isoélectrique (pI) théorique de Bmt3 à 6.44 (grâce à l'outil Compute pI disponible *via* ExPASy). Ainsi, dans un tampon dont le pH est inférieur à cette valeur (ici nous avons employé un tampon d'acétate de sodium 20 mM à pH 5), la protéine est chargée positivement et sera ainsi retenue par les charges négatives de la colonne (**Figure 39**). L'élution de la protéine est réalisée grâce à un gradient de NaCl (jusque

1M) et les fractions récoltées sont analysées par électrophorèse SDS/PAGE (**Figure 40**).

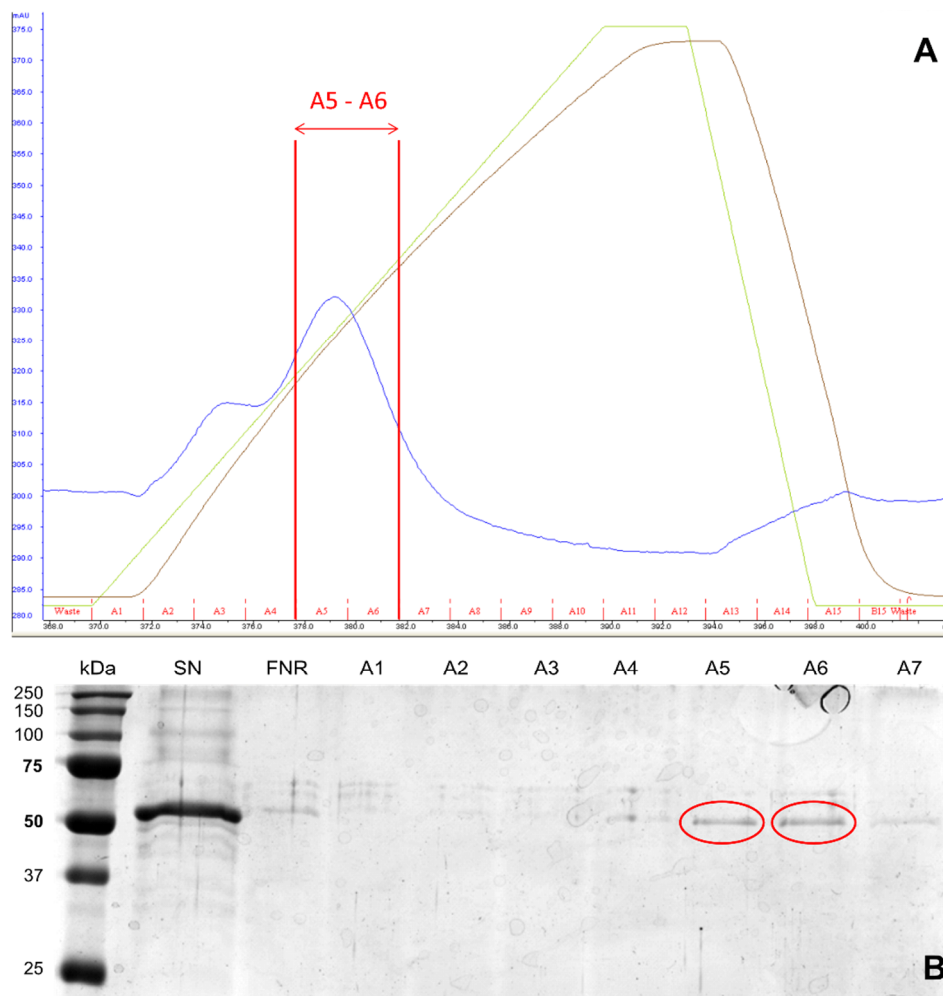


Figure 40 : Purification de Bmt3 sur colonne MonoS. **A** : chromatogramme de purification (bleu : absorbance à 280 nm, vert : gradient de NaCl de 0 à 100%, marron : conductivité). **B** : analyse des fractions d'élution par électrophorèse SDS/PAGE et coloration au bleu de Coomassie. SN : surnageant de culture, FNR : fraction non retenue.

Notre protéine d'intérêt se retrouve majoritairement dans les fractions A5 et A6, ce qui est confirmé par l'électrophorèse. Il apparaît néanmoins, si l'on compare l'intensité des bandes avant (piste SN) et après (pistes A5 et A6) purification, qu'une grande proportion de l'enzyme est perdue en cours de manipulation. Un des paramètres essentiels à la cristallogénèse est, rappelons-le, une concentration de l'ordre du mg/mL. Nous avons donc assez vite compris que ce type de purification échangeuse d'ions, ainsi que le type de production de l'enzyme recombinante employé allaient nous limiter grandement dans l'obtention de la concentration minimale requise.

2.1.3 Purification par chromatographie par affinité

Un autre type de purification peut également être employé. L'utilisation d'une purification par chromatographie par affinité peut s'avérer efficace et est largement employée. Bien que ne possédant aucune étiquette 6xHis, nous avons voulu essayer de purifier la forme recombinante Bmt3 produite chez *P. pastoris* grâce à une colonne IMAC dont l'ion métallique est le Ni^{2+} . Pour rappel, ce cation divalent ne causait qu'une très légère perte d'activité de Bmt3 lorsque nous avons déterminé ses paramètres cinétiques, au contraire de Bmt1 qui était complètement inhibée par celui-ci.

A partir d'une production classique chez *P. pastoris*, qui représente environ 100 mL de surnageant de culture sans Triton X-100, nous avons ainsi procédé à la purification sur une colonne Ni-NTA (Nickel-Nitrilotriacetic acid). Après chargement sur la colonne et collecte de la fraction non retenue (FNR), l'élution est réalisée par un palier d'imidazole à 250 mM et notre protéine d'intérêt est majoritairement éluee dans deux fractions. Après ceci, et afin de maximiser la quantité de protéine récoltée, nous procédons à un nouveau cycle de purification en utilisant la FNR collectée à l'étape précédente. Ces étapes sont ainsi répétées jusqu'à ce que la FNR ne contienne plus de protéine d'intérêt. En l'occurrence, il aura fallu pour cela quatre cycles, pour un total de neuf fractions d'élution récoltées (**Figure 41, piste P**).

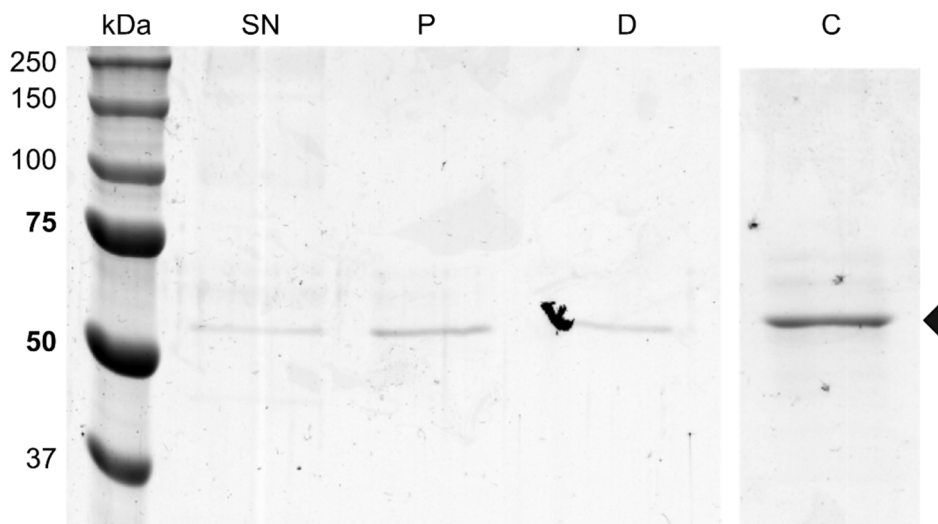


Figure 41 : Purification de Bmt3 exprimée chez *P. pastoris* par chromatographie par affinité sur colonne Ni-NTA. Electrophorèse SDS/PAGE et coloration au bleu de Coomassie. SN : surnageant de culture, P : après purification, D : après dialyse, C : après concentration.

Après purification, notre protéine d'intérêt se retrouve donc en présence de 250 mM d'imidazole, ce qui peut être préjudiciable à la fois si l'on veut tester l'activité de l'enzyme purifiée, mais également dans l'optique de la cristallogenèse et de l'obtention d'un échantillon le plus pur et le plus homogène possible. De plus, afin d'atteindre une concentration protéique compatible avec la cristallogenèse, il faut envisager de concentrer l'enzyme. Nous avons décidé de réaliser ces deux étapes en une grâce à l'utilisation de filtres à centrifuger (Vivaspin 20 de Sartorius) dont la limite de masse moléculaire est de 10 kDa. Bmt3 a, pour rappel, une masse moléculaire de 55 kDa environ. Les neuf fractions d'élution sont rassemblées puis diluées dans le tampon utilisé lors du chargement de l'enzyme sur la colonne de purification (dépourvu d'imidazole) et déposées dans le Centricon. Après centrifugation, la portion qui ne sera pas passée à travers la membrane du Centricon sera constituée de la protéine d'intérêt déplétée d'une partie de l'imidazole qu'elle contenait. Il peut être intéressant de répéter cette dialyse sur Centricon plusieurs fois afin de se débarrasser d'un maximum d'imidazole (**Figure 41, piste D**).

Enfin, l'étape de concentration consiste essentiellement à la centrifugation de l'échantillon, toujours présent dans le Centricon au-dessus de la membrane. Le volume contenant l'échantillon devient donc de plus en plus restreint, sa concentration augmentant de manière inversement proportionnelle. Ici, nous sommes passés d'un volume initial de 18 mL (neuf fractions de 2 mL), à un volume final de 200 μ L, soit une concentration théorique d'un facteur 90 (**Figure 41, piste C**). Par mesure densitométrique sur gel, il s'avère que le facteur de concentration est de 9. La mesure de l'absorbance à 280 nm nous permet alors de calculer la concentration de l'échantillon purifié, dialysé et concentré. Nous trouvons une valeur de 0.3 mg/mL, soit une concentration au moins dix fois trop faible pour envisager la cristallogenèse.

Sans étiquette 6xHis, et malgré de nombreuses tentatives pour obtenir une concentration plus élevée, cette forme recombinante produite chez *P. pastoris* s'avère être un mauvais candidat pour espérer obtenir des cristaux protéiques.

2.2 Utilisation de l'enzyme recombinante exprimée chez *E. coli*

2.2.1 Préparation de l'échantillon

2.2.1.1 Purification sur colonne par chromatographie par affinité

Nous avons démontré que l'expression chez *P. pastoris* ne nous permet pas d'obtenir des concentrations suffisantes en Bmt3. Pour pallier ce problème, nous avons décidé de produire l'enzyme recombinante dans *E. coli*, dans la souche d'expression SHuffle, comme décrit précédemment. En effet, la construction plasmidique employée dispose d'une étiquette 6xHis du côté N-terminal, ce qui devrait grandement faciliter la purification et améliorer les rendements par rapport à la forme recombinante produite chez *P. pastoris*.

Le protocole de purification est légèrement modifié par rapport à celui décrit précédemment. Produite chez *E. coli*, pour une culture de 100 mL par exemple, nous récupérons environ 5 mL de cellules en suspension contenant la protéine Bmt3 surexprimée. La libération du contenu intracellulaire, par tampon de lyse et ultrasons, révèle une surexpression manifeste de Bmt3 (**Figure 42, piste LC**). Bien que le tampon de lyse contienne du détergent (DDM à 0.5%), la proportion de protéine surexprimée retrouvée dans la fraction soluble reste faible, comme constaté dans nos premières productions chez *E. coli* décrites précédemment (**Figure 42, piste FS**). Le tampon de lyse contient également 10 mM d'imidazole, afin de minimiser le phénomène de reconnaissance non spécifique lors du chargement de l'échantillon sur la colonne HisTrap HP (colonne Nickel-Sépharose, GE Healthcare). De ce fait, nous constatons que la protéine d'intérêt ne se retrouve plus dans la FNR de chargement (**Figure 42, piste FNR**). Un premier palier d'élution à 25 mM d'imidazole permet d'éliminer les éventuelles protéines endogènes d'*E. coli* retenues non spécifiquement sur la colonne (**Figure 42, piste 25mM**). L'élution proprement dite de la protéine d'intérêt est effectuée à 250 mM d'imidazole. Nous constatons que la très grande majorité de l'enzyme est éluée dans deux fractions d'élution, visiblement en très bonnes quantités (**Figure 42, pistes 250mM**). Un dernier palier d'élution à 500 mM d'imidazole ne décroche aucune protéine supplémentaire (**Figure 42, piste 500mM**).

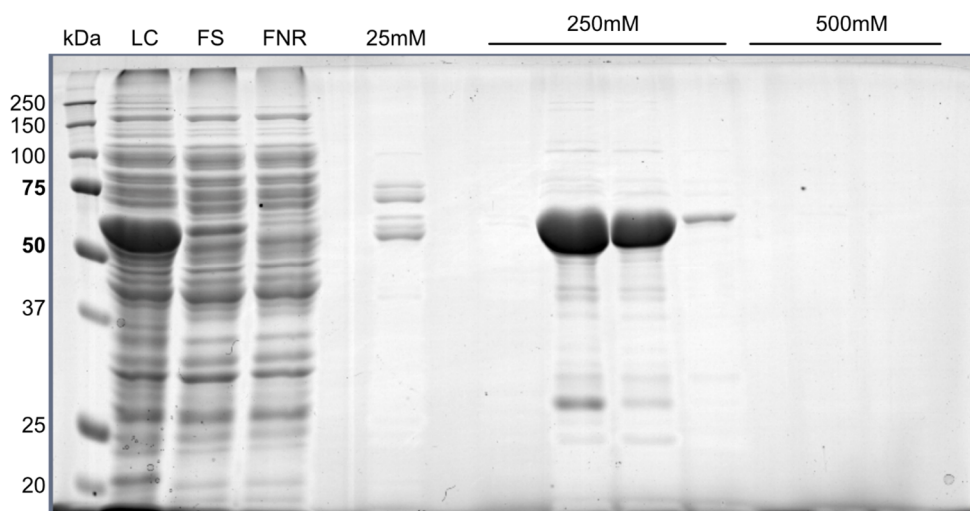


Figure 42 : Purification de Bmt3 exprimée chez *E. coli* par chromatographie par affinité sur colonne HisTrap. Electrophorèse SDS/PAGE et coloration au bleu de Coomassie. LC : lysat cellulaire, FS : fraction soluble, FNR : fraction non retenue.

2.2.1.2 Détermination du tampon de stabilité

Afin de s'assurer que l'enzyme purifiée reste la plus stable possible, nous avons essayé de déterminer le tampon dans lequel l'enzyme est la plus stable. Pour cela, nous avons utilisé la technique de TSA (Thermal Shift Assay) qui consiste à chauffer progressivement, depuis la température ambiante jusque 95°C, la protéine se trouvant dans divers tampons. A chaque condition est ajouté au préalable un composé fluorescent, le Sypro Orange, qui va se lier de manière non spécifique aux acides aminés hydrophobes de la protéine, normalement difficilement accessibles en solution aqueuse si la protéine est bien conformée (et donc stable). Sous l'effet de la température croissante, la protéine va alors se dénaturer progressivement, exposant ainsi de plus en plus d'acides aminés hydrophobes qui vont donc fixer de plus en plus de Sypro Orange. Plus la protéine se trouve dans un environnement stable (nature du tampon, pH, concentration en sels...), plus la température à laquelle la protéine va commencer à se dénaturer sera élevée. L'analyse de la détection de fluorescence en fonction de la température nous permet ainsi de déterminer le tampon optimal pour la stabilité de notre protéine d'intérêt (**Figure 43**). En l'occurrence, nous avons dans un premier temps déterminé que la composition du tampon idéal était : Tris 0.1 M à pH 7.5, NaCl 150 mM.

Le signal observé pour la population monomérique de Bmt3, bien que relativement fin, s'étale tout de même sur plusieurs fractions d'élution de 1 mL chacune (de B15 à B8, soit 8 mL en tout). L'échantillon qui était somme toute bien concentré après l'étape de purification se retrouve dilué après l'étape de chromatographie d'exclusion. Une mesure de l'absorbance à 280 nm permet de calculer une valeur de concentration, grâce au coefficient d'extinction massique théorique déterminé pour Bmt3 ($\epsilon = 1.586$). Nous obtenons une concentration d'environ 1 mg/mL, ce qui est nettement plus encourageant que ce que nous obtenions lors de nos tentatives de purification avec l'enzyme recombinante produite chez *P. pastoris*. Il convient désormais de concentrer ces 8 mL à 1 mg/mL jusqu'à atteindre une concentration d'environ 15 à 20 mg/mL. Nous utilisons pour cela la technique de concentration sur Vivaspin 20 décrite précédemment.

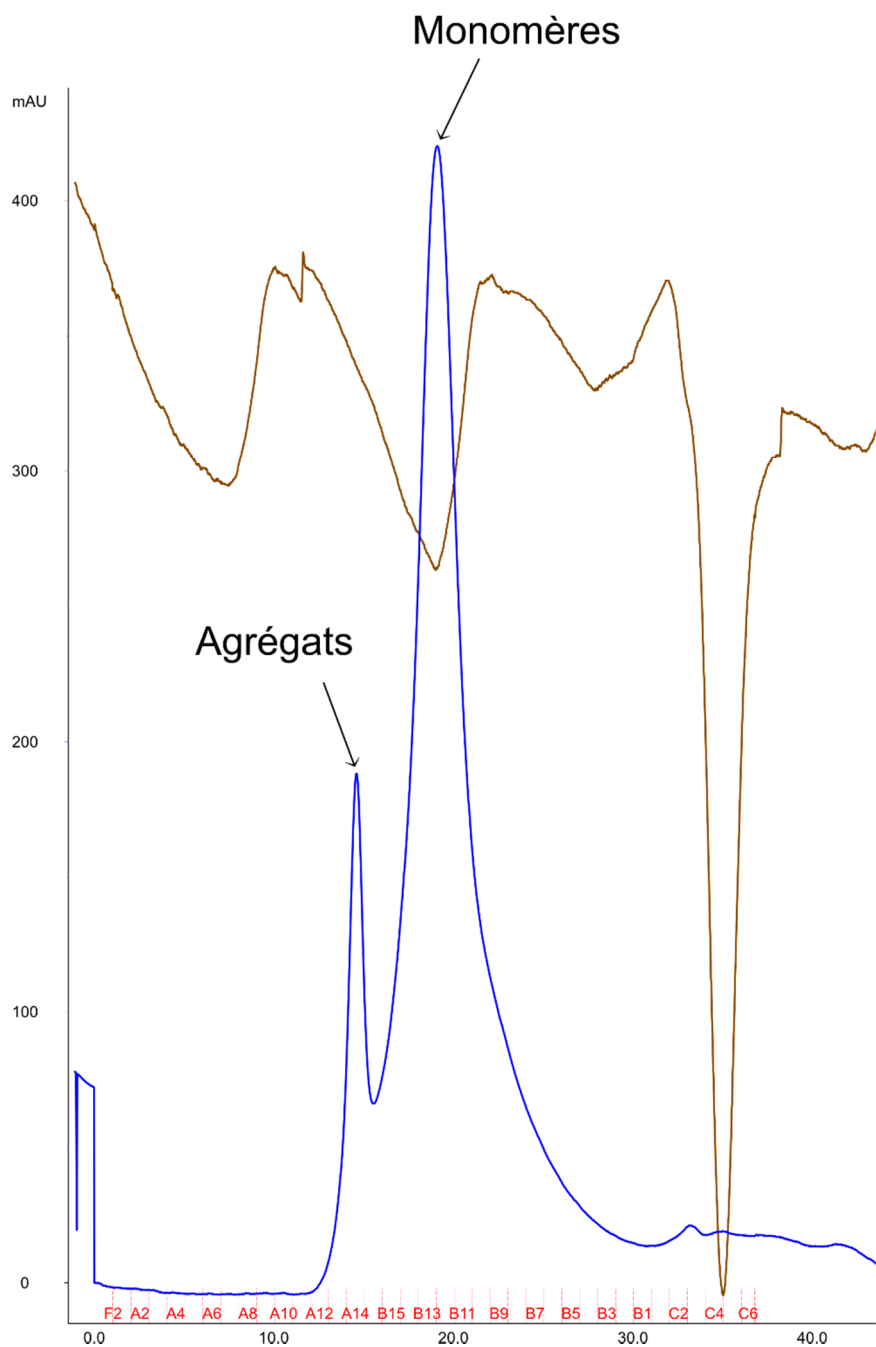


Figure 44 : Séparation des populations monomérique et multimérique de Bmt3 en solution par chromatographie d'exclusion stérique sur colonne Séphacryl S-100 HR. Suivi par mesure de l'absorbance à 280 nm (bleu) et de la conductimétrie (marron).

Nous avons donc établi un processus de préparation d'échantillon purifié, homogène, monodisperse et stable. En répétant toutes ces opérations à plusieurs reprises, nous disposons ainsi de suffisamment de matériel pour envisager des essais de cristallogénèse.

2.2.2 Essais de cristallogenèse

A partir du moment où ce processus de préparation s'est révélé suffisamment robuste, de nombreuses tentatives de cristallogenèse ont été menées tout au long de ces travaux de thèse, à partir de multiples productions d'enzyme Bmt3. Nous avons eu l'occasion de tester de nombreux kits commerciaux de cristallographie grâce à l'utilisation de deux robots présents au sein de l'unité, un robot Cybio et un robot Mosquito. Les kits suivants ont été testés : Crystal Screen, 3DStructure Screen, Clear Strategy Screen I et II, Cations Suite, pH Clear I et II, PACT Premier, JCSG, MemGold, Proplex, Memplus, PGA, Midas et MemMagic. De plus, nous avons également décidé dans certains cas de tenter de cristalliser l'enzyme en présence de son substrat donneur, le GDP-mannose. L'idée sous-jacente était que la présence du substrat donneur au sein du site actif de l'enzyme allait permettre une certaine stabilisation de la protéine et donc de meilleures chances de cristallisation. De même, plusieurs concentrations ont été testées. Au final, nous aurons ainsi testé plus de 2000 conditions.

Malheureusement, l'immense majorité des conditions testées s'est révélée infructueuse. Malgré l'apparition rapide de précipités dans de nombreuses conditions, signe que l'enzyme semble être en concentration suffisante et en état de sur-saturation, celles-ci n'ont finalement pas abouti à la formation de cristaux utilisables pour une étude de diffraction des rayons X (**Figure 45**).

La cristallogenèse entreprise sur la forme recombinante de Bmt3, produite chez *P. pastoris* et chez *E. coli*, s'est révélée au final très chronophage, pour des résultats insatisfaisants. Une des hypothèses envisagées pour expliquer ces échecs tient dans la structure même des glycosyltransférases golgiennes de type II. En effet, celles-ci présentent, entre leur domaine transmembranaire et leur domaine catalytique, un domaine tige qui est prédit pour être désordonné. Cette particularité serait préjudiciable pour la formation de cristaux, car elle entraînerait une instabilité intrinsèque et une hétérogénéité incompatibles avec la cristallogenèse.

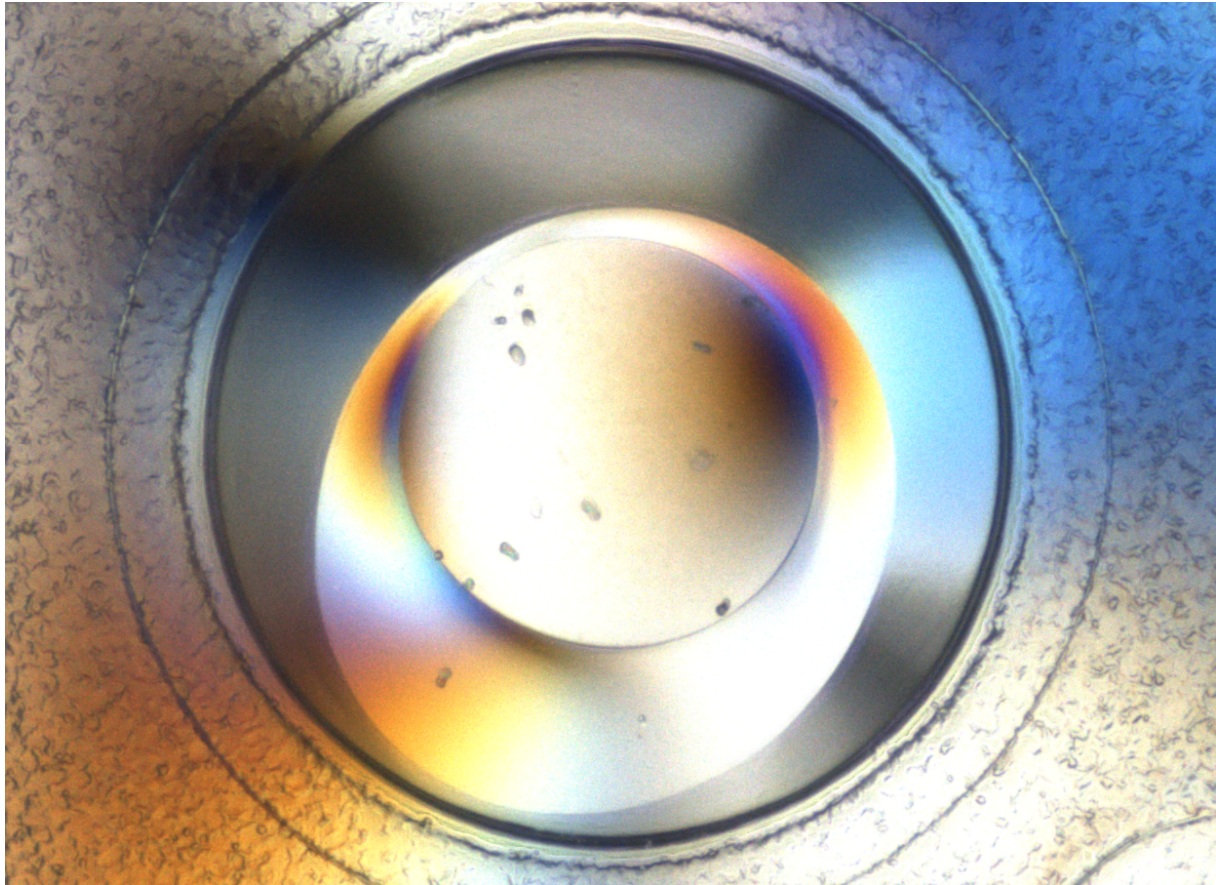


Figure 45 : Photographie de la goutte assise contenant Bmt3 à 8 mg/mL dans une solution de Tris/HCl 0.1M pH 8.5 CaCl₂ 2.2M à J10 après dépôt par le robot Cybio. Les cristaux observés seront finalement identifiés comme des cristaux salins, et non protéiques.

2.3 Formes tronquées : le nouvel espoir ?

Afin de remédier à ce problème de domaine tige désordonné, nous avons décidé de produire une forme tronquée de l'enzyme Bmt3, dépourvue, en plus des domaines cytosolique et transmembranaire déjà ôtés, du domaine tige. Ne resterait donc plus, par rapport à la séquence native, que le domaine cytosolique. Plusieurs constructions ont été envisagées : soit ne garder exclusivement que le domaine catalytique tel qu'il est prédit par les logiciels de prédiction de structures secondaires (**Phyre2, Figure 46**), c'est-à-dire à partir du résidu Pro¹³⁴, soit conserver une partie du domaine tige en amont du domaine catalytique, c'est-à-dire à partir du résidu Lys¹⁰². Cette deuxième possibilité a été envisagée suite à l'observation préalable d'une protéolyse lente de la forme recombinante de Bmt1 après plusieurs mois de stockage à +4°C, sans que cela n'altère l'activité de celle-ci. L'analyse par séquençage N-terminal d'Edman de ces fragments a montré un site de coupure chez Bmt1 qui, par

alignement de séquence avec Bmt3, correspond à cette Lys¹⁰² chez cette dernière. La forme plus longue, FT1, et la forme plus courte, FT2, ont été produites chez *E. coli*.

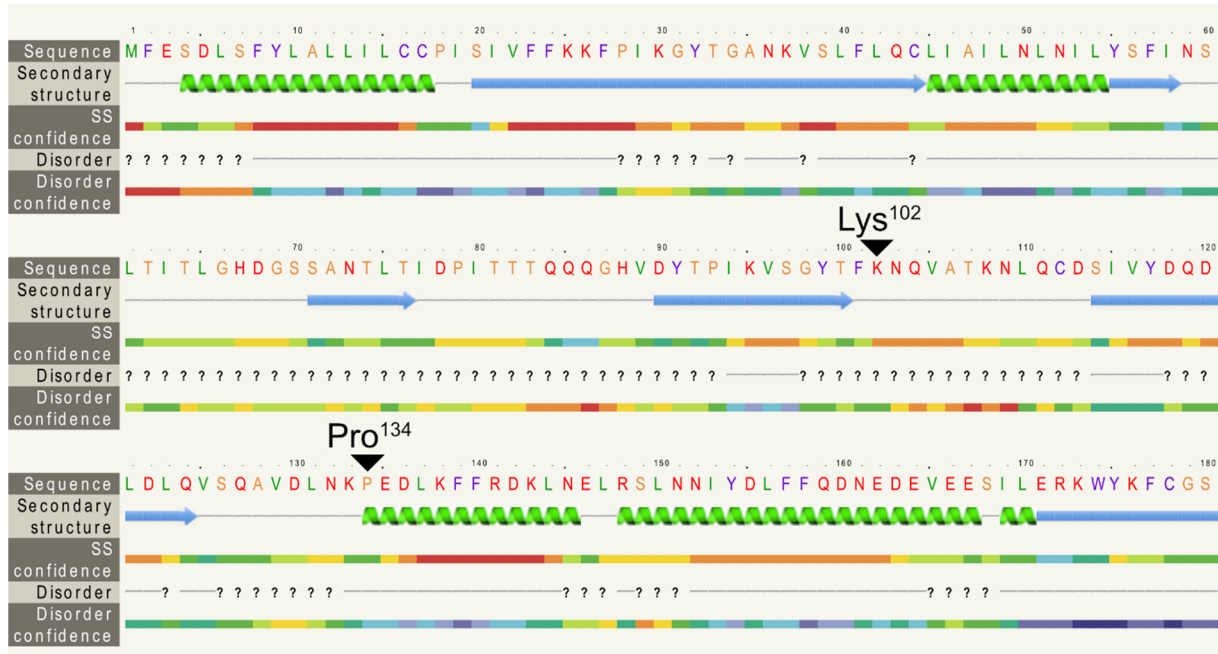


Figure 46 : Prédiction de structures secondaires sur les 180 premiers acides aminés de la séquence native de CaBmt3 par le logiciel Phyre2. Les résidus Lys¹⁰² et Pro¹³⁴ marquant le début de séquence des formes tronquées FT1 et FT2, respectivement, sont identifiés par une flèche noire (Kelley *et al.* 2015).

Nous avons suivi le même protocole de production chez *E. coli* pour ces formes tronquées que celui qui avait été mis au point pour produire la forme recombinante de Bmt3 décrit précédemment. Ainsi, nous avons réussi à produire les formes FT1 et FT2 de manière satisfaisante, comme en atteste leur présence détectée par anticorps anti-Bmt3 (anticorps polyclonal dirigé contre une séquence de 15 acides aminés du domaine catalytique) dans le lysat cellulaire en quantité similaire à la forme entière recombinante de Bmt3 (**Figure 47**). Néanmoins, nous avons également constaté qu'au contraire de la forme entière recombinante, les formes tronquées étaient toutes deux absentes de la fraction soluble, en dépit du détergent DDM à 0.5% présent dans le tampon de lyse (**Figure 47**). De nouveaux tests de solubilisation de ces formes tronquées n'ont apporté aucune amélioration, celles-ci se retrouvant probablement dans des corps d'inclusion.

Pour conclure, nous ne sommes pas parvenus à exprimer de forme tronquée soluble de l'enzyme Bmt3. Par conséquent, nous n'avons pas pu procéder au processus de préparation de l'échantillon (purification – chromatographie d'exclusion stérique – concentration) en vue d'essais de cristallogénèse. La suppression du domaine tige désordonné, que nous pensons nécessaire pour stabiliser au maximum la protéine et homogénéiser l'échantillon, s'est révélée délétère à la solubilisation de l'enzyme. Il pourrait être intéressant pour de futures explorations d'envisager des protocoles de resolubilisation de corps d'inclusion, notamment par dénaturation/renaturation au chlorure de guanidium et à l'urée.

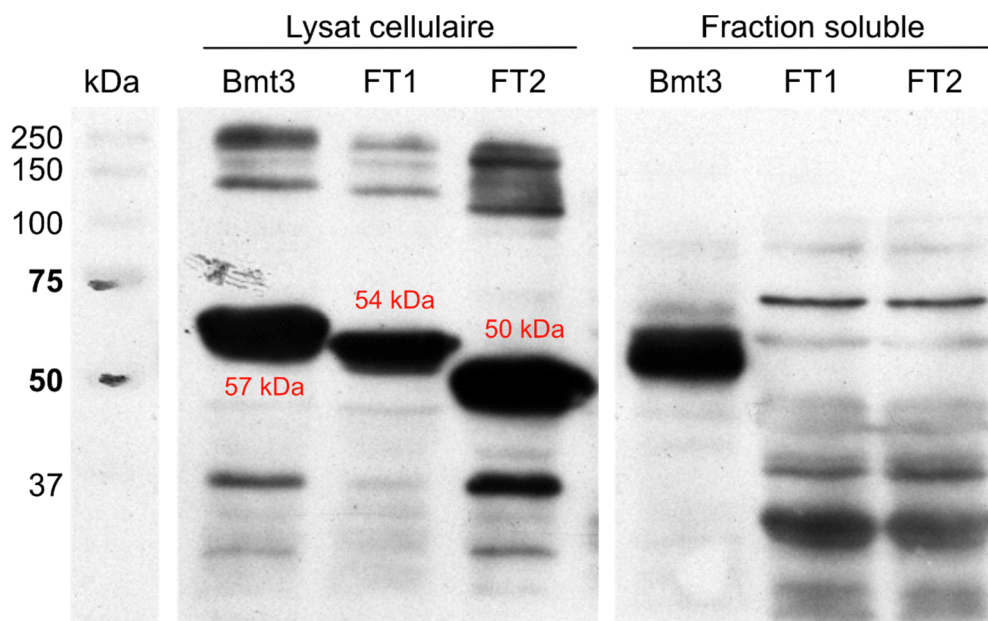


Figure 47 : Expression chez *E. coli* des formes tronquées FT1 et FT2. Détection par western blot (anticorps anti-Bmt3) des formes entière et tronquées dans le lysat cellulaire (à gauche) et la fraction soluble (à droite).

Dans l'impossibilité, en l'état actuel, de parvenir à une cristallogénèse réussie, nous avons suivi une stratégie parallèle afin d'obtenir néanmoins des informations structurales sur CaBmt3.

3 Mutagénèse dirigée de CaBmt3

3.1 Identification de cibles *in silico*

3.1.1 Alignement multiple des séquences de la famille GT91

Nous avons tout d'abord cherché à mettre en évidence des résidus conservés au sein de la famille GT91. Nous recherchons ici à identifier des résidus qui pourraient être impliqués dans le mécanisme catalytique des CaBmt. Nous avons expliqué dans un chapitre précédent que pour des glycosyltransférases possédant un mécanisme par inversion de configuration, comme c'est le cas pour les CaBmt (formation d'une liaison β -1,2 à partir d'un substrat donneur, le GDP-mannose, lié en α), la chaîne latérale d'un résidu présent au niveau du site actif allait permettre de déprotoner l'accepteur nucléophile. Classiquement, la fonction carboxylate des résidus glutamate et aspartate est décrite pour remplir ce rôle dans des mécanismes par inversion de type S_N2 .

Grâce au logiciel MAFFT, nous avons ainsi procédé à l'alignement multiple des séquences protéiques des membres de la famille GT91 qui étaient décrits dans la base de données UniProt (33 au moment où l'alignement a été effectué, 38 à l'écriture de ce manuscrit), dont les CaBmt (**Figure 48**). Nous identifions clairement des blocs de résidus plus ou moins conservés à travers ces 33 séquences. Cette **figure 48** reprend à titre d'exemple l'alignement multiple, sur une petite centaine de résidus, correspondant aux résidus 231 à 288 pour CaBmt3, au sein desquels 3 blocs de conservation peuvent être identifiés. Parmi eux, nous recherchons des résidus d'acide glutamique (E) ou d'acide aspartique (D) conservés dans ces 33 séquences (**Figure 48, rectangles pointillés noirs**). De cette façon, nous avons identifié au total sept résidus (trois acides glutamiques et quatre acides aspartiques) susceptibles de jouer le rôle de nucléophile-base dans le mécanisme catalytique des CaBmt.

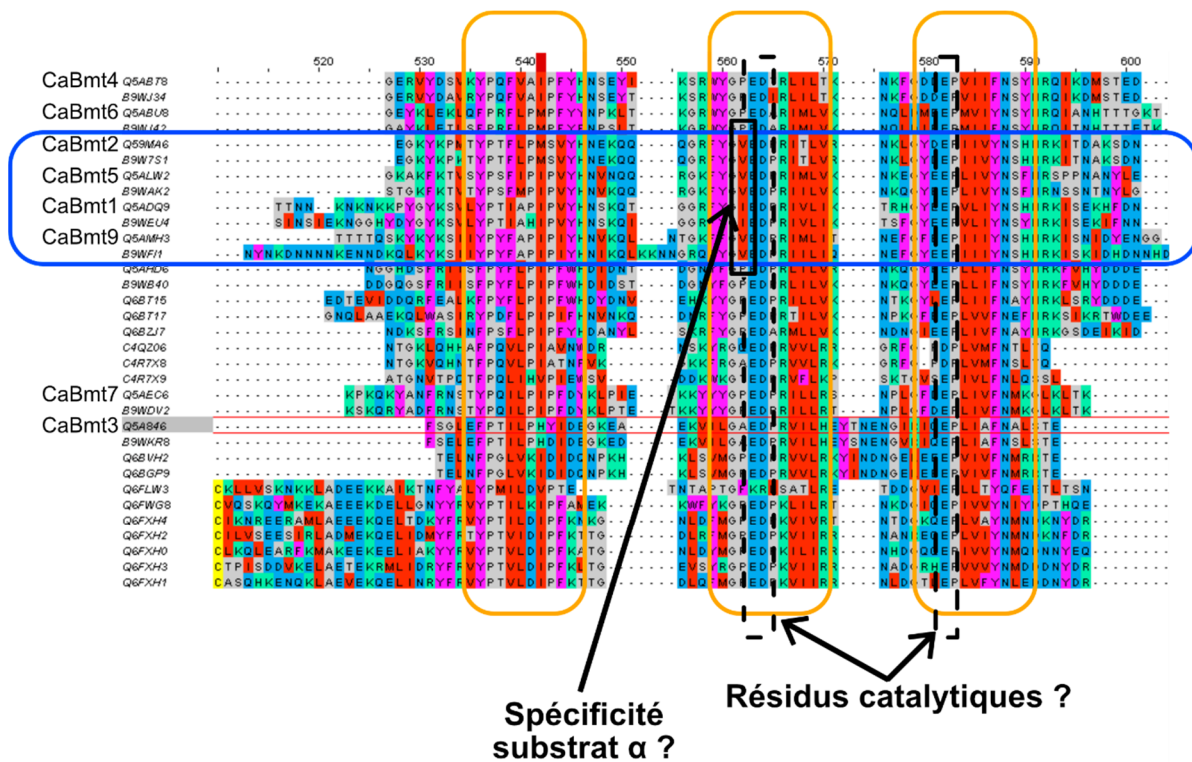


Figure 48 : Alignement des séquences protéiques des membres de la famille GT91 grâce au logiciel MAFFT. Les CaBmt sont indiquées à gauche. Au sein de blocs de résidus conservés (rectangles orange), il est possible d'identifier des résidus d'acide aspartique et d'acide glutamique conservés dans toute la famille GT91 qui pourraient être des résidus catalytiques (rectangles pointillés noirs). Parmi les séquences des enzymes d'initiation CaBmt1/2/5/9 (rectangle bleu), il est possible d'identifier des résidus conservés différents du reste des membres de la famille GT91 (valine/isoleucine contre alanine/proline) qui pourraient être responsables de la spécificité de substrat de ces enzymes d'initiation (rectangle continu noir).

Avec la même approche, nous avons recherché d'autres résidus qui pourraient être impliqués, de manière indirecte, dans le mécanisme catalytique. En particulier, il est possible de différencier au sein des CaBmt les enzymes responsables de l'initiation du motif β -Man, les CaBmt1, 2 et 5 (voire CaBmt9 en se basant sur la proximité phylogénétique de cette dernière envers les trois autres (**Mille et al. 2012**) (**Figure 49**)), des enzymes responsables de l'élongation de ce motif, les CaBmt3, 4 et 6 (**Figure 48**, rectangle bleu). En effet, si l'on regarde la spécificité de substrat de ces deux sous-familles, nous pouvons dire que les enzymes d'initiation ont besoin d'un substrat accepteur lié en α -1,2, tandis que les enzymes d'élongation vont nécessiter un substrat dont l'extrémité non réductrice est en β -1,2. Cette différence de spécificité de substrat accepteur pourrait être due à des résidus qui seraient conservés uniquement dans la séquence des enzymes d'initiation. Nous avons donc regardé, sur

cet alignement, si des résidus étaient conservés chez les CaBmt1/2/5/9, mais pas au niveau des autres séquences où l'on retrouverait des résidus conservés mais différents (**Figure 48, rectangle continu noir**). Six résidus présents dans la séquence des enzymes d'initiation sont susceptibles d'être impliqués dans leur spécificité de substrat accepteur α -1,2.



Figure 49 : Alignement des séquences nucléiques des neuf CaBMT grâce au logiciel d'alignement multiple AlignX. L'arbre phylogénétique a été obtenu par la méthode *neighbour joining*. Les enzymes dites d'initiation CaBmt1, CaBmt2 et CaBmt5 (ainsi que CaBmt9) s'alignent ensemble. De la même manière, les enzymes dites d'élongation CaBmt4 et CaBmt6 s'alignent ensemble.

En utilisant le même type de raisonnement, il est également possible de déterminer la présence de résidus propres aux enzymes d'élongation ayant une activité polymérase. En effet, parmi les enzymes d'élongation, nous avons vu que CaBmt3 n'était capable, *in vitro*, d'ajouter qu'un seul résidu β -1,2-mannosyl supplémentaire. Or, que ce soit sur PPM ou sur le PLM, les motifs β -Man peuvent compter plus de deux résidus β -1,2-mannosyl. Les enzymes CaBmt4 et CaBmt6 devraient être théoriquement capables, sur base des études par génétique inverse (**Mille et al. 2008, 2012**), d'allonger ces motifs, et donc posséder une activité polymérase. Nous avons donc cherché, au sein de leurs séquences, des résidus spécifiques conservés. Quatre résidus ont ainsi été identifiés.

Au final, sur la base de l'analyse de l'alignement multiple des séquences, nous avons identifié 17 résidus potentiellement impliqués dans le mécanisme catalytique et/ou la spécificité de substrat. Le rôle de ces résidus sera analysé par mutagenèse dirigée. Afin d'affiner notre analyse et de fait restreindre le nombre de résidus à analyser, nous avons cherché à prédire la position de ces résidus sur l'enzyme par des modélisations moléculaires.

3.1.2 Modélisation 3D de CaBmt3

Nous avons utilisé le logiciel I-TASSER (Iterative Threading ASSEmbly Refinement) pour obtenir un modèle tridimensionnel de CaBmt3 (Zhang 2008; Roy *et al.* 2010; Yang *et al.* 2015). Après soumission de notre séquence protéique primaire, ce service identifie des modèles structuraux à partir de la base de données PDB grâce à une approche de prédiction de structure en parallèle sur de multiples fragments de séquence. Plusieurs modèles atomiques reprenant la séquence complète sont ensuite construits par assemblage itératif de tous les modèles fragmentaires déterminés à l'étape précédente. Enfin, des renseignements sur la fonction potentielle de la séquence soumise sont déterminés par confrontation des modèles 3D utilisés à la base de données des fonctions protéiques BioLiP (focalisée sur les interactions ligand-protéine).

Le modèle le plus probable de CaBmt3 proposé par I-TASSER (Figure 50) est composé de deux domaines globulaires. Le domaine C-terminal, qui contient tous les résidus catalytiques potentiels prédits, adopte une structure bien décrite dans la littérature, le β -propeller (Chen *et al.* 2011).

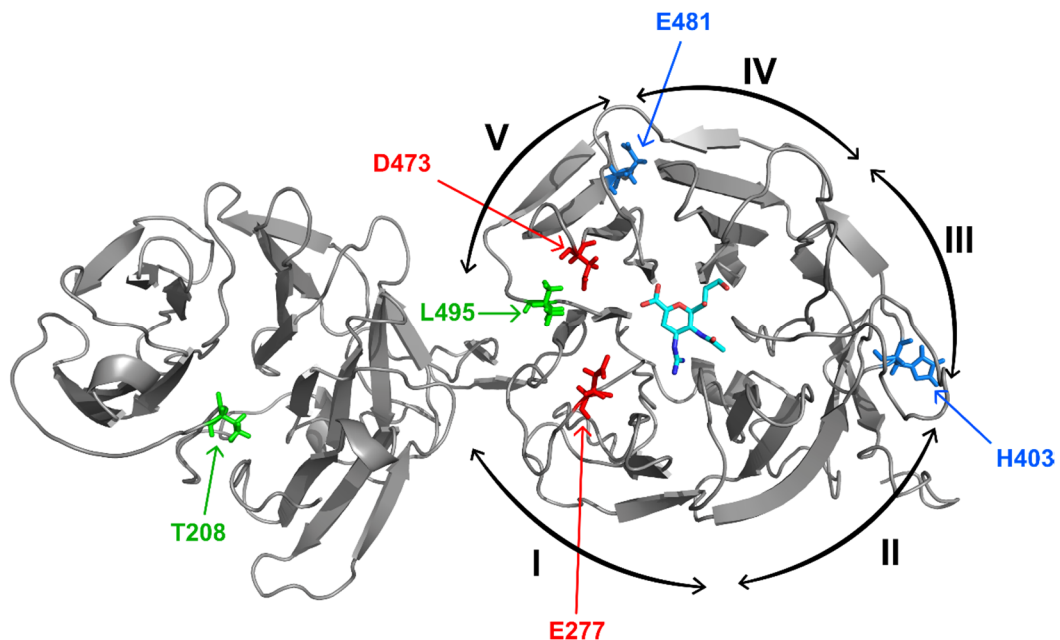


Figure 50 : Modélisation 3D de CaBmt3 en mode cartoon (gris) grâce au logiciel I-TASSER. Six cibles potentielles de mutagenèse dirigée, parmi les dix-sept identifiées, sont représentées à titre d'exemple. Deux résidus catalytiques nucléophile-base (rouge), deux résidus impliqués dans la spécificité de substrat α/β (bleu) et deux résidus impliqués dans l'activité polymérasique (vert). L'organisation 3D du domaine catalytique (à droite) semble correspondre à un β -propeller à cinq pales (flèches noires).

Cette structure, très symétrique, est composée de quatre à dix répétitions de quatre brins β anti-parallèles. Selon le nombre de répétitions, (composant les pales de l'hélice), la fonction de la protéine va varier. On retrouve par exemple des domaines de liaison à un ligand (quatre, cinq, six ou sept pales), une activité hydrolase (cinq, six ou sept pales) ou encore une fonction de signalisation (six, sept ou dix pales). Des anomalies au niveau de protéines porteuses de ces β -propellers ont néanmoins été associées à diverses pathologies chez l'Homme. Concernant CaBmt3, il semblerait qu'elle présente un β -propeller à cinq pales. Or, parmi les fonctions retrouvées, l'activité transférase n'est décrite qu'avec un β -propeller à cinq pales, comme c'est le cas pour la glutaminyl cyclase de *Xanthomonas campestris* par exemple (**Huang et al. 2010**). De plus, si l'on répète cette modélisation I-TASSER pour les autres CaBmt, on retrouve dans la grande majorité des cas cette organisation en β -propeller à cinq pales (pour les CaBmt1 à 7, mais pas pour CaBmt8 et CaBmt9). Ces éléments nous confortent donc dans le bien-fondé et la robustesse de cette modélisation 3D.

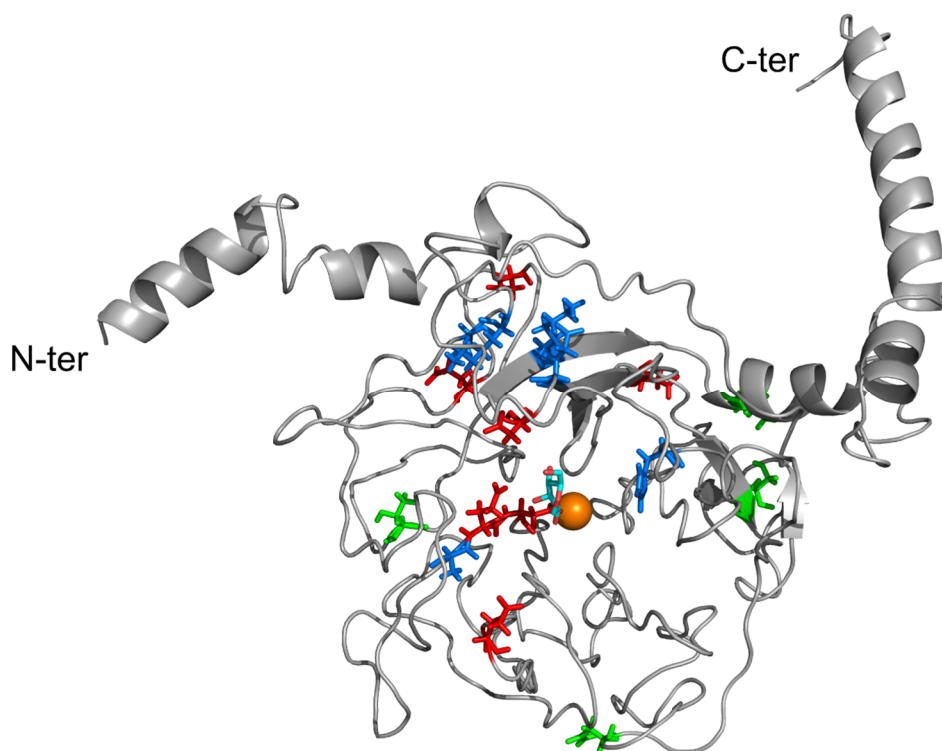


Figure 51 : Modélisation 3D du domaine catalytique de CaBmt3 grâce au logiciel I-TASSER. Au centre, identifiant potentiellement le site actif, sont représentés le substrat β -mannose (cyan) et l'ion divalent Mg^{2+} (orange). Parmi les dix-sept cibles de mutagenèse dirigée mises en évidence - résidus catalytiques nucléophile-base (rouge), résidus impliqués dans la spécificité α/β (bleu) et dans l'activité polymérase (vert) - seuls celles les plus proches du site actif seront choisies pour être mutées.

A partir de ce modèle, nous avons ainsi pu visualiser la position des dix-sept cibles de mutagenèse dirigée, et déterminer leurs positions respectives vis-à-vis du site actif prédit. Nous avons également réalisé la modélisation 3D par I-TASSER de la séquence C-terminale recouvrant le domaine catalytique (**Figure 51**). De façon certes moins nette, nous y retrouvons également une organisation en β -propeller, avec au centre, un substrat (du β -mannose) et un ion métallique divalent (le Mg^{2+}). Là encore, nous y plaçons les cibles de mutagenèse. Pour avoir un rôle clé dans le mécanisme catalytique, les résidus impliqués doivent être suffisamment proches du substrat au niveau du site actif, d'autant plus s'il s'agit des résidus supposés catalytiques. Nous avons donc choisi de privilégier l'étude des résidus les plus proches du site actif, écartant par là-même les résidus prédits comme étant les plus éloignés. Ainsi, au final, nous avons retenu :

- cinq résidus catalytiques nucléophile-base : E258, D259, E277, D473 et D483
- six résidus impliqués dans la spécificité α/β : K176, C178, A257, H403, E481 et K487
- deux résidus impliqués dans l'activité polymérase : T208, L495.

3.2 Essais enzymatiques : détermination de résidus catalytiques

3.2.1 Résidus catalytiques nucléophile-base

Afin de déterminer l'implication de ces cinq résidus (E258, D259, E277, D473 et D483) dans le mécanisme catalytique de CaBmt3, nous avons décidé de les muter de façon à supprimer leur fonction carboxyle, tout en préservant au maximum l'encombrement stérique initial. Ainsi, les acides glutamiques ont été mutés en glutamine (Q), et les acides aspartiques en asparagine (N). Après expression chez *E. coli* dans la souche SHuffle, nous avons ainsi obtenu les mutants suivants : E258Q, D259N, E277Q, D473N et D483N.

Ces expériences de mutagenèse dirigée ont été réalisées chez *E. coli*, à partir de la forme recombinante Bmt3, dont la caractérisation enzymatique a été décrite dans

la partie I de ce manuscrit (paragraphe 1.5). Le protocole d'expression est resté identique à celui employé pour la forme non mutée. Une fois exprimés, les mutants ont été purifiés sur colonne IMAC par chromatographie d'affinité, de manière similaire à ce qui a été décrit pour la forme sauvage (**Figure 52**). De même, des tests d'activité enzymatique ont été réalisés dans les conditions optimales définies précédemment, sur le substrat accepteur DP4M-b, et suivies par détection de fluorescence par HPLC-Fluo. Pour chaque mutant, la mesure densitométrique de l'intensité de signal observée par électrophorèse SDS/PAGE a été effectuée. La quantité d'enzyme présente dans chaque milieu réactionnel a ainsi été normalisée.

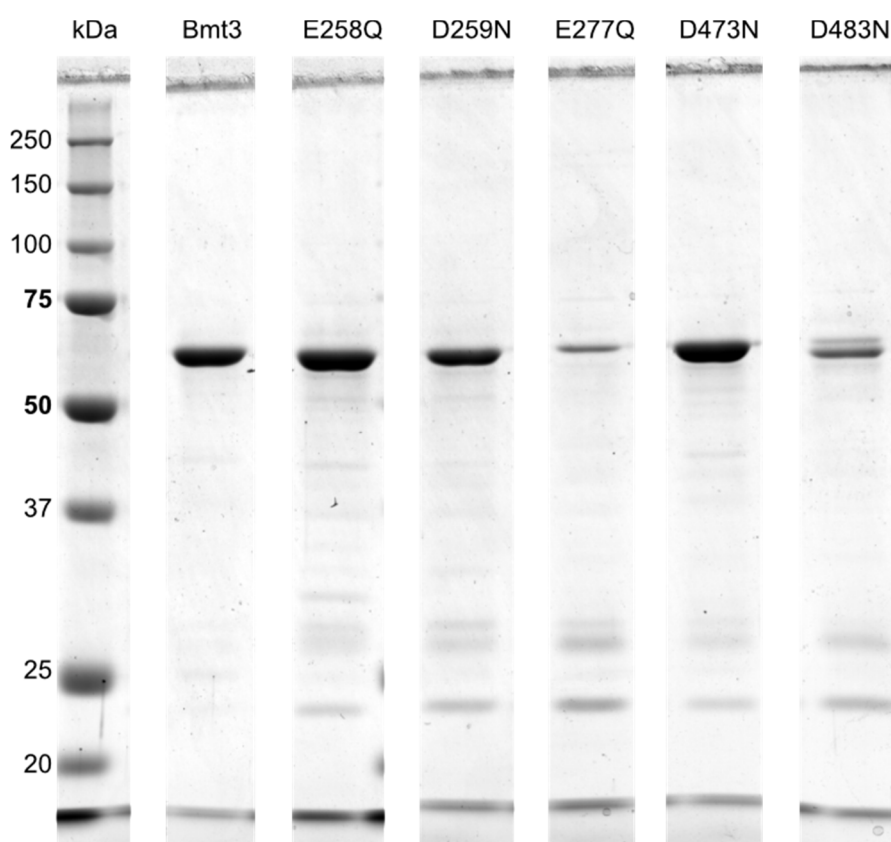


Figure 52 : Purification par chromatographie d'affinité des mutants catalytiques nucléophile-base de CaBmt3 exprimés chez *E. coli*. Electroforèse SDS/PAGE, coloration au bleu de Coomassie.

Afin de s'assurer que les mutations introduites n'ont pas perturbé le repliement de chaque mutant, nous avons vérifié leur degré d'agrégation par DLS, en comparant avec la forme Bmt3 sauvage (**Figure 53**).

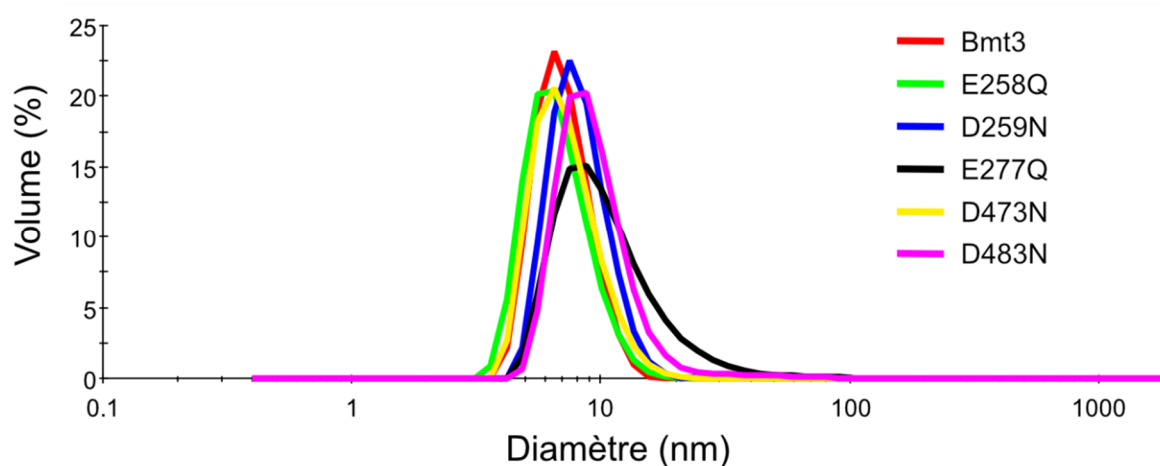


Figure 53 : Analyse de l'agrégation des mutants catalytiques nucléophile-base de CaBmt3 par DLS. Les cinq mutants en solution se présentent, tout comme la forme non mutée, sous forme monomérique d'environ 8-9 nm de diamètre.

Les résultats obtenus après 1h d'incubation sont à mettre en parallèle avec les résultats des contrôles négatif et positif (**Figure 54**). En présence de Bmt3 non mutée (contrôle positif), 100% du substrat DP4M-b est transformé en produit DP5M-b, comme attendu. De même, en présence de β -galactosidase, aucun substrat n'est consommé (contrôle négatif). Nous sommes donc en présence de deux profils d'activité opposés : soit tout le substrat est consommé, soit aucun substrat n'est consommé.

