



**HAL**  
open science

## Protéines et paroi chez *Aspergillus fumigatus*

Muriel Bernard-Cardona

► **To cite this version:**

Muriel Bernard-Cardona. Protéines et paroi chez *Aspergillus fumigatus*. Autre [q-bio.OT]. INAPG (AgroParisTech), 2003. Français. NNT : . tel-00005702

**HAL Id: tel-00005702**

**<https://pastel.hal.science/tel-00005702v1>**

Submitted on 5 Apr 2004

**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.

Institut National Agronomique  
de Paris Grignon  
Ecole doctorale ABIES  
16, rue Claude Bernard  
75231 Paris cedex 05

Unité des Aspergillus  
Institut Pasteur  
25, rue du Docteur Roux  
75024 Paris cedex 15

Aventis Pharma  
Département des Anti-  
Infectieux  
102, route de Noisy  
93235 Romainville

Thèse

Présentée par  
**Muriel BERNARD-CARDONA**

En vue de l'obtention du grade de  
**Docteur de l'Institut National Agronomique de Paris-Grignon**

**Protéines et paroi chez *Aspergillus fumigatus***

Soutenance le 28 mars 2003 devant le jury composé de :

Professeur Claude Gaillardin  
Professeur Richard Calderone  
Professeur Daniel Poulain  
Docteur Dominique Lebeller  
Docteur Jean-Paul Latgé

Président  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Directeur de thèse

I.N.A. P.G., Grignon  
Georgetown University, USA  
Université de Lille  
Aventis Pharma, Romainville  
Institut Pasteur, Paris

Institut National Agronomique  
de Paris Grignon  
Ecole doctorale ABIES  
16, rue Claude Bernard  
75231 Paris cedex 05

Unité des Aspergillus  
Institut Pasteur  
25, rue du Docteur Roux  
75024 Paris cedex 15

Aventis Pharma  
Département des Anti-  
Infectieux  
102, route de Noisy  
93235 Romainville

Thèse

Présentée par  
**Muriel BERNARD-CARDONA**

En vue de l'obtention du grade de  
**Docteur de l'Institut National Agronomique de Paris-Grignon**

**Protéines et paroi chez *Aspergillus fumigatus***

Soutenance le 28 mars 2003 devant le jury composé de :

Professeur Claude Gaillardin  
Professeur Richard Calderone  
Professeur Daniel Poulain  
Docteur Dominique Lebellier  
Docteur Jean-Paul Latgé

Président  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Directeur de thèse

I.N.A. P.G., Grignon  
Georgetown University, USA  
Université de Lille  
Aventis Pharma, Romainville  
Institut Pasteur, Paris

# ***REMERCIEMENTS***

Ce travail a été réalisé dans l'Unité des *Aspergillus* de l'Institut Pasteur sous la direction de Jean-Paul Latgé. Je voudrais d'abord adresser mes vifs remerciements à Jean-Paul pour m'avoir accueillie dans son laboratoire, m'avoir fait partager son expérience avec passion et m'avoir apporté tout son soutien lors de la rédaction de ce manuscrit.

Je remercie vivement Monsieur Daniel Poulain de l'Université de Lille et Monsieur Richard Calderone de l'Université de Georgetown aux Etats-Unis qui ont accepté de juger ce travail en tant que rapporteurs. Monsieur Claude Gaillardin de l'INAPG est assuré de toute ma sympathie d'avoir bien voulu suivre cette thèse pendant trois ans et de participer au jury de soutenance.

Monsieur Dominique Lebeller de Aventis Pharma est doublement remercié pour sa présence dans le jury mais aussi pour m'avoir permis de réaliser cette thèse en collaboration avec Aventis Pharma. Un grand merci aussi à Olivier Courtin pour m'avoir encouragé à faire cette thèse. Je voudrais aussi remercier Jean-Michel Bruneau ainsi qu'Eric Tagat pour leur collaboration dans les analyses en gel 2D.

J'adresse toute ma sympathie et ma reconnaissance à Thierry pour son enthousiasme et les discussions passionnantes que nous avons eues. Merci à toutes les personnes du laboratoire avec qui j'ai collaboré, qui ont su supporté toutes mes étourderies... et m'ont apporté toute leur expérience. Merci pour leur soutien, leur écoute, leurs conseils et leur bonne humeur...Merci Maria, Bruno, Oumaïma, Jacqueline, Corina, Sandrine, Sophie, Isabelle, Anne, Christine, Willy, Ramon, Thierry M., Michel, Catherine, Marc, Lucile,... C'était un réel plaisir de travailler avec vous.

Je voudrais remercier plus particulièrement Jean-Paul Debeaupuis et Marinette Cormier qui ont su m'apporter une aide précieuse lors de l'élaboration de ce manuscrit. Je ne saurais comment vous témoigner ma gratitude pour votre patience et votre gentillesse.

Enfin, un très grand merci à mes parents et à ma soeur pour leur affection et leur soutien inconditionnels, et surtout à Jean-Marc et Marine pour m'avoir soutenue tout au long de cette thèse et avoir accepté mes absences.



# SOMMAIRE

Résumé.....	4
Avant-propos.....	6
<b>1 CONNAISSANCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>8</b>
<b>1.1 <i>Aspergillus fumigatus</i> et aspergillose.....</b>	<b>8</b>
1.1.1 <i>Aspergillus</i> : un champignon saprophyte et ubiquitaire .....	8
1.1.1.1 Taxonomie, morphologie et génome.....	8
1.1.1.2 Biologie et écologie.....	9
1.1.2 <i>Aspergillus fumigatus</i> : un pathogène opportuniste .....	10
1.1.2.1 Pathologies aspergillaires .....	10
1.1.2.2 La pathogénicité .....	13
1.1.2.3 Les traitements .....	16
<b>1.2 La paroi de <i>Aspergillus fumigatus</i> .....</b>	<b>17</b>
1.2.1 Rôle de la paroi .....	18
1.2.1.1 Protection osmotique.....	18
1.2.1.2 Morphologie.....	18
1.2.1.3 Perméabilité.....	18
1.2.1.4 Réservoir de protéines et interactions avec les cellule-hôte .....	19
1.2.2 L'organisation des polysaccharides dans la paroi du mycélium de <i>A. fumigatus</i> .....	19
1.2.2.1 Méthode utilisée pour étudier les polysaccharides de la paroi de <i>A. fumigatus</i> .....	19
1.2.2.2 Les différents polysaccharides .....	20
1.2.2.3 Les liaisons inter-polysaccharidiques.....	22
1.2.2.4 Les polysaccharides de la paroi de la levure .....	24
1.2.3 Biosynthèse des polysaccharides pariétaux.....	26
1.2.3.1 Synthèse et dégradation de la chitine .....	26
1.2.3.2 Synthèse, dégradation et remodelage du $\beta$ -(1,3) glucane.....	31
1.2.3.3 Synthèse de l' $\alpha$ -(1,3) glucane .....	37
1.2.3.4 Synthèse du galactomannane.....	38
<b>1.3 Les protéines pariétales .....</b>	<b>39</b>
1.3.1 La glycosylation des protéines pariétales.....	39
1.3.1.1 La N-glycosylation.....	40
1.3.1.2 La O-glycosylation.....	43

1.3.1.3	La glycosylation par ancre glycosyl-phosphatidylinositol .....	45
1.3.2	Méthodes d'extraction des protéines pariétales .....	50
1.3.2.1	Extractions en vue de l'analyse des mannanes.....	52
1.3.2.2	Extractions chimiques en vue de l'analyse des polypeptides .....	52
1.3.2.3	Extractions enzymatiques.....	54
1.3.3	Liaisons entre protéines pariétales et différents polymères de la paroi.....	56
1.3.3.1	Liaisons protéine-protéine.....	57
1.3.3.2	Liaison protéines GPI- $\beta$ glucane .....	59
1.3.3.3	Liaisons protéines Pir- $\beta$ glucanes.....	68
1.3.3.4	Autres types de liaisons entre mannoprotéines et polysaccharides .....	71
<b>1.4</b>	<b>Revue : <i>Aspergillus fumigatus</i> cell wall : composition and biosynthesis</b>	
	<b>73</b>	
<b>2</b>	<b><i>PROJET DE THESE</i></b> .....	<b>82</b>
<b>3</b>	<b><i>RÉSULTATS</i></b> .....	<b>84</b>
<b>3.1</b>	<b>Characterization of a cell wall acid phosphatase (PhoAp) in <i>A. fumigatus</i></b> .....	<b>84</b>
<b>3.2</b>	<b>Galactomannoproteins of <i>Aspergillus fumigatus</i></b> .....	<b>95</b>
<b>3.3</b>	<b>Proteome analysis of <i>Aspergillus fumigatus</i> identifies glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins associated to the cell wall biosynthesis</b> .....	<b>118</b>
<b>3.4</b>	<b>Growth and cell wall organization of mutants of <i>Aspergillus fumigatus</i> affected in <math>\beta</math>-glucan and chitin biosynthesis</b> .....	<b>130</b>
<b>4</b>	<b><i>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES</i></b> .....	<b>149</b>
<b>4.1</b>	<b>Les protéines de la paroi</b> .....	<b>149</b>
4.1.1	Prépondérance des protéines solubles dans la paroi de <i>A. fumigatus</i> .....	149
4.1.2	Protéines fortement associées à la paroi de <i>A. fumigatus</i> .....	150

4.1.3	La liaison de PhoAp aux $\beta$ -1,3 glucanes.....	152
<b>4.2</b>	<b>Une nouvelle famille de protéines antigéniques glycosylées par du galactofuranose.....</b>	<b>154</b>
<b>4.3</b>	<b>L'analyse de mutants de paroi.....</b>	<b>155</b>
<b>4.4</b>	<b>Perspectives .....</b>	<b>156</b>
4.4.1	Rôle des protéines GPI dans la biosynthèse de la paroi de <i>A. fumigatus</i> .....	156
4.4.2	Rôle des protéines pariétales dans le métabolisme du phosphate .....	157
4.4.3	Synthèse de la chaîne de N-glycane associée aux galacto mannoprotéines.....	158
4.4.4	Actine et septines dans la cytokinèse chez <i>A. fumigatus</i> .....	159
<b>5</b>	<b><i>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES</i>.....</b>	<b>161</b>
<b>6</b>	<b><i>ANNEXE : ETUDE DE LA LIAISON PHOA-<math>\beta</math>(1,3) GLUCANES</i> .....</b>	<b>178</b>
<b>6.1</b>	<b>Analyse de l'affinité de PhoAp pour les <math>\beta</math>-(1,3) glucanes.....</b>	<b>178</b>
6.1.1	Méthodes.....	178
6.1.2	Résultats.....	179
<b>6.2</b>	<b>Analyse du peptide C-terminal d'une protéine.....</b>	<b>180</b>
6.2.1	Méthode .....	181
6.2.2	Résultats.....	182
<b>6.3</b>	<b>Marquage des sucres réducteurs par la 2'-amino-pyridine .....</b>	<b>183</b>
6.3.1	Méthodes.....	184
6.3.2	Résultats.....	185

## Résumé

La paroi du champignon filamentueux *A. fumigatus* conditionne la croissance et est responsable du maintien de l'intégrité cellulaire lors de l'infection. Les protéines de la paroi de ce champignon filamentueux n'avaient pas été étudiées jusqu'à présent alors qu'elles semblent jouer un rôle essentiel dans la structuration de la paroi de la levure modèle *S. cerevisiae*. Une approche essentiellement biochimique a permis de caractériser les protéines associées à la paroi de *A. fumigatus*. La majorité des protéines pariétales chez *A. fumigatus* sont des protéines solubles. Une seule protéine est relarguée à partir de la paroi par un traitement  $\beta$ - (1,3) glucanase : c'est une phosphatase acide qui possède une ancre GPI et dont l'expression est réprimée en présence de phosphate inorganique. Par ailleurs, une étude des protéines GPI chez *A. fumigatus* par génomique comparative a montré que les protéines GPI décrites comme associées de façon covalente à la paroi chez la levure n'ont pas d'homologue chez *A. fumigatus*. Ainsi, l'organisation des protéines au sein de la paroi de *A. fumigatus* est différente de celle de la levure : les protéines pariétales ne semblent pas avoir un rôle essentiel dans l'élaboration de la paroi. Ensuite, une nouvelle famille de glycoprotéines portant un N-glycane lié à un galactofuranose en position terminale a été décrite. Cette famille comprend : une phospholipase C, une phosphatase alcaline et une phytase. Enfin, une analyse morphologique de deux mutants chitine synthase et gluconosyltransférase a permis d'associer la réduction de la croissance à un hyper-branchement du mycélium et à une diminution de la taille de la cellule apicale sans que l'organisation globale des polysaccharides pariétaux et le taux de croissance spécifique soient affectés.

## Abstract

*A. fumigatus* is the major pathogen among filamentous fungi. Its cell wall is involved in cell growth and responsible for cellular integrity during infection. Cell wall proteins had not been studied before. Their study showed that : (i) the majority of proteins present in the cell wall are soluble proteins in transit to be secreted ; (ii) the main protein that is released by  $\beta$ - (1,3)glucanase treatment from an SDS/ $\beta$  mercaptoethanol-treated cell wall is an acid phosphatase that has been characterized enzymatically and is a GPI-anchored protein whose expression is repressed by phosphate ; (iii) a comparative genomic analysis has confirmed the biochemical study and showed that none of the GPI-anchored proteins covalently bound to polysaccharides in yeast have homologues in *A. fumigatus*. These results suggested that organization of proteins in *A. fumigatus* cell wall is different from what is known about *S. cerevisiae* and that cell wall associated proteins do not play an essential role in the structural organization of the cell wall of *A. fumigatus*. Besides, a new class of glycoproteins has been described : galactomannanproteins (GMP) having a N-glycan with a terminal galactofuransose. This study has shown that, in contrast to yeast cells, the GMPs do not have an N-glycan with a long N-mannan backbone. Finally, an analysis of morphogenesis growth of two cell wall mutants having a reduced growth and a pattern of GPI anchored proteins different from the parent strains showed that that reduced growth is associated to an hyperbranching of the mycelium and a reduced apical cell size. Although cell wall polysaccharides content was different, localization of these polysaccharides in the cell wall does not differ between each strain.

# ***AVANT-PROPOS***

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

Depuis 10 ans maintenant, *Aspergillus fumigatus* est la cause d'un nombre croissant de décès à l'hôpital. Cette situation est associée à l'augmentation des patients à risque consécutivement (1) au développement de chimiothérapies de plus en plus drastiques pour combattre les cancers, (2) à l'augmentation du nombre de transplantations d'organes (évalué à 500 000 par an dans le monde), (3) à l'utilisation croissante de traitements immunosuppresseurs pour traiter les maladies auto-immunes et (4) à la persistance d'infections au HIV.

Les antifongiques utilisés dans le traitement de l'aspergillose sont essentiellement au nombre de deux : l'Amphotéricine B et l'itraconazole. Même si des progrès ont été réalisés dans le domaine, suite à la commercialisation de nouveaux azolés ou de préparations lipidiques de l'Amphotéricine B, ou encore des candines qui sont des inhibiteurs de la synthèse des  $\beta$ -1,3 glucanes pariétaux, la mortalité due à l'aspergillose reste élevée en raison d'un diagnostic trop tardif et de l'efficacité insuffisante de ces antifongiques.

La paroi du champignon est le lieu privilégié des échanges entre la cellule et l'hôte et est indispensable à l'intégrité de la cellule fongique en jouant un rôle essentiel dans la résistance aux agressions externes et en particulier aux défenses des cellules immunitaires de l'hôte. Elle représente ainsi une cible potentielle pour de nouveaux antifongiques. L'étude de la paroi ou des mécanismes qui participent à son élaboration fait donc aujourd'hui l'objet de nombreuses études fondamentales et appliquées. Si ces études sont bien développées chez la levure modèle *S. cerevisiae*, les recherches centrées sur la paroi des champignons filamenteux pathogènes comme *A. fumigatus* restent limitées.

Les travaux abordés durant ma thèse sont centrés sur l'étude des protéines associées à la paroi de *A. fumigatus*. C'est un des aspects qui a totalement été ignoré jusqu'à ce jour dans l'analyse de la paroi de ce champignon filamenteux, alors que les travaux chez la levure

suggèrent un rôle essentiel de ces protéines dans la structuration de la paroi. Chez un champignon pathogène comme *A. fumigatus*, ces protéines pariétales présentent potentiellement un double intérêt : elles peuvent être impliquées soit dans les relations hôte – pathogène soit dans l’organisation de la paroi cellulaire.

**Connaissances  
bibliographiques**

# 1 CONNAISSANCES BIBLIOGRAPHIQUES

## 1.1 *Aspergillus fumigatus* et aspergillose

### 1.1.1 *Aspergillus* : un champignon saprophyte et ubiquitaire

#### 1.1.1.1 Taxonomie, morphologie et génome

Les *Aspergillus* sont des champignons filamenteux de la classe des Ascomycètes (Raper et Fennell, 1965) Aujourd'hui, le genre *Aspergillus* est constitué de plus de 150 espèces réparties en 6 sections (*Aspergillus*, *Nidulans*, *Fumigati*, *Clavati*, *Ornati* et *Circumdati*) et 18 groupes (Samson, 1999) sur la base de caractéristiques morphologiques, biochimiques, écologiques et génétiques.

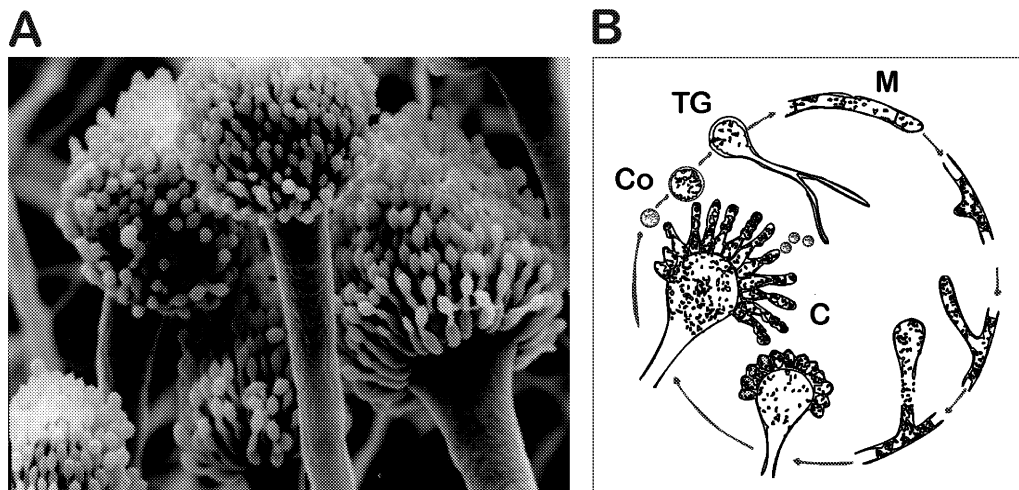


Figure 1 : *Aspergillus fumigatus*. (A) Conidiophores de *Aspergillus fumigatus* ; (B) Cycle biologique de *Aspergillus fumigatus* CO : conidie, TG : tube germinatif, M : mycélium, C : conidiophore.

Le cycle biologique de *A. fumigatus* est présenté dans la figure 1. La conidie, spore asexuée, est arrondie avec un diamètre de 2 à 3  $\mu\text{m}$  et de couleur vert-foncé (Samson, 1999). Cette conidie unicellulaire qui est normalement dormante gonfle et émet un tube germinatif dès qu'elle est placée dans un milieu aqueux contenant une source de carbone et d'azote appropriée (Figure 1). Ce tube germinatif évolue en un mycélium végétatif formé de filaments septés, ramifiés et multi-nucléés (Momany & Taylor, 2000). Lorsque le milieu est épuisé, des filaments différenciés aériens se terminant par une vésicule apparaissent. La vésicule porte



une rangée de phialides au sommet desquelles apparaissent les conidies qui sont groupées en chaînettes. Les chaînes de conidies peuvent atteindre 100 µm.

*A. fumigatus* est un organisme haploïde pour lequel aucun stade sexué n'est connu aujourd'hui. Les études de typage moléculaire, principalement réalisées par comparaison des polymorphismes de longueur des fragments de restriction (RFLP) visualisés par hybridation de Southern à l'aide d'une sonde moyennement répétée et l'étude du polymorphisme des microsatellites font apparaître une grande variabilité génétique entre souches de *A. fumigatus* (Chazalet et al., 1998, Latgé, 1999, Bart-Delabesse et al., 2001, Lasker et al., 2002). Un programme international de séquençage du génome d'une souche de *A. fumigatus* (AF293) est bien avancé et implique essentiellement le TIGR (The Institute for Genomic Research, USA) et le Sanger center (Angleterre). La taille du génome est évaluée à 28,7 Mb avec un ratio de GC de 50 %. Seuls 85 gènes avaient été auparavant séquencés et publiés sur un total de 11000 gènes estimés dans la séquence. La séquence de *A. fumigatus* obtenue par séquençage aléatoire (shotgun sequencing) représente aujourd'hui 10 équivalents génome et est disponible publiquement sur le site internet [www.tigr.org](http://www.tigr.org). Les données sont réparties en 1578 assemblages (contigs), ce qui représente plus de 94 % du génome de *A. fumigatus*. L'annotation débutera en mai 2003 (Denning et al., 2002).

### **1.1.1.2 Biologie et écologie**

*A. fumigatus* est un champignon aérobie saprophyte ubiquitaire qui joue un rôle important dans le recyclage du carbone et de l'azote organique. Sa niche écologique naturelle est le sol où il se développe sur la matière organique en décomposition. Il pousse très vite, la taille d'une colonie pouvant atteindre 4 +/-1 cm en une semaine sur un milieu synthétique Czapek Dox agar à 25°C (Latgé, 1999). C'est une espèce thermophile qui peut pousser jusqu'à 55°C et survivre jusqu'à 70°C. Du fait de ses propriétés thermophiles, de sa capacité de sporulation élevée et de l'absence de besoins nutritionnels spécifiques, il peut coloniser un grand nombre de substrats différents. Il est ainsi un habitant privilégié des composts et autres matières organiques en décomposition telles que fourrages humides, grains et farines avariées.

Bien que cette espèce ne soit pas la plus répandue dans le monde fongique, on retrouve ses spores dans l'air de tous les environnements. Une tête aspergillaire est capable de produire des centaines de conidies. Du fait de leur hydrophobicité et de leur petite taille, les conidies sont facilement dispersées dans l'air par les turbulences aériennes qui permettent aux conidies

de se détacher et de se disperser dans l'environnement. La concentration moyenne de spores d'*Aspergillus* dans l'atmosphère varie de 1 à 100 spores/m<sup>3</sup> et elle augmente largement en présence de poussière dans l'atmosphère (Goodley et al., 1994). Ainsi, l'inhalation des spores par l'homme est constante et quotidienne. En raison de sa présence permanente dans l'atmosphère, de sa thermophilie et de ses aptitudes saprophytiques, *A. fumigatus* est capable de se développer comme pathogène dans les voies aériennes de l'homme et de l'animal. Ce développement résulte à la fois des propriétés biologiques du champignon et de conditions générales ou locales prédisposantes qui seront discutées ci-dessous.

## 1.1.2 *Aspergillus fumigatus* : un pathogène opportuniste

### 1.1.2.1 Pathologies aspergillaires

Trois types d'aspergillose pulmonaire sont essentiellement rencontrés et sont caractérisés par des mécanismes physiopathologiques et immunologiques différents associés à un développement fongique d'importance variable (Tableau 1). La gravité de ces infections est très différente et va de la simple rhinite allergique à la mort du patient consécutivement à l'envahissement du poumon et d'autres organes (Stevens et al., 2000, Denning, 1998, Latgé, 1999).

**Tableau 1 : Comparaison des 3 types d'aspergilloses causées par *A. fumigatus*.**

Maladie	Etat immunitaire	Croissance mycélienne	Sévérité
Allergie	IC	-	-
Aspergillome et ABPA	IC	+	+
Aspergillose invasive	ID	+++	+++

IC : immunocompétent

ID : immunodéficient

### ***L'aspergillose allergique***

Une exposition prolongée aux spores de *Aspergillus* peut déclencher des crises d'asthme ou des rhinites allergiques chez des patients généralement atopiques. Dans ce cas, il n'y a pas de développement du champignon. Chez les asthmatiques anciens ou chez les enfants porteurs de mucoviscidose, il peut être à l'origine d'une aspergillose bronchopulmonaire allergique (ABPA) accompagnée d'un développement limité du champignon. Cette maladie se caractérise par la présence d'un infiltrat pulmonaire, d'une forte éosinophilie, de réactions d'hypersensibilité immédiate et de la présence de précipitines (fortes concentrations d'IgG et d'IgE anti-*Aspergillus*). Son évolution peut-être mortelle et il est donc essentiel d'améliorer le diagnostic de ce type d'aspergillose.

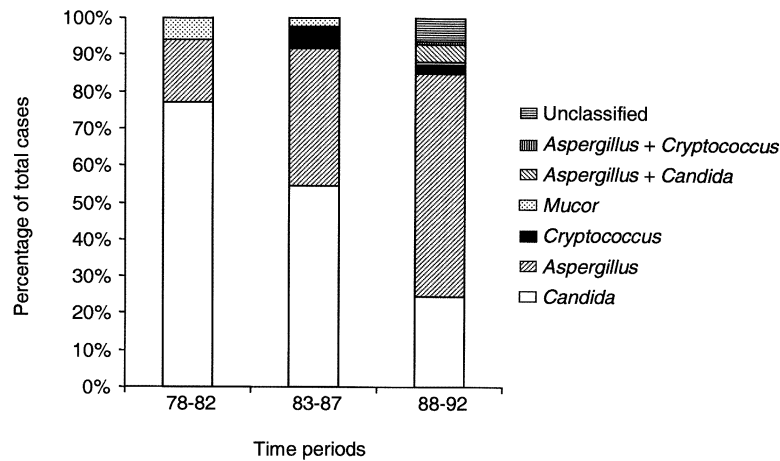
### ***L'aspergillome***

L'aspergillome est dû au développement du champignon dans une cavité pulmonaire pré-existante (kyste pulmonaire ou plus fréquemment cavités séquellaires d'une ancienne tuberculose). Cette cavité, en communication avec l'arbre bronchique, favorise l'aération du milieu nécessaire au développement des spores dès leur arrivée dans le poumon. L'absence ou l'insuffisance des défenses locales notamment phagocytaires sont des facteurs qui permettent la germination des spores et le développement d'une boule mycélienne. Cette masse fongique va combler progressivement la cavité. Les traitements antifongiques classiques, notamment à base d'Amphotéricine B, sont souvent peu efficaces dans le traitement de cette maladie (Denning et al., 1990).

### ***L'aspergillose invasive***

L'aspergillose pulmonaire invasive se caractérise par l'envahissement du parenchyme pulmonaire, des bronches et des vaisseaux par le mycélium. Le champignon peut s'étendre à d'autres organes (cerveau, cœur, reins...). Cette forme de maladie est le plus souvent mortelle.

Le nombre de cas d'aspergillose invasive (AI) n'a cessé d'augmenter au cours des dernières années (Groll et al., 1996, Denning, 2002). Parmi les infections fongiques invasives, l'incidence des aspergilloses est passée de 17 % entre 1978 et 1982 à 60 % entre 1988 et 1992, alors que celle des candidoses a chuté de 77% à 24% pendant la même période (Groll et al., 1996) (Figure 2). Cette diminution se note plus particulièrement chez les transplantés de moelle osseuse (Marr et al., 2002) où l'utilisation du fluconazole entraîne une baisse de la prévalence des candidoses (Ninin et al., 2001).



**Figure 2 : Prévalence des champignons pathogènes à l'hôpital de Francfort de 1978 à 1993 (d'après Groll et al., 1996).**

L'AI atteint essentiellement les patients immunodéprimés : l'incidence de l'AI est de 5 à 24 % chez les patients atteints de leucémie, 0,5 à 9 % chez les individus ayant subi une greffe de moelle osseuse et 0.5 à 26 % chez les patients ayant reçu une transplantation d'organe solide (Marr et al., 2002) (Tableau 2). L'AI se retrouve également chez les patients atteints du SIDA (jusqu'à 12% des cas). Par contre, elle est peu fréquente chez les patients immunocompétents (Latzgé, 1999).

**Tableau 2 : Incidence de l'aspergillose invasive en fonction de la pathologie sous-jacente (Denning, 1998).**

Conditions	Incidence (%)
Transplantation pulmonaire ou cœur-poumon	19-26
Granulomatose chronique	25-40
Leucémie aiguë	5-24
Greffe de moelle osseuse allogénique	4-9
Greffe de moelle osseuse autologue	0,5-6
SIDA	0-12
Transplantation hépatique	1,5-10
Transplantation rénale et cardiaque	0,5-10
Immunodéficience combinée sévère	3,5
Brûlure	1-7
Lupus érythémateux disséminé	1

Des espèces autres que *A. fumigatus* (Marr et al., 2002) telles que *A. flavus*, *A. terreus*, *A. niger* et *A. nidulans* peuvent être responsables d'infections chez l'homme (Wald et al., 1997). Une des caractéristiques essentielles des espèces de *Aspergillus* pathogènes est leur

capacité à pousser à 37°C (Denning, 1998). L'incidence des espèces non-*fumigatus* augmente depuis 1995 (18 % des lavages bronchoalvéolaires entre 1993 et 1995, 34 % entre 1996 et 1998) (Marr et al., 2002). *A. fumigatus* reste cependant responsable de la grande majorité des infections vues chez l'homme et cette espèce est devenue aujourd'hui le pathogène aérien le plus fréquent et le plus dangereux entraînant donc des infections invasives sévères le plus souvent fatales.

### ***1.1.2.2 La pathogénicité***

Un trait essentiel de la pathogénicité de *A. fumigatus* est son caractère opportuniste. Cette espèce ne devient pathogène que si elle rencontre des conditions générales et/ou locales de l'hôte favorables à son développement. La virulence de cette espèce ne pourra être comprise que si l'on prend en compte de concert les caractéristiques biologiques de cette espèce et le terrain immunologique sur lequel elle s'établit.

#### ***Facteurs fongiques***

Pour envahir son hôte, *A. fumigatus* doit être capable de résister aux défenses phagocytaires de l'hôte et d'envahir le parenchyme pulmonaire (Latgé, 2001). Les facteurs de virulence recherchés sont donc soit des molécules permettant une plus grande résistance à l'attaque phagocytaire, soit des enzymes favorisant le développement mycélien dans les tissus. La principale stratégie utilisée pour mettre en évidence les facteurs de virulence est basée sur la construction de mutants ayant une virulence atténuée dans des modèles murins d'aspergillose invasive. La production de mutants peut se faire de manière aléatoire ou par disruption de gènes codant pour des protéines ayant des activités enzymatiques a priori essentielles pour le développement du champignon dans les poumons. Ainsi, 4 types de facteurs ayant un rôle potentiel dans la virulence ont été mentionnés : les adhésines, les hydrolases, les toxines et les pigments (Tableau 3). Les hydrophobines (protéines hydrophobes appelées « rodlets »), qui sont présentes à la surface des conidies et sont responsables de leur hydrophobicité, permettent aux conidies de se fixer à certaines protéines hydrophobes de l'hôte comme le collagène. Les mutants dépourvus de rodlets sont toujours virulents mais la réponse inflammatoire est diminuée (Thau et al., 1994, Paris et al., 2003a). De nombreuses protéases sécrétées (métalloprotéase, dipeptidylpeptidase, sérine protéase ...) ont été décrites mais leur rôle dans la pathogénicité n'a pas été montré (Jaton-Ogay et al., 1994, Monod et al., 1995). *Aspergillus* produit également des superoxide dismutases (Holdom

et al., 1996) et des catalases (Calera et al., 1997, Paris et al., 2003b) qui lui permettent de se protéger des radicaux libres libérés par les cellules phagocytaires. Mais, comme dans le cas des hydrophobines, seul le double mutant catalase a une pathogénicité légèrement et transitoirement affectée. La gliotoxine, métabolite secondaire de *A. fumigatus* le plus étudié, réduit la phagocytose par les macrophages et les neutrophiles et induit l'apoptose de ces cellules mais il n'a pas été établi qu'elle contribue à la virulence de *A. fumigatus*. En revanche, la mélanine constituant la couche extérieure de la conidie et la protégeant ainsi des réactifs oxydants produits par les phagocytes a montré un rôle important dans la pathogénicité (Jahn et al., 2000). Les souches qui ont une croissance réduite ou qui ne germent pas *in vivo* pour des problèmes d'auxotrophie sont aussi affectées dans leur virulence (Brown et al., 1998, D'Enfert, 1999, Latgé, 2002). Cependant, aucune souche de *A. fumigatus* avirulente n'a pu être construite à ce jour et reste le « Graal » de tous les mycologues étudiant la virulence de cette espèce.

Les résultats obtenus à ce jour suggèrent ainsi que la virulence de *A. fumigatus* serait multifactorielle. Une analyse par transcriptome des gènes exprimés de façon différentielle *in vivo* pourrait permettre de mettre en évidence les voies métaboliques essentielles à la virulence. Une telle étude est aujourd'hui possible grâce au séquençage du génome de cet organisme.

**Tableau 3 : Les facteurs potentiels de virulence étudiés chez *A. fumigatus*.**

Catégories	Molécules	Rôle dans la virulence
Toxines	Rnase	non
	Gliotoxine	
Enzymes	Sérine protéase	non
	Aspartic protéase	non
	Métalloprotéases	non
	Catalases	limité
Adhésines	Hydrophobines	limité
Pigments	Enzymes de biosynthèse de la mélanine	oui

### ***Facteurs de défense de l'hôte***

Le premier mécanisme de défense qui élimine les conidies est l'action du battement ciliaire qui dirige la majorité des conidies, piégées dans le mucus de l'épithélium bronchique vers le tractus digestif (Latgé, 2001). Les conidies de *A. fumigatus* peuvent aussi être internalisées par les cellules épithéliales et échapper ainsi aux mécanismes de défense de

l'hôte pour servir d'inoculum potentiel consécutivement à l'immunosuppression du patient (Paris, et al, 1997, Wasynlka et al., 2002).

La deuxième et principale ligne de défense de l'organisme pour éliminer les spores de *A. fumigatus* dans les poumons est représentée par les macrophages alvéolaires (MA). La reconnaissance de la conidie par le macrophage alvéolaire (MA) a été peu étudiée. Néanmoins des interactions de type lectine semblent être impliquées dans l'adhérence et l'ingestion de la conidie. Le récepteur au mannose et au fucose ainsi que deux autres récepteurs inhibés par du  $\beta$ -glucane et des chitoooligosaccharides ont été suggérés comme étant impliqués dans le phénomène d'adhésion (Kan & Bennett, 1991, Kan & Bennett, 1988) mais aucun récepteur spécifique n'a pu être identifié à ce jour. Après phagocytose, les conidies gonflent dans le MA, y compris chez les patients immunocompétents. Le processus d'élimination des conidies est relativement lent. Seulement 10 % des conidies phagocytées sont tuées après 6 heures de phagocytose. Les mécanismes antimicrobiens responsables de l'élimination des conidies sont les réactifs oxydants (Ibrahim-Granet et al., 2003, Philippe et al., 2003).

La troisième ligne de défense est assurée par les polynucléaires neutrophiles (PN) qui interviennent lorsque les conidies ont germé. Les PN activés ont la capacité d'adhérer aux hyphes aspergillaires (Kozel et al., 1996) qui ne peuvent pas être phagocytés en raison de leur grande taille. Le contact entre hyphes et PN déclenche la sécrétion de réactifs oxydants et d'enzymes par dégranulation. L'élimination est rapide (50 % des hyphes sont tués après 2 heures d'incubation).

L'immunosuppression, notamment due aux corticoïdes, a de nombreux effets négatifs sur les réactions de défense de l'hôte vis à vis d'*Aspergillus*. Elle diminue notamment l'efficacité des défenses phagocytaires de l'hôte. Elle altère aussi l'intégrité de la muqueuse respiratoire. En outre, les traitements immunosuppresseurs perturbent aussi les cellules T et les cellules dendritiques. Or, des études récentes ont montré un rôle de l'immunité acquise dans la lutte contre l'infection aspergillaire chez la souris et chez l'homme. La résistance aux infections causées par *A. fumigatus* dépendrait d'une réponse de type Th1 tandis que le développement d'une infection s'accompagnerait d'une réponse de type Th2 qui est stimulée par les corticoïdes (Cenci et al., 1999, Cenci et al, 1997, Bozza et al., 2002, Hebart et al 2002, Graziutti et al., 2001).