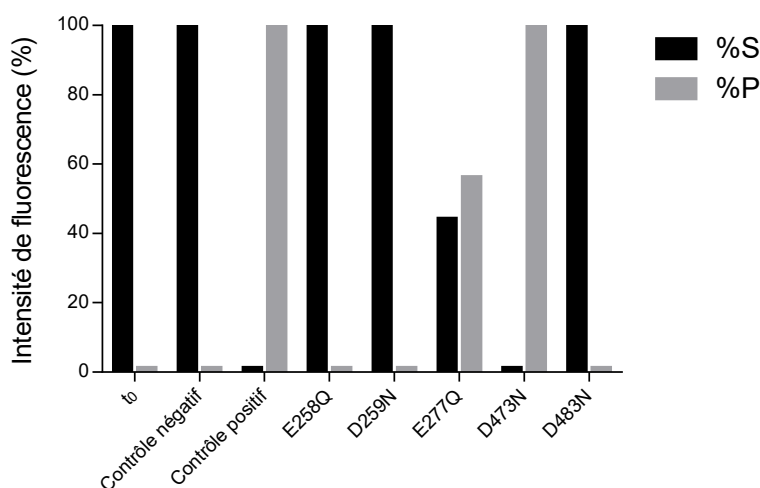


Figure 54 : Activités enzymatiques des mutants catalytiques de CaBmt3 sur le substrat DP4M-b après 1h d'incubation en conditions standards. Le contrôle négatif a été effectué grâce à la β -galactosidase, le contrôle positif et le to grâce à l'enzyme Bmt3 non mutée. Les réactions ont été suivies par détection de fluorescence par HPLC-Fluo. S : substrat consommé. P : produit formé.

Si on prend le résultat du mutant D473N, nous pouvons voir qu'il présente un profil d'activité identique à celui du contrôle positif, c'est-à-dire que tout le substrat a été consommé. Ceci est le signe que la mutation de l'Asp⁴⁷³ en Asn⁴⁷³ n'a pas modifié l'activité de Bmt3. Sa position sur le modèle 3D de CaBmt3 nous montre également qu'il semble éloigné du site actif (plus de 30Å). Nous en concluons donc que ce résidu Asp⁴⁷³ n'est vraisemblablement pas impliqué dans le mécanisme catalytique de CaBmt3.

En revanche, considérons à présent les profils d'activité des mutants E258Q, D259N et D483N. Ils correspondent au profil d'activité du contrôle négatif, c'est-à-dire qu'ils n'ont pas du tout consommé de substrat. La suppression de la fonction carboxyle de ces trois résidus semble donc avoir fortement perturbée l'activité de Bmt3. Leurs positionnements respectifs sur le modèle 3D montrent en outre des distances inférieures à 10Å par rapport au substrat. Les résidus Glu²⁵⁸, Asp²⁵⁹ et Asp⁴⁸³ semblent donc être nécessaires au mécanisme catalytique de CaBmt3.

Reste le cas du mutant E277Q. Nous pouvons voir qu'il présente un profil d'activité intermédiaire, puisqu'un peu plus de la moitié (56%) du substrat a été consommée. Une explication possible à ce profil intermédiaire pourrait être un effet indirect de la mutation sur le mécanisme catalytique. En effet, ce résidu est situé légèrement plus loin du substrat que les résidus Glu²⁵⁸, Asp²⁵⁹ et Asp⁴⁸³. A ce titre, sa mutation en glutamine a pu perturber l'organisation tridimensionnelle locale, modifiant ainsi légèrement l'orientation des acides aminés proches impliqués dans le mécanisme catalytique. L'activité observée pour ce mutant est donc diminuée, mais pas complètement abolie, car les résidus catalytiques, bien que légèrement réorientés, seraient toujours suffisamment en place pour assurer une activité résiduelle. Une autre explication serait que ce résidu est impliqué dans la fixation du substrat. Sa mutation entraînerait un déficit de charge au sein de ce site de fixation. L'activité résultante en serait donc diminuée.

3.2.2 Résidus impliqués dans la spécificité α/β

En sus de ces résidus catalytiques nucléophile-base, nous avons également identifié dans la séquence de CaBmt3 six résidus qui pourraient être impliqués dans

la spécificité de substrat. Afin de déterminer leur fonction, nous avons décidé de remplacer ces résidus par ceux qui sont retrouvés conservés dans les séquences des enzymes d'initiation CaBmt1, 2, 5 et 9. Par exemple, en reprenant la **figure 48**, nous avons identifié dans le rectangle continu noir la présence de résidus valine ou isoleucine dans les séquences des enzymes d'initiation, alors que dans les autres séquences, ils sont remplacés par des résidus proline ou alanine. En l'occurrence, pour CaBmt3, il s'agit de l'Ala²⁵⁷. Le but ici va donc être de muter cette Ala²⁵⁷ en Ile²⁵⁷ telle qu'elle est retrouvée chez CaBmt1. Ce faisant, nous espérons ainsi changer la spécificité de CaBmt3 d'un substrat possédant, à son extrémité non réductrice, un β -1,2 mannose, à un substrat possédant un α -1,2 mannose. Conscients de la difficulté d'un tel changement, nous avons également choisi de réaliser des mutations multiples (quintuple et sextuple mutants) en plus des six mutants simples.

Au final, nous avons donc produit chez *E. coli* les mutants suivants : K176H, C178I, A257I, H403A, E481R, K487D, 5M (quintuple mutant comprenant toutes les mutations sauf K487D) et 6M (sextuple mutant comprenant toutes les mutations) (**Figure 55**).

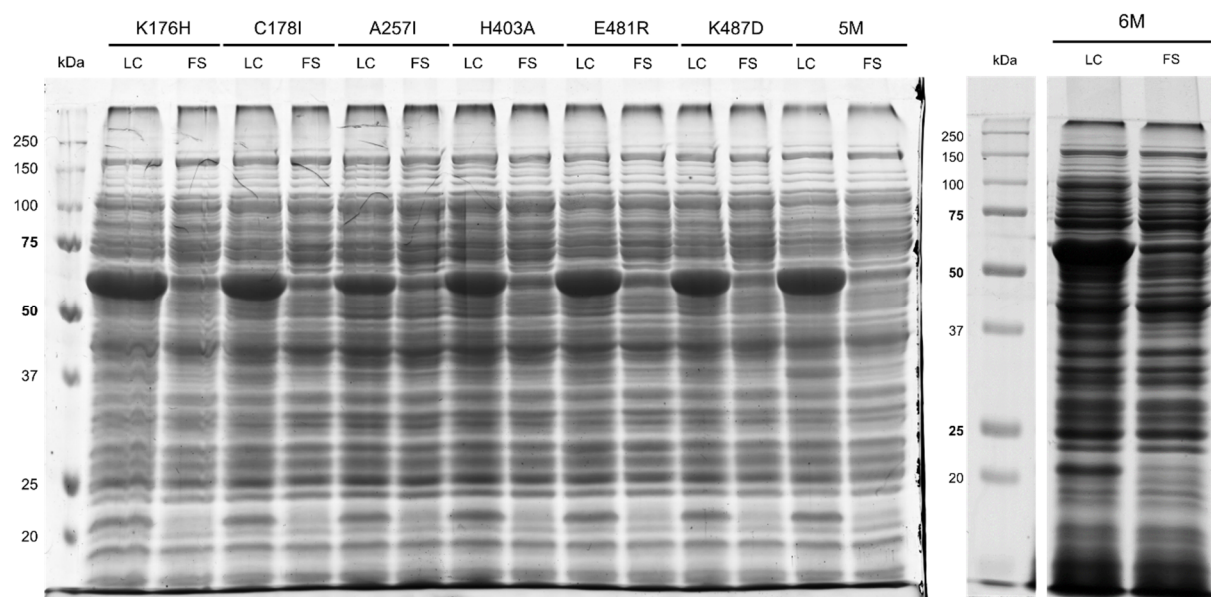


Figure 55 : Expression chez *E. coli* des mutants simples et multiples de la spécificité de substrat de CaBmt3. Electrophorèse SDS/PAGE, coloration au bleu de Coomassie.
 5M : quintuple mutant (K176H/C178I/A257I/H403A/E481R).
 6M : sextuple mutant (K176H/C178I/A257I/H403A/E481R/K487D).
 LC : lysat cellulaire. FS : fraction soluble.

Leur présence dans le lysat cellulaire a été confirmée par western blot grâce à un anticorps polyclonal anti-Bmt3 dirigé contre une séquence présente au niveau du domaine catalytique C-terminal (mais non concernée par les mutations) (**Figure 56**).

Une fois à disposition, l'activité enzymatique de ces mutants de Bmt3 a été analysée en présence du substrat DP3M-a (Man α 1-2Man α 1-2Man-Mantyl). Si la mutation insérée n'a pas d'effet sur la spécificité de substrat, l'enzyme mutée ne sera pas capable d'utiliser ce substrat dépourvu d'un mannose lié en β -1,2 à son extrémité non réductrice. En revanche, si l'enzyme mutée est capable de former un produit de DP supérieur et porteur d'un mannose lié en β -1,2 à son extrémité non réductrice, alors nous aurons réussi à modifier la spécificité de substrat de l'enzyme Bmt3.

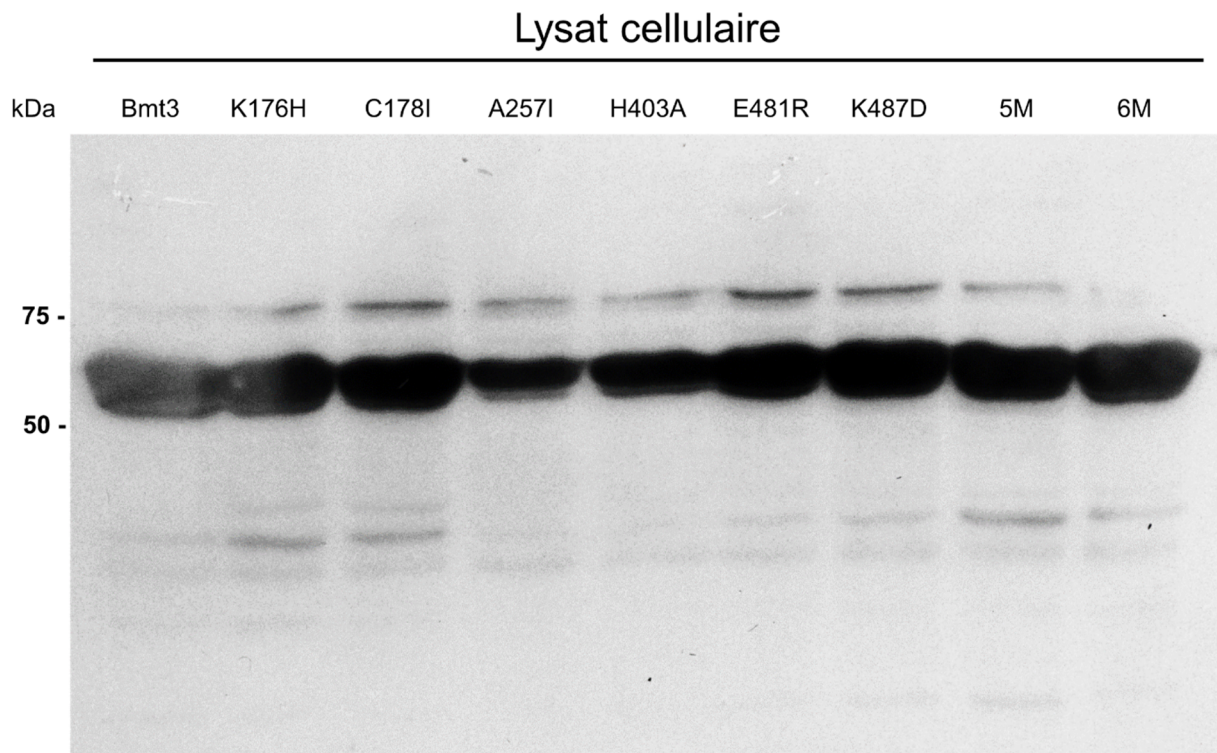


Figure 56 : Expression chez *E. coli* des mutants simples et multiples de la spécificité de substrat de CaBmt3. Détection dans le lysat cellulaire par western blot grâce à un anticorps anti-Bmt3.

Les réactions ont été effectuées en conditions standards, pendant 48h. La quantité de chaque enzyme mutée introduite dans son milieu réactionnel a été normalisée par densitométrie, comme décrit précédemment. Les résultats ont été obtenus par mesure de l'intensité de fluorescence par HPLC-Fluo.

Il apparaît très clairement qu'aucune enzyme mutée n'est parvenue à utiliser le DP3M-a comme substrat accepteur. Aucun signal de DP supérieur n'est visible sur les chromatogrammes (**Figure 57**). Le seul signal visible est celui du substrat accepteur DP3M-a.

Pour essayer d'aller un peu plus loin dans l'exploitation de ces mutants de la spécificité de substrat α/β , nous avons voulu observer leur réaction sur le substrat accepteur DP4M-b (Man β 1-2Man α 1-2Man α 1-2Man-Mantyl), substrat optimal de la forme Bmt3 non mutée.

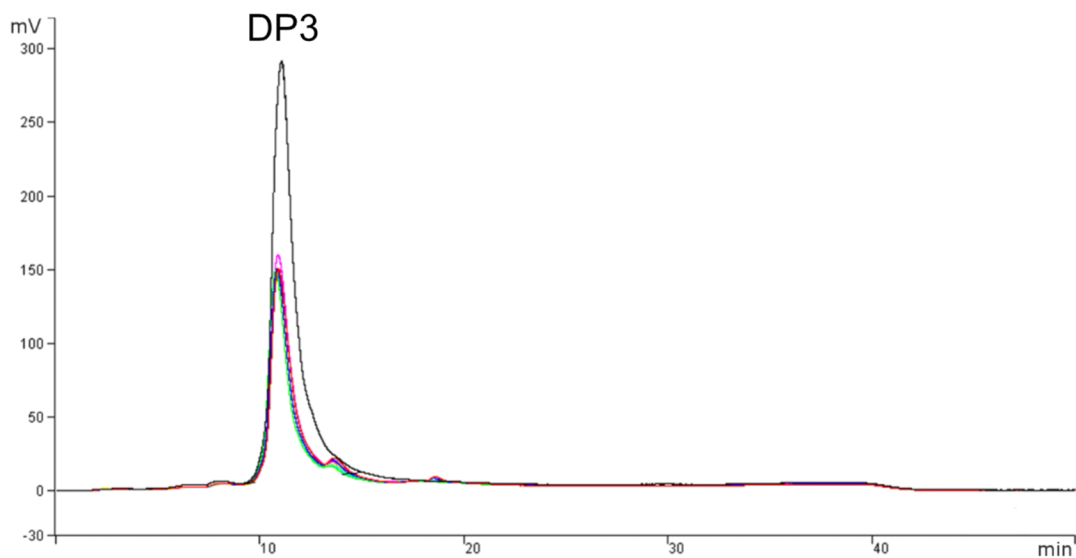


Figure 57 : Réactions enzymatiques des mutants simples, 5M et 6M de la spécificité de substrat α/β sur le substrat accepteur DP3M-a. Après 48h d'incubation en conditions standards, aucun signal de DP supérieur n'est observé. La courbe noire représente la composition du milieu réactionnel à t_0 .

Les activités enzymatiques ont été suivies par HPLC-Fluo et comparées à celles obtenues pour Bmt1, Bmt3 et la β -galactosidase (contrôle négatif) (**Figure 58**). Nous pouvons voir qu'après 1h d'incubation, Bmt1 n'a été capable de transformer qu'une infime partie du substrat accepteur en produit de DP supérieur (profil quasiment identique à celui retrouvé pour le t_0 et le contrôle négatif). Bien que Bmt1 soit capable *in vitro* de catalyser le transfert d'un deuxième résidu β -1,2-mannosyle, nous avons vu qu'il fallait au moins 24h pour commencer à observer un signal chromatographique correspondant. Il est donc normal d'observer moins de 1% de substrat consommé par Bmt1 au bout d'1h. De même, Bmt3 présente un profil d'activité conforme à ce qui a

été décrit précédemment, à savoir une consommation quasi-complète (90%) du substrat accepteur.

Observons maintenant les profils d'activité des mutants simples. Le mutant K176H, et dans une moindre mesure C178I, présente un profil similaire à celui de Bmt3. Ceci veut donc dire que les résidus Lys¹⁷⁶ et Cys¹⁷⁸ ne semblent pas avoir d'importance particulière ni dans le mécanisme catalytique de Bmt3, ni dans son repliement. Ils peuvent en revanche nous servir éventuellement de contrôle de notre protocole de mutagenèse dirigée, confirmant que le protocole en lui-même n'a pas d'impact notable sur l'activité de l'enzyme mutée qui en résulte. Les effets ainsi observés sont donc uniquement imputables à la présence de la mutation.

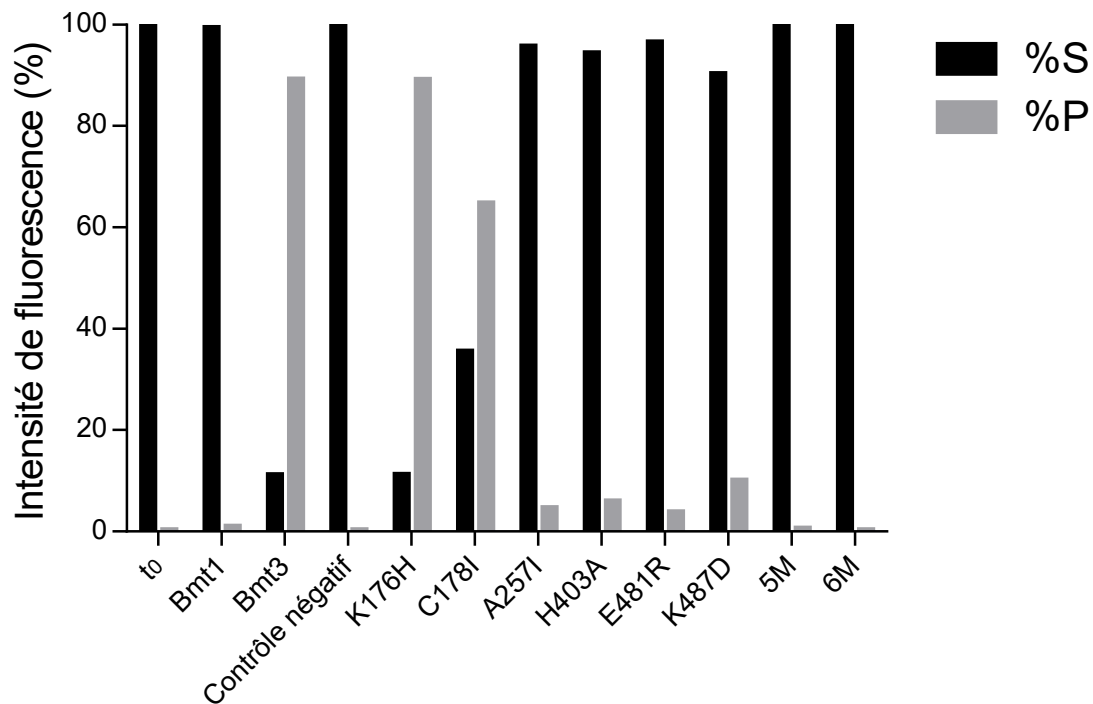


Figure 58 : Activités enzymatiques des mutants de Bmt3 simples, 5M et 6M de la spécificité de substrat α/β sur le substrat accepteur DP4M-b après 1h d'incubation en conditions standards. Le contrôle négatif a été effectué grâce à la β -galactosidase, le t_0 grâce à l'enzyme Bmt3. Les réactions ont été suivies par détection de fluorescence par HPLC-Fluo. S : substrat consommé. P : produit formé.

Pour ce qui est des autres mutants simples, A257I, H403A, E481R et K487D, leur profil d'activité n'est pas complètement nul comme il peut l'être pour Bmt1 ou le contrôle négatif, mais nous observons cependant une nette baisse de l'activité enzymatique. Le substrat accepteur n'est ainsi consommé qu'à 5-10%. Le placement

de ces résidus sur la modélisation 3D de CaBmt3 obtenue par I-TASSER nous montre qu'ils se trouvent relativement proches du site actif, et donc des résidus catalytiques identifiés dans le chapitre précédent. Ainsi, comme cela a été envisagé pour le résidu Glu²⁷⁷ précédemment, il est possible que la mutation de ces résidus ait entraîné une perturbation locale du repliement, conduisant à une modification de l'environnement du site actif et donc du bon déroulé du mécanisme catalytique.

Enfin, les mutants multiples 5M et 6M présentent quant à eux des profils d'activité identiques à ceux de Bmt1 et du contrôle négatif, c'est-à-dire que moins de 1% du substrat accepteur a été consommé. L'accumulation des mutations simples, notamment A257I, H403A, E481R et K487D, au sein d'une même forme mutée a dû perturber suffisamment le repliement du site actif pour que l'enzyme perde totalement son activité par rapport à la forme non mutée.

Pour conclure, l'identification *in silico* de cibles de mutagenèse dirigée par alignement multiple et modélisation prédictive nous a amené à déterminer la contribution de certains résidus à l'activité β -1,2-mannosyltransférase de CaBmt3. Ainsi, les résidus Glu²⁵⁸, Asp²⁵⁹ et Asp⁴⁸³ semblent être directement impliqués dans le mécanisme catalytique. Nous n'avons néanmoins pas réussi à mettre en évidence de résidus pouvant être impliqués dans la spécificité de substrat accepteur. Enfin, faute de temps, nous n'avons pas pu commencer l'étude des résidus Tyr²⁰⁸ et Leu⁴⁹⁵ et leur éventuelle implication dans l'activité polymérase de CaBmt4 et CaBmt6.

4 Confrontation aux données expérimentales

4.1 Alignement entre modélisation et structure connue

Lors de la modélisation par I-TASSER, le logiciel nous fournit la liste des meilleures structures résolues sur lesquelles il s'est basé pour construire le modèle donné. Ainsi, pour le domaine catalytique de Bmt3, la structure résolue correspondant le plus à la modélisation proposée correspond à l'enzyme 4-O- β -D-mannosyl-D-glucose phosphorylase (3WAS dans la base de données PDB). Il s'agit d'une glycosidase de *Bacteroides fragilis*, appartenant à la famille GH130 dans la classification CAZy, qui catalyse la dégradation des mannanes grâce à une activité β -

1,4-mannosylglucose phosphorylase (**Nakae *et al.* 2013**) (**Figure 59A**). Il est décrit que les membres de cette famille GH130 disposent de résidus catalytiques bien conservés, notamment deux acides aspartiques qui interviendraient dans le mécanisme par inversion propre à ces enzymes. En l'occurrence, pour 3WAS, il s'agit des résidus D131 et D344.

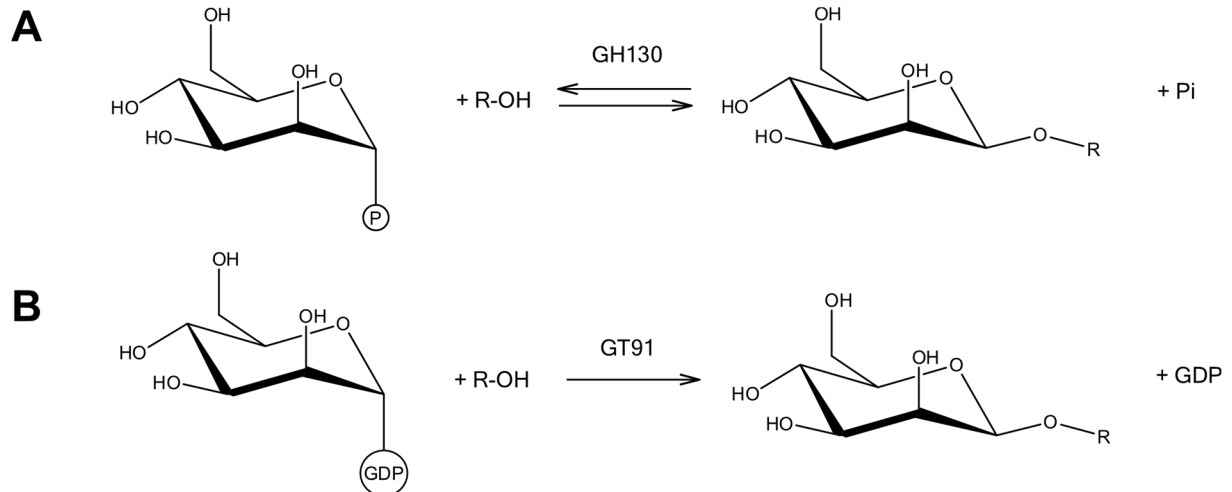


Figure 59 : Analogie des mécanismes réactionnels entre GH130 et GT91. **A** : la famille GH130 regroupe des β -oligomannane phosphorylases possédant un mécanisme par inversion. **B** : la famille GT91 regroupe des β -mannosyltransférases dont le mécanisme semble également être par inversion. Pi : phosphate inorganique. GDP : guanosine diphosphate.

Si l'on essaie de généraliser le mécanisme réactionnel des membres de cette famille GH130, on peut remarquer qu'elles sont capables de catalyser la formation d'un résidu mannosyle α -phosphorylé en position 1 à partir d'un oligosaccharide lié en β et de phosphate inorganique. Cette réaction est réversible pour les glycoside hydrolases. En se penchant sur la réaction catalysée par les membres de la famille GT91, nous nous apercevons qu'elles sont capables, à partir d'un sucre activé comme le GDP-mannose (lié en α), de catalyser le transfert en β de ce résidu mannosyle sur un oligosaccharide (**Figure 59B**). La ressemblance, originale, entre ces deux mécanismes pourrait ainsi nous aiguiller dans la compréhension du mécanisme catalytique des GT91. La confrontation entre la structure 3D de 3WAS et notre modèle prédictif de CaBmt3 pourrait nous apporter ainsi de nouveaux éclairages.

En superposant la structure 3D de 3WAS avec la modélisation du domaine catalytique de CaBmt3, nous retrouvons un très bon alignement, ce qui est logique puisque le modèle proposé par I-TASSER est basé en partie sur cette structure. De

manière intéressante, nous constatons que les deux résidus catalytiques de 3WAS s'alignent sur deux résidus de CaBmt3 : D259 et D483 (**Figure 60**). Ces deux résidus faisaient partie des cibles de mutagenèse dirigée. Leur mutation en asparagine entraînait alors une perte totale d'activité β -1,2-mannosyltransférase.

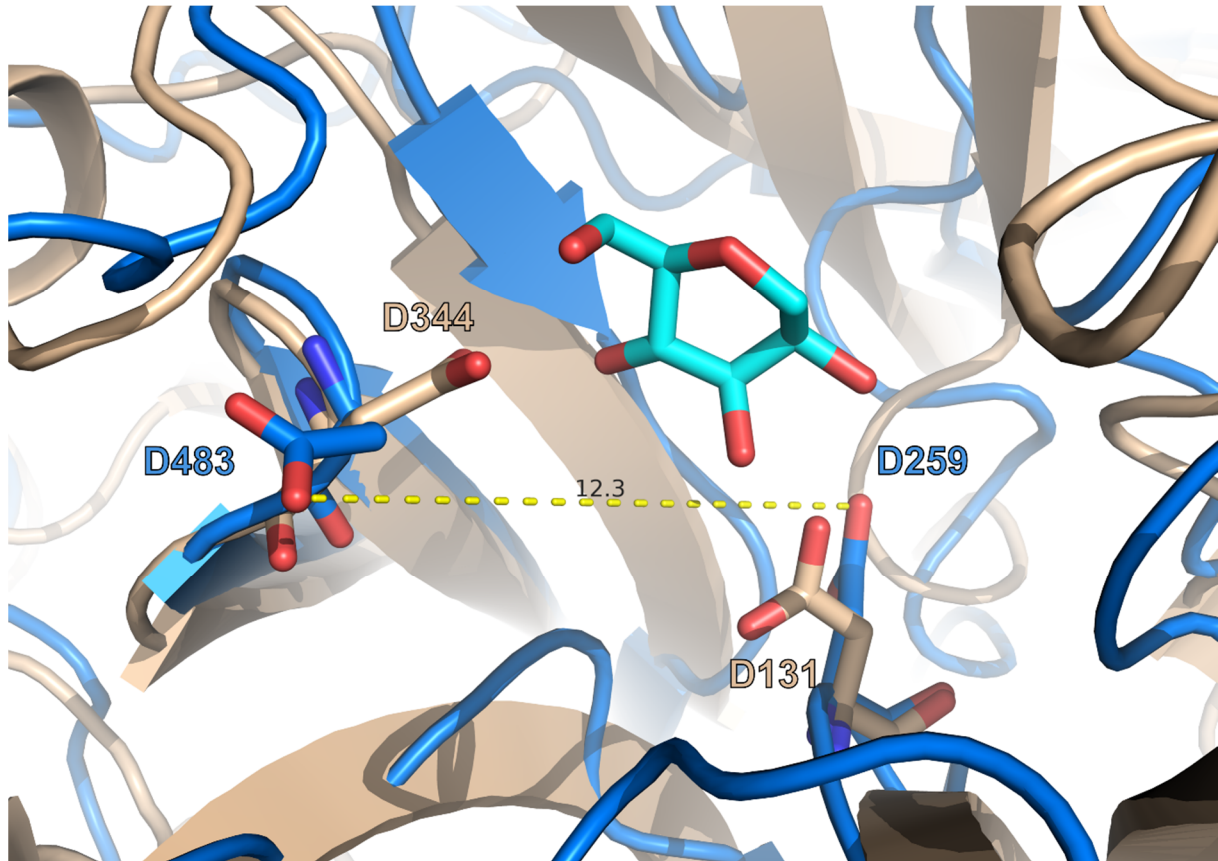


Figure 60 : Alignement tridimensionnel entre la structure résolue de 3WAS (marron clair) et le domaine catalytique de CaBmt3 (bleu). La vue est centrée au niveau du site actif où se trouve le substrat β -mannose (cyan). Les résidus catalytiques de 3WAS (D131 et D344) s'alignent avec les résidus D259 et D483 de CaBmt3. La distance entre ces résidus D259 et D483 est représentée en pointillés jaunes.

De plus, il est décrit dans la littérature que le mécanisme catalytique, par inversion ou par rétention, opéré par une glycoside hydrolase va dépendre de la distance entre deux résidus catalytiques (**Davies & Henrissat 1995**). Ainsi, pour un mécanisme par rétention, cette distance est de 5.5Å, tandis que pour un mécanisme par inversion, elle est d'environ 10Å. Même si le mécanisme catalytique des glycosyltransférases ne nécessite pas la présence de deux résidus catalytiques, il peut être intéressant d'essayer de visualiser la distance qui sépare ces deux résidus D259 et D483 sur notre modèle. La mesure de la distance entre ces résidus tels qu'ils nous sont donnés sur la modélisation I-TASSER est de 12.3Å. Cette valeur proche de 10Å,

d'autant plus si l'on considère qu'il ne s'agit pas d'une structure résolue mais d'une modélisation prédictive, nous conforte dans l'idée que ces deux résidus D259 et D483 pourraient être impliqués dans un mécanisme catalytique par inversion, qui pourrait se rapprocher de ce qui a été montré chez les GH130.

4.2 Diffusion des rayons X aux petits angles

Malgré nos efforts répétés, il nous a jusqu'à présent été impossible d'obtenir des cristaux de CaBmt3. En revanche, une autre technique liée aux rayons X a pu être exploitée afin de récolter des renseignements sur la forme de CaBmt3. La diffusion des rayons X aux petits angles, ou SAXS (Small Angle X-ray Scattering), permet d'obtenir des informations sur l'organisation tridimensionnelle générale d'une protéine, en solution. Cette technique nécessite une protéine pure en solution homogène et monodisperse dont la concentration minimale est de 2 mg/mL. Pour cela, une collaboration avec le Dr Coralie Bompard a été mise en place. A ce titre, nous lui avons fourni la forme recombinante de Bmt3 exprimée chez *E. coli*, forme dépourvue des domaines cytosolique et transmembranaire N-terminaux telle que décrite précédemment, à une concentration de 8 mg/mL. Elle a ainsi pu effectuer sur celle-ci des mesures SAXS. Ces données expérimentales, exploitées de manière encore préliminaire par le Dr Coralie Bompard, lui ont permis de nous fournir *ab initio* une première ébauche de modèle nous montrant l'organisation tridimensionnelle potentiellement prise par Bmt3 en solution (**Figure 61**). Nous constatons ainsi que Bmt3 semblerait présenter un domaine C-terminal globulaire délimitant en son centre une cavité. La superposition de ces données SAXS au modèle proposé par I-TASSER pour la forme entière CaBmt3 nous montre que côté C-terminal, le domaine catalytique présentant ce repliement en β -propeller à cinq pales décrit précédemment semblerait s'aligner convenablement aux données obtenues expérimentalement (**Figure 61**).

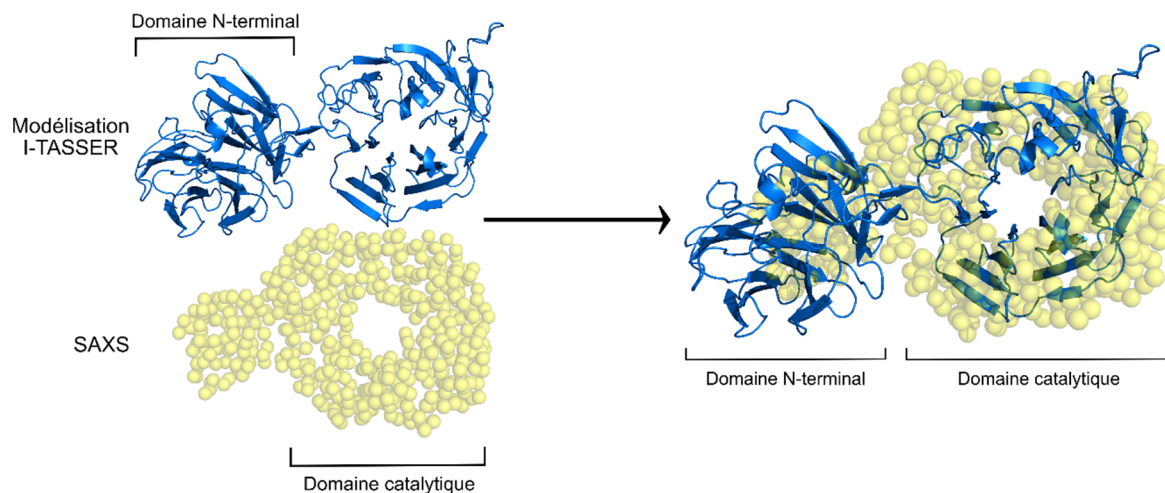


Figure 61 : Représentations graphiques de la structure tridimensionnelle de CaBmt3. En haut à gauche : modélisation 3D sous forme cartoon de la forme entière de CaBmt3 obtenue *in silico* par le logiciel de prédiction I-TASSER. En bas à gauche : représentation préliminaire sous forme de sphères des données obtenues par SAXS (Small Angle X-ray Scattering) sur la forme recombinante de CaBmt3 tronquée de 55 acides aminés côté N-terminal. A droite : superposition des deux représentations.

En revanche, la prédiction de repliement côté N-terminal ne correspond pas du tout au modèle préliminaire calculé grâce aux données SAXS. Cette excroissance N-terminale pourrait correspondre au domaine tige présent dans la forme recombinante utilisée pour ces manipulations. Ce domaine tige est prédit comme étant un domaine désordonné. Cela pourrait expliquer une moins bonne qualité des données SAXS pour cette partie N-terminale, et donc un calcul du modèle quelque peu biaisé pour cette excroissance N-terminale.

Ces données expérimentales obtenues sur CaBmt3, encore très préliminaires, pourraient donc venir appuyer l'observation qui avait été faite *in silico* sur toutes les CaBmt concernant le repliement du domaine catalytique en β -propeller à cinq pales. De plus, le tunnel délimité par ce repliement semblerait correspondre au site actif de l'enzyme mis en évidence par les alignements et la mutagenèse dirigée.

En conclusion, sur la base de la modélisation I-TASSER des CaBmt, la production de mutants du site actif de CaBmt3, la comparaison avec des structures tridimensionnelles résolues et les données expérimentales SAXS préliminaires, nous proposons que le mécanisme catalytique de CaBmt3 pourrait être un mécanisme par inversion faisant probablement intervenir au niveau de son site actif les résidus D259

et D483. Sur base de modélisation, le repliement en β -propeller à cinq pales (caractéristique d'une activité transférase) retrouvé chez CaBmt3 pourrait être présent chez quasiment toutes les CaBmt. Il est donc envisageable que les membres de la famille GT91 présentent également un mécanisme catalytique par inversion et que le repliement caractéristique de leur domaine catalytique soit un β -propeller à cinq pales. Afin de confirmer ces hypothèses, il apparaît néanmoins essentiel de parvenir à cristalliser le domaine catalytique d'un représentant de cette famille, si possible en présence de son substrat, afin de résoudre sa structure tridimensionnelle au niveau atomique.

Partie III :

Caractérisation enzymatique préliminaire de CaBmt4

La caractérisation des enzymes CaBmt1 et CaBmt3 nous a permis de mieux comprendre les voies de β -1,2-mannosylation de la fraction acido-stable du PPM. CaBmt1 ajoute le premier résidu β -Man du motif, tandis que CaBmt3 l'allonge. Cependant, nous avons mis en évidence que CaBmt3 n'était capable d'ajouter, *in vitro*, qu'un seul résidu β -Man sur son substrat accepteur. Or, l'analyse structurale du PPM a montré que celui-ci pouvait présenter des motifs β -Man de plus de deux résidus, et que l'enzyme CaBmt4 semblait être responsable de l'élongation de ce motif sur la fraction acido-labile (**Suzuki *et al.* 1995; Mille *et al.* 2008**) (**Figure 62**). La question suivante s'est donc posée : CaBmt4 est-elle également capable d'ajouter un ou plusieurs résidus β -Man sur la fraction acido-stable, à la suite de CaBmt3 ?

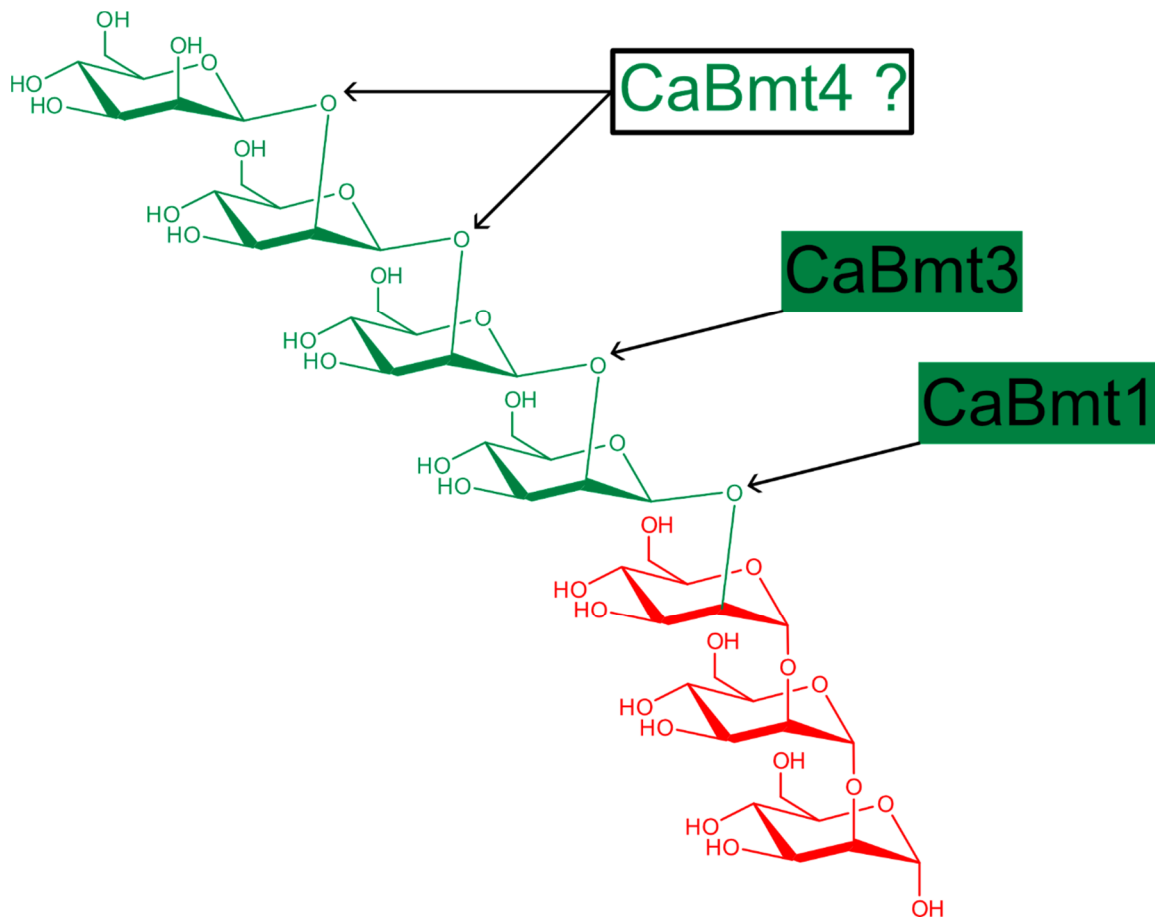


Figure 62 : Représentation schématique de la cascade enzymatique potentiellement responsable de la β -mannosylation de la fraction acido-stable du PPM de *C. albicans*.

1 Expression chez *E. coli* à partir d'un gène synthétique

Afin de gagner du temps dans l'expression de CaBmt4 chez *E. coli*, nous ne sommes pas partis de l'ADN génomique comme nous l'avons fait pour CaBmt1 et CaBmt3. La construction plasmidique a été effectuée grâce au service GeneArt Gene Synthesis de ThermoFisher Scientific. Une séquence de 2265 paires de bases codant pour une forme tronquée de CaBMT4, dépourvue des domaines cytoplasmique et transmembranaire comme cela avait été entrepris pour CaBmt1 et CaBmt3, a ainsi été insérée dans le vecteur d'expression pET151/D-TOPO (**Figure 63**). La souche d'expression SHuffle a ensuite été transformée par ce plasmide pET151-BMT4 selon le protocole établi pour Bmt3.

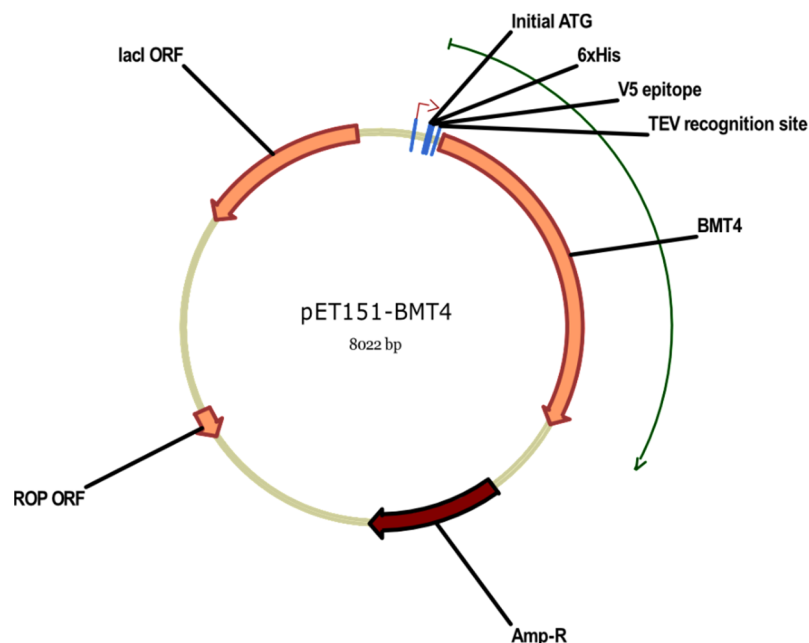


Figure 63 : Représentation du gène BMT4 inséré dans le vecteur pET151/D-TOPO pour son expression dans la souche SHuffle d'*E. coli*.

L'expression de Bmt4 a été également réalisée selon de protocole de production décrit précédemment pour Bmt3. Ne sachant pas au préalable comment cette enzyme allait se comporter en solution une fois les cellules lysées, nous nous sommes placés dans les conditions de lyse déterminées pour Bmt3, à savoir l'ajout du détergent DDM à 0.5%. Comme ce qui a été observé lors des différentes productions de Bmt1 ou de Bmt3 chez *E. coli*, nous constatons que Bmt4 est très bien exprimée dans le lysat cellulaire (à des taux comparables à ceux obtenus pour Bmt3), mais

qu'une grande partie reste dans le culot et ne se retrouve pas dans la fraction soluble (**Figure 64**).

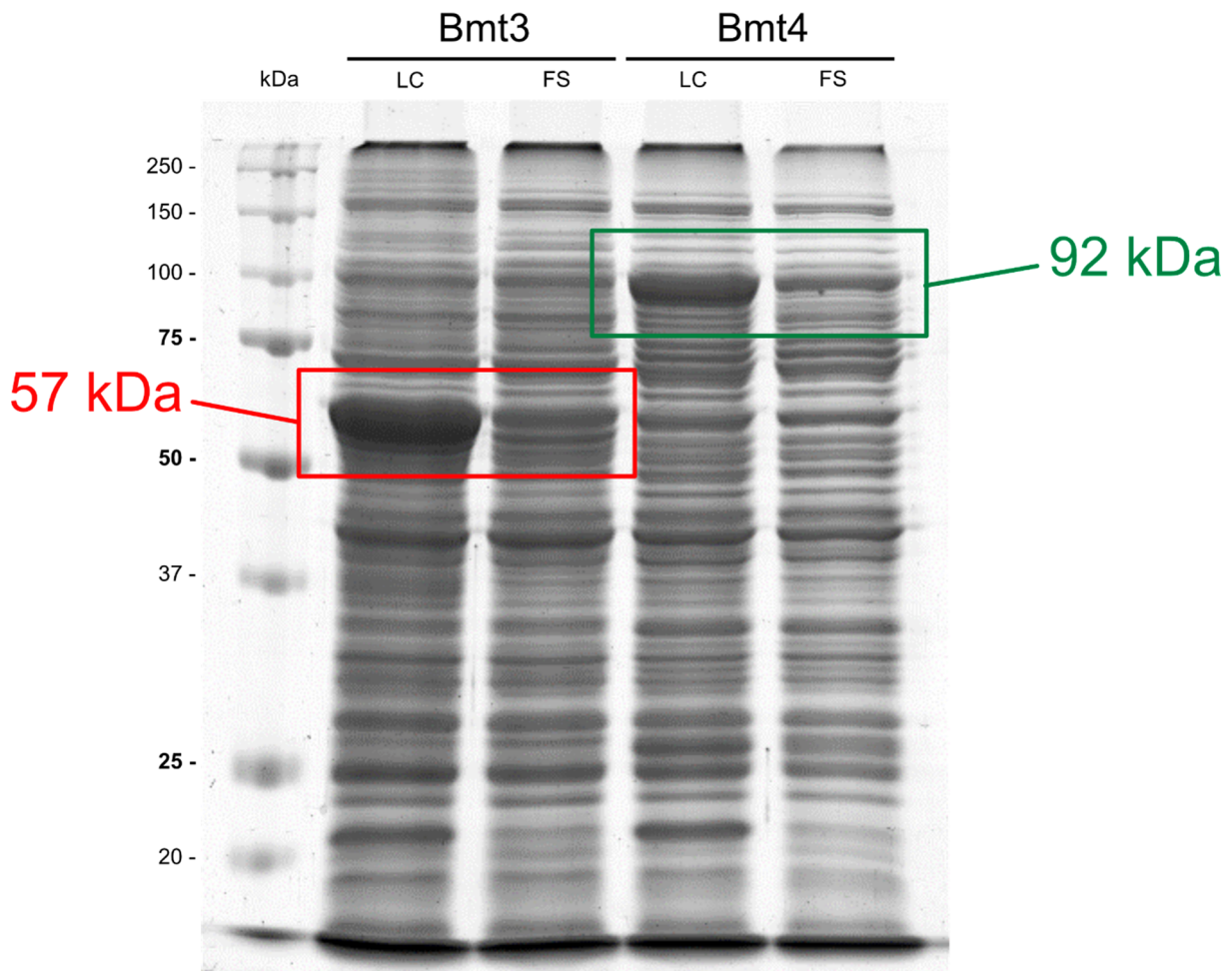


Figure 64 : Expression de Bmt3 et Bmt4 chez *E. coli* dans la souche SHuffle. La forme recombinante de Bmt3, d'une masse moléculaire théorique de 57 kDa, est bien retrouvée dans le lysat cellulaire (LC) et dans une moindre mesure dans la fraction soluble (FS), tout comme la forme recombinante de Bmt4, d'une masse moléculaire théorique de 92 kDa). Electrophorèse SDS/PAGE, coloration au bleu de Coomassie.

Nous avons également cherché à optimiser la solubilité de Bmt4 dans différentes conditions. Divers tampons de lyse ont ainsi été employés, contenant chacun un détergent différent. Les résultats ont ensuite été analysés par électrophorèse SDS/PAGE et par western blot, grâce à l'utilisation d'un anticorps dirigé contre l'étiquette 6xHis N-terminale (**Figure 65**).

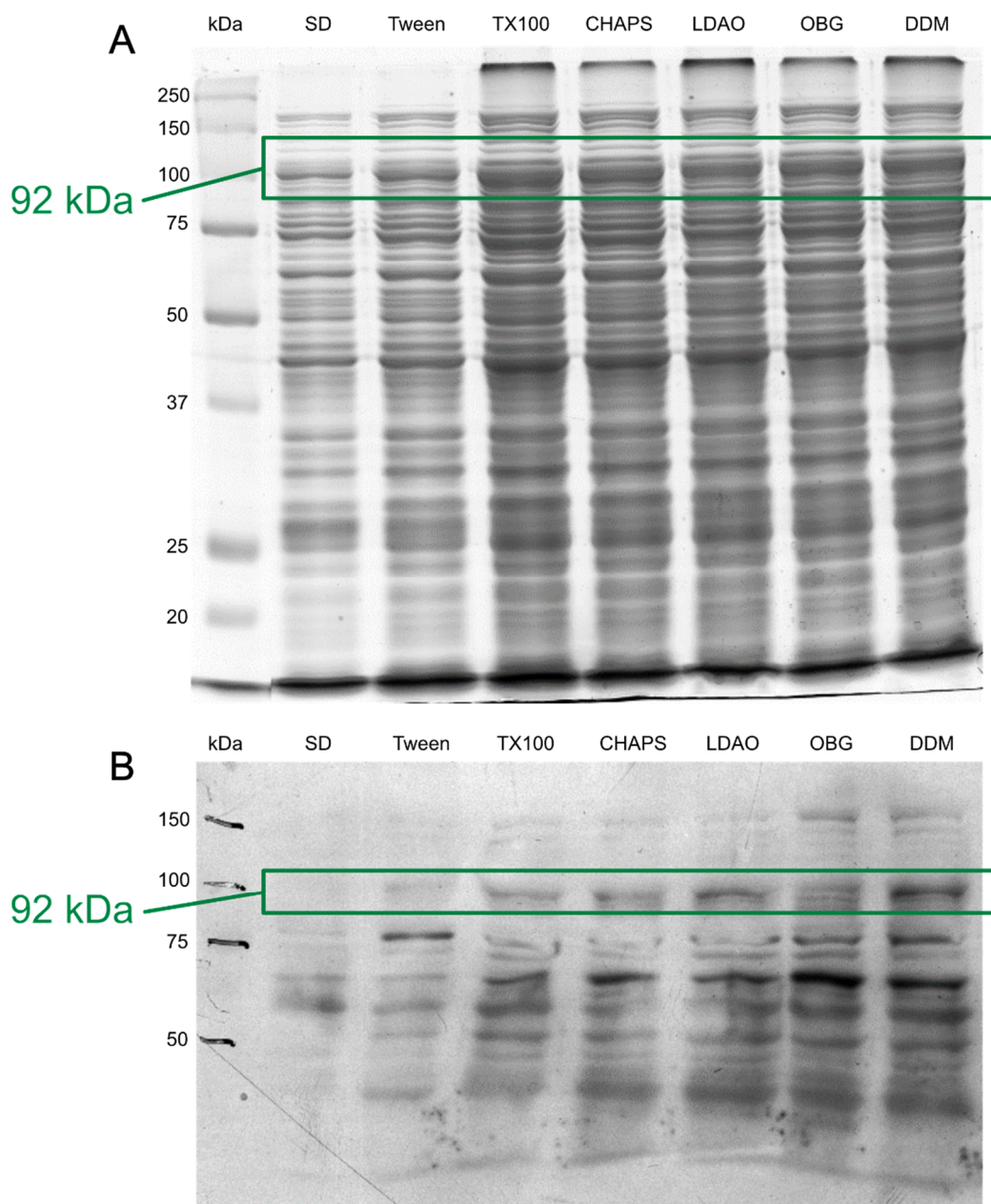


Figure 65 : Solubilisation de la protéine recombinante Bmt4 surexprimée dans la souche SHuffle en présence de différents détergents. **A** : électrophorèse SDS/PAGE, coloration au bleu de Coomassie. Dans le lysat cellulaire, Bmt4 est retrouvée dans la majorité des conditions. **B** : Western-blot anti-6xHis. Dans les fractions solubles, le DDM et le LDAO solubilisent correctement Bmt4, mais pas le Tween20. SD : sans détergent ; TX100 : Triton X100 ; DDM : dodécyl- β -D-maltoside ; OBG : octyl- β -glucoside ; HM : heptyl-mannose ; LDAO : dodécyl-NN-diméthylamine-N-oxyde.

Nous avons ainsi la confirmation que le DDM à 0.5% est le détergent le plus efficace pour la solubilisation de Bmt4. Le LDAO peut éventuellement être utilisé.

2 Paramètres optimaux et spécificité de substrat : essais préliminaires

L'étape suivante dans la caractérisation enzymatique de CaBmt4 est de déterminer ses paramètres optimaux de réaction ainsi que sa spécificité de substrat, comme cela a été entrepris pour CaBmt1 et CaBmt3.

Dans le cadre de ces travaux de thèse, nous n'avons abordé que les prémices de cette étude. Nous avons réalisé des essais préliminaires afin de déterminer si l'enzyme Bmt4 produite était bel et bien active. Pour cela, nous avons réalisé deux types de réaction, avec deux substrats différents. Dans un premier temps, nous avons fait agir Bmt3 sur son substrat optimal, le DP4M-b ($\text{Man}\beta 1\text{-}2\text{Man}\alpha 1\text{-}2\text{Man}\alpha 1\text{-}2\text{Man}\alpha\text{-Mantyl}$). Une fois cette réaction terminée, le milieu réactionnel résultant contient désormais le produit de la réaction, le DP5M-b ($\text{Man}\beta 1\text{-}2\text{Man}\beta 1\text{-}2\text{Man}\alpha 1\text{-}2\text{Man}\alpha 1\text{-}2\text{Man}\alpha\text{-Mantyl}$). Ce produit peut alors théoriquement servir de substrat à Bmt4. Dans un deuxième temps, nous avons fait agir Bmt4 sur un tétramannoside lié en β -1,2 et couplé à la 2-aminopyridine. Ce composé a été préparé par le Dr Ghenima Sfihi-Loualia au cours de sa thèse par extraction et purification de la fraction acido-labile du PPM issu d'une souche de *C. albicans* délétée de son gène BMT1, puis marquage à la 2-aminopyridine. Ces deux réactions ont été suivies par HPLC-Fluo.

La première réaction de Bmt4 sur le substrat DP5M-b a été réalisée sur 24h, avec des temps intermédiaires à 1h et 8h (**Figure 66**). Nous constatons que même au bout de 24h d'incubation, très peu de substrat a été consommé. Néanmoins, il est possible de visualiser l'apparition de signaux à des temps de rétention supérieurs par rapport au substrat (à 21, 23, 26 et 29 minutes environ). Ces signaux pourraient correspondre à des produits de DP supérieur formés par Bmt4 à partir du DP5M-b (donc potentiellement des produits de DP6, DP7, DP8 et DP9). Le signal DP6, déjà présent à t_0 (vraisemblablement un produit contaminant présent dans le milieu réactionnel issu de la réaction de Bmt3 sur le DP4M-b), devient de plus en plus intense avec le temps d'incubation. Les signaux DP7 et DP8, absents à t_0 , ne commencent à

apparaître qu'à partir de 8h d'incubation, et sont à leur maximum après 24h d'incubation. Enfin, le signal DP9 est le plus intense et apparaît dès 1h d'incubation.

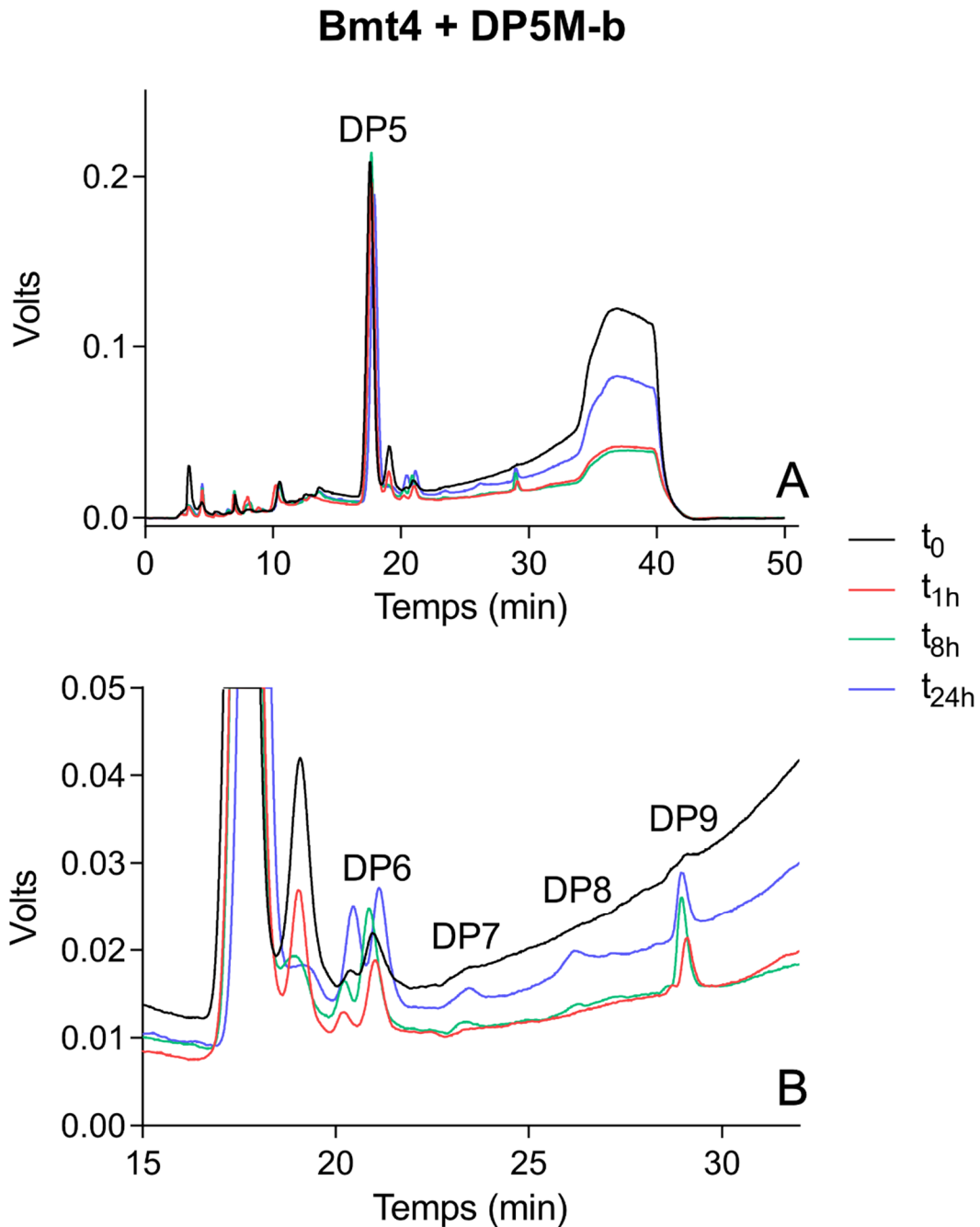


Figure 66 : Cinétique de réaction enzymatique, sur 24h, de la forme recombinante Bmt4 sur le substrat DP5M-b, suivie par HPLC-Fluo. **A** : chromatogramme complet. Le signal majoritaire correspond au substrat DP5M-b. **B** : Zoom sur les signaux qui apparaissent à des temps de rétention supérieurs au cours de la réaction. Ceux-ci peuvent correspondre aux produits formés de DP supérieur.