### 1.1.2.3 Les traitements

Actuellement, deux principaux antifongiques l'Amphotéricine B (AmB) de la famille des polyènes et l'itraconazole de la famille des azolés sont utilisés pour traiter les aspergilloses. Malgré une bonne activité *in vitro*, l'efficacité de ces médicaments *in vivo* contre *A. fumigatus* reste limitée, ce qui, associé à un diagnostic tardif, est la raison principale de la mortalité élevée observée chez les patients atteints d'aspergillose invasive.

L'AmB se fixe sur l'ergostérol des membranes fongiques, créant ainsi des canaux transmembranaires qui créent des déséquilibres dans les flux ioniques à travers les membranes. Cependant l'AmB peut aussi se fixer aux cholestérols des membranes des mammifères et est donc responsable d'une toxicité secondaire importante.

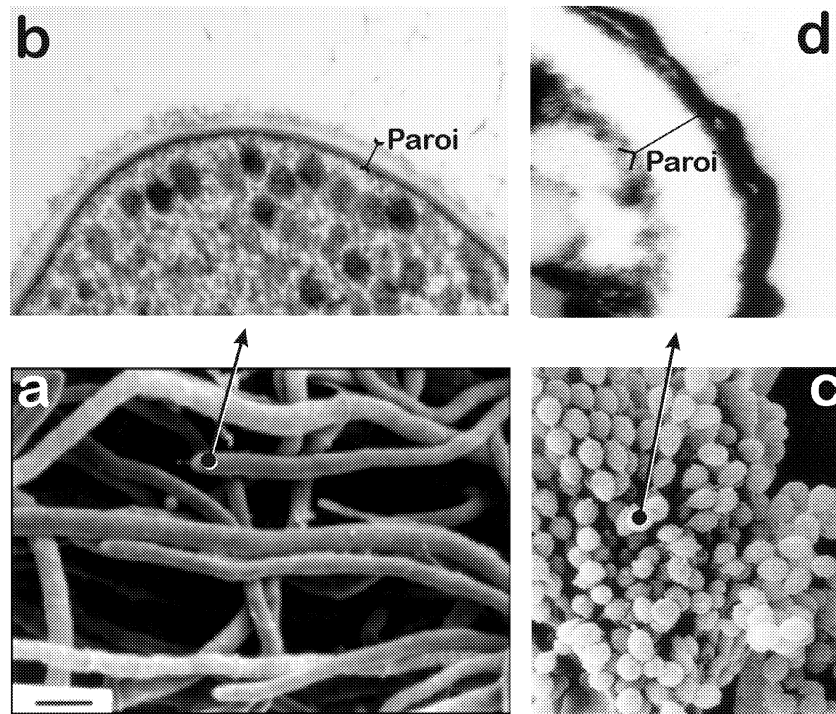
Le mode d'action des azolés est très bien connu. La fonction azole rentre en compétition avec le fer au niveau du cytochrome P450 et inhibe ainsi la synthèse de l'ergostérol, ce qui entraîne une altération de la fluidité de la membrane. L'itraconazole se fixe faiblement au cytochrome P450 des cellules mammifères, d'où une faible toxicité du médicament pour l'homme. Des souches d'*Aspergillus* résistantes à l'itraconazole ont été cependant identifiées récemment (Tkacz & DiDomenico, 2001).

Des progrès ont été réalisés dans le traitement des aspergilloses grâce à l'apparition sur le marché de nouveaux azolés (voriconazole, posaconazole, ravuconazole) qui ont un spectre d'action plus large que les azolés classiques et à l'amélioration des formulations de l'AmB et de l'itraconazole qui permet une meilleure utilisation des antifongiques. Cependant, la mortalité est toujours élevée chez les patients atteints d'AI. Il est donc nécessaire de mettre au point de nouveaux antifongiques et d'identifier de nouvelles cibles spécifiques aux champignons. La paroi a été reconnue depuis de nombreuses années, comme une cible potentielle puisque les polysaccharides qui la constituent sont spécifiques du champignon et ne sont pas rencontrés chez l'homme. Les enzymes intervenant dans leur synthèse sont donc des cibles privilégiées. Ce concept s'est trouvé récemment vérifié par le développement d'inhibiteurs de la glucane synthase (caspofungine, anidulafungine, micafungine) qui présentent une activité fongicide contre de nombreux champignons. Notamment, la caspofungine, soluble dans l'eau, qui est actuellement utilisée en clinique sous le nom de Cancidas s'est révélée efficace pour le traitement des aspergilloses invasives notamment chez des patients en échec thérapeutique ou intolérants aux traitements antifongiques déjà disponibles (Groll & Walsh, 2001).



## 1.2 La paroi de *Aspergillus fumigatus*

*A. fumigatus*, comme tous les champignons, possède une paroi qui non seulement protège la cellule fongique du monde extérieur mais qui est aussi essentielle aux échanges entre cellule fongique et environnement et à ce titre joue donc un rôle dans les relations hôte-pathogène. Cette paroi constitue une matrice extracellulaire entourant la membrane plasmique et a une épaisseur moyenne de 100-200 nm. Elle représente 15-25 % du poids sec de la cellule chez la levure et les champignons filamenteux (Fleet, 1991). La paroi est une structure complexe constituée essentiellement de polysaccharides et de protéines dont la composition varie en fonction de l'environnement et du stade fongique considéré, conidie ou mycélium (Bernard et Latgé, 2001). Par exemple, au contraire de la paroi mycélienne qui est caractérisée par la présence d'une seule couche transparente aux électrons, la paroi de la conidie est composée de deux couches : une couche externe dense et pigmentée (constituée de mélanine) et une couche interne transparente aux électrons (Figure 3).



**Figure 3 : Caractéristiques ultrastructurales de la paroi du mycélium (a, b) et de la conidie (c, d) de *A. fumigatus*. a, c, Microscopie à balayage ; b, d, Coupe en microscopie électronique à transmission de la paroi du mycélium ou de la conidie (A noter la couche extérieure de mélanine dense aux électrons dans la paroi de la conidie). Grossissement : a, x2000, b, x10 000, c, x1000, d, x100 000 (Bernard & Latgé, 2001).**

Une revue bibliographique centrée sur la paroi de *A. fumigatus* a déjà été publiée (Bernard et Latgé, 2001) (voir chapitre 1.4). Seuls seront repris ici les points essentiels permettant de comprendre l'organisation structurale et la biosynthèse de la paroi de ce champignon filamenteux et de l'analyser comparativement à celle des levures *S. cerevisiae*, *S. pombe* et *C. albicans*.

## **1.2.1 Rôle de la paroi**

### ***1.2.1.1 Protection osmotique***

La paroi préserve l'intégrité osmotique de la cellule. Sans paroi et en absence de stabilisateur osmotique, les protoplastes, cellules sans paroi, lysent. La sensibilité osmotique peut être retrouvée consécutivement à une mutation affectant un composé essentiel de la paroi. Par exemple, l'addition de chlorure de potassium (KCl) 0,6 M restaure des phénotypes de certains mutants chitine synthase de *A. fumigatus* (Aufauvre-Brown et al., 1997 ; Mellado et al., 2003).

### ***1.2.1.2 Morphologie***

La paroi est une structure rigide, mais dotée d'une grande plasticité, et évolutive puisqu'elle entoure les diverses propagules rencontrées chez cette espèce : conidie, conidie gonflée, tube germinatif polarisé, branchement, vésicule, phialides,... qui ont des morphologies très différentes. A ce jour, une seule mutation dans des gènes impliqués dans la biosynthèse de la paroi a été rapportée comme s'accompagnant de modifications de la morphologie des conidies. Il s'agit du double mutant *chse/chsg* de *A. fumigatus*, dont les conidies ne sont pas sphériques mais ont des formes allongées (Mellado et al., 2003).

### ***1.2.1.3 Perméabilité***

La paroi constitue une barrière sélective : sa perméabilité détermine l'influx ou l'efflux de molécules. La taille des molécules pouvant traverser la paroi n'a pas été étudiée chez *A. fumigatus*. L'analyse de cette perméabilité est pourtant essentielle car elle intervient notamment dans la pénétration des molécules antifongiques. En outre, les conidies gonflées sont beaucoup plus sensibles à l'action des réactifs oxydants produits par les macrophages que les conidies dormantes (Philippe et al, 2003). On ne connaît pas les déterminants de la

porosité pariétale même si un rôle des mannoprotéines pariétales a été mis en avant chez *S. cerevisiae* (Zlotnik et al., 1984, De Nobel, 1990a, 1990b, 1991).

#### ***1.2.1.4 Réservoir de protéines et interactions avec les cellule-hôte***

La paroi protège la cellule fongique de son environnement. Dans le cas d'un champignon pathogène comme *A. fumigatus*, la paroi à la fois du mycélium et des conidies joue un rôle majeur dans la protection du champignon vis à vis des mécanismes de killing par les phagocytes pulmonaires. La couche d'hydrophobines présente à la surface de la conidie confère un caractère hydrophobe à ces conidies (structure en rodlets) et intervient dans le contact avec l'hôte (Girardin et al., 1999). Les mutants ne possédant pas cette couche de rodlets adhèrent moins au collagène (Thau et al., 1994) et sont moins sensibles au killing par les macrophages alvéolaires (Paris et al., 2003). Enfin, la couche de mélanine en surface des conidies les protège des mécanismes oxydatifs des phagocytes (Jahn et al., 2000).

La paroi est aussi un réservoir de molécules fongiques ayant un rôle actif lors de l'infection : molécules d'adhésion, enzymes hydrolytiques (Latgé, 1999). Un des exemples d'enzymes hydrolytiques est la sérine protéase Alpp de *A. fumigatus* qui intervient dans l'hydrolyse des protéines du parenchyme pulmonaire et qui a été localisée par immunofluorescence dans la paroi (Moutaouakil et al., 1993). Les récepteurs de surface permettant aux conidies de *A. fumigatus* d'adhérer spécifiquement aux protéines de l'hôte ou de la membrane basale n'ont pas été identifiés (collagène, laminine,...) (Coulot et al., 1994). La paroi est également une source de molécules antigéniques soit polysaccharidiques comme le galactomannane (Jensen et al., 1993), soit protéiques telles que la dipeptidyl peptidase V (Kobayashi et al., 1993), la catalase (Calera et al., 1997) et la ribonucléase (Latgé et al., 1991, Jensen et al., 1993).

### **1.2.2 L'organisation des polysaccharides dans la paroi du mycélium de *A. fumigatus***

#### ***1.2.2.1 Méthode utilisée pour étudier les polysaccharides de la paroi de *A. fumigatus****

La figure 4 montre les différents traitements utilisés pour solubiliser les polysaccharides de la paroi du mycélium de *A. fumigatus*, étape nécessaire avant de pouvoir

les analyser. Un traitement avec NaOH 1M en présence de NaBH<sub>4</sub> à 70°C permet de fractionner les polysaccharides de la paroi en deux groupes, selon leur solubilité dans la soude à chaud. La fraction alcali-soluble est principalement constituée de  $\alpha(1,3)$ -glucane et de galactomannane (tableau 4). La fraction alcali-insoluble, qui est la fraction considérée comme responsable de la rigidité de la paroi, représente 40 % du poids sec de la paroi et elle contient en majorité des  $\beta$ -1,3 glucanes, du galactomannane et de la chitine (tableau 4). Cette fraction a été analysée en détail par Fontaine et al. (2000). Des digestions enzymatiques avec une  $\beta(1,3)$ -glucanase et une chitinase recombinantes ont permis d'isoler différentes fractions contenant chacune des liaisons inter-polysaccharides spécifiques. Ces fractions ont été purifiées par chromatographie liquide (gel filtration et chromatographie d'échange d'ions) et caractérisées par GC-MS et RMN.

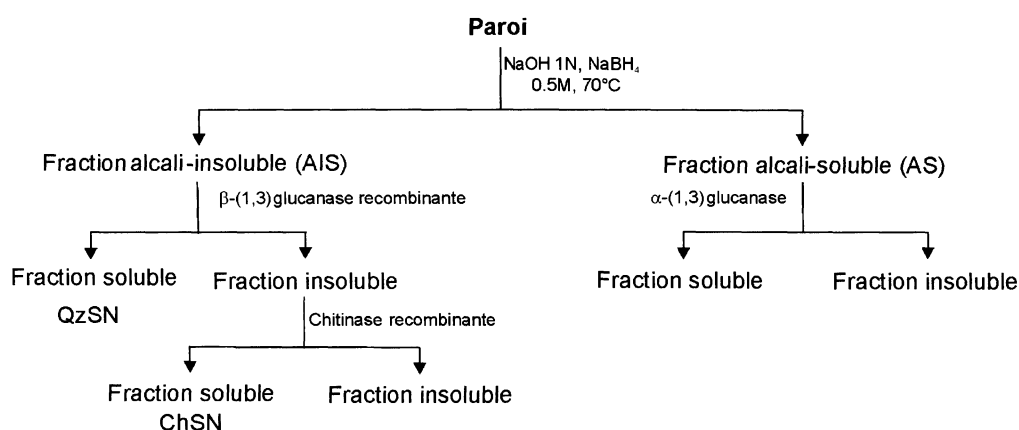


Figure 4 : Protocole d'extraction des polysaccharides de la paroi de *A. fumigatus*.

### 1.2.2.2 Les différents polysaccharides

#### Le $\beta$ -1,3 glucane

Comme chez tous les champignons, c'est un des polysaccharides majoritaires de la paroi de *A. fumigatus*. Il représente 22 % des polysaccharides pariétaux. Il est branché en  $\beta(1,6)$  avec un pourcentage de points de branchement de 4%. Avec son grand nombre d'extrémités non réductrices, il constitue ainsi le point d'ancrage d'une structure tridimensionnelle.

L'ultrastructure de ce polysaccharide n'a pas été étudiée chez *A. fumigatus*. Chez la levure, le  $\beta(1,3)$ -glucane pariétal constitue un réseau de fibres visible en microscopie électronique (Kopecka et al., 1974). Des études réalisées chez *S. cerevisiae* tout d'abord *in vitro* sur du  $\beta(1,3)$ -glucane isolé puis sur des cellules entières par RMN ont montré une

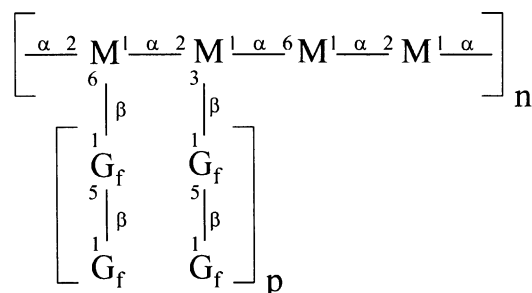
conformation des chaînes de  $\beta(1,3)$ -glucane en hélice. Ces hélices sont composées d'une seule chaîne ou de trois chaînes liées entre elles par liaisons hydrogènes. Ces hélices (0,5 à 1 nm de diamètre) sont ensuite associées entre elles pour constituer les fibres de 10 à 30 nm (Kopecka & Kreger, 1986).

### **La chitine**

C'est un homopolymère constitué d'un enchaînement linéaire de résidus de N-acétylglucosamine liés entre eux par des liaisons  $\beta(1,4)$ . Les chaînes de chitine sont associées de façon anti-parallèle par des ponts hydrogènes pour former des microfibrilles capables de retenir le Calcofluor White (Minke et Blackwell, 1978). La chitine, présente dans la partie alcali-insoluble de la paroi de *A. fumigatus*, représente 7% du poids sec de la paroi.

### **Le galactomannane**

Le galactomannane est un polysaccharide présent chez les genres *Aspergillus* et *Penicillium* (Sakagushi et al., 1969, Gander, 1974, Barreto-Bergter et al., 1980). Chez *A. fumigatus*, c'est un composé majoritaire de la paroi (25% du poids sec de la paroi). Il est présent à la fois dans la partie alcali-soluble et dans la partie alcali-insoluble de la paroi et est aussi sécrété dans le milieu de culture. La structure en peigne du galactomannane est très particulière. Le squelette de mannane est constitué d'une chaîne linéaire d'unités répétées d' $\alpha$ -(1,2) mannotétraose liées entre elles par une liaison en  $\alpha$ -(1,6). Les chaînes latérales sont constituées en moyenne de 4 à 5 résidus galactofuranose liés en  $\beta$ -(1,5) et reliés au carbone en position 3 ou 6 des mannoses liés en  $\alpha$ -(1,2) (Figure 5). (Latgé et al. 1994 ; Fontaine et al. 2000).



**Figure 5 : Structure du galactomannane (Latgé et al., 1994). M, mannose ; G<sub>f</sub>, galactofuranose ; p a une valeur moyenne de 4 à 5 ; n est évalué à 10.**

### ***L'α-1,3 glucane***

L'α(1,3)glucane est uniquement rencontré dans la fraction alcali-soluble de la paroi de *A. fumigatus*. Il représente 41% de cette fraction. Il est présent dans la paroi de nombreux champignons filamenteux ou dimorphiques tels *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidoides brasiliensis*, *Blastomyces dermatidis* ainsi que *Schizosaccharomyces pombe* mais n'est pas présent chez *Candida albicans* et *Saccharomyces cerevisiae* (Eissenberg et al., 1997). Il s'agit d'un polysaccharide linéaire dont l'organisation a été peu étudiée jusqu'à présent.

### ***Autres composés***

Un β(1,3)/(1,4) glucane, jamais décrit auparavant chez les autres champignons, a été mis en évidence par Fontaine et al. (2000) dans la fraction alcali-insoluble. Des résultats de RMN et de méthylation ont montré que cette chaîne linéaire serait liée à l'extrémité non réductrice du β-(1,3)glucane branché.

Un polysaccharide contenant de la galactosamine identifié à partir de la paroi de *A. fumigatus* pourrait être similaire au polygalactosamine sécrété par *A. parasiticus* (Takada et al., 1981). Chez *A. fumigatus*, il est aussi présent dans le milieu de culture où il devient rapidement insoluble (T. Fontaine, résultats non publiés). Bien que ce polygalactosamine soit rencontré dans la fraction insoluble, aucune expérience n'a montré que ce polymère était associé de façon covalente à d'autres polymères de la paroi.

**Tableau 4 : Composition de la fraction alcali-soluble et de la fraction alcali-insoluble chez *A. fumigatus* d'après Fontaine et al. (2000) et Morelle (communication personnelle).**

	Fraction alcali-soluble (60%)	Fraction alcali-insoluble (40%)
β-1,3 glucane	-	22%
α-1,3 glucane	41%	-
Chitine	-	7%
Galactomannane	16%	9%
Polygalactosamine	3%	2%

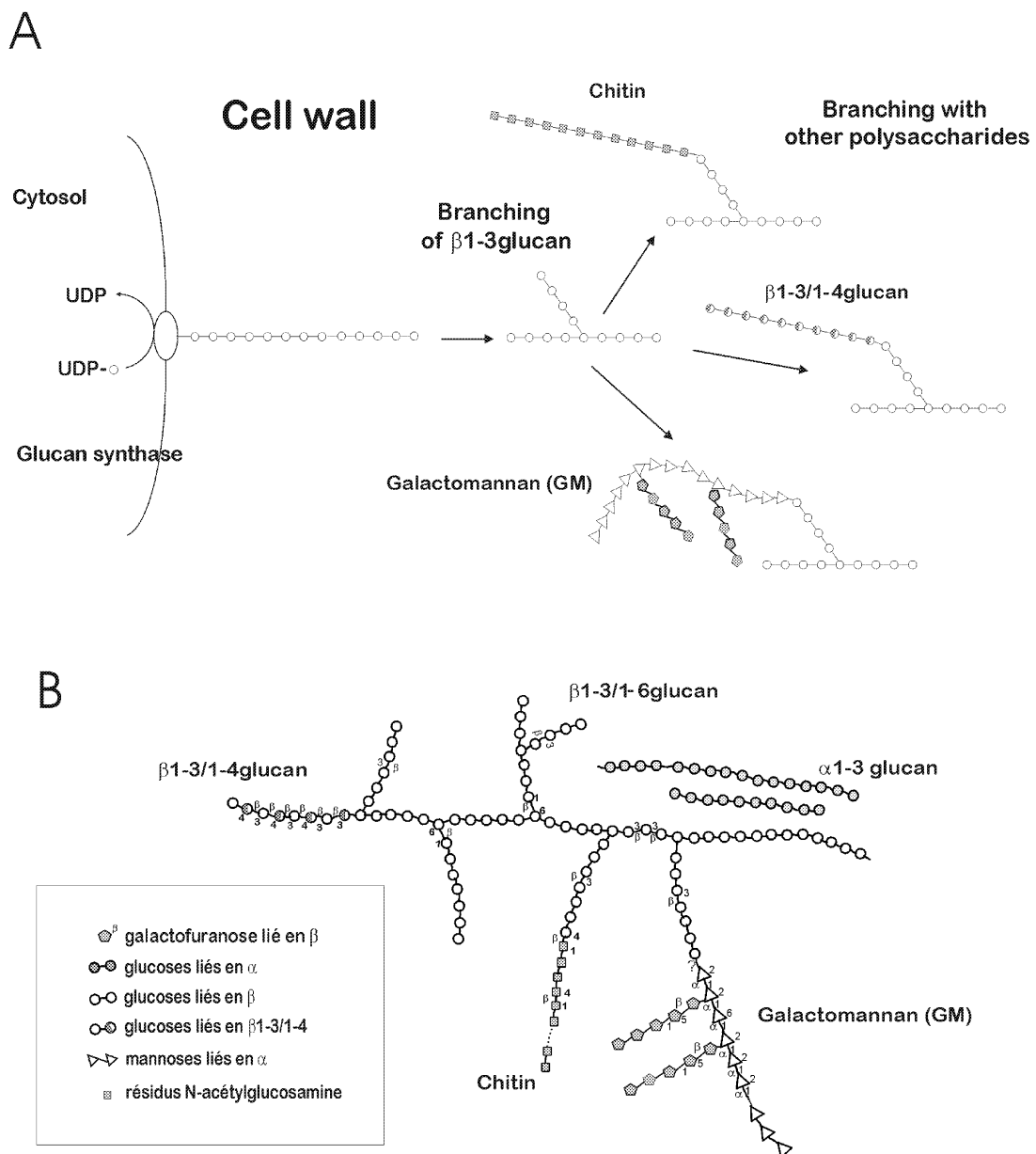
### ***1.2.2.3 Les liaisons inter-polysaccharidiques***

Les différents composants structuraux décrits précédemment sont associés les uns aux autres par des liaisons d'interaction hydrogènes ou hydrophobes et des liaisons covalentes.

Une des liaisons essentielles, reconnue comme responsable de la rigidité et de l'insolubilité de la paroi chez la levure, est la liaison entre le  $\beta(1,3)$  glucane et la chitine. La liaison  $\beta(1,3)$  glucane-chitine mise en évidence chez *A. fumigatus* (Fontaine et al., 2000) est identique à celle existant chez *S. cerevisiae* (Kollar et al., 1995). Elle est caractérisée par un lien en  $\beta(1,4)$  entre l'extrémité réductrice de la chaîne de chitine et l'extrémité non réductrice de la chaîne de  $\beta(1,3)$  glucane. L'activité responsable de la formation de cette liaison qui serait essentielle à la rigidité de la paroi est une cible potentielle pour les antifongiques mais n'a pas été décrite à ce jour. Chez *C. albicans*, la liaison qui a été mise en évidence entre le C-1 du glucose et le C-6 de la N-acetylglucosamine est différente de celle rapportée chez *A. fumigatus* et *S. cerevisiae* (Surarit et al., 1988).

Chez *A. fumigatus*, l'étude de la fraction alcali insoluble a montré que le galactomannane est aussi lié de façon covalente au  $\beta(1,3)$  glucane. Cette liaison est sensible à l'acétolyse, ce qui suggère que le galactomannane est lié à l'extrémité non réductrice du  $\beta(1,3)$  glucane via une liaison  $\alpha(1,6)$ . Cependant l'absence d'endo-mannanase connue à ce jour rend difficile l'identification définitive de la liaison entre le galactomannane et le  $\beta(1,3)$  glucane. Le  $\beta(1,3)/(1,4)$  glucane est lui aussi rattaché à l'extrémité non réductrice du  $\beta(1,3)$  glucane.

Les connaissances accumulées à ce jour nous permettent d'ébaucher une chronologie des évènements ayant lieu lors de la biosynthèse des polysaccharides pariétaux : (1) la biosynthèse du  $\beta(1,3)$  glucane et de la chitine sont les premières étapes de l'organisation de la paroi ; (2) le branchement du  $\beta(1,3)$  glucane, se traduisant par une augmentation des extrémités non réductrices libres et donc des sites accepteurs, est indispensable et se trouve être le deuxième évènement dans l'élaboration de la paroi ; (3) il est suivi par la formation de liaisons covalentes entre le  $\beta(1,3)/\beta(1,6)$  glucane et la chitine, le galactomannane et le  $\beta(1,3)/\beta(1,4)$  glucane. Ceci constitue alors le cœur du réseau tridimensionnel de la paroi du champignon (Figure 6).



**Figure 6 : (A) Chronologie des évènements impliqués dans la biosynthèse des polysaccharides pariétaux de *A. fumigatus*. (B) Organisation générale de ces polysaccharides dans la paroi.**

#### 1.2.2.4 Les polysaccharides de la paroi de la levure

Des différences majeures existent dans la composition en polysaccharides de la paroi de la levure et des champignons filamenteux tels que *A. fumigatus* (Tableau 5). Par exemple, les chaînes de β(1,6)-glucane, élément essentiel de la paroi de *S. cerevisiae* (10% du poids sec) et de *C. albicans* (20% du poids sec), n'existent pas chez *A. fumigatus* (Fontaine et al., 2000). Les mannoprotéines qui représentent 40% de la paroi de la levure n'ont pas été décrites chez *A. fumigatus*. Au contraire, la paroi de ce champignon renferme de l'α(1,3)-glucane



(41%), du galactomannane (25%), un polymère de  $\beta(1,3)/\beta(1,4)$  glucane et de la polygalactosamine qui ne sont pas retrouvés chez *S. cerevisiae*.

La paroi des levures présente plusieurs couches mises en évidence en microscopie électronique (Osumi, 1998). Une couche interne transparente et amorphe et une couche externe, dense, constituée de fibrilles perpendiculaires à la surface sont observées. La couche interne est composée du  $\beta(1,3)$  glucane et du  $\beta(1,6)$  glucane qui assurent le maintien et la résistance mécanique de la paroi. La couche externe est constituée de mannoprotéines. Une structure similaire a été observée chez *C. albicans* (Lajeau-Chaffin et al., 1998). Le  $\beta(1,3)$  glucane et le  $\beta(1,6)$  glucane sont associés de façon covalente. Les  $\beta$ -glucanes représentent 60% de la paroi et sont divisés en trois groupes selon leur solubilité dans la soude et l'acide : 35 % d'entre eux, insolubles dans la soude et l'acide, sont des  $\beta(1,3)$  glucanes possédant 3% de branchement et un degré de polymérisation (DP) de 1500, 5% d'entre eux, solubles dans l'acide, sont des  $\beta(1,6)$  glucanes très branchés (15% de points de branchement) de DP 140 et les 20% restant (DP 1400), soluble dans la soude et insoluble dans l'acide, correspondent à du  $\beta(1,3)$  glucane (80%) lié à du  $\beta(1,6)$  glucane (10%) qui peut être associé à des résidus mannose (Fleet, 1991). Le  $\beta(1,3)$  glucane est également associé de façon covalente à la chitine (Kollar et al., 1995). Bien qu'étant un composé minoritaire de la paroi de la levure (1 à 2%), la chitine est essentielle ; elle est présente particulièrement au niveau des cicatrices de bourgeonnement, des septa et des apex (Munro et Gow, 2001). La chitine a un DP évalué à 100 : 40 à 50% de la chitine semble associée au  $\beta(1,3)$  glucane, alors que le reste serait libre (Kollar et al., 1995). Un complexe  $\beta(1,6)$  glucane-chitine a également été décrit, suggérant une association directe du  $\beta(1,6)$  glucane à la chitine (Kollar et al., 1997). Chez un mutant déficient en  $\beta(1,3)$  glucane synthase (*fks1*) ce complexe devient prépondérant (Dijkgraaf et al., 2002).

Les associations covalentes protéines-polysaccharides seront discutées en détail dans le chapitre 1.3.

**Tableau 5: Composition en polysaccharides de la paroi de *A. fumigatus*, *S. cerevisiae* et *C. albicans*.**

	<i>A. fumigatus</i> <sup>a</sup>	<i>S. cerevisiae</i> <sup>b</sup>	<i>C. albicans</i> <sup>c</sup>
β-1,3 glucane	22%	50-55%	40%
β-1,6 glucane	-	5-10%	20%
Chitine	7%	1-2%	1-2%
Mannoprotéines	?	35-40%	35-40%
β-1,3/β-1,4 glucane	oui	-	-
Galactomannane	25%	-	-
Polygalactosamine	5%	-	-
α-1,3 glucane	41%	-	-

<sup>a</sup> : Fontaine et al., 2000, <sup>b</sup>: Klis et al., 2002, <sup>c</sup> : Klis et al., 2001

### 1.2.3 Biosynthèse des polysaccharides pariétaux

Les différents polysaccharides pariétaux décrits ci-dessus sont synthétisés à partir de sucres nucléotidiques présents à l'intérieur de la cellule. Ceci explique que les enzymes impliquées dans la synthèse des polysaccharides fibrillaires de la paroi soient situées soit au niveau de la membrane plasmique, soit au niveau de l'appareil de Golgi. En revanche, les enzymes impliquées dans le remodelage de la paroi telles les hydrolases et les transglycosidases devraient être plutôt situées au niveau de la paroi, dans l'espace périplasmique.

#### 1.2.3.1 Synthèse et dégradation de la chitine

##### *Synthèse*

La chitine synthase (CHS) catalyse la polymérisation de la N-acétyl glucosamine (GlcNAc) à partir d'uridine diphosphate N-acétyl glucosamine ((UDP)-GlcNAc). Chez *A. fumigatus*, 7 gènes chitine synthase, *CHSA* à *CHSG*, ont été identifiés à ce jour (Aufauvre-Brown et al., 1997, Mellado et al., 1995, Mellado et al., 1996a, 1996b), ce qui suggère que la

biosynthèse de la chitine est plus complexe chez les champignons filamenteux que chez la levure. Les CHS des champignons filamenteux ont été divisées en six classes (de I à VI) sur la base de leur séquence en acides aminés (Tableau 6). Les classes I à III sont zymogéniques (activables par la trypsine) tandis que les classes IV à VI ne sont pas zymogéniques. Les classes III, V et VI ont seulement été identifiées chez les champignons filamenteux. Les protéines codées par les gènes *CHSA*, *CHSB* et *CHSC* montrent de fortes homologies de séquence avec Chs1p et Chs2p de *S. cerevisiae* (Mellado et al., 1995) et appartiennent respectivement aux classes I, II et III. Un autre gène de la classe III *CHSG*, dont le produit présente 78% d'homologie avec celui de *CHSC*, a été identifié (Mellado et al., 1996a). Les gènes *CHSD*, *CHSE* et *CHSF* sont, quant à eux, homologues à *CHS3* codant pour la chitine synthase non zymogénique de *S. cerevisiae* avec 34%, 54% et 80% d'identité respectivement (Mellado et al., 1995) et appartiennent aux classes V, IV et VI respectivement.

De façon intéressante, les mutants ayant le phénotype le plus important sont ceux qui résultent de l'inactivation des gènes de chitine synthase appartenant aux classes III et V (Tableau 6) (Mellado et al., 1996a, 1996b, Aufauvre-Brown et al., 1997). En effet, seules les mutations dans les gènes *CHSE* et *CHSG* induisent une modification de la croissance. L'inactivation des gènes *CHSA*, *CHSB* et *CHSD* ne conduit à aucun phénotype particulier (Mellado et al., 1996b). L'invalidation de *CHSD* provoque une diminution de 20% de la chitine présente dans la paroi par rapport au sauvage mais aucune différence au niveau de la morphologie, de l'activité chitine synthase et de la virulence n'a pu être mise en évidence. Par ailleurs, bien que *CHSC* appartienne à la classe III, aucune différence entre le mutant *chsC* et la souche sauvage n'a pu être observée (Mellado et al., 1996a). Par contre, la délétion du gène *CHSG* produit une souche dont la croissance en milieu solide est réduite ; en outre, le mycélium est très branché, la conidiation est réduite et l'activité chitine synthase mesurée *in vitro* est diminuée de 70% par rapport à la souche sauvage. Néanmoins, la quantité de chitine dans la paroi est la même pour le sauvage et le mutant. Pour le mutant *chsE*, d'importantes modifications morphologiques par rapport à la souche sauvage ont pu être observées : impossibilité de sporuler en absence d'un stabilisateur osmotique, présence de spores anormalement gonflées avant la germination et d'hyphes périodiquement gonflés. De plus, la quantité de chitine dans la paroi est diminuée de 25% environ bien que l'activité chitine synthase *in vitro* ne soit pas affectée.

**Tableau 6 : Caractéristiques des chitine synthases de *A. fumigatus*.**

Chitine synthase			Propriétés du mutant				
Classe	Gène	Zymogène	Contenu en chitine <sup>a</sup>	Activité chitine synthase <sup>a</sup>	Croissance <sup>a</sup>	Morphologie du mycélium	Conidiation <sup>a</sup>
I	<i>CHSA</i>	Oui	ND <sup>b</sup>	ND	100	Identique	100
II	<i>CHSB</i>	Oui	ND	ND	100	Identique	100
III	<i>CHSC</i>	Oui	100	100	100	Identique	100
	<i>CHSG</i>	Oui	100	30	30	Plus branché	Affectée <sup>d</sup>
IV	<i>CHSF</i> <sup>c</sup>	Non	-	-	-	-	-
V	<i>CHSE</i>	Non	75	100	70	Hyphes gonflés	1
VI	<i>CHSD</i>	Non	80	100	100	Identique	100

<sup>a</sup> Pourcentage par rapport à la souche sauvage

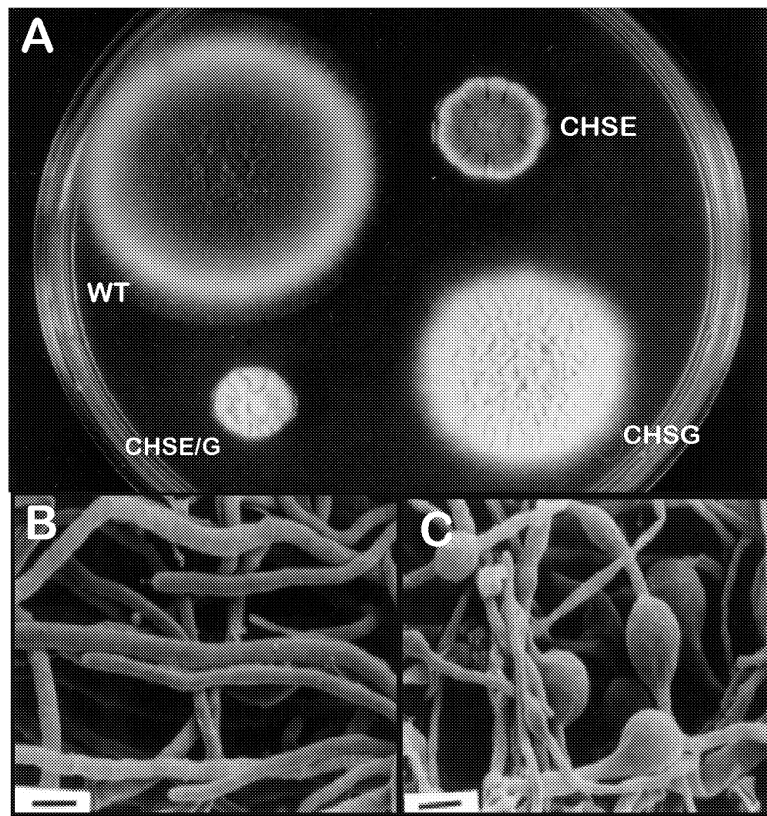
<sup>b</sup> ND : non déterminé

<sup>c</sup> Gène cloné mais disruption non réalisée

<sup>d</sup> Pas quantifiée

Une double disruption des deux seuls gènes *CHSE* et *CHSG*, pour lesquels la simple disruption se traduisait par un phénotype de croissance réduite, a été récemment obtenue. Le phénotype du double mutant est seulement additif (Mellado et al., 2003). Le mutant *chsE/chsG* est caractérisé par : (1) une activité chitine synthase réduite en présence ou non de trypsine, (2) une croissance réduite en milieu solide, (3) une quantité de chitine dans la paroi réduite de 50% et (4) des modifications morphologiques importantes. L'effet seulement additif de la double mutation suggère que les deux gènes *CHSG* et *CHSE* sont impliqués dans deux voies morphogénétiques différentes. Deux hypothèses peuvent expliquer que ce double mutant soit encore viable : (1) un ou plusieurs des cinq gènes non touchés de la famille multigénique CHS peu(ven)t compenser l'effet de la double disruption, (2) des réactions compensatoires impliquant la synthèse d'autres composés pariétaux peuvent avoir lieu. Chez ce double mutant de *A. fumigatus* la diminution de chitine est notamment compensée par la synthèse d'un autre polysaccharide qui est l' $\alpha$ -(1,3)glucane. Cependant, la localisation et la

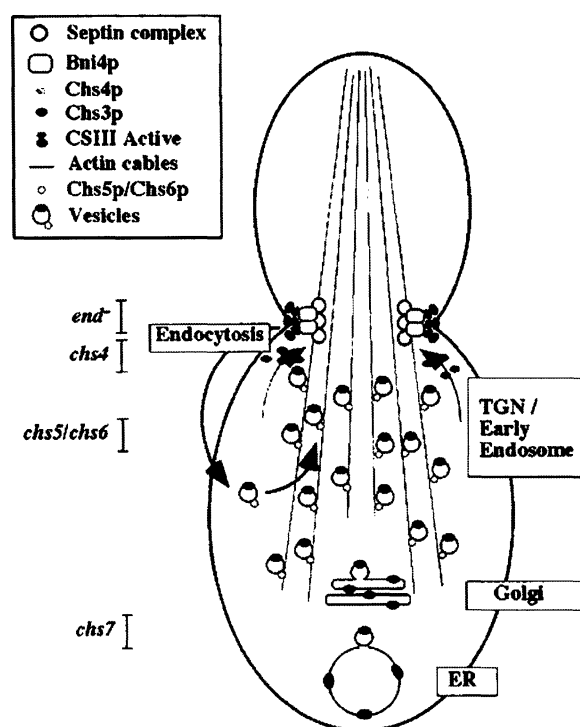
fonction exacte des différentes chitine synthases de *A. fumigatus* et des champignons filamenteux en général restent à ce jour inconnues.



**Figure 7 : Morphologie des mutants chitine synthase. A, croissance sur milieu gélosé (sabouraud, 2% agar) de la souche sauvage (WT) et des mutants *chse*, *chsg* et *chse/g*. B, C, Photos en microscopie électronique du mycélium de la souche sauvage (B) et du mutant *chse* (C) (Mellado et al., 2003, Mellado et al., 1996a, Aufauvre-Brown et al., 1997).**

Chez *S. cerevisiae*, la synthèse de la chitine a été étudiée en détail (Bulawa, 1993). Elle est sous le contrôle de trois gènes *CHS1*, *CHS2* et *CHS3* qui codent pour des protéines transmembranaires dont le domaine catalytique est situé au niveau de la face cytoplasmique. (Bulawa et al., 1986, Silverman et al., 1988, Valdivieso et al., 1991). Chs1p joue un rôle de réparation au niveau de la cicatrice de bourgeonnement entre la cellule mère et la cellule fille. Chs2p est impliquée dans la synthèse du septum primaire. Chs3p catalyse la formation de 90% de la chitine pariétale et pourrait être responsable de l'augmentation de la quantité de chitine induite lors d'une mutation ou d'un stress environnemental (Valdivieso et al., 2000, Garcia-Rodriguez et al., 2000). La mutation de l'un de ces gènes conduit à une diminution de la quantité de chitine dans la paroi. Seule la double mutation *chs2/chs3* est létale. Par ailleurs, la localisation cellulaire et l'activité de Chs3p au cours de la division cellulaire sont régulées

par des protéines codées par les gènes *CHS4*, *CHS5*, *CHS6* et *CHS7* (Figure 8, Roncero, 2002). Chs4p serait un activateur traductionnel de Chs3p (Trilla et al., 1997, Ono et al., 2000) qui de plus interagirait avec la septine Bni4p (Bud Neck Involved 4) pour localiser Chs3p au niveau du col de bourgeonnement (DeMarini et al., 1997). *CHS4* aurait un homologue chez *S. cerevisiae*, *SHC1*, qui serait transcrit au cours de la sporulation (Sanz et al., 2002). Chs5p et Chs6p interviennent dans le transport et la localisation de Chs3p au niveau des sites de biosynthèse de la chitine (Santos et al., 1997, Santos & Snyder, 1997, Ziman et al., 1998). Chs6p serait impliquée dans le transport des endosomes qui contiennent Chs3p (Valdivia et al., 2002). Chs7p est spécifiquement impliquée dans l'exportation de Chs3p du réticulum endoplasmique vers l'appareil sécrétoire, elle aurait un rôle de chaperone (Trilla et al., 1999). Des homologues des gènes *CHS4*, *CHS5* et *CHS7* ont été trouvés dans le génome de *A. fumigatus* mais ils n'ont pas été étudiés à ce jour et on ne sait pas s'il jouent le même rôle que chez *S. cerevisiae*. *CHS6* n'a pas d'homologue chez *A. fumigatus*.



**Figure 8 : Représentation schématique des protéines Chsp chez *S. cerevisiae*. Le trafic intracellulaire de Chs3p à travers l'appareil de sécrétion, du réticulum endoplasmique au septum. Les traits à gauche indiquent la localisation de Chs3p dans le cas où la protéine régulatrice agissant à ce niveau est absente (d'après Roncero, 2002).**

## **Dégradation**

Différentes activités chitinases ont été détectées dans le filtrat de culture, la paroi et la fraction cytosolique de *A. fumigatus* (Hearn et al., 1998). La plupart des chitinases intracellulaires ne semblent pas glycosylées et sont sensibles à la chaleur. Par contre, les chitinases sécrétées semblent hautement glycosylées (retenues sur Con A), sont relativement stables à la chaleur, et sont parmi les composés les plus immunogènes de la cellule étant donné leur affinité pour des anticorps de sera de patients souffrant d'aspergilloses. La plupart des chitinases détectées ont un pI acide compris entre 3,3 et 4,5. Cependant, à l'exception d'un polypeptide de 45 kDa aucune chitinase n'a été purifiée ou identifiée par son poids moléculaire. Chez *A. fumigatus* aucune activité chitinase n'a été caractérisée à ce jour. La recherche dans la base TIGR du génome de *A. fumigatus* a mis en évidence une dizaine d'homologues des chitinases *CTS1* et *CTS2* de *S. cerevisiae*. Seulement deux chitinases ont été clonées (Adams, communication personnelle) mais le phénotype des mutants n'a pas été publié à ce jour.

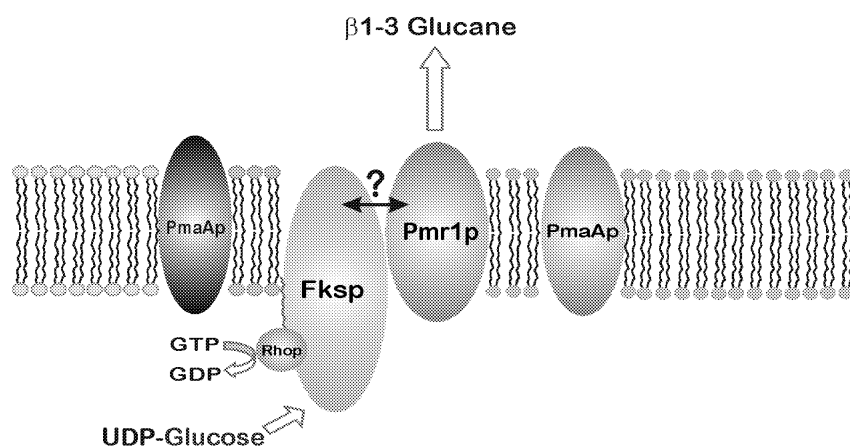
Seuls deux gènes *CTS1* et *CTS2* codant pour des chitinases ont été identifiés chez *S. cerevisiae* (Kuranda & Robbins, 1987, Pishko et al., 1995). *Cts1p* est une protéine pariétale hautement glycosylée, fixée de façon non covalente à la paroi (Cappellaro et al., 1998). Elle détruit la chitine du septum primaire synthétisée par *Chs2p*. Le gène *CTS2* intervient au cours de la sporulation. Sa disruption entraîne une modification de la surface des spores.

### **1.2.3.2 Synthèse, dégradation et remodelage du $\beta$ -(1,3) glucane**

#### **Activité de synthèse**

La réaction de synthèse du  $\beta$ -(1,3) glucane met en jeu le transfert d'une unité de glucose sur une chaîne en cours d'élongation à partir d'UDP-glucose. Comme pour la chitine, aucun accepteur lipidique ou protéique servant d'ancre pour ces polysaccharides néosynthétisés n'a été identifié. Le  $\beta$ -(1,3) glucane est synthétisé par un complexe glucane synthase associé à la membrane plasmique (Douglas et al., 1994a, Douglas, 2001 ; Beauvais et al., 1993 ; Beauvais et al., 2001). Chez *A. fumigatus*, l'activité  $\beta$ -(1,3) glucane synthase est mise en évidence dans les préparations membranaires solubilisées à l'aide de CHAPS. Elle est activée par le GTP ou des homologues du GTP et nécessite la présence de sucrose, de NaF et d'EDTA.

Chez *A. fumigatus*, un seul gène homologue de *FKS1* de *S. cerevisiae* a été identifié. *AjFKS1* est un gène de 6,5 kb avec deux introns aux extrémités C- et N-terminales qui est pratiquement identique au gène *FKS1* de *A. nidulans* (90% d'identité des acides aminés et même position des introns). C'est une protéine avec 16 segments transmembranaires. Ce gène *AjFKS1* unique est essentiel chez *A. fumigatus* (Firon et al., 2002). De plus, 4 membres de la famille des GTPases Rho ont été clonés et séquencés chez *A. fumigatus* : *RHO1* à *RHO4* (Beauvais et al., 2001). Le gène *RHO1* comprend 949 pb et 4 introns et code pour une protéine de 21 kDa qui est très homologue aux Rho1p de *S. pombe* et *S. cerevisiae*. Enfin, le complexe glucane synthase peut être purifié par « product entrapment » et a permis un enrichissement de Fksp et de 3 autres protéines : Rho1p, une protéine de 100 kDa homologue à une ATPase membranaire et une protéine de 160 kDa homologue à des ABC transporteurs bactériens de  $\beta$ -(1,2) glucane. Ainsi on peut imaginer que la protéine à 160 kDa est une protéine qui facilite le transport du  $\beta$ -(1,3) glucane vers l'espace périplasmique après sa synthèse par Fks1p (Figure 9).



**Figure 9 : Organisation hypothétique du complexe  $\beta$ -(1,3) glucane synthase de *A. fumigatus* (Bruneau, 2001). PmaA : homologue d'une ATPase membranaire, Pmr1 : homologue d'un ABC transporteur de  $\beta$ -(1,2) glucane.**

Chez *S. cerevisiae*, c'est l'analyse de mutants résistants à une échinocandine et à la Papulacandine B et de souches hypersensibles à FK506 (inhibiteur de la calcineurine) qui a permis de caractériser le gène *FKS1* codant pour la sous-unité catalytique de la  $\beta$ -(1,3) glucane synthase (Douglas et al., 1994b, Eng et al., 1994, Inoue et al., 1995, Ram et al., 1995). Un gène homologue à 88% à *FKS1*, *FKS2*, a été ensuite identifié (Inoue et al., 1995). La régulation de leur activité est différente (Mazur et al., 1995) : la transcription de *FKS2* est activée par le  $\text{Ca}^{++}$  de façon dépendante à la calcineurine tandis que celle de *FKS1* ne l'est pas.



*FKS1* prédomine en croissance sur glucose tandis que *FKS2* est exprimé en absence de glucose. Le double mutant *fks1/fks2* est létal. Un troisième gène *FKS3* homologue aux deux autres a été identifié mais ce gène n'intervient pas dans la synthèse des  $\beta$ -(1,3) glucanes et jouerait plutôt un rôle de transporteur (Bussey, communication personnelle).

L'identification initiale de la protéine Rho1p comme la sous-unité régulatrice du complexe  $\beta$ -(1,3) glucane synthase a été effectuée chez *S. cerevisiae* en deux temps : (1) des mutants *rho1* présentent une activité glucane synthase réduite (Mazur & Baginsky, 1996) et (2) après séparation des activités régulatrices et catalytiques par solubilisation différentielle par le Tergitol NP40, Rho1p a été mise en évidence dans la fraction contenant l'activité régulatrice.

L'activation de Rho1p est sous la dépendance des GEF (Guanine Exchange Factors) Rom1p et Rom2p (Rho1 Multifactor suppressor) qui remplacent le GDP associé à Rho1p par le GTP. L'inactivation de Rho1p quant à elle dépend des GAP (GTPase Activating Proteins), dont Sac7p, qui hydrolysent le GTP. Rho1p est aussi impliquée dans l'activation de la voie de la protéine kinase Pkc1p qui est elle-même au sommet d'une cascade de MAP kinases et coordonne la synthèse des composants de la paroi en réponse à des signaux extracellulaires. Cependant, Sekiya-Kawasaki et al. (2002) ont montré récemment que les activateurs de Rho1p intervenant dans la cascade de MAP kinases et dans la régulation de l'activité  $\beta$ -(1,3) glucane synthases pouvaient être différents (Figure 10).

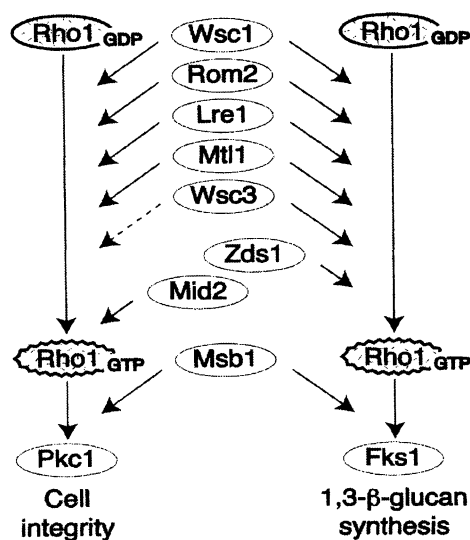


Figure 10 : Régulation de la synthèse des  $\beta$ -(1,3) glucanes (d'après Sekiya-Kawasaki et al., 2002).

## **Dégradation**

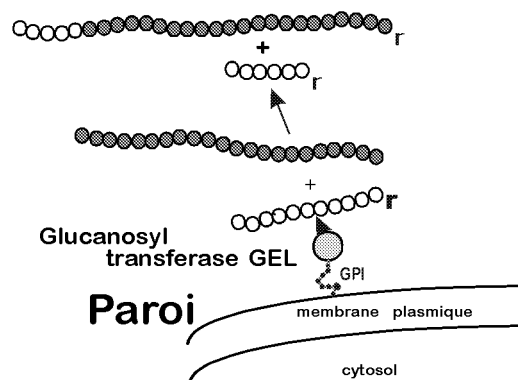
Plusieurs  $\beta$ -(1,3) glucanases ont été isolées à partir de la paroi de *A. fumigatus*. Ces glucanases appartiennent à deux classes : les exo- $\beta$ -(1,3) glucanases libérant les résidus glucose situés à l'extrémité non réductrice des chaînes de  $\beta$ -(1,3) glucane, et les endo- $\beta$ -(1,3)glucanases clivant à l'intérieur des chaînes de  $\beta$ -(1,3) glucane pour libérer un mélange d'oligosaccharides.

Une endo- $\beta$ -(1,3) glucanase (Eng1p) et 2 exo- $\beta$ -(1,3) glucanases (ExgIp et ExgIIp) ont été purifiées à partir d'un autolysat de parois de *A. fumigatus* et caractérisées biochimiquement (Fontaine et al., 1997a, 1997b, Mouyna et al., 2002). Une troisième activité exo- $\beta$ -(1,3) glucanase a été mise en évidence mais la protéine n'a pas été étudiée. Tandis que ExgIp hydrolyse exclusivement le  $\beta$ -(1,3) glucane d'une taille minimale de 4 résidus, ExgIIp est capable d'hydrolyser le  $\beta$ -(1,6)glucane, le  $\beta$ -(1,3)glucane et le *p*-nitrophényl- $\beta$ -D-glucoside. L'endo-glucanase est une protéine de 74 kDa qui hydrolyse spécifiquement le  $\beta$ -(1,3) glucane linéaire d'une taille minimale de 5 résidus glucose. La présence de cette enzyme dans la paroi, sa capacité à hydrolyser les longues chaînes de glucane et son expression constitutive à toutes les étapes de la croissance indépendamment de la présence d'un substrat  $\beta$ -(1,3)glucane soluble ou insoluble dans le milieu de culture suggèrerait que cette enzyme pouvait avoir un rôle dans l'hydrolyse de structures pariétales existantes, permettant ainsi le branchement des hyphes, l'émergence de tubes germinatifs ou la formation d'extrémités réductrices ou non réductrices nécessaires aux activités  $\beta$ -(1,3) glucanosyltransférases. Cependant, l'absence de phénotype chez le mutant *eng11* et l'absence d'homologue suggère que cette endo- $\beta$ -(1,3) glucanase ne joue pas un rôle essentiel dans la morphogénèse de *A. fumigatus*.

## **Remodelage des $\beta$ -(1,3)glucanes**

Les chaînes de  $\beta$ -(1,3) glucane synthétisées *in vitro* par le complexe  $\beta$ -(1,3) glucane synthase à partir de préparation membranaires et d'UDP-glucose sont linéaires et restent alcali-solubles. Les réactions de transglycosylation et enzymes responsables de l'établissement des liaisons entre les  $\beta$ -(1,3) glucanes et les autres polysaccharides pariétaux restent totalement inconnues. Seule une activité  $\beta$ -(1,3) glucanosyltransférase (GEL) a été mise en évidence récemment chez *A. fumigatus* (Hartland et al., 1996, Mouyna et al., 2000a, 2000b). Cette enzyme coupe une molécule de  $\beta$ -(1,3) glucane et transfère l'extrémité réductrice libérée lors de l'hydrolyse sur l'extrémité non réductrice d'une autre molécule de

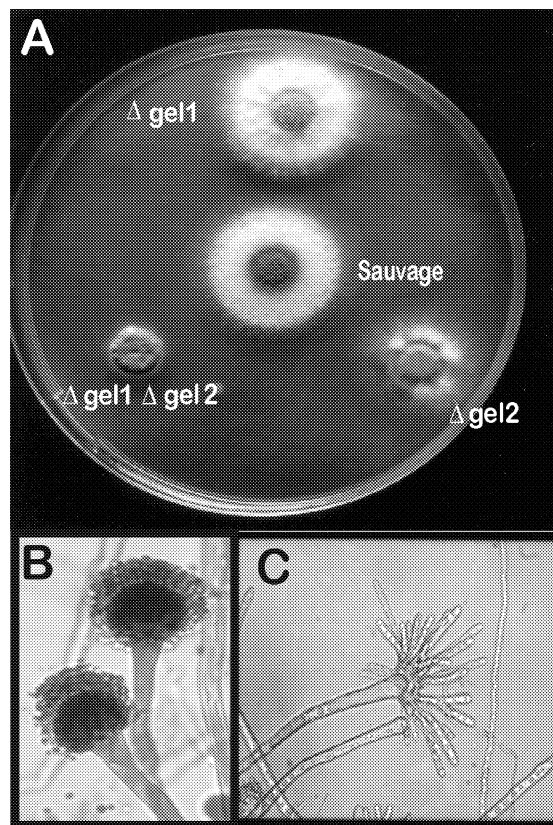
$\beta$ -(1,3) glucane. La génération d'une nouvelle liaison en  $\beta$ -(1,3) entre l'accepteur et le donneur se traduit par l'élongation des chaînes de  $\beta$ -(1,3) glucane. Chez *A. fumigatus*, la famille GEL comprend 6 gènes, *GEL1* à *GEL6* (Mouyna et al., 2003). Les Gelps sont homologues à plusieurs familles de gènes présentes chez les levures : *GAS* chez *S. cerevisiae*, *PHR* chez *C. albicans*, *CGG* chez *C. glabrata* et *EPD* chez *C. maltosa* qui sont nécessaires à une morphogénèse correcte des levures sans que la fonction biochimique de ces protéines ait été identifiée au moment de l'obtention des mutants (Nuoffer et al., 1991, Vai et al., 1991, Popolo et al., 1993, Saporito-Irwin et al., 1995, Muhlschlegel et al., 1997, Nakasawa et al., 2000). Des expériences biochimiques réalisées avec les protéines recombinantes Gas1p de *S. cerevisiae*, Phr1p et Phr2p de *C. albicans* ont montré que toutes ces protéines ont une activité glucanosyltransférase similaire à celle de Gellp. Gellp est une protéine attachée à la membrane par une ancre glycosyl phosphatidylinositol (GPI) comme ses homologues chez la levure. Un schéma hypothétique de son activité enzymatique *in situ* est présenté dans la figure 11.



**Figure 11 : Mode d'action des  $\beta$ -(1,3) glucanosyltransférases de la famille GEL dans la paroi de *A. fumigatus*.**

Parmi les six gènes de la famille GEL, seuls *GEL1*, *GEL2* et *GEL4* sont exprimés dans les conditions standards de culture. Les mutants *gell*, *gel2* ainsi que le double mutant *gell/gel2* ont été construits. Le mutant *gell* n'a pas de phénotype tandis que le mutant *gel2* et le double mutant *gell/gel2* ont une croissance réduite et des têtes aspergillaires anormales qui apparaissent en culture liquide agité alors que la souche sauvage ne sporule pas en condition agitée (Figure 12). Pour ces deux mutants, la concentration en hexosamine et le rapport Hexose AS / Hexose AS sont augmentés. En outre, les protéines et polysaccharides sécrétés dans le milieu de culture par le mutant ont une composition différente (Mouyna et al.,

soumis). Par ailleurs, le mutant *gel1/gel2* est moins virulent que la souche sauvage dans un modèle expérimental d'aspergillose invasive.



**Figure 12 : Morphologie des mutants glucanosyltransférases. A, croissance sur milieu gélosé (Sabouraud, 2% agar) de la souche sauvage (WT) et des mutants *gel1*, *gel2* et *gel1/gel2*. B, C, Photos en microscopie optique du mycélium de la souche sauvage (B) et du mutant *gel1/gel2* (C).**

Une autre activité glucanosyl transférase (Bgt1p), homologue à Bgl2p de *S. cerevisiae* et de *C. albicans* a été mise en évidence chez *A. fumigatus* (Mouyna et al., 1998). Cette enzyme relargue un laminaribiose à partir de l'extrémité réductrice de la chaîne de  $\beta$ -(1,3) glucane et associe le glucane restant à une nouvelle molécule de  $\beta$ -(1,3) glucane avec une liaison en  $\beta$ -(1,6). Comme chez la levure, le mutant ne montre pas de phénotype particulier par rapport au sauvage. Ceci suggère donc que cette enzyme ne joue pas un rôle prépondérant dans la morphogenèse de la paroi et en particulier dans l'assemblage des polysaccharides pariétaux. Ce qui n'est pas surprenant puisque cette enzyme requiert des extrémités réductrices libres pour fonctionner. Ceci indique aussi que toutes les activités glucanosyltransférases présentes dans la paroi ne sont pas essentielles à la biosynthèse de la paroi.

### 1.2.3.3 Synthèse de l' $\alpha$ -(1,3) glucane

Chez *A. fumigatus*, trois gènes *AGS1*, *AGS2* et *AGS3* impliqués dans la synthèse des  $\alpha$ -(1,3) glucanes ont été identifiés (Beauvais et al., 2003). Ces 3 gènes ont une taille dépassant 8 kb et codent pour des protéines de Mr > 250 kDa qui présentent de fortes homologues de séquence (40 à 48%) avec les gènes *MOK1* à *MOK5* de *S. pombe*. Le profil d'hydropathie des protéines codées par ces gènes suggère la présence de 3 régions hydrophobes : un peptide signal en N-terminal, une région transmembranaire située au milieu de la protéine et une série de régions transmembranaires à l'extrémité C-terminale. L'analyse de la séquence permet ainsi de définir trois domaines fonctionnels : un domaine homologue d' $\alpha$  amylases bactériennes dans la partie extracellulaire de la protéine, un autre domaine homologue de la glycogène synthase localisé dans la partie intracellulaire et un domaine « pore-like » qui permettrait au glucane synthétisé d'être exporté à l'extérieur de la cellule (Figure 13). Le site consensus d'utilisation de l'UDP-glucose, K/RXGG, est présent dans le domaine synthase de la protéine. Les mutants *ags1* et *ags2* ont été construits et montrent tous deux une légère diminution du taux de croissance et une conidiation anormale en milieu liquide. Le mutant *ags1* est plus sensible aux inhibiteurs de paroi tels que la Nikkomycine et le Rouge Congo et montre une réduction de 40% de la concentration en  $\alpha$ -(1,3) glucane dans la partie alcali-soluble de la paroi (Beauvais et al., 2003). Le mutant *ags2*, quant à lui, n'est pas affecté dans sa sensibilité aux inhibiteurs de la paroi ni dans la composition de sa paroi. Ces résultats sont en accord avec les résultats d'immunolocalisation des deux protéines qui montrent que Ags1p est associée à la paroi tandis que Ags2p est intracellulaire. L'étude de la localisation de Mok1p (homologue de Ags1p) de *S. pombe* montre que la protéine est membranaire et co-localise avec l'actine du cytosquelette au cours de la cytokinèse (Katayama et al., 1999). Au contraire de *S. pombe* où la disruption de *MOK1/AGS1* est létale (Hochstenbach et al., 1998), aucun des gènes AGS de *A. fumigatus* n'est essentiel à la viabilité des cellules.

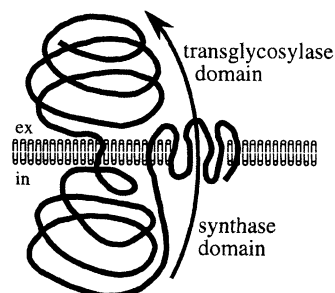


Figure 13 : Modèle de fonctionnement de l'enzyme AGS (d'après Hochstenbach et al., 1998).

#### ***1.2.3.4 Synthèse du galactomannane***

La biosynthèse du galactomannane de *A. fumigatus* reste inconnue à ce jour. Seules ont été mises en évidence à l'aide du génome de *A. fumigatus* la présence d'homologues des mannosyltransférases *VANI* et *MNN9* de la levure. Les protéines codées par ces gènes pourraient être impliquées dans l'élongation de la chaîne de mannane du galactomannane. Les glycosyltransférases responsables de la synthèse des chaînes de galactofurane et du transfert de ces chaînes sur la chaîne de mannane sont encore inconnues. Une UDP-galactose mutase est probablement nécessaire pour transformer l'UDP-galactopyranose en UDP-galactofuranose qui sera ensuite utilisé pour la synthèse des chaînes de galactofurane. De telles UDP-mutases ont été uniquement identifiées à ce jour chez les bactéries et aucun homologue de ces enzymes bactériens n'a pu être repéré dans le génome de *A. fumigatus* (Pan et al., 2001).

### **1.3 Les protéines pariétales**

La paroi des champignons est principalement constituée de polysaccharides mais elle contient aussi 2 à 5% de protéines qui sont souvent considérées comme essentielles à l'intégrité pariétale de la levure (Fleet, 1991, Orlean, 1997). Puisque les protéines de la paroi de *A. fumigatus* sont totalement inconnues, la revue bibliographique concernant les protéines pariétales sera exclusivement axée sur *S. cerevisiae*.

Chez la levure, les protéines pariétales sont dans leur grande majorité glycosylées et les mannoprotéines représentent 40% du poids sec de la paroi (Orlean, 1997). Les mannanes n'existent pas en tant que polysaccharides isolés dans la paroi mais sont toujours associés de façon covalente à des protéines ou à des peptides.

L'analyse des mannoprotéines a débuté il y a plus de trente ans par l'analyse chimique des mannanes. La structure des mannanes a ainsi été très bien décrite chez *S. cerevisiae* par l'équipe de Ballou (Nakajima et Ballou, 1974a, Nakajima et Ballou, 1974b, Ballou, 1976) et chez *Candida* (Kobayashi et al., 1994, Shibata et al., 1995). Les mannoprotéines extraites par le Cetavlon contiennent globalement 90% de mannose, 10% de protéine et de 0,1 à 1% de phosphore (Nakajima et Ballou, 1974b). Environ 10% des résidus mannoses existent sous la forme de O-glycanes (petits oligosaccharides comportant au plus 5 résidus mannose) liés à la protéine par des résidus de sérine ou thréonine. Les 90% de mannose restant correspondent à des N-glycanes qui sont liés à l'asparagine de la protéine par un résidu di-N-acétyl glucosamine. Ces protéines sont très riches en sérine et thréonine qui peuvent composer jusqu'à 40% de la protéine (Frévert et Ballou, 1985, Molloy et al., 1989). La connaissance des différentes étapes de la glycosylation est essentielle pour comprendre à la fois les processus de biosynthèse et de sécrétion de ces protéines et leur ancrage ultérieur dans la paroi. Les progrès dans ce domaine résultent essentiellement de l'analyse de trois classes de mutants : mutants *mnn* (mannan defective) (Ballou, 1990, Ballou et al., 1980), mutants *sec* (secretory defective) et mutants *alg* (asparagine-linked glycosylation defective).

#### **1.3.1 La glycosylation des protéines pariétales**

La glycosylation des protéines a été revue en détail par Orlean (1997), Dean (1999), Gemill et Trimble (1999) et Cutler (2001). La plupart des protéines pariétales sont N- ou O-

glycosylées mais elles peuvent également être modifiées par une ancre glycosylphosphatidyl inositol (GPI) au niveau de l'extrémité C-terminale de la protéine.

### **1.3.1.1 La N-glycosylation**

#### **Description des chaînes de N-mannanes**

Les chaînes de N-glycane, qui sont liées à l'asparagine par deux unités de N-acétylglucosamine, sont constituées d'un cœur oligosaccharidique de 8 à 13 résidus de mannose et, chez la plupart des mannoprotéines de la paroi, d'une chaîne externe très branchée comportant environ 200 résidus de mannose (Orlean, 1997). Cette structure est constituée chez *S. cerevisiae* d'une longue chaîne d' $\alpha$ -1,6 mannane qui porte des courtes chaînes latérales composées de résidus  $\alpha$ -1,2 mannose avec un résidu  $\alpha$ -1,3 mannose en position terminale (Figure 14). Par ailleurs, il a été montré que ces chaînes latérales de mannose pouvaient contenir des phosphates. Ces phosphates sont liés entre le C-1 d'un mannose et le C-6 d'un autre mannose de la chaîne par une liaison phosphodiester (Hernandez et al., 1989, Gemmill et Trimble, 1999), donnant naissance à des complexes phosphomannanes chargés.

L'hypermannosylation des N-glycanes spécifique à *S. cerevisiae* ne semble pas être un phénomène général chez les levures. Le cœur oligosaccharidique est toujours de la forme Hex<sub><15</sub>GlcNAc<sub>2</sub> mais chez *Pichia pastoris*, *Yarrowia lipolytica*, *Schwanniomyces occidentalis* et *Kluyveromyces marxianus*, l'élongation des chaînes de N-glycanes est limitée en taille et la ramification de la chaîne externe est différente. Par exemple, chez *Pichia Pastoris*, les courtes chaînes de  $\alpha$ -1,2 mannose ne sont pas terminées par un  $\alpha$ -1,3 mannose. Chez *Schizosaccharomyces pombe*, la chaîne principale d' $\alpha$ -1,6 mannane est ramifiée par des chaînes de résidus  $\alpha$ -1,2 galactose (Gemmill et Trimble, 1999). Chez *Candida albicans*, la chaîne externe est composée d'une chaîne d' $\alpha$ -mannane liée à des chaînes de  $\beta$ -mannane par une liaison phosphodiester. L'hydrolyse en conditions acides clive la liaison phosphodiester et libère ainsi la chaîne de  $\beta$ -mannane (acide labile) tandis que la chaîne d' $\alpha$ -mannane (acide-stable) reste attachée à la protéine. La chaîne d' $\alpha$ -mannane a une structure similaire à celle de *S. cerevisiae*. Occasionnellement, un seul résidu mannose peut être lié en  $\alpha$ -1,6 aux courtes chaînes latérales d' $\alpha$ -1,2 mannoses ou encore des résidus  $\beta$ -1,2 mannose peuvent être rajoutés en position terminale aux ramifications de la chaîne acide stable. La chaîne de  $\beta$ -mannane est constituée de 2 à 6 (parfois 14) résidus mannose liés en  $\beta$ -(1,2) (Cutler, 2001).



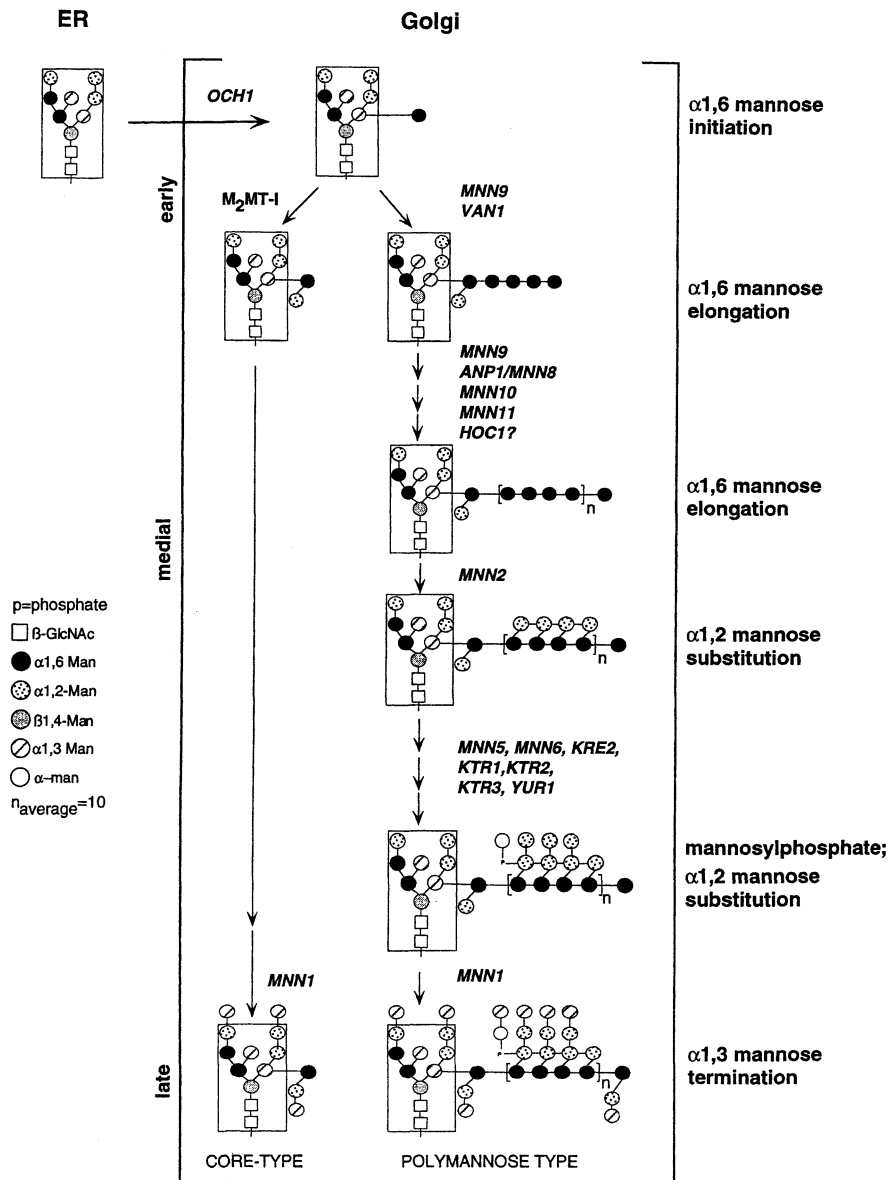


Figure 14 : N-glycosylation chez *S. cerevisiae* (d'après Dean, 1999).