Nous pouvons donc dire que la forme recombinante de Bmt4 a semble-t-il été capable, *in vitro*, d'utiliser comme substrat accepteur le DP5M-b (Man β 1-2Man β 1-2Man α 1-2Man α 1-2Man α -Mantyl) pour former des produits de DP supérieur jusqu'au DP9 (Man β 1-2Man β 1-2Man β 1-2Man β 1-2Man β 1-2Man α 1-2Man α 1-2Man α -Mantyl). La caractérisation de ces produits par spectrométrie de masse et par RMN reste néanmoins nécessaire pour confirmer ces résultats.

Un deuxième test d'activité enzymatique de Bmt4 a été réalisé avec le substrat DP4 β 2 couplé à la 2-aminopyridine (Man β 1-2Man β 1-2Man β 1-2Man β -2AP), sur un temps plus long (72h d'incubation, avec un point intermédiaire à 7h) (**Figure 67**).

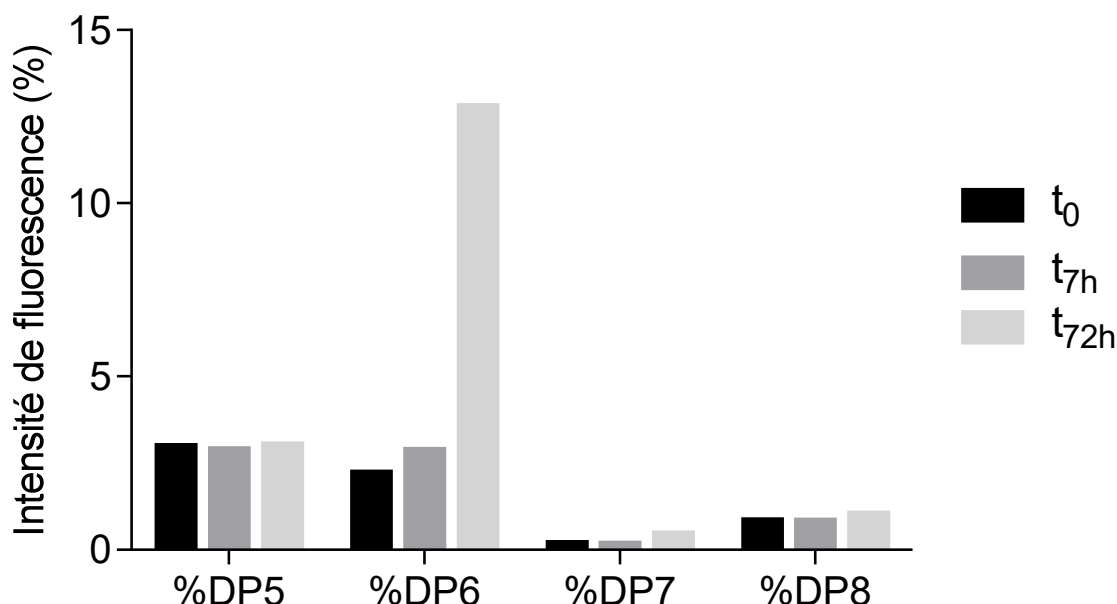


Figure 67 : Cinétique de réaction enzymatique, sur 72h, de la forme recombinante Bmt4 sur le substrat DP4 β 2-2AP, suivie par HPLC-Fluo. Parmi les quatre signaux détectés, de temps de rétention supérieurs au substrat (DP5 à DP8), seul le signal DP6 présente une véritable évolution au cours du temps.

Il aura fallu attendre un temps très long (72h) pour voir apparaître une variation dans les signaux détectés par HPLC-Fluo. De manière globale, là encore très peu de substrat a été consommé. Par contre, nous ne voyons l'apparition notable que d'un seul produit de temps de rétention supérieur. Il pourrait s'agir d'un produit de DP+2 par rapport au substrat de départ, en l'occurrence un DP6. Les signaux qui pourraient être équivalents à des DP5, DP7 et DP8 n'ont que très légèrement augmentés. Pour DP5, il se pourrait que Bmt4 forme ce produit, mais qu'il soit immédiatement utilisé à

nouveau comme substrat pour former le DP6. Par contre, il semblerait que Bmt4 soit incapable d'utiliser le DP6 comme substrat. Bmt4 aurait donc été capable, *in vitro*, d'ajouter deux résidus mannose sur le substrat DP4 β 2-2AP.

En mettant en parallèle ces deux résultats obtenus pour l'activité enzymatique de Bmt4, nous pouvons remarquer que les produits de DP maximum formés par Bmt4 (DP9 à partir du substrat DP5M-b et DP6 à partir du DP4 β 2-2AP) disposent tous deux de six résidus liés en β -1,2. Ainsi, nous pouvons émettre l'hypothèse que Bmt4 serait capable d'allonger un motif β -Man jusqu'à six résidus. Au-delà, l'enzyme semble incapable de continuer à catalyser cette réaction de β -1,2 mannosylation. Des investigations plus poussées sont néanmoins indispensables pour l'étude complète de l'activité de cette enzyme.

Conclusions et perspectives

Candida albicans est une levure saprophyte présente chez l'Homme, notamment au niveau de la flore digestive. Elle revêt néanmoins un caractère pathogène souvent associé à un état immunitaire déficient. Elle peut alors être responsable d'infections profondes (candidoses systémiques), principalement dans un contexte nosocomial, à l'origine de taux de mortalité élevés pouvant aller jusqu'à 50%. La paroi de *C. albicans*, en contact avec la cellule hôte, présente des β -1,2 oligomannosides (β -Man) pouvant être associés à différentes molécules pariétales : des glycolipides (phospholipomannanes ou PLM), et des phosphopeptidomannanes (ou PPM). Ces β -Man sont présents chez les espèces de *Candida* les plus pathogènes et sont considérés comme facteurs de virulence. Leur absence chez les mammifères en fait des cibles thérapeutiques prometteuses. Leur présence avait été mise en évidence chez *C. albicans* dès les années 1980 grâce aux travaux de Shibata et de ses collaborateurs. Néanmoins, leurs voies de biosynthèse sont demeurées, jusqu'à récemment, incomprises.

L'identification chez *C. albicans* d'une nouvelle famille de neuf gènes de β -mannosyltransférases (CaBMT) a mené à définir le rôle des enzymes codées par six d'entre eux. Étudiées par génétique inverse à partir de 2008, les enzymes Bmt1 à 4 permettent l'ajout d'unités β -mannosyl à l'extrémité du PPM, tandis que les enzymes Bmt5 et 6 ajoutent des unités β -mannosyl au niveau du PLM. D'un point de vue structural, il est apparu que cette nouvelle famille de β -1,2-mannosyltransférases ne semblait appartenir à aucune des familles de glycosyltransférases identifiées jusqu'alors. À ce titre, la base de données CAZy, consacrée à la classification des enzymes qui dégradent, modifient ou créent des liaisons glycosidiques, a classifié en 2008 ces enzymes CaBmt dans la famille GT91.

Cette famille d'enzymes est ainsi le sujet d'études au sein du laboratoire depuis 2010. Récemment, de précédents travaux de thèse, réalisés par le Dr Ghenima Sfihi-Loualia, ont permis de caractériser l'activité enzymatique de CaBmt1, enzyme d'initiation de la β -1,2-mannosylation de la fraction acido-stable du PPM, et d'initier l'étude de CaBmt3. Dans ce contexte, l'objectif de cette thèse était donc de poursuivre l'élucidation des voies de biosynthèse des β -1,2-mannosides de *C. albicans* grâce à

l'étude des relations structure-fonction des CaBmt, en prenant comme modèle CaBmt3. La caractérisation enzymatique de CaBmt4 a également été abordée.

Tout d'abord, la production d'une forme recombinante de CaBmt3 active a nécessité une mise au point des procédés d'expression. Initialement effectuée en système procaryote, chez *Escherichia coli*, elle s'est révélée problématique pour deux raisons. L'ajout de détergent lors de la lyse cellulaire, indispensable au maintien de l'enzyme recombinante sous forme soluble, risquait de s'avérer préjudiciable pour de futures études structurales. De plus, nous avons constaté lors des premiers tests enzymatiques une activité mannosidasique endogène, propre au système de production chez *E. coli*. La dégradation des produits de réaction rendait complexe l'analyse des résultats par HPAEC-PAD. L'expression en système eucaryote, chez *Pichia pastoris*, a ainsi permis de solutionner ces problèmes. La forme recombinante produite ne nécessitait plus l'ajout de détergent pour rester sous forme soluble, et les réactions enzymatiques ont pu être suivies par HPLC-Fluo sans aucune dégradation. L'étude de cette activité β -mannosidasique endogène à *E. coli*, jusqu'à présent jamais mise en évidence, pourrait être intéressante à approfondir.

Ainsi, nous avons pu procéder à la caractérisation enzymatique de CaBmt3. Nous avons déterminé sa spécificité de substrat grâce à un panel étendu de substrats oligomannosidiques potentiels, de longueur et de nature de liaison variables. Nous en sommes arrivés à la conclusion que le substrat optimal de CaBmt3 consistait en un motif $\text{Man}\beta 1-2\text{Man}\alpha 1-2(\text{Man}\alpha 1-2)_n$ sur lequel était catalysé l'unique transfert d'un second résidu β -1,2-mannosyl à l'extrémité non réductrice, pour former le produit de réaction $\text{Man}\beta 1-2\text{Man}\beta 1-2\text{Man}\alpha 1-2(\text{Man}\alpha 1-2)_n$. Nous avons également montré que les enzymes CaBmt1 et CaBmt3 étaient capables d'effectuer, ensemble, la β -mannosylation d'Hwp1, une glycoprotéine endogène de *C. albicans*.

L'analyse structurale du PPM de *C. albicans* nous révèle cependant que cette structure peut être porteuse de motifs β -Man présentant plus de deux résidus β -1,2-mannosyl (jusqu'à 7 sur la fraction acido-labile, au moins 3 pour la fraction acido-stable, même s'il est plus difficile de se prononcer pour la fraction acido-stable du fait

de la taille importante de la molécule à analyser en RMN). Si CaBmt3 est incapable de catalyser l'élongation de ce motif au-delà du deuxième résidu, une autre enzyme de la famille CaBmt est vraisemblablement responsable de cette élongation. Nous avons donc cherché à savoir si CaBmt4 était capable d'ajouter au moins un résidu β -1,2-mannosyl sur le produit de réaction de CaBmt3. Des résultats très préliminaires montrent ainsi que CaBmt4 pourrait être capable de catalyser le transfert de résidus β -1,2-mannosyl jusqu'à une certaine limite. En effet, au-delà de six résidus β -1,2-mannosyl, CaBmt4 semble incapable de poursuivre son activité. La poursuite des études à ce sujet est donc indispensable pour aboutir à une compréhension complète de la β -mannosylation de la fraction acido-stable du PPM.

Parallèlement, nous avons étudié les effets de composés iminosucres sur l'activité des enzymes que nous avons caractérisés, CaBmt1 et CaBmt3. Ces iminosucres étaient connus pour être des inhibiteurs de nombreuses glycosidases, mais ont également montré dans certains cas un effet inhibiteur sur quelques glycosyltransférases. Plusieurs composés mono-, tétra- et polyvalents, synthétisés à partir de déoxynojirimycine (DNJ) et de déoxymannojirimycine (DMJ), ont été testés en présence de CaBmt1 et CaBmt3. Bien que n'ayant que peu d'effet notable sur l'activité de CaBmt3, nous avons pu montrer que certains de ces composés pouvaient entraîner une inhibition de CaBmt1 (composé **1**, monomère de DNJ) pour une IC_{50} de 5 mM, mais également orienter l'activité de CaBmt1 vers la formation de son produit P1 (composés **4** et **6**, tétra- et polyvalent de DMJ).

Enfin, dans le cadre de l'étude des relations structure-fonction des CaBmt, il nous fallait envisager la caractérisation structurale d'une CaBmt. Notre choix s'est porté sur CaBmt3 pour sa solubilité supérieure à CaBmt1, ainsi que pour sa vitesse de catalyse accrue. Le but initial était de parvenir à l'obtention de cristaux protéiques, afin d'obtenir par diffraction aux rayons X des informations sur l'organisation tridimensionnelle du site actif de l'enzyme, au niveau atomique. Pour cela, la préparation de l'échantillon devait nous permettre de parvenir à la production en solution d'une enzyme pure, homogène, monodisperse, stable et à la concentration minimale de 5 mg/mL. Malgré de nombreuses tentatives, nous avons été incapables de produire une forme recombinante chez *P. pastoris* remplissant ces critères. En

revanche, en produisant l'enzyme chez *E. coli*, nous sommes parvenus à produire suffisamment de matériel pour entreprendre de multiples essais de cristallogénèse. Cette étape fastidieuse et quelque peu aléatoire s'est révélée infructueuse. Devant notre incapacité à cristalliser cette forme recombinante, nous avons envisagé la production d'autres formes recombinantes de CaBmt3, tronquées de leur partie N-terminale contenant non seulement les domaines cytosolique et transmembranaire, mais également le domaine tige. Ce domaine tige, prédit comme étant désordonné, pourrait être source d'instabilité et empêcher ainsi la formation de cristaux protéiques. Malheureusement, les différentes formes tronquées, exprimées chez *E. coli* et *P. pastoris*, se sont révélées insolubles et donc inexploitable pour la cristallogénèse.

Afin d'obtenir tout de même des renseignements sur la structure tridimensionnelle de CaBmt3, nous avons menés des études *in silico*, combinant modélisation prédictive et alignement multiple, qui nous ont permis d'identifier au sein de la séquence de CaBmt3 des résidus potentiellement impliqués dans le mécanisme catalytique. Par mutagénèse dirigée, nous avons pu tester l'activité enzymatique de cinq mutants du site actif de CaBmt3. Sur ces cinq mutants, nous avons montré que trois d'entre eux, E258Q, D259N et D483N, avaient totalement perdu leur activité β -1,2-mannosyltransférase. De plus, par alignement entre la modélisation prédictive obtenue *in silico* et une structure résolue de glycoside hydrolase appartenant à la famille GH130, nous avons pu mettre en évidence que les résidus D259 et D483 semblaient être essentiels dans le mécanisme catalytique de CaBmt3. La ressemblance originale entre les mécanismes de ces deux familles est très intéressante et pourrait permettre de parvenir à avancer dans l'élucidation du mécanisme catalytique de la famille GT91.

Enfin, des expérimentations préliminaires réalisées par SAXS (diffusion des rayons X aux petits angles) nous ont donné un premier aperçu sur l'organisation tridimensionnelle globale de CaBmt3. Celle-ci présenterait un domaine C-terminal globulaire en forme de tunnel. La modélisation prédictive de CaBmt3, ainsi que d'une très grande majorité des CaBmt, nous a montré que le domaine catalytique semblerait adopter un repliement de type β -propeller à cinq pales. Ce repliement est décrit dans la littérature comme pouvant être associé à une activité transférase. Ainsi, la

superposition de la modélisation prédictive sur le modèle obtenu après exploitation des données SAXS tendrait à montrer que le domaine catalytique C-terminal des membres de la famille GT91 pourrait adopter un repliement de type β -propeller à cinq pales, comme cela a déjà été décrit pour la famille GH130.

Dans le futur, il apparaît donc indispensable, pour confirmer toutes ces hypothèses, de poursuivre les efforts de cristallogénèse des CaBmt afin de parvenir à l'obtention d'un modèle structural fiable à l'échelle atomique. Ainsi, l'élucidation détaillée du mécanisme catalytique de CaBmt3, et par extension des CaBmt, nous ferait faire un grand pas dans la compréhension des voies de biosynthèse des β -Man de *C. albicans*. De même, il serait intéressant d'étendre l'étude de ces CaBmt aux enzymes agissant sur le PLM, CaBmt5 et CaBmt6. L'identification des protéines putatives CaBmt7, CaBmt8 et CaBmt9 et de leurs activités respectives serait également une piste d'investigation à explorer. A ce titre, des études structurales préliminaires sont actuellement en cours au sein de l'équipe sur le PPM d'une souche de *C. albicans* délétée du gène CaBMT7.

Outre l'aspect fondamental de ces connaissances, il semble également essentiel d'un point de vue médical de parvenir à utiliser ces nouvelles données pour l'élaboration de stratégies de prise en charge des patients candidosiques beaucoup plus performantes qu'à l'heure actuelle.

Quatre classes thérapeutiques sont à l'heure actuelle disponibles : les polyènes (amphotéricine B), la fluorocytosine, les azolés (fluconazole) et les échinocandines (micanfungine). Malgré cet arsenal thérapeutique, le pronostic des candidoses invasives reste sombre, et des résistances à ces antifongiques se développent.

La connaissance approfondie des voies de biosynthèse des β -Man, ainsi que de la topographie intime du site actif des CaBmt pourrait donc ouvrir la voie à l'élaboration de nouvelles molécules antifongiques. De plus, de nouvelles techniques de détection des candidémies sont en ce moment même en cours de développement. Une prise en charge plus précoce de ces patients pourrait ainsi permettre de réduire le taux de mortalité constaté en cas d'infection profonde à *Candida*.

Matériel et méthodes

1 Matériel

Les souches d'*E. coli* et de *P. pastoris* proviennent d'Invitrogen ; les plasmides proviennent d'Invitrogen ; les oligonucléotides ont été synthétisés par Eurogentec ; le GDP-Mannose provient de Sigma-Aldrich ; les composés iminosucres ont été fournis par le Dr S. Gouin (LUNAM Université, CEISAM, Chimie Et Interdisciplinarité, Synthèse, Analyse, Modélisation, UMR CNRS 6230, Nantes). Les kits de cristallographie utilisés sont les suivants : Crystal Screen, 3DStructure Screen, Clear Strategy Screen I et II, Cations Suite, pH Clear I et II, PACT Premier, JCSG, MemGold, Proplex, Memplus, PGA, Midas et MemMagic. Deux robots automatisés de précision (Mosquito Crystal et CyBi Replicator) sont également à notre disposition.

2 Constructions plasmidiques

2.1 BMT3

Une séquence d'ADN de 1401 paires de bases codant pour le gène BMT3 a été insérée dans le vecteur pET151/D-TOPO afin de transformer la souche TOP10 F' d'*E.coli*. Grâce au logiciel Vector NTI Advance (Invitrogen), un codon CTG codant pour une sérine a été identifié au sein de la séquence en position 460. Les amorces complémentaires sens et anti-sens contenant la modification (CTG → TCT) nous ont permis, par PCR inverse et grâce à la polymérase Phusion-HF (Finnzymes), d'obtenir, à partir du plasmide pET151-BMT3, un nouveau plasmide muté pour son codon CTG. L'insertion silencieuse d'un site de restriction pour l'enzyme AseI (ATTAAT) permet de vérifier *a posteriori* le bon déroulement du clonage. Ce nouveau plasmide a permis ensuite la transformation des souches TOP 10 F' et SHuffle d'*E. coli*. Nous avons également inséré des sites de restriction en amont (PmlI) et en aval (NotI) de la séquence d'intérêt. Ces mêmes sites, retrouvés dans le site multiple de clonage du vecteur navette pPICZαA, permettent le clonage de BMT3 dans ce vecteur navette. Après extraction de l'ADN plasmidique, nous procédons à la digestion de chaque plasmide (pET151-BMT3 d'une part, pPICZαA vide d'autre part) par les enzymes de restriction PmlI et NotI, et isoler, après migration puis purification sur gel, le gène BMT3

et le vecteur pPICZ α A linéarisé. Une étape de ligation grâce à la T4 Ligase a ensuite permis de reformer un vecteur pPICZ α A contenant le gène d'intérêt : pPICZ α A-BMT3.

2.2 BMT3-FT1 et BMT3-FT2

Les amorces sens 5'-CACCAATCAAGTTGCCACCAAGAATTTGC-3' et 5'-CACCCCAGAGGACTTAAAATTTTTC-3' (pour BMT3-FT1 et BMT3-FT2, respectivement) et l'amorce antisens 5'-AATGGCGGCCGCTCATCTTGATAATTTATCCC-3' (Eurogentec) ont été utilisées avec la polymérase Phusion-HF (Finnzymes) pour synthétiser les plasmides pET151-BMT3-FT1 et pET151-BMT3-FT2.

2.3 BMT4

Le processus est simplifié par rapport à BMT3 grâce à l'utilisation d'un gène synthétique. Une séquence d'ADN de 2265 paires de bases, tronquée des 105 premières paires de bases, codant pour le gène BMT4, dépourvu du côté N-terminal codant pour les domaines cytoplasmique et transmembranaire, a été obtenue directement dans le vecteur pET151/D-TOPO, et optimisée pour son expression chez *E. coli* (GeneArt Gene Synthesis, ThermoFisher Scientific).

3 Production dans *E. coli* et *P. pastoris*

3.1 Expression des formes recombinantes de Bmt3 et Bmt4 dans *E. coli*

Les souches SHuffle sont transformées par pET151-BMT3, pET151-BMT3-FT1, pET151-BMT3-FT2 et pET151-BMT4 par choc thermique puis ont été utilisées pour l'expression de Bmt3, Bmt3-FT1, Bmt3-FT2 et Bmt4. Chacune des souches a été mise en culture, à partir d'un isolement sur boîte de LB-Agar + ampicilline (50 μ g/mL), dans 50 mL de LB + ampicilline (37°C, 175 rpm) jusqu'à l'obtention d'une DO₆₀₀ de 0.6. L'induction s'est faite grâce à l'IPTG (0.5 mM) pendant 1h30. Après centrifugation à 3500 rpm pendant 15 minutes à 4°C, les culots sont lavés 2 fois au PBS, puis centrifugés à nouveau à 5000 rpm pendant 15 minutes à 4°C. Les culots sont ensuite resuspendus dans un tampon de lyse (phosphate de potassium pH 7.8 50 mM, glycérol

10%, NaCl 400 mM, KCl 100 mM, anti-protéases (SigmaFast Protease Inhibitor Cocktail Tablets, EDTA-Free), azide 0.01%, lysozyme 0.5 mg/mL) puis soniqués pendant 12 minutes (sonication alternée toutes les 15s à 30% de la puissance maximale). Enfin, le cas échéant, différents détergents ont pu être ajoutés au tampon de lyse. De même, pour les productions destinées à être purifiées par chromatographie d'affinité, de l'imidazole 10 mM est ajouté au tampon de lyse.

3.2 Expression de Bmt1 et Bmt3 dans *P. pastoris*

La transformation de X33 (souche sauvage de *P. pastoris*) a nécessité la préparation préalable d'une quantité suffisante de vecteur pPICZ α A-BMT3 (au moins 10 μ g) linéarisé par l'enzyme de restriction SacI (GAGCTC, coupe une fois dans la séquence du vecteur et non dans la séquence d'intérêt). La même opération a été réalisée sur le vecteur vide pPICZ α A linéarisé par BstXI. La transformation a été effectuée par électroporation (1.5 KV, 25 μ F, 200 ohm, 5 ms). L'étalement sur boîtes d'YPD-Agar + Zéocine à différentes concentrations a permis de sélectionner les meilleurs clones producteurs (un clone qui résistera à une plus forte concentration en Zéocine est un clone qui aura intégré un plus grand nombre de copies du gène de résistance, et donc du gène d'intérêt. Il surexprimera donc au final une plus grande quantité de la protéine d'intérêt). Le criblage de ces clones a été effectué sur microplaque 24 puits :

- incubation (28°C, 225 RPM) jusque DO₆₀₀ de 40 dans le milieu BMGY (1% extrait de levure, 2% peptone, 100 mM phosphate de potassium pH 6.0, 1.34% YNB, 4 \times 10⁻⁵% biotine, 1% glycérol) pour produire suffisamment de biomasse. 5 mL par puits,
- puis changement de milieu permettant de lancer l'induction d'expression : soit 1 mL de milieu riche BMMY (1% extrait de levure, 2% peptone, 100 mM phosphate de potassium pH 6.0, 1.34% YNB, 4 \times 10⁻⁵% biotine, 0.5% méthanol), soit 1 mL de milieu minimum BMM (100 mM phosphate de potassium pH 6.0, 1.34% YNB, 4 \times 10⁻⁵% biotine, 0.5% méthanol) ; ajout de Tween 20 0.05% ; incubation 28°C, 225 RPM pendant 3 jours

- toutes les 12 heures, ajout de méthanol 100% (pour une concentration finale de 0.5%) et des anti-protéases Pepstatine et Leupeptine à 1 μM et 10 μM respectivement.

Le clone donnant le meilleur niveau d'expression de la protéine d'intérêt a ensuite été cultivé en plus grand volume (par un facteur 100), selon les mêmes conditions de croissance et d'induction, dans des Erlenmeyers bafflés. La sélection du meilleur clone pour Bmt1 avait déjà été réalisée dans l'équipe précédemment. Les surnageants de culture, contenant la protéine d'intérêt surexprimée, ont été récupérés par centrifugation à 3000g pendant 10 minutes. Enfin, les différents détergents utilisés (Triton X-100 (Sigma) à 8.5mM, Dodécyl- β -D-Maltoside (DDM, Affymetrix) à 10 et 0.2 mM, ont pu être ajoutés avant stockage d'aliquotes à 4°C et -80°C. Nous avons ainsi pu obtenir une concentration protéique de 40 mg/L de culture avec Bmt1 et Bmt3.

3.3 Mutagénèse dirigée

Les mutants du site actif de Bmt3 ont été obtenus par l'introduction (par substitution de base) de la mutation désirée dans la séquence des amorces sens et antisens utilisées pour la réaction PCR. Des mutations silencieuses pour faire apparaître ou disparaître des sites de restriction ont également été introduites afin de vérifier la bonne présence de la mutation désirée.

Composition du milieu réactionnel PCR :

| | |
|---|--------------------|
| Eau | 32.5 μL |
| Tampon 5x Phusion HF | 10 μL |
| Amorce sens, 10 μM | 2.5 μL |
| Amorce antisens, 10 μM | 2.5 μL |
| Template (pET151/D-TOPO), 50-80 ng/ μL | 1 μL |
| dNTPs, 10 mM | 1 μL |
| Phusion HF DNA Polymerase | 0.5 μL |

Cycles PCR :

| Etape | Température (°C) | Temps (s) | Nombre de cycles |
|-----------------------|------------------|-----------|------------------|
| Dénaturation initiale | 98 | 30 | |
| Dénaturation | 98 | 10 | 16 |
| Hybridation | * | 30 | |
| Extension | 72 | 240 | |

* dépend du T_m de l'amorce utilisée : $T_{\text{hybridation}} = T_m + 3^\circ\text{C}$

4 Préparation des enzymes recombinantes

4.1 Purification par chromatographie échangeuse de cations

A l'aide du système FPLC AKTA (Fast Protein Liquid Chromatography, GE Healthcare), nous avons utilisé la colonne échangeuse de cations HiTrap SP FF 1 mL (GE Healthcare), équilibrée avec le tampon A (acétate de sodium 20 mM pH 5). L'élution a été effectuée grâce à un gradient de tampon B (acétate de sodium 20 mM pH 5, NaCl 1M), à 2 mL/min pendant 20 minutes, et suivie par mesure de l'absorbance à 280 nm. Des fractions d'élution de 2 mL ont été collectées et analysées par électrophorèse SDS/PAGE.

4.2 Purification par chromatographie d'affinité

A l'aide du système FPLC AKTA (Fast Protein Liquid Chromatography, GE Healthcare), nous avons utilisé la colonne HisTrap HP 1 mL (GE Healthcare), équilibrée avec le tampon A (phosphate de sodium 20 mM pH 7.3, NaCl 100 mM, imidazole 10 mM). L'élution a été effectuée grâce à des paliers successifs (0%, 5%, 50% et 100%) de tampon B (phosphate de sodium 20 mM pH 7.3, NaCl 100 mM, imidazole 500 mM), à 1 mL/min pendant 10 minutes par palier, et suivie par mesure de l'absorbance à 280 nm. Des fractions d'élution de 1 mL ont été collectées et analysées par électrophorèse SDS/PAGE.

4.3 Thermal Shift Assay (TSA)

La détermination du tampon de stabilité pour Bmt3 a été effectuée par TSA. La protéine est mise en présence de 24 conditions différentes (nature du tampon, pH, concentration en sels) et de Sypro Orange, puis chauffée progressivement de 25°C à 95°C. La mesure de la fluorescence est mesurée par l'appareil de qPCR Stratagene Mx3005P (Agilent Technologies).

4.4 Chromatographie d'exclusion stérique

A l'aide du système FPLC AKTA (Fast Protein Liquid Chromatography, GE Healthcare), nous avons utilisé la colonne HiPrep 16/60 Sephacryl S-100 HR. L'élution a été effectuée dans le tampon optimal déterminé par TSA (Tris/HCl 0.1 M pH 7.5, NaCl 150 mM), et suivie par mesure de l'absorbance à 280 nm. Des fractions d'élution de 1 mL ont été collectées et analysées par électrophorèse SDS/PAGE.

4.5 Concentration sur unité d'ultrafiltration

Nous avons utilisé les unités d'ultrafiltration Vivaspin 20 et Vivaspin 500 (Sartorius) disposant d'un seuil de masse moléculaire de 10 kDa, par centrifugation à 5000 et 13000 rpm, respectivement.

5 Méthodes analytiques

5.1 Electrophorèse SDS/PAGE

Les extraits bruts ou les fractions solubles issus de l'expression dans *E. coli*, ainsi que les surnageants de culture issus de *P. pastoris* ont été analysés par SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS/PAGE) sur gel de 10% avec le système électrophorétique Mini-Protean 3 (Bio-Rad). Le marqueur de masse moléculaire utilisé est le Precision Plus Protein Standard (Bio-Rad). La visualisation des protéines a été effectuée par coloration Instant Blue (Expedeon). La densitométrie réalisée grâce au densitomètre GS-800 Calibrated Imaging Densitometer (Bio-Rad) a permis d'estimer des concentrations protéiques relatives.

5.2 Western blot

Les protéines ont été transférées sur membrane de nitrocellulose (Protran BA 83, Whatman) grâce au Mini Trans-Blot Cell (Bio-rad). Les anticorps primaires utilisés étaient soit l'anticorps monoclonal de souris anti-HisG (Invitrogen), soit un anticorps polyclonal de sérum de lapin dirigé contre une séquence peptidique synthétique (CALSKDTMGWDKLSR) retrouvée au sein de la séquence du domaine catalytique de Bmt3 (Eurogentec).

5.3 Dynamic Light Scattering (DLS)

Les expériences de DLS ont été effectuées à 20°C sur un Malvern Zetasizer Nano ZS thermostaté utilisant un laser He-Ne à 633 nm pour dévier à 173°. Les mesures ont été répétées 12 fois par analyse, à raison de 10 secondes par mesure. Les échantillons ont été centrifugés à 18000g pendant 40 minutes avant chaque analyse. Une cuvette en quartz de faible volume a été employée. Les deux enzymes ont été analysées à une concentration de 40 µg/mL, avec ou sans Triton X-100 0.5%. Pour les tests d'agrégation en présence d'iminosucres, deux concentrations ont été testées, 140 µM et 180 µM.

6 Essais enzymatiques

6.1 Composition des milieux réactionnels

Les milieux réactionnels, d'un volume total de 100 µL (25 µL, soit environ 1 µg, de Bmt1 ou Bmt3 selon le type d'expérience (il peut s'agir i) d'extraits bruts (les cellules ont simplement été lysées) à 40 µg/mL issus de productions chez *E. coli*, ou ii) de surnageants de culture à 40 µg/mL issus de productions chez *P. pastoris*), 3 mM de substrat accepteur natif (pour détection par HPAEC-PAD) ou 0.1 mM de substrat accepteur couplé (pour détection par HPLC-Fluo), 20 mM de substrat donneur GDP-Mannose, 50 mM Tris/citrate pH 6.5, 20 mM CaCl₂, 0.3% Triton X-100, avec les anti-protéases pepstatine A et leupeptine), ont été incubés à 28°C, à différents temps. Les tests d'inhibition avec les composés iminosucres ont été réalisés avec le même milieu réactionnel, additionné du composé iminosucre à 20 mM, pendant 48h ou 1h pour Bmt1 et Bmt3, respectivement. Les réactions ont été arrêtées en chauffant le mélange

à 100°C pendant 10 minutes. Après centrifugation, les échantillons issus d'*E. coli* ont été filtrés sur filtre de 0.22 µm PVDF (Millipore) ; les échantillons issus de *P. pastoris* n'ont nécessité que l'étape de centrifugation. Enfin, les milieux réactionnels ont pu être analysés soit par HPLC-Fluo, soit par HPAEC-PAD.

6.2 Traitement aux α -mannosidases

Après arrêt des réactions enzymatiques, les milieux réactionnels ont été soumis à l'action d' α -mannosidases (20 mM tampon acétate de sodium pH 5, contenant 2 mM $ZnCl_2$ et 0.15 unités d' α -exomannosidases de Jack Bean (Prozyme) à 37°C pendant 24 à 48 heures).

7 Analyse des produits de réaction

7.1 Par HPAEC-PAD (Dionex)

Une colonne analytique PA-100 (4 x 250mm) a été utilisée, à un débit de 1 mL/min pendant 55 minutes, avec les éluants A (100 mM NaOH) et B (100 mM NaOH + 1 M acétate de sodium (AcNa)) selon le gradient suivant :

- 0 à 5 min : 100% A
- 5 à 25 min : passage progressif à 90% A + 10% B
- 25 à 30 min : passage progressif à 100% B
- 30 à 35 min : 100% B
- 35 à 55 min : 100% A

Les éluants A et B ont été préparés selon les indications fournies par Dionex.

7.2 Par HPLC-Fluo (Varian ProStar)

Une colonne Amide-80 (TSK gel, 4.6mm x 25cm) a été utilisée, avec une élution à 0.8 mL/min pendant 50 (Mantyl) ou 70 (2-AP) minutes et un gradient discontinu d'un mélange de deux éluants : A (10% acétonitrile, 3% acide acétique, triéthylamine à pH 7 / acétonitrile) (25:75, v/v) et B (10% acétonitrile, 3% acide acétique, triéthylamine à pH 7 / acétonitrile) (50:50, v/v). La détection fluorimétrique des oligosaccharides

mantylés a été permise par excitation à 334 nm et émission à 437 nm. La détection fluorimétrique des oligosaccharides couplés à la 2-aminopyridine a été permise par excitation à 310 nm et émission à 380 nm.

Gradient d'élution des composés couplés au mantyl :

- 0 à 5 min : 90% A, 10% B
- 5 à 30 min : 18% A, 82% B
- 30 à 31 min : 0% A, 100% B
- 31 à 36 min : 0% A, 100% B
- 36 à 38 min : 90% A, 10% B
- 38 à 50 min : 90% A, 10% B

Gradient d'élution des composés couplés à la 2-AP :

- 0 à 5 min : 90% A, 10% B
- 5 à 45 min : 0% A, 100% B
- 45 à 60 min : 0% A, 100% B
- 60 à 62 min : 90% A, 10% B
- 62 à 70 min : 90% A, 10% B

8 Activité enzymatique de Bmt3 sur Hwp1

8.1 Essais enzymatiques sur Hwp1

Les milieux réactionnels contenaient 50 μ L de surnageant de culture de *P. pastoris* (contenant soit aucune β -1,2-mannosyltransférase recombinante, soit 1 μ g de Bmt3, soit un mélange de 1.5 μ g de Bmt1 et 0.5 μ g de Bmt3), 0.25 μ g de Hwp1 *bmt1* Δ , 20 mM de GDP-mannose, 50 mM Tris/citrate pH 6.5, 20 mM CaCl₂, 0.3% Triton X-100, avec les anti-protéases pepstatine A et leupeptine, pour un volume final de 200 μ L. Chaque milieu réactionnel a été divisé en deux, pour être incubé pendant 12h ou

48h à 28°C. Les réactions ont été stoppées à 100°C pendant 10 minutes. Après centrifugation à 14 000 rpm pendant 10 minutes, les réactions ont été analysées par western blot.

8.2 Analyse par western blot

Après transfert, les membranes de nitrocellulose ont été incubées en présence de concanavaline A (ConA) couplée à la biotine ou de l'anticorps monoclonal (MAb) B6.1 aux dilutions 1:1000 et 1:2000, respectivement. La membrane ConA a été incubée en présence de Streptavidine couplée à l'HRP (1:1000), tandis que la membrane MAb B6.1 a été incubée en présence d'IgM anti-souris couplée à la phosphatase alcaline (1:2000). Les activités peroxydase et phosphatase alcaline ont été détectées par chimioluminescence grâce aux substrats SuperSignal West Pico (Pierce) et CDP-Star (Roche), respectivement.

Annexes

Article 1 :

Sfihi-Loualia, G. §, **Hurtaux, T.** §, Fabre, E., Fradin, C., Mée, A., Pourcelot, M., Maes, E., Bouckaert, J., Mallet, J.-M., Poulain, D., Delplace, F. & Guérardel, Y. (2016). *Candida albicans* β -1,2-mannosyltransferase Bmt3 prompts the elongation of the cell-wall phosphopeptidomannan. *Glycobiology*, **26**, 203–214.

Article 2 :

Hurtaux, T. §, Sfihi-Loualia, G. §, Brissonnet, Y., Bouckaert, J., Mallet, J.-M., Sendid, B., Delplace, F., Fabre, E., Guin, S.G. & Guérardel, Y. (2016). Evaluation of monovalent and multivalent iminosugars to modulate *Candida albicans* β -1,2-mannosyltransferase activities. *Carbohydrate Research*, **429**, 123–127.

§ Co-auteurs à contribution équivalente.

Article 3 :

Fabre, E., **Hurtaux, T.** & Fradin, C. (2014a). Mannosylation of fungal glycoconjugates in the Golgi apparatus. *Current Opinion in Microbiology*, **20**, 103–110.

Participation à la rédaction et à l'élaboration des figures.

Article 4 :

Fabre, E., Sfihi-Loualia, G., Pourcelot, M., Coddeville, B., Krzewinski, F., Bouckaert, J., Maes, E., **Hurtaux, T.**, Dubois, R., Fradin, C., Mallet, J.-M., Poulain, D., Delplace, F. & Guérardel, Y. (2014). Characterization of the recombinant *Candida albicans* β -1,2-mannosyltransferase that initiates the β -mannosylation of cell wall phosphopeptidomannan. *Biochemical Journal*, **457**, 347–360.

Participation à l'expression de l'enzyme recombinante Bmt1 chez *Pichia pastoris*.

Article 5 :

Cattiaux, L., Mée, A., Pourcelot, M., Sfihi-Loualia, G., **Hurtaux, T.**, Maes, E., Fradin, C., Sendid, B., Poulain, D., Fabre, E., Delplace, F., Guérardel, Y. & Mallet, J.-M. (2016). *Candida albicans* β -1,2 mannosyl transferase Bmt3: Preparation and evaluation of a β (1,2), α (1,2)-tetramannosyl fluorescent substrate. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **24**, 1362–1368.

Participation à l'expression de l'enzyme recombinante Bmt3 chez *Pichia pastoris* et aux tests enzymatiques.

ARTICLE 1

***Candida albicans* β -1,2-mannosyltransferase Bmt3 prompts the elongation of the cell-wall phosphopeptidomannan**

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

* Univ. Lille, CNRS, UMR 8576, UGSF, Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, F 59000 Lille, France ; †Département de chimie, Ecole Normale Supérieure, Université Paris 6, UMR CNRS 7203, 75005 Paris, France ; ‡Univ. Lille ; §Inserm, LIRIC - U995, F-59 000 Lille, France

¹ These authors contributed equally to this work

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

SHORT TITLE: Elongation of β -mannans in *C. albicans*

ABSTRACT

β -1,2-linked mannosides are expressed on numerous cell wall glycoconjugates of the opportunistic pathogen yeast *Candida albicans*. Several studies evidenced their implication in the host-pathogen interaction and virulence mechanisms. In the present study, we characterized the *in vitro* activity of CaBmt3, a β -1,2-mannosyltransferase involved in the elongation of β -Man oligomers onto the cell wall polymannosylated N-glycans. A recombinant soluble enzyme Bmt3p was produced in *Pichia pastoris* and its enzyme activity was investigated using natural and synthetic oligomannosides as potential acceptor substrates. Bmt3p was shown to exhibit an exquisite enzymatic specificity by adding a single terminal β -mannosyl residue to α -1,2-linked oligomannosides capped by a Man β 1-2Man motif. Furthermore, we demonstrated that the previously identified CaBmt1 and CaBmt3 efficiently act together to generate Man β 1-2Man β 1-2[Man α 1-2]_n sequence from α -1,2-linked oligomannosides onto exogenous and endogenous substrates.

KEY WORDS

Yeast, cell wall, beta-mannose, mannosyltransferase, *Candida albicans*

INTRODUCTION

Candida albicans is a yeast species from the normal human microbial flora that may cause severe opportunistic infections in immunocompromised individuals (Shibata *et al.* 2012). The interaction between the invading fungal pathogen and the host cells is mediated by the yeast cell wall. The outer layer of the *C. albicans* cell wall comprises a wealth of mannoconjugates including mannoproteins, and phospholipomannan (PLM). Among mannoproteins, phosphopeptidomannans (PPM), sometimes referred as mannans, are defined as a subclass of glycoproteins substituted by polymannosylated N-glycans that can bear more than a hundred mannose residues. Polymannosylated N-glycans are the result of the extension of Man₈GlcNAc₂ N-glycans by an α -1,6-backbone that is further substituted by α -1,2-, α -1,3-manno-oligosaccharides. In addition, the main core of polymannosylated moiety is substituted by manno-oligosaccharides through phospho-di-ester bonds. This last motif is commonly referred as “acid labile mannan” in opposition to the “acid stable mannan” constituted of the substituted α -1,6-backbone. Previous studies demonstrated that *C. albicans*, in contrast to most non-pathogenic yeast species, *Saccharomyces cerevisiae* for example, expresses β -1,2-oligomannosides (β -Mans) associated with its cell wall components (Shibata *et al.* 1985). The β -1,2-linked oligomannosides were shown to display stronger antigenicity than α -linked oligomannosides during the humoral antibody response of mammals and fungal adherence to epithelial cells (Miyakawa *et al.* 1992; Shibata *et al.* 1992). Moreover, the role of β -Mans as adhesins for *C. albicans* has been shown on buccal epithelial cells, macrophage cell lines, vaginal cells and intestinal cells either *in vivo* with mouse model or *in vitro* using cell lines (Miyakawa *et al.* 1992; Fukazawa and Kagaya 1997; Han *et al.* 1998; Cutler 2001; Dromer *et al.* 2002; Dalle *et al.* 2003). β -Mans also generate protective antibodies and induce inflammatory cytokine production (Jouault *et al.* 1995; Han *et al.* 1997). Thus β -Mans appear to play a key role in *C. albicans*-host cell interactions and virulence mechanisms.

Numerous mannosyltransferases initiating and elongating α -mannosylated chains have been identified in *C. albicans*, as well as in other yeast species (Mora-Montes *et al.* 2010; Fabre *et al.* 2014a). Among them are protein *O*-mannosyltransferases Pmts (encoded by five genes *PMT1*, *PMT2* and *PMT4-6*) that initiate the synthesis of *O*-linked glycans (Timpel *et al.* 1998; Timpel *et al.* 2000; Prill *et al.* 2005; Fabre *et al.* 2014a). Similarly, the multi-enzyme complex Mannan Polymerase I (M-Pol I) was shown to initiate the synthesis of the α -1,6-mannose backbone of the PPM by adding up to ten α -1,6 mannose residues to the oligomannosylated N-glycan core. The product is then extended by the action of a second multi-enzyme complex named Mannan Polymerase II (M-Pol II) that can transfer up to fifty additional residues (Jungmann and Munro 1998; Stolz and Munro 2002; Striebeck *et al.* 2013; Fabre *et al.* 2014a). In comparison, the enzymes responsible for the synthesis of β -mannosylated chains have only been recently identified in a small number of yeast species that include *C. albicans*, *C. glabrata* and *Pichia pastoris*. Indeed, a family of nine genes, named CaBMT1-9, encoding for putative β -1,2-mannosyltransferases (Bmts) was identified by reverse genetics in 2008 (Mille *et al.* 2008). Based on the structural analysis of the glycoconjugates produced by *C. albicans* strains individually deleted in the nine CaBMTs, the enzymatic activities of six proteins out of nine could be inferred. Four of these genes, CaBMT1 to 4, were shown to encode enzymes involved in the β -mannosylation of cell wall PPM: CaBmt1 and CaBmt2 appeared to be responsible for the addition of the first β -mannose unit onto the PPM core (acid-stable fraction, resistant to acid hydrolysis) and phospho-di-ester linked region (acid-labile fraction, released by acid hydrolysis), respectively, whereas CaBmt3 and CaBmt4 appeared to be involved in the elongation of β -Man chains of PPM (Mille *et al.* 2008; Fabre *et al.* 2014b). Then, two other enzymes, CaBmt5 and CaBmt6, were proposed to be involved in the β -mannosylation of PLM (Mille *et al.* 2012). The enzyme activities of CaBmt7-9 remain unknown. In addition to PPM and PLM, other mannoproteins from the cell wall carry β -Mans epitopes in *O*-glycans (Fradin *et al.* 2008). The Hwp1 (Hyphal wall protein 1) adhesin, implicated in the adhesion of *C. albicans* to epithelial cells, is one of those. It is presently not known if Hwp1 β -mannosylation results of the activity of one or several members of the nine previously identified enzymes (Mille *et al.* 2008).

Surprisingly, the amino acid sequences of Bmt proteins exhibit very low similarities with any known glycosyltransferase, which put them out of any known family of glycosyltransferases (GTs).

Bmts have recently been classified in the GT-91 mannosyltransferases family according to the CAZy database (<http://www.cazy.org/>). Currently, the structures of only two mannosyltransferases have been solved: the yeast *Saccharomyces cerevisiae* (*Sc*) α -1,2-mannosyltransferase *ScMnt1/Kre2* and α -1,6-mannosyltransferase *ScMnn9*, belonging to GT families 15 and 62 respectively (Lobsanov *et al.* 2004; Striebeck *et al.* 2013). These structures suggest that *ScMnt1/Kre2* has a S_Ni-like catalytic mechanism with a role for Tyr220 residue in positioning the substrate. For *ScMnn9*, Asp280 plays a role in the donor substrate binding site. This sparse number of crystal structures can be explained by the lack of solubility and stability of isolated mannosyltransferases. Furthermore of them are incorporated into the Golgi membrane and form multi-enzyme complexes *in vivo* (Munro 2001).

The aim of our studies is to characterize CaBmts activities in order to better understand the biosynthetic pathways of β -Mans and the catalytic mechanism of each enzyme, with the longer term objective to guide the design of putative inhibitors. In particular, the availability of well-defined enzymes will permit us to assay the inhibitory activities of a library of synthetic carbohydrates toward individual steps of β -mannosylated oligosaccharides bio-synthesis. Using a recombinant form of Bmt1 (Bmt1p), we have previously demonstrated that this enzyme initiates the β -mannosylation of PPM acid-stable fraction (Fabre *et al.* 2014b). In the present study, a recombinant form of Bmt3 (Bmt3p) was overexpressed in *Pichia pastoris* to determine its *in vitro* activity. Endogenous oligomannosides isolated from *S. cerevisiae* and *C. albicans* mutant PPMs and synthetic oligomannosides were used as potential acceptor substrates. We have demonstrated that Bmt3p catalyzes the *in vitro* transfer of a single β -1,2-mannosyl unit onto a terminal β -1,2-mannoside linked to an α -1,2-linked oligomannoside chain, as previously suggested by the structural analysis of PPM isolated from a *C. albicans* strain deficient in the synthesis of CaBmt3. Furthermore, we demonstrated that Bmt1p and Bmt3p efficiently participate together to the synthesis of the Man β 1-2Man β 1-2[Man α 1-2]_n sequence from α -1,2-linked oligomannosides.

EXPERIMENTAL

Materials

The *Pichia pastoris* strains and plasmids were obtained from Life Technologies; GDP-Mannose was purchased from Sigma-Aldrich; oligonucleotides were synthesized by Eurogentec. Phosphopeptidomannan from *S. cerevisiae* was obtained from Sigma Products. Phosphopeptidomannan from the *C. albicans bmt1Δ* mutant strain, grown in YPD medium at 28°C, was extracted as described previously (Faille *et al.* 1992). Briefly, cells were autoclaved in 0.02M citrate buffer at 125°C for 90 min and Fehling's solution was added to the supernatant to precipitate PPM. The PPM was then washed with methanol/acetic acid (8:1, v/v) and dried in a vacuum concentrator after a final wash in methanol.

Plasmid construction

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

Expression of Bmt1p and Bmt3p in *Pichia pastoris*

The preparation of *Pichia pastoris* supernatant containing Bmt1p was previously described (Fabre *et al.* 2014b). A similar protocol was used to express Bmt3p. Briefly, the pPICZαA vector was digested with SacI and the linearized fragment was used to transform the *P. pastoris* strain (X-33) by electroporation. Transformants were screened for the expression level of Bmt3p. Clones were grown in 5 ml deep-well microplates at 28°C (200 rpm) in BMGY medium (1% (w/v) yeast extract, 2% (w/v) peptone, 1.34% (w/v) yeast nitrogen base, 0.00004% biotin and 1% (v/v) glycerol buffered at pH 6 with 100 mM potassium phosphate) until OD₆₀₀ of 40. Medium was removed by centrifugation and the cells were re-suspended at 5-fold their original density in BMM medium (similar to BMGY without yeast extract and with 0.5% methanol instead of glycerol). The medium was collected after 2 days of culture at 28°C during which methanol 0.5% and leupeptin and pepstatin protease inhibitors were added every 12 h. The clone showing the best expression level was then cultivated in baffled Erlenmeyer flasks. 0.05% Tween 20 was added during the expression phase. Cells were removed by centrifugation after which 0.01% sodium azide was added with or without 0.5% Triton X-100. The culture supernatants were used as Bmt1p or Bmt3p source for every enzymatic assay. In parallel, X-33 strain was transformed in the same conditions as described above, using the empty pPICZαA vector. The supernatant collected at the end of the process was used as a control in the mannosyltransferase assays described below.

Purification of recombinant Bmt3p

To purify the over-expressed Bmt3p, nickel-affinity chromatography was performed using an Akta Purifier FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography, GE Healthcare). HisPur Ni-NTA Chromatography 1 mL column (Thermo Scientific) was washed with Buffer A (20 mM sodium phosphate buffer, 100 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 1 μM Pepstatin A, 10 μM Leupeptin, pH 7.4) and loaded with culture supernatant at 0.5 mL/min. Then, the column was washed with Buffer A' (same as Buffer A without Triton X-100). Finally, the column was irrigated with Buffer B (same as Buffer A' with 500 mM imidazole) at 2 mL/min for 10 min with an intermediary step at 250 mM for 5 min. Eluted fractions of 1 mL were collected and analyzed by SDS/PAGE (15% gel).

Analytical methods

Culture supernatant or purified Bmt3p were run on SDS/PAGE (15% gel) using a Mini-Protean 3 electrophoresis system (Bio-Rad Laboratories). Proteins were visualized with Coomassie Blue ProteoStain (Proteomics Consult). Protein concentration was determined from SDS/PAGE (15% gel) by densitometry with a GS-800 Calibrated Imaging densitometer (Bio-Rad Laboratories) and software Quantity One, using purified Bmt1p as a standard (Fabre *et al.* 2014b).

For Western blotting, proteins were transferred with the Mini Trans-Blot cell (Bio-Rad Laboratories) onto nitrocellulose membranes (Protran BA 83, Whatman). Detection was performed with the ECL2 detection system (GE Healthcare). Primary antibodies were rabbit polyclonal antisera raised against synthetic peptides containing 15 amino acid residues of the C-terminus of Bmt3p (CALSKDTMGWDKLSR and TQERLKDESSDPVLE + C, Eurogentec).

Dynamic light scattering

Dynamic light scattering (DLS) was carried out at 20°C with a Malvern Zetasizer Nano ZS instrument equipped with temperature control and using a 633 nm He-Ne laser for backscattering at 173°. The measurement duration was 10s and 15 measurements were averaged for each analysis. The culture supernatants containing Bmt3p or Bmt1p, with or without 0.5% Triton X-100, were centrifuged at 14000 g for 45 min at 4°C prior to analysis.

Purification of acceptor substrates

Natural oligomannosides were obtained from *S. cerevisiae* and *C. albicans* mutant strain phosphopeptidomannans as previously described (Fabre *et al.* 2014b). Briefly, the acid-labile oligosaccharides were released from *C. albicans bmt1Δ* PPM by mild acid hydrolysis and individually separated by gel-filtration chromatography. Then, the remaining PPM was submitted to acetolysis that generated a mixture of oligosaccharides further purified by anion-exchange chromatography and individually separated by gel filtration chromatography (BioGel P2 from BioRad).

Coupling of oligosaccharides with 2-aminopyridine

The pyridylation of the oligosaccharides was performed as described by Hase (Hase 1994). Briefly 100 µg of oligomannosides were incubated at 80°C for 1 h in 20 µL of solution A (552 mg of 2-aminopyridine (Aldrich) in 200 µL of glacial acetic acid) followed by the addition of 70 µL of solution B (250 mg of dimethylamine boran complex (Aldrich) in 100 µL of acetic acid and 62.5 µL H₂O) and 1 h incubation at 80°C. The samples were dried under nitrogen and diluted in 1 mL of water. The solution was adjusted to pH 10 with aqueous ammonia, washed ten times with chloroform and freeze-dried. The reaction mixture was diluted with 100 µL of water and applied to a C18 cartridge (Sep-Pak Waters), and separated from free 2-aminopyridine by elution with 5 mL acetonitrile/water (25/75).

Synthetic acceptor substrates

Three synthetic fluorescent acceptor substrates were prepared. The synthesis of mantyl-tagged α -oligomannosides (DP3M-a and DP4M-a) has been previously described (Pourcelot *et al.* 2013). Another mantyl-tagged oligomannoside (DP4M-b) [Man β 1-2Man α 1-2Man α 1-2Man α -Mantyl] was synthesized using a different mannoside-to-mantyl linker. This derivative was prepared in 10 steps from alkyl 3,4,6-tri-O-benzyl-2-O-Benzoyl 1-thio mannose and glucose, and fully characterized by NMR and mass spectrometry. Briefly, azido propanol was α -mannosylyzed by three consecutive treatments with lauryl 2-O-benzoyl 3,4,6-O-tribenzyl 1-thio glycoside, NIS, TfOH followed by Zemplen debenzoylation. On the trimannoside level, a β -manno unit was introduced in position 2" by three steps sequence : [β -glucosylation using a 2-O-benzoyl 3,4,6-O-tribenzyl D-glucopyranoside donor, followed by debenzoylation, oxidation, reduction] to give a β -manno unit in the non reducing end. Finally, protecting groups (benzyl ether and azido) were removed by catalytic hydrogenolysis and the product was N-mantylated (by N-methylisatoic anhydride) to give DP4M-b. A more detailed account of the synthesis of this compound will be provided in a coming report (Cattiaux *et al.*, in preparation).

Mannosyltransferase Assays

The standard assay mixtures contained 25 μL (corresponding to about 1 μg of protein) of the Bmt1p- or Bmt3p-containing culture supernatant of *P. pastoris* (in Tween 20/Triton X-100, same batch for each assay), 0.1 mM pyridylamino- or mantyl-oligomannoside, 20 mM GDP-mannose donor, 0.3 % Triton X-100, 50 mM sodium citrate buffer pH 6.5, 20 mM CaCl_2 , in a total volume of 100 μL with the protease inhibitors pepstatin A and leupeptin. The reaction mixture was incubated over different times at 28°C and stopped by boiling for 5 min. Reaction mixtures were centrifuged for 10 min at 12,100 x g and analysed by normal phase HPLC fitted with fluorimetric detection (NP-FL-HPLC).

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

Treatment with α -mannosidase

The α -mannosidase treatment of the reaction mixture after mannosyltransferase assays was carried out in 20 mM sodium acetate buffer pH 5, containing 2 mM ZnCl_2 and 0.15 units of α -exomannosidase from Jack Bean (Prozyme) at 37°C for 24-48h. After centrifugation, the resulting products were analysed by HPLC.

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

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

Isolation of enzyme products

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

Mass spectrometry analysis of native and fluorescent oligomannosides

MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Time of Flight) mass spectra were acquired on a Voyager Elite DE-STR mass spectrometer (Perspective Biosystems, Framingham, MA) equipped with a pulsed nitrogen laser (337 nm) and a gridless delayed extraction ion source. The spectrometer was operated in positive reflectron mode by delayed extraction with an accelerating voltage of 20 kV, a pulse delay time of 250 ns and a grid voltage of 66%. Samples were prepared by mixing 0.5 μL of oligomannosides solution (0.02 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) with 0.5 μL of 2,5-dihydroxybenzoic acid matrix solution (10 mg/mL in methanol/water, v/v) directly on the target. The samples were allowed to dry for about 5 min at room temperature. Between 50 and 100 scans were acquired for each spectrum over the range m/z 200 to 2500 Da.

NMR Analyses

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

Expression and purification of recombinant Hwp1

According to the protocol previously described (Courjol *et al.* 2015), recombinant Hwp1 (Hwp1p) was expressed in *C. albicans*. Briefly, various *C. albicans* cells (CAI-4, *bmt1Δ* mutant) expressing 6xHis Hwp1p were generated *via* the use of *Escherichia coli* strains DH5 α for cloning. The culture supernatants containing the expressed 6xHis Hwp1p were purified using His GraviTrap column (GE Healthcare). Hwp1p^{WT} expressed in CAI-4 was fully β -mannosylated, whereas Hwp1p^{*bmt1Δ*} expressed in *bmt1Δ* was devoid of β -mannosyl residue since β -mannosylation was not initiated in the absence of the *BMT1* gene.