### Biosynthèse des N-glycanes

Chez *S. cerevisiae*, comme chez les autres eucaryotes, la N-glycosylation débute par l'assemblage d'un précurseur oligosaccharidique ( $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_9\text{Glc}_3$ ) avec le lipide transporteur Dol-PP au niveau du réticulum endoplasmique. Au moins 9 gènes (*ALG1* à *ALG9*) sont impliqués dans la synthèse de ce complexe lipide-oligosaccharide.

Ensuite une oligosaccharyltransférase (complexe de protéines, OTase) catalyse le transfert de  $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_9\text{Glc}_3$  du Dol-PP sur l'amine d'une asparagine. Il a été montré que cette asparagine devait avoir une position particulière : elle doit être placée au sein d'un

tripeptide Asn-X-Ser/Thr où X peut être n'importe quel acide aminé excepté la proline. Au moins 8 enzymes sont requises pour le transfert de l'oligosaccharide sur la protéine : Wbp1p, Swp1p, Ost1p, Ost2p, Ost3p et Ost5p qui ont été identifiées dans le complexe OTase et Ost4p et Stt3p. Wbp1p et Swp1p sont essentielles. Après ce transfert, les trois glucoses sont successivement clivés. L' $\alpha$ -1,2 glucose terminal est enlevé par la glucosidase I codée par *CWH41* et les deux  $\alpha$ -1,3 glucoses sont éliminés par la glucosidase II codée par *ROT2* (Herscovics, 1999). Ensuite un seul résidu  $\alpha$ -1,2 mannose est clivé de façon spécifique par une mannosidase Mns1p pour donner la structure GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>8</sub>.

Cette structure peut ensuite être maturée de différentes façons selon la glycoprotéine et chacun de ses sites de N-glycosylation (Figure 14). Certains sites ne possèdent que 9 à 13 résidus de mannose tandis que pour d'autres sites la chaîne de mannane peut être allongée jusqu'à 200 résidus de mannose. L'agrandissement de la chaîne dépend de la conformation locale du peptide et de son accessibilité pour les mannosyltransférases (Orlean, 1997). L'hypermannosylation des chaînes de N-glycanes a lieu au niveau de l'appareil de Golgi et met en jeu de nombreuses mannosyltransférases qui utilisent le GDP-Man comme substrat. Le produit du gène *VRG4* est une protéine essentielle dans la synthèse des mannanes. C'est une protéine membranaire responsable du transport du GDP-Man du cytosol, où le GDP-Man est synthétisé, vers le lumen de l'appareil de Golgi où a lieu la synthèse des N-glycanes. La disruption du gène *VRG4* est létale chez *S. cerevisiae* et chez *C. albicans* (Poster & Dean, 1996, Nishikawa et al., 2002).

Och1p est responsable de l'initiation de la formation de la chaîne de  $\alpha$ -1,6 mannose. Ensuite, plusieurs mannosyltransférases participent à l'élongation de cette chaîne. Ces mannosyltransférases sont regroupées essentiellement sous forme de deux complexes : (1) M-Pol II constitué de Mnn9p, Anp1p, Hoc1p et Mnn11p et qui a une activité  $\alpha$ -1,6 mannosyltransférase et (2) M-Pol I constitué de Mnn9p et Van1p pour lequel une activité  $\alpha$ -1,6 mannosyltransférase a été mise en évidence ainsi qu'une activité  $\alpha$ -(1,2) mannosyltransférase (Jungmann et Munro, 1998, Stolz et Munro, 2002). Mnn10p, qui a une homologie avec une galactosyltransférase Gma12p de *S. pombe*, semble aussi participer à l'élongation de l' $\alpha$ -1,6 mannane et interagir avec le complexe M-Pol II (Jungmann et al., 1999). La formation des chaînes latérales constituées de l' $\alpha$ -1,2 mannose est réalisée par Kre2p/Mnt1p, Ktr1p, Ktr2p et Yur1p qui ont une activité  $\alpha$ -(1,2) mannosyltransférase. Mnn1p catalyse l'addition de l' $\alpha$ -1,3 mannose terminal (Lussier et al., 1999). Les mannanes sont phosphorylés consécutivement à l'addition d'un mannosylphosphate à partir de GDP-Man par Mnn6p (Wang et al., 1997, Jigami & Odani, 1999).

### ***Fonction des longues chaînes de mannane***

Bien qu'elles semblent jouer un rôle biologique important, le rôle exact de ces longues chaînes de N-glycanes n'est pas vraiment connu. Au niveau de la paroi, les longues chaînes de N-glycane influenceraient la porosité de la paroi puisqu'il a été montré, chez *S. cerevisiae*, qu'un traitement à la tunicamycine, qui bloque la N-glycosylation, accroît la porosité (De Nobel et al., 1990). Par ailleurs, chez *C. albicans*, les chaînes de N-glycanes ont un rôle essentiel dans les interactions hôte-champignon et la virulence puisqu'elles se lient notamment de façon spécifique aux macrophages et peuvent induire la production de TNF- $\alpha$  (Kanbe & Cutler, 1998, Li & Cutler, 1993, Garner et al., 1994, Jouault et al., 1994, 1995).

Les chaînes de mannanes jouent également un rôle dans le repliement de la protéine et permettent ainsi d'éviter l'agrégation des protéines nouvellement formées dans le réticulum endoplasmique (Riederer & Hinnen, 1991). De cette façon, elles favorisent la multimérisation et la sécrétion de ces protéines et sont souvent nécessaires à leur activité enzymatique (Orlean, 1997).

#### ***1.3.1.2 La O-glycosylation***

##### ***Description des chaînes***

De nombreuses protéines portent des O-glycanes. La chaîne de O-glycane est une courte chaîne linéaire constituée de 2 à 5 mannoses reliés par des liaisons  $\alpha(1,2)$  et  $\alpha(1,3)$ . Cette chaîne linéaire peut être mannosylphosphorylée sur le second mannose (Nakayama et al., 1998). Chez les autres levures, les chaînes de O-glycanes sont similaires à celles de *S. cerevisiae*. Elles possèdent en général au moins 2 ou 3 mannoses et peuvent être allongées jusqu'à 7 mannoses (Figure 15, Gemmill et Trimble, 1999). Les O-glycanes sont attachés à la protéine au niveau d'une sérine ou une thréonine (Figure 15, Ernst et Prill, 2001). Il ne semble pas qu'il y ait une séquence consensus spécifique de l'attachement des O-glycanes bien que la proximité d'une proline paraisse favoriser la O-mannosylation. Ces chaînes de O-glycanes sont facilement libérées par un traitement NaOH 30-100mM à 4°C ou 37°C ( $\beta$ -élimination).

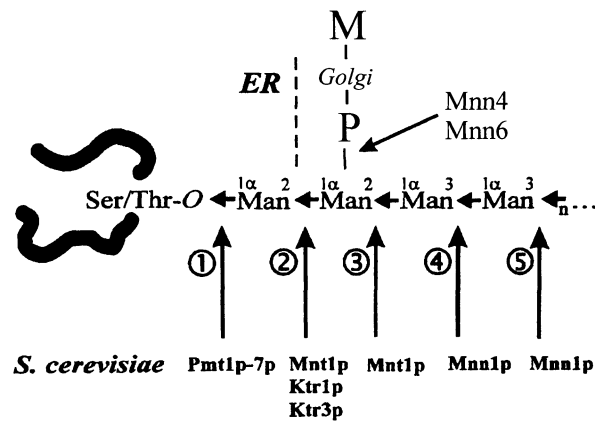


Figure 15 : O-glycane et enzymes impliquées dans chaque étape de la biosynthèse chez *S. cerevisiae* (d'après Ernst et Prill, 2001).

### Biosynthèse des O-glycane

Les différentes étapes de la biosynthèse des O-glycane sont schématisées dans la figure 15. Le premier mannose de la chaîne est transféré à partir du Dol-P-Man sur une sérine ou une thréonine tandis que les unités de mannose suivantes sont transférées à partir du GDP-Man. La O-mannosylation débute dans le réticulum endoplasmique. Ce sont les 7 gènes de la famille PMT (*PMT1* à *PMT7*, 50 à 80% d'homologie) qui interviennent dans cette première étape (Strahl-Bolsinger et al., 1999). L'implication des gènes *PMT1*, *PMT2*, *PMT3*, *PMT4* et *PMT6* dans le processus de O-mannosylation a été démontré grâce à l'analyse des mutants correspondants (Gentzsch et Tanner, 1996, Gentzsch et Tanner, 1997). Par contre les rôles de *PMT5* et *PMT7* restent à explorer. Alors que les simples mutants n'ont pas de phénotype de croissance, les triples mutants *pmt1/pmt3/pmt4* et *pmt2/pmt3/pmt4* ne sont pas viables (Gentzsch et Tanner, 1996), montrant ainsi que la O-mannosylation est essentielle à la croissance du champignon. La topologie de Pmt1p a été déterminée : Pmt1p a 7 régions transmembranaires, le peptide N-terminal est situé dans l'espace cytosolique et l'extrémité C-terminale dans le lumen du Golgi (Strahl-Bolsinger & Scheinost, 1999). Une grande boucle hydrophile située dans le lumen du Golgi semble essentielle à l'activité enzymatique (Girrbach et al., 2000). Les 6 autres gènes *PMT* présentent la même organisation. Il a été montré que Pmt1p et Pmt2p étaient actives sous forme de complexe. Ces deux enzymes peuvent elles même former des complexes avec les autres protéines : Pmt1p/Pmt3p, Pmt2p/Pmt6p (Gentzsch et Tanner, 1996). L'existence d'une famille multiple de gènes codant pour des mannosyltransférases peut s'expliquer par le fait que chacune reconnaît un peptide récepteur particulier et donc une gamme bien particulière de protéines. Par exemple, sur dix

protéines analysées, six sont glycosylées par Pmt1p et Pmt2p (la chitinase Cts1p, la protéase Bar1p, la protéine de choc thermique Pir2p/Hsp150p, l'a-agglutinine et Kre9p et Kre2p impliqué dans l'assemblage des  $\beta$ -1,6 glucanes) tandis que les quatre autres (l'endoprotéase Kex2p, la glycosyltransférase Gas1p, la protéine de fusion Fus1p et la protéine membranaire Axl2p) montrent un défaut de O-mannosylation seulement chez le mutant *mnn4* (Gentzsch et Tanner, 1997).

L'élongation de cette chaîne de O-glycane se poursuit par l'addition du deuxième mannose lié en  $\alpha$ -1,2 dans un compartiment situé entre le réticulum endoplasmique et le Golgi. *In vitro*, le sucre donneur est le GDP-Man. Les enzymes Ktr1p, Ktr3p et Mnt1p semblent impliquées dans l'ajout du deuxième  $\alpha$ -(1,2) mannose et Mnt1p dans l'ajout du troisième mannose (Lussier et al., 1999). Enfin, les autres mannoses sont transférés par Mnn1p qui est impliquée à la fois dans les processus de N-et O-glycosylations (Ernst et Prill, 2001). L'ajout de mannosylphosphate sur ces chaînes semble impliquer les gènes *MNN4* et *MNN6* (Nakayama et al., 1998).

### ***Caractérisation et rôle des protéines O-glycosylées***

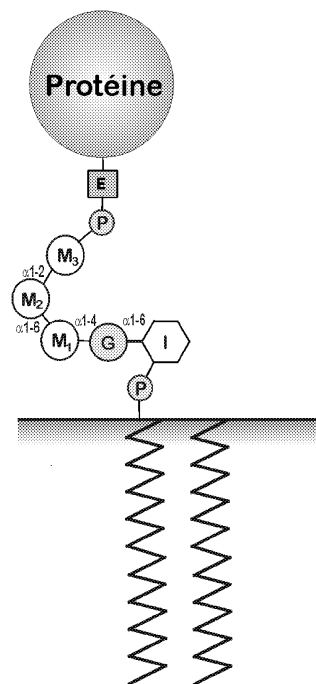
Jentoft (1990) et Stratford (1994) ont émis l'hypothèse que le rôle de ces nombreuses courtes chaînes de O-glycanes est de conférer une conformation plus étirée à certaines parties de la protéine pour faciliter leur ancrage à la membrane et/ou de les protéger vis à vis des protéases. Les O-glycanes semblent aussi avoir un rôle dans la sécrétion car un grand nombre de protéines sécrétées ont été décrites comme O-mannosylées (les agglutinines, la protéine Hsp150p, Flo1p, les chitinases) et chez les mutant *pmt* la quantité de protéines sécrétées décroît (Strahl-Bolsinger et al., 1999). Les O-glycanes pourraient jouer un rôle dans le maintien de l'intégrité de la paroi. En effet, les doubles mutants *pmt2/pmt3* et *pmt2/pmt4* ne sont viables qu'en présence d'un stabilisateur osmotique et la quantité de glucane présente dans la paroi de *pmt2/pmt3* est diminuée de 20%, suggérant un rôle de la O-glycosylation dans le maintien du glucane dans la paroi (Gentzsch et Tanner, 1996). Le mutant *pmt4* montre un bourgeonnement anormal qui serait dû à une absence de glycosylation de la protéine Axl2p (Gemmill et Strimble, 1999).

### ***1.3.1.3 La glycosylation par ancre glycosyl-phosphatidylinositol***

#### ***Description de l'ancre GPI***

L'ancre GPI se situe au niveau de l'extrémité carboxy-terminale de la protéine. Cette structure GPI permet l'ancrage de la protéine du côté externe de la membrane plasmique. La partie C-terminale de la protéine est liée par une liaison peptidique via une phosphoéthanolamine à un tétrasaccharide (-Man $\alpha$ (1,2)Man $\alpha$ (1,6)Man $\alpha$ (1,4)Gln-) qui à son tour est lié en  $\alpha$ -1,6 à un inositol. Enfin, l'inositol est associé via un phosphate à un groupe lipidique hydrophobe qui permet à l'ancre de s'enchrâsser dans la membrane et d'y former un réseau de liaisons hydrophobes assurant son attachement (Figure 16). Chez *S. cerevisiae*, un quatrième mannose lié en  $\alpha$ -1,2 au mannose précédant la phosphoéthanolamine (Man3) peut être ajouté à la structure et peut être prolongé par un  $\alpha$ -1,2 et/ou un  $\alpha$ -1,3 mannose (structure à 4 ou 5 mannoses). De plus, une phosphoéthanolamine serait liée au moins transitoirement aux deux autres mannoses (Man1 et Man2) (Tiede et al., 1999). Chez *A. fumigatus* la partie glycane de l'ancre GPI est un pentamannose linéaire lié à un résidu de glucosamine (Fontaine et al., 2003). Un Man $\alpha$ 1-3Man est lié en  $\alpha$ 1-2 sur le troisième mannose par rapport à la structure générale.

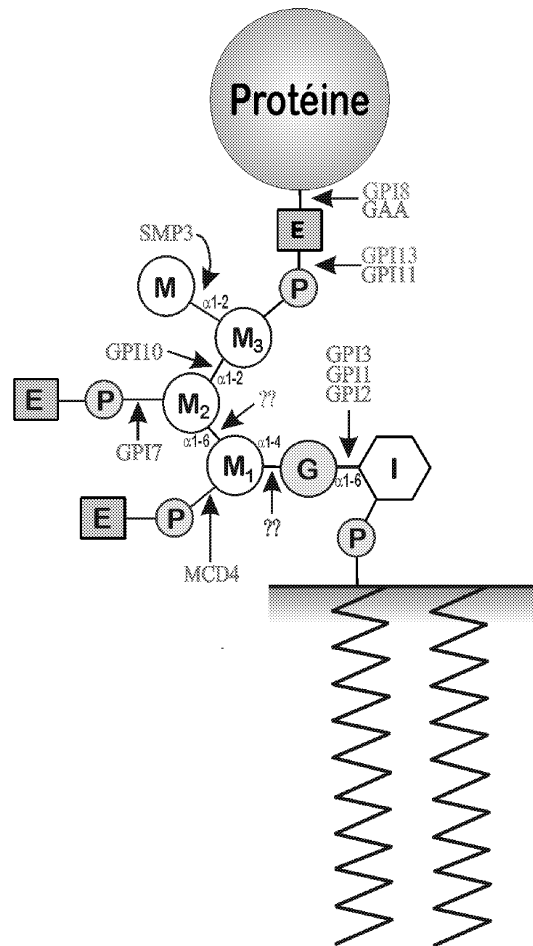
La partie lipidique varie également de façon importante entre les différentes espèces. Chez la levure, le lipide peut être soit un diacylglycérol (C26/C26) base-labile, soit une céramide base-stable (Herscovics et Orlean, 1993). Chez *A. fumigatus*, l'ancre lipidique est toujours une céramide comprenant une C18-phytosphingosine liée par une amide à un acide gras monohydroxylé C<sub>24:0</sub> (Fontaine et al., 2003).



**Figure 16 : Représentation schématique de la structure commune aux ancres GPI des eucaryotes. M : mannose, E : éthanolamine, N : glucosamine, I : myo-inositol, P : phosphate (d'après Ferguson, 1999).**

### ***Biosynthèse de l'ancre GPI***

Les premières étapes de la biosynthèse de l'ancre GPI ont lieu au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique. La majorité des gènes intervenant dans la synthèse ont été identifiés (Figure 17). La première étape est le transfert de la N-acétyl glucosamine (GlcNAc) provenant d'un UDP-GlcNAc sur le phosphoinositol (PI) pour former un GlcNAc-PI. Cette étape est régulée par un complexe d'au moins trois protéines *GPI1*, *GPI2* et *GPI3* (Leidich et al., 1995). La fonction de chacune de ces protéines n'est pas complètement élucidée mais il semblerait que ce soit Gpi3p qui ait la fonction GlcNAc transférase (Kostova et al., 2000). La deuxième étape est la désacétylation du GlcNAc-PI pour former de la glucosamine phosphatidylinositol (GlcN-PI). Cette étape serait sous le contrôle de la protéine membranaire GPI12p qui possède une activité de dé-N-acétylase *in vitro* (Watanabe et al., 1999). Ensuite, l'addition des trois mannoses se fait à partir de Dol-P-Man. Les gènes impliqués dans l'addition du Man1 et du Man2 sont inconnus chez *S. cerevisiae*, mais *GPI10* est le gène codant pour la mannosyltransférase ajoutant le troisième mannose (Sutterlin et al., 1998). Enfin le gène permettant l'addition du quatrième mannose sur l'ancre de *S. cerevisiae* vient d'être cloné, il s'agit de *SMP3* (Grimme et al., 2001). Les gènes responsables de l'addition des phosphoéthanolamines (P-EtN) sur chacun des trois mannoses ont été identifiés chez *S. cerevisiae*. *MCD4* code pour la protéine qui ajoute le P-EtN sur le Man1 (Gaynor et al., 1999), *GPI7* code pour la protéine qui ajoute le P-EtN sur le Man2 (Flury et al., 2000) et *GPI13* code pour la protéine qui ajoute le P-EtN sur le Man3, probablement en collaboration avec *GPI11* (Flury et al., 2000, Taron et al., 2000). Les gènes *MCD4*, *GPI13* et *GPI11* sont essentiels, ce qui se comprend pour *GPI13* et *GPI11* étant donné qu'ils participent à l'addition du P-EtN qui sert de lien entre la protéine et l'ancre. En revanche, la raison biologique pour laquelle *MCD4* est essentiel est inconnue (Figure 17).



**Figure 17 : Représentation des gènes impliqués dans la biosynthèse de l'ancrage GPI chez *S. cerevisiae*. M : mannose, E : éthanolamine, N : glucosamine, I : myo-inositol, P : phosphate.**

### ***Transfert de l'ancrage sur la protéine***

Le transfert de l'ancrage sur la protéine s'effectue dans le lumen du réticulum endoplasmique. L'ancrage GPI mature est ajoutée à la partie C-terminale de la protéine via une liaison peptidique entre le C-terminal et la P-EtN. Il y a donc remplacement de la queue peptidique de la protéine par l'ancrage GPI par une réaction de transamidation. Chez *S. cerevisiae*, les deux gènes impliqués dans cette réaction sont *GPI8* et *GAA1* (Ohishi et al., 2000, Sharma et al., 2000). Ces deux protéines coopèrent dans l'ajout de l'ancrage, Gpi8p par le clivage de la protéine au niveau du site ω, et Gaa1p par la création de la liaison peptidique (Figure 17). Ensuite, les ancres GPI portées par les protéines peuvent subir des modifications du lipide précurseur ou être dirigées vers la paroi (voir chapitre 1.3).

Les protéines qui sont ancrées GPI possèdent trois caractéristiques (Figure 18) :

- (1) Un peptide signal hydrophobe en N-terminal permet à la protéine d'être envoyée vers le réticulum. Ce peptide signal est clivé au cours de la translocation dans le réticulum.



- (2) Un peptide C-terminal hydrophobe (15 à 30 acides aminés) permet d'ancrer transitoirement la protéine dans la membrane du réticulum. Ce peptide est lui aussi clivé au cours de l'étape d'accrochage à l'ancre GPI par le complexe transamidase.
- (3) Un triplet d'acides aminés de petite taille est situé au niveau du site de coupure puis d'attachement de l'ancre. Ce site de coupure est nommé  $\omega$ . Il est espacé de 10 à 15 acides aminés du peptide hydrophobe en C-terminal.

L'analyse par mutation ponctuelle a permis d'identifier les acides aminés présents autour du site  $\omega$  (Nuoffer et al., 1993). Le site  $\omega$  est composé de petits acides aminés : glycine, acide aspartique, asparagine, alanine, cystéine ou sérine. Au niveau du site  $\omega+2$ , il y a préférentiellement les acides aminés glycine, alanine et sérine. La nature des acides aminés les plus fréquents au site  $\omega+1$  est dépendante de l'espèce étudiée (Tiede et al., 1999). On sait par exemple que chez *S. cerevisiae* les deux résidus les plus probables en  $\omega+1$  sont une asparagine ou une glycine, alors que chez les mammifères c'est une sérine ou une asparagine (Caro et al., 1997).

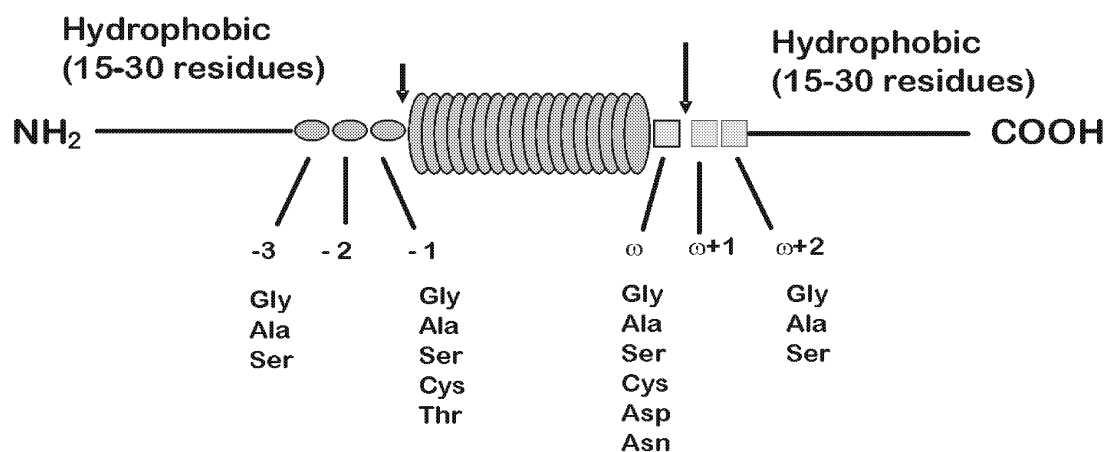


Figure 18 : Structure des protéines qui sont ancrées GPI. Les flèches représentent les sites de clivage. Les acides aminés indiqués au bas de la figure correspondent aux acides aminés les plus souvent rencontrés aux sites indiqués.

### ***Caractérisation et fonction des protéines ancrées GPI***

La première protéine ancrée GPI à avoir été décrite chez *S. cerevisiae* est l' $\alpha$ -agglutinine (Wojciechovicz et al., 1993). Deux études récentes de génomique chez *S. cerevisiae* ont permis d'établir une liste des protéines potentiellement ancrées GPI. Les protéines ont été sélectionnées sur la base de : la présence d'un peptide signal en position N-terminale, la présence d'une séquence pour l'attachement de l'ancre GPI dans la région C-

terminale et la présence d'une région riche en sérine et/ou thréonine (Caro et al., 1997, Hamada et al., 1998b). Une soixantaine de protéines ont été dénombrées. Elles sont regroupées en plusieurs familles. Certaines sont et restent purement membranaires telles que la famille des glucosyltransférases Gas, la famille des protéases Yap3, la famille Sps2 et la famille des lysophospholipases Plb1 ; d'autres s'associent de manière covalente à la paroi après clivage de l'ancre (voir chapitre 1.3) comme la famille Tir, la famille Flo impliquée dans la floculation, la famille Sed1, la famille Yel040 ayant des homologies avec des glucanases et la famille des agglutinines. Quelques autres protéines n'appartenant à aucune famille multigénique ont été décrites : Exg1p une exoglucanase, Kre1p intervenant dans la synthèse des  $\beta$ -(1,6) glucanes, Rot1p, Icw1p et Egt2p. Ainsi, chez *S. cerevisiae*, les protéines à ancre GPI sont impliquées dans de nombreux processus biologiques tels que l'assemblage et les modifications de la paroi cellulaire, la floculation et la formation d'agrégats, la sporulation et l'adhérence au substrat, la nutrition.

La fonction de ces protéines ancrées de façon spécifique à la membrane est donc très variable. Il n'y a pas de raison évidente expliquant pourquoi ces protéines ont une ancre GPI plutôt qu'un peptide transmembranaire. Cependant l'ancre GPI pourrait conférer des avantages aux protéines (De Sampaio et al., 1999) : (1) une mobilité latérale pour ces protéines plus importante que pour celles qui sont ancrées dans la membrane par un ou plusieurs segments transmembranaires, (2) la possibilité pour ces protéines d'être relarguées par PI-PLC ou PI-PLD, (3) une fonction dans la transduction du signal et (4) la concentration de protéines dans certains domaines de la membrane appelés LDTI (Low-Density Triton X-100-Insoluble membrane domains) (Muniz & Riezman, 2000).

### **1.3.2 Méthodes d'extraction des protéines pariétales**

Les techniques d'extraction des mannoprotéines sont différentes selon que l'on souhaite analyser la partie mannane ou la partie peptidique. Le tableau 7 résume les différentes techniques utilisées. Ces extractions se font à partir soit de cellules entières, soit de parois isolées. La paroi est généralement préparée par broyage des cellules avec des billes de verre, séparation par centrifugation à 3000 g pendant 10 minutes et lavage des parois avec NaCl 1 M avec ou sans PMSF 1 mM.

**Tableau 7 : Différentes techniques d'extraction utilisées pour isoler les protéines pariétales.**

Techniques d'extraction	Matériel de départ	Type de protéines relarguées	Références
<b>Chimique</b>			
Cétavlon/liqueur de Fehling	Cellules entières	Complexe mannoprotéique de très haut poids moléculaire	Nakajima et Ballou, 1974a, Frevert et Ballou, 1985, Van Rinsum et al., 1991
Détergents (SDS, Triton X-100, déoxycholate), urée	Paroi	Protéines pariétales solubles, membranaires ou intracellulaires	Valentin et al., 1984, Pastor et al., 1984, Mrsa et al., 1997
Agents réducteurs (DTT ou $\beta$ -mercaptoéthanol)	Cellules entières ou paroi	Protéines pariétales liées par pont disulfure	Orlean et al., 1986, Cappellaro et al., 1998, Moukadiri et al., 1999
$\beta$ -élimination (NaOH)	Paroi	Protéines liées par O-glycosylation	Mrsa et al., 1997, 1999a, Mormeneo et al., 1994
Acide hydrofluorique (HF)	Paroi	Protéines associées par liaison phosphodiester aux polysaccharides	Kapteyn et al., 1996
<b>Enzymatique</b>			
Protéases	Paroi	Protéines résistantes aux protéases	Iranzo et al., 2002, Shimoi et al., 1995
$\beta$ -1,3 glucanases/ $\beta$ -1,6 glucanases	Paroi	Protéines associées de façon covalente aux $\beta$ -glucanes	Van Rinsum et al., 1991, Monjin et al., 1994 ; Kapteyn et al., 1996, Kapteyn et al., 2000
	Protoplastes en régénération		Kapteyn et al., 1995a
Chitinase	Paroi	Protéines associées de façon covalente à la chitine	Marcilla et al., 1991; Kapteyn et al., 1997

### ***1.3.2.1 Extractions en vue de l'analyse des mannanes***

Les cellules entières, ou les parois isolées, sont autoclavées dans un tampon citrate (par exemple 90 minutes avec 20 mM tampon citrate pH 7) puis les mannanes sont précipités avec du Cetavlon (hexadécyltriméthylammonium bromide) (Lloyd, 1970, Ballou, 1976) ou de la liqueur de Fehling (Algranati et al., 1966). Cette extraction au citrate est très efficace pour extraire les mannanes en vue de l'analyse de leur structure. Elle n'est cependant pas favorable à l'analyse des protéines pariétales car elle aurait l'inconvénient d'abîmer au moins partiellement la partie peptidique des mannoprotéines. Le complexe mannoprotéique extrait par le Cetavlon est un complexe de haut poids moléculaire (> 133 kDa) (Nakajima et Ballou, 1974a). Analysé sur gel de polyacrylamide 7%, ce complexe ne pénètre pas dans le gel de séparation chez une souche sauvage. Par contre, chez le mutant *mnn9* dont les chaînes de mannanes sont tronquées, une bande large de 180 kDa sensible à l'endo H peut-être observée. Ce complexe est constitué à 88% de sucres et 12% d'acides aminés, principalement des sérines et thréonines (Frévert et Ballou, 1985). Cette protéine serait identique à la protéine de Mr 150 kDa purifiée sur une colonne d'affinité à base de Concanavalline A par Van Rinsum (1991) à partir d'un extrait similaire. La nature de cette protéine est inconnue.

### ***1.3.2.2 Extractions chimiques en vue de l'analyse des polypeptides***

Les parois peuvent être également traitées avec des agents dénaturants ou des détergents. L'urée 6M à température ambiante permet de solubiliser 65% des mannoprotéines de la paroi tandis que le SDS 2% à température ambiante ou à 100°C libère 60 et 85%, respectivement, des mannoprotéines de la paroi. Une soixantaine au moins de protéines de poids moléculaire inférieur à 80 kDa sont solubilisées par le SDS (Valentin et al., 1984). Ces protéines libérées par le SDS ne semblent pas être hypermannosylées car elles donnent des bandes bien définies en SDS-PAGE (Pastor et al., 1984). De plus, elles ne semblent pas être relarguées par le citrate à chaud ou les  $\beta$ -1,3 glucanases. D'autres détergents comme le déoxycholate de sodium ou le Triton X-100 n'ont qu'un effet mineur sur le relargage des protéines pariétales (moins de 10%). Des résultats similaires ont été observés chez *C. albicans*. Plus de 40 protéines de Mr compris entre 15 et 80 kDa correspondant à 70% des protéines pariétales sont relarguées par le SDS 2% (Elorza et al., 1985). Ces divers travaux suggèrent cependant que l'extrait SDS contient un grand nombre de protéines membranaires. En effet, quand des cellules sont marquées à l'iode pendant 10 minutes de façon à marquer préférentiellement les protéines de surface, seulement 9 protéines radiomarquées peuvent être

visualisées dans l'extrait SDS (Molloy et al., 1989). Ceci indique que la majorité des bandes mises en évidence dans l'extrait SDS représente des protéines intracellulaires et/ou membranaires qui ont été adsorbées sur la paroi lors du broyage. Une autre façon de vérifier que les protéines extraites appartiennent à la paroi est la biotinylation, préalable à l'extraction, des protéines (Mrsa et al., 1997). Les cellules intactes sont traitées avec un réactif de biotinylation (sulfo succinimidyl-6-(biotinamido)hexanoate) réagissant de façon spécifique avec les fonctions amines libres. Ce réactif, qui ne traverse pas la membrane plasmique, est donc incapable de marquer les protéines intracellulaires. En utilisant cette méthode Mrsa et ses collaborateurs ont pu identifier environ 20 protéines associées à la paroi dont seulement 9 étaient solubilisées par le SDS à chaud tandis que les autres étaient solubilisées par  $\beta$ -élimination ou par  $\beta$ -1,3 glucanase (Mrsa et al., 1997).

Valentin et al. (1984) ont montré que 30% des protéines extraites par le SDS étaient associées entre elles par des ponts disulfures. Ceci a donc amené l'utilisation d'agents réducteurs (2 mM dithiothréitol (DTT) à 4°C pendant 2 heures ou 2%  $\beta$ -mercaptoéthanol à 30°C pendant 3 heures) qui détruisent les ponts disulfures (Cappellaro et al., 1998, Moukadiri et al., 1999, Orlean et al., 1986). Les protéines relarguées par DTT ou  $\beta$ -mercaptoéthanol ont des tailles variables comprises entre 22 et plus de 200 kDa (Frevert et Ballou, 1985, Orlean et al., 1986). Etant donné que le profil de protéines est le même que les protéines soient extraites de paroi isolée ou de cellules entières (Frevert et Ballou, 1985), il est suggéré que le matériel relargué de cette façon est effectivement localisé dans la paroi.

Ces traitements urée/détergents/agents réducteurs ne dégradent pas les protéines isolées. En revanche, les autres traitements chimiques utilisés pour isoler des protéines peuvent abîmer les protéines lors du traitement.

Un traitement par 100 mM NaOH pendant 16 heures à température ambiante permet de libérer les O-glycanes des mannoprotéines isolées. Mais ces conditions dégradent les protéines (Nakajima et Ballou, 1974b). Ainsi des conditions alcalines plus douces, 30 mM NaOH à 4°C pendant 16h, ont été utilisées pour solubiliser des protéines (Mrsa et al., 1997, 1999) qui sont associées à la paroi par O-glycosylation ou tout simplement qui ont été libérées de la paroi en raison d'une modification des glucanes qui ne retiennent plus les protéines dans la paroi.

L'acide hydrofluorique (HF) qui clive les liaisons phosphodiester (Ferguson, 1992) a aussi été utilisé. Le traitement de la paroi avec 50% HF pendant 3 jours dans la glace libère des protéines (Kapteyn et al., 1996), suggérant que ces protéines pariétales sont associées aux polysaccharides pariétaux par liaison phosphodiester.

L'éthylènediamine anhydre (EDA) aurait l'avantage d'isoler les protéines de la paroi en préservant les liaisons O-glycosidiques et en évitant la destruction de protéines labiles. Cependant, les analyses des mannoprotéines isolées par l'EDA ne sont pas concluantes (Ruiz-Herrera et al., 1994, Mormeneo et al., 1996).

### **1.3.2.3 Extractions enzymatiques**

Un certain nombre de glycosylhydrolases ou de protéases ont été utilisées pour dégrader la paroi en vue de l'analyse des liaisons polysaccharides-protéines. Les extractions enzymatiques avec des  $\beta$ -1,3 glucanases (Shibata et al., 1983, Pastor et al., 1984, Valentin et al., 1984, Van Rinsum et al., 1991, Frevert et Ballou, 1985, Montijn et al., 1994), des  $\beta$ -1,6 glucanases (Kapteyn et al., 1996, Kapteyn et al., 2000, Bom et al., 1998), des chitinases (Kapteyn et al., 1997, Marcilla et al., 1991) ou des protéases (Shimoi et al., 1995, Iranzo et al., 2002) représentent une façon ménagée et spécifique d'extraire les protéines pariétales (contrairement aux traitements chimiques mentionnés ci-dessus). La libération de protéines pariétales par dégradation enzymatique peut se faire à partir de cellules entières (Shibata et al., 1983) ou de paroi isolée préalablement traitée avec du SDS à chaud (Pastor et al., 1984) ou des protoplastes en régénération (Kapteyn et al., 1995a). Les enzymes du commerce utilisées initialement n'étaient pas pures. Par exemple, la zymolyase est contaminée par des activités protéasiques et des mannanases. Des protéases peuvent être contaminées par des  $\beta$ -(1,3) glucanases. Ces enzymes peuvent être maintenant remplacées par des protéines recombinantes telles que la Quantazyme ( $\beta$ -(1,3) glucanase).

Chez *S. cerevisiae*, les profils de protéines obtenus après digestion par  $\beta$ -(1,3) glucanase montrent une grande hétérogénéité de Mr 29->600 kDa (Pastor et al., 1984, Van Rinsum et al., 1991). Le nombre de protéines isolées est difficile à déterminer car la plupart sont hypermannosylées et forment des bandes diffuses sur gel SDS-PAGE. De plus, la taille de la chaîne de N-mannane peut varier en fonction des conditions de culture, ce qui rend difficile la caractérisation des protéines sur la base de leur Mr (Valentin et al., 1987). L'utilisation du mutant *mnn9* dont les chaînes de N-glycanes ne possèdent que 10 à 14 résidus mannose au lieu des 150 à 200 mannoses habituels présents chez la souche sauvage s'est révélée très avantageuse pour l'identification des protéines relarguées par  $\beta$ -(1,3) glucanase. Chez le mutant *mnn9*, les protéines libérées par la laminarinase ont des tailles comprises entre 740 à 35 kDa, une majorité d'entre elles ayant un Mr supérieur à 94 kDa (Van Rinsum et al., 1991). Parmi ces protéines, dix (entre 35 et 450 kDa) sont retenues sur une colonne de

Concanavale A-Sepharose, les 3 majoritaires ont des Mr de 160, 220 et 300 kDa. Elles sont différentes des mannoprotéines relarguées par le tampon citrate ou le SDS.

Chez *C. albicans*, des traitements avec la zymolyase, la laminarinase ou la Quantazyme relarguent aussi des protéines de très haut poids moléculaire (650 à 160 kDa) qui sont également sensibles à l'endoH (Marcilla et al., 1991, Kapteyn et al., 1995b). Ces protéines sont différentes dans la forme levure et la forme mycélienne (Casanova et al., 1989, Kapteyn et al., 1995b).

La fraction mannoprotéique libérée par  $\beta$ -(1,3) glucanase (laminarinase) contient du glucose (Shibata et al., 1983, Van Rinsum et al., 1991), suggérant une liaison potentielle des mannanes aux glucanes pariétaux. Ceci est corroboré par le fait que quatre des protéines libérées par laminarinase chez *S. cerevisiae* (200, 155, 100 et 66 kDa) sont reconnues par un anticorps spécifique des  $\beta$ -1,6 glucanes (Montjin et al., 1994). Il en est de même pour les protéines libérées par  $\beta$ -(1,3) glucanase chez *C. albicans* (Kapteyn et al., 1995b).

L'extraction des parois par une  $\beta$ -1,6 glucanase chez *S. cerevisiae* relargue les mêmes protéines que la laminarinase (Kapteyn et al., 1996). Chez *C. albicans*, elle libère à la fois des bandes fines (220, 170, 100 et 65 kDa) et une fraction de haut poids moléculaire migrant entre 400-600 kDa (Kapteyn et al., 2000, Bom et al., 1998) qui n'a pas été caractérisée.

L'extraction par une chitinase relargue des protéines de poids moléculaire supérieur à 205 kDa chez *C. albicans* (Marcilla et al., 1991). Le profil de protéines est identique à celui obtenu par traitement des parois avec la zymolyase. Les bandes correspondant à l'extraction avec la chitinase ont un poids moléculaire légèrement plus élevé que celles isolées par zymolyase. Ceci suggère que des protéines sont liées à la chitine par l'intermédiaire du  $\beta$ -(1,3) glucane puisque la  $\beta$ -1,3 glucanase relargue aussi ces protéines.

De manière paradoxale, la trypsine a aussi été utilisée pour solubiliser des protéines pariétales (Iranzo et al., 2002). Une des protéines identifiées est une chitinase hautement O-glycosylée qui est aussi relarguée par les détergents, suggérant que cette méthode permet d'isoler seulement des protéines résistantes à la trypsine mais qui ne sont pas forcément liées de manière covalente aux polysaccharides. La protéase I de *Rarobacter faecitabidus* a aussi été utilisée pour relarguer Cwp1p (Shimoï et al. (1995).

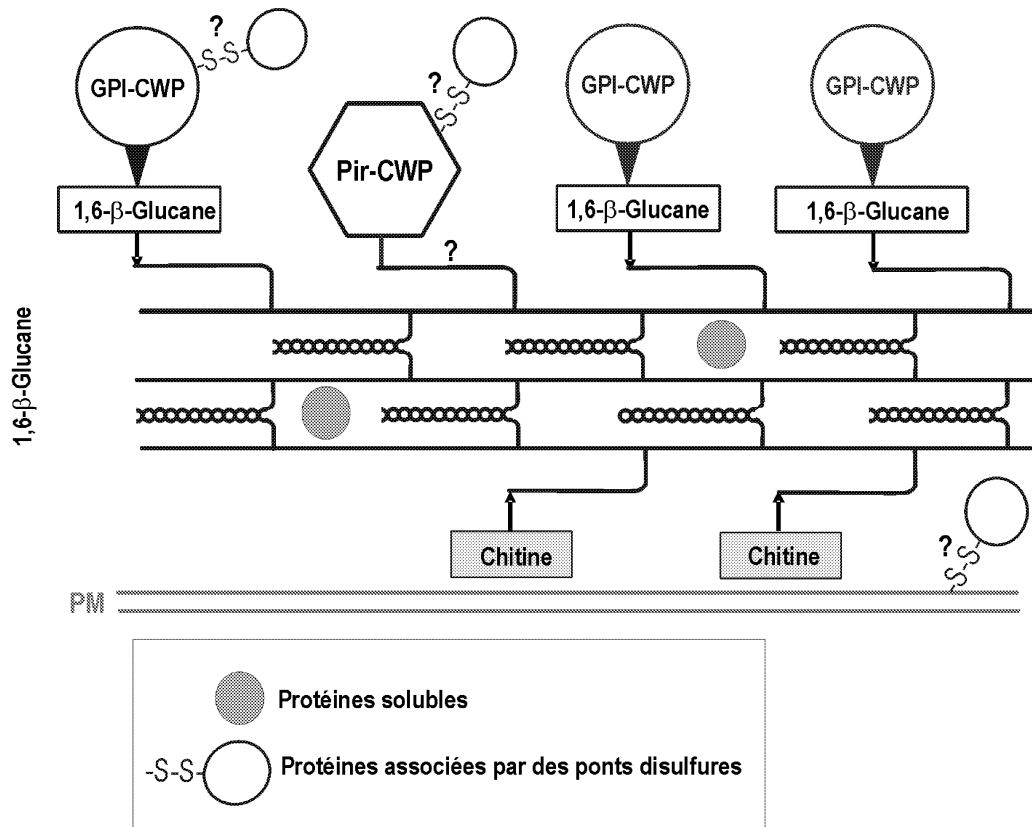
Une autre technique consiste à utiliser des protoplastes en régénération qui excrètent les mannoprotéines dans le milieu (Valentin et al., 1986, Kapteyn et al., 1995a, Pardo et al., 1999). Cette méthode donne des informations sur les précurseurs des mannoprotéines associées à la paroi et sur leur interaction avec les polysaccharides.

### **1.3.3 Liaisons entre protéines pariétales et différents polymères de la paroi**

A ce jour, les caractéristiques des protéines isolées de la paroi de *S. cerevisiae* sont les suivantes : (1) une quantité importante des protéines n'est pas associée aux polysaccharides pariétaux et est libérée par des détergents ou par des agents réducteurs. La majorité de ces protéines sont soit des protéines membranaires contaminant l'extrait pariétal, soit des protéines sécrétées en transit avant relargage dans le milieu extérieur (Mrsa et al., 1997, Molloy et al., 1989) ; (2) la grande majorité des protéines pariétales existent sous forme de complexes mannoprotéiques car elles sont N-glycosylées par un système d'hypermannosylation et souvent O-glycosylées ; (3) certaines protéines sont associées de façon covalente aux  $\beta$ -glucanes et à la chitine car elles sont relarguées par  $\beta$ -1,3 glucanase,  $\beta$ -1,6 glucanase ou chitinase et les complexes mannoprotéiques contiennent du glucose.

Trois principales classes de protéines peuvent donc être définies en fonction de leur mode d'extraction et de leur association aux polymères de la paroi : une classe de protéines relarguées par agents réducteurs et deux classes de protéines relarguées par  $\beta$  glucanases ou  $\beta$ -élimination et considérées comme associées aux  $\beta$ -glucanes (Figure 19).





**Figure 19 : Localisation hypothétique des protéines pariétales dans la paroi de *S. cerevisiae*. Le squelette interne est constitué de  $\beta$ -(1,3) glucane qui forme un réseau tridimensionnel. Ce réseau est consolidé par de nombreuses liaisons hydrogènes entre les molécules de  $\beta$ -(1,3) glucane. Des chaînes de chitine sont couplées à l'extrémité non réductrice du  $\beta$ -(1,3) glucane et renforcent le squelette. Des chaînes de  $\beta$ -(1,6) glucane très branchées sont aussi associées au  $\beta$ -(1,3) glucane. A l'extérieur, les protéines pariétales seraient associées aux extrémités non réductrices du  $\beta$ -(1,3) glucane soit directement (Pir-CWP) soit par l'intermédiaire d'une chaîne de  $\beta$ -(1,6) glucane et d'une partie de l'ancre GPI (GPI-CWP). Les protéines associées de façon non covalente (solubilisées par détergents, urée...) et les protéines liées par des ponts disulfures aux autres protéines pariétales sont également représentées (d'après Smits et al., 2001).**

### 1.3.3.1 Liaisons protéine-protéine

Les protéines pariétales libérées par des agents réducteurs correspondent à des protéines pariétales qui seraient liées entre elles par des ponts disulfures. Par exemple, il est décrit que l'agglutinine a (Aga1p) de la levure existe sous la forme d'un dimère dans lequel une sous-unité de la protéine est ancrée à la paroi et est liée par pont disulfure à une deuxième sous-unité qui serait relarguée des cellules par les agents réducteurs (Watzel et al., 1988, Roy et al., 1991).

Chez *S. cerevisiae*, 4 glycoprotéines sont relarguées de façon spécifique par le  $\beta$ -mercaptoéthanol (gp38, gp49, gp68, gp88) ainsi que des protéines de très haut poids moléculaire mal séparées en SDS-PAGE (Orlean et al., 1986). Les protéines gp49 et gp88 semblent N-glycosylées tandis que les protéines gp38 et gp68 semblent O-glycosylées mais

elles n'ont pas été séquencées. Cappellaro et al. (1998) ont identifié 7 protéines relarguées par 2 mM DTT à 4°C pendant 2 heures (Tableau 8). Trois protéines ont été identifiées : l'endoglucanase Bgl2p (29 kDa), l'exoglucanase Exg1p (44 kDa) et la chitinase Cts1p (116kDa). Une autre protéine Scw8p/Ccw5p semble appartenir à la famille des protéines PIR. Les 3 autres protéines Scw3p, Scw4p et Scw10p présentent des homologies de séquence avec des glucanases mais il n'existe pas de preuve biochimique de leur activité glucanasique. Par la suite, trois autres protéines majeures relarguées par incubation de la paroi en présence de 2 %  $\beta$ -mercaptoéthanol à 37°C ont été identifiées (Moukadiri et al., 1999). Une protéase Bar1p de 120 kDa est observée chez le mutant *mnn1/mnn9* mais pas dans la souche sauvage. Deux bandes à 45 et 40 kDa correspondent à la seule protéine Ccw5p (ou Pir4p) qui a déjà été décrite comme solubilisée à la fois par des agents réducteurs et par  $\beta$ -élimination et action de la laminarinase, suggérant que cette protéine existe sous plusieurs formes dans la paroi (soluble ou associée aux  $\beta$ -(1,3) glucanes) ou bien que le clivage par les différents traitements n'est pas spécifique.

Des protéines habituellement localisées à l'intérieur de la cellule peuvent être aussi retrouvées dans des extraits pariétaux obtenus par incubation des levures avec du  $\beta$ -mercaptoéthanol. Ce sont des homologues de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (Tdh1p à Tdh3p) (Delgado et al., 2001) et des membres de la famille HSP (Heat Shock Protein) (Lopez-Ribot et Chaffin, 1996). Ces protéines n'étant pas des protéines sécrétées et, en absence de biotinylation préalable des protéines pariétales, la question se pose de savoir si ce sont des protéines pariétales multi-fonctionnelles comme l'é nolase ou la fructose diphosphate aldolase (Pardo et al., 1999) qui sont sécrétées par un mécanisme non conventionnel ou si elles proviennent de cellules lysées.

Chez *C. albicans*, une seule protéine a été décrite comme étant libérée par des agents réducteurs (Casanova et al., 1992). C'est une protéine de 58 kDa qui est une fibrinogen-binding protein (Pra1p) habituellement sécrétée. Elle est relarguée par le  $\beta$ -mercaptoéthanol et est à la fois N-glycosylée (18% de la protéine) et O-glycosylée (3-4% de la protéine).

La majorité des protéines relarguées par les agents réducteurs à partir de la paroi sont des enzymes hydrolytiques (Tableau 8). Ces protéines ne semblent pas être hyperglycosylées (mis à part Bar1p qui n'est détectée que chez le mutant *mnn1/mnn9*). Il est intrigant de constater que la majorité des protéines libérées par traitement réducteur soit des protéines telles que Cts1p, Bgl2p, Exg1p qui sont habituellement sécrétées dans le milieu de culture. En outre, des traitements SDS sans agent réducteur libèrent aussi les mêmes protéines. La

question de l'existence réelle de liaisons protéines-protéines reste entière au moins pour la plupart des protéines identifiées puisqu'il n'existe pas d'analyse chimique prouvant que le relargage de ces protéines est effectivement dû à la coupure de la liaison S-S. Le  $\beta$ -mercaptoéthanol ou le DTT pourrait aussi modifier les interactions ioniques à l'intérieur de la paroi, favorisant ainsi la libération de protéines retenues par ces interactions à l'intérieur de la paroi.

**Tableau 8 : Protéines relarguées par des agents réducteurs à partir de cellules entières ou de paroi isolée chez *S. cerevisiae*.**

Gènes	Méthode d'extraction	Caractéristiques de la protéine	Références
<i>BGL2</i>	2 mM DTT à 4°C	Endo- $\beta$ (1,3) glucanase ayant une activité glucanosyltransférase	Cappellaro et al., 1998
<i>EXG1</i>	2 mM DTT à 4°C	Exo- $\beta$ (1,3) glucanase	Cappellaro et al., 1998
<i>CTS1</i>	2 mM DTT à 4°C	Endochitinase 1	Cappellaro et al., 1998
<i>SCW8/CCW5/PIR4</i>	2 mM DTT à 4°C	Protéine de la famille PIR	Cappellaro et al., 1998/ Moukadiri et al., 1999
<i>SCW3</i>	2 mM DTT à 4°C	Homologies de séquence avec des glucanases	Cappellaro et al., 1998
<i>SCW4</i>	2 mM DTT à 4°C	Homologies de séquence avec des glucanases	Cappellaro et al., 1998
<i>SCW10</i>	2 mM DTT à 4°C	Homologies de séquence avec des glucanases	Cappellaro et al., 1998
<i>BAR1</i>	2% $\beta$ -ME à 37°C	Protéase	Moukadiri et al., 1999
<i>SSA1, SSA2</i>	1% $\beta$ -ME à 37°C	Protéines chaperones (famille HSP70)	Lopez-Ribot et al., 1996
<i>TDH1, TDH2, TDH3</i>	1% $\beta$ -ME à 37°C	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase	Delgado et al., 2001

### 1.3.3.2 Liaison protéines GPI- $\beta$ glucane

#### Mise en évidence d'un lien entre $\beta$ -glucane et protéine GPI

Les travaux réalisés sur l' $\alpha$ -agglutinine (Sag1p) et l' $\alpha$ -agglutinine (Aga1p) ont suggéré, les premiers, dans les années 90 l'association covalente entre l'ancre GPI de la

protéine et le  $\beta$ -1,6 glucane (Wojciechowicz et al., 1993, Lu et al., 1994, Lu et al., 1995, Lipke et al., 1989, Roy et al., 1991). La construction de protéines chimères contenant l'extrémité C-terminale de l' $\alpha$ -agglutinine (Van Berkel et al., 1994) a montré que cette région est essentielle et suffisante pour attacher de façon covalente une protéine hétérologue à la paroi. Par ailleurs, un mutant déficient dans la partie C-terminale de l' $\alpha$ -agglutinine sécrète cette protéine dans le milieu de culture (Wojciechowicz et al., 1993). L' $\alpha$ -agglutinine présente à la surface de la cellule peut donc être retrouvée sous 3 formes : une forme liée par ancre GPI à la membrane plasmique, une forme soluble périplasmique et une forme pariétale. Les formes soluble et pariétale ont perdu leur phosphatidyl inositol. (Lu et al., 1994). Seule la forme pariétale est associée aux  $\beta$ -glucanes (Lu et al., 1995).

Les études à l'aide du mutant *mnn9* ont montré qu'un certain nombre de mannoprotéines autre que Sag1p sont libérées de la paroi par  $\beta$ -glucanase (Van Rinsum et al., 1991, Montijn et al., 1994). La caractérisation de la liaison entre le  $\beta$ -glucane et les protéines s'est faite progressivement au cours de différentes études. (1) Après purification sur Con A-Sepharose et chromatographie d'échange d'ions pour éliminer tous les glucanes contaminants, la fraction protéique contient un glucane qui ne peut pas être éliminé par action de l'endoH ou de la PNGase, ce qui suggère que ce glucane n'est pas N-lié. (2) L'utilisation de l'Aculeacin A, un inhibiteur de la synthèse des  $\beta$ -glucanes, entraîne une diminution de l'incorporation des mannoprotéines dans la paroi et la sécrétion de mannoprotéines dans le milieu (Valentin et al., 1986). (3) Un anticorps anti- $\beta$ -1,6 glucane produit par Montijn et al. (1994) reconnaît un ensemble de 4 protéines parmi les protéines extraites par  $\beta$ -1,3 glucanase. Cette reconnaissance est sensible à l'oxydation périodique et peut être inhibée par du  $\beta$ -1,6 glucane mais pas par du mannane ou du  $\beta$ -1,3 glucane ; elle est donc spécifique du  $\beta$ -1,6 glucane. (4) Les protéines libérées par action d'une  $\beta$ -(1,3) glucanase recombinante sont reconnues à la fois par des anticorps anti- $\beta$ -1,6 glucane et anti- $\beta$ -1,3 glucane. L'action d'une  $\beta$ -(1,6) glucanase sur ces protéines se traduit par une diminution de la taille de ces protéines et par la perte de la reconnaissance par l'antisérum anti- $\beta$ -1,3 glucane mais pas de celle par l'antisérum anti- $\beta$ -1,6 glucane suggérant l'agencement suivant : protéine- $\beta$ -(1,6) glucane- $\beta$ -(1,3) glucane (Kapteyn et al., 1994, 1995b, 1996). (5) Cette reconnaissance de la protéine par l'anti- $\beta$ -1,6 glucane est abolie après traitement avec de l'acide hydrofluorique (HF) et par l'action de phosphodiesterases suggérant ainsi l'intervention d'une liaison phosphodiester entre protéine et glucane (Kapteyn et al. 1994, Kapteyn et al., 1996). (6) L'action du HF sur la paroi entière libère le même profil de protéines que les  $\beta$ -glucanases (Kapteyn et al., 1996). (7) Le

séquençage de 3 de ces protéines montrent que ce sont des protéines portant une ancre GPI (Van Der Vaart et al., 1995). Ainsi une classe de protéines GPI associées au  $\beta$ -1,3 glucane pariétal par liaison phosphodiester de l'ancre GPI au  $\beta$ -1,3 glucane par l'intermédiaire d'une chaîne de  $\beta$ -1,6 glucane a été caractérisée.

Fujii et al. (1999) ont caractérisé chimiquement le lien existant entre l'ancre GPI de Tip1p et le glucane, l'obstacle majeur étant la faible quantité de la chaîne de sucre associée aux glucanes. Tip1p a été isolée de la paroi par l'action d'une glucanase. Ensuite, elle a été digérée par une protéase et le séquençage et la composition en sucres de chaque peptide libéré a permis de caractériser le peptide C-terminal comme le seul peptide lié à des glucanes. La chaîne de sucre associée au peptide C-terminal contient du mannose, du glucose (7,5 moles par mole de peptide) et de l'éthanolamine (1 mole/mole de peptide) mais pas de glucosamine, suggérant ainsi que l'ancre GPI a été clivée entre l'éthanolamine et la glucosamine. Le traitement par une phosphodiesterase élimine l'éthanolamine et certains résidus glucose ont leur extrémité réductrice libre tandis qu'aucun mannose n'a d'extrémité réductrice libre. Ceci suggère donc qu'il existe une liaison phosphodiester entre l'éthanolamine et la partie sucre et que le  $\beta$ -glucane est associé aux résidus mannose par son extrémité non réductrice. Ainsi, la structure de l'ancrage de Tip1p aux  $\beta$ -glucanes suggérée par Fujii et al. (1999) est représentée à la figure 20A : l'ancre GPI est tronquée au niveau de la chaîne de mannose et l'extrémité réductrice du mannose est liée aux glucanes. Dans cette analyse, il n'y a aucune preuve que le glucane de la chaîne est un  $\beta$ -1,6 glucane mais cela est déduit des études précédentes montrant que les protéines sont d'abord liées au  $\beta$ -1,6 glucane puis au  $\beta$ -1,3 glucane.

De leur côté, Kollar et al. (1997) ont montré qu'un complexe mannose/glucose peut être relargué de la fraction protéique de la paroi par traitement HF. L'analyse de ce complexe révèle qu'il ne contient pas de glucosamine et qu'il est composé de 5 résidus mannose liés en  $\alpha$  et attachés à un di- ou trisaccharide de glucose portant une extrémité réductrice libre et qui peut être hydrolysé par la  $\beta$ -1,6 glucanase. La structure hypothétique de la liaison protéine- $\beta$ -1,6 glucane est représentée sur la figure 20B (Kollar et al., 1997). La protéine ainsi glycosylée n'a pas été identifiée.



### ***Séquence des protéines GPI identifiées dans la paroi***

La liste des protéines GPI de *S. cerevisiae* identifiées comme associées à la paroi est présentée dans le tableau 9.

Plusieurs approches ont été utilisées pour identifier des protéines GPI ancrées de façon covalente dans la paroi. Premièrement, plusieurs protéines libérées par  $\beta$ -1,3 glucanase et associées au  $\beta$ -1,6 glucane ont été identifiées par séquençage peptidique. Parmi les 4 glycoprotéines mises en évidence par Montijn et al. (1994) et Kapteyn et al. (1996), 3 ont été séquencées. La bande à 60 kDa est codée par le gène YKL096w et la protéine correspondante a été nommée Cwp1p (Cell Wall Protein 1). La bande à 80 kDa semble être identique à Tip1p qui avait été identifiée initialement par Kondo et Inouye (1991) comme une protéine induite par un choc thermique froid. Une autre protéine GPI relarguée en quantité abondante de la paroi mais qui n'est pas reconnue par l'anticorps anti- $\beta$ -1,6 glucane a été mise en évidence et nommée Cwp2p (Van Der Vaart et al., 1995, 1996). Pour Ccw12p, Tir3p et Icw1p, leur libération de la paroi par laminarinase et leur marquage par du phosphate radioactif suggèrent également qu'elles sont associées à la paroi de la même façon (Mrsa et al., 1999b, Moukadiri et al., 1997).

Un certain nombre de protéines ont été localisées dans la paroi grâce à un marquage GFP ou HA. La disparition de ce marquage après traitement de la paroi par laminaminase suggère que ces protéines sont associées à la paroi au niveau des  $\beta$ -(1,3) glucanes. On peut citer Crh1p, Crh2p (Congo Red Hypersensitivity), Fit1p, Fit2p, Fit3p (Facilitator of Iron Transport) (Rodriguez-Pena et al., 2000, Protchenko et al., 2001).

Pour d'autres protéines GPI, l'association covalente au  $\beta$ -1,6 glucane a été mise en évidence par la construction de protéines chimères comprenant la partie C-terminale de la protéine fusionnée à l' $\alpha$ -galactosidase puis par la mise en évidence de l' $\alpha$ -galactosidase dans les extraits pariétaux libérés par  $\beta$ -1,3 glucanase et reconnaissance de la protéine chimère par un anti- $\beta$ -1,6 glucane. Plusieurs études sur diverses protéines ancrées GPI liées à la paroi ont en effet montré que (1) si ces protéines sont privées de la séquence signal du GPI, elles ne sont pas retenues dans la paroi mais relarguées dans le milieu de culture (Van Der Vaart et al., 1996a, Ram et al., 1998) et que (2) des protéines de fusion possédant la partie C-terminale de protéines pariétales GPI ne sont pas sécrétées mais restent associées avec la paroi (Hamada et al., 1998b, Van Der Vaart et al., 1996a, Bourdineaud et al., 1998). Dix-huit protéines GPI potentiellement ancrées à la paroi ont été identifiées de la sorte (Tableau 9).

**Tableau 9 : Liste des protéines GPI relarguées par  $\beta$ -1,3 glucanase et pour lesquelles l'association aux  $\beta$ -1,6 glucanes a été montrée chez la levure.**

Gènes	Nom de la protéine	Mise en évidence de la localisation*	Fonction et régulation	Références
<b>Famille Tir :</b>				
YBR067c	Tip1	G, DB	Lipase, induite à basse température	Van der Vaart et al., 1995
YER011w	Tir1/Srp1	DB, PF	Induite à basse température	Bourdineaud et al., 1998
YIL011w	Yib1	DB		
YJR150c	Dan1/ Tir3	DB, G		Mrsa et al., 1999b
YJR151c	Tir4	DB, PF	Induite en anaérobiose	
YKL096w	Cwp1	G, DB, L		Van der Vaart et al., 1995, Shimoi et al., 1995
YKL097w-a	Cwp2	G, PF, DB, L		Van der Vaart et al., 1996b
YLR040c	Tir5	DB		
YOR009w	Tir6	DB, PF		
YOR010c	Tir2	DB	Induite à basse température	
<b>Famille Flo :</b>				
YAL063c	Flo9	DB	Flocculation	
YAR050w	Flo1	PF, DB	Flocculation	Van der Vaart et al., 1996a
YHR211w	Flo5	DB	Flocculation	
YKR102w	Flo10	DB	Flocculation	
YIR019c	Flo11	DB	Flocculation	
<b>Famille Sed1 :</b>				
YDR077w	Sed1	PF, DB	Induite en phase stationnaire	Van der Vaart et al., 1996a
YER150w		DB, PF		
<b>Famille Yel040</b>				
YEL040w	Crh1	DB, PF, L	Homologue de glucanase	Rodriguez-Pena et al., 2000
YGR189c	Crh2	DB, PF, L	Homologue de glucanase	Rodriguez-Pena et al., 2000
<b>Famille des agglutinines</b>				
YJR004c	Ag $\alpha$ 1/Sag1	G, PF, DB	Adhérence	Lu et al., 1995
YNR044w	Aga1	DB	Adhérence	Roy et al., 1991
<b>Autres</b>				
YCR089w		DB, PF		Kapteyn et al., 1999a
YDR534c	Fit1	DB, L, PF	Impliquée dans le transport du fer	Protchenko et al., 2001
YHR126c		DB		
YIL171c		DB		
YJL078c	Pry3	DB, PF		
YLR042c		DB		
YLR110c	Ccw12	DB, PF, G		Mrsa et al., 1999b
YLR194c		DB		
YLR391w-a	Icwp	DB,G		Moukadiri et al., 1997, Mrsa et al., 1999b
YNL300w		DB, PF		
YNL327w	Egt2	DB, PF	Endoglucanase impliquée dans la séparation cellules mère-fille	
YOL155c		DB		
YOR214c		DB, PF		
YOR382w	Fit2	DB	Impliquée dans le transport du fer	Protchenko et al., 2001
YOR383c	Fit3	DB	Impliquée dans le transport du fer	Protchenko et al., 2001
YDR134c		PF		
YPL130w		DB		

\* G, protéine isolée de la paroi par  $\beta$ -(1,3) glucanase ou  $\beta$ -(1,6) glucanase ; PF, association au  $\beta$  glucane de la paroi mise en évidence par la construction d'une protéine chimère possédant le C-terminal de la protéine couplé à l' $\alpha$ -galactosidase ; DB, déduction de l'association par l'absence de motif dibasique dans la séquence ; L, localisée dans la paroi par la construction de protéines chimères portant un tag GFP.



C'est le cas de: Flo1p, Sed1p (Van Der Vaart, 1996a), Tir1p (Bournineaud et al., 1998), la protéine codée par YCR089w (Kapteyn et al., 1999a), Cwp2p (Van der Vaart et al., 1996b), Crh1p, Crh2p, Egt2p, Ccw12, Fit1, Sag1p, Pry3p (Hamada et al., 1998b).

L'association covalente des protéines GPI aux polysaccharides peut aussi être suggérée sur une simple analyse de la séquence de la région C-terminale de la protéine. Les observations de Vossen et al. (1997) et Popolo & Vai (1999) ont montré que des protéines GPI connues pour être ancrées dans la membrane comme Exg2p, Gas1p, Yap3p et Kre1p contiennent un motif dibasique d'acides aminés spécifique en amont du site de clivage de l'ancre GPI (Tableau 10). La présence de deux acides aminés basiques en amont du site  $\omega$ , lysine (K), arginine (R) ou histidine (H) est une caractéristique des protéines ancrées à la membrane (Caro et al., 1997). Cependant, cette règle a des exceptions. Ainsi, la protéine Dcw1p a une localisation membranaire malgré l'absence de ce résidu dibasique (Kitagaki et al., 2002). Ensuite, la présence de résidus valine (V), isoleucine (I), ou leucine (L) en position  $\omega-4$  ou  $\omega-5$  et de résidus tyrosine (Y) ou asparagine (N) en position  $\omega-2$  est une caractéristique des protéines envoyées par la suite à la paroi (Hamada et al., 1998a). Ainsi, le motif dibasique agirait comme un signal négatif tandis que les acides aminés spécifiques joueraient un rôle positif dans l'attachement à la paroi (Hamada et al. 1999). La perte par mutation du motif dibasique peut aboutir à la délocalisation d'une protéine à ancre GPI telle que Yap3p de la membrane vers la paroi (Hamada et al., 1998b). Cependant, Sampaio et al. (1999) ont montré que Gas1p, caractérisée par la présence d'un motif dibasique en amont de son site de clivage peut aussi être détectée dans les extraits pariétaux. Cette approche *in silico* de la séquence de *S. cerevisiae* a permis de prévoir l'envoi à la paroi de 38 protéines parmi les 51 protéines ancrées GPI identifiées (Caro et al., 1997, et Hamada et al., 1998a, 1998b, 1999).

**Tableau 10 : Signal GPI des protéines GPI putatives chez *S. cerevisiae* (Caro et al., 1997).**

Gene name	Protein name	GPI-signal
<i>YAL063c</i>	Flo9	STASLEISTYAG SANLLAGSGLSVFIASLLLAII
<i>YAR050w</i>	Flo1**	STASLEISTYAG SANLLAGSGLSVFIASLLLAII
<i>YBR067c</i>	Tip1**	VETASNAGQRVN AGAASFGAVVAGAAALLL
<i>YBR078w</i>		SSSSSSKKS <sup>g</sup> KG AAPELVPEATSEFMGVVAAVGVAYYKIKATICVSI TLISSLMISLPFLFYETVGSLLNFICR
<i>YCL048w</i>		DSK <sup>g</sup> KRVISKYAN SANPSMQLDPLLEFGTCLVAMLLF
<i>YCR089w</i>		WITTPIVSTYAG SASKFLCSKFFMIMVMVINFI
<i>YDR055w</i>		ASSSSSKSKGN AAIMAPIGQTTPLVGLLTAIIMSIM
<i>YDR077w</i>	Sed1**	SASSHSVVINSN GANVVVPGALGLAGVAMLLF
<i>YDR144c</i>	Mkc7	SPTSSSSPK <sup>g</sup> EN GGHNLNPPFFARFITAIFHHI
<i>YDR261c</i>	Exg2*	LSSTTTSTR <sup>g</sup> SKN AATSNKLTTSQLLPIKNMSLTWKASVCALAITIAALCASL
<i>YDR349c</i>		SNSTNRTSSAS <sup>g</sup> AGVRLSSPYTFNKDPAGHVTRIASLLLSIFSLIVL
<i>YDR522c</i>	Sps2	AKSQGSSK <sup>g</sup> ME <sup>g</sup> N SAPKNIFIDAFKMSVYAVFTVLF <sup>g</sup> SIIF
<i>YDR534c</i>		SSTTPQIVNYTG AADSIAAGTGLMGAALAAVIFL
<i>YEL040w</i>		ASSSTSSMSGN AGANVAANWRLTVLCVILGYVL
<i>YER011w</i>	Tir1/Srp1**	ATKAVSEQTEN AAKAFVGMGAGVAAAAMLL
<i>YER150w</i>		VSSTHDVETNSN AANARAI PGALGLAGAVMMLL
<i>YGR189c</i>		EASSTNSVQISN GADLAQSLPREGKLFVLLVALLL
<i>YHR126c</i>		PSSTANVSVEG AGMKVESKNMGYIVGVAALLFL
<i>YHR211w</i>	Flo5	STASLEISTYAG SANLLAGSGLSVFIASLLLAII
<i>YIL011w</i>	Yib1	STNSSSSATSKN AGAAMDGMGFFSAGVGAAIAGAAAMLL
<i>YIR019c</i>	Flo11	YSVPSISSTY <sup>g</sup> G AANIKVLGNFMWLLLALPVVF
<i>YJL078c</i>		TSTTAKLSAYE <sup>g</sup> AATPLSIFQCNSLAGTIAAFVAVLEAF
<i>YJL171c</i>		LSNGVRLTNMQN GVWYYILAIFTAFTQVLLI
<i>YJR004c</i>	Aga1/Sag1**	TSTSLMISTYE <sup>g</sup> KASIFFS <sup>g</sup> AELGSIIFLLLSYLLF
<i>YJR150c</i>		SSASRVIDVTN GANKFNNGVFGAAAIAGAAALLL
<i>YJR151c</i>		SSASYTVSINTN GAYNFDKDNIFGTAVAVVALLL
<i>YKL046c</i>		APLNITKGSKAG AGIITAVIGISIVACALWLVF
<i>YKL096w</i>	Cwp1**	QAPNTVYEQTEN AGAKAAVGMGAGALAVAAAYLL
<i>YKL097w-a</i>	Cwp2**	SSTETISQQTEN GAAKAAVGMGAGALAAAMLL
<i>YKR102w</i>	Flo10	STASLEMSSYL <sup>g</sup> IANHLLTNSGISIFIASLLLAIV
<i>YLR040c</i>		SSSTSRSTSQSN GAHAKSLYFPMALFGIFAVAL
<i>YLR042c</i>		TNTLSSSTSTG <sup>g</sup> VGSVKPCLYFVLMLETIAYLFS
<i>YLR110c</i>		AAPTHSVTSYTG AAKALPAAGALLAGAAALLL
<i>YLR120c</i>	Yap3*	TASATSTSSK <sup>g</sup> RN VGDHIVPSLPLTLISLLFAFI
<i>YLR121c</i>		KSK <sup>g</sup> RALQRAATN SASSIRSTLGLLLVPSLLLSVFFS
<i>YLR194c</i>		GKVASVMSNSTN GAFAGTHIAYGAGAFVAGALLL
<i>YLR343w</i>	Gas2	NVKYPSSEEREN DGTIAFKTSGFVILLISMIAAGILL
<i>YLR391w-a</i>	Icwp**	AVISTFSEGSN VLEAGKSVFIAVAAMLI
<i>YMR006c</i>		ARSSSTANKAN AAALSANTNTLMSLLGAITALFGLI
<i>YMR008c</i>	Pib1	ASASGSSTH <sup>g</sup> K <sup>g</sup> N AGNALVNYSNLNTNTFIGVLSVISA <sup>g</sup> VGLI
<i>YMR200w</i>	Rot1	NRHKTNAIK <sup>g</sup> R <sup>g</sup> ON TSFLTSNAIWYISAGMLGVGSLLFLAF
<i>YMR215w</i>	Gas3	SSKSKGVGNIVN VFSQSGYLALFAGLISALL
<i>YMR307w</i>	Gas1*	SSASSSSSK <sup>g</sup> K <sup>g</sup> N AATNVKANLAQVFTSII <sup>g</sup> LSIAAGVGFALV
<i>YNL190w</i>		TYGPGEKARK <sup>g</sup> N AAPGPSNFNSIKLFGVTAGSAAVAGALLL
<i>YNL300w</i>		NTTTHEISTYV <sup>g</sup> AAVKGSVAGMGAIMGAAAFALL
<i>YNL322c</i>	Kre1*	IKSAIK <sup>g</sup> KT <sup>g</sup> VSHN EAQHLGMSF <sup>g</sup> TSILGGLLTVLIWFL
<i>YNL327w</i>	Egt2	TIKPPSISTY <sup>g</sup> S AAGQLTIRIGSLLLGLISFLL
<i>YNR044w</i>	Aga1**	TSSMVTISQY <sup>g</sup> MG SGSQTRLPLGKLVFAIMAVACNVIFS
<i>YOL030w</i>	Gas5	TSSSQSSSK <sup>g</sup> SK <sup>g</sup> G AAGIIEIPLIFRALAELYNLVL
<i>YOL132w</i>	Gas4	EDKDDLK <sup>g</sup> R <sup>g</sup> K <sup>g</sup> HRN SASISGPLPLGLCLLFFFTSLFF
<i>YOL155c</i>		KTSTGIVQSE <sup>g</sup> IAAGLNANTLNALVGFVLAFFN
<i>YOR009w</i>		SKTTGIVEQTEN GAAKAVIGMGAGALAAVAAMLL
<i>YOR010c</i>	Tir2	QATSTVSEQTEN GAAKAVIGMGAGVMAAAAMLL
<i>YOR214c</i>		PGNITTIGGYEN SSSSLMPSMGILSFLFLYLLLHP
<i>YOR382w</i>		SSSSSSASS <sup>g</sup> S AAPAAFQGASV <sup>g</sup> GALALGLISYLL
<i>YOR383c</i>		SSSTAELSSYTG AADAITAGTGLMGAALAAVMLL
<i>YPL130w</i>		SNISL <sup>g</sup> NEDYDN ASNFLTP <sup>g</sup> TTVALAVLLTILFLIQAY
<i>YPL261c</i>		LGPLPDDK <sup>g</sup> K <sup>g</sup> L <sup>g</sup> K <sup>g</sup> N DARYSFMNYFIITCIGIIM

Le site  $\omega$  suggéré est marqué en gras. Les motifs dibasique précédant le site  $\omega$  de clivage est souligné. Ybr078p est ajoutée à ce tableau bien que son signal GPI soit suivi d'un domaine transmembranaire supplémentaire. \* Protéines membranaires connues; \*\* Protéines pariétales connues.