Mannosyltransferase assays on Hwp1p

Assay mixtures contained 50 μ L of the culture supernatant of *P. pastoris* (containing either no Bmtp, or a mixture of 1.5 μ g of Bmt1p and 0.5 μ g of Bmt3p, in Tween 20 0.05%/Triton X-100 0.5%), 0.25 μ g of Hwp1p Δ Bmt1, 20 mM GDP-mannose donor, 0.3 % Triton X-100, 50 mM sodium citrate buffer pH 6.5, 20 mM CaCl₂, in a total volume of 200 μ L with protease inhibitors pepstatin A and leupeptin. The reaction mixture was divided in two parts, incubated for 12 or 48h at 28°C and stopped by boiling for 5 min. Reaction mixtures were then centrifuged for 10 min at 14000 g and analysed by Western-blotting.

Western blotting analysis of Hwp1p assays

Loading buffer was added to each sample in order to get to the following final concentrations: 2% sodium dodecyl sulfate (SDS), 50 mM Tris pH 6.8, 10% glycerol and 2% β -mercaptoethanol. Samples were boiled for 10 min and run on 10 % polyacrylamide SDS/PAGE. Following transfer, nitrocellulose membranes were probed with biotinylated concanavalin A (ConA) or MAb B6.1 diluted 1:1000 and 1:2000 respectively. ConA is specific for terminal α -D-mannosyl and α -D-glucosyl residues and was purchased from Sigma. MAb B6.1 (mouse immunoglobulin M [IgM]) is specific for β -Mans. ConA-probed membrane was incubated with HRP-labeled Streptavidin (1:1000), and MAb B6.1-probed membrane was incubated with alkaline phosphatase-labeled anti-mouse IgM (1:2000). Peroxidase and alkaline phosphatase activities were detected by chemiluminescence using SuperSignal West Pico (Pierce) and CDP star (Roche), respectively.

RESULTS

Production of recombinant Bmt3p in *P. pastoris*

The gene *BMT3* (GenBank EAK9857.1) is predicted to encode a Golgi type II membrane protein of 63.084 kDa presenting a short cytoplasmic N-terminus followed by a transmembrane domain of 21 residues (38-58). We further assigned the following residues covering amino acids 61 to 132 as disordered “stem region” (**Supplementary Figure S1 B**), and defined the catalytic domain from residues 133 to 549 based on alignment with Bmt1p secondary structure predictions. Compared to Bmt1p sequence, no additional “putative transmembrane domain” was predicted by the TopPred software (**Figure S1 A**).

We designed a truncated form of Bmt3p expressed in *P. pastoris*, which was lacking the N-terminal cytoplasmic region, as well as the membrane-spanning domain (**Figure S1 C**). The cleavable signal sequence α factor from *S. cerevisiae* was placed at the N-terminus and the fusion protein was placed under the control of the *AOX1* (alcohol oxidase 1) promoter. One CUG codon encoding for a serine was identified in the Bmt3p native sequence (in position 460). In most organisms, a CUG codon is translated as a leucine residue. But in *Candida* species, it is almost always translated as a serine residue (95 to 97% of the time) (Rocha *et al.* 2011). In order to restore its native sequence, this CUG codon was mutated to encode a serine residue.

The recombinant Bmt3p was produced at the expected molecular mass of 53.9 kDa (**Figure 1**) and was absent from the medium of the control cells. The BMM induction medium was preferred to BMGY because high mannose content of yeast extract may inhibit mannosyltransferase activities. The yield was determined by densitometry of the SDS/PAGE gels, stained by ProteoStain. It was estimated that approximately 35 mg of Bmt3p per litre of BMM medium was produced. This yield was similar to that previously obtained for Bmt1p (Fabre *et al.* 2014b).

Size determination of Bmt1p and Bmt3p particles

Contrary to Bmt1p, the production of recombinant Bmt3p was achieved without the addition detergent of (except for the introduction of 0.05% Tween 20 at the beginning of the induction period). This difference of solubility was visualized using DLS analysis, by comparing the sizes of Bmt1p and Bmt3p, with or without the addition of 0.5% Triton X-100 (**Supplementary Figure S2**). Indeed, without detergent, Bmt1p forms 20-1000 nm aggregates in solution. In order to obtain 4 nm Bmt1p monomers, the addition of detergent like Triton X-100 at 0.5% is thus mandatory. On the contrary, 5 nm monomers of Bmt3p can be observed in the absence of any additional detergent, without impeding enzyme activity. However, in order to ensure a long-term solubilization of Bmt3p, we added 0.5% Triton X-100 in the culture supernatant for better consistency during enzymatic experiments over a long period of time.

Production of natural and synthetic acceptor substrates

A variety of oligomannosides differing in size and sequences were chosen as potential acceptor substrates for the characterization of the activity of the Bmt3p produced in *P. pastoris*. Natural α -oligomannosides were generated from PPMs isolated from *S. cerevisiae* and *C. albicans bmt1 Δ* mutant strain. We have used two different strains in order to generate a large panel of oligosaccharides that present different structural features. The β -Mans were purified from the acid-labile moiety of *C. albicans bmt1 Δ* strain PPM. These oligomannosides, which structures were described in a previous report (Fabre *et al.* 2014b), were used as substrates for mannosyltransferase assays after coupling with a fluorescent tag (2-aminopyridine). Three mantyl tagged oligomannosides [DP3M-a, DP4M-a and DP4M-b] were also synthesized to be used as potential substrates. DP3M-a and DP4M-a were mantylated α -1,2-tri- and tetra-mannosides respectively, whereas DP4M-b contained a non-reducing terminal β -1,2-mannosyl residue linked to a α -1,2-mannotriose (**Supplementary Figure S3**).

Determination of the enzymatic activity

Based on the *in vitro* activity of Bmt1p in the initiation of PPM acid-resistant moiety β -mannosylation (Fabre *et al.* 2014b) and on the putative role of Bmt3 in the first step of PPM β Man chain elongation (Mille *et al.* 2008), we hypothesized that Bmt1p and Bmt3p could sequentially add two β -Man residues on a stretch of α -1,2-linked mannan. This hypothesis was tested by incubating the two enzymes sequentially or simultaneously with the synthetic mantyl-tagged α -1,2-mannotriose DP3M-a [$\text{Man}\alpha$ 1-2 $\text{Man}\alpha$ 1-2 $\text{Man}\alpha$ -Mantyl]. Culture supernatants of *P. pastoris* were used as enzyme sources for both Bmt1p and Bmt3p (see (Fabre *et al.* 2014b) for the production of Bmt1p). The reaction mixtures were incubated over different times at 28°C, pH 6.5 under the standard assay conditions, and the generation of reaction products was followed by NP-FL-HPLC. As shown in **Figure 2B**, 48h incubation of Bmt1p extract with DP3M-a and GDP-Man generated two α -mannosidase resistant products P1 and P2 in the ratio 2:1. P1, the major product of Bmt1p activity, and P2 were previously described as extensions of DP3M-a with one or two β -Man residues, respectively. This was expected since Bmt1p was shown to catalyse the *in vitro* transfer of up to two consecutive β -Man units onto this substrate DP3M-a (Fabre *et al.* 2014b). After the inactivation of Bmt1p by heating 10 min at 100°C, the reaction mixture containing P1 and P2 was used as acceptor substrate for Bmt3p in the standard reaction procedure. The respective amounts of P1 and P2 were then assessed by HPLC for each incubation time. From 1 h, the second product P2 became prominent (P1 and P2 approximately in the ratio 1:2) (data not shown). Longer incubation times with Bmt3p strongly decreased the quantity of P1 and concomitantly increased the P2 quantity. Incubation time of 48h showed the total disappearance of the first product P1 (**Figure 2C**). However, we could not observe the appearance of a third product, which demonstrated that P2 cannot be used by Bmt3p as acceptor substrate. Furthermore, Bmt3p incubated with DP3M-a up to 48 h did not generate any product, which established that DP3M-a cannot be used as a substrate by Bmt3p (data not shown and **Table 1**).

In parallel, we simultaneously incubated Bmt1p and Bmt3p extracts with DP3M-a. As for sequential incubation of Bmt1p and Bmt3p, simultaneous incubation led to the accumulation after 48h of a single product with a similar chromatographic behavior to P2, suggesting the conversion of P1 as soon as it is formed (**Figure 2D**). A longer incubation time (96 h) enabled the conversion of 75% of the initial substrate into the α -mannosidase resistant P2 product (**Figure 2E and 2F**). These experiments evidenced that the product of Bmt1p *in vitro* activity can be used by Bmt3p as an acceptor substrate.

In order to precisely identify the product resulting from both enzymes activity on DP3M-a, the final reaction product P2 was isolated by preparative HPLC from a large-scale enzyme reaction mixture containing both Bmt1p and Bmt3p. It was then analysed by MS and NMR. In MALDI-TOF MS analysis, the final P2 product exhibited $[\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z value at 1122.6 (**Figure 3B**), which confirmed its attribution to Hex₅-mantyl (named DP5M-a). A control experiment showed that it was resistant to α -exomannosidase treatment, which strongly suggests that the terminal non-reducing mannose residue has a β -anomerism (data not shown). The one-dimensional ¹H NMR spectrum of DP5M-a showed five anomeric signals A to E (**Figure 4A**). Compared to DP3M-a (**Supplementary Figure S4**), two additional shielded anomeric protons (D) and (E) at 4.86 and 4.84 ppm were observed in DP5M-a spectrum and tentatively attributed to two supplementary mannosyl residues transferred onto the DP3M-a glycan. The integration values of H1-D and H1-E (1.11 and 1.13) were very close to those of H1-A, H1-B and H1-C (1.00, 1.05 and 0.96), which strongly suggested that they are part of the same oligosaccharide. The complete spin systems of the five residues were established by ¹H-¹H COSY, TOCSY, ROESY and ¹H-¹³C HSQC NMR experiments ((**Figure 4B-D**). These established that (1) A, B and C were α -Man residues; (2) D and E were β -Man residues; (3) A, B, C and D residues were substituted in position C2; (4) E residue was not substituted. The identification of β -anomerism was confirmed by (1) the observation of strong internal H1/H3 and H1/H5 nuclear Overhauser effects (nOe) for both D (H1/H3 at δ 4.86/3.65 and H1/H5 at δ 4.86/3.39) and E (H1/H3 at δ 4.84/3.62 and H1/H5 at δ 4.84/3.34) on ROESY spectrum (**Figure 4C**); (2) the strong downfield shifts of D-H5/C5 at 3.39/77.4 ppm and E-H5/C5 at 3.34/77.5 ppm compared with α -Man, as observed on ¹H-¹³C HSQC spectrum (**Figure 4D**) (Shibata *et al.* 1993). In addition, the observation of (1) the strong downfield shifts of C-H1 ($\Delta\delta$, +0.10 p.p.m.) and C-H2 ($\Delta\delta$, +0.19 p.p.m.) signals compared with DP3M-a (**Table 2 and**

Supplementary Figure S4) and (2) external H1-C/H1-D nuclear Overhauser effect (nOe) (**Figure 4C**) established that D was linked to C in position C-2.

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

Enzymatic parameters

In order to establish the enzymatic parameters of Bmt3p, we synthesized a β -1,2-mannosyl- α -1,2-mannotriose derivative to serve as specific substrate for Bmt3p that we called DP4M-b [details of the synthesis of this mantyl oligomannoside will be published elsewhere, Cattiaux *et al.*, in preparation].

The incubation of Bmt3p extract under the standard assay conditions (28°C, pH 6.5) with DP4M-b and GDP-Man generated very quickly (from 10 min) a single product detected by HPLC analysis with a higher retention time than DP4M-b (18.8 min versus 14.4 min). This compound, named DP5M-b, was resistant to α -exomannosidase treatment and showed the same chromatographic behavior than DP5M-a (data not shown). The analysis of DP5M-b by MALDI-TOF MS confirmed that it was a Hex₅-mantyl owing to its observed [M+Na]⁺ value at *m/z* 1041.2, as expected (**Figure 3D**). Although the addition of the terminal β Man residue at C-2 position of β Man unit of DP4M-b could not be formally established by NMR because of low quantity, MS analysis and enzymatic digestion strongly suggest that Bmt3p transferred one β -1,2-mannosyl residue onto this initial substrate, in a similar manner than on P1.

The incubation of Bmt3p with DP4M-b under standard assay conditions led to a time-dependent DP5M-b production for at least 3h at 28°C corresponding to ~ 7 μ mol/h per mg of protein (**Figure 5A**). A control experiment using the supernatant from *P. pastoris* transformed with the empty vector did not show any transferase activity onto DP4M-b in similar experimental conditions (data not shown). It is noteworthy that Bmt3p exhibited a high reaction velocity in comparison with Bmt1p, whose velocity was estimated around 40 nmol/h per mg of protein (Fabre *et al.* 2014b).

The activity of Bmt3p was investigated under different experimental conditions using DP4M-b as acceptor substrate in order to establish by NP-FL-HPLC the optimal reaction conditions for the formation of DP5M-b. The temperature- and pH- dependence and the metal requirement were studied under the standard assay conditions except for the parameter studied. The pH dependence of the enzyme activity was determined in two buffers: sodium citrate/citric acid 100 mM between pH 4 and pH 6.5, and Tris/maleate 100 mM between pH 6.5 and pH 9.5. Bmt3p exhibited maximum activity at pH 6.5 (**Figure 5B**). The temperature dependence study showed that maximal activity occurred at 28°C (**Figure 5C**). Thus, the optimal conditions were shown to be very close to the standard conditions used throughout this study. The effect of several divalent cations, Mn²⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Co²⁺, Ni²⁺ and Zn²⁺, on the Bmt3p activity was assessed with the use of their respective chloride salts. As shown in **Figure 5D**, the Bmt3p activity was equivalent in presence of Mg²⁺, Mn²⁺, Co²⁺ or Ca²⁺, and only slightly affected by Ni²⁺ but completely inhibited by Zn²⁺. The presence of EDTA alone did not affect their activity. Thus, Bmt3p does not require a specific divalent cation to perform its duty. Moreover, it is noteworthy that, contrary to Bmt1p, Bmt3p activity is not inhibited by Ni²⁺, but only slightly affected.

Determination of the acceptor substrate specificity

In order to study the substrate specificity of Bmt3p, we used pyridylamino-labeled oligomannosides generated from PPMs of *S. cerevisiae* and *C. albicans bmt1 Δ* mutant and synthetic mantyl-tagged oligomannosides. Optimal incubation conditions were used, as established above *i.e.* 30 min, 28°C, pH 6.5 with 20 mM CaCl₂.

As shown in **Table 1**, the only acceptor substrate inducing the generation of α -mannosidase-resistant higher DP product was the mantylated DP4M-b [DP4 $\alpha\beta$] that generated a DP+1 product with a conversion rate of about 35% in 30 min. None of the assays using the pyridylamino- or mantyl-tagged

α -1,2-tri- and tetramannosides [DP3 α and DP4 α 2] or the pyridylamino derivatives of α -1,2- or β -1,2-mannobiose [DP2 α and DP2 β] generated a higher DP product. Similarly, Bmt3p showed no activity toward pyridylamino derivatives of a β -1,2-tetramannoside [DP4 β 2] and of a α -1,2-trimannoside capped with a α -1,3-mannosyl unit [DP4 α 3]. These data established that *in vitro* Bmt3p requires a Man β 1-2Man α motif in the terminal non-reducing end to elongate a tetramannoside by a single β -1,2-mannosyl residue.

Bmt3p purification and enzymatic activity of purified Bmt3p

As shown in **Figure 1**, Bmt3p is by far the major protein of the culture supernatant of *P. pastoris*. As established above, culture supernatant of *P. pastoris* expressing Bmt3p exhibits a specific β -mannosyltransferase activity that was not observed with the culture supernatant obtained with the empty vector. However, in order to confirm that the observed activity is borne by Bmt3p, the recombinant enzyme was purified and assayed. Despite the fact that no polyhistidine tag had been inserted in the plasmid, we noticed that Bmt3p could bind to a certain extent to a Ni²⁺ affinity column, as we previously observed for Bmt1p. Bmt3p was eluted from the column with 250 mM imidazole, which permitted us to achieve a higher degree of purity than in the supernatant (**Figure 1**). In identical experimental conditions, the purified enzyme exhibited similar mannosyltransferase activity rate onto DP4M-b than the culture supernatant (data not shown). Furthermore, even in the presence of 250 mM imidazole, Bmt3p retained its ability to transfer a β -mannosyl residue on its substrate, albeit with 20% decrease in transfer rate, as compared with the activity observed before purification. In addition, DLS analysis showed that purified Bmt3p retained monomeric form (not shown). Altogether, these data showed that purification of Bmt3p did not compromise its enzymatic activity.

Bmt1p and Bmt3p activity on a recombinant mannoprotein

Activity assays on purified and synthetic oligosaccharides established that Bmt1p and Bmt3p can efficiently β -mannosylate α -1,2-mannans to generate Man β 1-2Man β 1-2[Man α 1-2]_n epitopes. We further assessed the capacity of these enzymes to modify glycoproteins by using the endogenous mannoprotein Hwp1 as a model target. To achieve this, recombinant Hwp1 was over-expressed as a secreted soluble protein both in a WT strain (Hwp1pWT) and in a *BMT1* deleted strain (Hwp1p*bmt1* Δ), the latter being used for activity assay. As shown in **Figure 6** (lanes 1 and 2), both Hwp1pWT and Hwp1p*bmt1* Δ are recognized by concanavalin A (ConA) as broad bands around 70 and 50 kDa, respectively. It is noteworthy that Hwp1p*bmt1* Δ exhibits a slightly higher mobility in gel electrophoresis, probably due to the shorter mannosylation induced by the lack of β -mannosylation. However, only Hwp1pWT is detected by the antibody MAb B6.1 (lanes 7 and 8) that is known to be specific to β -mannosylated epitopes (Han *et al.* 1997), which confirms the absence of β -mannosylation on Hwp1p*bmt1* Δ . Time course incubation (12 and 48h) of Hwp1p*bmt1* Δ with Bmt1p and Bmt3p in standard conditions did not induce visible modifications of the ConA reactive glycoproteins around 50 kDa (lanes 5 and 6). However, it induced the specific appearance of a MAb B6.1 reactive glycoprotein around 50 kDa in Hwp1p*bmt1* Δ strain which co-migrates with Hwp1p (lanes 11 and 12 vs lanes 9 and 10). The optimal signal intensity was obtained after 48h incubation. Strong signals around 70 and 40 kDa correspond to endogenous β -mannosylated mannoproteins from *P. pastoris* supernatant. Therefore, this experiment established that Bmt1p and Bmt3p can β -mannosylate endogenous mannoproteins produced by *C. albicans*.

DISCUSSION

The human pathogen yeast *Candida albicans* is the most frequent cause of invasive candidiasis with a high level of mortality (Wisplinghoff *et al.* 2004; Bounoux *et al.* 2008). Its cell wall plays an essential role in host-pathogen interaction, in particular β -1,2-linked mannose units that were shown to be directly connected to both PPM acid stable and acid labile fractions and correspond to the antigenic factor 6 (one, two or three β -Man at the non-reducing end of α -1,2-linked mannan) and antigenic factor 5 (homopolymer of β -1,2-linked mannose) of serotype A *C. albicans* (Kobayashi *et al.* 1992; Shibata *et al.* 1992). The β -1,2-linked oligomannosides moieties were found to display, in mice, stronger antigenicity than the α -linked mannosides (Dromer *et al.* 2002). The factor 6 antigen of *C. albicans* serotype A was reported to play a role in fungal adherence to epithelial cells (Miyakawa *et al.* 1992) and the factor 5 antigen was shown to induce tumor necrosis factor (TNF)- α production through binding to macrophages *via* galectin-3 (Fradin *et al.* 1996; Fradin *et al.* 2000). Despite the fact that the presence of β -mannosides in *C. albicans* cell wall was established in 1980s by Shibata and co-workers (Shibata *et al.* 1985), the family of genes encoding for enzymes involved in the transfer of β -Mans was only identified in 2008 by Mille and co-workers (Mille *et al.* 2008). This work allowed the characterization of a new family of nine genes, named CaBMT1-9, encoding for β -1,2-mannosyltransferases (Bmts) in *C. albicans*. Four of these β -1,2-mannosyltransferases (CaBmt1-4) are involved in the β -mannosylation of cell wall PPM and two (CaBmt5-6) act specifically on β -mannosylation of the PLM (Mille *et al.* 2008). In order to better understand biosynthetic pathways of β -mannosides, the *in vitro* activity of a recombinant form (Bmt1p) of CaBmt1, the enzyme responsible for the initiation of β -mannosylation of PPM acid stable fraction, was recently characterized (Fabre *et al.* 2014b).

In the present study, we characterized the *in vitro* activity of a recombinant form of CaBmt3 that was tentatively associated to the elongation of the β -Mans chain on the phosphopeptidomannan (Mille *et al.* 2008). Similarly to CaBmt1, CaBmt3 harbors a type II membrane protein arrangement. We used the *P. pastoris* protein expression system to obtain a soluble Bmt3p lacking the cytoplasmic N-terminus and the membrane spanning domain. This protocol permitted us to obtain high concentrations of the desired protein. In addition, the absence in Bmt3p of the hydrophobic region located at the C-terminal end in Bmt1p, which presents similarity with PDZ domain known to play a part in protein-protein interactions (Kim and Sheng 2004), allowed us to produce the recombinant active Bmt3p without any additional detergent, albeit the introduction of 0.05% Tween 20 at the beginning of the induction period. However, because it was shown to ensure a long-term solubilization of the enzyme (data not shown), we added 0.5% of Triton X-100 when storage and results consistency over a long period of time were needed.

Using a synthetic substrate, we first established that Bmt3p can transfer *in vitro* a single β -1,2-mannosyl unit to a terminal β -1,2-mannoside linked to a α -1,2-linked oligomannoside chain. The enzymatic activity of Bmt3p was then compared with the previously described Bmt1p activity. Surprisingly, Bmt3p showed a much higher reaction velocity (5-10 μ mol/h per mg of protein) than i) Bmt1p, which exhibited a relatively low catalysis velocity (about 40 nmol/h per mg of protein) (Fabre *et al.* 2014b), and ii) native enzyme fractions of *Candida* cells (approximately 30 and 50 nmol/h per mg of protein for *C. albicans* serotype A and *Candida guilliermondii* β -1,2 mannosyltransferases respectively) (Goto and Okawa 2008, Shibata *et al.* 2012). This discrepancy may be the result of an unsuitable *in vitro* environment for Bmt1p activity. Indeed, the presence of an additional C-terminal hydrophobic region in this enzyme, homologous to a PDZ motif (Kim and Sheng 2004), strongly suggests that Bmt1 requires a physical proximity with a lipidic membrane or a proteic partner. However, DLS assays using mixtures of Bmt1p and Bmt3p supernatants showed the absence of Bmt1p/Bmt3p dimeric or multimeric association (data not shown). Moreover, this difference in reaction velocity between Bmt1p and Bmt3p could also justify the respective *in vivo* role of CaBmt1 and CaBmt3. Indeed, we previously showed that Bmt1p was able to form *in vitro* two reaction products (addition of one or two β -Man residues), thus potentially rendering unnecessary the action of Bmt3p. But the fact that Bmt3p is at least 100 times quicker than Bmt1p to add this second β -Man unit on its substrate leads us to believe that *in vivo* CaBmt3, rather than CaBmt1, is the enzyme responsible for the addition of the second β -Man onto the PPM acid-stable moiety.

In 1995, Suzuki and co-workers studied the β -1,2-mannosyltransferase activities of microsomes prepared from *C. albicans* strains (Suzuki *et al.* 1995). They called β -1,2ManTaseII the activity corresponding to Bmt3. They determined that this enzyme exhibited an optimum activity at 30°C and pH 7, and did not require any specific divalent cation. They also showed that its minimal acceptor motif was Man β 1-2Man α 1-. In the present study, by using a variety of substrates we confirmed that Bmt3p exhibited an exquisite specificity toward oligosaccharides capped with Man β 1-2Man α 1- motif. Indeed, we showed that Bmt3p is unable to transfer a Man residue onto other substrates such as α -1,2-tri- and tetramannosides [DP3 α and DP4 α 2] or α -1,2- or β -1,2-mannobiose [DP2 α and DP2 β] (**Table 1**). On the one hand, our report evidenced that Bmt1p and Bmt3p act sequentially to generate the β -mannosylation of PPM acid stable fraction as previously predicted for *in vivo* activity of CaBmt1 and CaBmt3 (Mille *et al.* 2008). On the other hand, we demonstrated that Bmt1p and Bmt3p can also add β -Man residues onto endogenous mannoproteins of *C. albicans* such as recombinant Hwp1. Then, we established that Bmt3p exhibited optimal reaction conditions very similar to Bmt1p; i.e. 28°C, pH 6.5. Furthermore, the addition of EDTA did not affect activity of Bmt3p indicating that divalent cations do not contribute to the reaction, in accordance with Suzuki and co-workers' findings.

Surprisingly, despite the absence of 6xHis tag, Bmt3p can bind to a Ni²⁺ affinity column that allowed its purification. Bmt3p conserved about 80% of its enzymatic activity after purification. The fact that Bmt3p is only slightly affected by Ni²⁺ could be used to produce milligram quantities of stable protein : expression of Bmt3p with a 6xHis tag in *Escherichia coli* could be achieved relatively easily and the purification protocol presented here appears reproducible and readily set up. The production of such quantities will be useful in future experiments to establish the structure and catalytic mechanism of Bmt3p. Indeed, alignment studies of CaBmts with ScMnt1/Kre2 or ScMnn9 proved to be rather difficult due to the singularity of this GT-91 family, especially CaBmt3. Equivalent of the canonical DXD motif involved in the coordination of manganese (E²⁴⁷PD) identified in ScMnt1/Kre2 for example could potentially be found in CaBmt3 as E²⁸⁸VD but catalytic residue Tyr²²⁰ does not seem to have an equivalent in CaBmt3 sequence. Therefore, to extend our understanding of how precisely this GT-91 family functions, it is now essential to obtain direct structural data.

ABBREVIATIONS

PPM, Phosphopeptidomannan; PLM, Phospholipomannan ; Bmt, β -1,2 mannosyltransferase; Bmtp, β -1,2-mannosyltransferase recombinant form; Hwp1p, Hwp1 recombinant form; β -Man, β -1,2-linked mannose; *BMT*, β -1,2-mannosyltransferase gene ; *bmt1* Δ , *C. albicans BMT1* gene deleted mutant strain ; BMGY, Buffered glycerol complex medium ; BMM, Buffered minimal methanol medium ; MALDI-TOF MS, matrix assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry ; DP, degree of polymerization ; NMR, Nuclear magnetic resonance ; TOCSY, total correlation spectroscopy ; COSY, correlation spectroscopy ; ROESY, rotating-frame nuclear Overhauser effect correlation spectroscopy; HSQC, heteronuclear single quantum coherence ; NP-FL-HPLC, normal-phase HPLC with fluorimetric detection; PA, pyridylamino; NIS, N-iodosuccinimide; TfOH, trifluoromethanesulfonic acid.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr Frederic Krzewinski and Dr Diane Jouanneau for their technical help in HPLC and HPAEC. We gratefully acknowledge Pr. J. Cutler (Research Institute for Children, New Orleans, LA) for providing mAb B6.1.

FUNDING

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

research on the 900 MHz spectrometer is gratefully acknowledged. The mass spectrometry facility used in this study is funded by the European Community (FEDER), the Région Nord-Pas de Calais (France), the CNRS and the Université Lille1. This work was partly supported by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-MIEN-BMT)

REFERENCES

- Bougnoux M-E, Kac G, Aegerter P, d'Enfert C, Fagon J-Y. 2008. Candidemia and candiduria in critically ill patients admitted to intensive care units in France: incidence, molecular diversity, management and outcome. *Intens Care Med.* 34:292–299.
- Courjol F, Jouault T, Mille C, Hall R, Maes E, Sendid B, Mallet JM, Guerardel Y, Gow NA, Poulain D, Fradin C. 2015 β -1,2-Mannosyltransferases 1 and 3 participate in yeast and hyphae O- and N-linked mannosylation and alter *Candida albicans* fitness during infection. *Open Forum Infect Dis.* 2:ofv116.
- Cutler JE. 2001. N-glycosylation of yeast, with emphasis on *Candida albicans*. *Med Mycol.* 39 Suppl 1:75–86.
- Dalle F, Jouault T, Trinel PA, Esnault J, Mallet JM, d'Athis P, Poulain D, Bonnin A. 2003. β -1,2- and α -1,2-linked oligomannosides mediate adherence of *Candida albicans* blastospores to human enterocytes in vitro. *Infect Immun.* 71:7061–7068.
- Dromer F, Chevalier R, Sendid B, Improvisi L, Jouault T, Robert R, Mallet JM, Poulain D. 2002. Synthetic analogues of β -1,2 oligomannosides prevent intestinal colonization by the pathogenic yeast *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Ch.* 46:3869–3876.
- Fabre E, Hurtaux T, Fradin C. 2014a. Mannosylation of fungal glycoconjugates in the Golgi apparatus. *Curr Opin Microbiol.* 20:103–110.
- Fabre E, Sfihi-Loualia G, Pourcelot M, Coddeville B, Krzewinski F, Bouckaert J, Maes E, Hurtaux T, Dubois R, Fradin C, et al. 2014b. Characterization of the recombinant *Candida albicans* β -1,2-mannosyltransferase that initiates the β -mannosylation of cell wall phosphopeptidomannan. *Biochem J.* 457:347–360.
- Faille C, Wieruszkeski J-M, Michalski J-C, Poulain D, Strecker G. 1992. Complete ¹H- and ¹³C-resonance assignments for D-mannooligosaccharides of the β -D-(1 → 2)-linked series released from the phosphopeptidomannan of *Candida albicans* VW.32 (serotype A). *Carbohyd Res.* 236:17–27.
- Fradin C, Jouault T, Mallet A, Mallet JM, Camus D, Sinay P, Poulain D. 1996. Beta-1,2-linked oligomannosides inhibit *Candida albicans* binding to murine macrophage. *J Leukocyte Biol.* 60:81–87.
- Fradin C, Poulain D, Jouault T. 2000. β -1,2-linked oligomannosides from *Candida albicans* bind to a 32-kilodalton macrophage membrane protein homologous to the mammalian lectin Galectin-3. *Infect Immun.* 68:4391–4398.
- Fradin C, Slomianny MC, Mille C, Masset A, Robert R, Sendid B, Ernst JF, Michalski JC, Poulain D. 2008. β -1,2 oligomannose adhesin epitopes are widely distributed over the different families of *Candida albicans* cell wall mannoproteins and are associated through both N- and O-glycosylation processes. *Infect Immun.* 76:4509–4517.
- Fukazawa Y, Kagaya K. 1997. Molecular bases of adhesion of *Candida albicans*. *J Med Vet Mycol.* 35:87–99.
- Goto K, Okawa Y. 2008. Activity and stability of alpha- and beta-mannosyltransferases in *Candida albicans* cells cultured at high temperature and at low pH. *Biol Pharm Bull.* 31:1333–1336.
- Han Y, Kanbe T, Cherniak R, Cutler JE. 1997. Biochemical characterization of *Candida albicans* epitopes that can elicit protective and nonprotective antibodies. *Infect Immun.* 65:4100–4107.

- Han Y, Morrison RP, Cutler JE. 1998. A vaccine and monoclonal antibodies that enhance mouse resistance to *Candida albicans* vaginal infection. *Infect Immun.* 66:5771–5776.
- Hase S. 1994. High-performance liquid chromatography of pyridylaminated saccharides. In: William J. Lennarz GWH, editor. *Methods in Enzymology*. Vol. 230. Academic Press. p. 225–237.
- Jouault T, Lepage G, Bernigaud A, Trinel PA, Fradin C, Wieruszkeski JM, Strecker G, Poulain D. 1995. Beta-1,2-linked oligomannosides from *Candida albicans* act as signals for tumor necrosis factor alpha production. *Infect Immun.* 63:2378–2381.
- Jungmann J, Munro S. 1998. Multi-protein complexes in the cis Golgi of *Saccharomyces cerevisiae* with alpha-1,6-mannosyltransferase activity. *EMBO J.* 17:423–434.
- Kim E, Sheng M. 2004. PDZ domain proteins of synapses. *Nat Rev Neurosci.* 5:771–781.
- Kobayashi H, Shibata N, Suzuki S. 1992. Evidence for oligomannosyl residues containing both beta-1,2 and alpha-1,2 linkages as a serotype A-specific epitope(s) in mannans of *Candida albicans*. *Infect Immun.* 60:2106–2109.
- Lobsanov YD, Romero PA, Sleno B, Yu B, Yip P, Herscovics A, Howell PL. 2004. Structure of Kre2p/Mnt1p a yeast α 1,2-mannosyltransferase involved in mannoprotein biosynthesis. *J Biol Chem.* 279:17921–17931.
- Mille C, Bobrowicz P, Trinel P-A, Li H, Maes E, Guerardel Y, Fradin C, Martínez-Esparza M, Davidson RC, Janbon G, et al. 2008. Identification of a new family of genes involved in β -1,2-mannosylation of glycans in *Pichia pastoris* and *Candida albicans*. *J Biol Chem.* 283:9724–9736.
- Mille C, Fradin C, Delplace F, Trinel P-A, Masset A, François N, Coddeville B, Bobrowicz P, Jouault T, Guerardel Y, et al. 2012. Members 5 and 6 of the *Candida albicans* BMT family encode enzymes acting specifically on β -mannosylation of the phospholipomannan cell-wall glycosphingolipid. *Glycobiology.* 22:1332–1342.
- Miyakawa Y, Kuribayashi T, Kagaya K, Suzuki M, Nakase T, Fukazawa Y. 1992. Role of specific determinants in mannan of *Candida albicans* serotype A in adherence to human buccal epithelial cells. *Infect Immun.* 60:2493–2499.
- Mora-Montes HM, Bates S, Netea MG, Castillo L, Brand A, Buurman ET, Díaz-Jiménez DF, Jan Kullberg B, Brown AJP, Odds FC, et al. 2010. A multifunctional mannosyltransferase family in *Candida albicans* determines cell wall mannan structure and host-fungus interactions. *J Biol Chem.* 285:12087–12095.
- Munro S. 2001. What can yeast tell us about N-linked glycosylation in the Golgi apparatus? *FEBS Lett.* 498:223–227.
- Pourcelot M, Cattiaux L, Sfihi-Loualia G, Fabre E, Krzewinski F, Fradin C, Poulain D, Delplace F, Guérardel Y, and Mallet JM. 2013. Mantyl tagged oligo α (1- \rightarrow 2) mannosides as *Candida albicans* β -mannosyltransferases substrates: a comparison between synthetic strategies. *RSC Adv.* 3:22560-22571.
- Prill SK-H, Klinkert B, Timpel C, Gale CA, Schröppel K, Ernst JF. 2005. PMT family of *Candida albicans*: five protein mannosyltransferase isoforms affect growth, morphogenesis and antifungal resistance. *Mol Microbiol.* 55:546–560.
- Rocha R, Pereira PJB, Santos MAS, Macedo-Ribeiro S. 2011. Unveiling the structural basis for translational ambiguity tolerance in a human fungal pathogen. *Proc Natl Acad Sci USA.* 108:14091–14096.
- Shibata N, Arai M, Haga E, Kikuchi T, Najima M, Satoh T, Kobayashi H, Suzuki S. 1992. Structural identification of an epitope of antigenic factor 5 in mannans of *Candida albicans* NIH B-792 (serotype B) and J-1012 (serotype A) as beta-1,2-linked oligomannosyl residues. *Infect Immun.* 60:4100–4110.
- Shibata N, Hisamichi K, Kobayashi H, Suzuki S. 1993. Complete assignment of ^1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance chemical shifts of β -1,2-linked mannooligosaccharides isolated from the phosphomannan of the pathogenic yeast *Candida albicans* NIH B-792 strain. *Arch Biochem Biophys.* 302:113–117.

- Shibata N, Ichikawa T, Tojo M, Takahashi M, Ito N, Okubo Y, Suzuki S. 1985. Immunochemical study on the mannans of *Candida albicans* NIH A-207, NIH B-792, and J-1012 strains prepared by fractional precipitation with cetyltrimethylammonium bromide. *Arch Biochem Biophys.* 243:338–348.
- Shibata N, Kobayashi H, Suzuki S. 2012. Immunochemistry of pathogenic yeast, *Candida* species, focusing on mannan. *P Jpn Acad B-Phys.* 88:250–265.
- Stolz J, Munro S. 2002. The components of the *Saccharomyces cerevisiae* mannosyltransferase complex M-Pol I have distinct functions in mannan synthesis. *J Biol Chem.* 277:44801–44808.
- Striebeck A, Robinson DA, Schüttelkopf AW, van Aalten DMF. 2013. Yeast Mnn9 is both a priming glycosyltransferase and an allosteric activator of mannan biosynthesis. *Open Biol.* 3(9):130022.
- Suzuki A, Takata Y, Oshie A, Tezuka A, Shibata N, Kobayashi H, Okawa Y, Suzuki S. 1995. Detection of β -1,2-mannosyltransferase in *Candida albicans* cells. *FEBS Lett.* 373:275–279.
- Timpel C, Strahl-Bolsinger S, Ziegelbauer K, Ernst JF. 1998. Multiple functions of Pmt1p-mediated Protein O-mannosylation in the fungal pathogen *Candida albicans*. *J Biol Chem.* 273:20837–20846.
- Timpel C, Zink S, Strahl-Bolsinger S, Schröppel K, Ernst J. 2000. Morphogenesis, adhesive properties, and antifungal resistance depend on the Pmt6 protein mannosyltransferase in the fungal pathogen *Candida albicans*. *J Bacteriol.* 182:3063–3071.
- Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. 2004. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis.* 39:309–317.

FIGURES

Figure 1 Production and purification of Bmt3p. Culture supernatant and purified Bmt3p were analysed by SDS/PAGE. Proteins were detected either by Coomassie Blue staining (CB) or by western blotting using the anti-Bmt3 antibody (Ab).

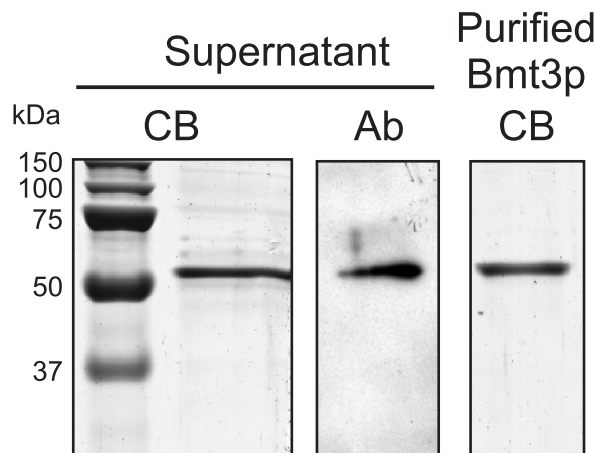


Figure 2: Evaluation of the β -mannosyltransferase activity of Bmt3p. The reaction products of the sequential or simultaneous activities of Bmt1p and Bmt3p, using DP3M-a as substrate, were detected and quantified by NP-FL-HPLC under standard assay conditions (28°C). (A) acceptor substrate DP3M-a. (B) reaction products after 48h incubation of DP3M-a with Bmt1p. (C) reaction products resulting from B after inactivation of Bmt1p and 48h incubation with Bmt3p. (D) reaction products after 48h incubation of DP3M-a with both Bmt1p and Bmt3p. Reaction mixture at 96h with both enzymes (E) before and (F) after α -exomannosidase (α -ManAse) treatment. White circle, α -Man; black circle, β -Man.

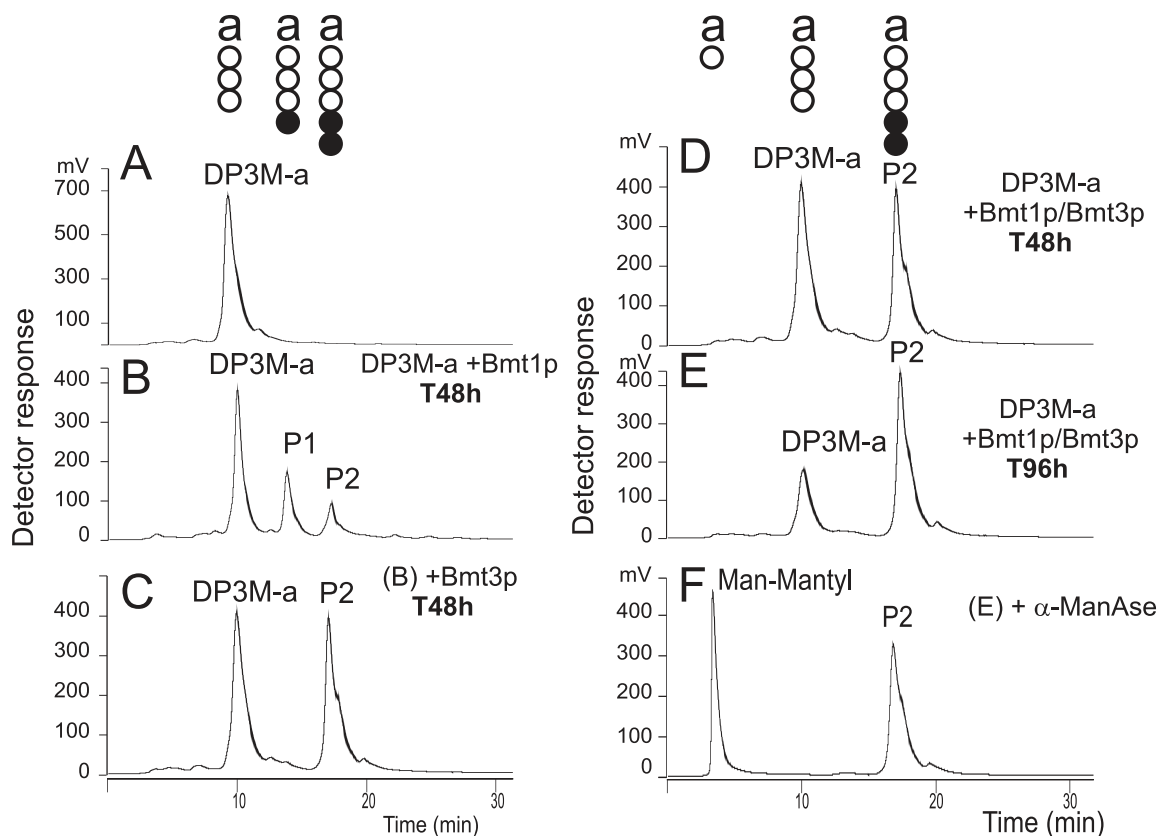


Figure 3: MALDI-TOF MS analysis of the mantylated acceptor substrates and reaction products. **(A)** DP3M-a substrate. **(B)** DP5M-a reaction product resulting from Bmt1p/Bmt3p activity on DP3M-a. **(C)** DP4M-b substrate. **(D)** DP5M-b reaction product resulting from Bmt3p activity on DP4M-b. Spectra display $[M + Na]^+$ adducts. White circle, α -Man; black circle, β -Man.

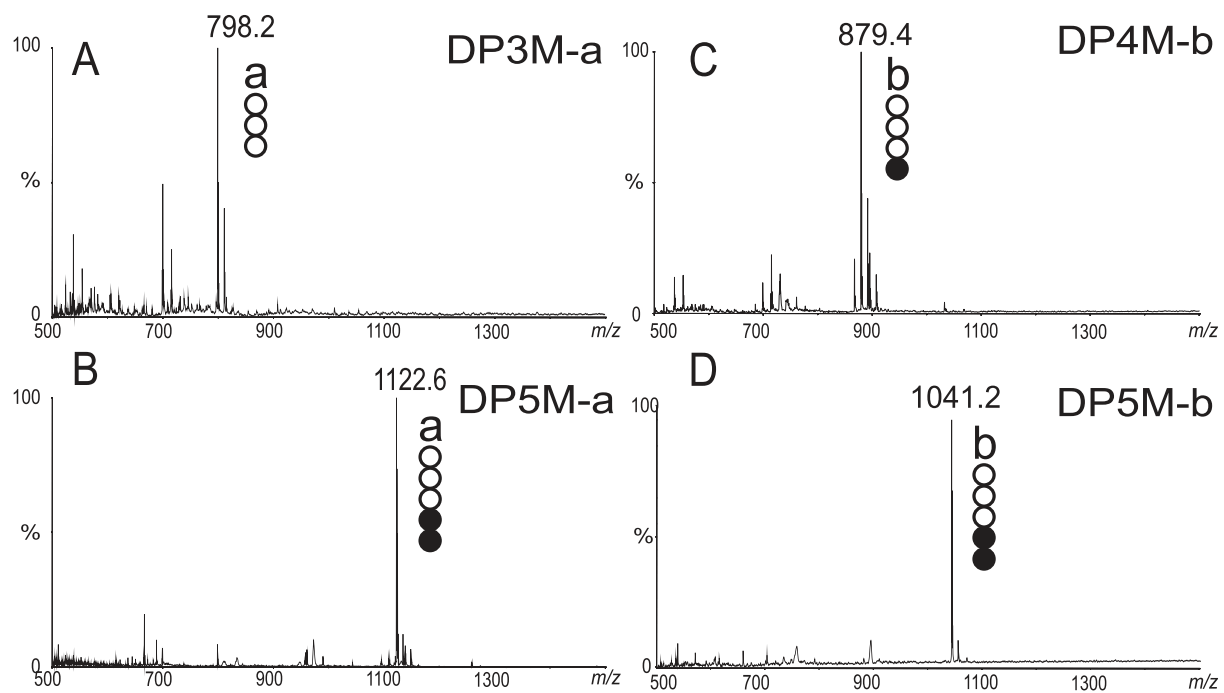


Figure 4: NMR analysis of the purified reaction product P2 (named DP5M-a). (A) ^1H NMR spectrum of DP5M-a mantylated glycan. (B) ^1H - ^1H COSY spectrum, (C) ^1H - ^1H ROESY spectrum showing the internal H1/H3 and H1/H5 nuclear Overhauser effects and (D) ^1H - ^{13}C HSQC spectrum. White circle, α -Man; black circle, β -Man.

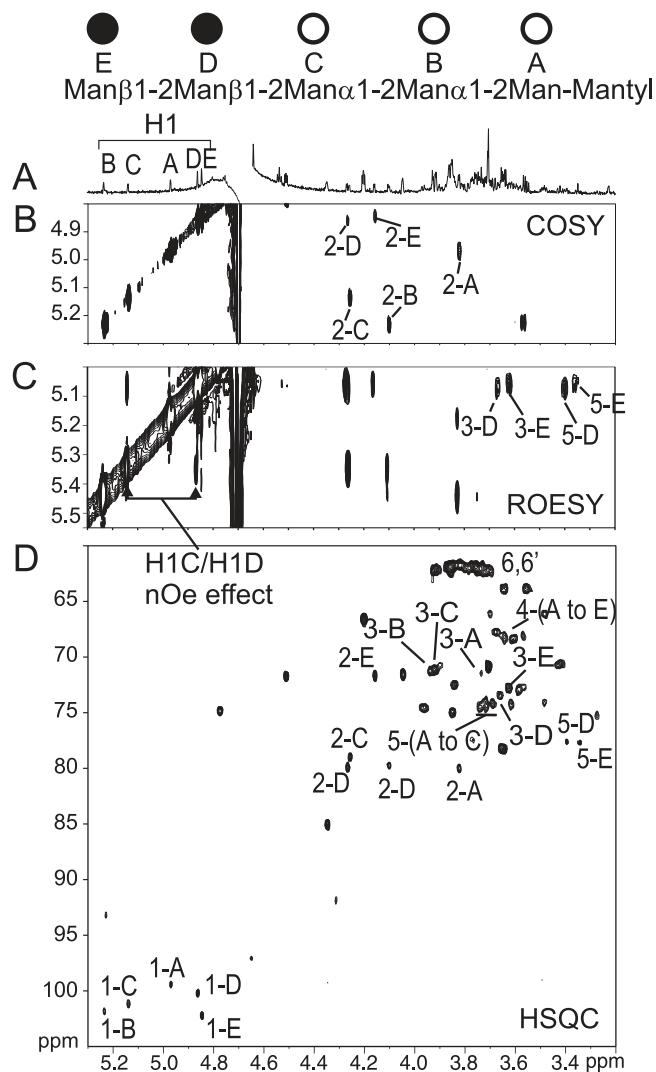


Figure 5: Influence of reaction parameters on Bmt3p activity on DP4M-b substrate. Except for time dependence analysis, all reactions were conducted for 30 minutes. The activity (substrate conversion rate) was quantified by NP-FL-HPLC as the percentage of the product fluorescence compared with the summed fluorescence of substrate and product. Each data point represents the mean value of three experiments. (A) Time-dependent production of DP5M-b, expressed as percentage of converted DP4M-b substrate after incubation with Bmt3p under standard assay conditions. (B) pH-dependence at 28°C. Sodium citrate or Tris/maleate buffers (100 mM) were used for pH 4-6.5 and 6.5-9.5 respectively. (C) Effect of temperature in sodium citrate buffer pH 6.5. (D) Effect of metal ions and EDTA. The incubation was achieved in the presence of 20 mM ions or EDTA at pH 6.5 and 28°C.

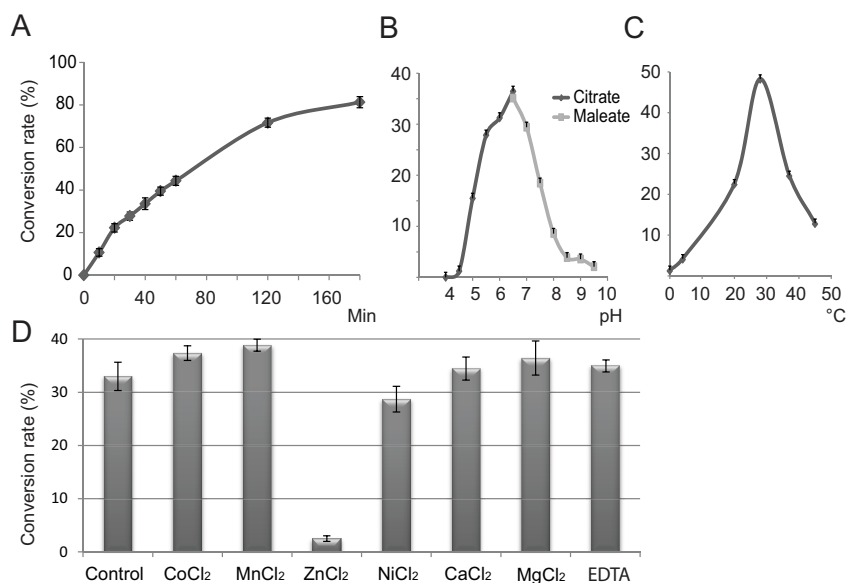
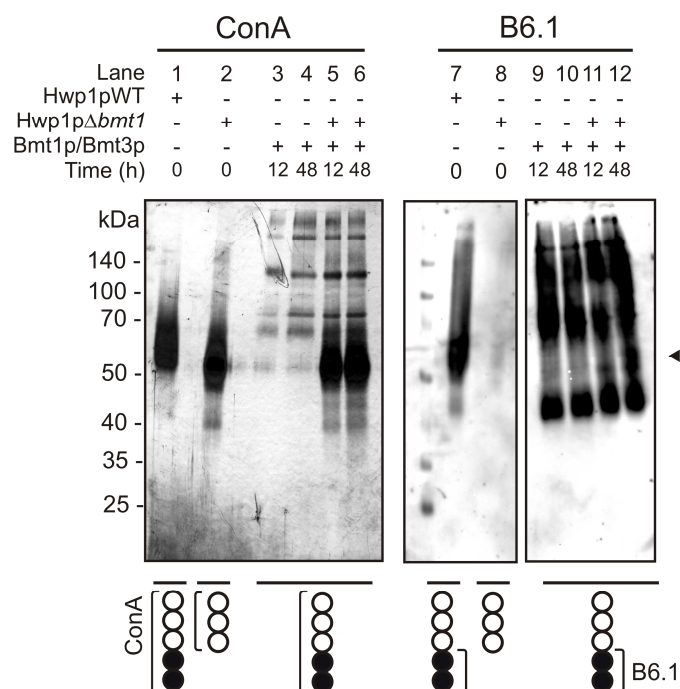


Figure 6: β -mannosylation of recombinant Hwp1 produced in a WT (Hwp1pWT) or a $\Delta bmt1$ (Hwp1pbmt1 Δ) *C. albicans* strain. Following the action (for 12 and 48h) of the two recombinant enzymes Bmt1p and Bmt3p, specific epitopes were detected on Hwp1p through the use of concanavalin A (ConA), or the monoclonal antibody (MAb) B6.1. Arrow shows Hwp1pbmt1 Δ . White circle, α -Man; black circle, β -Man.



Tables

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

| Oligomannosides | Substrate | Structure | Conversion rate (%) |
|---|-----------------------------|--|---------------------|
| α -1,2-Mannobiose | DP2 α ¹ | M α 1-2 M | 0 |
| β -1,2-Mannobiose | DP2 β ¹ | M β 1-2 M | 0 |
| α -1,2-Mannotriose | DP3 α ^{1,2} | M α 1-2 M α 1-2 M | 0 |
| α -1,2-Mannotetraose | DP4 α ^{1,2} | M α 1-2 M α 1-2 M α 1-2 M | 0 |
| α -1,3-Mannosyl- α -1,2-Mannotriose | DP4 α ¹ | M α 1-3 M α 1-2 M α 1-2 M | 0 |
| β -1,2-Mannotetraose | DP4 β ¹ | M β 1-2 M β 1-2 M β 1-2 M | 0 |
| β -1,2-Mannosyl- α -1,2-Mannotriose | DP4 α ² | M β 1-2 M α 1-2 M α 1-2 M | ~ 35 |

Table 2: ^1H - ^{13}C Chemical shifts of DP3M-a and DP5M-a (P2). Bold characters correspond to position of substitution, italic bold characters correspond to typical chemical shifts of H5/C5 of β -mannose configuration.

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

ARTICLE 2

Evaluation of monovalent and multivalent iminosugars to modulate *Candida albicans* β -1,2-mannosyltransferase activities

Thomas Hurtaux^{a,d#}, Ghenima Sfihi-Loualia^{a#}, Yoan Brissonnet^b, Julie Bouckaert^a, Jean-Maurice Mallet^c, Boualem Sendid^d, Florence Delplace^a, Emeline Fabre^a, Sébastien G. Guoin^b and Yann Guérardel^{a*}

^a Univ. Lille, CNRS, UMR 8576 - UGSF - Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, F 59000 Lille, France

^b LUNAM Université, CEISAM, Chimie Et Interdisciplinarité, Synthèse, Analyse, Modélisation, UMR CNRS 6230, UFR des Sciences et des Techniques, 2 rue de la Houssinière, BP 92208, 44322 Nantes Cedex 3, France.

^c École Normale Supérieure-PSL Research University, Département de Chimie, Sorbonne Universités - UPMC Univ Paris 06, CNRS UMR 7203 LBM, 24, rue Lhomond, 75005 Paris, France

^d Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, U995 - LIRIC - Lille Inflammation Research International Center, F-59000 Lille, France

#These authors equally contributed to this work

* To whom correspondence should be addressed. Yann Guérardel; e-mail: Yann.guerardel@univ-lille1.fr; Tel : 33.(0)3.20.43.69.41

Abstract

β -1,2-linked oligomannosides substitute the cell wall of numerous yeast species. Several of those including *Candida albicans* may cause severe infections associated with high rates of morbidity and mortality, especially in immunocompromised patients. β -1,2-mannosides are known to be involved in the pathogenic process and to elicit an immune response from the host. In *C. albicans*, the synthesis of β -mannosides is under the control of a family of nine genes coding for putative β -mannosyltransferases. Two of them, CaBmt1 and CaBmt3, have been shown to initiate and prime the elongation of the β -mannosides on the cell-wall mannan core. In the present study, we have assessed the modulating activities of monovalent and multivalent iminosugar analogues on these enzymes in order to control the enzymatic bio-synthesis of β -mannosides. We have identified a monovalent deoxynojirimycin (DNJ) derivative that inhibits the CaBmt1-catalyzed initiating activity, and mono-, tetra- and polyvalent deoxymannojirimycin (DMJ) that modulate the CaBmt1 activity toward the formation of a single major product. Analysis of the aggregating properties of the multivalent iminosugars showed their ability to elicit clusterization of both CaBmt1 and CaBmt3, without affecting their activity. These results suggest promising roles for multivalent iminosugars as controlling agents for the biosynthesis of β -1,2 mannosides and for monovalent DNJ derivative as a first target for the design of future β -mannosyltransferase inhibitors.

Keywords

Mannosyltransferase, iminosugars, yeast, inhibition, multivalency

1. Introduction

Major cell wall glycoconjugates, including mannoproteins, phosphopeptidomannan (PPM) and phospholipomannan (PLM), of the *Candida albicans* yeast are substituted by terminal β -1,2-mannosides.¹⁻⁴ These motifs were described as *Candida*-associated pathogenic factors by numerous studies. Indeed, they were shown not only to be involved in the process of intestinal colonization in both mice and Human^{5,6} but also to induce macrophage inflammatory responses.⁷ The biological relevance of β -mannosides was further confirmed by showing that synthetic β -1,2-mannosides mimic the antigenicity of native *Candida albicans* glycoconjugates and protect mice from *C. albicans* gut colonization when orally administered.⁸ More recently, vaccine preparations containing β -1,2- α mannosylated cell-surface peptide were shown to elicit the production of robust antibody responses, leading to a sustainable protection against disseminated candidiasis.⁹

The β -1,2-mannosyltransferases (Bmt) responsible for the synthesis of yeast β -mannosides constitute a recently discovered family of fungal carbohydrate synthesizing enzymes that have been classified in the glycosyltransferases family GT91 (<http://www.cazy.org/GT91.html>).^{10,11} These enzymes were identified in several species of yeasts among which the *Candida* genus is highly represented (*albicans*, *dubliniensis*, *glabrata*, *orthopsilosis*). Absent in human and in some commensal yeasts such as *Saccharomyces cerevisiae*, they are promising therapeutic targets since *Candida* are the most encountered species in invasive fungal infections of hospitalized patients.¹² In *C. albicans*, β -mannosides are biosynthesized by the products of a family of nine Bmt-encoding genes.¹⁰ The role of six of them was inferred from a mutant phenotypic method: CaBmt1-4 appear to be involved in the sequential synthesis of protein-associated β -manno-oligosaccharides whereas CaBmt5-6 play similar roles on lipid moiety.^{10,13} The activity and enzymatic parameters of CaBmt1 and CaBmt3 that initiate and prime the elongation of β -1,2-mannosides on the N-glycan acid-stable core were recently confirmed by analyzing the enzymatic products of recombinant enzymes.^{14,15} Indeed, whereas CaBmt1 was shown to sequentially transfer two β -mannosyl units onto an α -mannosidic scaffold *in vitro*, CaBmt3 can only add a single β -mannosyl unit onto a β Man(1-2) α Man(1-2)[α Man(1-2)]_n motif (Fig. 1).