Cette liste des protéines GPI ancrées à la paroi ne fait cependant pas état de tous les homologues des protéines GPI qui peuvent exister comme le montre la mise en évidence récente d'une protéine GPI membranaire codée par *DFG5*, homologue de *DCW1*, qui n'avait pas été identifiée par la recherche systématique de Caro et al. (1997) et Hamada et al. (1998b) et qui semble de plus impliquée dans la biosynthèse de la paroi ainsi que le montre son homologie avec une  $\alpha$ -1,6 mannosidase (Kitagaki et al., 2002).

### ***Rôle des protéines GPI pariétales***

Les fonctions des protéines GPI liées de façon covalente à la paroi sont résumées dans le tableau 9. Dans la plupart des cas, leur fonction est inconnue. Certaines protéines comme les très petites protéines codées par les gènes *CCW12* et *YDR134C*, 133 et 66 acides aminés respectivement, sont supposées être utilisées pour présenter du mannane à la surface cellulaire (Klis et al., 2002). D'autres sont impliquées dans les phénomènes d'adhésion comme l'agglutination sexuelle et la floculation (*Sag1p*, *Aga1p*, *Flo1p*...) D'autres semblent avoir un rôle enzymatique au niveau de la paroi comme *Crh1p* et *Crh2p*. Il n'y a donc pas un rôle commun à toutes ces protéines qui pourrait expliquer leur association aux polysaccharides pariétaux. De plus, aucune de ces protéines n'est essentielle.

Le suivi de l'expression des protéines GPI à l'aide de chips et leur localisation à l'aide de tag GFP (Rodriguez-Pena et al., 2000) ont montré que l'expression des protéines GPI est strictement contrôlée durant le cycle cellulaire et que ces protéines sont souvent localisées dans des régions spécifiques de la paroi (Smits et al., 2001). Par exemple, *Cwp1p* est localisée au niveau de la cicatrice du bourgeon et sa localisation semble dépendante de la présence et de la localisation correcte de la chitine au niveau du septum. *Crh1p* et *Crh2p* sont localisées dans des zones riches en chitine et au niveau des sites de polarisation. De plus, cette localisation de *Crh2p* au niveau du bourgeon est dépendante de l'intégrité du septum et des septines et son système de transport coïncide avec celui de *Chs3p* puisque chez un mutant *chs5* la localisation de *Crh2p* est complètement modifiée (Rodriguez-Pena et al., 2002). Les protéines GPI pourraient donc avoir un rôle dans l'établissement de la polarité et la morphologie cellulaire.

### ***Les protéines GPI associées à la paroi chez les autres champignons***

Chez *Candida albicans*, les premières protéines GPI pariétales à avoir été mises en évidence sont des protéines de la famille des ALS (pour Agglutinin Like Sequence du fait de leur homologie avec l' $\alpha$ -agglutinine). Ce sont des protéines de surface impliquées dans

l'adhésion cellulaire. Als1p et Als3p sont les 2 premiers membres de cette famille à avoir été mis en évidence après action d'une  $\beta$ -1,6 glucanase sur la paroi (Kapteyn, 2000). L'action de la  $\beta$ -1,6 glucanase relargue d'autres protéines de poids moléculaire 65, 100, 170 et 220 kDa qui n'ont pas été identifiées (Bom et al., 1998). D'autres protéines potentiellement ancrées GPI ont été mises en évidence par analyse de séquence : Als1-9 (Hoyer, 2001) ; Csa1 (Lamarre et al., 2000) qui est un antigène de surface principalement exprimé dans la forme mycélienne ; Hyr1 (Bailey et al., 1996) qui est exprimé durant le développement de la forme hyphe mais dont la fonction reste inconnue du fait de l'absence d'homologie avec d'autres protéines ; Hwp1 (Staab et al., 1998) qui est un antigène localisé par immunofluorescence indirecte dans la paroi et dans des extraits de paroi libérés par zymolyase ; Rbt1, Rbt5 et Wap1 (Braun et al., 2000) qui sont des protéines dont les gènes sont réprimés par *TUP1*, un répresseur transcriptionnel qui contrôle négativement la croissance mycélienne. Chez *C. glabrata*, une protéine putative GPI codée par *EPA1* a été identifiée (Cormack et al., 1999). Chez *Candida* comme chez *S. cerevisiae*, il semble exister deux types de protéines GPI qui sont soit membranaires soit liées de façon covalente à la paroi. Les protéines GPI ancrées à la paroi seraient plutôt associées à la croissance mycélienne.

Des protéines associées au  $\beta$ -1,6 glucane ont été aussi observées chez *Wangiella dermatitidis* (Montjin et al., 1997), *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus niger*, *Penicillium roquefortii*, *P. marneffeii* et *K. marxianus*. Seules 3 de ces protéines ont été identifiées : Mp1p, protéine antigénique, chez *P. marneffeii* (Cao et al., 1998), une phosphatase acide chez *K. marxianus* (Yoda et al., 2000) et la protéine Fem1p de *Fusarium oxysporum* (Schoffemeer et al., 2001).

### **1.3.3.3 Liaisons protéines Pir- $\beta$ glucanes**

#### **Protéines relarguées par $\beta$ -élimination**

Un autre groupe de protéines identifié tout d'abord chez *S. cerevisiae* (Mrsa et al., 1997) puis chez *C. albicans* (Kandasamy et al., 2000) peut être libéré par  $\beta$ -élimination à partir de la paroi préalablement traitée avec du SDS/ $\beta$ -mercaptoéthanol. Chez *S. cerevisiae*, six protéines ont été solubilisées par un traitement avec 30 mM NaOH 4°C pendant 16h (Mrsa et al., 1997) : Ccw5p à Ccw10p (34, 250, 115, 57, 52, et 47 kDa). Quatre de ces protéines (Ccw5p, Ccw6p, Ccw7p et Ccw8p) ont été séquencées et se sont révélées être des membres de la famille PIR (Protein with Internal Repeats). Ccw6p correspond à Pir1p (YKL164c),

Ccw8p à Pir3p (YJL159w). Ccw5p et Ccw7p se sont révélées être codées par des gènes homologues à ceux de la famille PIR et ont été nommées Pir4p et Pir2p. Les deux autres protéines n'ont pas été séquencées.

Les protéines de la famille PIR ont été initialement identifiées dans des souches de *S. cerevisiae* résistantes à une protéine antifongique : l'osmotine (Yun et al., 1997). En effet, les souches sur-exprimant des protéines de la famille PIR sont résistantes à cet agent. Les 4 membres de cette famille Pir1p, Pir2p/Hsp150p, Pir3p et Pir4p ont été localisés dans la paroi de *S. cerevisiae* à l'aide d'anticorps spécifiques (Kapteyn et al. 1999a, Toh-e et al., 1993, Mrsa et al., 1999a). La séquence des protéines Pir est caractérisée par la présence d'un peptide signal en position N-terminale, suivi d'un site de reconnaissance Kex2 d'environ 40 acides aminés. Des expériences réalisées avec le mutant *kex2* ont confirmé que les protéines de la famille PIR ont des poids moléculaires plus élevés chez le mutant que chez le sauvage mais restent sécrétées (Mrsa et al., 1997). Elles possèdent des régions répétées (7 à 10 selon la protéine) de 18/19 acides aminés (A A A X S Q I X D G Q V/I Q A T/A T/K X T). La région C-terminale est très conservée. Ces protéines sont caractérisées par un grand nombre de sites potentiels de O-glycosylation (39 à 73) et au maximum un seul site de N-glycosylation.

Chez *C. albicans*, des études réalisées par Mormeneo et al. (1994) montraient déjà l'existence de protéines pouvant être libérées de la paroi par un traitement alcalin. Plus récemment, Kapteyn et al. (1999b) ont mis en évidence la présence d'un homologue de la protéine ScPir2p dans la paroi de *C. albicans* par immuno-empreinte avec un sérum dirigé contre ScPir2p. Ils ont confirmé que cet homologue de Pir2p/Hsp150p (de Mr 235 kDa) n'est pas libéré par  $\beta$ -1,6 glucanase mais par  $\beta$ -1,3 glucanase. En outre, la réactivité de cette protéine avec un anticorps spécifique du  $\beta$ -1,3 glucane disparaît après  $\beta$ -élimination. Par ailleurs, l'extraction par  $\beta$ -élimination de protéines pariétales biotinylées a permis de libérer 4 protéines de 150, 66, 54, et 45 kDa de la paroi. Deux d'entre elles (160 et 66 kDa) réagissent avec un anticorps anti-Pir2/Hsp150 (Kandasamy et al., 2000).

### **Rôle des protéines PIR**

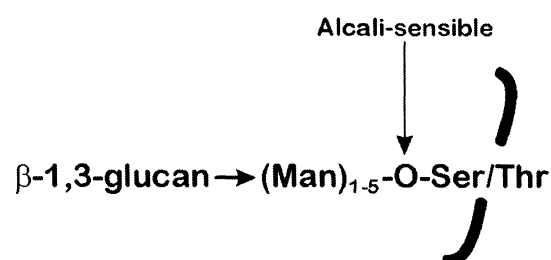
La protéine sécrétée Pir2p/Hsp150p est induite par un choc thermique mais Mrsa et al. (1997) ont montré que l'expression des autres protéines de la famille PIR n'était pas dépendante d'un choc thermique. Le rôle de ces protéines a été étudié par Mrsa et al. (1999a). Les gènes codant pour ces 4 protéines PIR Ccw5p, Ccw6p, Ccw7p et Ccw8p ont été disruptées et le phénotype des mutants étudié. Les mutants *ccw5/ccw7*, *ccw5/ccw7/ccw6* et

*ccw5/ccw6/ccw7/ccw8* poussent plus lentement, ont une sensibilité accrue au Calcofluor et au rouge Congo, et des cellules plus grandes avec une forme irrégulière. Ceci traduit une diminution de la résistance de la paroi. Par ailleurs, la surexpression de *PIR2* induit une résistance accrue à l'osmotine tandis que les cellules qui sont déficientes en *PIR1*, *PIR2* et *PIR3* y sont plus sensibles (Yun et al., 1997). On peut donc penser que les protéines PIR jouent un rôle dans la perméabilité vis à vis de certaines protéines comme l'osmotine. Les protéines PIR sont, en outre, sur-exprimées lors d'un stress (Klis et al., 2002) et des études sur des mutants *KRE* déficients en  $\beta$ -1,6 glucane ont montré que la protéine Pir2p/Hsp150p était incorporée en plus grande quantité dans la paroi de ces mutants. L'augmentation des protéines PIR pourrait être un mécanisme compensatoire de la fragilisation de la paroi causée par la présence d'une faible quantité de  $\beta$ -1,6 glucane (Kapteyn et al., 1999b). La proportion de ces protéines dans la paroi augmente également à pH acide. Il pourrait s'agir là aussi d'un mécanisme qui sert à compenser la fragilisation de la paroi en milieu acide ou d'une meilleure rétention des protéines dans la paroi à pH acide (Kapteyn et al., 2001).

### ***Lien entre les protéines Pir et le $\beta$ -1,3 glucane***

La  $\beta$ -élimination est un procédé qui permet de libérer les O-glycanes et les protéines PIR ont des régions riches en sérine et thréonine. Il est donc suggéré que les protéines PIR sont associées par leur O-glycane à un polysaccharide de la paroi. Ceci est corroboré par le fait que la protéine Ccw5p soit absente de la paroi du mutant *pmt4* qui est affectée dans son O-glycosylation (Mrsa et al., 1997).

Kapteyn et al. (1999) ont montré que 98% des protéines pariétales sont relarguées par l'action d'une  $\beta$ -1,3 glucanase tandis que la digestion par la  $\beta$ -1,6 glucanase ne relargue que 84% des protéines pariétales. Ceci suggère à la fois que la fraction résistante à la  $\beta$ -1,6 glucanase correspond aux protéines PIR et que celles-ci sont liées de façon covalente aux  $\beta$ -1,3 glucanes (Figure 21, Klis et al., 2002).



**Figure 21 : Schématisation hypothétique du mode d'ancrage des protéines PIR au  $\beta$ -(1,3) glucane (d'après Klis, 2002).**

Nakayama et al. (1998), qui ont mis en évidence la modification par phosphorylation du second résidu mannose de la chaîne de O-glycane, ont suggéré que le couplage des chaînes O-glycosylées avec le  $\beta$ -1,3 glucane pourrait nécessiter la présence de mannosylphosphate. Cependant, la liaison entre ces protéines PIR et le  $\beta$ -1,3 glucane n'a jamais été élucidée. L'hypothèse d'une telle liaison repose aujourd'hui exclusivement sur le relargage des protéines PIR à la fois par  $\beta$ -élimination et par l'action d'une  $\beta$ -1,3 glucanase. En outre, la caractérisation récente de la protéine Pir1p comme une protéine nucléaire interagissant avec l'endonucléase Apn1p (Vongsamphanh et al., 2001) met en doute l'hypothèse que ces protéines PIR seraient des protéines structurales de la paroi liées de façon covalente aux  $\beta$ -1,3 glucanes.

#### ***1.3.3.4 Autres types de liaisons entre mannoprotéines et polysaccharides***

Deux classes de protéines associées de façon covalente aux glucanes de la paroi ont été décrites : les protéines ancrées GPI associées au  $\beta$ -1,3 glucane via une chaîne de  $\beta$ -1,6 glucane et les protéines PIR directement associées au  $\beta$ -1,3 glucane (Figure 22A, B). Cependant, l'existence d'associations protéine-glucane différentes de celles-ci ont été suggérées. Par exemple, la protéine GPI Cwp1p ancrée à la paroi par son ancre peut aussi être relarguée de la paroi par  $\beta$ -élimination (Kapteyn et al., 2001), ce qui suggère que cette protéine pourrait être doublement liée aux  $\beta$ -1,3 glucanes (Figure 22C). Chez des mutants *fks1* et *gas1* déficients en  $\beta$ -1,3 glucane, des protéines GPI seraient associées à du  $\beta$ -1,6 glucane directement lié à la chitine (Figure 22D, Kapteyn et al., 1997).

D'après les résultats de Montjin et al. (1994) montrant que certaines protéines relarguées par  $\beta$ -1,3 glucanase ne sont pas reconnues par l'anti- $\beta$ -1,6 glucane et ne sont pas des protéines GPI, Klis et al. (1994) a aussi émis l'hypothèse qu'il peut exister une quatrième forme de glycosylation similaire à celle décrite chez les cellules mammifères (Schreiner et al., 1994) qui met en jeu une liaison directe entre l'asparagine et un  $\beta$ -glucane.

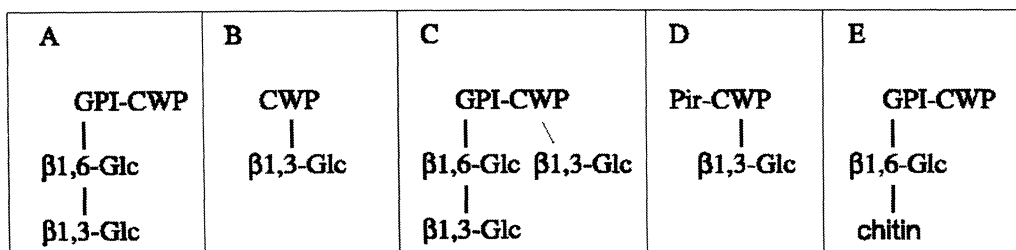


Figure 22 : Revue des différents complexes protéines-polysaccharides suggérés dans la paroi de *S. cerevisiae* (d'après Klis et al., 2002).

L'analyse structurale de la liaison protéine-polysaccharide reste trop rarement entreprise. Chez *S. cerevisiae*, cette liaison n'a été étudiée chimiquement que chez 2 protéines dont Tip1p et une protéine de nature inconnue (Fujii et al., 1999, Kollar et al., 1997). Ce genre d'analyses structurales est absolument nécessaire pour assurer la présence d'une liaison covalente. Il se pourrait en effet que la libération de protéines dites associées de façon covalente aux polysaccharides consécutivement à la dégradation des glucanes ne résulte que du relâchement des mailles polysaccharidiques induit par les traitements glucanasiques. En outre, certaines protéines pourraient être associées aux  $\beta$ -glucanes par simple affinité lectinique ou interaction ionique. Ce type d'interactions a été négligé jusqu'à aujourd'hui dans l'étude des protéines pariétales alors que des études génomiques ont mis en évidence des séquences consensus d'association non covalente à des polysaccharides ([www.afmb.cnrs.mrs.fr/CAZy](http://www.afmb.cnrs.mrs.fr/CAZy)). Des exemples existent chez *S. cerevisiae*. La chitinase Cts1p, libérée de la paroi par des agents réducteurs, a un domaine en C-terminal qui se fixe à la chitine avec une grande affinité (Kuranda et Robbins, 1991) et qui est analogue au domaine non-catalytique de binding de polysaccharide de certaines cellulases. De plus, Bgl2p, protéine abondante de la paroi, se fixe au  $\beta$ -1,3 glucane à la fois sous forme native et dénaturée probablement par l'intermédiaire de ponts hydrogènes (Kubl et Tanner, 1989, Mrsa et al., 1992,1993). Elle n'est pas la seule protéine capable de s'associer au  $\beta$ -1,3 glucane *in vitro*, suggérant que ce type de « binding » pourrait être dû à plusieurs séquences peptidiques (Mrsa et al., 1992). Au contraire, un certain nombre d'enzymes périplasmiques fortement associées à la paroi telles que l'invertase ou la phosphatase acide ne se fixent pas au  $\beta$ -1,3 glucane, même sous leur forme déglycosylée (Mrsa et al., 1992).



**Revue :**

***A. fumigatus* et paroi**

# ***Aspergillus fumigatus* cell wall: composition and biosynthesis**

M. BERNARD & J.P. LATGE

Unité des *Aspergillus*, Institut Pasteur, 75015 Paris, France

Analysis of the cell wall of *Aspergillus fumigatus* is guided by obvious biological reasons: the cell wall protects the fungus against the aggressive human defense reactions, it harbors most of the fungal antigens and it represents a potential drug target. This review will discuss our current understanding of the structural organization of the polysaccharides constitutive of the cell wall of *A. fumigatus* [ $\alpha$  and  $\beta(1-3)$  glucans, chitin, galactomannan, and  $\beta(1-3),(1-4)$  glucan] and of the enzymes (synthases, transglycosidases, and glycosyl hydrolases) responsible for their biosynthesis and remodeling. Comparative analysis of the cell wall of the conidium and mycelium also provides insights on their respective roles during the pathogenic life of this fungal species.

**Keywords** Q1?

## **Introduction**

A thorough analysis of the biochemical organization and biogenesis of the cell wall of the opportunistic pathogen *Aspergillus fumigatus* is essential to obtain a thorough understanding of the growth of this filamentous fungus, both *in vitro* and in its human host. All exchanges between the fungal cell and its environment rely upon a functional and permeable cell wall. In *A. fumigatus*, like in other pathogenic fungi, the cell wall is continuously in contact with the host cells and proteins and acts as a sieve and a reservoir for molecules such as antigens and enzymes playing an active role during infection [1]. Moreover, the cell wall is a physically rigid layer, which protects the fungal cell from its environment, especially in the lung where the mycelial and conidial cell wall plays a major role against the lung phagocyte killing mechanisms. Although the fungal cell wall has been considered for a long time as an inert organelle, recent studies, mainly based on the analysis of yeast cell wall, suggest that the fungal cell wall is indeed a dynamic

structure where constitutive polymers are continuously chemically modified and rearranged during cell wall biosynthesis (see review by Popolo *et al.*, this issue) [2].

Cell wall biosynthetic enzymes have been long recognized as being essential for the fungal life and unique specific drug targets, since a fungus cannot survive without a wall or even if its cell wall is markedly altered from the native form. Fungal cell wall polysaccharides do not have a counterpart in humans suggesting that inhibitors of the fungal polysaccharide biosynthetic pathway should be potent and specific antifungals without marked secondary side effects in humans [3]. New drugs are especially required in the case of treatment of aspergillosis because of the high incidence of therapeutic failure in the treatment of invasive aspergillosis [4]. The recent clinical launch of Cancidas, a  $\beta(1-3)$  glucan synthase inhibitor, has confirmed that the development of new drugs can indeed be based on inhibition of cell wall biosynthetic enzymes (see article by Douglas, this issue) [5]. Our present understanding of the chemical structure and polymer organization of the cell wall of *A. fumigatus* and the characterization of proteins/genes involved in the biosynthesis of the constitutive polymers of the cell wall are presented in this review.

Correspondence: J.P. Latgé, Unité des *Aspergillus*, Institut Pasteur, 75015 Paris, France. Tel.: +33 140613518; Fax +33 140613419; e-mail: jplatge@pasteur.fr

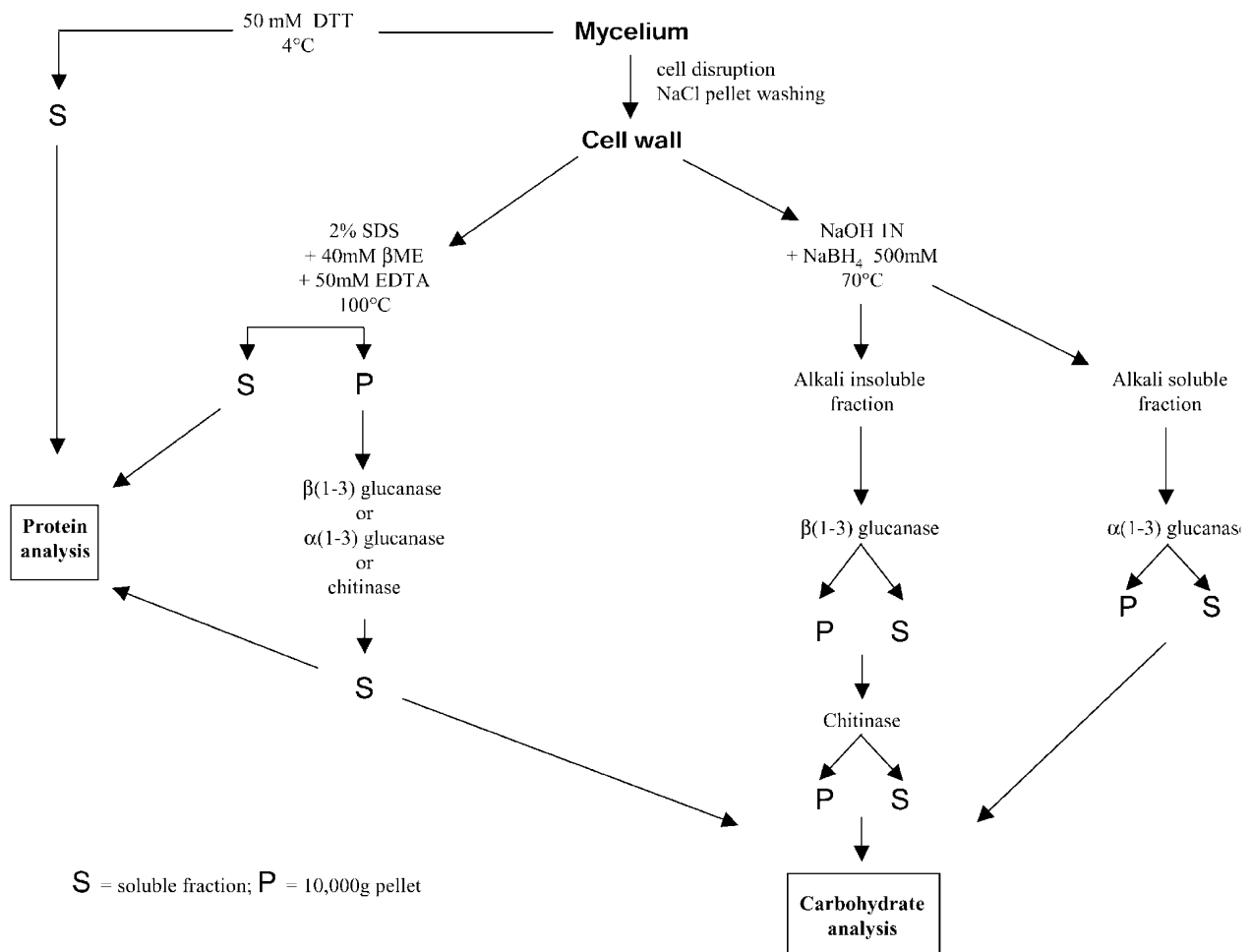
## Composition of the fungal cell wall of *A. fumigatus*

### *Mycelium cell wall*

Figure 1 shows the various extraction protocols that have been used in our laboratory to analyze the cell wall of *A. fumigatus*. Sodium dodecyl sulfate (SDS) mercaptoethanol treatments of the cell wall release noncovalently bound proteins since the major secreted antigens of *A. fumigatus* have been shown by immunoblot experiments to be present in this fraction (M. Bernard, unpublished results). Galactomannan and galactomannan containing proteins have been also extracted from the cell wall by ionic detergent extraction. Therefore, the bulk of proteins extracted from the cell wall by detergents (3.5% of the total cell wall dry weight) contain only proteins passively located in or passing through the cell wall. It is indeed difficult to remove all of the noncovalently bound cell wall-associated proteins

from the cell wall even after 4 h boiling in detergent buffers. Treatment of the detergent-extracted cell wall with  $\beta(1-3)$  glucanase,  $\alpha(1-3)$  glucanase and chitinase for several days did not release more proteins than the incubation buffer alone. Only a single protein homologous to the *Penicillium chrysogenum* or *A. niger* acid phosphatase was released in minute amounts from cell walls by  $\beta(1-3)$  glucanase treatment. However, short incubation of intact mycelium of *A. fumigatus* in a simple buffer also results in the release of this protein. This result suggests that the presence of this phosphatase in the  $\beta(1-3)$  glucanase soluble extract is due to its strong  $\beta(1-3)$  glucan-binding properties (M. Bernard, unpublished results). Data gathered on the study of cell wall proteins in *Aspergillus* suggest that, in contrast to the situation in yeast, the *A. fumigatus* cell wall does not harbor proteins bound covalently to cell wall polysaccharides.

The main structural components of the *A. fumigatus*



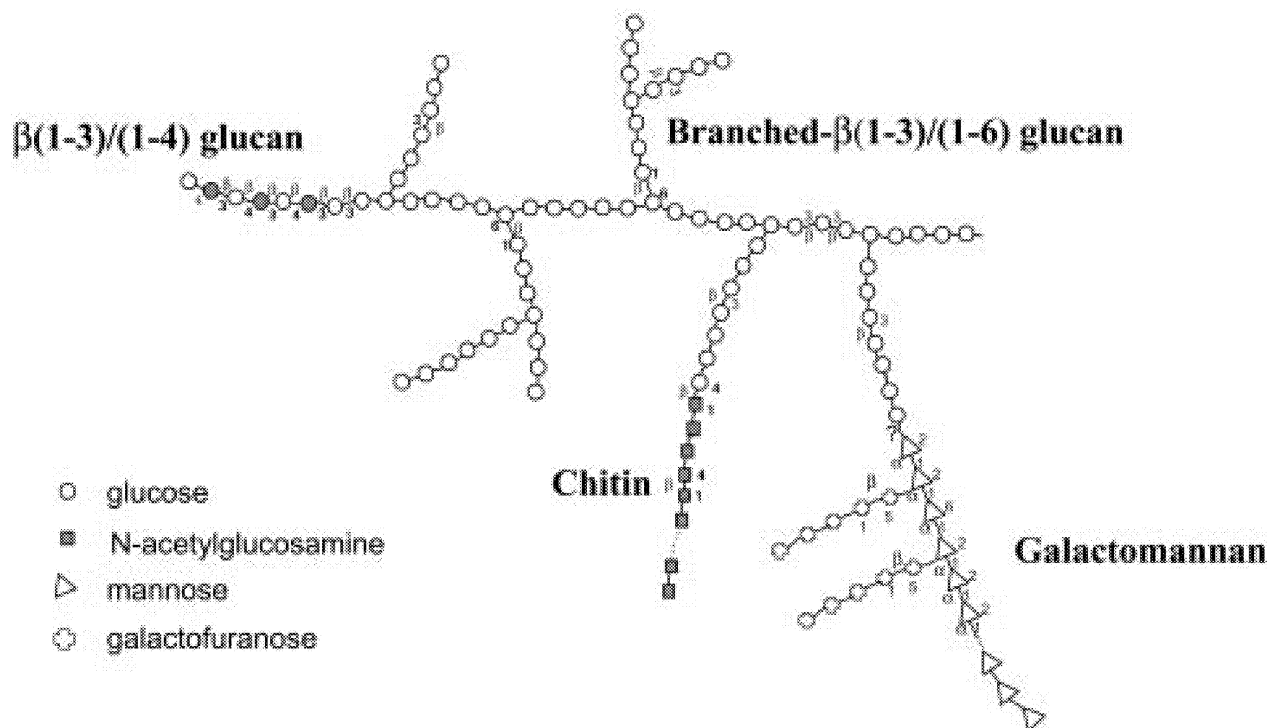
**Fig. 1** Methodology to extract proteins and polysaccharides from the cell wall of *A. fumigatus*.

cell wall are polysaccharides that can be divided into two groups, depending on their solubility in hot alkali. The alkali soluble fraction is composed mainly of  $\alpha(1-3)$  glucans with some galactomannan (W. Morelle *et al.*, unpublished results). The alkali-insoluble fraction of the *A. fumigatus* cell wall, which is the fraction believed to be responsible for fungal cell wall rigidity, has been analyzed in detail [6]. Following enzymatic digestion with recombinant endo- $\beta(1-3)$  glucanase and chitinase, several fractions that contained specific interpolysaccharide covalent linkages were purified by liquid chromatography and characterized by GC-MS and NMR. Galactomannan, chitin and  $\beta(1-3)$  glucan are the main components of the alkali-insoluble fraction (Fig. 2). Galactomannan is composed of a core chain of  $\alpha$ -mannose residues with short side chain of  $\beta(1-5)$  galactofuranose residues [7]. Acetolysis experiments preferentially released a tetrasaccharide consistent with the presence of a repeating mannose oligosaccharide unit  $-[6\text{Man}\alpha 1-2\text{Man}\alpha 1-2\text{Man}\alpha 1-2\text{Man}\alpha 1]$ . Two of the  $\alpha(1-2)$  linked mannose residues are substituted in position 3 or 6 and are branching points for the galactofuran side chain. A linear  $\beta(1-3)/(1-4)$  glucan, never previously described in fungi, was also found in *A. fumigatus* that represented 10% of total  $\beta$ -glucan. NMR and methylation data indicated that the linear  $\beta(1-3)/(1-4)$  glucan had the following repeating unit  $-[3\text{Glc}\beta 1-$

$4\text{Glc}\beta 1]-$ . The core  $\beta(1-3)$  glucan is a branched polymer with 4% of  $\beta(1-6)$  branch points. Chitin, galactomannan and the linear  $\beta(1-3)/(1-4)$  glucan are covalently linked to the nonreducing end of  $\beta(1-3)$  glucan side chains. Chitin is linked via a  $\beta(1-4)$  linkage to  $\beta(1-3)$  glucan. The linkage of galactomannan to glucan is sensitive to acetolysis suggesting that the galactomannan is linked to glucan via a  $\alpha(1-6)$  linkage. The lack of the availability of a suitable endo-mannanase prevented up to date the chemical identification of the linkage between the galactomannan and the  $\beta(1-3)$  glucan.

A galactosamino-galactan has been also found in the alkali-insoluble fraction of the cell wall [6]. This heteropolymer is reminiscent of a similar polysaccharide secreted by *A. parasiticus* [7, Q2]. In *A. fumigatus*, the galactosamine polymer is also found in the culture filtrate (T. Fontaine, unpublished results) where it becomes rapidly insoluble. There is no evidence to date that this polymer is covalently associated with other cell wall polymers.

Our current understanding of the chronological events occurring in the biosynthesis of the structural polysaccharides of the *A. fumigatus* cell wall suggests the following: (i) biosynthesis of  $\beta(1-3)$  glucan and chitin is the primary event in the organization of the cell wall; (ii) branching of  $\beta(1-3)$  glucan, resulting in an increase in potential acceptor sites, is a prerequisite and the second



**Fig. 2** Polysaccharides composition of the alkali-insoluble fraction of the mycelial cell wall of *A. fumigatus*.

event in the elaboration of the cell wall structure; and (iii) branching of  $\beta(1-3)$  glucan is followed by the formation of covalent linkages between the  $\beta(1-3)/(1-6)$  glucan core and chitin, galactomannan and  $\beta(1-3),(1-4)$  glucan which constitute the three-dimensional structural core of the fungal cell wall.

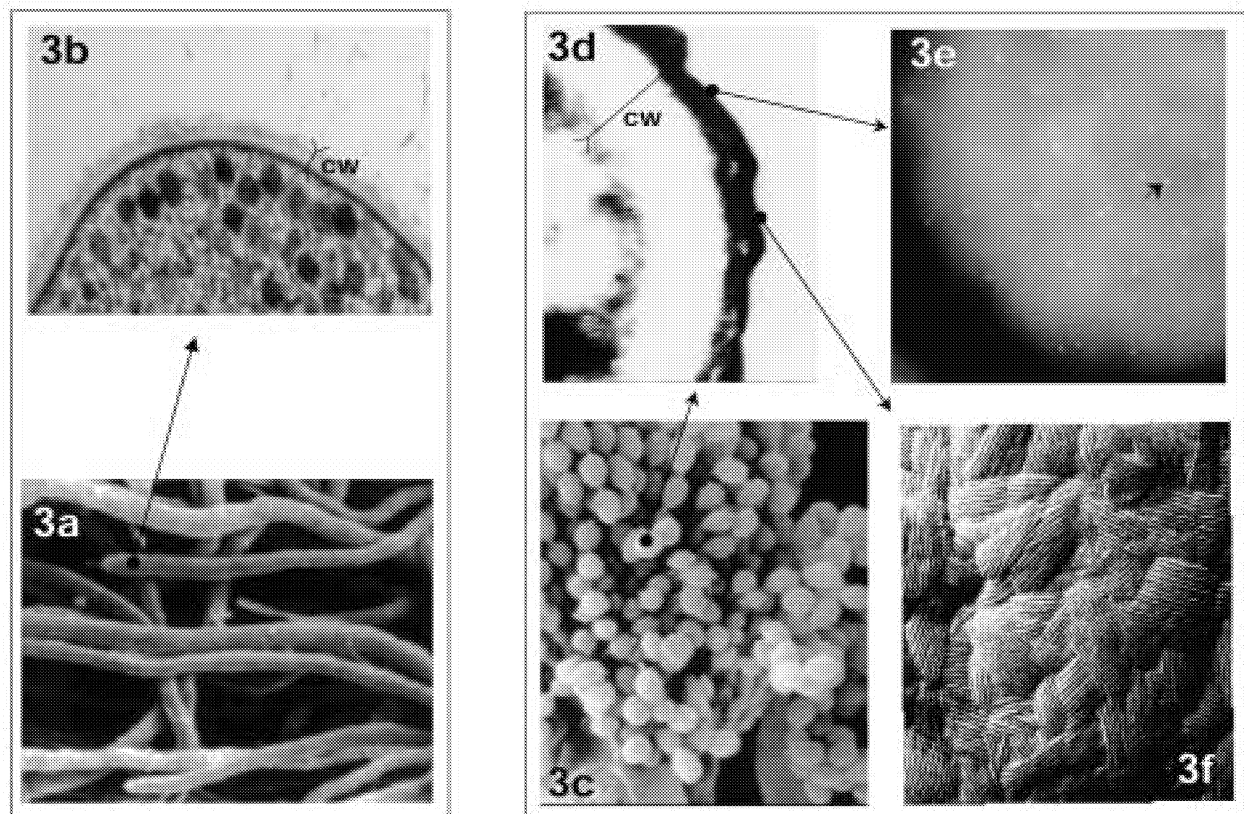
#### The conidium cell wall

Interestingly, the approaches used to study the conidial cell wall are different to the ones involved in the study of the mycelium. Although the structure of the cell wall of conidia and mycelia is different (Fig. 3), very little is known about the chemical organization of the constitutive conidial polysaccharides and most work has been dedicated to the analysis of the components of the conidial outer layer. This is appropriate because conidia are the first fungal cells to come in contact with the human host and they play a role in resisting phagocytosis by alveolar macrophages.

The outermost cell wall layer of the *A. fumigatus*

conidium is characterized by the presence of interwoven rodlet fascicles (Fig. 3). This layer, which is composed of hydrophobic proteins (hydrophobins), confers hydrophobic properties to *A. fumigatus* conidia. The gene encoding the rodlet protein RodAp of *A. fumigatus* has been cloned and a rodlet-less mutant has been generated [9]. In *A. fumigatus*, the absence of this rodlet layer resulted in the formation of conidia that become more hydrophilic than the conidia of the parental strain [10]. Binding to host cell proteins is not affected significantly *in vitro* and in animal models of invasive pulmonary aspergillosis, mortality induced by intranasal inoculation was comparable for the parent and rodlet-less strains with a lower inflammatory response with the  $\Delta rod$  mutant [9,11]. In *A. fumigatus*, a 14-kDa hydrophobin (named RodBp) which co-extracts with the 16-kDa RodAp protein has been recently identified and is presently under investigation (S. Paris *et al.* unpublished).

Immunocytochemical data indicated that receptors to host proteins (fibrinogen, laminin, complement, fibro-



**Fig. 3** Ultrastructural features of the cell wall (cw) of the mycelium (a,b) and conidium (c–e) of *A. fumigatus*. (a, c) Scanning electron micrographs; (b, d) transmission electron micrographs of sections of the conidial and mycelial cell wall (note the dense melanin outer layer in the conidial wall); (e) back-scattered electron micrograph of a conidium labeled with laminin, anti-laminin antibody and protein A-gold particles (arrow heads) (courtesy of G. Tronchin); (f) carbon–platinum replica of the conidial surface showing the rodlet structure.

nectin, albumin, immunoglobulins, collagen, and surfactant proteins) are located at the conidial surface (Fig. 3). Both carbohydrate and protein molecules on the conidial surface are involved in binding to host proteins. For example, an unknown carbohydrate molecule bound in a calcium-dependent manner to pulmonary surfactant proteins A and D. Fucose- and sialic acid-specific lectins also associated with adhesion have been identified on the conidial cell wall. Western-blot analysis has shown that complement binds to a 54–58-kDa doublet protein found on the surface of conidia. The receptor for laminin is a 72-kDa glycoprotein, which is also present on the surface of the conidium (see [1] for references).

The conidial cell wall is composed of a dense pigmented outer layer and a translucent inner layer (Fig. 3). The chemical composition of the conidial cell wall of *A. fumigatus* has not been characterized yet, with the exception of the melanin component [12,13]. The use of mutants with white conidia has shown that the melanin of the conidial cell wall plays a major role in protection against the phagocytic reactions within the phagolysosome. Both *in vivo* and *in vitro* studies have shown that white conidia were more efficiently damaged by phagocytes than green conidia. When conidia were incubated *in vitro* with reactive oxygen species (ROS) like NaOCl or hydrogen peroxide, white conidia were about 10-fold more sensitive to ROS than green conidia [14]. This finding indicated that the pigment gives *A. fumigatus* conidia some protection against ROS which could be responsible for the higher survival of green conidia in monocytes. Analysis of the ability of wt and mutant strains conidia to cause ROS production in human monocytes and polymorphonuclear leukocytes has shown that the resulting ROS were scavenged by the pigment present in wild type conidia. These results explain the observed higher sensitivity to ROS of white conidia. The nonpigmented strains are amongst a small group of mutants that are known to be attenuated in virulence.

#### Cell wall-associated molecules involved in diagnosis

When a serum of an aspergilloma patient is used in indirect immunofluorescence assays, the cell wall of the infective mycelium is intensively labeled, indicating that cell wall-associated molecules are recognized by the immune host response [15]. Accordingly, cell wall-associated molecules, either constitutive or secreted, are used in diagnosis. The most important antigens used in the diagnosis of aspergillosis in the immunocompetent (used for the detection of specific antibodies) are secreted molecules that are passively located in the cell wall. Three of these mycelial antigens have been studied

extensively: the 18-kDa Asp1 ribonuclease, the Cat1p catalase (a tetrameric glycoprotein with a monomeric subunit of 90 kDa) and the 88-kDa dipeptidylpeptidase V (identified previously as the so called 'chymotrypsin antigen') [16–18].

In contrast to the immunocompetent host, growth of *A. fumigatus* in the tissues of an immunosuppressed host is not correlated with an increase in anti-*Aspergillus* antibody titers. In fact, current methods for serological diagnosis of Invasive Aspergillosis are based on the detection of circulating cell wall polysaccharides in biological fluids, e.g. serum, urine and bronchoalveolar lavages, from patients. Among these polysaccharides, the most commonly targeted molecule is galactomannan. Monoclonal antibodies directed against the galactofuran side chains of the galactomannan are at the basis of the only commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) antigen detection kit [19]. The other cell wall polysaccharide that can also be used diagnostically is  $\beta(1-3)$  glucan, even though it is not an immunogenic molecule. In this case, the detection system is based on the activation of a proteolytic coagulation cascade, which is an essential defense mechanism of arthropods against the invasion of their hemocoel by microorganisms [20].

#### Cell wall-associated enzymes

Enzymes involved in the biosynthesis of the *A. fumigatus* cell wall that have been characterized at the molecular level are shown in Table 1.

##### Polysaccharide synthases

Enzymes responsible for the biosynthesis of the major polysaccharides of the alkali-insoluble fibrillar core of the cell wall,  $\beta(1-3)$  glucans and chitin are integral membrane proteins which have been extensively investigated in *Aspergillus* (Fig. 4).

##### Chitin synthesis

Chitin synthase (CHS) catalyzes the polymerization of GlcNAc from uridine diphosphate (UDP)-GlcNAc. *A. fumigatus* is the fungal species with the highest number of CHSs: seven CHS have been identified to date (see article by Munro & Gow, this issue) [21]. CHS of moulds have been split into six classes according to their amino acid sequences. Biochemical data have suggested that classes I–III are zymogenic, i.e. stimulated *in vitro* by trypsin whereas classes IV to VI are nonzymogenic. Classes III, V and VI have been only identified in filamentous fungi. Interestingly, mutants with the most altered phenotype result from inactivation of *CHS* genes belonging to class III and V (Table 1) [22,23]. Only

**Table 1** Enzymes associated to the synthesis of the mycelial and conidial cell wall of *A. fumigatus*

Enzyme	Phenotype of mutant
<b>CHSs</b>	
Class I <i>CHSA</i>	No
Class II <i>CHSB</i>	No
Class III <i>CHSC</i>	No
<i>CHSG</i>	Reduced growth rate Increased hyphal branching
Class IV <i>CHSF</i>	?*
Class V <i>CHSE</i>	Swollen hyphae Altered conidiation
Class VI <i>CHSD</i>	No
<b><math>\beta(1-3)</math> glucan synthase</b>	
<i>FKS1</i>	†(Essential)
<i>RHO1</i>	†(Essential)
<b><math>\alpha(1-3)</math> glucan synthases</b>	
<i>AGS1</i>	Reduced growth rate and altered conidiation
<i>AGS2</i>	Reduced growth rate and altered conidiation
<b><math>\beta(1-3)</math> glucanosyl transferases</b>	
<i>GEL1</i>	No
<i>GEL2</i>	Reduced growth rate and altered conidiation
<i>GEL3</i>	?‡
<b>Mannosyl transferases</b>	
<i>MNN9</i>	?*
<i>VANI</i>	?*
<b>Chitinases</b>	
<i>ENGL1</i>	?*
<b>Endo- <math>\beta(1-3)</math> glucanases</b>	
<i>ENGL1</i>	No
<b>Melanin biosynthetic enzymes</b>	
<i>ALB1</i>	White conidia
<i>ARPI, 2</i>	Reddish pink conidia
<i>ABRI, 2</i>	Brown conidia
<i>AYGI</i>	Yellowish green conidia

\*Gene cloned but disruption not performed.

†Q6.

‡Gene cloned but disruption not attempted because *GEL3* is not expressed in standard culture conditions.

mutations in *Af CHSE* and *Af CHSG* result in a growth phenotype: reduction in hyphal growth, periodic swellings along the length of hyphae and a block on conidiation partially restored by growth in presence of an osmotic stabilizer. No apparent direct correlation exists between the severity of the mutant phenotype and the amount of residual chitin in the cell wall as a consequence of the CHS gene disruption (Table 1). A double *CHSE/CHSG* disruption has been recently obtained and the phenotype of the double mutant is only additive (E. Mellado *et al.*, unpublished results). This double mutant is still viable suggesting an alternate regulation of the various remaining CHSs. Expression studies are presently underway to understand the additive, redundant or synergistic roles of the various

CHSs of this multigene family in chitin deposition in *A. fumigatus*.

#### *$\beta(1-3)$ glucan synthesis*

$\beta(1-3)$  glucans of *A. fumigatus* are synthesized by a plasma membrane-bound glucan synthase complex, which uses UDP-glucose as a substrate and extrudes  $\beta(1-3)$  glucan chains through the membrane into the periplasmic space (see article by Douglas, this issue) [24,25]. A gene homologous to the *FKS* genes of *S. cerevisiae*, which encodes the putative catalytic subunit of  $\beta(1-3)$  glucan synthase, has been identified in *A. fumigatus*. The *FKS1* ORF of *A. fumigatus* is 6.5 kb long with two introns at the C- and N-termini and is almost identical to the *A. nidulans FKS* gene (90% amino acid identity and conservation of the intron positions). It is an integral membrane protein with 16 transmembrane domains (Fig. 4). In contrast to yeast, only one *FKS* gene has been found in *A. fumigatus* and this gene is essential. As in yeast,  $\beta(1-3)$  glucan synthase is regulated by the Rho GTPases, and four members of this family have been cloned and sequenced: *RHO1* of *A. fumigatus* is 949 bp long with four introns and codes for a 21.5-kDa protein highly homologous to *RHO1* of *S. pombe* and *S. cerevisiae* [25].

#### *$\alpha(1-3)$ glucan synthesis*

Two genes *AGS 1/AGS 2* involved in  $\alpha(1-3)$  glucan synthesis have been identified. *AGS1* and *AGS2* are around 6 kb long and are characterized by two putative hydrolase and synthase domains separated by a single transmembrane fragment (Fig. 4). Their sequences are highly homologous to the *S. pombe*  $\alpha(1-3)$  glucan synthase genes.  $\Delta AGS1$  and  $\Delta AGS2$  mutants show a slight reduction in growth rate and a reduction in the concentration of the  $\alpha(1-3)$  glucan of the alkali-soluble fraction of the fungal cell wall (A. Beauvais *et al.*, unpublished results).

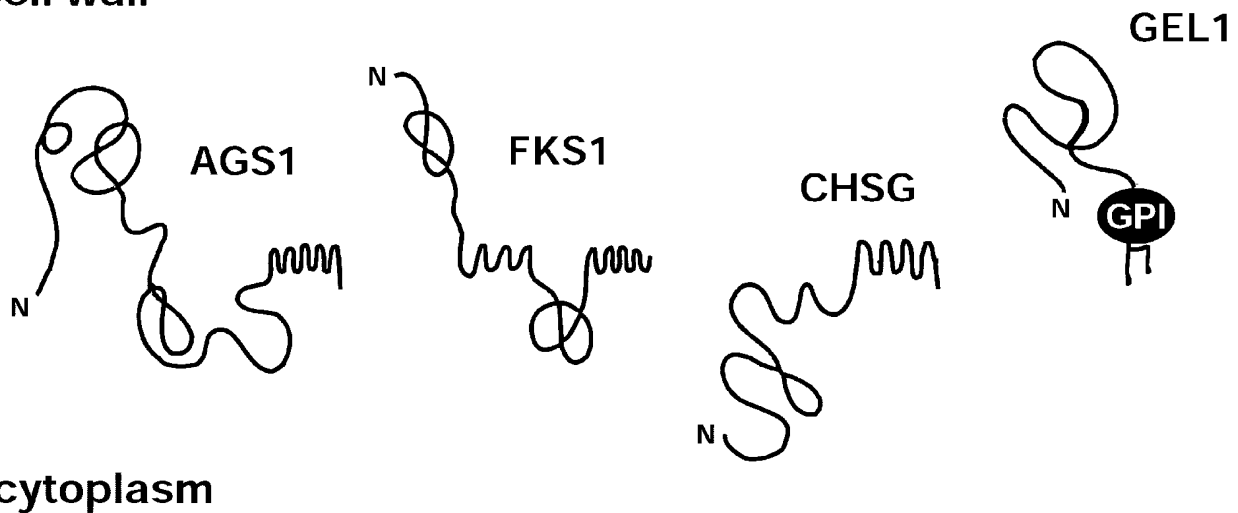
#### *Galactomannan synthesis*

The biosynthesis of galactomannan of *A. fumigatus* has not been investigated in detail. Homologs of the yeast *MNN9* and *VANI* that could be responsible for the elongation of the mannan chain have been identified recently in our laboratory (J. Sarfati *et al.*, unpublished results). Glycosyl transferases responsible for the synthesis of the galactofuran side chains and transfer to the mannan chain are as yet unknown.

#### *Polysaccharide remodeling enzymes*

Native  $\beta(1-3)$  glucan chains produced by the  $\beta(1-3)$  glucan synthase complex are disorganized and remain

## cell wall



**Fig. 4** Topology prediction of membrane enzymes involved in the biosynthesis of the polysaccharides of the cell wall of *A. fumigatus* (based on Top Pred 2 analysis with the following options: length of full window, 21; length of core window, 11; upper cutoff, 10 and lower cut off, 06; basic pI calculated with EMBOSS/iep suggests a cytosolic location). AGS,  $\alpha(1-3)$  glucan synthase; FKS,  $\beta(1-3)$  glucan synthase; CHS, chitin synthase; GEL,  $\beta(1-3)$  glucanosyl transferases.

alkali-soluble until covalent linkages occur between  $\beta(1-3)$  glucans and other cell wall components (Fig. 2). Such transglycosylation reactions presumably occur in the periplasmic space of the *A. fumigatus* cell wall. Transglycosidases responsible for the linkage between glucans and other polysaccharides, which play a role in the reticulation and stabilization of the cell wall skeleton, are now under investigation in our laboratory.

#### Transferases

A novel  $\beta(1-3)$  glucanosyltransferase isolated from the cell wall of *A. fumigatus* has been characterized recently [26,27]. This enzyme internally splits a  $\beta(1-3)$  glucan molecule and transfers the newly generated reducing end to the nonreducing end of another  $\beta(1-3)$  glucan molecule. The generation of a new  $\beta(1-3)$  linkage between the acceptor and donor molecules results in the elongation of  $\beta(1-3)$  glucan chains. The predicted amino acid sequence of *GEL1*, encoding this enzymatic activity, is homologous to several yeast protein gene families (*GAS* in *Saccharomyces cerevisiae*, *PHR* in *Candida albicans*, *CGG* in *C. glabrata* and *EPD* in *C. maltosa*) that are required for correct morphogenesis in yeast. The biochemical assays performed on purified recombinant Gas1p of *S. cerevisiae*, Phr1p and Phr2p of *C. albicans* and complementation experiments have shown now that these yeast proteins have a  $\beta(1-3)$  glucanosyltransferase activity similar to that of Gelp. Gelp is a glycosylated protein attached to the membrane via a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor (Fig. 4), similarly to the homologous yeast proteins.

Mutations in *GEL*, *PHR* and *EPD* all result in alteration of polar hyphal growth.

Another glucanosyltransferase (Bgt1p) homologous to the *S. cerevisiae* and *C. albicans* Bgl2p has been found in *A. fumigatus* [28]. This enzyme cleaves laminaribiose from the reducing end of linear  $\beta(1-3)$  glucans and transforms the remaining glucan to another  $\beta(1-3)$  glucan acceptor with a  $\beta(1-6)$  linkage. As in yeast, null mutants of *A. fumigatus* Bgt1 do not display a phenotype different of the wild-type parental strain. Since the gene is present as a single copy in the genome, the absence of phenotype for the null mutant suggests that this enzyme does not play a major role in cell wall morphogenesis and in particular in cross-linking of cell wall polysaccharides, a result expected since this enzyme requires a free reducing end for activity. It also indicates that not all glucanosyltransferases associated to the cell wall have an obligatory role in cell wall biosynthesis.

#### Hydrolases

$\beta(1-3)$  glucanases and chitinases that may play roles in morphogenetic events such as germination and branching, which require plasticization and cell wall expansion, have not been investigated in detail in *A. fumigatus*.

In *A. nidulans* there are at least 12 chitinase genes and therefore the chitinase gene family in *A. fumigatus* is also likely to be expansive. Cell wall-associated and secreted chitinases have been detected in *A. fumigatus* [29]. Much of the cellular chitinase activity does not bind to conA and is heat sensitive. In contrast, secreted chitinases are heat stable, bind to conA and are among the most



immunologically reactive components of the cell as judged by their binding to antibodies from sera of patients suffering from aspergillosis. Most chitinases detected have an acidic pI between 3.3 and 4.5. However, with the exception of a 45-kDa polypeptide, no chitinase has been purified, or identified by its molecular weight. Two chitinases have been cloned in *A. fumigatus* (D. Adams, personal communication) but disruption of chitinase genes has not yet been reported.

An endo- $\beta$ (1–3) glucanase (ENGL1p) and 3 exo- $\beta$ (1–3) glucanases are associated with the cell wall of *A. fumigatus* and have been purified and biochemically characterized [30,31]. Molecular studies in *A. fumigatus* were centered exclusively on the endoglucanase *ENGL1*. This was likely to be an important enzyme because it is located in the cell wall and because of its mode of action (endosplitting activity efficient on complex polysaccharide structure). This suggests that this enzyme could play a role in hydrolyzing existing cell wall structures, allowing hyphal branching as well as germ tube emergence or the formation of the numerous free reducing and nonreducing ends necessary for the activity of  $\beta$ (1–3) glucanosyltransferase. Expression studies have shown that *ENGL1* is expressed constitutively at all growth stages independently of the presence of an insoluble and soluble  $\beta$ (1–3) glucan substrate in the culture medium. However, the lack of phenotype for the null *ENGL1* mutant and the absence of *ENGL1* homolog suggests that this endo- $\beta$ (1–3) glucanase activity does not play a major morphogenetic role in *A. fumigatus*.

#### *Enzymes involved in the biosynthesis of melanin*

Melanin biosynthesis has been the focus of several studies in the last few years [12,13,32]. *A. fumigatus* synthesizes its pigment via the dihydroxynaphthalene (DHN)–melanin pathway. Molecular studies have identified six genes involved in the DHN–melanin biosynthetic pathway. The six genes form a cluster spanning the 19-kb region of a single chromosome and are all regulated developmentally and expressed during conidiation. *ALBI* (= *PKSP*) encodes a putative protein of 234 kDa, which exhibits a high degree of similarity with a polyketide synthase and is homologous to *WA* of *A. nidulans*. The product of *ALBI* has not yet been identified. *ARPI* and *ARP2* encode a scytalone dehydratase and a 1,3,6,8 THN reductase respectively. *ABRI* share sequence homologies with multicopper oxidases while *ABR2* had 65% similarities to a laccase encoded by *YA* of *A. nidulans*. The function of the sixth gene *AYGI* remains unknown.

Mutation in the *A. fumigatus* melanin pathway

induced a modification or reorganization of the cell wall, since white conidia have a smooth surface whereas wild-type conidia showed a distinct ornamentation on their surface. The chemical modifications associated to the change in surface ornamentation remain unknown.

#### **Conclusion and prospective**

This review of the cell wall structure and associated enzymes has shown how little we know about the cellular, biochemical and genetic mechanisms controlling cell wall synthesis in *A. fumigatus*.

The understanding of the enzymatic function of all synthases remain poorly understood since the lack of purified or recombinant proteins prevents the characterization of their biochemical activities and the analysis of their direct interactions with other members of these multiprotein synthase complexes. Elaboration of *N*-mannans is totally unexplored in moulds. Analysis of this biosynthetic pathway will be vital to understand the biosynthesis of the galactomannan that is both an essential component of the cell wall and a major antigen in *A. fumigatus*. The enzymatic activities responsible for the branching of  $\beta$ (1–3) glucans or the linkage chitin- $\beta$ (1–3) glucan, have not yet been identified but should be investigated because they are active in the periplasmic space and involved in essential key biosynthetic steps. As such, they represent ideal targets (essential, accessible) for drug development. The first transglycosidase activity, which plays an active role in cell wall synthesis and fungal morphogenesis, has been identified in our laboratory. These proteins of the Gel family are anchored to the plasma membrane via a GPI. Two-dimensional electrophoretic studies have identified five GPI-protein families common to yeast and moulds that include Gelp [34 Q3; Mouyna *et al.*, unpublished results]. These results suggest that the four other protein families may play, like Gelps, a significant role during cell wall biosynthesis. These are now being investigated biochemically with the hope of finding new wall-remodeling GPI-anchored membrane proteins. Comparative biochemistry and genomics, due to the ongoing *A. fumigatus* genome sequencing project, will allow the identification of cell wall biosynthetic pathway genes that are either species-specific or common to both yeast and mould.

Although progress has been made in the area, the analysis of chemical linkages between components of the cell wall remains incomplete: (i) anchoring of the bulk galactomannan proteins to the cell wall remains unsolved; (ii) the relationship between melanin and the other polysaccharides of the conidial cell wall has not been investigated; (iii) the relationship between the  $\alpha$ (1–3) glucan and the other cell wall polysaccharides is

totally unknown. Such studies may reveal the role of noncovalent linkages in the organization of the cell wall and bring new insights in the understanding of the chemical nature of the association between alkali-soluble and alkali-insoluble polysaccharide fractions of the cell wall.

The cell wall of *A. fumigatus* plays an essential role in the pathobiology of this fungal species. This role is linked directly to morphogenetic changes associated with the life cycle of this fungus. In *A. fumigatus*, the conidial cell wall seems to be involved mainly in protection against phagocyte attack whereas the mycelial cell wall may function more as a permeability barrier allowing for the release of hydrolases in the external medium at the vicinity of the mycelial apex, helping the mycelium to invade the lung parenchyma and associated hydrolases. Influx and efflux of molecules through the *A. fumigatus* cell wall (including antifungals) is totally unknown. Research on the physico-structural organization of the cell wall, totally lacking to date, should show great promise in the understanding of the cell wall permeability to antifungal agents and other molecules.

## Acknowledgements

We are grateful to Jean-Paul Debeaupuis for preparing all illustrations.

## References

- Latgé JP. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev* 1999; **12**: 310–350.
- Smits GJ, Kapteyn JC, van den Ende H, Klis FM. Cell wall dynamics in yeast. *Curr Op Microbiol* 1999; **2**: 348–352.
- Beauvais A, Latgé JP. Membrane and cell wall targets in *Aspergillus fumigatus*. *Drug Resistance Updates* 2001; **4**: 1–12.
- Denning DW. Therapeutic outcome in invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis* 1996; **23**: 608–614.
- Abruzzo GK, Gill CJ, Flattery AM, *et al.* Efficacy of the echinocandin caspofungin against disseminated aspergillosis and candidiasis in cyclophosphamide-induced immunosuppressed mice. *Antimicrobial Agents Chemother* 2000; **44**: 2310–2318.
- Fontaine T, Simenel C, Dubreucq G, *et al.* Molecular organization of the alkali-insoluble fraction of *Aspergillus fumigatus* cell wall. *J Biol Chem* 2000; **275**: 27594–27607.
- Latgé JP, Kobayashi H, Debeaupuis JP, *et al.* Chemical and immunological characterization of the galactomannan secreted by *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun* 1994; **62**: 5424–5433.
- Takada H, Ariki Y, Ito E. Structure of polygalactosamine produced by *Aspergillus parasiticus*. *J Biochem* 1981; **89**: 1265–1274.
- Thau N, Monod M, Crestani B, *et al.* Rodletless mutants of *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun* 1994; **62**: 4380–4388.
- Girardin H, Paris S, Rault J, Bellon-Fontaine MN, Latgé JP. The role of the rodlet structure on the physicochemical properties of *Aspergillus* conidia. *Lett Appl Microbiol* 1999; **29**: 364–369.
- Shibuya K, Takaoka M, Uchida K, *et al.* Histopathology of experimental invasive pulmonary aspergillosis in rats: pathological comparison of pulmonary lesions induced by specific virulent factor deficient mutants. *Microb Pathog* 1999; **27**: 123–131.
- Tsai HF, Chang YC, Washburn RG, Wheeler MH, Kwon-Chung KJ. The developmentally regulated gene cluster involved in conidial pigment biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*. *J Bacteriol* 1999; **181**: 6469–6477.
- Watanabe A, Fujii I, Tsai HF, Chang YC, Kwon-Chung KJ, Ebizuka Y. *Aspergillus fumigatus* alb1 encodes naphthopyrone synthase when expressed in *Aspergillus oryzae*. *FEMS Microbiol Lett* 2001; **92**: 39–44.
- Jahn B, Boukhallouk F, Lotz J, Langfelder K, Wanner G, Brakhage AA. Interaction of human phagocytes with pigmentless *Aspergillus* conidia. *Infect Immun* 2000; **68**: 3736–3739.
- Moutaouakil M, Monod M, Prévost MC, Bouchara JP, Paris S, Latgé JP. Identification of the 33 kDa alkaline protease of *Aspergillus fumigatus* *in vitro* and *in vivo*. *J Med Microbiol* 1993; **39**: 393–399.
- Latgé JP, Moutaouakil M, Debeaupuis JP, Bouchara JP, Haynes KA, Prévost MC. The 18 kDa antigen secreted by *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun* 1991; **59**: 2586–2594.
- Calera JA, Paris S, Monod M, *et al.* Cloning and disruption of the antigenic catalase gene of *Aspergillus fumigatus*. *Infect Imm* 1997; **65**: 4718–4724.
- Beauvais A, Monod M, Debeaupuis JP, Diaquin M, Kobayashi H, Latgé JP. Biochemical and antigenic characterization of a new dipeptidyl peptidase isolated from *Aspergillus fumigatus*. *J Biol Chem* 1997; **272**: 6238–6244.
- Stynen D, Goris A, Sarfati J, Latgé JP. A new sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay to detect galactofuran in patients with invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol* 1995; **33**: 497–500.
- Obayashi T, Yoshida M, Mori T, *et al.* Plasma (1–3)- $\beta$ -D-glucan measurement in diagnosis of invasive deep mycosis and fungal febrile episodes. *Lancet* 1995; **345**: 17–20.
- Mellado E, Aufauvre-Brown A, Specht CA, Robbins PW, Holden DW. A multigene family related to chitin synthase genes of yeast in the opportunistic pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Mol Gen Genet* 1995; **246**: 353–359.
- Mellado E, Aufauvre-Brown A, Gow NAR, Holden DW. The *Aspergillus fumigatus* chsC and chsG genes encode Class III chitin synthases with different functions. *Mol Microbiol* 1996; **20**: 667–679.
- Aufauvre-Brown A, Mellado E, Gow NAR, Holden DW. *Aspergillus fumigatus* chsE: a gene related to CHS3 of *Saccharomyces cerevisiae* and important for hyphal growth and conidiophore development but not pathogenicity. *Fungal Genet Biol* 1997; **21**: 141–152.
- Beauvais A, Drake R, Ng K, Diaquin M, Latgé JP. Characterization of the 1,3- $\beta$ -glucan synthase of *Aspergillus fumigatus*. *J Gen Microbiol* 1993; **139**: 3071–3078.
- Beauvais A, Bruneau JM, Mol PC, Buitrago MJ, Legrand R, Latgé JP. The glucan synthase complex of *Aspergillus fumigatus*. *J Bacteriol* 2000; **83**: 2273–2279.
- Hartland RP, Fontaine T, Debeaupuis JP, Simenel C, Delepierre M, Latgé JP. A novel  $\beta$ -(1–3)-glucanoyltransferase from the cell wall of *Aspergillus fumigatus*. *J Biol Chem* 1996; **271**: 26843–26849.
- Mouyna I, Fontaine T, Vai M, *et al.* GPI-anchored glucanoyltransferases play an active role in the biosynthesis of the fungal cell wall. *J Biol Chem* 2000; **275**: 14882–14889.

- 28 Mouyna I, Hartland RP, Fontaine T, Diaquin M, Latgé JP. A  $\beta(1-3)$  glucanosyltransferase isolated from the cell wall of *Aspergillus fumigatus* is an homolog of the yeast Bgl2p. *Microbiology* 1998; **144**: 3171–3180.
- 29 Hearn VM, Escott GM, Glyn E, Evans V, Adams DJ. Complex chitinolytic system of *Aspergillus fumigatus*. *Microbios* 1998; **93**: 85–104.
- 30 Fontaine T, Hartland R, Beauvais A, Diaquin M, Latgé JP. Purification and characterization of an endo-1,3- $\beta$ -glucanase from *Aspergillus fumigatus*. *Eur J Biochem* 1997; **243**: 315–321.
- 31 Mouyna I, Sarfati J, Recco P, Fontaine T, Henrissat B, Latgé JP. Molecular characterization of a cell wall associated  $\beta(1-3)$  endoglucanase of *Aspergillus fumigatus*. *Med Mycol* 2001 (**Q4**, accepted for publication).
- 32 Tsai HF, Chang YC, Washburn RG, Wheeler MH, Kwon-Chung KJ.. The developmentally regulated *alb1* gene of *Aspergillus fumigatus*: its role in modulation of conidial morphology and virulence. *J Bacteriol* 1998; **180**: 3031–3038.
- 33 Bruneau JM, Magnin T, Tagat E, Legrand R, Bernard M, Diaquin M, Fudali C, LatgéJP. Proteome analysis of *Aspergillus fumigatus* identifies glycosylphosphatidylo-sitol-anchored proteins associated to the cell wall biosynthesis. *Electrophoresis* 2001 (**Q5**, in press).

# **Projet de thèse**

## 2 PROJET DE THESE

A partir des données de la littérature, un schéma de l'organisation des protéines dans la paroi de *S. cerevisiae* a pu être élaboré sur la base des différentes interactions ou associations covalentes existant entre les protéines et les polysaccharides de la paroi (Figure 19). Cette organisation est très figée mais est décrite comme essentielle à l'intégrité de la paroi. Un schéma identique existerait pour la paroi de *C. albicans* (Klis et al., 2002). La question posée au début de ma thèse était la suivante : le modèle élaboré chez la levure peut-il être appliqué aux champignons filamenteux et en particulier à *A. fumigatus* ? En effet, *S. cerevisiae* et *C. albicans* ont une paroi relativement similaire en ce qui concerne leur composition en polysaccharides et protéines pariétales. Nous avons vu, dans l'introduction, que la paroi de *A. fumigatus* a une composition en polysaccharides présentant des différences significatives avec celle de la levure. En outre, les protéines pariétales de *A. fumigatus* n'ont jamais été étudiées. Il est donc intéressant de caractériser l'organisation des protéines dans la paroi et de voir si des interactions similaires à celles décrites chez la levure existent chez ce champignon filamenteux. Dans le cas où certaines protéines pariétales communes aux levures et aux champignons filamenteux se révéleraient essentielles à l'intégrité pariétale, elles deviendraient *de facto* des cibles potentielles pour la découverte de nouveaux antifongiques.

L'objectif de ma thèse a donc été essentiellement centré sur la caractérisation des protéines de la paroi du champignon *A. fumigatus*. Ainsi, au cours de notre étude, nous avons analysé les protéines associées aux polysaccharides de la paroi de *A. fumigatus* et les liaisons responsables de cette association. C'est ce qui sera présenté dans la première partie des résultats. Lors de l'étude des protéines liées au galactomannane, composant essentiel de la paroi, nous avons identifié un mode de glycosylation unique chez *A. fumigatus* mettant en jeu des résidus galactofuranose. Les protéines portant des N-glycanes avec galactofuranose seront discutées dans la deuxième partie de ma thèse. Une analyse de génomique comparative associée à une analyse protéomique présentée dans la troisième partie des résultats et à laquelle j'ai participé a confirmé le rôle des protéines ancrées GPI dans la biosynthèse de la paroi. De plus, un double mutant glucanosyltransférase construit au laboratoire par I. Mouyna montre une croissance mycélienne réduite. Il est alors apparu intéressant d'entreprendre une caractérisation de la morphogenèse de *A. fumigatus* afin d'analyser les modifications cellulaires résultant de ces mutations. Cette étude a également été effectuée de manière

comparative avec un double mutant chitine synthase qui est le seul autre mutant »paroi » présentant un phénotype de croissance. Ces études ont été conduites en essayant d'intégrer la localisation respective des protéines et des polysaccharides de la paroi lors des différentes phases de croissance caractéristiques de ce champignon. Elles constituent la dernière partie des résultats.