However, the much higher reaction velocity of CaBmt3 strongly suggested that *in vivo* each enzyme sequentially adds a single β Man residue on an α -mannoside to finally generate a β Man(1-2) β Man(1-2) α Man(1-2)[α Man(1-2)]_n motif.¹⁵

Monovalent iminosugars have been extensively developed for the inhibition of glycosidases.^{16,17} Out of these, deoxymannojirimycin (DMJ) and deoxynojirimycin (DNJ) are well known potent inhibitors of α -mannosidases and α -glucosidases. These two iminosugars are relatively broad glycosidase inhibitors. However, a certain degree of specificity may be observed for specific enzymes. As an example, DMJ inhibits the Golgi Mannosidase I, but not the endoplasmic reticulum α -mannosidase *in vitro*.¹⁸ Recently, the concept of multivalency as emerged as an alternative to this classic “lock and key” approach for the inhibition of carbohydrate-processing enzymes.^{19–22} Iminosugars were grafted in multiple copies to diverse chemical scaffolds, and the resulting multivalent inhibitors were shown to be significantly more potent than their monovalent analogs when compared in iminosugar molar-basis. In a recent work, Gouin and coworkers investigated the activity of polymeric DMJ and DNJ toward the modulation of a panel of glycoside-hydrolases.²³ This study unexpectedly showed that polymeric iminosugars could not only inhibit but also promote the enzyme activity of selected glycoside-hydrolases. Finally, recent works demonstrated that iminosugars may not only inhibit glycosidase but also glycosyltransferase activities.^{24,25} Altogether, these reports open-up the possibility to control the activity of a wide panel of glycosylation enzymes using iminosugars. These compounds may thus be used to modulate glycosyltransferase activities during engineered processes aimed to produce efficiently β -1,2-mannoside epitopes for research or therapeutics purposes.

In the present report, we evaluated the potential of monovalent and multivalent DNJ and DMJ derivatives (Fig. 2) to influence the β -mannosyltransferase activities of recombinant CaBmt1 and CaBmt3. We hypothesized that DMJ, a broad mannosidase inhibitor, could modulate the mannosyltransferase activity of these two enzymes. Gluco-configured DNJ derivatives were also included in this study as this family was previously shown to inhibit manno-processing enzymes such as the α -mannosidase from jack bean²⁶. In view of the recent results showing the possibility to modulate the glycosidase and glycosyltransferase activity with multivalent and polyvalent DNJ and DMJ iminosugars, this family was also considered.^{21–24} We established that monovalent triazole-DNJ was able to specifically inhibit CaBmt1, whereas multivalent DMJ could promote the synthesis of a homogenous product.

2. Results and discussion

Synthesis of compounds 1-6

Monovalent DNJ and DMJ references **1** and **2**, tetravalents **3** and **4**, and polyvalent **5** and **6**, were chemically designed as we previously reported (Fig. 2).^{23,27} Briefly, the iminosugars were armed with azide and grafted to the alkyne-functionalized scaffolds by copper-catalyzed azide-alkyne cyclization. For polyvalent **5** and **6**, we functionalized a commercial dextran composed of approximately 55 glucose units and 95% of α -(1,6) linkages. All the available hydroxyl groups were functionalized with DNJ or DMJ units to give a highly dense polymer of approximately 167 iminosugars.

Effect of monovalent or multivalent iminosugars on CaBmt1 and CaBmt3 activities

CaBmt1 and CaBmt3 β -1,2-mannosyltransferases were produced as recombinant enzymes in *Pichia pastoris* and their respective activities were evaluated by an enzymatic assay, as previously described.^{14,15,28} Briefly, recombinant enzymes were incubated with GDP-Mannose as donor substrate and two fluorescent acceptor substrates: Man α 1-2Man α 1-2Man α -Mantyl (DP3Man α) for CaBmt1 and Man β 1-2Man α 1-2Man α 1-2Man α -Mantyl (DP4Man β) for CaBmt3 (Fig. 1)^{28,29}. The quantities of

reaction products at initial and final times of incubation were established by normal phase HPLC with fluorometric detection (NP-FL-HPLC). As shown previously, in standard conditions CaBmt1 generates two products from DP3Man α , named **P1** and **P2**, corresponding to the addition of one (for **P1**) or two (for **P2**) consecutive β -1,2-Man¹⁴ whereas CaBmt3 generates one product **P2** from DP4Man β by the addition of a single β -1,2-Man (Fig. 1).¹⁵ The β -mannosyltransferase activities of CaBmt1 and CaBmt3 were then quantified by calculating the percentages of acceptor substrate consumed during the incubation period.

Using this assay, we have evaluated the modulating properties of a set of mono-, tetra-, and polyvalent DNJ and DMJ iminosugars (Fig. 2) at different concentrations (0.1 to 20mM) towards the activities of CaBmt1 and CaBmt3 by comparing them to control conditions without iminosugars. Most compounds exhibited no or low activities on both CaBmt1 and CaBmt3 activities, even at 20 mM (Fig. 3). Indeed, compound **1** appeared to be the only compound that markedly inhibits the activity of CaBmt1 on DP3Man α at the high concentration of 20 mM (95% of inhibition) with an IC₅₀ at 5 mM (Fig. 3). Previously, we have established that CaBmt1 activity did not seem to be influenced by an increase in α -1,2-Man chain length¹⁴. In order to confirm that the inhibitory effect of compound **1** was independent of the chain length of the acceptor oligosaccharide, we have showed that compound **1** inhibited the activity of CaBmt1 on the tetrasaccharide Man α 1-2Man α 1-2Man α 1-2Man α -Mantyl (DP4Man α) in a similar manner than on the trisaccharide (data not shown).

When the results are analyzed in more details, the presence of the *N*-linked tail, the nature of the iminosugar epimer (gluco- or manno- configured), and the structure and valency of the multivalent derivatives are all factors impacting the inhibitory activity. The first is clearly illustrated when comparing the absence of CaBmt1 inhibition with DNJ, with the low enzyme activity observed with **1** at the same concentration. This effect was only partially retained with the manno-configured epimer **2**. Finally the nature and valency of the multivalent scaffold also seems to modulate the inhibition as illustrated with compounds **4** and **6**.

Altogether, this demonstrates that although weak, the interaction between CaBmt1 and **1** appears specific for both the iminosugar core and the *N*-linked tail of **1**. All the other DNJ and DMJ derivatives only slightly perturbed CaBmt1 and CaBmt3 activity.

Effect of monovalent or multivalent iminosugars on CaBmt1 specificity

Next, we investigated the effect of the compounds at 20 mM onto the relative CaBmt1 production of **P1** and **P2** starting from the DP3Man α acceptor substrate as presented in Table 1. In control conditions (without iminosugars), CaBmt1 induced the conversion of 54% of the acceptor substrate into **P1** and **P2** products, corresponding to a reaction velocity of 30 nmol/h/mg of protein. Compound **1**, significantly decreased the overall activity of CaBmt1 at this concentration down to a 5% conversion rate (2.5 nmol/h/mg of protein) but did not notably modified its tropism toward the use of DP3Man α and DP4Man β (**P1/P2** 0.67 compared to 0.48 for control). In contrast, mono- and multivalent DMJ derivatives **2**, **4** and **6** markedly diverted the biosynthesis process toward the production of **P1** to the detriment of **P2** (Table 1). In particular, **2** and **4** led to the almost exclusive synthesis of **P1** from DP3Man α (**P1/P2**=17.5 and 7.5, respectively). Although less specific for the synthesis of **P1** (**P1/P2**=5.22) compared to **2** and **4**, the polyvalent DMJ **6** promoted the highest rate of **P1** synthesis. The same tendency was observed with the DNJ analogs **5** but at a lower level. Altogether, these results show the potency of the synthetic mono and multivalent iminosugars to induce an increase of CaBmt1 specificity toward the use of DP3Man α mannoside as acceptor instead of mantyl DP4Man β . Indeed, these compounds not only increased the efficiency of CaBmt1 to transfer a β -1,2-Man residue onto the DP3Man α acceptor substrate but also inhibit the transfer of a second β -1,2-Man residue onto the formed product. The higher reaction rates obtained with the polymeric iminosugars **5** and **6**, which

further illustrate the potential interest of this new class of compounds in modulating the activity of carbohydrate-processing enzymes.²¹ The marked difference observed between these compounds regarding **P1/P2** ratios reflects a more efficient blocking of **P2** biosynthesis when the dextran scaffold harbors the DMJ rather than the DNJ ligands.

Effect of tetra and multivalent iminosugars on CaBmt1 and CaBmt3 aggregation

In order to better understand how the polyvalent iminosugars may drive the CaBmts activity toward the catalysis of the β -mannosylation initiation step (*i.e.* **P1** accumulation), we assessed the interaction between CaBmts and all iminosugars at different concentrations by Dynamic Light Scattering (DLS). In the control experiments, both CaBmt1 and CaBmt3 appeared as monomers displaying mean diameters of 8 nm (Fig. 4). In agreement with their monovalent nature, Compounds **1** and **2** never induced any aggregation of CaBmts (data not shown). In contrast, multivalent compounds **4**, **5** and **6** exhibited aggregative powers toward CaBmts. In particular, the use of increasing concentrations of **6** showed that both CaBmt1 and CaBmt3 aggregate to form high molecular weight clusters of enzymes when concentration reached 180 μ M. As shown in Figure 4, the switch from 140 to 180 μ M of **6** induced the formation of large CaBmt1 and CaBmt3 aggregates with mean diameters of 800 nm, which correspond to clusters of enzyme containing around 100 particles. Such aggregative effect was previously reported with tetravalent DNJ derivatives and the α -mannosidase from jack bean.²⁷ When compared with **6**, tetravalent compound **4** showed reduced aggregative power. Indeed, incubation with **4** did not result in any aggregation of CaBmt1, even at 180 μ M, whereas it resulted in the formation of slightly smaller aggregates of CaBmt3 (Fig. 4). However, limited aggregation of 200-250 nm CaBmt1 particles could also be observed with **4** but only when the intensity mode of DLS, which promotes the observation of aggregate, was used (data not shown). Polyvalent compound **5** showed similar results than **6** (data not shown), demonstrating that the gluco or manno configurations did not significantly influences the aggregative power. Finally, in order to confirm that the aggregative properties of **5** and **6** were under the control of the iminosugars, we have established that the naked dextran did not exhibit any aggregative properties, irrespective of the used concentrations (data not shown).

It is noteworthy that compound **6** aggregates CaBmts at submillimolar concentrations, whereas it required higher concentrations (20 mM) to “specialize” the CaBmt1 activity toward the initiation step of β -1,2-mannosylation. This observation suggests that CaBmts clustering is probably not the critical factor explaining the modulation of CaBmt1 activity. Furthermore **6** aggregates CaBmt3 but does not perturb its activity. Thus, the modulating activities of the iminosugars is probably more dependent of their respective analogy with the natural highly mannosylated substrate than with their potency to form CaBmts clusters.

3- Conclusion

In this study we have evaluated the effects of mono-, tetra- and polyvalent DNJ and DMJ iminosugars **1-6** on the modulation of CaBmt1 and CaBmt3 enzyme activities. We showed that **1** could inhibit CaBmt1 activity, probably through specific interactions involving both the carbohydrate core and the *N*-linked moiety. This inhibitory effect observed at high concentrations may pave the way toward the development of new antifungal drugs. Interestingly, we have shown that DMJ-derivatives **2**, **4** and **6** significantly perturbed the *in vitro* specificity of CaBmt1 at high concentrations. They efficiently specialized the enzyme toward the use of its *in vivo* acceptor, the α -1,2-oligomannosides, to initiate the β -1,2-mannosylation process without notable loss of enzymatic efficiency. We first hypothesized that this effect could be related to aggregation phenomenon, as previously described for the jack bean α -mannosidase.²⁷ Indeed, the multivalent iminosugars such as **6**, promoted the formation of large CaBmt1 and CaBmt3 clusters, containing up to 100 enzyme particles, but this aggregation event did

not significantly impact the CaBmts activities. In contrast, ratios of the enzymatic products were highly dependent from the nature of the iminosugar core (DMJ better than DNJ) and to a lesser extent from the valency of the ligands. The fact that iminosugars **1-6**, and more particularly polyvalent DMJ **6** are controlling agents of CaBmt1 velocity and specificity may open up new perspectives for the controlled biosynthesis of β -mannosides with immuno-stimulating activities.

4. Experimental

4.1. Recombinant production of CaBmt1 and CaBmt3 in *Pichia pastoris*

The preparation of *Pichia pastoris* supernatant containing CaBmt1 and CaBmt3 was described previously.^{14,15} Briefly, the pPICZ α A vectors containing CABMT1 or CABMT3 cDNAs were linearized using the restriction enzyme SacI, and then used to transform the *P. pastoris* strain (X-33) by electroporation. Transformants providing the best level of expression were cultivated at 28°C (200 rpm) in baffled Erlenmeyer flasks in 250 mL of in BMGY medium (1% (w/v) yeast extract, 2% (w/v) peptone, 1.34% (w/v) yeast nitrogen base, 0.00004% biotin and 1% (v/v) glycerol buffered at pH 6 with 100 mM potassium phosphate) until DO₆₀₀ of 40. After centrifugation cells were re-suspended at 5-fold their original density in BMM medium (similar to BMGY without yeast extract, with 0.5% methanol instead of glycerol, and 0.05% Tween 20). The supernatant was collected after 2 days and used as CaBmt1 or CaBmt3 source for enzymatic assays, after the addition of 0.01% azide and 0.5% Triton X-100.

4.2. Mannosyltransferase Assays

The standard assay mixtures contained 25 μ L of the CaBmt1 or CaBmt3 containing culture supernatant of *P. pastoris* (40 mg/L, corresponding to 1 μ g of protein per assay), 0.1 mM mantyl-oligomannoside, 20 mM GDP-mannose donor, 0.3 % Triton X-100, 150 mM sodium citrate buffer pH 6.5, 20 mM CaCl₂, in a total volume of 100 μ L with the protease inhibitors pepstatin A and leupeptin. These conditions were chose to comply with previous reports describing the β -mannosyltransferase activities in *C. albicans*.^{14,15,30} The acceptor-substrate mannosides were synthesized as previously described.^{15,28} Varying concentrations, from 0.1 up to 20 mM, of iminosugars were added as described in the results and discussion section. For compounds **5** and **6**, concentrations were expressed based on repetition units R₃-O-Glc (R=DNJ or DMJ). The reaction mixture was incubated over 48h for CaBmt1 or 30 min for CaBmt3 at 28°C and stopped by boiling for 5 min. Reaction mixtures were centrifuged for 10 min at 12.100 x g and analyzed by normal phase HPLC fitted with fluorometric detection (NP-FL-HPLC), as previously described.^{14,15}

4.3. Dynamic light scattering

Dynamic light scattering (DLS) was carried out at 20°C with a Malvern Zetasizer Nano ZS instrument equipped with temperature control and using a 633 nm He-Ne laser for backscattering at 173°. The measurement duration was 10s and 15 measurements were averaged for each analysis. The culture supernatants containing CaBmt1 or CaBmt3 (40 mg/L) alone or complemented with either compounds **4** or **6** at different concentrations, were centrifuged at 14000 g for 45 min at 4°C prior to analysis.

Funding

The work was supported by the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (to G.S-L and T.H).

Figure

Figure 1: Biosynthesis of β -1,2-mannosylated mannosides catalyzed by CaBmt1 and CaBmt2.^{14,15} In the present report a synthetic DP3Man α , where R is a N-methyl anthranilamide (manthyl) group, was used as acceptor substrate to generate **P1** and **P2** by CaBmt1.²⁸

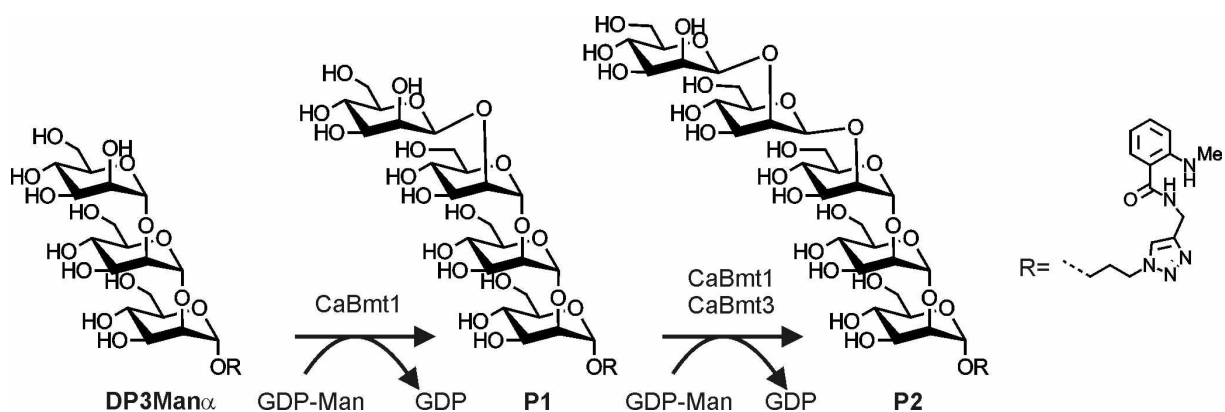


Figure 2: Schematic representations of the synthetic monovalent, multivalent and polyvalent iminosugars **1-6** used in this study.^{23,27}

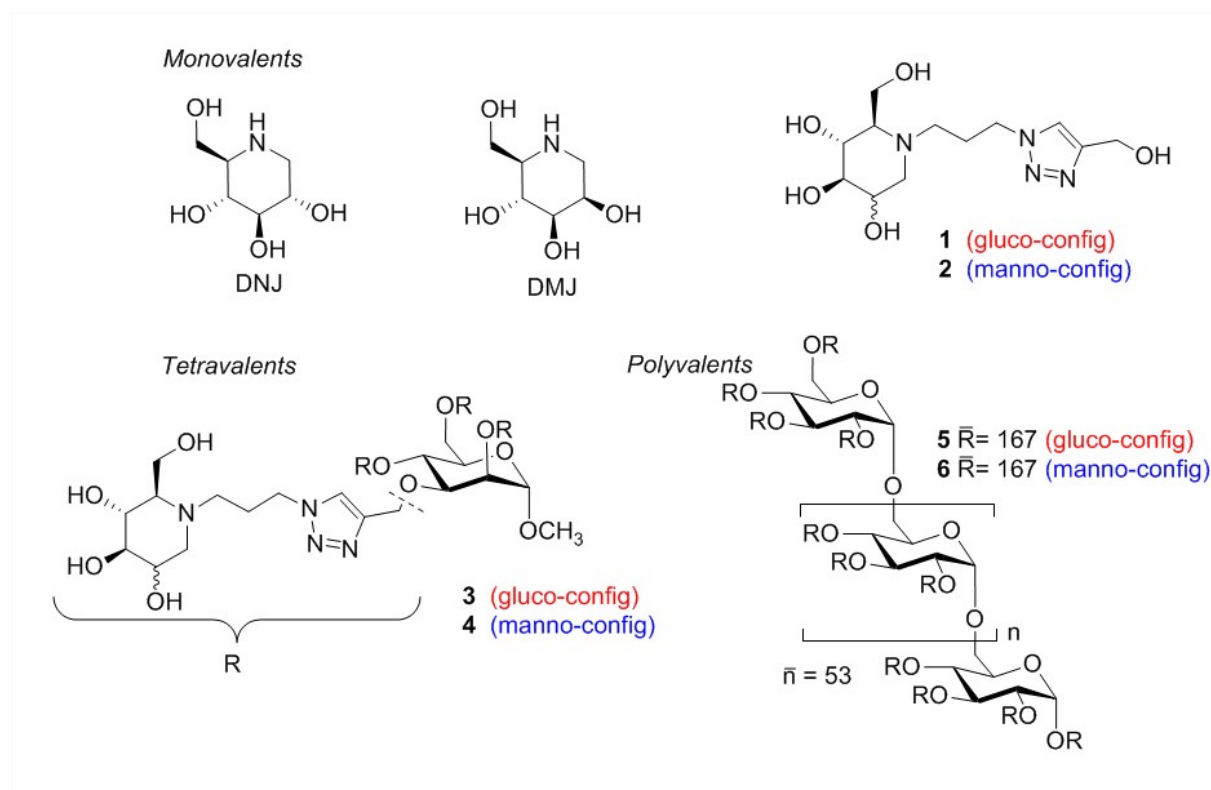


Figure 3: Effects of **1-6** (20 mM) on CaBmt1 and CaBmt3 enzyme activities. Man α 1-2Man α 1-2Man α -Mantyl (DP3Man α) and Man β 1-2Man α 1-2Man α 1-2Man α -Mantyl (DP4Man β) were used as substrates for CaBmt1 and CaBmt3 respectively. The enzymes activities in all experimental conditions were evaluated as the quantity of consumed substrates and compared to the controlled condition (no inhibitor) that was normalized to 100%. Data represent median \pm interquartile range from three independent experiments.

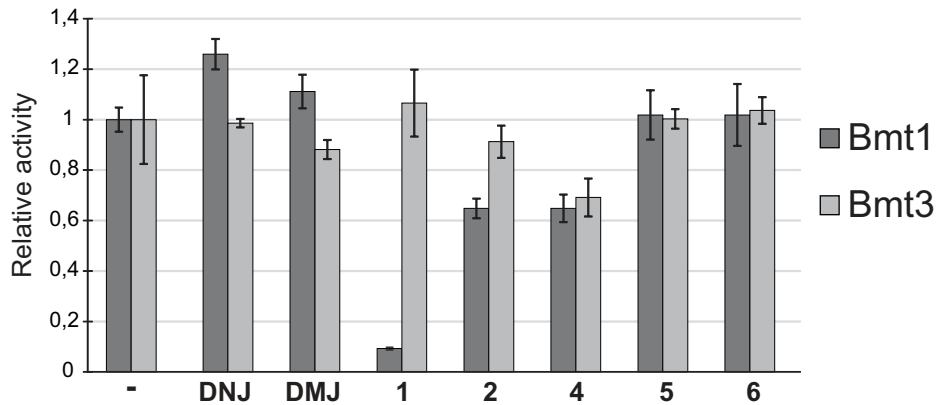
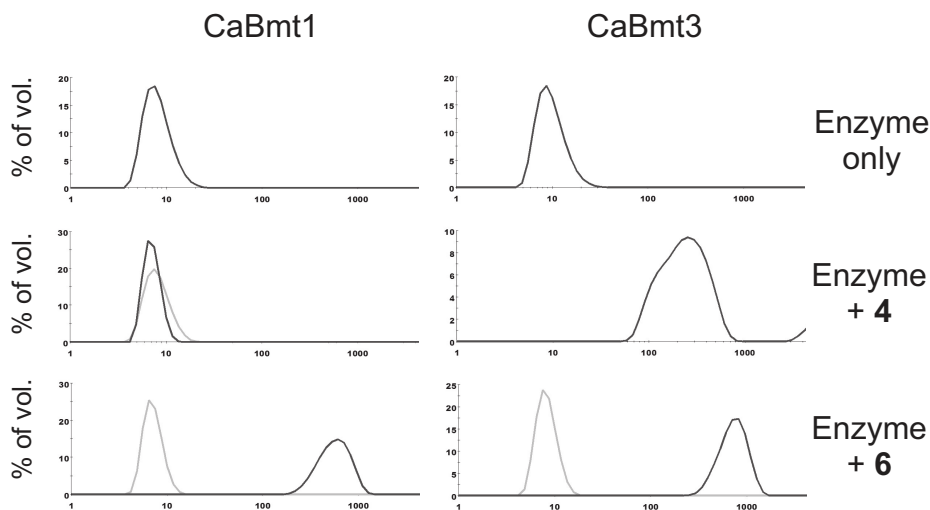


Figure 4: Aggregation assays of CaBmt1 and CaBmt3 in the presence of tetraivalent **4** and polyvalent **6** using Dynamic Light Scattering (DLS) in volume mode detection. Both CaBmt1 and CaBmt3, without any iminosugar, were present in 8 nm diameter monomeric forms but differentially aggregated depending on the concentration and nature of iminosugars. Enzymes were incubated with 140 μ M (grey curve) and 180 μ M (black curve) iminosugars.



References

1. Kobayashi, H.; Shibata, N.; Suzuki, S. *Infect. Immun.*, **1992**, *60*(5), 2106–9.
2. Trinel, P.-A.; Maes, E.; Zanetta, J.-P.; Delplace, F.; Coddeville, B.; Jouault, T.; Strecker, G.; Poulain, D. *J. Biol. Chem.*, **2002**, *277*(40), 37260–71.
3. Fradin, C.; Slomianny, M.C.; Mille, C.; Masset, A.; Robert, R.; Sendid, B.; Ernst, J.F.; Michalski, J.C.; Poulain, D. *Infect. Immun.*, **2008**, *76*(10), 4509–17.
4. Shibata, N.; Ichikawa, T.; Tojo, M.; Takahashi, M.; Ito, N.; Okubo, Y.; Suzuki, S. *Arch. Biochem. Biophys.*, **1985**, *243*(2), 338–48.
5. Dalle, F.; Jouault, T.; Trinel, P.A.; Esnault, J.; Mallet, J.M.; d’Athis, P.; Poulain, D.; Bonnin, A. *Infect. Immun.*, **2003**, *71*(12), 7061–8.
6. Jawhara, S.; Mogensen, E.; Maggiotto, F.; Fradin, C.; Sarazin, A.; Dubuquoy, L.; Maes, E.; Guérardel, Y.; Janbon, G.; Poulain, D. *J. Biol. Chem.*, **2012**, *287*(14), 11313–24.
7. Jouault, T.; Lepage, G.; Bernigaud, A.; Trinel, P.A.; Fradin, C.; Wieruszkeski, J.M.; Strecker, G.; Poulain, D. *Infect. Immun.*, **1995**, *63*(6), 2378–81.
8. Dromer, F.; Chevalier, R.; Sendid, B.; Improvisi, L.; Jouault, T.; Robert, R.; Mallet, J.M.; Poulain, D. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2002**, *46*(12), 3869–76.
9. Xin, H.; Cartmell, J.; Bailey, J.J.; Dziadek, S.; Bundle, D.R.; Cutler, J.E. *PLoS ONE*, **2012**, *7*(4), e35106.
10. Mille, C.; Bobrowicz, P.; Trinel, P.-A.; Li, H.; Maes, E.; Guerardel, Y.; Fradin, C.; Martínez-Esparza, M.; Davidson, R.C.; Janbon, G.; Poulain, D.; Wildt, S. *J. Biol. Chem.*, **2008**, *283*(15), 9724–36.
11. Lairson, L.L.; Henrissat, B.; Davies, G.J.; Withers, S.G. *Annu. Rev. Biochem.*, **2008**, *77*, 521–55.
12. Lortholary, O.; Renaudat, C.; Sitbon, K.; Madec, Y.; Denoeud-Ndam, L.; Wolff, M.; Fontanet, A.; Bretagne, S.; Dromer, F.; French Mycosis Study Group *Intensive Care Med*, **2014**, *40*(9), 1303–12.
13. Mille, C.; Fradin, C.; Delplace, F.; Trinel, P.-A.; Masset, A.; François, N.; Coddeville, B.; Bobrowicz, P.; Jouault, T.; Guerardel, Y.; Wildt, S.; Janbon, G.; Poulain, D. *Glycobiology*, **2012**, *22*(10), 1332–42.
14. Fabre, E.; Sfihi-Loualia, G.; Pourcelot, M.; Coddeville, B.; Krzewinski, F.; Bouckaert, J.; Maes, E.; Hurtaux, T.; Dubois, R.; Fradin, C.; Mallet, J.-M.; Poulain, D.; Delplace, F.; Guerardel, Y. *Biochem. J.*, **2014**, *457*(2), 347–60.
15. Sfihi-Loualia, G.; Hurtaux, T.; Fabre, E.; Fradin, C.; Mée, A.; Pourcelot, M.; Maes, E.; Bouckaert, J.; Mallet, J.-M.; Poulain, D.; Delplace, F.; Guerardel, Y. *Glycobiology*, **2015**, *26*(2), 203–14.
16. Lillielund, V.H.; Jensen, H.H.; Liang, X.; Bols, M. *Chemical Reviews*, **2002**, *102*(2), 515–54.
17. Nash, R.J.; Kato, A.; Yu, C.-Y.; Fleet, G.W. *Future Med Chem*, **2011**, *3*(12), 1513–21.
18. Bischoff, J.; Kornfeld, R. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1984**, *125*(1), 324–31.
19. Durka, M.; Buffet, K.; Iehl, J.; Holler, M.; Nierengarten, J.-F.; Vincent, S.P. *Chemistry*, **2012**, *18*(2), 641–51.
20. Compain, P.; Bodlenner, A. *Chembiochem*, **2014**, *15*(9), 1239–51.
21. Gouin, S.G. *Chemistry*, **2014**, *20*(37), 11616–28.
22. Kanfar, N.; Bartolami, E.; Zelli, R.; Marra, A.; Winum, J.-Y.; Ulrich, S.; Dumy, P. *Org. Biomol. Chem.*, **2015**, *13*(39), 9894–906.
23. Brissonnet, Y.; Ladevèze, S.; Tezé, D.; Fabre, E.; Deniaud, D.; Daligault, F.; Tellier, C.; Šesták, S.; Remaud-Simeon, M.; Potocki-Veronese, G.; Gouin, S.G. *Bioconjugate Chemistry*, **2015**, *26*(4), 766–72.
24. Lee, J.C.; Francis, S.; Dutta, D.; Gupta, V.; Yang, Y.; Zhu, J.-Y.; Tash, J.S.; Schönbrunn, E.; Georg, G.I. *J. Org. Chem.*, **2012**, *77*(7), 3082–98.
25. Qiao, L.; Murray, B.W.; Shimazaki, M.; Schultz, J.; Wong, C.-H. *Journal of the American Chemical Society*, **1996**, *118*(33), 7653–62.
26. Dong, W.; Jespersen, T.; Bols, M.; Skrydstrup, T.; Sierks, M.R. *Biochemistry*, **1996**, *35*(8), 2788–95.

27. Brissonnet, Y.; Ortiz Mellet, C.; Morandat, S.; Garcia Moreno, M.I.; Deniaud, D.; Matthews, S.E.; Vidal, S.; Šesták, S.; Kirat, K. El.; Gouin, S.G. *Journal of the American Chemical Society*, **2013**, *135*(49), 18427–35.
28. Pourcelot, M.; Cattiaux, L.; Sfihi-Loualia, G.; Fabre, E.; Krzewinski, F.; Fradin, C.; Poulain, D.; Delplace, F.; Guérardel, Y.; Mallet, J.-M. *RSC Advances*, **2013**, *3*(44), 22560.
29. Cattiaux, L.; Mée, A.; Pourcelot, M.; Sfihi-Loualia, G.; Hurtaux, T.; Maes, E.; Fradin, C.; Fabre, E.; Delplace, F.; Guerardel, Y.; Mallet, J.-M. *To Be Published*, **n.d.**
30. Goto, K.; Okawa, Y. *Biol. Pharm. Bull.*, **2008**, *31*(7), 1333–6.

ARTICLE 3

Mannosylation of fungal glycoconjugates in the Golgi apparatus

Emeline Fabre^{1,2}, Thomas Hurtaux^{1,2,3,4} and Chantal Fradin^{3,4}

¹Université Lille 1, Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, 59650 Villeneuve d'Ascq, France; ²CNRS, UMR 8576, 59650 Villeneuve d'Ascq, France ³Unité Inserm 995, 59000 Lille, France; ⁴Université Lille 2, Group "Candida and Candidiasis", Faculté de Médecine, 59000 Lille, France

Corresponding author: Chantal Fradin, Unité Inserm 995, Université Lille 2, Group « *Candida* and Candidiasis », Pôle Recherche, Faculté de Médecine, Place Verdun, 59045 Lille cedex, France. Tel: (+33) 3 20 62 34 20; Fax: (+33) 3 20 62 34 16; E-mail: chantal.fradin@univ-lille2.fr

Abstract

Glycosylation is a crucial step in the modification of proteins or sphingolipids that then play a prominent role in fungal biology. Glycosylation controls the structure and plasticity of the fungal cell wall and fungi–host interactions. Non-pathogenic and pathogenic yeasts, such as *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*, respectively, have been useful models for analyzing the mannosylation of proteins and sphingolipids, which mainly takes place in the Golgi apparatus. Studies of these yeasts have identified different mannosyltransferases that belong to separate families of glycosyltransferases. The characterization of mannosyltransferases and their activities is essential for deciphering cell wall biogenesis, for identifying mannosides involved in virulence and for designing inhibitors that target specific mannosylation processes.

Introduction

The endoplasmic reticulum (ER) and Golgi apparatus are essential organelles for the posttranslational modification, transport and sorting of proteins in the secretory pathway. The initiation of protein glycosylation in the ER is highly conserved in all eukaryotes, whereas protein elongation in the Golgi apparatus has clear specificities among families and species (nature of the sugar, type of anomer linkage, type of branching and length of the oligosaccharide chains). The non-pathogenic yeast *Saccharomyces cerevisiae* has been a valuable model for studying conserved ER glycosylation and fungal Golgi mannosylation, mainly α -mannosylation [1,2]. The mannosylation of glycosphingolipids (GSLs) from the mannose-inositol-phosphorylceramide family has also been elucidated for this yeast [3]. Several Golgi mannosyltransferases involved in protein and sphingolipid modification, as well as their orthologs, have been identified in the pathogenic yeast *Candida albicans* [4]. Because *S. cerevisiae* does not have any β -1,2 mannosides, enzymes involved in their biosynthesis were first identified in another non-pathogenic yeast, *Pichia pastoris*, and then in *C. albicans* [5,6]. The identification of α - and β -mannosyltransferases gives rise to tools for the generation of specific mutants that can be used to better characterize mannosylation and to unravel the role of mannosides in fungal virulence. The aim of this review is to provide a detailed and updated presentation of mannosyltransferases involved in protein and sphingolipid mannosylation. This review focuses on *S. cerevisiae* and *C. albicans* glycoconjugate mannosylation, which has been well characterized.

Protein mannosylation

Protein *N*- or *O*-glycosylation is initiated in the ER through the attachment of the *N*-mannan precursor ($\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$) to asparagine residues via an amide bond or through the transfer of a mannosyl residue to the hydroxyl group of serine and threonine residues, respectively. The synthesis of the *N*-mannan inner core involves different glycosyltransferases and glycosidases [7], whereas members of the *PMT* gene family encoding Dol-P-Man:protein mannosyltransferases link mannose to hydroxyamino acids [8]. Mannoproteins are then transported from the rough ER to the Golgi apparatus by coat protein complex II (COPII) vesicles [9]. The intercompartmental protein transport factor Sec18/NSF is involved in the transport of glycoproteins through the different Golgi compartments [10]. As they pass through the Golgi complex, proteins acquire heavily branched outer chains that are attached to their *N*-glycan cores. The elongation of *O*-mannosides is less prominent and composed of shorter, linear glycans. The glycosylation of mannoproteins in the Golgi apparatus involves different mannosyltransferases and GDP-mannose molecules as substrates, which are transported to the Golgi by the specific transporter Vrg4 [11]. Figure 1 schematizes the *S. cerevisiae* (Sc) and *C. albicans* (Ca) *N*- and *O*-glycans and shows the mannosyltransferases involved in their biosynthesis.

During *N*-glycosylation, a single α -1,6 mannose unit is first attached to the core by Sc and CaOch1 [12,13]. This single mannose residue is then elongated to form the α -1,6 outer chain backbone. The mannan polymerase I multi-enzyme complex M-Pol I, which contains ScMnn9 and ScVan1, adds up to 10 α -1,6 mannose residues. M-Pol II, a second complex composed of ScMnn9, ScAnp1, ScMnn10, ScMnn11 and ScHoc1, can then transfer up to 50 additional residues [14-17]. The resulting α -1,6 backbone is decorated with side chains consisting of homopolymeric α -1,2 mannosides and heteropolymeric α -1,2/ α -1,3 or β -1,2 mannosides. In *S. cerevisiae*, the initial α -1,2

mannose unit is attached by ScMnn2 [18] and is then elongated with additional α -1,2 mannose units by ScMnn5 [18,19]. In *C. albicans*, CaMnt4 and CaMnt5/Ktr2 were described to be involved in this elongation [20,21]. These side chains can be capped with either α -1,3 mannosides by ScMnn1 [17-19,22] in *S. cerevisiae* or with β -1,2 oligomannosides by CaBmt1 and CaBmt3 in *C. albicans* [5]. *C. albicans* also has terminal α -1,3 mannosides on some of its side chains, but the enzyme involved in this process has not yet been identified. Further substitutions can decorate the α 1,2 side chain through phosphomannosylation by ScMnn6 in *S. cerevisiae* [23] or CaMnt3 and CaMnt5/Ktr2 in *C. albicans* [21]. This side-phosphomannose itself can be further β -1,2 mannosylated through the action of CaBmt2, CaBmt3 and CaBmt4 in *C. albicans* [5]. *N*-mannosylation steps are catalyzed in distinct compartments of the Golgi complex. An analysis of *S. cerevisiae* *N*-mannosylation in the different Golgi compartments has shown that α -1,6 mannosylation starts in the cis Golgi compartment and continues in the medial compartment together with α -1,2 mannosylation. α -1,3 mannosylation takes place in the trans-Golgi compartment and the trans-Golgi network (TGN) [10].

O-mannosylation is less complex than *N*-mannosylation, and fewer mannosyltransferases are involved in this process. Mannose residues are transferred directly by Golgi mannosyltransferases with redundant activities from the Mnt/Ktr family in *S. cerevisiae* and *C. albicans*. ScMnt1/Kre2, ScKtr1 and ScKtr3 add the 2nd and 3rd mannose units through α -1,2 linkages [24-26], and ScMnn1, ScMnt2 and ScMnt3 then transfer the 4th and 5th mannose units through α -1,3 linkages [22,27]. The *O*-mannosides of *C. albicans* possess up to six mannose units linked through α -1,2 linkages by CaMnt1/Kre2 and CaMnt2 [28]. Some *C. albicans* *O*-mannosides have terminal β -1,2 mannosides added by CaBmt1 and CaBmt3 that act on the *O*-Man₃ biosynthesized by CaMnt1/Kre2 and CaMnt2 (Courjol *et al.*, unpublished). In *S. cerevisiae*, the addition of α -1,2 mannosides takes place in the medial Golgi compartment, where α -1,3 mannosylation begins, but ends in the trans-Golgi compartment [22,29].

It is noteworthy that ScMnt1/Kre2, ScKtr1 and ScKtr3, which were first identified as *O*-elongating mannosyltransferases, are also implicated in the α -1,2 mannosylation of Nglycoproteins [24,25]. In contrast, ScMnn1, which was first identified as involved in the terminal α -1,3 mannosylation of N-glycoproteins (core and side chains), was shown to be able to mannosylate *O*-glycans [17,22]. Similarly, CaBmt1 and CaBmt3, which were first described to add terminal β -1,2 mannosides to N-glycan side chains [5], are able to use *O*glycans as their substrates (Courjol *et al.*, unpublished).

Sphingolipid mannosylation

Ceramides are transported from the ER to the Golgi apparatus by vesicular (COPII) and non-vesicular pathways [30,31]. The glycosphingolipids (GSLs) of various eukaryotes are generated after the addition of glucose or galactose to the C1 hydroxyl group of ceramide [32]. The transfer of additional sugars leads to the production of different GSL species. In *S. cerevisiae*, the IPC synthase ScAur1 catalyzes the addition of phosphoryl-inositol to ceramide in the medial Golgi compartment [33-35]. Inositol-phosphorylceramide (IPC) is then formed and transported to the Golgi lumen, where it is mannosylated to form mannosyl-inositolphosphorylceramide (MIPC) (Figure 2). Two redundant IPC mannosyltransferases, ScCsg1 and ScCsh1, can catalyze the reaction [36]. Both enzymes can form a complex with a Ca²⁺-binding protein, ScCsg2, which certainly regulates their activity [3]. In the Golgi lumen, MIPC can receive a second phosphorylinositol group added by another inositol-phosphoryl transferase, ScLpt1, to

generate mannosyl-diinositol-phosphorylceramide (M(IP)₂C) [33] (Figure 2). MIPC and M(IP)₂C are secreted into the plasma membrane, whereas non glycosylated IPC is transported to a vacuole. GSLs from the MIPC family are present in *C. neoformans*, *A. fumigatus* and *C. albicans* [37-39]. MIPC from *C. neoformans* and *C. albicans* can be further β -1,6 galactosylated and phosphomannosylated, respectively, rather than linked to phosphoryl-inositol. Phosphomannosylated MIPC from *C. albicans* is further β -

1,2 mannosylated by at least two members of the Bmt family: CaBmt5 adds the first β mannose and, purportedly, the second, and CaBmt6 transfers the third β -mannose and elongates the chain [6] (Figure 2). The resulting GSL is called phospholipomannan (PLM).

Structure and function of Golgi mannosyltransferases

To date, fungal mannosyltransferases have been characterized either by gene deletion and phenotype analysis or by *in vitro* assays using recombinant forms. Members of the same family can possess functional redundancies, whereas others can catalyze distinct reactions. Therefore, it is difficult to establish the structure-function relationships within the different families.

Golgi mannosyltransferases are type II membrane proteins with a short cytosolic Nterminal domain followed by a transmembrane domain that is required to anchor the enzymes to the Golgi membrane. The transmembrane domain is followed by a non-conserved stem and a more conserved C-terminal globular catalytic domain. Mannosyltransferases use GDPmannose as a donor of mannose units, which are transferred onto various acceptor substrates (*N/O*-GP, GSL). Glycosyltransferases (GTs) are classified into families based on similarities in their amino acid sequences to one or more members that have been biochemically characterized [40]. This classification scheme was used to set up a database of enzymes involved in carbohydrate metabolism: CAZY (Carbohydrate Active enZYmes), <http://www.cazy.org/>. Fungal Golgi mannosyltransferases belong to five distinct GT-families: three families of inverting enzymes (GT-15, GT-71 and GT-91), one family of retaining enzymes (GT-32) and one family of enzymes with an unknown mechanism (GT-62). Interestingly, GT-15 and GT-71 both contain α -1,2 mannosyltransferases but also phosphomannosyltransferases and α -1,3 mannosyltransferases, respectively. This suggests a close relationship between the GT-15 and GT-71 families and neighboring catalytic mechanism for these three distinct reaction specificities. GT-32 contains both inositolphosphorylceramide α -mannosyltransferases and α -1,6 mannosyltransferases, which are also present in the GT-62 family, whereas β -1,2 mannosyltransferases belong to the GT-91 family.

ScMnt1/Kre2, a member of the GT-15 family, was crystallized to obtain its 3D structure, and its catalytic mechanism was then partially elucidated [41] (Figures 3 a and c). The protein has a mixed alpha/beta fold similar to the GT-A fold, which is one of the two typical GT folds [42]. Modeling with the acceptor, site-directed mutagenesis, and kinetic analysis suggested two possible catalytic mechanisms: a double-displacement mechanism with the Tyr220 hydroxyl as the putative nucleophile or, alternatively, a S_Ni-like mechanism (a nucleophilic reaction allowing the retention of the conformation) with Tyr220 positioning the substrate for catalysis. Interestingly, this Tyr220 catalytic residue (within the sequence ESYRH) is conserved in CaBmt4 and CaBmt6 (NSYHR in both elongating enzymes: Tyr321 and Tyr328, respectively) but is converted into a histidine residue in CaBmt1 and CaBmt2 (NSHHR in both initiating

enzymes: His364 and His322, respectively) (Figure 4). Because sequence alignment strongly suggests that His364 in the sequence of CaBmt1 plays a key catalytic role in this enzyme, the conversion from a tyrosine into a histidine residue (maintaining a cyclic lateral chain, but without a hydroxyl radical) strongly supports the SNIlike catalytic mechanism [43].

More recently, the 3D structure of ScMnn9, a member of the GT-62, was solved [16] and was found to be similar to that of the GT-15 and GT-78 mannosyltransferases: a GT-A fold (Figures 3 b and d). This 3D structure is the first X-ray structure determined for a member of the GT-62 family. A comparison of the ScMnn9 and ScKre2/Mnt1 3D structures revealed structural similarity derived from the GT-A fold around the catalytic site. However, as for ScKre2, the authors were not able to obtain a complex with an intact GDP-Man donor, which would have led to the identification of the amino acid that acts as the mannosyl binding site. The superimposition of the ScMnn9 3D structure with the 3D structure of a mannosylglycerate synthase (a member of the GT-76 family) from the bacteria *Rhodothermus marinus* predicted that Asp280 would line the mannosyl binding site and is positioned close to the hydroxyl group. The conversion of Asp280 to Asn280 by site-directed mutagenesis rendered the enzyme inactive [16]. Residues Glu247/His388 in Kre2 and Asp236/His389 in Mnn9 were identified as coordinating with manganese, with Glu and Asp corresponding to the first position of the canonical DXD motif frequently described as a determining characteristic of the GT-A superfamily (Figure 4). ScMnn9 has a unique hairpin loop formed by two additional beta-strands (from Ile262 to Asn283) that may act either as a molecular ruler for the formation of a mannosyl backbone of defined length or as a guide for the recognition and correct positioning of protein N-linked glycans for mannosyl transfer [16] (Figure 3b).

Contribution of mannosylation to virulence of pathogenic fungi

C. albicans has been a useful model for analyzing the relationship between the structure and activity of mannoglycoconjugates. Due to its different mannosyltransferases, this yeast expresses a vast repertoire of mannosides with different types of linkages and degrees of polymerization in its cell wall. These mannosides cannot be considered as strict virulence factors because they are also present in the cell wall of non-pathogenic yeasts [1,2,5]. Indeed, they are recognized by different host receptors expressed by immune cells (mannose receptor [MR], dectin-2, dendritic cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin, DCSIGN and Mincle are all specific for α -mannosides) and soluble lectins (mannose-binding lectin [MBL] and galectin-3 are specific for α - and β -mannosides, respectively). The soluble lectins trigger *C. albicans* clearance through either direct uptake by phagocytes [44], activation of the lectin pathway of the complement [45], opsonization [45,46] or direct killing [47]. The host can also generate specific antibodies against β -mannosides that induce protection against disseminated candidiasis [48]. Nevertheless, through their adhesive and immunomodulatory properties, mannosides play a crucial role during the transition of *C. albicans* from commensal to pathogen when the host's homeostasis is disrupted. The adherence of *C. albicans* to host tissue is essential during the early stages of colonization and invasion. The use of purified mannosides or mutants lacking the genes encoding specific mannosyltransferases have highlighted the role of α -mannosides conjugated to proteins through *N*- or *O*-linkages and β -mannosides in the adherence of *C. albicans* to epithelial cells [28,49,50]. Moreover, mutants with *N*- and *O*-glycosylation defects exhibit impaired virulence in murine models of candidiasis [12,28,51]. The mannosides of *C. albicans* belong to pathogen-associated molecular

patterns (PAMPs) whose interplay with the pattern recognition receptors (PRRs) described above (lectin receptors and soluble lectins) lead to tolerance or infection by the yeast [44,52,53]. Depending on the host immune status, the fungal morphotype and the type of glycans (nature of sugar, anomeric type of linkage and degree of polymerization) exposed at its cell surface, *C. albicans* can either be recognized and cleared by the host or can evade, dampen and escape the host's innate defenses. The proinflammatory activity of the GSL named PLM that is shed upon contact with host cells clearly depends on its β -mannosides and their degree of polymerization [54]. The respective role of the different cell wall mannosides during *Candida* infections will be elucidated by the use of mutants partially or completely deprived of one or several mannosyltransferase families.

Conclusion

The mannosyltransferases of pathogenic fungi are key enzymes involved in the biosynthesis of virulence attributes. Despite the high sequence similarities between mannosyltransferases, their structure-function relationships remain poorly understood, particularly the molecular determinants of their acceptor specificities and the type of reaction that they catalyze (retaining/inverting reaction, type of linkage). The determination of their 3D structures will help define the structure-function relationships, but their structures are difficult to obtain because of the weak solubility and stability of recombinant enzymes devoid of a transmembrane domain. Knowledge of the structure-function relationships of the different mannosyltransferase families is crucial for i) determining the function of the putative mannosyltransferases of the various pathogenic fungi and ii) designing inhibitors of the mannosyltransferases involved in virulence.

Acknowledgements

Our own investigations are supported by the the "Agence Nationale de la Recherche" [ANR-

09-MIE-031-01]; the European project "AllFun" from the 7thFramework programme-Health [260338].

Abbreviations: ER: endoplasmic reticulum; GlcNAc: N-acetylglucosamine; GP: Glycoproteins ; GSL: Glycosphingolipids; GT: Glycosyltransferases; Man: mannose; PLM: Phospholipomannan

References

1. Dean N: **Asparagine-linked glycosylation in the yeast Golgi.** *Biochim Biophys Acta* 1999, **1426**:309-322.
 2. Loibl M, Strahl S: **Protein O-mannosylation: what we have learned from baker's yeast.** *Biochim Biophys Acta* 2013, **1833**:2438-2446.
 3. Uemura S, Kihara A, Iwaki S, Inokuchi J, Igarashi Y: **Regulation of the transport and protein levels of the inositol phosphorylceramide mannosyltransferases Csg1 and Csh1 by the Ca²⁺-binding protein Csg2.** *J Biol Chem* 2007, **282**:8613-8621.
 4. Hall RA, Gow NA: **Mannosylation in *Candida albicans*: role in cell wall function and immune recognition.** *Mol Microbiol* 2013, **90**:1147-1161.
- (*) This review provides excellent insight into the role of the different mannosides of *C. albicans* in cell wall function and immune recognition.

5. Mille C, Bobrowicz P, Trinel PA, Li H, Maes E, Guerardel Y, Fradin C, Martinez-Esparza M, Davidson RC, 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.
6. Mille C, Fradin C, Delplace F, Trinel PA, Masset A, Francois N, Coddeville B, Bobrowicz P, Jouault T, Guerardel Y, *et al.*: **Members 5 and 6 of the *Candida albicans* BMT family encode enzymes acting specifically on beta-mannosylation of the phospholipomannan cell-wall glycosphingolipid.** *Glycobiology* 2012, **22**:1332-1342.
7. Herscovics A: **Processing glycosidases of *Saccharomyces cerevisiae*.** *Biochim Biophys Acta* 1999, **1426**:275-285.
8. Lengeler KB, Tielker D, Ernst JF: **Protein-O-mannosyltransferases in virulence and development.** *Cell Mol Life Sci* 2008, **65**:528-544.
9. Barlowe C: **Traffic COPs of the early secretory pathway.** *Traffic* 2000, **1**:371-377.
10. Brigance WT, Barlowe C, Graham TR: **Organization of the yeast Golgi complex into at least four functionally distinct compartments.** *Mol Biol Cell* 2000, **11**:171-182.
11. Dean N, Zhang YB, Poster JB: **The VRG4 gene is required for GDP-mannose transport into the lumen of the Golgi in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*.** *J Biol Chem* 1997, **272**:31908-31914.
12. Bates S, Hughes HB, Munro CA, Thomas WP, MacCallum DM, Bertram G, Atrih A, Ferguson MA, Brown AJ, Odds FC, *et al.*: **Outer chain N-glycans are required for cell wall integrity and virulence of *Candida albicans*.** *J Biol Chem* 2006, **281**:90-98.
13. Lehle L, Eiden A, Lehnert K, Haselbeck A, Kopetzki E: **Glycoprotein biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: ngd29, an N-glycosylation mutant allelic to och1 having a defect in the initiation of outer chain formation.** *FEBS Lett* 1995, **370**:4145.
14. Jungmann J, Munro S: **Multi-protein complexes in the cis Golgi of *Saccharomyces cerevisiae* with alpha-1,6-mannosyltransferase activity.** *EMBO J* 1998, **17**:423-434.
15. Stolz J, Munro S: **The components of the *Saccharomyces cerevisiae* mannosyltransferase complex M-Pol I have distinct functions in mannan synthesis.** *J Biol Chem* 2002, **277**:44801-44808.
16. Striebeck A, Robinson DA, Schuttelkopf AW, van Aalten DM: **Yeast Mnn9 is both a priming glycosyltransferase and an allosteric activator of mannan biosynthesis.** *Open Biol* 2013, **3**:130022.
- (**) This paper provides the first description of the 3D-structure of a glycosyltransferase from the GT-62 family.
17. Yip CL, Welch SK, Klebl F, Gilbert T, Seidel P, Grant FJ, O'Hara PJ, MacKay VL: **Cloning and analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* MNN9 and MNN1 genes required for complex glycosylation of secreted proteins.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, **91**:2723-2727.
18. Rayner JC, 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.
19. Cohen RE, Ballou L, Ballou CE: ***Saccharomyces cerevisiae* mannoprotein mutants. Isolation of the mnn5 mutant and comparison with the mnn3 strain.** *J Biol Chem* 1980, **255**:7700-7707.
20. Diaz-Jimenez DF, Mora-Montes HM, Hernandez-Cervantes A, Luna-Arias JP, Gow NA, Flores-Carreón A: **Biochemical characterization of recombinant *Candida***

***albicans* mannosyltransferases Mnt1, Mnt2 and Mnt5 reveals new functions in O- and Nmannan biosynthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2012, 419:77-82.**

- (*) This paper reveals how recombinant mannosyltransferases can be useful tools for determining the function of mannosyltransferases.
21. Mora-Montes HM, Bates S, Netea MG, Castillo L, Brand A, Buurman ET, Diaz-Jimenez DF, Jan Kullberg B, Brown AJ, Odds FC, *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.**
 22. Graham TR, Seeger M, Payne GS, MacKay VL, Emr SD: **Clathrin-dependent localization of alpha 1,3 mannosyltransferase to the Golgi complex of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 1994, 127:667-678.**
 23. Wang XH, Nakayama K, Shimma Y, Tanaka A, Jigami Y: **MNN6, a member of the KRE2/MNT1 family, is the gene for mannosylphosphate transfer in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 1997, 272:18117-18124.**
 24. Hausler A, Ballou L, Ballou CE, Robbins PW: **Yeast glycoprotein biosynthesis: MNT1 encodes an alpha-1,2-mannosyltransferase involved in O-glycosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992, 89:6846-6850.**
 25. Lussier M, Sdicu AM, Bussereau F, Jacquet M, Bussey H: **The Ktr1p, Ktr3p, and Kre2p/Mnt1p mannosyltransferases participate in the elaboration of yeast O- and N-linked carbohydrate chains. *J Biol Chem* 1997, 272:15527-15531.**
 26. Romero PA, Lussier M, Sdicu AM, Bussey H, Herscovics A: **Ktr1p is an alpha-1,2-mannosyltransferase of *Saccharomyces cerevisiae*. Comparison of the enzymic properties of soluble recombinant Ktr1p and Kre2p/Mnt1p produced in *Pichia pastoris*. *Biochem J* 1997, 321 (Pt 2):289-295.**
 27. Romero PA, Lussier M, Veronneau S, Sdicu AM, Herscovics A, Bussey H: **Mnt2p and Mnt3p of *Saccharomyces cerevisiae* are members of the Mnn1p family of alpha1,3-mannosyltransferases responsible for adding the terminal mannose residues of O-linked oligosaccharides. *Glycobiology* 1999, 9:1045-1051.**
 28. Munro CA, Bates S, Buurman ET, Hughes HB, Maccallum DM, Bertram G, Atrih A, Ferguson MA, Bain JM, 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.**
 29. Strahl-Bolsinger S, Gentsch M, Tanner W: **Protein O-mannosylation. *Biochim Biophys Acta* 1999, 1426:297-307.**
 30. Funato K, Riezman H: **Vesicular and nonvesicular transport of ceramide from ER to the Golgi apparatus in yeast. *J Cell Biol* 2001, 155:949-959.**
 31. Perry RJ, Ridgway ND: **Molecular mechanisms and regulation of ceramide transport. *Biochim Biophys Acta* 2005, 1734:220-234.**
 32. Merrill JAH, Sweeley CC: **Sphingolipids: metabolism and cell signaling. In *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes*. Edited by Vance DaV, J.E.: Elsevier; 1996:309-339.**
 33. Dickson RC, Nagiec EE, Wells GB, Nagiec MM, Lester RL: **Synthesis of mannose(inositol-P)2-ceramide, the major sphingolipid in *Saccharomyces cerevisiae*, requires the IPT1 (YDR072c) gene. *J Biol Chem* 1997, 272:29620-29625.**

34. Levine TP, Wiggins CA, Munro S: **Inositol phosphorylceramide synthase is located in the Golgi apparatus of *Saccharomyces cerevisiae*.** *Mol Biol Cell* 2000, **11**:2267-2281.
35. Nagiec MM, Nagiec EE, Baltisberger JA, Wells GB, Lester RL, Dickson RC: **Sphingolipid synthesis as a target for antifungal drugs. Complementation of the inositol phosphorylceramide synthase defect in a mutant strain of *Saccharomyces cerevisiae* by the AUR1 gene.** *J Biol Chem* 1997, **272**:9809-9817.
36. Lisman Q, Pomorski T, Vogelzangs C, Urli-Stam D, de Cocq van Delwijnen W, Holthuis JC: **Protein sorting in the late Golgi of *Saccharomyces cerevisiae* does not require mannosylated sphingolipids.** *J Biol Chem* 2004, **279**:1020-1029.
37. Kotz A, Wagener J, Engel J, Routier F, Echtenacher B, Pich A, Rohde M, Hoffmann P, Heesemann J, Ebel F: **The mitA gene of *Aspergillus fumigatus* is required for mannosylation of inositol-phosphorylceramide, but is dispensable for pathogenicity.** *Fungal Genet Biol* 2010, **47**:169-178.
38. Mille C, Janbon G, Delplace F, Iyata-Ombetta S, Gaillardin C, Strecker G, Jouault T, Trinel PA, 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.
39. Wohlschlager T, Buser R, Skowrya ML, Haynes BC, Henrissat B, Doering TL, Kunzler M, Aebi M: **Identification of the galactosyltransferase of *Cryptococcus neoformans* involved in the biosynthesis of basidiomycete-type glycosylinositolphosphoceramide.** *Glycobiology* 2013, **23**:1210-1219.
40. Campbell JA, Davies GJ, Bulone V, Henrissat B: **A classification of nucleotidediphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities.** *Biochem J* 1997, **326** (Pt 3):929-939.
41. Lobsanov YD, Romero PA, Sleno B, Yu B, Yip P, Herscovics A, Howell PL: **Structure of Kre2p/Mnt1p: a yeast alpha1,2-mannosyltransferase involved in mannoprotein biosynthesis.** *J Biol Chem* 2004, **279**:17921-17931.
42. Unligil UM, Rini JM: **Glycosyltransferase structure and mechanism.** *Curr Opin Struct Biol* 2000, **10**:510-517.
43. Fabre E, Sfihi-Loualia G, Pourcelot M, Coddeville B, Krzewinski F, Bouckaert J, Maes E, Hurtaux T, Dubois R, Fradin C, *et al.*: **Characterization of the recombinant *Candida albicans* beta-1,2-mannosyltransferase that initiates the betamannosylation of cell wall phosphopeptidomannan.** *Biochem J* 2014, **457**:347-360.
44. Gow NA, van de Veerdonk FL, Brown AJ, Netea MG: ***Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization.** *Nat Rev Microbiol* 2012, **10**:112-122.
45. Ma YJ, Doni A, Skjoedt MO, Honore C, Arendrup M, Mantovani A, Garred P: **Heterocomplexes of mannose-binding lectin and the pentraxins PTX3 or serum amyloid P component trigger cross-activation of the complement system.** *J Biol Chem* 2011, **286**:3405-3417.
46. Linden JR, Kunkel D, Laforce-Nesbitt SS, Bliss JM: **The role of galectin-3 in phagocytosis of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* by human neutrophils.** *Cell Microbiol* 2013, **15**:1127-1142.
47. Kohatsu L, Hsu DK, Jegalian AG, Liu FT, Baum LG: **Galectin-3 induces death of *Candida* species expressing specific beta-1,2-linked mannans.** *J Immunol* 2006, **177**:4718-4726.
48. Xin H, Cutler JE: **Vaccine and monoclonal antibody that enhance mouse resistance to candidiasis.** *Clin Vaccine Immunol* 2011, **18**:1656-1667.

49. Dalle F, Jouault T, Trinel PA, Esnault J, Mallet JM, d'Athis P, Poulain D, Bonnin A: **Beta-1,2- and alpha-1,2-linked oligomannosides mediate adherence of *Candida albicans* blastospores to human enterocytes in vitro.** *Infect Immun* 2003, **71**:70617068.
50. Murciano C, Moyes DL, Runglall M, Islam A, Mille C, Fradin C, Poulain D, Gow NA, Naglik JR: ***Candida albicans* cell wall glycosylation may be indirectly required for activation of epithelial cell proinflammatory responses.** *Infect Immun* 2011, **79**:4902-4911.
51. Hall RA, Bates S, Lenardon MD, Maccallum DM, Wagener J, Lowman DW, Kruppa MD, Williams DL, Odds FC, Brown AJ, *et al.*: **The Mnn2 mannosyltransferase family modulates mannoprotein fibril length, immune recognition and virulence of *Candida albicans*.** *PLoS Pathog* 2013, **9**:e1003276.
- (**) This paper highlights the complexity associated with unraveling the function of different members of a mannosyltransferase family and clearly describes how the members of this family contribute to *C. albicans* virulence.
52. Jouault T, Sarazin A, Martinez-Esparza M, Fradin C, Sendid B, Poulain D: **Host responses to a versatile commensal: PAMPs and PRRs interplay leading to tolerance or infection by *Candida albicans*.** *Cell Microbiol* 2009, **11**:1007-1015.
53. Romani L: **Immunity to fungal infections.** *Nat Rev Immunol* 2011, **11**:275-288.
- (**) This review provides excellent insight into the interplay between fungi and host immune cells.
54. Devillers A, Courjol F, Fradin C, Coste A, Poulain D, Pipy B, Bernardes ES, Jouault T: **Deficient beta-mannosylation of *Candida albicans* phospholipomannan affects the proinflammatory response in macrophages.** *PLoS One* 2013, **8**:e84771.

Figure 1: Mannosylation pathways of *S. cerevisiae* and *C. albicans* proteins. The structures of *S. cerevisiae* (left) and *C. albicans* (right) N- and O-linked glycans are schematized. The arrow indicates the function of the mannosyltransferases. The Golgi mannosyltransferases are framed.

Figure 2: Biosynthesis of *S. cerevisiae* and *C. albicans* GSLs from the MIPC family. The *S. cerevisiae* and *C. albicans* M(IP)₂C biosynthesis pathway and the *C. albicans* PLM biosynthesis pathway are schematized. The arrow indicates the function of the enzymes. The Golgi mannosyltransferases are framed.

Figure 3: Structure and active site of ScMnt1/Kre2 and ScMnn9. Top panels: stereoscopic surface/cartoon representations of the structure of ScMnt1/Kre2 in complex with GDP, α-methyl-mannose (MMA) and Mn²⁺ (a) and of ScMnn9 in complex with GDP and Mn²⁺ (b) are displayed. The distinctive hairpin loop present in ScMnn9 is shown in green. GDP is displayed as blue sticks, MMA as red sticks and Mn²⁺ as an orange sphere. Lower panels: close-up overviews of the active site of ScMnt1/Kre2 (c) and ScMnn9 (d) are represented. Amino acid residues and ligands involved in the catalytic reaction are shown as sticks. Hydrogen bonds are represented as yellow dashed lines, with light grey carbon atoms, red oxygen atoms, blue nitrogen atoms and orange phosphorus atoms. The nomenclature for the atoms is that used in the Protein Data Bank (PDB, <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>). Mn²⁺ is shown as a purple sphere. Representations were generated with the PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.7.1.1 Schrödinger, LLC.

Figure 4: Protein sequence alignments of Sc and CaKre2, CaBmts and Sc and CaMnn9 active sites. The dark grey shading indicates completely conserved residues; the light grey shading shows identical (grey letters) or similar (black letters) residues that are shared by at least two of the aligned proteins. Grey letters without shading display weakly similar amino acids. The arrows indicate residues implicated in the binding of mannose from GDP-Man. The canonical DXD sequence of glycosyltransferases (underlined residues) and the histidine residue (star) are involved in the coordination of manganese [16,41,43].

Figure 1

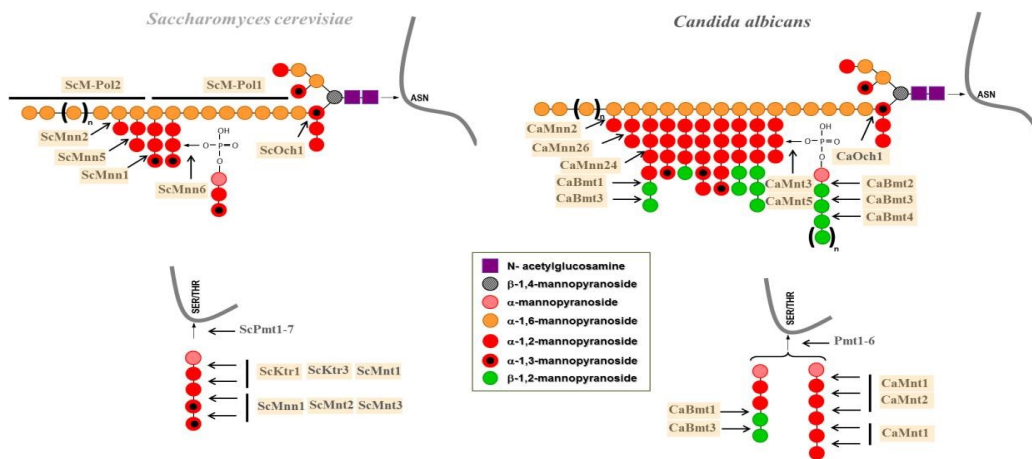


Figure 2

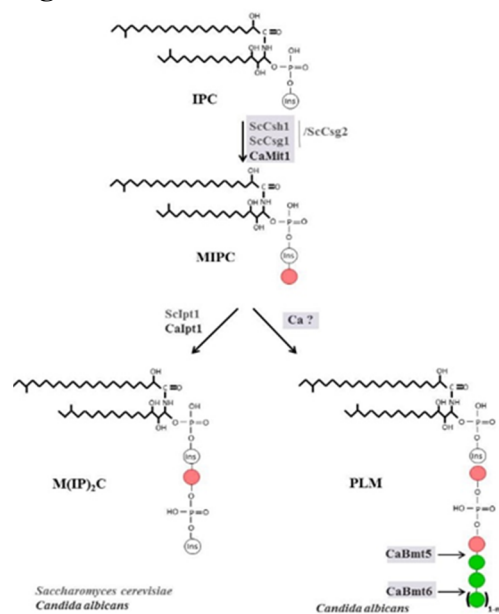


Figure 3

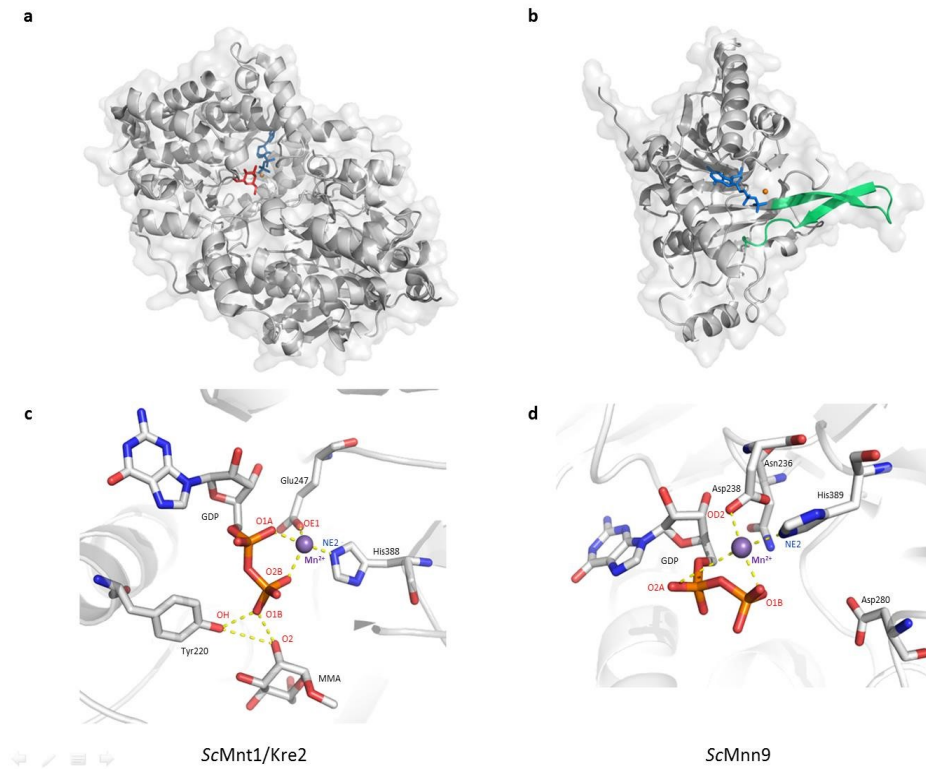
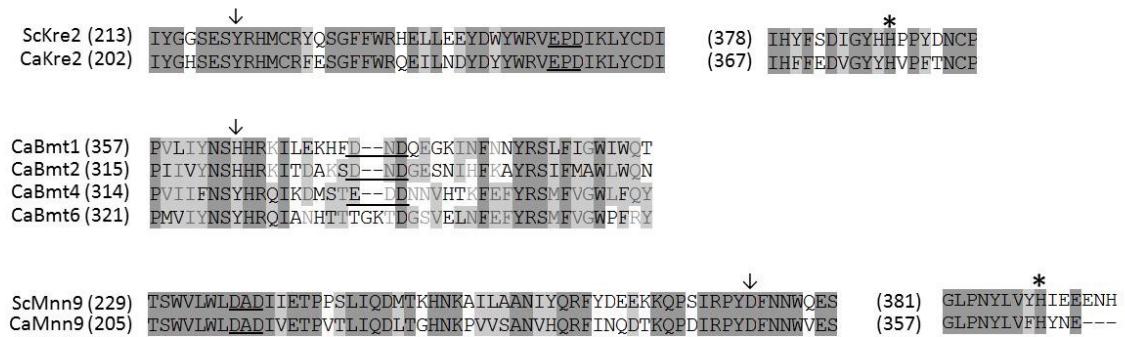


Figure 4



ARTICLE 4

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

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

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

¹ To whom correspondence should be addressed. Yann Guérardel; e-mail: Yann.guerardel@univ-lille1.fr

² These two authors contributed equally to this work

SHORT TITLE: Synthesis initiation of β -mannans in yeasts

ABSTRACT

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

KEY WORDS

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

INTRODUCTION

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

Numerous yeast mannosyltransferases were shown to be involved in either the initiation [18] or the elongation [19–21] of α -linked *O*-mannan and *N*-glycan α -polymannosyl outer side chains. It is only recently that the enzymes responsible for the synthesis of β -mannosylated chains were identified in *C. albicans* as a new family of 9 β -mannosyltransferase genes (BMTs) [22]. Surprisingly, the amino acid sequences of Bmtps exhibit very low similarities with already known glycosyltransferases classified according to the CAZY and Pfam databases (<http://www.cazy.org/>; <http://pfam.sanger.ac.uk/>), which preclude their assignment to GT-A or GT-B superfamilies. Notably, all Bmtps except members 5 and 7 possess a Asp-X-Asp motif, frequently described as a determining characteristic of GT-A glycosyltransferases [23]. Referred as DXD (in which none of the residues is invariant), this tripeptide is often described to be dedicated to the coordination of a divalent cation and/or a ribose by carboxylates. The phenotypic analysis of individual BMT-deleted strains permitted us to partially establish the substrate specificities of six out of nine identified enzymes. Bmts 1 and 3 act on the acid stable moiety of PPM, Bmts 2, 3 and 4 on the acid labile moiety of PPM whereas Bmts 5 and 6 act on the PLM (Figure 1) [22,24]. Furthermore, these data established that most enzymes sequentially transfer *in vivo* a single residue at a given position. Thus, the originality of the Bmts family lies not only in their protein structure but also on the strict specificity of the reactions they catalyse. Moreover, considering that this family is restricted to a very limited set of pathogenic yeasts (*C. albicans*, *C. glabrata* and *C. tropicalis*) that are responsible of more than 90% of life threatening yeast hospital infections and vaginal *Candida* infections, Bmts appear as promising targets for a new class of very specific antifungal drugs. Thus, the aim of the present study is to provide new insights on basic Bmts catalytic mechanisms, with the longer term objective to guide the design of putative inhibitors.

Here, the protein Bmt1p tentatively identified as the enzyme that transfers the first β -mannose unit onto the PPM acid-resistant fraction (Figure 1), was overexpressed in *P. pastoris* to determine its *in vitro* activities. Panels of endogenous oligomannosides isolated from *S. cerevisiae* and *C. albicans* mutant PPMs and synthetic α -oligomannosides were prepared and used as potential acceptor substrates. The results demonstrate that Bmt1p is a β -1,2-mannosyltransferase that can utilize terminal α -1,2- mannotriose and mannotetraose as

substrates and can catalyse the transfer of two consecutive β -mannosyl units. This work provides essential clues on the exclusive requirements of this novel enzyme.

EXPERIMENTALS

Materials

The *P. pastoris* strains and plasmids were obtained from Invitrogen; GDP-Mannose was from Sigma-Aldrich; oligonucleotides were synthesized by Eurogentec. Phosphopeptidomannan from *S. cerevisiae* was obtained from Sigma Products. Phosphopeptidomannan from the *C. albicans* Δ BMT1 mutant strain, grown in YPD medium at 28°C, was extracted as described [25]. Briefly, cells were autoclaved in 0.02M citrate buffer at 125°C for 90 min and Fehling's solution was added to the supernatant to precipitate PPM. The PPM was then washed with methanol:acetic acid (8:1) and dried in a Speed Vac concentrator after a final wash in methanol.

Plasmid construction

DNA sequence encoding a 1910 pb truncated form of BMT1 was amplified by PCR from the genome of *C. albicans* serotype A strain (BWP17). The DNA polymerase Accuprime Pfx (Invitrogen) was used following manufacturer recommendations, with oligonucleotides 5'-CCAATAATAATGAATTCCCTGGATTATCGGG-3' (direct) and 5'-GTTCTTGATCAATCTAGAAAAGTTTCTCCATAAAT-3' (reverse). Restriction sites EcoRI and XbaI (underlined) were respectively inserted before and after the starting and ending codons. DNA fragment was digested with EcoRI and XbaI, and ligated into the EcoRI/XbaI sites of the pPICA α A vector (Invitrogen). The encoded Bmt1p truncate begins with N52. To obtain the three L/S mutations that restore the native serine residues, the following oligonucleotides were successively used, concomitantly with their respective inverted complemented version 5'-CGAGAAGGATCAAGGATCCCCAAAATTTTC-3' for the amino acid 267, 5'-CATCATCGGAAGATATCTGAAAAACATTTTG-3' for the amino acid 369, and 5'-CAAAGTGGATTTAAATCTGTGACTAATGTTG-3' for the amino acid 662. The pfu turbo Cx Hotstart DNA polymerase (Agilent technologies) was used to achieve inverse PCRs following manufacturer recommendations. To obtain the native C-terminal sequence of Bmt1p, devoid of C-terminal tag, the following oligonucleotide was used concomitantly with its respective inverted complemented version : 5'-GGAGAACTTTTTAAGAACA AAAACTCATCTCAGAAGAGG-3'. The complete open reading frame was sequenced (Genoscreen) to establish that only the desired mutations were present.

Expression of Bmt1p in Pichia pastoris

The pPICZ α A vectors were digested with BstXI, and the linearized fragments were used to transform the *P. pastoris* strain (X-33) by electroporation. Mut^s transformants were obtained by selecting clones that grew well in minimal medium containing glucose but poorly in minimal medium containing methanol. Twenty four transformants were screened for the level of secretion of Bmt1p into culture supernatant. Clones were grown in a 10 mL deep well microplate at 28°C (225 rpm) until DO₆₀₀ of 40, in medium containing 1% (w/v) yeast extract, 2% (w/v) peptone, 1.34% (w/v) yeast nitrogen base, 4 x 10⁻⁵% (w/v) biotin and 1% (v/v) glycerol buffered at pH6 with 100 mM potassium phosphate (BMGY medium). The medium was removed by centrifugation and the cells were suspended at five times the original density in BMMY medium, which are similar to BMGY except that it contains 0.5% (v/v) methanol (instead of glycerol) as the inducer, protease inhibitors pepstatin and leupeptin at 1 μ M and 10 μ M respectively. Alternatively, BMM medium was used, differing from BMMY by the absence of yeast extract. The medium was collected after 2 days of culture at 28°C during which methanol and protease inhibitors were added each 12h. The clone showing the highest level of

expression was then cultivated using the same growing and expression conditions, scaling-up volumes 50 times in baffled erlenmeyer flasks. Either 0.5% tween 20 or CHAPS (0.5% v/v or 0.1% w/v respectively) were added along expression. Cells were eliminated by centrifugation at 3000 g during 10 min after which 0.5% of Triton X-100 was added to the supernatant containing the protein.

Purification of recombinant Bmt1p

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

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

Analytical methods

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

For western-blotting, proteins were transferred with the Mini Trans-Blot Cell (Bio-rad) to nitrocellulose membrane (Protran BA 83, Whatman). Detection was performed with the Enhanced Chemiluminescence plus detection system (Amersham GE Healthcare). Primary antibody were alternatively mouse monoclonal anti-*c-myc* (clone 9E10, Sigma) or rabbit polyclonal antisera raised against synthetic peptides containing 15 and 16 amino acid residues of the C-terminus of Bmt1p (EFVKPNNNRGRTEKN +C and WTIEKDLHQKEKDKQV +C, Eurogentec) .

N-glycosidase F (PNGase-F) and Endo-β-N-acetylglucosaminidase H (EndoH) digestions

For each digestion, protein denaturation was carried out with 9 μL of culture supernatant mixed with 10 μL of 10% SDS and 10% β-mercaptoethanol, incubated at 95°C during 20 min. Then, 10 μL of 100 mM Phosphate buffer pH6 were added. For PNGase-F (Roche) digestions, 1.5 μL of 10% Nonidet P40 were also added. Either 0.25 μL of 250 mU/μL PNGase-F (Roche) or 1 μL of 5 mU/μL EndoH (Roche) were added. The reaction media were incubated overnight at 37°C, 20 μL of which were analysed by SDS-PAGE. For non-digested samples, enzymes were replaced by water. Bovine serotransferrin was concomitantly digested by EndoH as positive control.

LC-MS/MS identification

For LC-MS/MS identification, purified Bmt1p was Coomassie-stained after SDS-PAGE. The band of interest was cut, discolored, dried and submitted to in-gel trypsin digestion overnight at 37°C in 25mM ammonium bicarbonate buffer (Porcine Mass Spectrometry Grade MSG-trypsin, G-Biosciences, agroBio, La ferté St Aubin, France). After sequential extraction, tryptic peptides were dried in a speed-vac and separated in LC-MS/MS. NanoLC-NanoESI-MS/MS. Analyses of trypsin digests were performed on an hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometer (Q-Star, Applied Biosystems, Foster City, California, USA) equipped with a nano-electrospray ion source coupled with a nano high pressure liquid chromatography system (LC Packings Dionex, Amsterdam, The Netherlands). Samples redissolved in 5 µL solvent A (5% acetonitrile with 0.1% formic acid) were desalted and concentrated on a reserved-phase C18 precolumn of 0.3 mm i.d. x 5 mm. Peptides were then separated on a 75 µm i.d. x 15 cm C18 Pepmap column (Dionex) with a flow rate of 200 nL/min. Peptides were eluted using a 0% to 35% linear gradient of solvent B (75% acetonitrile with 0.1% formic acid) in 80 min then a 35% to 100% linear gradient of solvent B in 10 min and finally held at 100% of solvent B for 5 min. The mass spectrometer was operated in the positive ion mode. Data acquisition was performed in a data-dependent mode consisting of, alternatively, a full-scan MS over the range m/z 300-2000, and a full-scan MS/MS of the ion selected over the range m/z 50-2000 in a dynamic exclusion mode with a collision energy automatically fixed by the device.

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

Dynamic Light Scattering (DLS)

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

Purification of acceptor substrates

Natural oligomannosides were obtained from *S. cerevisiae* and Δ BMT1 *C. albicans* mutant strain phosphopeptidomannans after acetolysis [27]. Prior to acetolysis, the PPM from Δ BMT1 *C. albicans* was submitted to acid hydrolysis (10 mM HCl at 100°C for 1h) in order to separate acid-stable and acid-labile parts [28]. The acid-labile fraction was collected and separated by gel-filtration chromatography. The acetolysis was performed on remaining PPM in acetic anhydride/acetic acid/sulfuric acid (10:10:1, v/v) at 25°C for 24 h. The supernatant was recovered after centrifugation at 4500g, for 10 min at 4°C, and the reaction products were extracted with chloroform after pH neutralization, then deacetylated with methanol/0.2M sodium hydroxyde (v/v) 1h at 4°C. Acetolysis yields a mixture of oligosaccharides that were purified by anion-exchange chromatography and individually separated by gel filtration chromatography (BioGel-P2 BioRad).

Coupling of Oligosaccharides with 2-Aminopyridine

The pyridylation of the oligosaccharides was performed according to Hase *et al.*, 1994 [29]. Briefly 100 µg of oligomannosides were incubated at 80°C for 1 h in 20µL of

solution A (552 mg of 2-aminopyridine (Aldrich) in 200 μ L of glacial acetic acid) followed by the addition of 70 μ L of solution B (250 mg of dimethylamine boran complex (Aldrich) in 100 μ L of acetic acid and 62.5 μ L H₂O) and 1 h incubation at 80°C. The samples were dried under nitrogen and diluted in 1 mL of water. The solution was adjusted to pH 10 with aqueous ammonia, washed ten times with chloroform and lyophilized. The reaction mixture was diluted with 100 μ L of water and applied to a C18 column (Sep-Pak Waters), and separated from free 2-aminopyridine by elution with 5 mL acetonitrile/water (25/75).

Synthesis of acceptor substrates

Synthesis of mantyl tagged α -oligomannosides (DP3M and DP4M) is described elsewhere (respectively compounds A and B in [30]). Synthetic fluorescent DP3M and DP4M oligomannosides were finally separated by gel-filtration chromatography on a Bio-Gel P2 (Bio-Rad) column and analyzed by MALDI-TOF mass spectrometry and NMR spectroscopy. As established by NMR experiments, DP4M is constituted by a major mantylated α -1,2 tetramannoside and a minor mantylated Man(α 1-3)Man(α 1-2)Man(α 1-2)Man. This minor contaminant originated from our attempt to use benzoyl and Fmoc protecting groups. The partial migration of the 3-O-benzoyl to position 2 leads to the formation of this regioisomer.

Mannosyltransferase Assays

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

The conditions of temperature, incubation time, divalent ions choice or pH buffer were suitably modified according to the studied parameters. The effect of several divalent cations was assayed using their respective chloride salts at a concentration of 20 mM. Sodium citrate/citric acid and Tris/maleate 160 mM buffers were used for the study of pH effect.

Treatment with α -mannosidase

The α -mannosidase treatment of the reaction mixture after mannosyltransferase assays was carried out in 20 mM sodium acetate buffer pH 5, containing 2 mM ZnCl₂ and 0.15 units of α -exomannosidase from Jack Bean (Prozyme) at 37°C for 24h to 48h. Resulting products were analyzed by HPLC. Reaction mixture containing Bmt1p without incubation was used as control for the substrate digestion with α -mannosidase.

Analysis of fluorescent substrates and enzyme reaction products by HPLC

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

Isolation of enzyme products

Reaction products were collected from HPLC separation as described above and sequentially purified on 150 mg carbograph SPE columns (Grace Davison) eluted by

water/acetonitrile (50:50, v/v) and C18 HPLC column using a gradient from water, 0.1% trifluoroacetic acid to water, 0.1% trifluoroacetic acid / acetonitrile (80:20, v/v). The products were then analyzed by mass spectrometry and NMR spectroscopy as described below.

Mass spectrometry analysis of native and fluorescent oligomannosides

MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Time of Flight) mass spectra were acquired on a Voyager Elite DE-STR mass spectrometer (Perspective Biosystems, Framingham, MA) equipped with a pulsed nitrogen laser (337 nm) and a gridless delayed extraction ion source. The spectrometer was operated in positive reflectron mode by delayed extraction with an accelerating voltage of 20 kV, a pulse delay time of 250 ns and a grid voltage of 66%. Samples were prepared by mixing 0.5 μL of oligomannosides solution (0.02 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) with 0.5 μL of 2,5-dihydroxybenzoic acid matrix solution (10 mg/mL in methanol/water, v/v) directly on the target. The samples were allowed to dry for about 5 min at room temperature. Between 50 and 100 scans were acquired for each spectrum over the range m/z 200 to 2500 Da.

NMR Analyses

NMR experiments were performed at 293K and 300 K on Bruker spectrometer at 21.6 teslas where ^1H resonates at 900.11 MHz and ^{13}C at 220.0 MHz. Avance[®] spectrometer was equipped with a 5-mm triple resonance cryoprobe. Before NMR spectroscopic analyses, samples were exchanged three times with $^2\text{H}_2\text{O}$ (99.97% deuterium atoms, Euriso-Top, Saclay, France) and intermediate lyophilization and then dissolved in 250 μL of $^2\text{H}_2\text{O}$ and transferred in Shigemi tubes (Allison Park, USA). ^1H chemical shifts were expressed in ppm related to the methyl signal of acetone as internal standard ($\delta^1\text{H}$ 2.225 and $\delta^{13}\text{C}$ 31.55 ppm). Pulse programs used were extracted from the Bruker pulse program library where pulses and delays were optimized for each experiment. The COSY, TOCSY and ^{13}C HSQC experiments were performed using the Bruker standard sequences.

RESULTS

Production of recombinant Bmt1p in P. pastoris

BMT1 was predicted to encode a type II membrane protein (http://ccb.imb.uq.edu.au/golgi/golgi_predictor.shtml) of 79.786 kDa (Vector NTI Advance 11.0, Invitrogen) with a short cytoplasmic N-terminus (28 residues), followed by a membrane spanning domain (<http://mobyle.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py#forms::toppred>, residues 29 to 49). A second hydrophobic region (residues 561-581), interpreted as “putative transmembrane segment” by TopPred software was localized at the C-terminal end of the protein (Figure 2). Alignment with Bmt1p2-4 permitted us to identify a large conserved C-terminal domain as the catalytic domain (AlignX, Vector NTI Advance 11.0, Invitrogen, residues 230 to 685). The remaining sequence, which is less conserved, is considered as the stem region (residues 50 to 229, Figure 2C).

To characterize Bmt1p enzymatic activity, we identified the most soluble and stable constructs, based on their domain organizations. Three distinct truncated forms of Bmt1p were designed as proteins to be expressed in *P. pastoris* (data not shown). Out of those, a single truncate lacking the cytoplasmic N-terminus and the membrane spanning domain, could be finally expressed and permitted the production of a soluble recombinant protein (Figure 2D). Its DNA coding sequence was cloned into pPICZ α A expression vector fused with a *c-myc* epitope and a 6xHis C-terminal tag. The N-terminal cytoplasmic and transmembrane domains were replaced with the cleavable signal sequence α factor from *Saccharomyces cerevisiae* and the fusion protein was placed under the control of the *AOX1* promoter.

The size of the recombinant protein band was close to the predicted molecular mass of 76.3 kDa for unglycosylated truncate and the protein was absent from control cell's medium (data not shown). Aliquots of culture supernatants (20 μ L) obtained at different times of induction up to 72 hours were subjected to SDS-PAGE analysis, but no increase in the produced quantities were observed (Figure 3A). Several buffers were tested for the induction medium (Tris-maleate pH 7.5, Tris-HCl pH7.5, or no buffer), without affecting the concentration of recombinant protein secreted. Similar levels of expression were obtained with *P. pastoris* strains KM71H and SMD1168H (Figure 3A).

In order to improve the stability and to restore Bmt1p native sequence, the 3 CUG codons (corresponding to residues 267, 369 and 662 in the native sequence) were mutated to encode back serines. Indeed, whereas this codon is translated as leucine in most organisms, in *C. albicans* and other *Candida* species the CUG codon is dually translated as serine (95 to 97% of the time) and leucine (3 to 5% of the time) [31]. C-terminal tags were removed introducing the native stop codon. Twenty four new X-33 transformants were screened for their expression using either BMMY or BMM as induction medium. The latter, devoid of yeast extract (and consequently PPM), is considered less inhibitory for mannosyltransferase activity. Almost all the transformants exhibited significant expression of Bmt1p in BMMY, detected with Instant Blue staining. One clone in particular showed high level of expression, both in BMMY and BMM. This transformant was thus cultivated in Erlenmeyer in BMM. The mobility of the protein band obtained was close to the predicted molecular mass of 74.1 kDa for untagged Bmt1p (Figure 3B). The amount of protein produced was determined by densitometry of the Instant Blue staining on SDS-PAGE. It is estimated that approx. 40 mg of Bmt1p per liter of BMM were produced.

Bmt1p solubilization

Although produced with a good yield in the culture supernatant, it appeared that the solubility of Bmt1p decreased drastically when conserved at 4°C. DLS analysis of final culture supernatants indeed revealed the presence of aggregates with diameters varying from 20 to 1000 nm (Figure 4C), whereas a theoretical radius of 4 nm was expected for soluble Bmt1p monomers [26]. Therefore, prior to the activity assays, we first established the best conditions for long term solubilization of Bmt1p. In order to prevent the formation of Bmt1p aggregates during its accumulation into the culture medium, either Chaps 0,1% or tween 20 0,05% (v/v) were added at the beginning of the induction period. Nevertheless, DLS showed the presence of remaining aggregates with an average size of 40 or 60 nm respectively. In a first attempt, we tested the addition of polyethylene glycol (PEG) at 2 to 6% (v/v) to supernatants previously obtained in the presence of Chaps 0,1%, in order to stabilize putative hydrophobic regions. Distinct average molecular weights PEGs were assayed, ranging from 250 to 8000, and containing alternatively monomethylether or dimethylether groups, but aggregates from 16 to 250 nm were still observed. Detergents were then tested including Triton X-100, n-dodecyl-N,N-dimethylamine-N-oxide (LDAO), n-dodecyl- β -D-maltoside (DDM), n-octyl- β -D-glucoside (OBG), Heptyl mannose (HM) and Chaps, at two distinct concentrations: 20% above their respective critical micellar concentration (CMC), or 0,5% (v/v). Figure 4 shows that LDAO (0,08% and 0,5%), HM (0,67%), TX100 (0,5%) and DDM (0,5%) all permitted to obtain 4 nm monomers according to DLS size distribution analysis “in volume”, whereas enzymatic assays revealed negative effects onto Bmt1p activity for LDAO 0,5% and HM 0,67%, probably due to denaturation and mannose competitive inhibition respectively (Figure 4A and 4B).

In conclusion, TX100 0,5% and DDM 0,5% appeared as the best solubilizing agents while conserving the enzyme activity. TX100 was thus chosen as the standard condition for production of an active Bmt1p.

Identification of Bmt1p and study of N-glycosylation

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

BMT1 encodes a protein presenting a single N-glycosylation consensus sequence (²⁹⁷NIS, Figure S1). To test whether this site is used, culture supernatant was digested with either N-glycosidase F or Endo- β -N-acetylglucosaminidase H and analyzed by SDS-PAGE. The apparent molecular mass of Bmt1p did not decrease following enzyme digestions (data not shown), indicating the absence of N-glycosylation in *P. pastoris*. The identification of Asn in the native sequence of Bmt1p by LC-MS/MS sequencing (see below) instead of Asp established that the protein was not enzymatically deglycosylated *in vivo*. The absence of recognition by ConA in lectin-blotting experiments was in agreement with this conclusion (data not shown). Similar results were obtained for Bmt1p purified or not by affinity chromatography on ConA-sepharose.

In order to further confirm the identity of the antibody-reactive protein, and also to define precisely its N- and C-terminus extremities, purified Bmt1p band was excised from Coomassie-stained band and digested with trypsin before analysis by nanoLC-nanoESI-MS/MS. The band was identified as Bmt1p from *C. albicans* by 34 tryptic peptides corresponding to 60% of sequence coverage for the recombinant construct (Figure S1). Surprisingly, the first peptide identified along the sequence was TIIFPNNFNHVHDHK, beginning 42 residues after the expected glutamic acid. Noteworthy, N-terminal Edman sequencing was performed in parallel but failed to identify any peptide. This result suggests that the N-terminal extremity of Bmt1p is blocked by either a formyl, an acetyl or a pyroglutamic acid group [32], precluding the

identification of the actual *N*-terminus of the recombinant protein. Sequence coverage further showed the presence of the peptide IYGETF at the C-terminus, confirming the absence of terminal 6xHis tag. Furthermore, accordingly to the deglycosylation experiments, the identification of the peptide ELDNVELIVDPENISTTNNK at *m/z* [785.4020]³⁺ strongly suggests the absence of *N*-glycosylation in native Bmt1p.

Production of natural and synthetic acceptor substrates

Based on previous data concerning the putative activity of Bmt1 [22], α -mannosides were chosen as potential acceptor substrates for the characterization of the activity of the Bmt1p produced in *P. pastoris*. Natural α -oligomannosides were obtained by chemical degradation of PPM isolated from *S. cerevisiae*, which structure is close to *C. albicans* PPM but lacks β -1,2 mannose linkages, and from *C. albicans* Δ BMT1 mutant strain, which contains the endogenous putative acceptors for Bmt1p.

Short α -oligomannosides were generated by acetolysis of PPM of *S. Cerevisiae* and *C. albicans* mutant strain and purified by ion exchange and gel filtration chromatography. Individual molecules were separated according to their sizes by gel filtration on Bio-Gel P2 (BioRad) irrigated with water and pooled in homogenous fractions based on their mobility on thin layer chromatography. The primary structures of individual compounds were established by MALDI-TOF mass spectrometry and NMR spectroscopy based on previously established ¹H chemical shifts of oligomannosides [33,34]. Eleven major oligosaccharides differing in size and linkage type were finally chosen as potential substrates (Table 1). Details of the spectroscopic analyses of these oligomannosides are provided as supplemental material in Figures S2 and S3 and in Table S1. The chosen compounds were linear and branched oligosaccharides containing from two to eight α -mannose or β -mannose residues linked in 1-2, 1-3 or 1-6 positions. Glycans isolated from *S. cerevisiae* were branched and linear α -mannosides capped by either α Man(1-2) [DP3, DP5_{SC}], α Man(1-3) residues [DP4_{SC}, DP7_{SC}, DP8_{SC}] or both [DP6_{SC}]. By contrast, those isolated from Δ BMT1 *C. albicans* were exclusively linear oligosaccharides constituted by α Man(1-2) [DP2_{CA}, DP3, DP4 α _{CA}] or substituted in terminal and penultimate position by α Man(1-3) residue [DP5_{CA}, DP6_{CA}]. Finally, a β Man(1-2) oligomer [DP4 β _{CA}] was purified from the acid labile moiety of *C. albicans* Δ BMT1 PPM. After purification, all eleven oligosaccharides were coupled with a fluorescent tag (2-aminopyridine) in order to be used as substrates for mannosyltransferase assays. Two mantyl tagged α -1,2 oligomannosides [DP3M and DP4M], (Figure 5B and Table 1) were synthesized to use as potential substrates, as they have been recently shown to be valuable tools for enzymatic studies [30]. NMR analyses of DP4M by homo- and heteronuclear NMR experiments established that it contained a major oligosaccharide Man(α 1-2)Man(α 1-2)Man(α 1-2)Man(α)-Mantyl (Figure 6A, Figure S4, Table S2). The observation of a distinct set of minor signals established that DP4M also contained a minor compound Man(α 1-3)Man(α 1-2)Man(α 1-2)Man(α)-Mantyl that did not interfere with activity assays as later shown (Figure S4, Table S2).

Determination of the enzymatic activity

The fluorescent pyridylamino-derivatives of natural α - and β -oligomannosides as well as the fluorescent synthetic α -oligomannosides were assayed as substrates with the Bmt1p containing culture supernatant from *P. pastoris* (in Tween 20/Triton X-100). Initially, assays were conducted on nickel affinity chromatography purified Bmt1p, but did not show any results (data not shown). Further analyses established that NiCl₂ totally inhibited the mannosyltransferase activity of Bmt1p, which strongly suggests that the interaction with the

affinity chromatography resin has a deleterious effect on the activity. The use of cobalt affinity chromatography did not show significant improvement. Thus, considering the high purity of the Bmt1p, the final culture supernatant was used as a source of enzyme. However, prior to the assays, traces of PPMs were removed from the enzyme fraction by affinity chromatography on ConA-sepharose in order to get rid of their potential inhibiting effect toward β -mannosyltransferase activity. The reaction mixtures were incubated over 48h at 28°C in order to achieve maximal enzymatic activity. The reaction products were followed by NP-FL-HPLC.

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

In order to precisely identify the enzyme activity of Bmt1p, the two reaction products resulting from Bmt1p activity on DP4M were isolated by preparative HPLC from a large-scale enzyme reaction mixture and purified before their structural analysis by mass spectrometry and $^1\text{H-NMR}$. The two reaction products exhibited $[\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z values at 1122.7 and 1284.7 respectively by MALDI-TOF MS analysis, which confirmed their attributions to Hex₅-mantyl and Hex₆-mantyl (Figure 6C). The first reaction product DP5M resulting from the Bmt1p activity on DP4M was also analyzed by NMR. As shown in Figure 7, we observed an additional anomeric proton (E) at 4.78 ppm presenting integration value very close to A-D anomer protons that was tentatively attributed to a supplemental mannosyl residue transferred onto DP4M major glycan. Starting from the shielded H5 signal (δ 3.38), $^1\text{H-}^1\text{H}$ TOCSY experiment (Figure 7B) permitted us to identify the associated H4 (δ 3.58), H3 (δ 3.92) and H2 (δ 4.04) signals, the latter being correlated with H1 (δ 4.78) of residue E. This spin system and the pattern of vicinal coupling constants ($^3J_{1,2}$ S; $^3J_{2,3}$ S, $^3J_{3,4}$ L, $^3J_{4,5}$ L) typified residue E as having a beta-manno-configuration. Finally, observation of the strong downfield shifts of D-H1 ($\Delta\delta$ +0.12) and H2 ($\Delta\delta$ +0.22) signals compared with DP4M (Table S2) established that the supplemental β Man residue is linked in position C2 on residue D, whereas all others anomeric protons are not affected, to form DP5M Man(β 1,2)Man(α 1,2)Man(α 1,2)Man(α 1,2)Man(α)-Mantyl. Although the substitution position of the terminal non-reducing β Man residue of DP6M could not be formally established by NMR because of low quantities, mass spectrometry analysis and enzymatic digestion strongly suggest that DP6M differs from DP5M by the terminal substitution of a β Man in C2 position of the β Man residue. Altogether, combination of chromatographic behavior, enzymatic digestion, mass spectrometry and nuclear magnetic resonance demonstrated that Bmt1p sequentially transfers two β Man residues in C2 position of the terminal non reducing position of Man(α 1,2)Man(α 1,2)Man(α 1,2)Man(α)-Mantyl starting acceptor (DP4M) substrate. After 48h incubation in standard conditions, about 30% of DP5M and 16% of DP6M were produced (Table 1) from DP4M leaving 50% of residual acceptor substrate. Similarly the incubation of Bmt1p extract with α -1,2 mannotriose (DP3M) [Man(α 1,2)Man(α 1,2)Man(α)-Mantyl] and GDP-Man generated two reaction products (HPLC

retention times: 15 min and 18.4 min) resistant to exo α -mannosidase enzymatic digestion and attributed by MALDI-TOF MS analysis to Hex4-mantyl and Hex5-mantyl (data not shown). Bmt1p produced about 30% of DP+1 and 15% of DP+2, which establishes that Bmt1p exhibits a similar activity on DP3M than on DP4M (Table 1). Similar results were obtained using pyridylamino derivatives of natural α -1,2 tri- and tetra-mannosides (DP3-AP and DP4 α_{CA} -AP), albeit a lower yield of production of both DP+1 and DP+2 (Table 1). This difference of activity may be easily explained by both the modification of the reducing monosaccharide during the coupling with 2-aminopyridine and by the absence of spacer group between oligosaccharide and fluorescent group compared with mantyl group.

Altogether, glycosyltransferase activity assays on synthetic and semi-synthetic substrates demonstrated that Bmt1p can sequentially transfer *in vitro* two β -linked-Man residues at the non-reducing terminal extremity of α -1,2-oligomannosides.

Enzymatic parameters

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

The incubation of Bmt1p with DP4M led to a linear time-dependent reaction (sum of DP5M and DP6M) for at least 48h at 28°C. However, the NP-FL-HPLC profiles of the reaction mixture at different incubation times evidenced the successive formation of the two reaction products. From 4 hours onward the first reaction product DP+1 (DP5M) appeared. Then the second reaction product DP+2 (DP6M) clearly appeared from 24h and became prominent only after at least 65h incubation time (data not shown). This experiment confirmed that Bmt1p can use the mantylated tetramannoside to give longer oligomannosides, adding successively the two mannose units.

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

Determination of the acceptor-substrate specificity

In order to establish the substrate specificity of Bmt1p, we used a variety of pyridylamino derivatives of oligomannosides generated from PPM of *S. cerevisiae* and Δ BMT1 *C. albicans*, (Table 1). Optimal incubation conditions were used, as established above *i.e.* 48h, 28°C, pH 6.5 with 20 mM $CaCl_2$. The yield of conversion was calculated by integrating the HPLC signals of the remaining substrate and of the reaction-products. α -mannosidase treatment was then used in order to discard possible contamination from α -mannosyltransferase activities (data not shown). As shown in Table 1, linear stretches of α -1,2 linked mannose residues exhibited the highest activities with total conversion rates of acceptor substrates of 17.5 % for DP3 (DP3-AP) and 21.5% for DP4 (DP4 α_{CA} -AP). Furthermore, only these two acceptors induced the generation of DP+2 α -mannosidase resistant oligomers.

Replacement of the terminal α Man(1-2) residue by a α Man(1-3) residue from a DP4 (as seen in DP4_{SC}) led not only to a dramatic decrease of the total conversion rate of the acceptor (7,7%), but also to the almost disappearance of DP+2 product. Further substitution by a α Man(1-2) (as seen in DP6_{CA}) residue did not increase the conversion rate, demonstrating that Bmt1p requires two α Man(1-2) residues in terminal non-reducing end to initiate β -mannosylation process. Further assays using (1-6) branched α -mannosides capped by α Man(1-2) or α Man(1-3) resulted in very low (<4%) or null β -mannosyltransferase activities. Similarly, Bmt1p showed no activity on a β Man(1-2) tetramer (DP4 β _{CA}-AP).

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

DISCUSSION

Candida species are nowadays the third most prevalent causes of hospital borne bloodstream infections [36]. In this context, yeast molecules involved into the variability of the humoral or lectinic recognition by the host are considered as possible virulence factors. The presence of β -mannosides in *C. albicans* cell wall was established by Suzuki and collaborators about three decades ago [4]. In particular, β -1,2-linked mannose units were shown to be directly connected to the PPM α -1,2-linked mannoside side chains of the PPM acid stable fraction, which defines the antigen factor 6 [5,37]. This antigen was directly shown to play a role in fungal adherence to epithelial cells [38]. Since then, β -mannosides from both PPM (acid stable and acid labile fractions) and PLM were shown to be involved into *C. albicans* antigenicity and fine tuning of host innate response [10,13,17,39–41]. However, the initiation mechanisms leading to the transfer of the first β -1,2-linked mannose unit onto the α -1,2-linked side chain of PPM in *C. albicans* were until recently unknown. The enzymes responsible for the biosynthesis of β -mannosides were recently identified as a family of nine putative β -1,2 mannosyltransferases genes that constitute a new structural enzyme family among glycosyltransferases [22,24]. Based on structural analysis of PPM isolated from Bmt deleted strains, Bmt1 (encoded by BMT1 gene and also called β -1,2-ManTaseI by Suzuki and co-workers [35]) was tentatively identified as the enzyme initiating the β -mannosylation on acid resistant fraction of PPM. Despite the identification of these enzymes, no initiating activity of β -mannosylation could be directly detected from *C. albicans* micromal enzymes [35]. To explain this result, authors hypothesized that the enzyme required an acceptor substrate containing α -1,6-mannoside backbone unit, as on native PPM. Thus, the objective of the present work was to characterize the Bmt1p enzymatic activity and molecular requirements in order to delineate β -mannosylation initiation and open up new perspectives for anti-fungal therapy or prophylaxis.

Along initial trials for producing an active soluble enzyme in *P. pastoris* model system the truncate lacking the cytoplasmic *N*-terminus and the membrane spanning domain was the only one to be produced in good yields. Other truncates, including one beginning at the last third of the stem region that was designed on the basis of the Kre2p/Mnt1p 3D structure [42] and one devoid of C-terminal hydrophobic region, were not produced (data not shown). Based on the observation of two proteolytic degradation products within the *P. pastoris* supernatant (data not shown) we tentatively identified ¹⁹⁷D and ⁴⁰⁶E amino acids as the *N*-terminal

extremities of the *N*- and *C*-terminal catalytic subdomains respectively as generally described for glycosyltransferases [23]. In order to optimize the activity assays and enzyme storage, Bmt1p solubility and stability were followed by DLS analysis in multiple experimental conditions. Protein aggregates containing from 5 to 250 Bmt1p monomers were detected into the culture supernatant in the absence of detergent. The use of tween 20 0,05% during induction and the final addition of 0.5% of either DDM or TX100 finally enabled Bmt1p monomerization and optimal activity. The presence of the *C*-terminal 20 amino acid long hydrophobic region (residues 561-581) may explain its auto-aggregative properties.

Altogether, we have demonstrated that Bmt1p can sequentially transfer *in vitro* two β -linked-Man residues at the non-reducing terminal extremity of linear DP3 and DP4 α -1,2-oligomannosides. Thus, we described here for the first time the initiation activity leading to the transfer of the first β -1,2-linked mannose unit to the α -1,2-linked side chain of PPM. Although Bmt1p showed a relatively low catalysis velocity onto PA-oligomannoside derivatives (20% of conversion yield corresponding to 40 nmol.mg of protein⁻¹.h⁻¹) it is in the same range than those previously established for the native enzyme fractions of *Candida* cells (around 30 and 50 nmol.mg of protein⁻¹.h⁻¹ of *C. albicans* serotype A or *C. guilliermondii* β -1,2-mannosyltransferases) [36]. It is noteworthy that the transfer of a second β -mannose was not expected as it did not appear through deletion phenotyping analyses [22]. To explain this discrepancy, one may hypothesize that this secondary activity is inhibited *in vivo* by the physical proximity of other β -mannosyltransferases that exhibit a higher affinity for the Man β -1,2 capped oligomannosides. This observation clearly points out the necessity of studying the other identified β -mannosyltransferases and how they interact in order to decipher the whole chain reaction that controls the β -mannosides elongation.

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

The *in vitro* acceptor-substrate specificity of Bmt1p fits well with the structure of PPM isolated from CaBmt1 deleted strain [8,22]. Indeed, deletion of CaBMT1 from BWP17 *C. albicans* strain completely abrogated the transfer of β -man residues onto the acid-stable polymannoside moiety of PPM, which suggested that this enzyme initiated the capping of α -mannoside by β -Man residues without redundancy from other CaBmt family members. Furthermore, the very low *in vitro* transfer activity of Bmt1p onto α Man(1-3) substituted oligomannosides is also in agreement with the fact that *C. albicans* PPM is not substituted by β Man(1-2) α Man(1-3) terminal motifs, unlike the one isolated from *Candida guilliermondii* [44,45].

Finally, the fact that the presence of EDTA into the reaction medium did not affect Bmt1p activity established that the enzyme activity is independent from the presence of divalent

cations. This finding was at first a surprise considering the presence of a ⁴⁷⁴DND motif into Bmt1p sequence (indicated by a star in Figure S1) that aligns almost perfectly with the Mn²⁺ coordinating ²⁴⁷EPD motif in Kre2/Mnt1p [42]. However, the function of the so called “DXD” signature is still open to discussion considering that on one hand some GT-A glycosyltransferases, do not possess the DXD “signature” [46] and on the other hand non glycosyltransferase proteins were shown to possess a DXD signature. Interestingly, the ²²⁰Y catalytic residue identified in the vicinity of DXD motif of Kre2/Mnt1p [42] within the sequence ²¹⁸ESYRH is conserved within Bmt4 and 6 (^{319/326}NSYHR in both elongating enzymes), but converted into a H within Bmt1 and 2 (^{362/320}NSHHR in both initiating enzymes). Kinetic analysis for Kre2/Mnt1p suggested two possible catalytic mechanisms. A first one is a double-displacement mechanism with the hydroxyl of ²²⁰Tyr as the potential nucleophile. Alternatively ²²⁰Tyr positions the substrates for catalysis in a S_Ni kind of mechanism. If alignments strongly suggest that ³⁶⁴H in Bmt1p sequence also plays a key catalytic role in this enzyme, the conversion from Y to H (with still a cyclic lateral chain but without hydroxyl radical) strongly supports the second hypothetical mechanism by influencing the positioning of substrates.

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

ABBREVIATIONS FOOTNOTE

PPM, Phosphopeptidomannan ; PLM, Phospholipomannan ; Bmt1p, β-1,2 mannosyltransferase 1 from *Candida albicans* ; β-Man, β-1,2 linked oligomannoside ; TLR2, Toll like receptor 2 ; BMT, β-1,2 mannosyltransferase gene ; BMGY, Buffered glycerol-complex medium with yeast extract ; BMMY, Buffered methanol-complex medium with yeast extract ; LC-MS/MS, Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry ; DLS, Dynamic light scattering ; ΔBMT1, *C. albicans* BMT1 gene deleted mutant strain ; MALDI-TOF MS, matrix assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry ; DP, degree of polymerization ; NMR, Nuclear magnetic resonance ; TOCSY, total correlation spectroscopy ; COSY, correlation spectroscopy ; HSQC, heteronuclear single quantum coherence ; LDAO, n-dodecyl-N,N-dimethylamine-N-oxide ; DDM, n-dodecyl-β-maltoside ; OBG, n-octyl-β-D-glucoside ; HM, heptyl mannoside

FUNDING

The work was supported by a grant from the Agence Nationale de la Recherche (ANR-Blanc-CaBMTs) and by a grant from “Ministère de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche” to G.S-L. The 400 MHz NMR facility was funded by the Centre Commun de Mesure RMN de l’Université de Lille 1. The 900 MHz spectrometer was funded by Région Nord-Pas de Calais, European Union (FEDER), Ministère Français de la Recherche, Université Lille1-Sciences et Technologies and CNRS. Financial support from the TGE RMN THC Fr3050 for conducting the research on the 900 MHz spectrometer is gratefully acknowledged.

The mass spectrometry facility used in this study is funded by the European Community (FEDER), the Région Nord-Pas de Calais (France), the CNRS and the Université Lille1.

REFERENCES

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

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

- measured by pulse field gradient NMR techniques. *Biochemistry (Mosc.)* **38**, 16424–16431.
- 27 Stewart, T. S., Mendershausen, P. B. and Ballou, C. E. (1968) Preparation of a mannopentaose, mannohexaose, and mannoheptaose from *Saccharomyces cerevisiae* mannan. *Biochemistry (Mosc.)* **7**, 1843–1854.
- 28 Faille, C., Wieruszeski, J. M., Lepage, G., Michalski, J. C., Poulain, D. and Strecker, G. (1991) ¹H-NMR spectroscopy of manno-oligosaccharides of the beta-1,2-linked series released from the phosphopeptidomannan of *Candida albicans* VW-32 (serotype A). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **181**, 1251–1258.
- 29 Hase, S. (1994) High-performance liquid chromatography of pyridylaminated saccharides. *Methods Enzymol.* **230**, 225–237.
- 30 Pourcelot, M., Cattiaux, L., Sfihi-Loualia, G., Fabre, E., Krzewinski, F., Fradin, C., Poulain, D., Delplace, F., Guerardel, Y. and Mallet, J.-M. (2013) Mantyl tagged oligo α (1-2) mannosides as *Candida albicans* β-mannosyltransferases substrates: a comparison between synthetic strategies. *RSC Adv.*
- 31 Gomes, A. C., Miranda, I., Silva, R. M., Moura, G. R., Thomas, B., Akoulitchev, A. and Santos, M. A. S. (2007) A genetic code alteration generates a proteome of high diversity in the human pathogen *Candida albicans*. *Genome Biol.* **8**, R206.
- 32 Miyatake, N., Kamo, M., Satake, K., Uchiyama, Y. and Tsugita, A. (1993) Removal of N-terminal formyl groups and deblocking of pyrrolidone carboxylic acid of proteins with anhydrous hydrazine vapor. *Eur. J. Biochem. FEBS* **212**, 785–789.
- 33 Shibata, N., Suzuki, A., Kobayashi, H. and Okawa, Y. (2007) Chemical structure of the cell-wall mannan of *Candida albicans* serotype A and its difference in yeast and hyphal forms. *Biochem. J.* **404**, 365–372.
- 34 Vinogradov, E., Petersen, B. and Bock, K. (1998) Structural analysis of the intact polysaccharide mannan from *Saccharomyces cerevisiae* yeast using ¹H and ¹³C NMR spectroscopy at 750 MHz. *Carbohydr. Res.* **307**, 177–183.
- 35 Suzuki, A., Takata, Y., Oshie, A., Tezuka, A., Shibata, N., Kobayashi, H., Okawa, Y. and Suzuki, S. (1995) Detection of beta-1,2-mannosyltransferase in *Candida albicans* cells. *FEBS Lett.* **373**, 275–279.
- 36 Shibata, N., Kobayashi, H. and Suzuki, S. (2012) Immunochemistry of pathogenic yeast, *Candida* species, focusing on mannan. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* **88**, 250–265.
- 37 Kobayashi, H., Shibata, N., Nakada, M., Chaki, S., Mizugami, K., Ohkubo, Y. and Suzuki, S. (1990) Structural study of cell wall phosphomannan of *Candida albicans* NIH B-792 (serotype B) strain, with special reference to ¹H and ¹³C NMR analyses of acid-labile oligomannosyl residues. *Arch. Biochem. Biophys.* **278**, 195–204.
- 38 Miyakawa, Y., Kuribayashi, T., Kagaya, K., Suzuki, M., Nakase, T. and Fukazawa, Y. (1992) Role of specific determinants in mannan of *Candida albicans* serotype A in adherence to human buccal epithelial cells. *Infect. Immun.* **60**, 2493–2499.
- 39 Han, Y., Morrison, R. P. and Cutler, J. E. (1998) A vaccine and monoclonal antibodies that enhance mouse resistance to *Candida albicans* vaginal infection. *Infect. Immun.* **66**, 5771–5776.

- 40 Han, Y., Riesselman, M. H. and Cutler, J. E. (2000) Protection against candidiasis by an immunoglobulin G3 (IgG3) monoclonal antibody specific for the same mannotriose as an IgM protective antibody. *Infect. Immun.* **68**, 1649–1654.
- 41 Lee, J.-H., Jang, E.-C. and Han, Y. (2011) Combination immunotherapy of MAb B6.1 with fluconazole augments therapeutic effect to disseminated candidiasis. *Arch. Pharm. Res.* **34**, 399–405.
- 42 Lobsanov, Y. D., Romero, P. A., Sleno, B., Yu, B., Yip, P., Herscovics, A. and Howell, P. L. (2004) Structure of Kre2p/Mnt1p: a yeast alpha1,2-mannosyltransferase involved in mannoprotein biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **279**, 17921–17931.
- 43 Shibata, N., Ikuta, K., Imai, T., Satoh, Y., Satoh, R., Suzuki, A., Kojima, C., Kobayashi, H., Hisamichi, K. and Suzuki, S. (1995) Existence of branched side chains in the cell wall mannan of pathogenic yeast, *Candida albicans*. Structure-antigenicity relationship between the cell wall mannans of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis*. *J. Biol. Chem.* **270**, 1113–1122.
- 44 Shibata, N., Akagi, R., Hosoya, T., Kawahara, K., Suzuki, A., Ikuta, K., Kobayashi, H., Hisamichi, K., Okawa, Y. and Suzuki, S. (1996) Existence of novel branched side chains containing beta-1,2 and alpha-1,6 linkages corresponding to antigenic factor 9 in the mannan of *Candida guilliermondii*. *J. Biol. Chem.* **271**, 9259–9266.
- 45 Suzuki, A., Shibata, N., Suzuki, M., Saitoh, F., Oyamada, H., Kobayashi, H., Suzuki, S. and Okawa, Y. (1997) Characterization of beta-1,2-mannosyltransferase in *Candida guilliermondii* and its utilization in the synthesis of novel oligosaccharides. *J. Biol. Chem.* **272**, 16822–16828.
- 46 Pak, J. E., Arnoux, P., Zhou, S., Sivarajah, P., Satkunarajah, M., Xing, X. and Rini, J. M. (2006) X-ray crystal structure of leukocyte type core 2 beta1,6-N-acetylglucosaminyltransferase. Evidence for a convergence of metal ion-independent glycosyltransferase mechanism. *J. Biol. Chem.* **281**, 26693–26701.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Schematic representation of N-glycan moiety from *C. albicans* PPM. The arrows indicate the putative activity of the Bmt enzymes identified in Mille *et al.* (2008) [22].

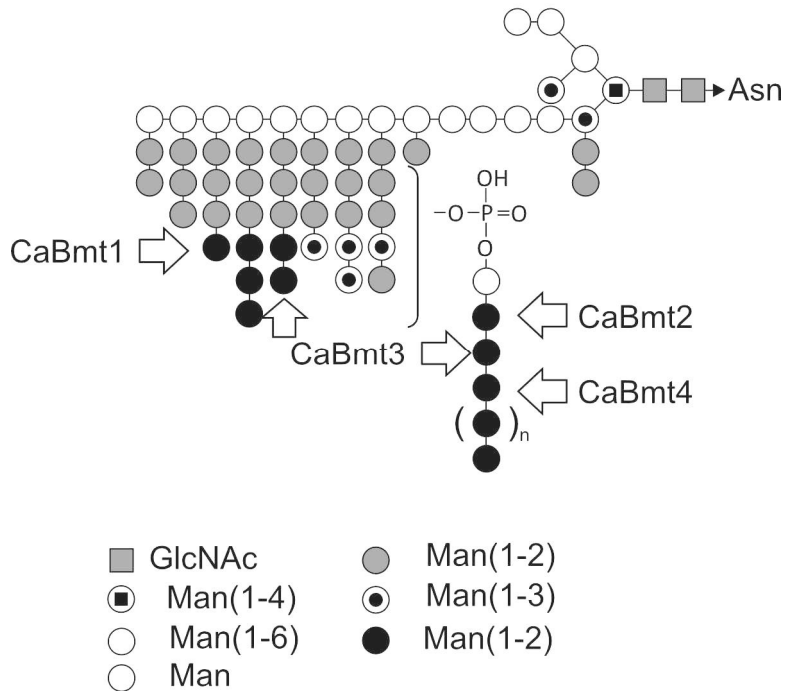


Figure 2: Functional domains of Bmt1p. **A-** TopPred hydrophobicity profile of the entire Bmt1p sequence (<http://mobyle.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py#forms::toppred>). **B-** Profile of the multiple alignments obtained from Bmt1-4p sequences (AlignX, Vector NTI Advance 11.0, Invitrogen). This graph is calculated as a sum of all pairwise residue substitution scores at a given alignment position divided by the number of pairs in the alignment. **C-** Predicted Bmt1p functional domains. **D-** The arrow represents the truncated form of Bmt1p expressed in *P. pastoris*.

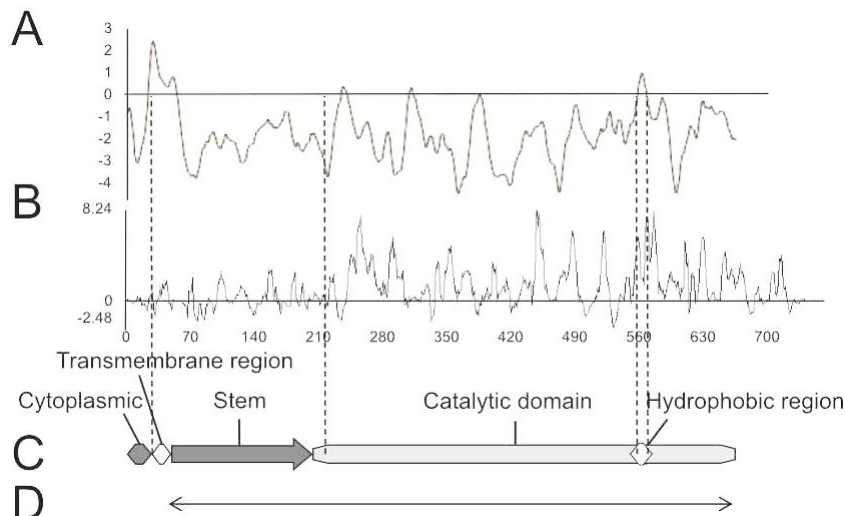


Figure 3: SDS-PAGE and western-blot analysis of recombinant Bmt1p production. **A-** The western-blotting analysis of culture supernatants using the anti-*c-myc* antibody permitted to detect positive clones in the X-33 *Pichia pastoris* strain. Aliquots obtained at different times

of induction up to 72h did not permit to observe any increase of Bmt1p production. Similar levels of expression were obtained with *P. pastoris* strains KM71H and SMD1168H. **B-** Culture supernatants or purified Bmt1p corresponding to the untagged protein were detected either with Coomassie blue (CB) or by western-blotting using the anti-Bmt1p antibody (Ab).

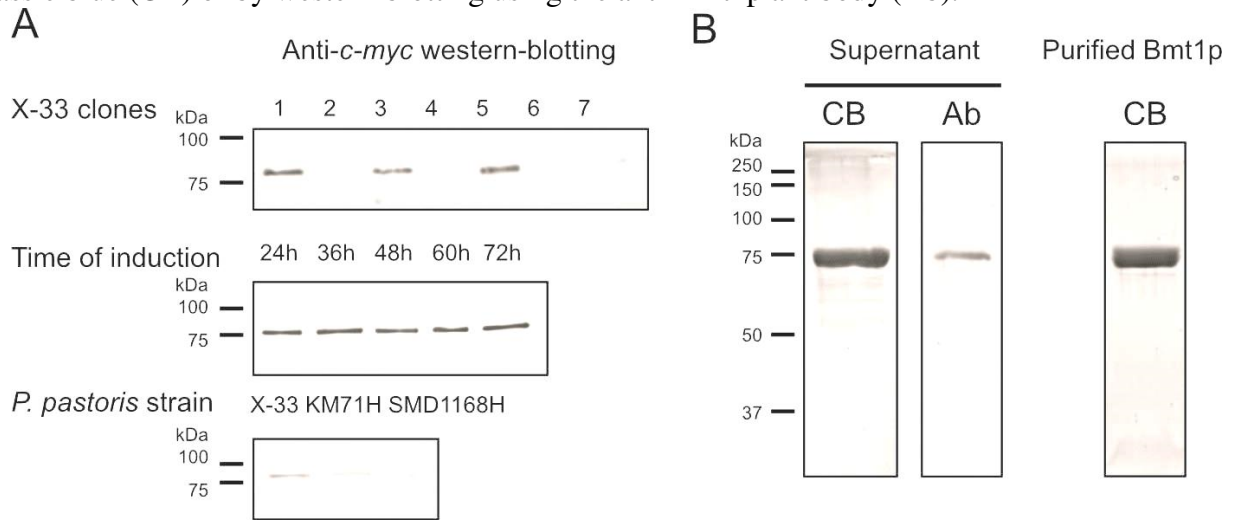


Figure 4: Bmt1p detergent requirement for monomerization. Different detergents were added into the supernatants after the end of cultures obtained in the presence of 0.1% Chaps during induction. Two concentrations were assayed: 20 % above their respective CMC, or at 0,5% (v/v). **A-** Size of predominant particles as determined by DLS analysis (by volume). **B-** Relative activities after 48h reaction time at 28°C using 100 μM oligoMan3 as acceptor substrate. **C-** DLS spectra in volume.

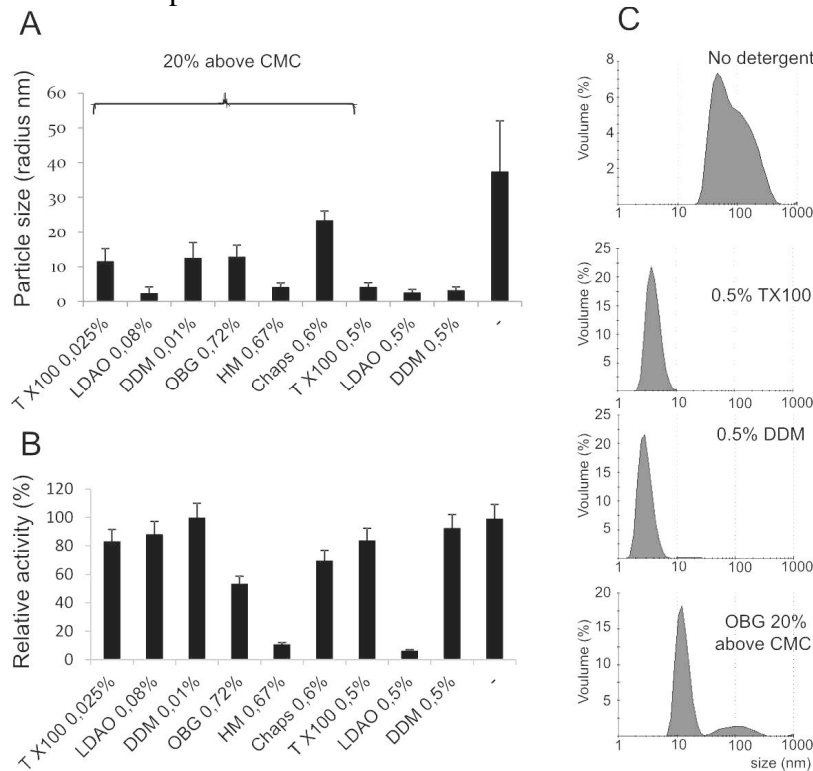


Figure 5: Structure of **A** semi-synthetic 2-aminopyridyl substrates generated by acetolysis of phosphopeptidomannans and **B** synthetic fluorescent mantylated α 1,2-mannosides (DP3M and DP4M). R: H or Man.

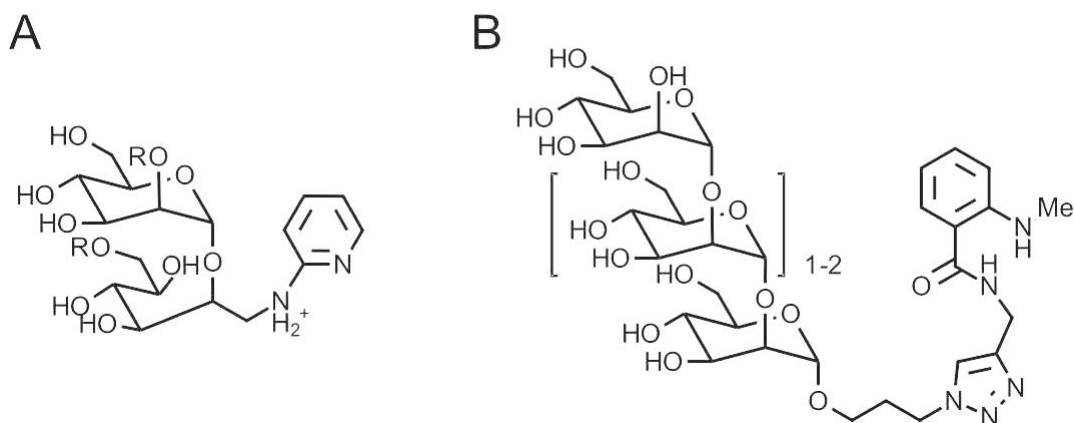


Figure 6: Enzymatic synthesis of two reaction products using Bmt1p (*P. pastoris* culture supernatant in tween 20/Triton X100) with mantyl-mannotetraose (DP4M) as substrate under standard assay conditions (48h, 28°C). **A** ^1H -NMR spectrum of synthetic DP4M, **B** NP-FL-HPLC analysis of acceptor substrate (DP4M) at T0h and reaction mixture at T48h before and after exo α -mannosidase treatment (ManAse). **C** MALDI-TOF MS analysis of acceptor substrate (DP4M) and reaction products DP5M and DP6M. Spectra display $[\text{M}+\text{Na}]^+$ adducts.

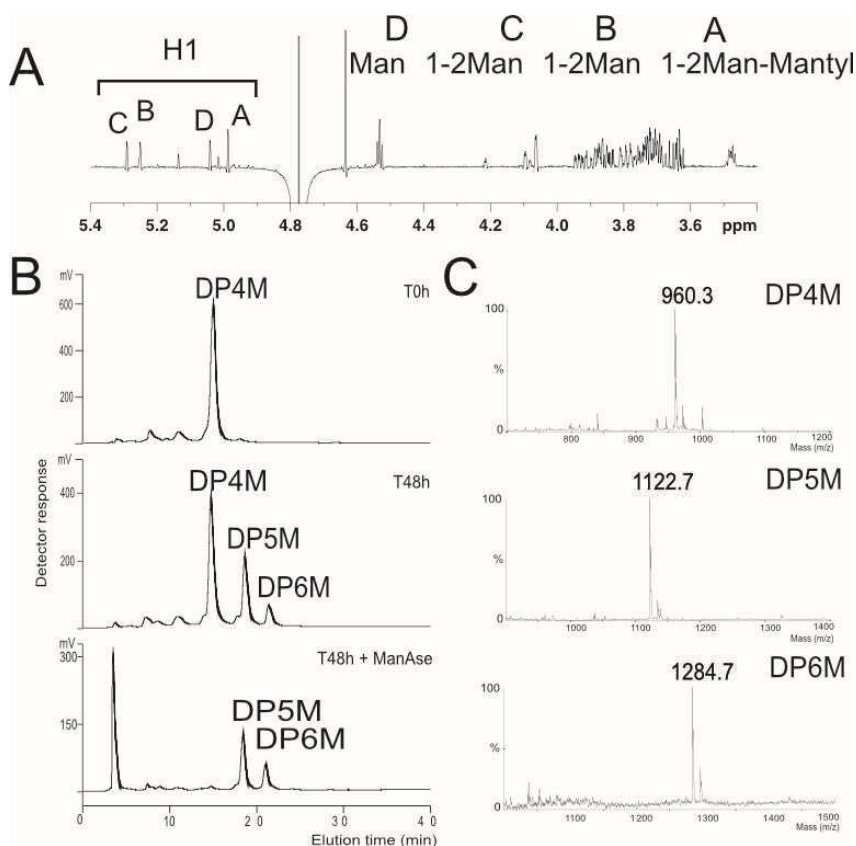


Figure 7: NMR analysis of the purified reaction product DP5M. **A** ^1H NMR spectrum of DP5M mantylated glycan. **B** Extended parts of 120 ms-TOCSY spectrum of DP5M mantylated glycan. **C** MALDI-TOF MS spectra of DP4M, DP5M, and DP6M.

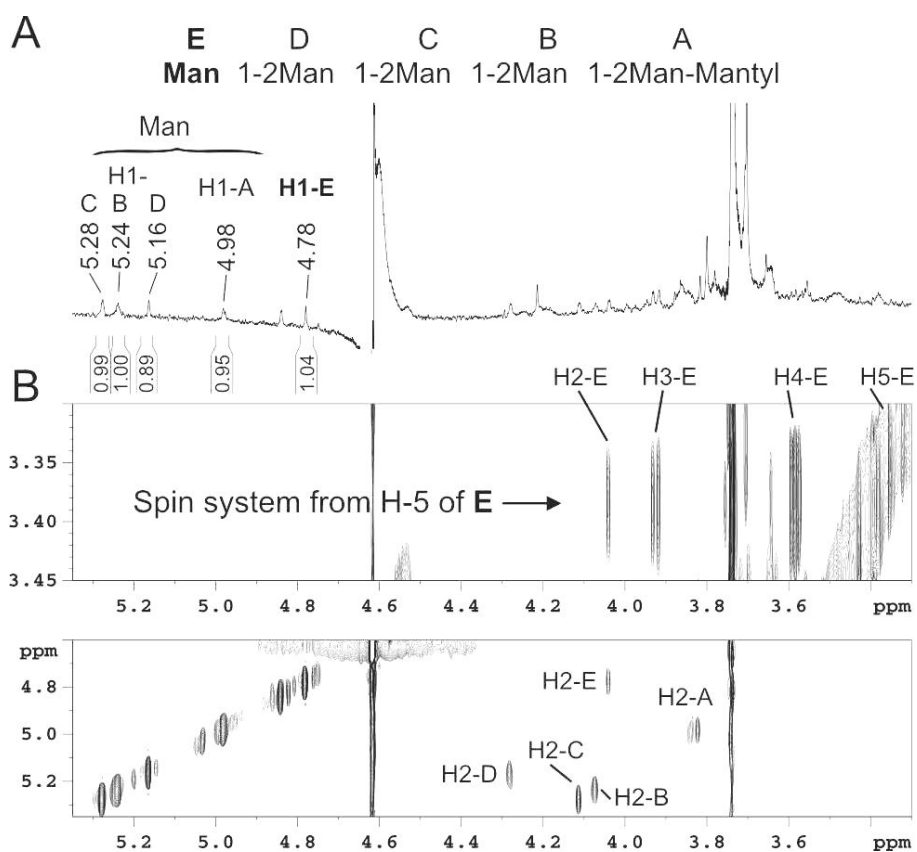
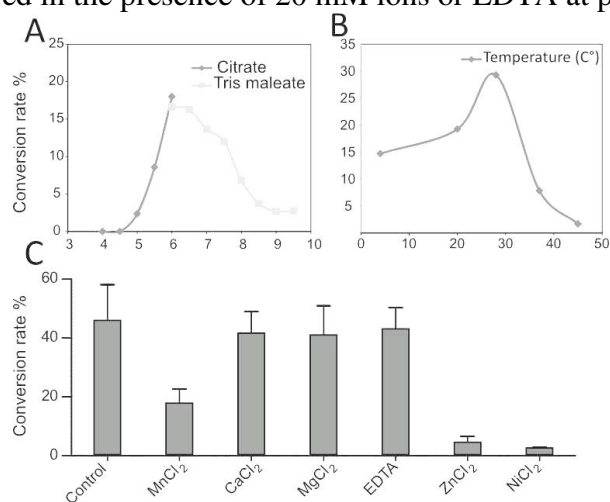


Figure 8: Influence of reaction parameters on Bmt1p activity on DP4M substrate in standard condition (48h). The activities were quantified by NP-FL-HPLC. Substrate transformation was quantified as percent of sum of fluorescent intensities of DP+1 and DP+2 products compared to total fluorescence. **A**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



TABLE

Table 1: Conversion rates of mantylated and 2-aminopyridyl oligomannosides in β -Man capped mannosides by Bmt1p in optimal conditions (48h at 28°C). Substrates and enzyme activity products were detected by normal phase HPLC coupled to a fluorescence detector (NP-FL-HPLC); RT: retention times of reaction products. Residual substrate (S) and products formed (DP+1) and (DP+2) were quantified as percent of the sum of fluorescent compounds areas. % activity corresponds to the % of converted acceptor substrates. Each value is representative from three experiments. 'Sbst' stands for substrate, 'My' for mantyl and 'AP' for 2-aminopyridine.

| Types | Sbst | Structures | % S | % DP + 1 | RT | % DP + 2 | RT | % Activity |
|---------------------------|--|--|------|----------|------|----------|------|-------------|
| Mantyl derivatives | DP3 | [Ma1-2] ₂ Ma1-My | 55.4 | 28.9 | 15 | 15.7 | 18.4 | 44.6 |
| | DP4 | [Ma1-2] ₃ Ma1-My | 50 | 33.3 | 18.3 | 16.7 | 20.9 | 50 |
| | DP2_{CA} | Ma1-2 Ma1-AP | 99.4 | 0.26 | 15 | 0.33 | 17.1 | 0.59 |
| | DP3 | [Ma1-2] ₂ Ma1-AP | 82.5 | 10.2 | 19.7 | 7.3 | 22.2 | 17.5 |
| | DP4_{SC} | Ma1-3 [Ma1-2] ₂ Ma1-AP | 91.6 | 6.9 | 23.3 | 0.8 | 25.8 | 7.7 |
| | DP4α_{CA} | [Ma1-2] ₃ Ma1-AP | 76.7 | 11.9 | 23.2 | 9.6 | 25.7 | 21.5 |
| | DP4 β_{CA} | M β 1-2 [M β 1-2] ₂ Ma1-AP | 100 | 0 | - | 0 | - | 0 |
| 2AP-derivatives | DP5_{SC} | Ma1-2 Ma1-6 ↓ [Ma1-2] ₂ Ma1-AP | 97.3 | 2.6 | 26.8 | 0 | - | 2.6 |
| | DP5_{CA} | Ma1-3 [Ma1-2] ₃ Ma1-AP | 98.4 | 1.6 | 27.9 | 0 | - | 1.6 |
| | DP6_{SC} | Ma1-2 Ma1-6 ↓ Ma1-3 [Ma1-2] ₂ Ma1-AP | 100 | 0 | - | 0 | - | 0 |
| | DP6_{CA} | Ma1-2 Ma1-3 [Ma1-2] ₃ Ma1-AP | 96.4 | 3.6 | 27.9 | 0 | - | 3.6 |
| | DP7_{SC} | Ma1-3 Ma1-2 Ma1-6 ↓ Ma1-3 [Ma1-2] ₂ Ma1-AP | 98.3 | 1.2 | 30 | 0.5 | 31.5 | 1.7 |
| | DP8_{SC} | Ma1-3 [Ma1-2] ₂ Ma1-6 ↓ Ma1-3 [Ma1-2] ₂ Ma1-AP | 96 | 2.4 | 30 | 1.6 | 31.1 | 4 |

Candida albicans β -1,2 mannosyl transferase Bmt3: preparation and evaluation of a $\beta(1,2),\alpha(1,2)$ - tetramannosyl fluorescent substrate

Laurent Cattiaux^{a,b,c}, Anaïs Mée^{a,b,c}, Marilyne Pourcelot^{a,b,c}, Ghenima Sfihi-Loualia^d, Thomas Hurtaux^d, Emmanuel Maes^d, Chantal Fradin^e, Daniel Poulain^{e,f}, Emeline Fabre^d, Florence Delplace^d, Yann Guérardel^d, Jean-Maurice Mallet^{a,b,c} *1

^a : École Normale Supérieure-PSL Research University, Département de Chimie, 24, rue Lhomond, 75005 Paris, France.

^b : Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, LBM, 4 place Jussieu, F-75005, Paris, France.

^c : CNRS, UMR 7203 LBM, F-75005, Paris, France ^d Univ.Lille, CNRS, UMR 8576, UGSF, Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, F 59000 Lille, France ; ^e: Univ. Lille ; ^f: Inserm, LIRIC - U995, F-59 000 Lille, France

ARTICLE INFO

ABSTRACT

Article history We describe for the first time the chemical synthesis of a tetramannoside, containing both Received $\alpha(1\rightarrow 2)$ and $\beta(1\rightarrow 2)$ linkages. Dodecylthio (lauryl) glycosides were prepared from odorless Received in revised form docecyl thiol and used as donors for the glycosylation steps. This tetramannoside, coupled to Accepted a mantyl group, and revealed to be a perfect substrate of β -mannosyltransferase Bmt3,

Available online confirming the proposed specificity and allowing the preparation of a pentamannoside sequence (β Man (1,2) β Man (1,2) α Man (1,2) α Man (1,2) α Man) usable as a novel substrate for further elongation studies.

Keywords:

Glycosylation,
Lauryl glycoside,
beta mannosides,
Mannosyl transferases,

2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

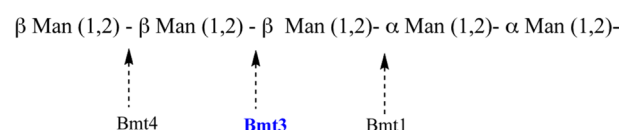
FI
uorescent
substrate
Mantyl

unclear. A family of nine genes (BMT) encoding β mannosyltransferases (Bmt) was identified in this yeast using a mutant phenotypic approach.² Several of these Bmts were predicted to be involved in the β -Mans biosynthesis of N-glycans and PLM^{2,3}. Recently, the activity and specificity of Bmt1 were characterized using a recombinant enzyme form. Bmt1 was thus evidenced to be responsible for the initiation of the β -Mans onto the

Figure 1: Bmts predicted roles

In order to characterize the roles of β -mannosyl transferases, in particular their substrates requirement and their kinetics, fluorescently tagged synthetic oligomannosides are desirable. We recently published our work on Bmt1^{4,5} using mantyl tagged $\alpha(1,2)$ oligomannosides as valuable substrates. In order to

¹ Corresponding author: Tel 33 1 44 32 33 90; Email address: Jean-Maurice.Mallet@ens.fr



1. Introduction

Candida albicans is a human fungal pathogen acid-stable moiety of polymannosylated N-involved in severe opportunistic infections. At the glycans^{4,5}. Now, the activity of Bmt3, the surface of its cell wall, it expresses $\beta(1,2)$ -enzyme presumably involved in the oligomannosides (β -Mans) that are critical for the elongation of N-glycans β -Mans, need to be yeast virulence mechanisms¹. These β -Mans investigated (fig 1).

substitute terminal α -Man residues of several glycoconjugates, including polymannosylated N-

linked glycans and a family of *Candida*-specific glycolipids, the phospholipomannans (PLM). The structure of these mannoconjugates has been extensively studied over the last years, but their building up is still

explore the activity of the second enzyme Bmt3, a (1,2) tetramannoside with a β unit at the non-reducing end was selected as a convenient mimic of its natural substrate (Fig 2). *No synthetic work on such mix α,β oligomannoside has been reported in the literature*

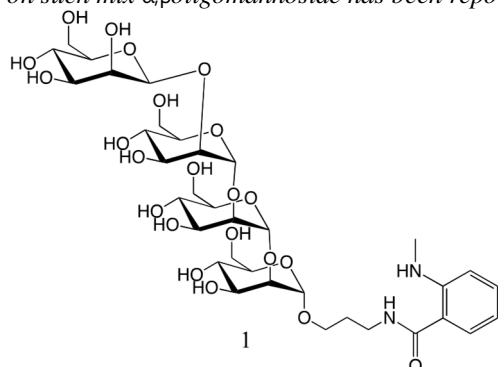


Figure 2: β Man (1,2) α Man (1,2) α Man (1,2) α Man target molecule

Results

The synthesis of 1 relies on two carbohydrate blocks (figure 3): an α -mannosyl donor (2), equipped with a lauryl thio leaving group and a similar β -glucopyranosyl donor (3). Azido propanol (4) was selected as a linker and methyl isatoic anhydride (5) as the mantyl fluorophore precursor. Mantyl group is a "discreet" fluorophore, it is small, polar and uncharged at pH 7 and should not interfere with the enzymatic process. It has been proved to be efficient in Bmt1 work. (Excitation 334 nm, emission 437 nm).

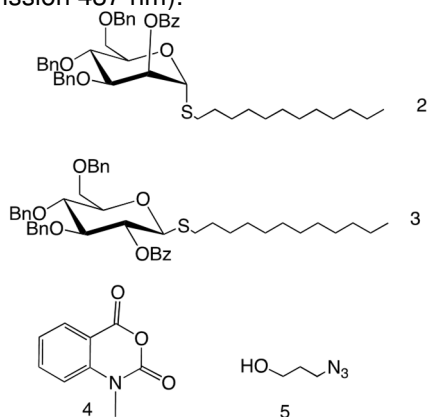
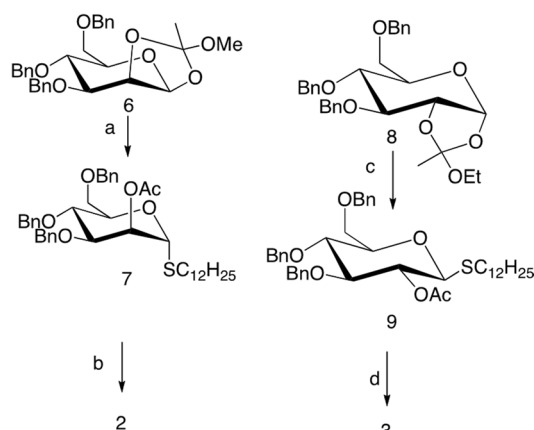


Figure 3: starting blocks

Lauryl thiol is odorless and a convenient alternative to ethyl thiol, giving reactive thioglycoside donors (compare to aryl thio). Although lauryl thioglycosides are already described (mainly as detergents) they were not used extensively as glycosyl donors ⁶.

For the construction of the β -mannosyl group, we selected a multi step sequence: introduction of a clean β glucopyranosyl linkage (help by a participating group in position 2) and a C-2 inversion though an oxidation / reduction sequence. Although they are efficient methods for a direct β -mannosylation ⁷, the selected method is reliable and easier on large scale. We used both strategies in the past ⁸ and we observed in many cases that *gluco/manno* isomers (from the ox/red strategy) are easier to separate than α / β mannosides pair (in sulfoxide method).



Scheme 1: Reagent and conditions: a) 1) AcOH; 2) 1-dodecanethiol, $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}$, toluene (73% two steps). b) 1) MeONa, MeOH 2) BzCl, Et_3N , DMAP, CH_2Cl_2 (55% two steps). c) 1) AcOH 2) 1-dodecanethiol, $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}$, toluene (36% two steps) d) 1) MeOH, Na 2) BzCl, Et_3N , DMAP, CH_2Cl_2 (78% two steps)

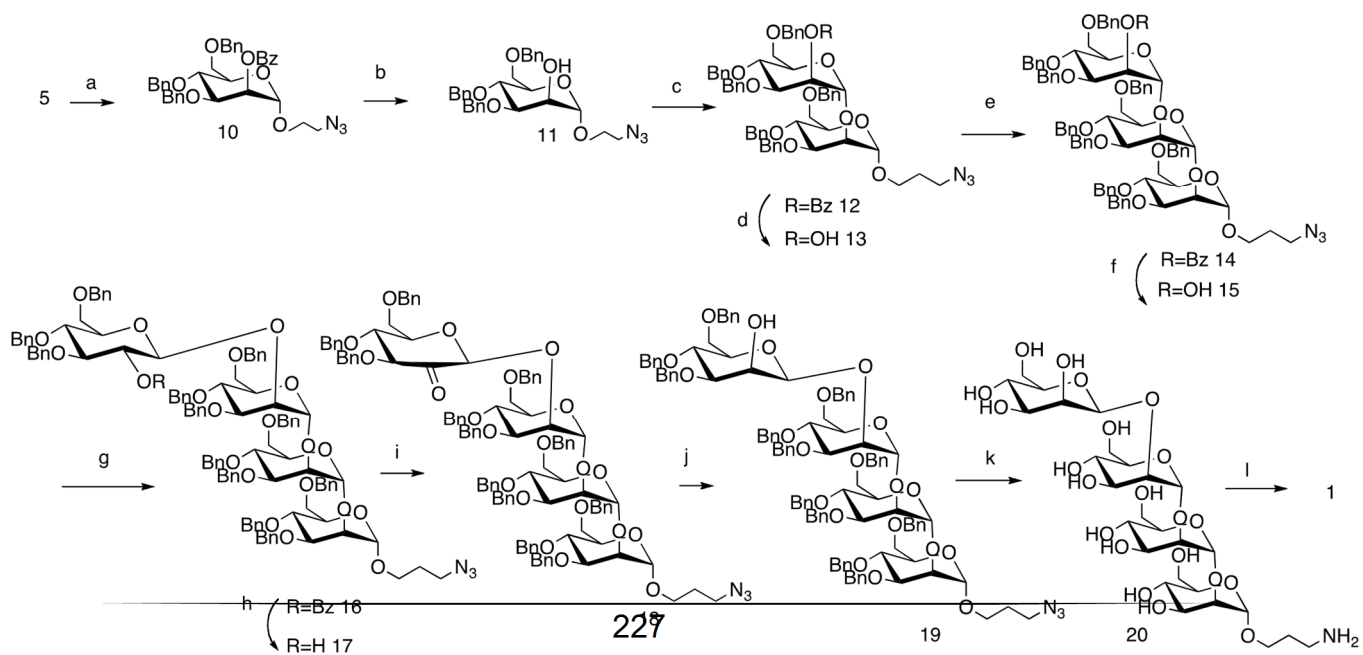
Monosaccharide preparation (scheme 1) are straightforward starting from the known orthoesters *manno* 6⁹ and *gluco* 9¹⁰. To avoid the use of mercury salts generally used in orthoester thiolysis, 1,2-diacetates were prepared first, and then reacted with lauryl thiol. Acetates at position 2 were replaced by benzoate to give the two glycosyl donors 2 and 3. These blocks in hand, glycosylation/debenzoylation sequences were repeated unevenly using NIS/TfOH then MeONa/MeOH (scheme 2). Final epimerization of the *gluco* derivative 17 was achieved in two steps: Dess-Martin periodinane oxidation to give the ketone (18) and NaBH_4 reduction to give the manno epimer (19) as the only isolated product. Hydrogenolysis of compound 19 (to remove the benzyl protected groups and reduce of azido group) was followed by a nitrogen acylation with methylisatoic anhydride to give the final tetramannoside 1. (NMR table 1)

Table 1: NMR data of the tetramannoside 1 : ^1H and ^{13}C chemical shifts (ppm)- saccharides signals

| Man units | H1 C1 | H2 C2 | H3 C3 | H4 C4 | H5 C5 | H6-6' C6 |
|------------|---------------|--------------|---------------|--------------|--------------|--------------|
| A α | 5.07 99.2 | 3.92 80 | 3.74 74.4 | ~ 3.66 68 | ~ 3.65 74 | ~ 3.80 62 |
| B α | 5.25 101.6 | 4.11 79.7 | 3.95 71.11 | ~ 3.66 68 | ~ 3.65 74 | ~ 3.80 62 |
| C α | 5.16 101.1 | 4.28 78.2 | 3.84 70.8 | ~ 3.66 68 | ~ 3.65 74 | ~ 3.80 62 |
| D β | 4.78 99.6 | 4.04 71.8 | 3.92 71.11 | 3.56 68 | 3.38 77.3 | ~ 3.80 62 |

Enzymatic evaluation

m/z 1041.2). An *exo* α -mannosidase treatment of this



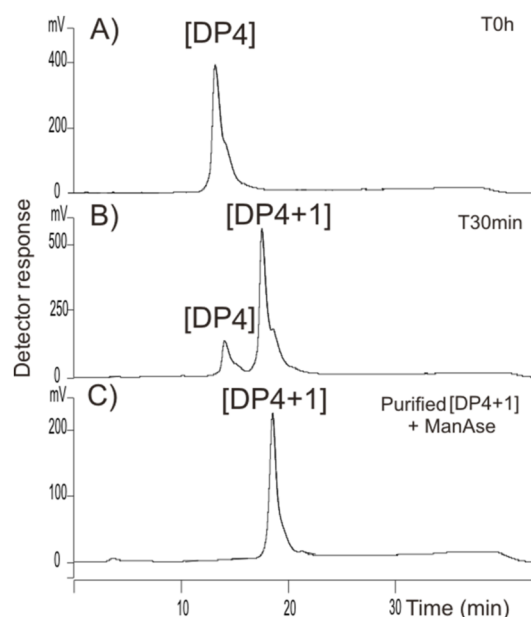
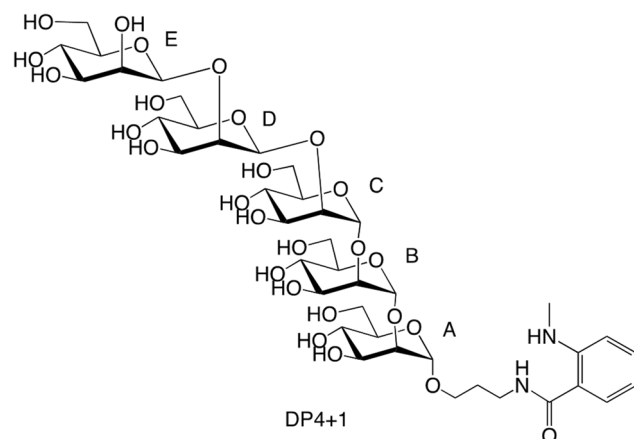


Figure 5: Proposed structure of the enzymatic product DP4+1

Figure 4: NP-FL-HPLC analysis of incubation mixture of recombinant Bmt3p with mantyl-mannotetraose 1 [DP4] as substrate under standard assay conditions at 28°C. (A) 0 h ; (B) 30 min. (C) NP-FL-HPLC profile of digestion mixture of purified [DP4+1] with an α -mannosidase (ManAse), showing its resistant behavior.

The synthetic mantyl-mannotetraose DP4 1 ($[M + Na]^+$ at m/z 879.4) was used as acceptor substrate in order to study the enzymatic properties of Bmt3p. The presumed function of this enzyme is to add a β -Man residue onto α 1,2 oligomannosides capped with a non-reducing terminal β -1,2 Man unit. A recombinant soluble enzyme was produced in *Pichia pastoris*¹¹ and enzymatic evaluation was performed using GDP-Man as mannosyl units donor. The reaction products were followed by normal-phase HPLC coupled to a fluorescence detector (NP-FL-HPLC). Chromatographic profile (Fig 4) of the reaction mixture after 30 min incubation time showed the appearance of a single reaction product, identified by mass spectrometry as a mantylated pentasaccharide [DP4+1] ($[M + Na]^+$ at compound after its purification had no effect, suggesting the β configuration of the Man added.

Scheme 2:
 Reagent and conditions: a) 2, NIS, TfOH, 4 Å molecular sieves, CH₂Cl₂, 85%.
 b) MeONa, MeOH, 79% .
 c) 2, NIS, TfOH, 4 Å molecular sieves, CH₂Cl₂, 55%.
 d) MeONa, MeOH, 79% . e) 2, NIS, TfOH, 4 Å molecular sieves, CH₂Cl₂ 61%. f) MeONa, MeOH, 76%. g) 3, NIS, TfOH, 4 Å molecular sieves CH₂Cl₂ 68% . h) MeONa, MeOH. i) Dess-martin periodinate, CH₂Cl₂. j) NaBH₄, MeOH, CH₂Cl₂, RT, 12h, 67 % (three steps). k) H₂, Pd/C, aq HCl, MeOH, 100%. l) methylisatoic anhydride, DMF, RT, 12h, 90%



This experiment evidenced that the new mantyl-tagged tetramannoside 1 is a convenient substrate of the β -mannosyl transferase Bmt3p. The further elongation of the β -mannoside chains tentatively done by Bmt4 is presently under study. **Conclusion**
 We have described for the first time the chemical synthesis of a tetra mannoside, containing both α (1,2) and β (1,2) bounds. This tetramannoside proved to be a perfect substrate of Bmt3 enzyme¹¹, confirming the proposed specificity of the enzyme. The resulting pentamannoside will be useful as a novel substrate for elongation studies through other transferases such as Bmt4.

Acknowledgements

This work has been supported by the Agence Nationale de la Recherche (ANR MIE CaBMT), by a grant from European Community and by the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (to G.S-L and T.H).

Experimental

Mannosyl transferase enzymatic assay - The culture supernatant of an engineered *Pichia pastoris* strain containing about 35 mg L⁻¹ Bmt3p, 0.05% Tween 20 and 0.5% Triton X-100, was used as enzyme source. The details of genetic construction and culture conditions are described elsewhere¹¹. The assay mixture containing 2 µl of supernatant, 0.06 mM mantyl-tetramannoside (1), 20 mM GDP-Man donor, 50 mM sodium citrate buffer pH 6.5, 20 mM CaCl₂, 0.3% Triton X-100, in a total volume of 25 µl, was incubated for 30 min at 28°C (standard assay). The reaction was stopped by heating the mixture for 5 min at 95°C. After removal of the denatured protein by centrifugation, reaction mixture was analyzed by normal phase HPLC as described below.

Treatment with α-mannosidases - The α-mannosidases treatment of the collected and purified [DP4+1] reaction product was carried out in 20 mM sodium acetate buffer pH 5, containing 2 mM ZnCl₂ and 0.15 units of α-mannosidase from Jack Bean (Prozyme) at 37°C for 24 h. After centrifugation, resulting reaction mixture was analyzed by HPLC.

Analysis of fluorescent substrate and enzyme reaction products by HPLC - An Amide-80 (TSK gel) column (4.6 mm x 25 cm) was used for HPLC analysis, with an elution in 50 min at a flow rate of 0.8 ml min⁻¹, using a gradient of two eluents: A (10% acetonitrile, 3% acetic acid, triethylamine pH 7.3 – acetonitrile) (25 :75 v/v) and B (same solutions, 50 :50 v/v). Fluorimetric detection of the mantyl-oligomannosides was conducted with excitation and emission wavelengths at 334 and 437 nm, respectively.

NMR analysis of tetramannoside 1 – NMR experiments were performed at 300 K on a Bruker Advance 400 spectrometer equipped with a 5 mm TBI (Triple resonance Broad-band Inverse probehead). Samples were analysed in D₂O and chemical shifts expressed in ppm related to the methyl signal of acetone as internal standard (δ¹H 2.225 and δ¹³C 31.55 ppm). The COSY and ¹H-¹³C HSQC pulse programs used were extracted from the Bruker pulse programs library, but pulses and delays were optimized for each experiment. **Chemical synthesis**

All compounds were homogeneous by TLC analysis and had spectral properties consistent with their assigned structures. Compound purity was checked by TLC on Silica gel 60 F254 (E. Merck) with detection by charring with sulfuric acid. Column chromatography was performed on Silica gel 60 (E. Merck). NMR spectra were recorded with Brüker 250, 400 MHz instruments. CH stand for cyclohexane and C7, C8, C9 refers to propyl aglycone.

dodecyl 3,4,6-tri-O-benzyl-2-O-acetyl 1-thio α-Dmannopyranoside (7) - Compound 6 (6.00 g, 11.80 mmol, 1 eq) was dissolved in acetic acid (56 mL) and stirred at room temperature for 30min, and concentrated under reduced pressure and the residue was dried under P₂O₅ for 18h. This residue was solubilized in toluene (20 mL) then 1-dodecanethiol (5.60mL, 23.6mmol, 2 eq) and BF₃.OEt (0.8mL, 5.90mmol, 0.5eq) was added. The reaction mixture was stirred for 2h at room temperature, cooled with ice-water and neutralized with aq NaHCO₃ solution. The organic layer was washed with water and the aqueous layer with CH₂Cl₂. The organic layers were combined, dried over MgSO₄, filtered and concentrated under vacuum. The crude product was purified over SiO₂ using CH-EtOAc (gradient from 100 % CH to 95/5) as eluent to give 7 (5.89 g, 73%). Rf: 0.56 (CH/EtOAc 8: 2). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.34 – 7.03 (m, 15H, H_{Ar}),

5.37 (app. s, 1H, H₂), 5.22 (app. s, 1H, H₁), 4.78 (d, J = 10.7 Hz, 1H, CHPh), 4.61 (d, J = 11.6 Hz, 1H, CHPh), 4.60 (d, J = 11.6 Hz, 1H, CHPh), 4.47 – 4.35 (m, 3H, CHPh, CH₂Ph), 4.13 – 4.04 (m, 1H, H₅), 3.89 – 3.82 (m, 2H, H₃, H₄), 3.77 (dd, J = 10.7, 4.1 Hz, 1H, H_{6a}), 3.60 (dd, J = 10.8, 2.0 Hz, 1H, H_{6b}), 2.58 – 2.43 (m, 2H, SCH₂-), 2.08 (s, 3H, CH₃ Ac), 1.60 – 1.45 (m, 2H, SCH₂CH₂-), 1.17 (br s, 18H, 9 × CH₂ Lauryl), 0.80 (t, J = 6.5 Hz, 3H, CH₃ Lauryl). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 170.51 (C=O

Ac), 138.36 (C_{q Ar}), 138.16 (C_{q Ar}), 137.71 (C_{q Ar}), 128.51 – 127.62 (C_{Ar}), 82.86 (C₁), 78.67 (C₃ or C₄), 75.28 (CH₂Ph), 74.52 (C₃ or C₄), 73.44 (CH₂Ph), 71.89 (CH₂Ph), 71.77 (C₅), 70.57 (C₂), 68.76 (C₆), 31.59 (SCH₂-), 29.74 – 26.98 (9 × CH₂ Lauryl), 22.80 (CH₂ Lauryl), 21.27 (CH₃ Ac), 14.25 (CH₃ Lauryl).

dodecyl 3,4,6-tri-O-benzyl-2-O-benzoyl 1-thio α -Dmannopyranoside (2) - A solution of **7** (5.89g, 8.67 mmol, 1eq) in CH₃ONa 0.1 M in CH₃OH (150 mL) was stirred at room temperature for 12 h then neutralized with Amberlite IR 120 (H+) resin and concentrated under vacuum. The residue was dissolved in CH₂Cl₂ (30mL) and Et₃N (7.87mL, 56.00 mmol, 7eq), BzCl (1.85mL, 16 mmol, 2eq) and DMAP (195mg, 1.60 mmol, 0.2eq) were added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 2 h and concentrated under reduced pressure. The residue was diluted in cyclohexane, filtered and purified over SiO₂ using CH-EtOAc-Toluene (90/5/5) as eluent to give **2** (3.147 g, 55%). R_f : 0.46 (CH/EtOAc 8:2). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.00 (d, J = 7.8 Hz,

2H, H_{Ar} Bz), 7.56 – 6.91 (m, 18H, H_{Ar}), 5.64 (app. s, 1H, H₂), 5.34 (app. s, 1H, H₁), 4.80 (d, J = 10.7 Hz, 1H, CHPh), 4.70 (d, J = 10.8 Hz, 1H, CHPh), 4.66 (d, J = 11.2 Hz, 1H, CHPh), 4.53 – 4.40 (m, 3H, CHPh, CH₂Ph), 4.19 – 4.11 (m, 1H, H₅), 4.06 (t, J = 9.3 Hz, 1H, H₄), 3.95 (dd, J = 9.3, 3.0 Hz, 1H, H₃), 3.90 – 3.82 (m, 1H, H_{6a}), 3.68 (dd, J = 10.8, 1.8 Hz, 1H, H_{6b}), 2.79 – 2.27 (m, 2H, SCH₂-), 1.62 – 1.42 (m, 2H, SCH₂CH₂-), 1.17 (br s, 18H, 9 \times CH₂ Lauryl), 0.80 (t, J = 6.6 Hz, 3H, CH₃ Lauryl). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 165.69 (C=O), 138.41 (C_q Ar), 138.38

(C_q Ar), 137.77 (C_q Ar), 133.21 (C_{Ar}), 130.64 – 127.56 (C_{Ar}), 83.04 (C₁), 78.74 (C₃), 75.38 (CH₂Ph), 74.53 (C₄), 73.44 (CH₂Ph), 71.97 (C₅), 71.63 (CH₂Ph), 70.84 (C₂), 69.01 (C₆), 31.99 (SCH₂), 31.76 (SCH₂CH₂-), 29.74 – 28.87 (9 \times CH₂ Lauryl), 26.97 (CH₂ Lauryl), 14.23 (CH₃ Lauryl).

3-azidopropyl 3,4,6-tri-O-benzyl-2-O-benzoyl α -Dmannopyranoside (10) - TfOH (93 μ L, 1.0 mmol, 0.5eq) was added to a cooled (0°C) mixture of **2** (1850mg), 3azidopropanol (760mg, 3eq), NIS (1.40g, 2.5eq) and molecular sieves 4 Å (2.0g) in CH₂Cl₂ (20 mL). The reaction mixture was stirred for 5 min (TLC monitoring), diluted with CH₂Cl₂ and filtered through Celite. The filtrate was washed with aqueous sodium thiosulfate and saturated aqueous NaHCO₃. The organic layer was dried over MgSO₄, filtered and concentrated under vacuum. The residue was chromatographed using CH-EtOAc (gradient from 100 % CH to 95/5) as eluent to give **10** (1.13g, 85%). R_f : 0.12 (CH/EtOAc 9:1). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.06 -7.06 (m, 20 H, H_{Ar}), 5.52 (t, J = 1.9 Hz, 1H, H₂), 4.88 (d, J = 1.9 Hz, 1H, H₁), 4.80 (d, J = 10.8 Hz, 1H, CHPh), 4.72 (d, J = 11.3 Hz, 1H, CHPh), 4.65 (d, J = 12.0 Hz, 1H, CHPh), 4.51 (d, J = 10.1 Hz, 1H, CHPh), 4.47 (m, 2H, 2 \times CHPh), 4.06 – 3.95 (m, 2H, H₃, H₄), 3.75 (m, 4H, H₅, H₆, H_{7a}) 3.45 (dt, J = 9.9, 6.0 Hz, 1H, H_{7b}), 3.30 (t, J = 6.7 Hz, 2H, H₉), 1.79 (m, 2H, H₈). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 165.90 (C=O Bz), 138.57 (C_q Ar), 138.46 (C_q Ar),

138.11(C_q Ar), 133.30 (C_{Ar}), 130.11(C_{Ar}), 128.54 (C_{Ar}), 128.48 (C_{Ar}), 128.45 (C_{Ar}), 128.19 (C_{Ar}), 127.82 (C_{Ar}), 127.79 (C_{Ar}), 127.66 (C_{Ar}), 98.04 (C₁), 78.29 (C₃ or C₄), 75.48 (CH₂Ph), 74.43 (C₃ or C₄), 73.61 (CH₂Ph), 71.99 (C₅), 71.75 (CH₂Ph), 69.21 (C₂), 69.16 (C₆), 64.79 (C₇), 48.50 (C₉), 28.99 (C₈).

3-azidopropyl 3,4,6-tri-O-benzyl α -Dmannopyranoside (11) - A solution of **10** (1.13g, 1.77 mmol, 1eq) and CH₃ONa (0.1 M) in CH₃OH (35 mL) was stirred at room temperature for 12 h then neutralized with Amberlite IR 120 (H+) resin, filtered and the filtrate was concentrated under vacuum. The crude product was purified over SiO₂ using CH-EtOAc (gradient from 95/5 CH to 80/20) as eluent to give **11** (748 mg, 79%). R_f : 0.10 (CH/EtOAc 8 : 2). MS ESI-HRMS m/z [M+Na]⁺ calcd for

C₃₀H₃₅N₃NaO₈⁺ 556.2418, found 556.2407. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.39 – 7.13 (m, 15H, H_{Ar}), 4.89 (d, J = 1.7 Hz, 1H, H₁), 4.82 (d, J = 10.8 Hz, 1H, CHPh), 4.66 (m, 3H, 3 \times CHPh), 4.53 (d, J = 12.1 Hz, 1H, CHPh), 4.51(d, J = 10.8 Hz, 1H, CHPh), 4.02 (dd, J = 1.7, 2.8 Hz 1H, H₂),

3.87 – 3.67 (m, 6H, H₃, H₄, H₅, H₆, H_{7a}), 3.50 (dt, J = 10.0, 6.1 Hz, 1H, H_{7b}), 3.34 (m, 2H, H₉), 2.05 (br s, 1H, OH), 1.84 (m, 2H, H₈). ¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ 138.22

(C_q Ar), 138.15 (C_q Ar), 137.91 (C_q Ar), 128.49 (C_{Ar}), 128.34 (C_{Ar}), 127.96 (C_{Ar}), 127.89 (C_{Ar}), 127.84 (C_{Ar}), 127.68 (C_{Ar}), 127.58 (C_{Ar}), 99.35 (C₁), 80.09 (C₃ or C₄), 77.67 (CH₂Ph), 77.16 (C₃ or C₄), 75.14 (CH₂Ph), 74.22 (C₃ or C₄), 73.42 (CH₂Ph), 71.94 (CH₂Ph), 71.25 (C₅), 68.89 (C₆), 68.29 (C₂), 64.33 (C₇), 48.35 (C₉), 28.77 (C₈).

3-azidopropyl 3,4,6-tri-O-benzyl- 2-O-(3,4,6-tri-Obenzyl-2-O-benzoyl α -D-mannopyranosyl) α -Dmannopyranoside (12) - Compound **2** (1.34g, 1.82 mmol, 1.3eq) was glycosylated with **11** (748mg, 1.40 mmol, 1eq) in CH₂Cl₂ (40 mL) in the presence of NIS (815 mg, 3.50 mmol, 2.5eq), TfOH (63 μ L, 0.70 mmol, 0.5eq) and 4 Å molecular sieves (1.5g) at 0°C. The mixture was stirred for 5 min (TLC monitoring), diluted with CH₂Cl₂ and filtered through Celite. The filtrate was washed with aqueous sodium thiosulfate and saturated aqueous NaHCO₃. The organic layer was dried over MgSO₄, filtered and concentrated under vacuum. The residue was chromatographed using CH / THF, 85:15 as eluent to give **12** (861mg, 61%). R_f: 0.42 (CH/EtOAc 8:2). MS ESI-

HRMS m/z [M+Na]⁺ calcd for C₆₄H₆₇N₃NaO₁₂⁺ 1092.4617, found 1092.4596. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.11 – 7.87 (m, 2H, H_{Ar} Bz), 7.60 – 6.98 (m, 33H, H_{Ar}),

5.69 (t, $J = 2.5$ Hz, 1H, H₂), 5.11 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H, H₁), 4.82 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H, H₁), 4.81 – 4.34 (m, 12H, 6 × CH₂Ph), 4.06 – 4.00 (m, 1H, H₃), 3.99 – 3.86 (m, 2H, H₂, H₄), 3.85 – 3.55 (m, 9H, H₃, H₄, H₅, H₅, H₆, H₆, H_{7a}), 3.25 (dt, $J = 9.9, 6.0$ Hz, 1H, H_{7b}), 3.18 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H, H₉), 1.67 (m, 2H, H₈). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 165.47 (C=O, Bz), 138.54 (C_q Ar), 138.46 (C_q Ar), 138.44

(C_q Ar), 138.41 (C_q Ar), 138.30 (C_q Ar), 138.08 (C_q Ar), 133.08 (C_{Ar}), 130.08 (C_q Ar), 129.98 (C_{Ar}), 128.43 – 127.46 (C_{Ar}), 99.69 (C_{1'}), 98.80 (C₁), 79.57 (C₃ or C₄), 78.16 (C₃), 75.36 (C₃ or C₄), 75.21 (CH₂Ph), 75.17 (CH₂Ph), 74.63 (C₅), 74.48 (C₄), 73.44 (CH₂Ph), 73.34 (CH₂Ph), 72.29 (CH₂Ph), 72.11 (C₂ or C₅), 72.07 (C₂ or C₅), 71.70 (CH₂Ph), 69.45 (C₆ or C_{6'}), 69.31 (C₆ or C_{6'}), 69.14 (C₂), 64.36 (C₇), 48.37 (C₉), 28.84 (C₈).

3-azidopropyl 3,4,6-tri-O-benzyl- 2-O-(3,4,6-tri-Obenzyl- α-D-mannopyranosyl) α-D-mannopyranoside (13) - A solution of **12** (1.68g, 1.57 mmol, 1eq) and CH₃ONa (0.1 M) in CH₃OH (50 mL) and THF (15mL) was stirred at room temperature for 12 h then neutralized with Amberlite IR 120 (H+) resin and concentrated under vacuum. The residue was purified over SiO₂ using CH₂Cl₂/EtOAc (gradient from 95/5 to 80/20) as eluent to give **13** (1.15 g, 76%). R_f: 0.26 (CH/EtOAc 8:2). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.44 – 6.98 (m, 30H, H_{Ar}), 5.10 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H, H₁), 4.87 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H, H₁), 4.85 – 4.40 (m, 12H, CHPh), 4.10 (dd, $J = 2.9, 1.7$ Hz, 1H, H₂), 3.99 – 3.84

(m, 2H, H₂, H₅ or H₅), 3.86 – 3.63 (m, 4H, H₃, H₃, H₄, H₄), 3.77 – 3.60 (m, 5H, H₆, H₆, H₅), 3.70 – 3.58 (m, 1H, H_{7a}), 3.30 – 3.21 (m, 1H, H_{7b}), 3.19 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H, H₉), 2.86 (br s, 1H, OH), 1.74 – 1.60 (m, 2H, H₈). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 138.60 (C_q Ar), 138.41 (C_q Ar), 138.35 (C_q Ar), 138.26 (C_q Ar), 138.23 (C_q Ar), 137.99 (C_q Ar), 128.52 (C_{Ar}), 128.42 (C_{Ar}), 128.38 (C_{Ar}), 128.35 (C_{Ar}), 128.05 (C_{Ar}), 127.96 (C_{Ar}), 127.93 (C_{Ar}), 127.92 (C_{Ar}), 127.84 (C_{Ar}), 127.69 (C_{Ar}), 127.65 (C_{Ar}), 127.50 (C_{Ar}), 127.46 (C_{Ar}), 101.18 (C_{1'}), 98.85 (C₁), 80.02 (C₃), 79.58 (C₃), 75.23 (CH₂Ph), 75.09 (CH₂Ph), 75.03

(C₂), 74.74 (C₄ or C₄), 74.46 (C₄ or C₄), 73.47 (CH₂Ph), 73.34 (CH₂Ph), 72.32 (CH₂Ph), 72.18 (CH₂Ph), 72.09 (C₅ or C₅), 71.58 (C₅ or C₅), 69.35 (C₆ or C₆), 69.28 (C₆ or C₆), 68.55 (C₂), 64.32 (C₇), 48.38 (C₉), 28.85 (C₈).

3-azidopropyl 3,4,6-tri-O-benzyl- 2-O-(3,4,6-tri-Obenzyl-2-O-(2-O-(3,4,6-tri-O-benzyl-2-O-benzoyl α-Dmannopyranosyl)) α-D-mannopyranosyl) α-D-mannopyranoside (14) -Compound **2** (1.03 g,, 1.2eq) was glycosylated with **13** (1.15 g, 1.19 mmol, 1eq) in CH₂Cl₂ (25mL) in the presence of NIS (590mg, 2eq), TfOH (21μL, 0.14 mmol, 0.5eq) and 4 Å molecular sieves (2g) at 0°C. The reaction mixture was stirred at room temperature for 5 min (TLC monitoring), diluted with CH₂Cl₂ and filtered over Celite, washed with aqueous sodium thiosulfate and saturated aqueous NaHCO₃, dried over MgSO₄, filtered and concentrated under vacuum. The residue was chromatographed using CH / EtOAc (gradient from 100 % CH to 95/5) as eluent to give **14** (1.21g, 68%). R_f: 0.53 (CH/EtOAc 8:2). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.24 – 8.07 (m, 2H, H_{Ar} Bz), 7.73 – 7.01 (m, 48H, H_{Ar}), 5.82 (app. s, 1H, H₂), 5.29 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H, H₁), 5.19 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H, H₁), 4.97 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H, H₁), 4.93 – 4.40 (m, 18H, 9 × CH₂Ph), 4.22 – 4.12 (m, 3H, H₄, H₂, H₃), 4.10 – 3.95 (m, 4H, H₂, H₃, H₅, H₅), 3.93 – 3.63 (m, 11H, H₃, H₄,

H₄, H₆, H₆, H₅, H_{7a}), 3.38 – 3.29 (m, 1H, H_{7b}), 3.28 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H, H₉), 1.63 (m, 2H, H₈). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 165.42 (C=O Bz), 138.53 – 138.07 (C_q Ar), 133.04 – 127.38 (C_{Ar}), 100.69 (C_{1'}), 99.46 (C_{1'}), 98.80 (C₁), 79.42 (C₃ and C₃), 78.01 (C₃), 75.59 – 74.38 (C₂, C₂, C₄, C₄, C₄, 3 × CH₂Ph), 73.28 (3 × CH₂Ph), 72.31 (CH₂Ph), 72.23 (C₅ and

C₅), 72.12 (CH₂Ph), 72.07 (C₅), 71.64 (CH₂Ph), 69.77 (C₆), 69.36 (C₆ and C₆), 69.04 (C₂), 64.26 (C₇), 48.31 (C₉), 28.78 (C₈).

3-azidopropyl 3,4,6-tri-O-benzyl- 2-O-(3,4,6-tri-Obenzyl-2-O-(2-O-(3,4,6-tri-O-benzyl- α-Dmannopyranosyl)) α-D-mannopyranosyl) α-D-mannopyranoside (15) - A solution of the compound **14** (269mg, 0.18 mmol, 1eq) and CH₃ONa (0.1 M) in CH₃OH (8 mL) and THF (2mL) was stirred at room temperature for 12 h then neutralized with Amberlite IR 120 (H+) resin, and concentrated under vacuum. The residue was purified over SiO₂ using cyclohexane-EtOAc. (gradient from 100% cyclohexane to 90/10) as eluent to give **15** (180 mg, 72%). R_f: 0.38 (CH/EtOAc 8:2). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.36 – 6.94 (m, 30H, H_{Ar}), 5.13 (s, 1H, H₁), 5.05 (s, 1H, H₁), 4.83 (s, 1H, H₁), 4.77 - 4.20 (m, 18H, CH₂Ph), 4.18 – 4.07 (m, 2H, H₂, H₂), 3.90 – 3.41 [m, 17H, 3.87 (H₂), 3.70 – 3.87 (H₃, H₃, H₃), 3.60 – 3.85

(H₄, H₄, H₄), 3.90-3.80 (H₅, H₅), 3.63 (H₅), 3.50 – 3.70 (H₆, H₆, H₆), 3.55 (H_{7a}), 3.17 (m, 1H, H_{7b}), 3.10 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H, H₉), 2.17 (s, 1H, OH), 1.64 – 1.55 (m, 2H, H₈). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 138.53 (C_q Ar), 138.51

(C_q Ar), 138.46 (C_q Ar), 138.45 (C_q Ar), 138.37 (C_q Ar),

138.28 (C_q Ar), 138.16 (C_q Ar), 138.05 (C_q Ar), 128.48 (C_{Ar}),

128.41 (C_{Ar}), 128.37 (C_{Ar}), 128.32 (C_{Ar}), 128.29 (C_{Ar}), 128.02 (C_{Ar}), 127.90 (C_{Ar}), 127.84 (C_{Ar}), 127.80 (C_{Ar}), 127.75 (C_{Ar}), 127.58 (C_{Ar}), 127.48 (C_{Ar}), 127.42 (C_{Ar}), 125.54 (C_{Ar}), 101.03 (C_{1'}), 100.88 (C_{1'}), 98.77 (C₁),

79.93, 79.36, 79.24 (C₃, C₃, C₃), 75.30, 75.11 (C₂, C₂),

75.18 (CH₂Ph), 75.06 (CH₂Ph), 75.00 (CH₂Ph), 74.94, 74.72, 74.29 (C₄, C₄, C=), 73.29 (3 × CH₂Ph), 72.33 (CH₂Ph), 72.08 (CH₂Ph), 71.86 (CH₂Ph), 72.21, 71.98,

71.60 (C₅, C₅, C₅), 69.71, 69.27, 68.90 (C₆, C₆, C₆), 68.54 (C₂), 64.28 (C₇), 48.34 (C₉), 28.81 (C₈).

dodecyl 3,4,6-tri-O-benzyl-2-O-acetyl 1-thio β -Dglucopyranoside (9) - 8 (2.00 g, 3.95 mmol) was dissolved in acetic acid (50 mL) and the solution was stirred at room temperature for 30min, concentrated under reduced pressure and the residue was dried under vacuum over P₂O₅ for 18h and solubilized in toluene (10 mL). To this solution were added 1-dodecanethiol (1.9mL, 7.90 mmol, 2eq) and BF₃.OEt (0.4mL, 1.97 mmol, 0.5eq). The reaction mixture was stirred for 2h at room temperature, cooled with ice-water and neutralized with NaHCO₃ solution. The organic layer was washed with water and the aqueous layer with CH₂Cl₂. The organic layers were combined, dried over MgSO₄, filtered and concentrated under vacuum. The residue was purified over SiO₂ using CH-EtOAc (gradient from 100 % CH to 95/5) as eluent to give **9** as a white solid. (0.95g, 36%). R_f: 0.68 (CH/EtOAc

8 : 2). MS ESI-HRMS m/z [M+Na]⁺ calcd for C₄₁H₅₆NaO₆S⁺ 699.3690, found 699.3687. ¹H NMR (300 MHz, Chloroform-d) δ 7.36 – 6.99 (m, 15H, H_{Ar}), 5.54 (d, *J* = 5.7 Hz, 1H, H₁), 5.06 – 4.85 (m, 1H, H₂), 4.78 – 4.23 (m, 6H, 3 \times CH₂Ph), 3.88 – 3.52 (m, 3H, H₃, H₄, H₆), 3.49 – 3.36 (m, 1H, H₅), 2.69 - 2.34 (m, 2H, SCH₂), 1.94 (s, 3H, CH₃ Ac), 1.90 (s, 2H, SCH₂CH₂), 1.63 – 1.41 (m, 18H, 9 \times CH₂ Lauryl), 0.86 - 0.75 (m, 3H, CH₃ Lauryl). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 170.08 (C=O Ac), 138.53

(C_{q Ar}), 138.23 (C_{q Ar}), 138.21 (C_{q Ar}), 138.13 (C_{q Ar}), 137.99 (C_{q Ar}), 137.95 (C_{q Ar}), 128.45 (C_{Ar}), 128.42 (C_{Ar}), 128.40 (C_{Ar}), 128.37 (C_{Ar}), 128.05 (C_{Ar}), 127.97 (C_{Ar}), 127.91 (C_{Ar}), 127.87 (C_{Ar}), 127.83 (C_{Ar}), 127.79 (C_{Ar}), 127.75 (C_{Ar}), 127.67 (C_{Ar}), 127.60 (C_{Ar}), 82.33 (C₁), 80.93 (C₃), 77.80 (C₄), 75.23 (CH₂Ph), 75.12 (CH₂Ph), 73.50 (CH₂Ph), 71.85 (C₂), 70.72 (C₅), 68.91 (C₆), 29.67 (SCH₂), 29.63 (CH₂ Lauryl), 29.58 (CH₂ Lauryl), 29.38 (CH₂ Lauryl), 29.27 (CH₂ Lauryl), 29.24 (CH₂ Lauryl), 29.21 (CH₂ Lauryl), 28.94 (CH₂ Lauryl), 28.91 (CH₂ Lauryl), 22.72 (CH₂ Lauryl), 21.01 (CH₂ Lauryl), 20.98 (CH₃ Ac), 14.15 (CH₃ Lauryl).

dodecyl 3,4,6-tri-O-benzyl-2-O-benzoyl 1-thio β -Dglucopyranoside (3) A solution of **9** (900 mg, 1.30 mmol, 1eq) and CH₃ONa (0.1 M) in CH₃OH (15 mL) was stirred at room temperature for 12 h then neutralized with Amberlite IR 120 (H⁺) resin, and concentrated under vacuum. The residue was dissolved in CH₂Cl₂ (10mL) and Et₃N (1.07mL, 7.60 mmol, 10 eq), BzCl (176 μ L, 1.52 mmol, 2 eq) and DMAP (18 mg, 0.15 mmol, 0.2 eq) were added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 48 h and concentrated under reduced pressure. The residue was diluted in cyclohexane, filtered and purified over SiO₂ using CH-EtOAc (gradient from 100 % CH to 95/5) as eluent to give **3** as white solid. (441 mg, 78%). R_f : 0.66 (CH/EtOAc 8:2). MS ESI-HRMS m/z [M+Na]⁺ calcd for C₄₆H₅₈NaO₆S⁺ 761.3846, found 761.3852. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.12 – 8.05 (m, 2H, H_{Ar} Bz), 7.71 – 7.08 (m, 18H, H_{Ar}), 5.37 (t, *J* = 9.3 Hz, 1H, H₂), 4.92 – 4.60 (m, 6H, 3 \times CH₂Ph), 4.57 (d, *J* = 10.0 Hz, 1H, H₁), 3.97 – 3.75 (m, 4H, H₃, H₄, H₆), 3.63 (m, 1H, H₅), 2.86 – 2.65 (m, 2H, SCH₂), 1.71 – 1.53 (m, 2H, SCH₂CH₂), 1.44 – 1.21 (m, 18H, 9 \times CH₂ Lauryl), 0.94 (t, *J* = 6.5 Hz, 3H, CH₃ Lauryl). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 165.29 (C=O, Bz), 138.23 (C_{q Ar}), 138.01 (C_{q Ar}),

137.84 (C_{q Ar}), 133.12(C_{Ar}), 129.99 (C_{q Ar}), 129.86 (C_{Ar}), 128.45 – 127.62 (C_{Ar}), 84.36 (C₃), 83.68 (C₁), 79.64 (C₅), 77.95 (C₄), 75.28 (CH₂Ph), 75.13 (CH₂Ph), 73.55 (CH₂Ph), 72.54 (C₂), 68.98 (C₆), 31.9 (CH₂ Lauryl), 29.81 (CH₂ Lauryl), 29.79 (CH₂ Lauryl), 29.70 (CH₂ Lauryl), 29.67(CH₂ Lauryl), 29.63 (CH₂ Lauryl), 29.56 (CH₂ Lauryl), 29.39 (CH₂ Lauryl), 29.22 (CH₂ Lauryl), 28.89 (CH₂ Lauryl), 22.73 (CH₂ Lauryl), 14.17 (CH₃ Lauryl).

3-azidopropyl 3,4,6-tri-O-benzyl- 2-O-(3,4,6-tri-Obenzyl-2-O-(2-O-(3,4,6-tri-O-benzyl- (2-O-(3,4,6-tri-Obenzyl-2-O-benzoyl β -D-glucopyranosyl) α -Dmannopyranosyl) α -D-mannopyranosyl) α -Dmannopyranoside (16) - Compound **15** (180 mg) was glycosylated with **3** (154mg, 1.2eq) in CH₂Cl₂ (5mL) in the presence of NIS (54mg, 2.2eq), TfOH (3 μ L, 0.0257mmol, 0.5eq) and 4 Å molecular sieves (0.3g) at 0°C. The reaction mixture was stirred for 5 min (TLC monitoring), diluted with CH₂Cl₂ and filtered through Celite, washed with aqueous sodium thiosulfate and saturated aqueous NaHCO₃, dried over MgSO₄, and concentrated under vacuum. The residue was chromatographed using CH-EtOAc (gradient from 100 % CH to 95/5) as eluent to give **16** (226mg, 91%). R_f: 0.44 (CH/EtOAc 8:2). MS ESI-HRMS m/z [M+Na]⁺ calcd for C₁₁₈H₁₂₃NaO₂₂⁺ 1956.8490, found 1956.8461. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.81 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H, H_{Ar} Bz),

7.39 – 6.97 (m, 63H, H_{Ar}), 5.26 (t, *J* = 8.5 Hz, 1H, H₂^m), 5.03 (app. s, 1H, H₁^r), 4.96 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H, H₁^m), 4.83 (app. s, H₁), 4.78 – 4.23 (m, 23H, 11 \times CH₂Ph, H₁^r, H₂^m), 4.13 – 4.02 (m, 2H, CH₂Ph), 4.00 (app. s, 1H, H₂^r), 3.90 –

3.30 (m, 21H, H₂, 4 \times H₃, 4 \times H₄, 4 \times H₅, 3 \times H₆, H_{6a}, H_{7a}), 3.19 – 2.99 (m, 3H, H_{6b}, H_{7b}, H₉), 1.58 (m, 2H, H₈). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 165.06 (C=O Bz), 138.73 –

137.98 (C_{q Ar}), 132.77 (C_{Ar}), 130.34 (C_{q Ar}), 129.69 (C_{Ar} Bz), 128.63 – 127.28 (C_{Ar}), 100.98 (C₁^r), 99.99 (C₁^m), 98.81 (C₁^m), 98.67 (C₁^r), 82 .65 (C saccharides), 79.72 (C saccharides), 78.65 (C saccharides), 78.09 (C saccharides),

77.21 (C saccharides), 75.41 – 75.36 (C saccharides), 75.13 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{Ph}$), 75.06 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{Ph}$), 74.74($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{Ph}$), 74.64 (C₂), 74.30 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{Ph}$), 73.61 (C₂^{''} and C₂^{'''}), 73.53 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{Ph}$), 73.42 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{Ph}$), 73.28 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{Ph}$), 72.86 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{Ph}$), 72.48 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{Ph}$), 72.20(C saccharides), 72.10 – 71.92 (C saccharides), 71.33 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{Ph}$), 70.17 – 69.27 (4 × C₆ saccharides), 64.29 (C₇), 48.37 (C₉), 28.83 (C₈).

3-azidopropyl 3,4,6-tri-O-benzyl-2-O-(3,4,6-tri-Obenzyl-2-O-(2-O-(3,4,6-tri-O-benzyl-(2-O-(3,4,6-tri-Obenzyl-β-D-mannopyranosyl)α-D-mannopyranosyl)) α-D-mannopyranosyl) -α-D-mannopyranoside (19) A solution of the compound **16** (234mg, 0.121 mmol) and CH₃ONa (0.1 M) in CH₃OH (20 mL) / THF (7mL) was stirred at room temperature for 12 h then neutralized with Amberlite IR 120 (H+) resin, and concentrated under vacuum to afford **17**. The residue was dissolved in CH₂Cl₂ (3mL) and Dess-Martin periodinate (36mg, 0.065mmol, 1.85 eq) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 12h and diluted with CH₂Cl₂ (5 mL), washed with aqueous solution of sodium thiosulfate, saturated aqueous NaHCO₃ and water, dried over MgSO₄, filtered and concentrated under vacuum. The crude ketone **18** was dissolved in a mixture of CH₃OH and CH₂Cl₂ (6 mL, 1/1 v/v) and solid NaBH₄ (20 mg, 0.543 mmol, 15.5 eq) was added. The reaction mixture was stirred for 12h at room temperature and NaBH₄ was quenched with acetone (5mL) for 5 min at room temperature. The solution was concentrated under reduced pressure. A solution of the residue in CH₂Cl₂ (5 mL) was washed with (1N) HCl, a saturated aqueous NaHCO₃ solution and water, dried over Na₂SO₄, and concentrated under vacuum. The residue was purified over SiO₂ using CH-EtOAc (gradient from 95/5 to 80/20) as eluent to give a pure compound **19** (43mg, 67%). R_f: 0.27 (CH/EtOAc 8:2). MS ESI-HRMS m/z [M+Na]⁺ calcd for C₁₁₁H₁₁₉N₃NaO₂₁⁺ 1852.8228, found 1852.8201. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.43 – 6.79 (m, 60H, H_{Ar}), 5.11 (app. s, 1H, H₁'), 5.02 (app. s, 1H, H₁''), 4.89 – 4.80 (m, 2H, $\underline{\text{C}}\text{HPh}$, H₁), 4.80 – 4.22 (m, 23H, $\underline{\text{C}}\text{HPh}$, 11 × $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{Ph}$), 4.21 (app. s, 1H, H₁''), 4.10 (app. s, 1H, H₂), 3.95 (app. d, J = 2.3 Hz, 1H, H₂''), 3.90 – 3.38 (m, 20H, H saccharides), 3.23 (dd, J = 8.9, 2.7 Hz, 1H, H₃''), 3.12 (m, 3H, H₉, H_{7b}), 2.31 (br. s, 1H, OH), 1.62 (m, 2H, H₈). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 138.67 – 138.09 (C_{q Ar}), 128.48 – 114.71 (C_{Ar}), 100.80 (C₁), 99.46 (C₁''), 98.78 (C₁'), 97.33(C₁''), 80.88 (C₃''), 79.93 (C saccharides), 79.33 (C saccharides), 77.78 (C saccharides), 75.26 (C saccharides),

75.22 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{Ph}$), 75.08 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{Ph}$), 74.98 (C saccharides), 74.87 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{Ph}$), 74.81 (C saccharides), 74.75 (C₂), 74.55 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{Ph}$), 74.38 (C saccharides), 74.10 (C saccharides), 73.41 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{Ph}$), 73.34 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{Ph}$), 73.28 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{Ph}$), 72.82 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{Ph}$), 72.22 (C saccharides), 72.00 (C saccharides),

71.87 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{Ph}$), 71.74 (C saccharides), 70.96 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{Ph}$), 70.71 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{Ph}$), 69.72 (C₆), 69.46 (C₆), 69.24 (C₆), 68.99 (C₆), 67.96 (C₂''), 64.31 (C₇), 48.37 (C₉), 28.83 (C₈).

3-Mantylaminopropyl 2-O-(2-O-(2-O-(2-O-(β-Dmannopyranosyl)α-D-mannopyranosyl)) α-Dmannopyranosyl) -α-D-mannopyranoside (1) To a solution of the **19** (70 mg, 0.038 mmol, 1 eq) in MeOH (15 mL) was added aq (1N) HCl (45μL) and 10% palladium on carbon (50 mg). The reaction mixture was stirred under hydrogen atmosphere (1atm) at room temperature for 12h. The catalyst was filtered through Celite and the filtrate was neutralized with Amberlite IRA 67 resin and concentrated under reduced pressure to afford the amino tetrasaccharide derivative (40mg, quantitative).

N-methylisatoic anhydride (81 mg, 0.46 mmol) was added to a solution of the residue in DMF (5mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 12 h and diluted with a mixture of AcOEt and water. The aqueous layer was concentrated under vacuum and the residue was purified on a Sephadex G25 column (eluent :water) . In order to remove traces of O-mantyled derivatives, the previous compound was dissolved in a solution of 0.1M NaOH in methanol (11 mL) The reaction mixture was stirred at room temperature for 24 h, neutralized by 1M aq HCl, concentrated and purified on a Sephadex G25 column (eluent water). The pure fractions were pooled and lyophilized to give **1** (30 mg, 90%). MS ESI-HRMS m/z [M+Na]⁺ calcd for C₃₅H₅₆N₂NaO₂₂⁺ 879.3217, found 879.3227. ¹H NMR (300 MHz, D₂O) δ 8.44 (app. s, 1H, NH amid), 7.68 – 7.40 (m, 2H, H_{Ar}), 7.07 – 6.74 (m, 2H, H_{Ar}), 5.23 – 4.71 (m, 4H, 4 × H₁ saccharides), 4.34 – 2.65 (m, 27H, H saccharides except H₁, H_{7a}, H₉), 2.27 – 1.77 (m, 4H, H_{7b}, CH₃ mantyl), 2.27 – 1.77 (m, 2H, H₈). ¹³C NMR (75 MHz, D₂O) δ 171.72 (C=O amid), 140.87 (C_{q Ar} mantyl), 137.12 (C_{Ar} mantyl), 133.09 (C_{Ar} mantyl), 127.11 (C_{q Ar} mantyl), 117.00 (C_{Ar} mantyl), 112.55 (C_{Ar} mantyl), 100.67 (C₁ saccharide), 99.99 (C₁ saccharide), 98.54 (C₁ saccharide), 98.28 (C₁ saccharide), 79.17 – 66.77 (C saccharides except C₁ and C₆), 61.19 – 60.73 (4 × C₆ saccharides), 39.59 (C₉), 36.57 (C₇), 29.92 (CH₃ mantyl), 22.39 (C₈).

References

- 1 Shibata, N.; Kobayashi, H.; Suzuki, S. *Proc Jpn Acad Ser. B* **2012**, *88*, 250-265.
- 2 Mille, C.; Bobrowicz, P.; Trinel, PA.; Li, H.; Maes E.; Guerardel, Y.; Fradin, C.; Martínez-Esparza, M.; Davidson, RC.; Janbon, G.; Poulain, D.; Wildt, S. *J Biol Chem.* **2008**, *283*, 9724-36.
- 3 Mille, C.; Fradin, C.; Delplace, F.; Trinel, PA.; Masset, A.; François, N.; Coddeville, B.; Bobrowicz, P.; Jouault, T.; Guerardel, Y.; Wildt, S.; Janbon, G.; Poulain, D. *Glycobiology.* **2012**, *1332-42*.

- 4 Fabre, E.; Sfihi-Loualia, G.; Pourcelot, M.; Coddeville, B.; Krzewinski, F.; Bouckaert, J.; Maes, E.; Hurtaux, T.; Dubois, R.; Fradin, C.; Mallet, J.-M.; Poulain, D.; Delplace, F.; Guéardel, Y. *Biochem J.* **2014**, *457*, 347-60
- 5 Pourcelot, M.; Cattiaux, L.; Sfihi-Loualia, G.; Fabre, E.; Krzewinsky, F.; Fradin, C.; Poulain, D.; Delplace, F.; Guéardel, Y.; Mallet, J.-M. *RSC Adv.* **2013**, *3*, 22560 - 22571.
- 6 Matsui, H.; Furukawa, J.-I.; Awano, T.; Nishi, N.; Sakairi, N.; *Chem Lett* **2000**, *4*, 326-327. Matsuoka, K.; Onaga, T.; Moria, T.; Sakamoto, J.-I.; Koyama, T.; Sakairi, N.; Hatano, K.; Terunuma, D.; *Tetrahedron Lett*, **2004**, *45*, 9383-9386 .
Son, S.-H.; Yanagiya, N.; Furukawa, J.-i.; Sakairi, N.; *Synlett* **2009**, *18*, 2957-2960
- 7 Crich, D.; Li, H.; Yao, Q.; Wink, D.J.; Sommer, R.D.; Rheingold, A.L.; *J Am Chem Soc.* **2001**, *123*, 5826-8
- 8 a) Collot, M.; Sendid, B.; Fievez, A.; Savaux, C.; Standaert-Vitse, A.; Tabouret, M.; Drucbert, A.S.; Danzé, P.M.; Poulain, D.; Mallet, J.-M. *J Med Chem.* **2008**, *51*, 6201-10. Fradin, C.; Jouault, T.; Mallet, A.; Mallet, J.-M.; Camus, D.; Sinay, P.; Poulain, D. *J Leukoc Biol.* **1996**, *60*, 81-7.
b) Dromer, F.; Chevalier, R.; Sendid, B.; Improvisi, L.; Jouault, T.; Robert, R.; Mallet, J.M.; Poulain, D. *Antimicrob Agents Chemother.* **2002**, *46*, 3869-76.
Esnault J.; Sinay P.; Chevalier R.; Colombel J.-F.; Mallet J.-M.; Sendid B.; Jouault T.; Poulain D.; Trinel P.-A. patent WOO138338 (2001)
- 9 Franks, N. E.; Montgomery, R. *Carbohydr. Res.* **1968**, *6*, 286–298
- 10 Boren, H. B.; Ekborg, G.; Eklind, K.; Garegg, P. J.; Pilotti, A.; Swahn, C. G. *Acta Chem. Scand.* **1973**, *27*, 2639–2644.
- 11 Sfihi-Loualia, G.; Hurtaux, T.; Fabre, E.; Fradin, C.; Mée, A.; Pourcelot, M.; Maes, E.; Bouckaert, J.; Mallet, J.-M.; Poulain, D.; Delplace, F.; Guéardel, Y.; *Glycobiology.*; **2015**, doi 10.1093/glycob/cwv094

Bibliographie

A - B

- Albesa-Jove, D., Giganti, D., Jackson, M., Alzari, P.M. & Guerin, M.E. (2014). Structure-function relationships of membrane-associated GT-B glycosyltransferases. *Glycobiology*, **24**, 108–124.
- Antinori, S., Milazzo, L., Sollima, S., Galli, M. & Corbellino, M. (2016). Candidemia and invasive candidiasis in adults: A narrative review. *European Journal of Internal Medicine*.
- Banfield, D.K. (2011). Mechanisms of Protein Retention in the Golgi. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **3**.
- Barlowe, C. (2000). Traffic COPs of the Early Secretory Pathway. *Traffic*, **1**, 371–377.
- 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. & Gow, N.A.R. (2006). Outer Chain N-Glycans Are Required for Cell Wall Integrity and Virulence of *Candida albicans*. *Journal of Biological Chemistry*, **281**, 90–98.
- Bernard, M. & Latgé, J.P. (2001). *Aspergillus fumigatus* cell wall: composition and biosynthesis. *Medical Mycology*, **39 Suppl 1**, 9–17.
- Bhattacharya, S., Dai, Z., Li, J., Baxter, S., Callaway, D.J.E., Cowburn, D. & Bu, Z. (2010). A Conformational Switch in the Scaffolding Protein NHERF1 Controls Autoinhibition and Complex Formation. *Journal of Biological Chemistry*, **285**, 9981–9994.
- Bischoff, J. & Kornfeld, R. (1984). The effect of 1-deoxymannojirimycin on rat liver α -mannosidases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **125**, 324–331.
- Bowman, S.M. & Free, S.J. (2006). The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioEssays*, **28**, 799–808.
- Breton, C., Fournel-Gigleux, S. & Palcic, M.M. (2012). Recent structures, evolution and mechanisms of glycosyltransferases. *Current Opinion in Structural Biology*, **22**, 540–549.
- Brissonnet, Y., Ladevèze, S., Tezé, D., Fabre, E., Deniaud, D., Daligault, F., Tellier, C., Šesták, S., Remaud-Simeon, M., Potocki-Veronese, G. & Guin, S.G.

(2015). Polymeric Iminosugars Improve the Activity of Carbohydrate-Processing Enzymes. *Bioconjugate Chemistry*, **26**, 766–772.

Brissonnet, Y., Ortiz Mellet, C., Morandat, S., Garcia Moreno, M.I., Deniaud, D., Matthews, S.E., Vidal, S., Šesták, S., El Kirat, K. & Gouin, S.G. (2013). Topological Effects and Binding Modes Operating with Multivalent Iminosugar-Based Glycoclusters and Mannosidases. *Journal of the American Chemical Society*, **135**, 18427–18435.

C

Cattiaux, L., Mée, A., Pourcelot, M., Sfihi-Loualia, G., Hurtaux, T., Maes, E., Fradin, C., Sendid, B., Poulain, D., Fabre, E., Delplace, F., Guérardel, Y. & Mallet, J.-M. (2016). *Candida albicans* β -1,2 mannosyl transferase Bmt3: Preparation and evaluation of a β (1,2), α (1,2)-tetramannosyl fluorescent substrate. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **24**, 1362–1368.

Chang, A., Singh, S., Phillips Jr., G.N. & Thorson, J.S. (2011). Glycosyltransferase structural biology and its role in the design of catalysts for glycosylation. *Current Opinion in Biotechnology*, **22**, 800–808.

Chen, C.K.-M., Chan, N.-L. & Wang, A.H.-J. (2011). The many blades of the β -propeller proteins: conserved but versatile. *Trends in Biochemical Sciences*, **36**, 553–561.

Chi, C.N., Bach, A., Strømgaard, K., Gianni, S. & Jemth, P. (2012). Ligand binding by PDZ domains. *BioFactors*, **38**, 338–348.

Clancy, C.J. & Nguyen, M.H. (2013). Finding the ‘Missing 50%’ of Invasive Candidiasis: How Nonculture Diagnostics Will Improve Understanding of Disease Spectrum and Transform Patient Care. *Clinical Infectious Diseases*, **56**, 1284–1292.

Cohen, R.E., Ballou, L. & Ballou, C.E. (1980). *Saccharomyces cerevisiae* mannoprotein mutants. Isolation of the *mnn5* mutant and comparison with the *mnn3* strain. *Journal of Biological Chemistry*, **255**, 7700–7707.

Compain, P. & Bodlenner, A. (2014). The Multivalent Effect in Glycosidase Inhibition: A New, Rapidly Emerging Topic in Glycoscience. *ChemBioChem*, **15**, 1239–1251.

Courjol, F., Jouault, T., Mille, C., Hall, R., Maes, E., Sendid, B., Mallet, J.M., Guérardel, Y., Gow, N.A.R., Poulain, D. & Fradin, C. (2015). β -1,2-Mannosyltransferases 1 and 3 Participate in Yeast and Hyphae O- and N-Linked Mannosylation and Alter *Candida albicans* Fitness During Infection. *Open Forum Infectious Diseases*, **2**.

Coutinho, P.M., Deleury, E., Davies, G.J. & Henrissat, B. (2003). An Evolving Hierarchical Family Classification for Glycosyltransferases. *Journal of Molecular Biology*, **328**, 307–317.

D

- Davies, G. & Henrissat, B. (1995). Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*, **3**, 853–859.
- Dean, N., Zhang, Y.B. & Poster, J.B. (1997). The VRG4 Gene Is Required for GDP-mannose Transport into the Lumen of the Golgi in the Yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, **272**, 31908–31914.
- Devillers, A., Courjol, F., Fradin, C., Coste, A., Poulain, D., Pipy, B., Bernardes, E.S. & Jouault, T. (2013). Deficient Beta-Mannosylation of *Candida albicans* Phospholipomannan Affects the Proinflammatory Response in Macrophages. *PLOS ONE*, **8**, e84771.
- Dickson, R.C., Nagiec, E.E., Wells, G.B., Nagiec, M.M. & Lester, R.L. (1997). Synthesis of Mannose-(inositol-P)₂-ceramide, the Major Sphingolipid in *Saccharomyces cerevisiae*, Requires the IPT1 (YDR072c) Gene. *Journal of Biological Chemistry*, **272**, 29620–29625.
- Dromer, F., Chevalier, R., Sendid, B., Improvisi, L., Jouault, T., Robert, R., Mallet, J.M. & Poulain, D. (2002). Synthetic Analogues of β -1,2 Oligomannosides Prevent Intestinal Colonization by the Pathogenic Yeast *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **46**, 3869–3876.
- Durka, M., Buffet, K., Iehl, J., Holler, M., Nierengarten, J.-F. & Vincent, S.P. (2012). The Inhibition of Liposaccharide Heptosyltransferase WaaC with Multivalent Glycosylated Fullerenes: A New Mode of Glycosyltransferase Inhibition. *Chemistry – A European Journal*, **18**, 641–651.

E - F

- Eggimann, P. & Marchetti, O. (2011). Is (1→3)- β -D-glucan the missing link from bedside assessment to pre-emptive therapy of invasive candidiasis? *Critical Care*, **15**, 1017.
- Erwig, L.P. & Gow, N.A.R. (2016). Interactions of fungal pathogens with phagocytes. *Nature Reviews Microbiology*, **14**, 163–176.
- Fabre, E., Hurtaux, T. & Fradin, C. (2014a). Mannosylation of fungal glycoconjugates in the Golgi apparatus. *Current Opinion in Microbiology*, **20**, 103–110.
- Fabre, E., Sfihi-Loualia, G., Pourcelot, M., Coddeville, B., Krzewinski, F., Bouckaert, J., Maes, E., Hurtaux, T., Dubois, R., Fradin, C., Mallet, J.-M., Poulain, D., Delplace, F. & Guerardel, Y. (2014b). Characterization of the recombinant *Candida albicans* β -1,2-mannosyltransferase that initiates the β -mannosylation of cell wall phosphopeptidomannan. *Biochemical Journal*, **457**, 347–360.

- Fontaine, T., Simenel, C., Dubreucq, G., Adam, O., Delepierre, M., Lemoine, J., Vorgias, C.E., Diaquin, M. & Latgé, J.P. (2000). Molecular organization of the alkali-insoluble fraction of *Aspergillus fumigatus* cell wall. *The Journal of Biological Chemistry*, **275**, 27594–27607.
- Fradin, C., Poulain, D. & Jouault, T. (2000). β -1,2-Linked Oligomannosides from *Candida albicans* Bind to a 32-Kilodalton Macrophage Membrane Protein Homologous to the Mammalian Lectin Galectin-3. *Infection and Immunity*, **68**, 4391–4398.
- Fradin, C., Slomianny, M.C., Mille, C., Masset, A., Robert, R., Sendid, B., Ernst, J.F., Michalski, J.C. & Poulain, D. (2008). β -1,2 Oligomannose Adhesin Epitopes Are Widely Distributed over the Different Families of *Candida albicans* Cell Wall Mannoproteins and Are Associated through both N- and O-Glycosylation Processes. *Infection and Immunity*, **76**, 4509–4517.
- Funato, K. & Riezman, H. (2001). Vesicular and nonvesicular transport of ceramide from ER to the Golgi apparatus in yeast. *Journal of Cell Biology*, **155**, 949–959.

G

- Garey, K.W., Rege, M., Pai, M.P., Mingo, D.E., Suda, K.J., Turpin, R.S. & Bearden, D.T. (2006). Time to Initiation of Fluconazole Therapy Impacts Mortality in Patients with Candidemia: A Multi-Institutional Study. *Clinical Infectious Diseases*, **43**, 25–31.
- Gemmill, T.R. & Trimble, R.B. (1999). *Schizosaccharomyces pombe* produces novel Gal0–2Man1–3 O-linked oligosaccharides. *Glycobiology*, **9**, 507–515.
- Gemmill, T.R. & Trimble, R.B. (1996). *Schizosaccharomyces pombe* Produces Novel Pyruvate-containing N-Linked Oligosaccharides. *Journal of Biological Chemistry*, **271**, 25945–25949.
- Gloster, T.M. (2014). Advances in understanding glycosyltransferases from a structural perspective. *Current Opinion in Structural Biology*, **28**, 131–141.
- Gouin, S.G. (2014). Multivalent Inhibitors for Carbohydrate-Processing Enzymes: Beyond the ‘Lock-and-Key’ Concept. *Chemistry – A European Journal*, **20**, 11616–11628.
- Gow, N.A. & Hube, B. (2012). Importance of the *Candida albicans* cell wall during commensalism and infection. *Current Opinion in Microbiology*, **15**, 406–412.
- Gow, N.A.R., van de Veerdonk, F.L., Brown, A.J.P. & Netea, M.G. (2011). *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nature reviews. Microbiology*, **10**, 112–122.
- Goyer, M., Loiselet, A., Bon, F., L’Ollivier, C., Laue, M., Holland, G., Bonnin, A. & Dalle, F. (2016). Intestinal Cell Tight Junctions Limit Invasion of *Candida albicans*

through Active Penetration and Endocytosis in the Early Stages of the Interaction of the Fungus with the Intestinal Barrier. *PLOS ONE*, **11**, e0149159.

Graham, T.R., Seeger, M., Payne, G.S., MacKay, V.L. & Emr, S.D. (1994). Clathrin-dependent localization of alpha 1,3 mannosyltransferase to the Golgi complex of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Cell Biology*, **127**, 667–678.

H

Hall, R.A., Bates, S., Lenardon, M.D., MacCallum, D.M., Wagener, J., Lowman, D.W., Kruppa, M.D., Williams, D.L., Odds, F.C., Brown, A.J.P. & Gow, N.A.R. (2013). The Mnn2 Mannosyltransferase Family Modulates Mannoprotein Fibril Length, Immune Recognition and Virulence of *Candida albicans*. *PLOS Pathog*, **9**, e1003276.

Hanson, K.E., Pfeiffer, C.D., Lease, E.D., Balch, A.H., Zaas, A.K., Perfect, J.R. & Alexander, B.D. (2012). β -D-glucan Surveillance with Preemptive Anidulafungin for Invasive Candidiasis in Intensive Care Unit Patients: A Randomized Pilot Study. *PLOS ONE*, **7**, e42282.

Häusler, A., Ballou, L., Ballou, C.E. & Robbins, P.W. (1992). Yeast glycoprotein biosynthesis: MNT1 encodes an alpha-1,2-mannosyltransferase involved in O-glycosylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **89**, 6846–6850.

Huang, W.-L., Wang, Y.-R., Ko, T.-P., Chia, C.-Y., Huang, K.-F. & Wang, A.H.-J. (2010). Crystal Structure and Functional Analysis of the Glutaminyl Cyclase from *Xanthomonas campestris*. *Journal of Molecular Biology*, **401**, 374–388.

Hurtaux, T., Sfihi-Loualia, G., Brissonnet, Y., Bouckaert, J., Mallet, J.-M., Sendid, B., Delplace, F., Fabre, E., Gouin, S.G. & Guérardel, Y. (2016). Evaluation of monovalent and multivalent iminosugars to modulate *Candida albicans* β -1,2-mannosyltransferase activities. *Carbohydrate Research*, **429**, 123–127.

J - K

Jawhara, S., Mogensen, E., Maggiotto, F., Fradin, C., Sarazin, A., Dubuquoy, L., Maes, E., Guérardel, Y., Janbon, G. & Poulain, D. (2012). Murine Model of Dextran Sulfate Sodium-induced Colitis Reveals *Candida glabrata* Virulence and Contribution of β -Mannosyltransferases. *The Journal of Biological Chemistry*, **287**, 11313–11324.

Jouault, T., Behi, M.E.A.-E., Martínez-Esparza, M., Breuilh, L., Trinel, P.-A., Chamailard, M., Trottein, F. & Poulain, D. (2006). Specific Recognition of *Candida albicans* by Macrophages Requires Galectin-3 to Discriminate

- Saccharomyces cerevisiae and Needs Association with TLR2 for Signaling. *The Journal of Immunology*, **177**, 4679–4687.
- Jouault, T., Ibata-Ombetta, S., Takeuchi, O., Trinel, P.-A., Sacchetti, P., Lefebvre, P., Akira, S. & Poulain, D. (2003). Candida albicans Phospholipomannan Is Sensed through Toll-Like Receptors. *Journal of Infectious Diseases*, **188**, 165–172.
- Jungmann, J. & Munro, S. (1998). Multi-protein complexes in the cis Golgi of Saccharomyces cerevisiae with α -1,6-mannosyltransferase activity. *The EMBO Journal*, **17**, 423–434.
- Kanfar, N., Bartolami, E., Zelli, R., Marra, A., Winum, J.-Y., Ulrich, S. & Dumy, P. (2015). Emerging trends in enzyme inhibition by multivalent nanoconstructs. *Organic & Biomolecular Chemistry*, **13**, 9894–9906.
- Kelley, L.A., Mezulis, S., Yates, C.M., Wass, M.N. & Sternberg, M.J.E. (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols*, **10**, 845–858.
- Klutts, J.S., Yoneda, A., Reilly, M.C., Bose, I. & Doering, T.L. (2006). Glycosyltransferases and their products: cryptococcal variations on fungal themes. *FEMS Yeast Research*, **6**, 499–512.
- Kullberg, B.J. & Arendrup, M.C. (2015). Invasive Candidiasis. *New England Journal of Medicine*, **373**, 1445–1456.

L

- Lairson, L.L., Henrissat, B., Davies, G.J. & Withers, S.G. (2008). Glycosyltransferases: Structures, Functions, and Mechanisms. *Annual Review of Biochemistry*, **77**, 521–555.
- Lee, J.C., Francis, S., Dutta, D., Gupta, V., Yang, Y., Zhu, J.-Y., Tash, J.S., Schönbrunn, E. & Georg, G.I. (2012). Synthesis and Evaluation of Eight- and Four-membered Iminosugar Analogues as Inhibitors of Testicular Ceramide-specific Glucosyltransferase, Testicular β -Glucosidase 2, and other Glycosidases. *The Journal of organic chemistry*, **77**, 3082–3098.
- Lefort, A., Chartier, L., Sendid, B., Wolff, M., Mainardi, J.-L., Podglajen, I., Desnos-Ollivier, M., Fontanet, A., Bretagne, S. & Lortholary, O. (2012). Diagnosis, management and outcome of Candida endocarditis. *Clinical Microbiology and Infection*, **18**, E99–E109.
- Lehle, L., Eiden, A., Lehnert, K., Haselbeck, A. & Kopetzki, E. (1995). Glycoprotein biosynthesis in Saccharomyces cerevisiae: ngd29, an N-glycosylation mutant allelic to och1 having a defect in the initiation of outer chain formation. *FEBS Letters*, **370**, 41–45.

- Lengeler, K.B., Tielker, D. & Ernst, J.F. (2007). Protein-O-mannosyltransferases in virulence and development. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **65**, 528.
- Levine, T.P., Wiggins, C.A.R. & Munro, S. (2000). Inositol Phosphorylceramide Synthase Is Located in the Golgi Apparatus of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, **11**, 2267–2281.
- Lillelund, V.H., Jensen, H.H., Liang, X. & Bols, M. (2002). Recent Developments of Transition-State Analogue Glycosidase Inhibitors of Non-Natural Product Origin. *Chemical Reviews*, **102**, 515–554.
- Lisman, Q., Pomorski, T., Vogelzangs, C., Urli-Stam, D., Delwijnen, W. de C. van & Holthuis, J.C.M. (2004). Protein Sorting in the Late Golgi of *Saccharomyces cerevisiae* Does Not Require Mannosylated Sphingolipids. *Journal of Biological Chemistry*, **279**, 1020–1029.
- Lobsanov, Y.D., Romero, P.A., Sleno, B., Yu, B., Yip, P., Herscovics, A. & Howell, P.L. (2004). Structure of Kre2p/Mnt1p A YEAST α 1,2-MANNOSYLTRANSFERASE INVOLVED IN MANNOPROTEIN BIOSYNTHESIS. *Journal of Biological Chemistry*, **279**, 17921–17931.
- Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P.M. & Henrissat, B. (2014). The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Research*, **42**, D490–D495.
- Lommel, M. & Strahl, S. (2009). Protein O-mannosylation: Conserved from bacteria to humans*. *Glycobiology*, **19**, 816–828.
- Lussier, M., Sdicu, A.-M., Bussereau, F., Jacquet, M. & Bussey, H. (1997). The Ktr1p, Ktr3p, and Kre2p/Mnt1p Mannosyltransferases Participate in the Elaboration of Yeast O- and N-linked Carbohydrate Chains. *Journal of Biological Chemistry*, **272**, 15527–15531.

M

- Maes, E., Mille, C., Trivelli, X., Janbon, G., Poulain, D. & Guérardel, Y. (2009). Molecular Phenotyping of Mannosyltransferases-Deficient *Candida albicans* Cells by High-Resolution Magic Angle Spinning NMR. *Journal of Biochemistry*, **145**, 413–419.
- Marchetti, O., Bille, J., Fluckiger, U., Eggimann, P., Ruef, C., Garbino, J., Calandra, T., Glauser, M.-P., Täuber, M.G., Pittet, D. & (funginos), F.I.N. of S. (2004). Epidemiology of Candidemia in Swiss Tertiary Care Hospitals: Secular Trends, 1991–2000. *Clinical Infectious Diseases*, **38**, 311–320.
- Mayer, F.L., Wilson, D. & Hube, B. (2013). *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*, **4**, 119–128.

- McManus, B.A. & Coleman, D.C. (2014). Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of *Candida albicans*. *Infection, Genetics and Evolution*, **21**, 166–178.
- Merrill Jr., A.H. & Sandhoff, K. (2002). Chapter 14 Sphingolipids: metabolism and cell signaling. (ed B.-N.C. Biochemistry), pp. 373–407. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*, 4th edition. Elsevier.
- Mery, A., Sendid, B., François, N., Cornu, M., Poissy, J., Guerardel, Y. & Poulain, D. (2016). Application of mass spectrometry technology to the early diagnosis of invasive fungal infections. *Journal of Clinical Microbiology*, JCM.01655-16.
- Mille, C., Bobrowicz, P., Trinel, P.-A., Li, H., Maes, E., Guerardel, Y., Fradin, C., Martínez-Esparza, M., Davidson, R.C., Janbon, G., Poulain, D. & Wildt, S. (2008). Identification of a New Family of Genes Involved in β -1,2-Mannosylation of Glycans in *Pichia pastoris* and *Candida albicans*. *Journal of Biological Chemistry*, **283**, 9724–9736.
- Mille, C., Fradin, C., Delplace, F., Trinel, P.-A., Masset, A., François, N., Coddeville, B., Bobrowicz, P., Jouault, T., Guerardel, Y., Wildt, S., Janbon, G. & Poulain, D. (2012). Members 5 and 6 of the *Candida albicans* BMT family encode enzymes acting specifically on β -mannosylation of the phospholipomannan cell-wall glycosphingolipid. *Glycobiology*, **22**, 1332–1342.
- Mille, C., Janbon, G., Delplace, F., Iyata-Ombetta, S., Gaillardin, C., Strecker, G., Jouault, T., Trinel, P.-A. & Poulain, D. (2004). Inactivation of CaMIT1 Inhibits *Candida albicans* Phospholipomannan β -Mannosylation, Reduces Virulence, and Alters Cell Wall Protein β -Mannosylation. *Journal of Biological Chemistry*, **279**, 47952–47960.
- Miyakawa, Y., Kuribayashi, T., Kagaya, K., Suzuki, M., Nakase, T. & Fukazawa, Y. (1992). Role of specific determinants in mannan of *Candida albicans* serotype A in adherence to human buccal epithelial cells. *Infection and Immunity*, **60**, 2493–2499.
- 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. & Gow, N.A.R. (2010). A Multifunctional Mannosyltransferase Family in *Candida albicans* Determines Cell Wall Mannan Structure and Host-Fungus Interactions. *The Journal of Biological Chemistry*, **285**, 12087–12095.
- Morelle, W., Bernard, M., Debeaupuis, J.-P., Buitrago, M., Tabouret, M. & Latgé, J.-P. (2005). Galactomannoproteins of *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryotic Cell*, **4**, 1308–1316.
- Morrell, M., Fraser, V.J. & Kollef, M.H. (2005). Delaying the Empiric Treatment of *Candida* Bloodstream Infection until Positive Blood Culture Results Are Obtained: a Potential Risk Factor for Hospital Mortality. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **49**, 3640–3645.
- 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.,

Zervou, F.N., Zacharioudakis, I.M., Kontoyiannis, D.P. & Pappas, P.G. (2015). T2 Magnetic Resonance Assay for the Rapid Diagnosis of Candidemia in Whole Blood: A Clinical Trial. *Clinical Infectious Diseases*, **60**, 892–899.

Nagiec, M.M., Nagiec, E.E., Baltisberger, J.A., Wells, G.B., Lester, R.L. & Dickson, R.C. (1997). Sphingolipid synthesis as a target for antifungal drugs. Complementation of the inositol phosphorylceramide synthase defect in a mutant strain of *Saccharomyces cerevisiae* by the AUR1 gene. *Journal of Biological Chemistry*, **272**, 9809–9817.

N

Nakae, S., Ito, S., Higa, M., Senoura, T., Wasaki, J., Hijikata, A., Shionyu, M., Ito, S. & Shirai, T. (2013). Structure of Novel Enzyme in Mannan Biodegradation Process 4-O- β -d-Mannosyl-d-Glucose Phosphorylase MGP. *Journal of Molecular Biology*, **425**, 4468–4478.

Netea, M.G., Brown, G.D., Kullberg, B.J. & Gow, N.A.R. (2008). An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *Nature Reviews Microbiology*, **6**, 67–78.

Nett, J.H., Cook, W.J., Chen, M.-T., Davidson, R.C., Bobrowicz, P., Kett, W., Brevnova, E., Potgieter, T.I., Mellon, M.T., Prinz, B., Choi, B.-K., Zha, D., Burnina, I., Bukowski, J.T., Du, M., Wildt, S. & Hamilton, S.R. (2013). Characterization of the *Pichia pastoris* Protein-O-mannosyltransferase Gene Family. *PLoS ONE*, **8**.

Nguyen, M.H., Wissel, M.C., Shields, R.K., Salomoni, M.A., Hao, B., Press, E.G., Shields, R.M., Cheng, S., Mitsani, D., Vadnerkar, A., Silveira, F.P., Kleiboeker, S.B. & Clancy, C.J. (2012). Performance of *Candida* Real-time Polymerase Chain Reaction, β -D-Glucan Assay, and Blood Cultures in the Diagnosis of Invasive Candidiasis. *Clinical Infectious Diseases*, **54**, 1240–1248.

O - P

Odds, F.C. (2000). Pathogenic fungi in the 21st century. *Trends in Microbiology*, **8**, 200–201.

Ohashi, T., Fujiyama, K. & Takegawa, K. (2012). Identification of Novel α 1,3-Galactosyltransferase and Elimination of α -Galactose-containing Glycans by Disruption of Multiple α -Galactosyltransferase Genes in *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of Biological Chemistry*, **287**, 38866–38875.

Perez-Garcia, L.A. (2012). Role of Cell Wall Polysaccharides during Recognition of *Candida albicans* by the Innate Immune System. *Journal of Glycobiology*, **1**.

Perry, R.J. & Ridgway, N.D. (2005). Molecular mechanisms and regulation of ceramide transport. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, **1734**, 220–234.

- Pfaller, M.A., Wolk, D.M. & Lowery, T.J. (2015). T2MR and T2Candida: novel technology for the rapid diagnosis of candidemia and invasive candidiasis. *Future Microbiology*, **11**, 103–117.
- Pfeiffer, C.D., Samsa, G.P., Schell, W.A., Reller, L.B., Perfect, J.R. & Alexander, B.D. (2011). Quantitation of Candida CFU in Initial Positive Blood Cultures. *Journal of Clinical Microbiology*, **49**, 2879–2883.
- Possner, D.D.D., Claesson, M. & Guy, J.E. (2015). Structure of the Glycosyltransferase Ktr4p from *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS ONE*, **10**.
- Posteraro, B., De Pascale, G., Tumbarello, M., Torelli, R., Pennisi, M.A., Bello, G., Maviglia, R., Fadda, G., Sanguinetti, M. & Antonelli, M. (2011). Early diagnosis of candidemia in intensive care unit patients with sepsis: a prospective comparison of (1→3)- β -D-glucan assay, Candida score, and colonization index. *Critical Care*, **15**, R249.
- Pourcelot, M., Cattiaux, L., Sfihi-Loualia, G., Fabre, E., Krzewinski, F., Fradin, C., Poulain, D., Delplace, F., Guérardel, Y. & Mallet, J.-M. (2013). Mantyl tagged oligo α (1 → 2) mannosides as *Candida albicans* β -mannosyl transferases substrates: a comparison between synthetic strategies. **3**, 22560–22571.
- Pourcq, K.D., Schutter, K.D. & Callewaert, N. (2010). Engineering of glycosylation in yeast and other fungi: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **87**, 1617–1631.

Q - R

- Qiao, L., Murray, B.W., Shimazaki, M., Schultz, J. & Wong, C.-H. (1996). Synergistic Inhibition of Human α -1,3-Fucosyltransferase V. *Journal of the American Chemical Society*, **118**, 7653–7662.
- Rahman, D., Mistry, M., Thavaraj, S., Challacombe, S.J. & Naglik, J.R. (2007). Murine model of concurrent oral and vaginal *Candida albicans* colonization to study epithelial host–pathogen interactions. *Microbes and infection / Institut Pasteur*, **9**, 615–622.
- Rayner, J.C. & Munro, S. (1998). Identification of the MNN2 and MNN5 Mannosyltransferases Required for Forming and Extending the Mannose Branches of the Outer Chain Mannans of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, **273**, 26836–26843.
- Romero, P.A., Lussier, M., Sdicu, A.-M., Bussey, H. & Herscovics, A. (1997). Ktr1p is an α -1,2-mannosyltransferase of *Saccharomyces cerevisiae*. Comparison of the enzymic properties of soluble recombinant Ktr1p and Kre2p/Mnt1p produced in *Pichia pastoris*. *Biochemical Journal*, **321**, 289–295.
- Romero, P.A., Lussier, M., Veronneau, S., Sdicu, A.-M., Herscovics, A. & Bussey, H. (1999). Mnt2p and Mnt3p of *Saccharomyces cerevisiae* are members of the

Mnn1p family of α -1,3-mannosyltransferases responsible for adding the terminal mannose residues of O-linked oligosaccharides. *Glycobiology*, **9**, 1045–1051.

Roy, A., Kucukural, A. & Zhang, Y. (2010). I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols*, **5**, 725–738.

S

Schmalhorst, P.S., Krappmann, S., Vervecken, W., Rohde, M., Müller, M., Braus, G.H., Contreras, R., Braun, A., Bakker, H. & Routier, F.H. (2008). Contribution of Galactofuranose to the Virulence of the Opportunistic Pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryotic Cell*, **7**, 1268–1277.

Sendid, B., Poissy, J., François, 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. *Clinical Microbiology and Infection*, **21**, 88.e1–88.e6.

Sfihi-Loualia, G. (2015). *Caractérisation de l'activité enzymatique des β -1,2 mannosyltransférases CaBmt1 et CaBmt3, enzymes d'initiation et d'élongation de la β -mannosylation du phosphopeptidomannane de *Candida albicans**. Thèse de doctorat en Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie thesis, Lille 1.

Sfihi-Loualia, G., Hurtaux, T., Fabre, E., Fradin, C., Mée, A., Pourcelot, M., Maes, E., Bouckaert, J., Mallet, J.-M., Poulain, D., Delplace, F. & Guérardel, Y. (2016). *Candida albicans* β -1,2-mannosyltransferase Bmt3 prompts the elongation of the cell-wall phosphopeptidomannan. *Glycobiology*, **26**, 203–214.

Shibata, N., Arai, M., Haga, E., Kikuchi, T., Najima, M., Satoh, T., Kobayashi, H. & Suzuki, S. (1992). Structural identification of an epitope of antigenic factor 5 in mannans of *Candida albicans* NIH B-792 (serotype B) and J-1012 (serotype A) as beta-1,2-linked oligomannosyl residues. *Infection and Immunity*, **60**, 4100–4110.

Shibata, N., Hisamichi, K., Kobayashi, H. & Suzuki, S. (1993). Complete Assignment of ¹H and ¹³C Nuclear Magnetic Resonance Chemical Shifts of β -1,2-Linked Mannooligosaccharides Isolated from the Phosphomannan of the Pathogenic Yeast *Candida albicans* NIH B-792 Strain. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **302**, 113–117.

Shibata, N., Kobayashi, H., Okawa, Y. & Suzuki, S. (2003). Existence of novel β -1,2 linkage-containing side chain in the mannan of *Candida lusitanae*, antigenically related to *Candida albicans* serotype A. *European Journal of Biochemistry*, **270**, 2565–2575.

- Shibata, N., KOBAYASHI, H. & SUZUKI, S. (2012). Immunochemistry of pathogenic yeast, *Candida* species, focusing on mannan. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences*, **88**, 250–265.
- Silva, S., Negri, M., Henriques, M., Oliveira, R., Williams, D.W. & Azeredo, J. (2012). *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, **36**, 288–305.
- Stolz, J. & Munro, S. (2002). The Components of the *Saccharomyces cerevisiae* Mannosyltransferase Complex M-Pol I Have Distinct Functions in Mannan Synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, **277**, 44801–44808.
- Strahl-Bolsinger, S., Gentsch, M. & Tanner, W. (1999). Protein O-mannosylation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, **1426**, 297–307.
- Striebeck, A., Robinson, D.A., Schüttelkopf, A.W. & van Aalten, D.M.F. (2013). Yeast Mnn9 is both a priming glycosyltransferase and an allosteric activator of mannan biosynthesis. *Open Biology*, **3**.
- Suzuki, S. (1997). Immunochemical study on mannans of genus *Candida*. I. Structural investigation of antigenic factors 1, 4, 5, 6, 8, 9, 11, 13, 13b and 34. *Current Topics in Medical Mycology*, **8**, 57–70.
- Suzuki, A., Takata, Y., Oshie, A., Tezuka, A., Shibata, N., Kobayashi, H., Okawa, Y. & Suzuki, S. (1995). Detection of β -1,2-mannosyltransferase in *Candida albicans* cells. *FEBS Letters*, **373**, 275–279.

T - U

- Tanaka, N., Fujita, Y., Suzuki, S., Morishita, M., Giga-Hama, Y., Shimoda, C. & Takegawa, K. (2005). Characterization of O-mannosyltransferase family in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **330**, 813–820.
- Tanaka, N., Konomi, M., Osumi, M. & Takegawa, K. (2001). Characterization of a *Schizosaccharomyces pombe* mutant deficient in UDP-galactose transport activity. *Yeast*, **18**, 903–914.
- Tissot, F., Lamoth, F., Hauser, P.M., Orasch, C., Flückiger, U., Siegemund, M., Zimmerli, S., Calandra, T., Bille, J., Eggimann, P. & Marchetti, O. (2013). β -Glucan Antigenemia Anticipates Diagnosis of Blood Culture–Negative Intraabdominal Candidiasis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, **188**, 1100–1109.
- Trinel, P.-A., Plancke, Y., Gerold, P., Jouault, T., Delplace, F., Schwarz, R.T., Strecker, G. & Poulain, D. (1999). The *Candida albicans* Phospholipomannan Is a Family of Glycolipids Presenting Phosphoinositolmannosides with Long Linear Chains

of β -1,2-Linked Mannose Residues. *Journal of Biological Chemistry*, **274**, 30520–30526.

Uemura, S., Kihara, A., Iwaki, S., Inokuchi, J. & Igarashi, Y. (2007). Regulation of the Transport and Protein Levels of the Inositol Phosphorylceramide Mannosyltransferases Csg1 and Csh1 by the Ca²⁺-binding Protein Csg2. *Journal of Biological Chemistry*, **282**, 8613–8621.

W - Z

Wang, X.-H., Nakayama, K., Shimma, Y., Tanaka, A. & Jigami, Y. (1997). MNN6, a Member of the KRE2/MNT1 Family, Is the Gene for Mannosylphosphate Transfer in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, **272**, 18117–18124.

Xin, H., Cartmell, J., Bailey, J.J., Dziadek, S., Bundle, D.R. & Cutler, J.E. (2012). Self-Adjuvanting Glycopeptide Conjugate Vaccine against Disseminated Candidiasis. *PLoS ONE*, **7**.

Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J. & Zhang, Y. (2015). The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nature Methods*, **12**, 7–8.

Yip, C.L., Welch, S.K., Klebl, F., Gilbert, T., Seidel, P., Grant, F.J., O'Hara, P.J. & MacKay, V.L. (1994). Cloning and analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* MNN9 and MNN1 genes required for complex glycosylation of secreted proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **91**, 2723–2727.

Yuan, Z. & Teasdale, R.D. (2002). Prediction of Golgi Type II membrane proteins based on their transmembrane domains. *Bioinformatics*, **18**, 1109–1115.

Zhang, Y. (2008). I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics*, **9**, 40.

Zhang, L., Zhou, H., Ouyang, H., Li, Y. & Jin, C. (2008). Afcwh41 is required for cell wall synthesis, conidiation, and polarity in *Aspergillus fumigatus*. *FEMS Microbiology Letters*, **289**, 155–165.

Ziegler, F.D., Cavanagh, J., Lubowski, C. & Trimble, R.B. (1999). Novel *Schizosaccharomyces pombe* N-linked GalMan9GlcNAc isomers: role of the Golgi GMA12 galactosyltransferase in core glycan galactosylation. *Glycobiology*, **9**, 497–505.

Résumé

Candida albicans est une levure saprophyte présente dans la flore digestive humaine. Elle peut néanmoins devenir pathogène chez des individus immunodéficients et causer des infections sévères associées à de forts taux de mortalité. La paroi de *C. albicans*, en contact avec l'hôte, contient des β -1,2 oligomannosides (β -Man) liés à de multiples molécules pariétales telles que le phospholipomannane (PLM) ou le phosphopeptidomannane (PPM). Ces β -Man sont présents dans les espèces les plus pathogènes de *Candida* (principalement *C. albicans*, mais également *C. glabrata* et *C. tropicalis*) et sont considérés comme des facteurs de virulence. L'identification d'une famille de 9 gènes codant pour des β -mannosyltransférases (CaBmt) a permis une meilleure compréhension du rôle de 6 de ces enzymes. Des études de génétique inverse ont montré que la β -1,2-mannosylation du PPM était assurée par les enzymes CaBmt1 à 4, tandis que CaBmt5 et 6 étaient impliquées dans celle du PLM. Une première enzyme responsable de l'initiation de la β -mannosylation du PPM, CaBmt1, a donc été caractérisée dans l'équipe grâce à l'étude de l'activité d'une forme recombinante soluble.

L'objectif de cette thèse est de caractériser l'activité et la structure de CaBmt3, l'enzyme qui initie la polymérisation des β -Man suite à l'action de CaBmt1, pour mieux comprendre le mécanisme catalytique des β -1,2-mannosyltransférases. Ainsi, nous avons précisément identifié le substrat accepteur de CaBmt3 et défini ses paramètres enzymatiques. Par une approche combinant la diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS), la modélisation moléculaire *in silico* et la mutagenèse dirigée de protéines recombinantes, nous proposons un modèle structural et catalytique de CaBmt3 qui pourrait être étendu à l'ensemble de la famille. En parallèle, nous avons montré que des iminosucres mono- et multivalents étaient capables de moduler l'activité des β -mannosyltransférases. Enfin, nous avons amorcé le travail sur une dernière enzyme, CaBmt4, qui est susceptible de polymériser le β -Man initié par CaBmt1 et CaBmt3.

Pour conclure, ces travaux offrent une meilleure compréhension de la β -mannosylation du PPM de *C. albicans*. Ces études fonctionnelles, couplées aux avancées structurales, pourraient conduire à l'élaboration d'inhibiteurs de CaBmt et développer ainsi de nouvelles approches thérapeutiques contre les candidoses invasives.