# Résultats

**Caractérisation d'une  
phosphatase acide pariétale  
(PhoAp) chez *A. fumigatus***



## Characterization of a cell-wall acid phosphatase (PhoAp) in *Aspergillus fumigatus*

Muriel Bernard,<sup>1</sup> Isabelle Mouyna,<sup>1</sup> Guy Dubreucq,<sup>1†</sup>  
Jean-Paul Debeaupuis,<sup>1</sup> Thierry Fontaine,<sup>1</sup> Constantinos Vorgias,<sup>2</sup>  
Claus Fuglsang<sup>3</sup> and Jean-Paul Latgé<sup>1</sup>

Author for correspondence: Muriel Bernard. Tel: +33 1 45 68 82 25. Fax: +33 1 40 61 34 19.  
e-mail: mbernard@pasteur.fr

<sup>1</sup> Unité des *Aspergillus*,  
Institut Pasteur, 25 rue du  
Docteur Roux, 75724 Paris  
Cedex 15, France

<sup>2</sup> National and Kapodistrian  
University of Athens,  
15784 Athens, Greece

<sup>3</sup> Novozymes A/S,  
Krogshoejvej 36, 2880  
Bagsvaerd, Denmark

**In the filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*, the vast majority of the cell-wall-associated proteins are secreted proteins that are in transit in the cell wall. These proteins can be solubilized by detergents and reducing agents. Incubation of a SDS/ $\beta$ -mercaptoethanol-treated cell-wall extract with various recombinant enzymes that hydrolyse cell-wall polysaccharides resulted in the release of a unique protein in minute amounts only after incubation of the cell wall in the presence of 1,3- $\beta$ -glucanase. Sequence analysis and biochemical studies showed that this glycoprotein, with an apparent molecular mass of 80 kDa, was an acid phosphatase (PhoAp) that was active on both phosphate monoesters and phosphate diesters. PhoAp is a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein that was recovered in the culture filtrate and cell-wall fraction of *A. fumigatus* after cleavage of its anchor. It is also a phosphate-repressible acid phosphatase. The absence of PhoAp from a phosphate-rich medium was not associated with a reduction in fungal growth, indicating that this cell-wall-associated protein does not play a role in the morphogenesis of *A. fumigatus*.**

Keywords: GPI protein, 1,3- $\beta$ -glucan

### INTRODUCTION

The vast majority of proteins associated with the fungal cell wall are secreted proteins that are transiently found in the cell wall before they are secreted into the extracellular environment (Klis, 1994). Most of these proteins have enzymic functions required for the fungus to grow in different natural environments. Recent studies have also suggested that in yeast several proteins are covalently linked to the cell-wall 1,3- $\beta$ -glucans (Kapteyn *et al.*, 1999). Some of these proteins (i.e. the Pir proteins) are released from the cell wall by  $\beta$ -elimination and are supposed to be O-linked directly to 1,3- $\beta$ -glucan (Mrsa *et al.*, 1997; Kandasamy *et al.*, 2000). Other 1,3- $\beta$ -glucan-linked proteins are released from the cell wall by glucanase treatment and are also sensitive to hydrofluoric acid treatment. Initially, these proteins are

anchored by glycosylphosphatidylinositol (GPI) to the plasma membrane and are linked to 1,3- $\beta$ -glucan via 1,6- $\beta$ -glucan through GPI remnants (van der Vaart *et al.*, 1995; Kapteyn *et al.*, 1995, 1996; Fujii *et al.*, 1999). Anchoring of these proteins to the cell-wall polysaccharides is functionally important, since it ensures their localization at the surface of the cell wall. In most cases, even in an extended configuration, a cell surface location will never be achieved if these proteins remain bound to the plasma membrane by their GPI anchor (Stratford, 1994). The cell-wall-associated protein that has been studied most is the sexual agglutinin (AG $\alpha$ 1) that is required for sexual conjugation in *Saccharomyces cerevisiae* (Lipke *et al.*, 1989; Lu *et al.*, 1994). Other cell-wall-associated proteins are thought to be involved in fungal cell wall–host cell interactions, e.g. the agglutinin-like sequences (Als proteins) of *Candida albicans* (Hoyer *et al.*, 1999; Kapteyn *et al.*, 2000). It has been suggested repeatedly that at least some cell-wall-associated proteins play a role in cell-wall organization, but mutants lacking these proteins are perfectly viable and are unaffected in their vegetative growth (van der Vaart *et al.*, 1995). As the studies described above have been performed in yeast and because cell-wall-associated

† Present address: Biodes, Saint Amand les Eaux, France.

**Abbreviations:** AfPhoAp, acid phosphatase of *A. fumigatus*; GPI, glycosylphosphatidylinositol; P<sub>i</sub>, inorganic phosphate; PNGase, peptide-N-glycosidase.

The GenBank accession number for the *A. fumigatus* PHOA sequence reported in this paper is AF462065.

proteins have not been carefully investigated in filamentous fungi (Schoffemeer *et al.*, 2001; Cao *et al.*, 1998), we have characterized an acid phosphatase (PhoAp) that is the only protein released upon treatment of the cell wall of the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus* with glycosylhydrolases.

## METHODS

**Preparation of the mycelium and cell wall.** *A. fumigatus* CBS 144-89 was grown in a 15 l fermenter in liquid medium containing 2% glucose and 1% mycopeptone (Biokar) as described previously (Latgé *et al.*, 1994). After 24 h of culture (within the exponential growth phase), the mycelium was collected by filtration and washed extensively with water. The mycelium was then resuspended in a 200 mM Tris/HCl (pH 7.8) buffer containing 20 mM EDTA and 1 mM PMSF. One-millimetre-diameter glass beads were added to the suspension and the mycelium was disrupted by using a Dyno-mill cell homogenizer at 4 °C. The disrupted mycelial suspension was centrifuged at 5500 r.p.m. for 10 min. The cell-wall pellet was recovered, washed five times in the buffer described above and then stored at -20 °C.

**Protein isolation from culture medium.** Proteins were precipitated from the culture filtrates by the addition of 4 vols of ethanol to the medium, and the culture filtrates were left overnight at 4 °C. The pellet was then recovered by centrifugation and resuspended in 50 mM Tris/HCl (pH 7.5) containing 20 mM EDTA.

**Protein extraction from the cell wall.** Non-covalently bound proteins were removed from the cell-wall pellet by boiling 1 g of wet cell walls (150 mg dry weight) in 10 ml of a 50 mM Tris/HCl (pH 7.4) buffer containing 50 mM EDTA, 2% SDS and 40 mM  $\beta$ -mercaptoethanol for 10 min. The extracted cell wall was recovered by centrifugation. This procedure was repeated four times. The four successive SDS/ $\beta$ -mercaptoethanol supernatants were stored separately at 4 °C for further analysis. The residual cell-wall pellet was washed five times with deionized water and then freeze-dried.

The SDS/ $\beta$ -mercaptoethanol-extracted cell-wall sample was subjected to various glycosylhydrolase treatments: (i) 100 mg of lyophilized cell wall was resuspended in 3 ml of 50 mM Tris/HCl (pH 7.4) buffer containing 5 mM sodium azide and 500 U of Quantazyme (recombinant endo-1,3- $\beta$ -glucanase; Quantum Biogene) and incubated for 16 h at 37 °C; (ii) 100 mg of dry cell wall was treated with 0.06 U of recombinant chitinase A from *Serratia marcescens* produced in *Escherichia coli* and purified as previously described (Vorgias *et al.*, 1993) for 3 days at 37 °C in a 50 mM Tris/HCl (pH 8.0) buffer containing 1 mM EDTA and 5 mM sodium azide; (iii) 100 mg of dry cell wall was treated with 8 mg (16 U mg<sup>-1</sup>) of recombinant 1,3- $\alpha$ -glucanase from *Trichoderma harzianum* produced in *Aspergillus oryzae* (Fuglsang *et al.*, 2000) for 16 h at 37 °C in a 50 mM sodium acetate (pH 5.6) buffer containing 5 mM sodium azide; and (iv) 100 mg of dry cell wall was resuspended in 50 mM sodium acetate (pH 5.0) buffer and digested with 5.4 U of 1,6- $\beta$ -glucanase (Glyko) for 16 h at 37 °C. For each of the glycosylhydrolase treatments, enzymic hydrolysis was stopped by boiling the samples for 10 min in the extraction buffer. Solubilized proteins were recovered in the supernatant after centrifugation at 4000 r.p.m. for 10 min.

The SDS/ $\beta$ -mercaptoethanol-extracted cell-wall sample was also treated with ice-cold hydrofluoric acid (50%, v/v) on ice for 3 days in a cold room at 4 °C (Ferguson, 1992). The hydrofluoric acid was then removed from the sample by

centrifugation. The pellet was washed seven times with methanol, dried under N<sub>2</sub> after each wash and then extracted with SDS/ $\beta$ -mercaptoethanol.

**Protein extraction from intact mycelium.** The mycelium was incubated in a 50 mM Tris/HCl (pH 7.5) buffer containing 50 mM DTT, 2 mM EDTA and 1 mM PMSF for 2 h at 4 °C, with shaking. Intact mycelium was also incubated in the same buffer with 1  $\mu$ g trypsin (Sigma) (mg mycelium)<sup>-1</sup> for 2 h at 25 °C. Solubilized proteins were separated from the mycelium by filtration and stored at -20 °C.

**Protein analysis.** Solubilized material was precipitated with 4 vols ethanol, lyophilized and boiled in Laemmli buffer (Laemmli, 1970), before undergoing electrophoresis on a 10% polyacrylamide separating gel or a pre-packed 4–12% polyacrylamide gel (NuPAGE Bistris gel from Novex). Proteins were visualized by Coomassie blue or silver nitrate staining. Preliminary assays have shown that no difference was seen between SDS-PAGE patterns of a soluble extract precipitated by ethanol or concentrated under vacuum and dialysed. To estimate the amount of protein released by the different treatments, soluble material was precipitated with 4 vols of ethanol, dried under vacuum and resuspended in water. The protein concentration was quantified using the Bio-Rad Protein Assay with BSA as a standard either directly or after subtraction of the amount of protein corresponding to the different glycosylhydrolases (when added).

For Western-blot analysis, proteins were blotted onto a nitrocellulose membrane. The membrane was blocked with 5% defatted milk powder (Regilait) in TBS containing 0.05% Tween 20 and 5 mM EDTA and incubated with an anti-1,3- $\beta$ -glucan (Australia Biosupplies) mouse mAb, an anti-cross-reactive-determinant rabbit polyclonal antibody (Oxford Glycosystem) or rabbit antisera against catalase, dipeptidyl peptidase V, RNase and acid phosphatase. Immunolabelling was visualized using the ECL Chemiluminescence Detection Kit, following the manufacturer's instructions (Amersham Pharmacia Biotech).

The anti-1,3- $\beta$ -glucan, a mouse mAb, was diluted to 1/10000 in TBS containing 0.05% Tween 20, 5 mM EDTA and 5% milk. Anti-phoA is a polyclonal antibody that was raised by Eurogentec (Herstal, Belgium) in rabbits against two internal peptides of PhoAp (TFDEDGTYSKSNKI and PDELKGTQD-DTFYT) that were coupled to an *m*-maleimidobenzoyl *N*-hydroxysuccinimide ester through a cysteine residue. It was diluted to 1/1000. The anti-cross-reactive-determinant antibody was diluted to 1/100. The polyclonal rabbit antisera were raised against purified 18 kDa RNase (Latgé *et al.*, 1991) and the purified recombinant catalase and dipeptidyl peptidase V proteins produced in *Pichia pastoris* (Calera *et al.*, 1997; Beauvais *et al.*, 1997). For immunization, 250  $\mu$ g of protein was injected intradermally into the rabbits in Freund's complete adjuvant. The animals were boosted (1–3 times) at 2-week intervals with the same amount of protein in Freund's incomplete adjuvant.

**Sequencing.** After in-gel digestion of the proteins that had been separated by gel electrophoresis (see above) with endolysin C, internal peptide sequencing was performed by J. d'Alayer (Laboratoire de microséquence des protéines, Institut Pasteur, Paris) on an Applied Biosystems 470 gas-phase sequencer, as described previously (Beauvais *et al.*, 1997).

The position of the *A. fumigatus* PHOA (AfPHOA) introns was determined after amplification of a cDNA clone obtained from a cDNA library of *A. fumigatus* (kindly provided by Dr Monod) by PCR, using primers deduced from the genomic

DNA sequence of clone 719 (cl719). The forward primer P1 (5'-ATGAAGCCTTCCGTGCG-3') complementary to nucleotides 459–476 of the genomic DNA of cl719 and the reverse primer P1 (5'-AAGCAGGTTTAGAGCGAG-3') complementary to nucleotides 1895–1912 of the genomic DNA of cl719 were used in the amplification, as described by Mouyna *et al.* (2002). Homologues of PhoAp were searched for in the SWISS-PROT databases (Worley *et al.*, 1995). The nucleotide sequence of AfPHOA reported in this paper has been deposited in GenBank under accession no. AF462065.

**Glycopeptidase (PNGase) treatment.** Deglycosylation of the protein samples was carried out using a recombinant PNGase F (Roche). After protein denaturation by boiling in 1% SDS for 20 min, the samples were adjusted to 0.8% n-octyl glucoside, 0.1% SDS and 100 mM  $\beta$ -mercaptoethanol and incubated overnight at 37 °C with PNGase F (5 U per 100  $\mu$ l of trypsin extract or Quantazyme extract containing 1–2  $\mu$ g protein). Digestion was terminated by precipitating the proteins with 4 vols of ethanol.

**Enzyme assays.** Acid phosphatase activity in the samples was measured by using *p*-nitrophenyl phosphate (Sigma) as a substrate. The reaction mixture contained (in a total of 100  $\mu$ l) 5 mM substrate, 50 mM sodium acetate buffer (pH 6.0) and 2  $\mu$ l of the acid phosphatase solution containing 10–20 ng protein. Incubation was performed at 37 °C for 30 min. The reaction was stopped by the addition of 100  $\mu$ l of 1 M NaOH to the sample; for each sample, the amount of *p*-nitrophenol released by the monoesterase activity was determined by measuring the absorbance value at 414 nm.

Phosphodiesterase activity within the samples was measured by using 5 mM bis-(*p*-nitrophenyl) phosphate sodium salt (Sigma) (O'Brien *et al.*, 2001) or 5 mM thymidine 5'-monophosphate *p*-nitrophenyl ester sodium salt (Sigma) as a substrate (Gijssbers *et al.*, 2001). The protocol was the same as that described above, except that the reactions were stopped by the addition of 100  $\mu$ l of 5% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> to the samples.

The release of inorganic phosphate (P<sub>i</sub>) from glucose 1-phosphate, glucose 6-phosphate, fructose 6-phosphate, fructose 1,6-diphosphate, ATP, UMP and UDP by the proteins within the samples was assayed as described for *p*-nitrophenyl phosphate in a 50 mM sodium acetate (pH 6.0) buffer containing 5 mM substrate. Released P<sub>i</sub> was measured by the method of Ames (1966).

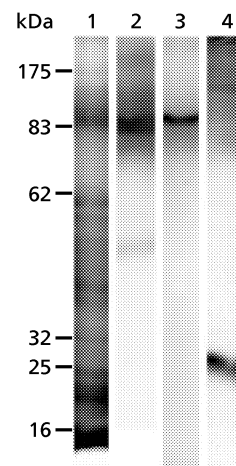
Compounds tested as inhibitors (EDTA, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, HgCl<sub>2</sub>, NaF, sodium molybdate, sodium orthovanadate, ammonium tartrate and DTT) of the proteins within the samples were used at a concentration of 10 mM. SDS was also tested as an inhibitor of protein activity (1% and 0.1%, w/v).

**HPLC purification.** The trypsin extract of the mycelium was analysed by gel filtration to isolate PhoAp. Gel filtration chromatography was performed on a Superdex 75 HR 10/30 column (Pharmacia) in 50 mM Tris/HCl (pH 7.5) containing 120 mM NaCl at a flow rate of 0.5 ml min<sup>-1</sup>.

## RESULTS

### Extraction of an 80 kDa polypeptide from the cell wall of *A. fumigatus* by treatment with 1,3- $\beta$ -glucanase

Treatment of the cell wall of *A. fumigatus* with 2% SDS and 40 mM  $\beta$ -mercaptoethanol released non-covalently associated proteins (Fig. 1). The first SDS/ $\beta$ -mercaptoethanol treatment released about 3% of the cell-wall dry weight. Protein release from the cell-wall sample de-



**Fig. 1.** Analysis of proteins released from *A. fumigatus* by SDS/ $\beta$ -mercaptoethanol treatment and separated on a 10% polyacrylamide gel. Each lane was loaded with the amount of protein extracted from 0.7 mg of dry cell wall. Lanes: 1, proteins stained with Coomassie blue; 2, protein immunoblotted with anti-catalase; 3, protein immunoblotted with anti-dipeptidyl peptidase; 4, protein immunoblotted with anti-RNase.

creased continuously following successive SDS/ $\beta$ -mercaptoethanol treatments. By the fourth treatment, some soluble proteins were still released from the cell wall, but they were not detectable by Coomassie blue staining (data not shown). The total amount of protein released from the cell-wall sample of *A. fumigatus* by the four successive SDS/ $\beta$ -mercaptoethanol treatments accounted for a maximum of 3.5% of the cell wall (by dry weight). Western blots with antisera directed against three secreted proteins (namely 90 kDa catalase, 88 kDa dipeptidyl peptidase and 18 kDa RNase) showed three bands which corresponded to the molecular masses of these proteins (Fig. 1). These results showed that among the proteins extracted from the cell wall of *A. fumigatus* by SDS/ $\beta$ -mercaptoethanol treatments there are secreted proteins that are transiently associated with the cell wall.

The SDS/ $\beta$ -mercaptoethanol-extracted cell-wall sample was enzymically hydrolysed by treatment with a 1,3- $\beta$ -glucanase, a chitinase, a 1,3- $\alpha$ -glucanase or a 1,6- $\beta$ -glucanase. Treatments with the chitinase, 1,3- $\alpha$ -glucanase or 1,6- $\beta$ -glucanase did not release any specific proteins (Fig. 2). Unexpectedly, proteins were released during incubation of the cell-wall extract in the buffer alone at 37 °C and no difference could be seen between the pattern of the proteins released in the buffer alone and the patterns generated after the addition of the glycosylhydrolases to the buffer (Fig. 2). The only differences in the banding patterns were due to the added glycosylhydrolases themselves (bands highlighted by solid circles in Fig. 2). In addition, the longer the incubation time the higher the amount of proteins released, when the cell-wall sample was incubated in buffer alone and in the presence of the glucosylhydrolases. However, the protein patterns produced were

generally similar with or without the addition of the glycosylhydrolases. These results show that in spite of several SDS/ $\beta$ -mercaptoethanol treatments, soluble proteins still remain associated with the cell wall of *A. fumigatus*. Western blots with antisera directed towards the three secreted proteins (i.e. catalase, dipeptidyl peptidase and RNase) confirmed that these proteins were also present in the extracts from the cell wall treated with the enzymes and buffer (data not shown).

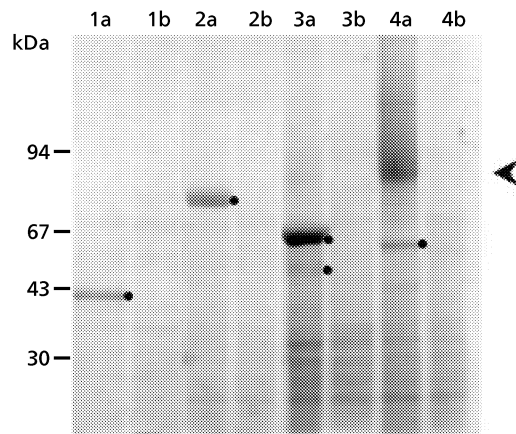
A single diffuse band between 75 and 90 kDa was seen when the SDS/ $\beta$ -mercaptoethanol-extracted cell-wall pellet was digested with 1,3- $\beta$ -glucanase (Fig. 2, lane 4a, indicated by an arrow head). This band could be stained by Coomassie blue but was barely seen with the silver nitrate stain, and it represented less than 0.1% of the cell-wall dry weight compared to the soluble proteins which accounted for 3–4% of the cell-wall dry weight. The whole of this diffuse band was used for peptide sequencing and only one protein was identified from the band. Hence, the band was not contaminated by other proteins.

An antibody directed against 1,3- $\beta$ -glucan showed reactivity between 75 and 90 kDa, when used for a Western blot of the diffuse protein band (Fig. 3a). Thus, the protein extractable by treatment of the cell wall with 1,3- $\beta$ -glucanase seemed to be strongly associated with the cell-wall 1,3- $\beta$ -glucan. The wide band seen with Coomassie blue staining was associated with the heterogeneity of the glucan hydrolysed by the 1,3- $\beta$ -glucanase Quantazyme. If the Quantazyme extract was then processed using another recombinant 1,3- $\beta$ -glucanase (Zverlov *et al.*, 1997), a single 80 kDa band was seen (data not shown).

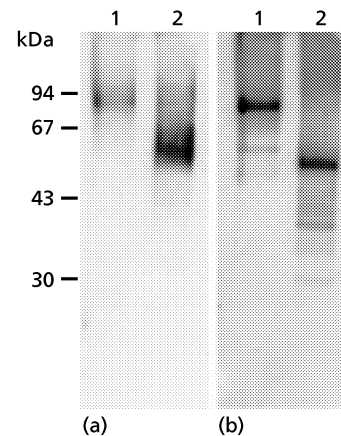
Deglycosylation of the Quantazyme extract with a PNGase F was associated with a shift in the 1,3- $\beta$ -glucan immunolabelled band to 58 kDa (Fig. 3a), showing that PhoAp is *N*-glycosylated but that glucan binding to PhoAp is not associated with *N*-glycosylation.

#### Molecular characterization of the 80 kDa cell-wall-associated protein

Amino-acid sequencing of the entire polypeptide band produced by electrophoresis of the Quantazyme-treated cell-wall sample showed that the band contained only one protein. An internal amino-acid sequence was obtained – IFSVLLGGAIPDELK. This polypeptide sequence was found in one clone, cl719, in the TIGR genomic database of *A. fumigatus* (<http://www.tigr.org/cgi-bin/BlastSearch>). The ORF deduced from the cDNA sequence of cl719 was 1341 nt long and had two putative introns of 53 and 60 bp which started at nucleotides 187 and 302, respectively. The positions of the putative introns were confirmed by PCR amplification. The ORF encoded a polypeptide of 447 aa residues with a theoretical molecular mass of 53 kDa (Fig. 4). Twelve potential *N*-glycosylation sites were located at amino-acid residues 119, 150, 177, 186, 208, 217, 234, 240, 315, 332, 382 and 405 of the 447 aa polypeptide. The high number of *N*-glycosylation sites was in agreement

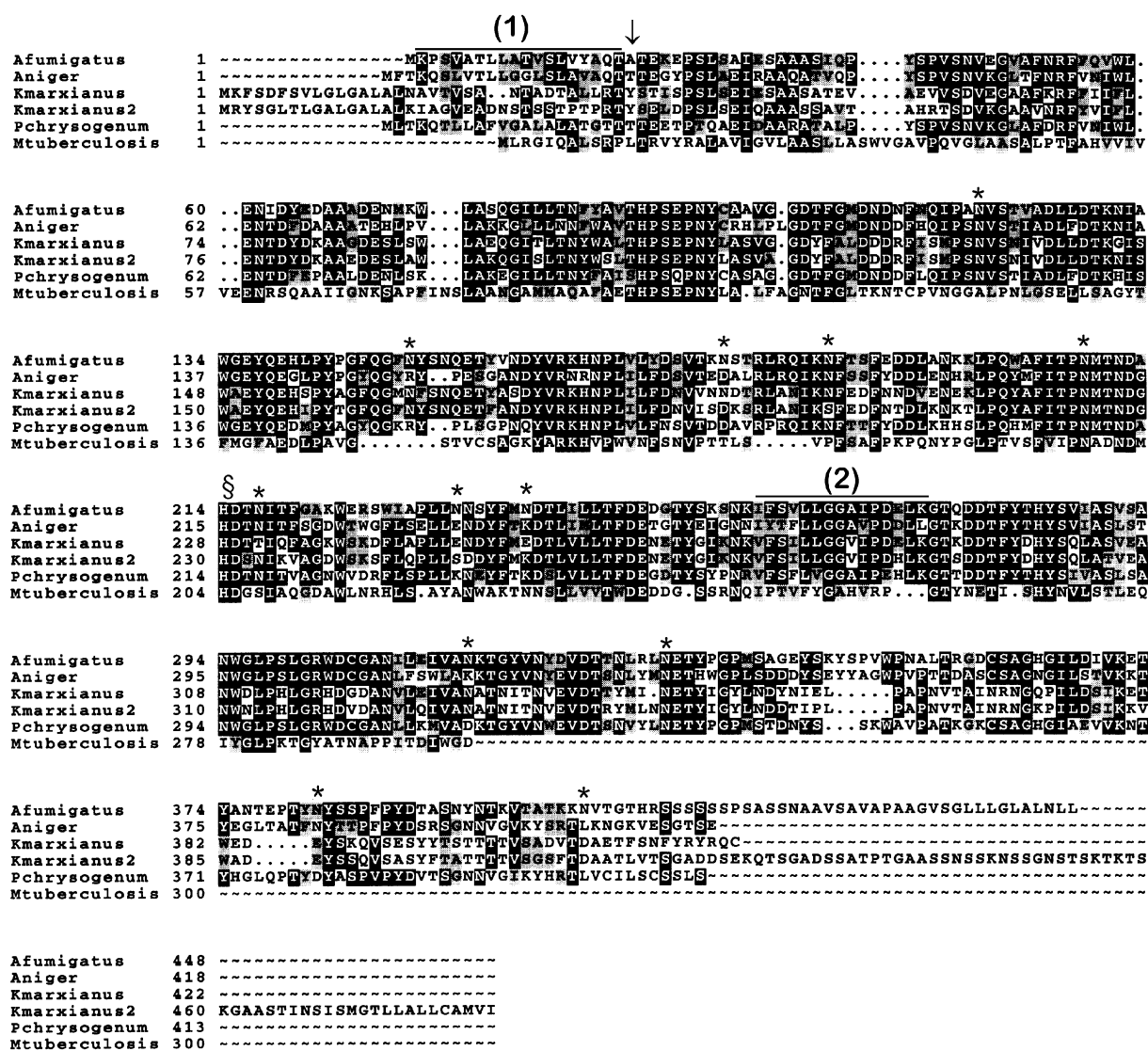


**Fig. 2.** Cell-wall proteins released after enzymic treatment of the *A. fumigatus* cell-wall extract. Proteins were separated on a 4–12% polyacrylamide gel and stained with Coomassie blue. Each lane was loaded with the amount of protein extracted from 7 mg of dry cell wall by treatment with 1,6- $\beta$ -glucanase (lane 1a), 1,3- $\alpha$ -glucanase (lane 2a), chitinase (lane 3a) or 1,3- $\beta$ -glucanase (lane 4a). Lanes 1b, 2b, 3b and 4b correspond to the protein extract obtained from the cell-wall sample incubated at 37 °C without the hydrolase. ●, Bands corresponding to the recombinant hydrolases. Protein material released by treatment of the sample with 1,3- $\beta$ -glucanase is shown by an arrow head.



**Fig. 3.** Analysis of the cell-wall-associated protein released by treatment of the sample with 1,3- $\beta$ -glucanase. An aliquot (100  $\mu$ l) of the Quantazyme extract was treated with 10 U of PNGase F (Roche) (lane 2) or was left untreated (lane 1). The different extracts were analysed by Western blot either with an anti-1,3- $\beta$ -glucan antibody (a) or with an anti-phoA antibody (b).

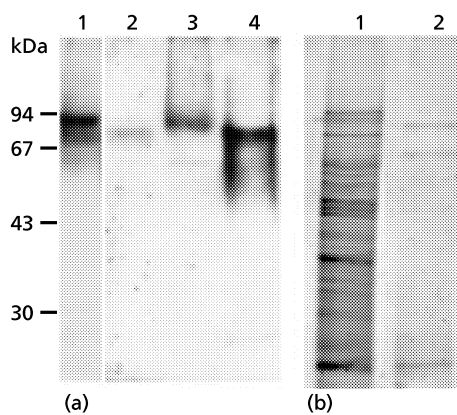
with the shift observed when the 1,3- $\beta$ -glucanase-extracted protein was treated with PNGase F. After treatment with PNGase F the polypeptide migrated with an apparent molecular mass of 58 kDa, which is in accordance with its theoretical molecular mass of 53 kDa (Fig. 3). The hydropathy profile of the protein showed the presence of a signal peptide at its amino terminus. Using the (–3, –1) rule of Von Heijne (1986),



**Fig. 4.** Comparison of the predicted amino-acid sequence of AfPhoAp with its closest relatives. Aniger, P34724 of *A. niger*; Kmarxianus, JC1719 of *K. marxianus*; Kmarxianus2, P08540 of *K. marxianus*; Pchrysogenum, P37274 of *P. chrysogenum*; Mtuberculosis, E70842 of *M. tuberculosis*. Identical residues are indicated by solid boxes; similar residues are indicated by grey boxes. The amino hydrophobic terminus of AfPhoAp is indicated by (1). Its putative peptide cleavage site is indicated by an arrow. The 12 potential *N*-glycosylation sites of AfPhoAp are each indicated by an asterisk. The putative active site containing histidine and aspartic acid is indicated by §. The peptide that was sequenced is indicated by (2).

the protein from *A. fumigatus* was predicted to have a signal peptide cleavage site at residue 20, an alanine. One hydrophobic domain at the carboxy terminus of the *A. fumigatus* protein was associated with a serine/threonine-rich region, a characteristic of GPI-anchored proteins. Indeed, recent biochemical studies have shown that this membrane protein can be labelled with an anti-cross-reactive determinant, a characteristic of all GPI-anchored proteins (Bruneau *et al.*, 2001). Based on the consensus predicted cleavage of the GPI anchor (Gerber *et al.*, 1992), the  $\omega$ ,  $\omega + 1$ ,  $\omega + 2$  site for GPI attachment could be N<sub>423</sub> A<sub>424</sub> A<sub>425</sub> (Fig. 4).

BLAST searches of the SWISS-PROT databases showed that the acid phosphatase protein of *A. fumigatus* (AfPhoAp) has significant identity with fungal acid phosphatases (Fig. 4), namely acid phosphatase P34724 of *Aspergillus niger* (62% identity; Ehrlich, 1994), acid phosphatase P37274 of *Penicillium chrysogenum* (60% identity; Haas *et al.*, 1991, 1992) and acid phosphatases JC1719 and P08540 of *Kluyveromyces marxianus* (56 and 51% identity, respectively; Yoda *et al.*, 2000). AfPhoAp also showed a lower level of identity with bacterial acid phosphatases, such as E70842 of *Mycobacterium tuberculosis* (Saleh & Belisle, 2000). The



**Fig. 5.** (a) Detection of PhoAp in different extracts. Western-blot analysis was performed with the anti-phoA antibody. The amount of sample loaded into each lane is indicated in parentheses for each lane. Lanes: 1, culture filtrate (3.6 ml of culture filtrate); 2, mycelium extract [incubation of 40 mg intact wet mycelium (6 mg dry mycelium) in a Tris buffer at 4 °C for 4 h]; 3, Quantazyme extract (1.5 mg dry cell wall); 4, SDS/ $\beta$ -mercaptoethanol extract (1.5 mg dry cell wall). (b) Resistance of PhoAp to trypsin. Analysis of a mycelium extract [see lane 2, (a)] before (lane 1) or after trypsin treatment (lane 2). Proteins were separated on a 10% SDS-polyacrylamide gel and stained with Coomassie blue.

RHGXRXP motif typical of many phosphatase enzymes (Van Etten *et al.*, 1991) was not present in any of these phosphatases, but histidine 214 and aspartic acid 215, conserved in all of these proteins, could be part of the catalytic active site (Ostanin *et al.*, 1992).

#### Localization of AfPhoAp

Western-blot analysis using an anti-phoA serum showed that PhoAp was secreted into the external medium by *A. fumigatus* during active growth (Fig. 5a). Evidence for this includes the following: (i) PhoAp was present in the SDS/ $\beta$ -mercaptoethanol cell-wall extract; (ii) PhoAp was readily released from the intact mycelium when it was incubated at 4 °C in a Tris buffer in the presence or absence of DTT; and (iii) PhoAp was found in the culture filtrate of actively growing cultures. In its native form, AfPhoAp was resistant to trypsin. When a total culture filtrate or mycelial extract was treated with trypsin, two bands, with apparent molecular masses of 75 and 60 kDa, were detected after SDS-PAGE (Fig. 5b). The two polypeptides contained within these bands reacted positively with the anti-phoA antibody. These polypeptides were sequenced and were shown to be two molecular species of PhoAp. The sequences of the major peptides of the two polypeptides and of the PhoAp released by 1,3- $\beta$ -glucanase from the cell wall of *A. fumigatus* were identical (IFSVLLGGAIPDELK). These forms of PhoAp released into the culture filtrate did not react with the anti-1,3- $\beta$ -glucan antibody. None of the PhoAp species isolated from the cell wall or secreted into the culture filtrate reacted with the anti-cross-reactive-

determinant antibody (data not shown), in contrast to membrane-associated species released by an endogenous phosphatidylinositol-specific phospholipase C (PI-PLC) treatment (Bruneau *et al.*, 2001), suggesting that extra-cellular and cell-wall-associated forms of PhoAp were released from the membrane by proteolytic cleavage.

#### Analysis of the phosphatase activity of AfPhoAp

The acid phosphatase activity of AfPhoAp was analysed by using mycelial extracts that had been treated with trypsin, since the phosphatase activity due to AfPhoAp was easy to recover from a complex mixture following a trypsin digest.

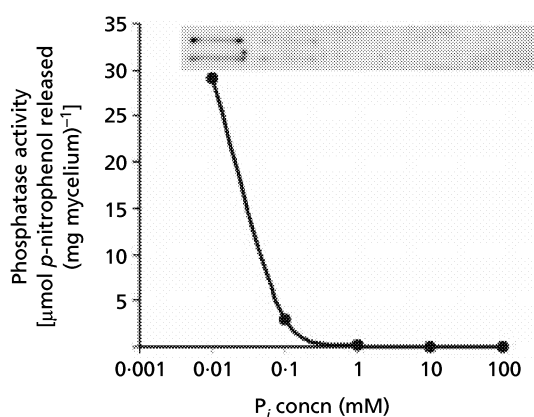
AfPhoAp was active against both mono- and di-phosphate esters, producing  $K_m$  values of 1.45 and 2.3 mM for *p*-nitrophenyl phosphate and bis-(*p*-nitrophenyl) phosphate sodium salt, respectively. These data suggest that PhoAp had both a phosphomonoesterase and a phosphodiesterase activity.

The enzyme was active from pH 3 to 7, with its optimum activity occurring between pH 4 and 6. A slight difference in the optimum pH was observed for the two substrates tested. AfPhoAp was most active at pH 5.5 when *p*-nitrophenyl phosphate was the substrate, whereas it was most active at pH 5 when bis-(*p*-nitrophenyl) phosphate sodium salt was the substrate. The tendency of the optimum pH of AfPhoAp to change depending on the substrate used was confirmed by testing the phosphodiesterase activity of AfPhoAp on thymidine 5'-monophosphate *p*-nitrophenyl ester sodium salt, where its activity was maximal at pH 4. AfPhoAp had no significant activity above pH 7, confirming that it is an acid phosphatase.

The phosphatase activity of AfPhoAp was not substrate-dependent, since it was able to cleave a broad range of phosphate esters, including glucose 1-phosphate, glucose 6-phosphate, fructose 6-phosphate, fructose 1,6-diphosphate, ATP, UMP, UDP and thymidine 5'-monophosphate *p*-nitrophenyl.

AfPhoAp did not require metal ion cofactors and was not inhibited by thiol reagents (such as DTT), SDS or metal chelators at the concentrations tested. It was partially inhibited by heavy metal ions such as  $Zn^{2+}$  (68% inhibition) and  $Hg^{2+}$  (56% inhibition), totally inhibited by 10 mM vanadate, and 60 and 85% inhibited by 10 mM NaF and molybdate, respectively. It was not inhibited by tartrate.

The secretion of PhoAp into the culture medium was repressed when *A. fumigatus* was grown in the presence of  $P_i$ . As shown in Fig. 6, PhoAp was not produced when the culture medium contained a concentration of  $P_i$  between 1 and 100 mM. In contrast, PhoAp was secreted in high amounts at low  $P_i$  concentrations (100 and 10  $\mu$ M). No *A. fumigatus* growth was observed at  $P_i$  concentrations below 10  $\mu$ M. These results indicate that AfPhoAp is a phosphate-repressible acid phosphatase.



**Fig. 6.** Repression of PhoAp activity by the presence of  $P_i$  in the culture medium. Mycelium was grown at 37 °C for 24 h in a defined medium supplemented with various amounts of phosphate (100 mM to 10  $\mu$ M). Phosphatase activity was measured in the culture filtrate and is expressed as  $\mu$ mol *p*-nitrophenol released (mg mycelium)<sup>-1</sup>. The gel image (inset) shows the analysis of the different extracts by Western blotting with the anti-phoA antibody.

## DISCUSSION

The AfPhoAp described in this manuscript (PhoAp) has several specific characteristics. (i) When in its native form, PhoAp is resistant to trypsin. (ii) As with the acid phosphatase from *P. chrysogenum* (Haas *et al.*, 1991), PhoAp is not inhibited by high concentrations of tartrate, which is a competitive inhibitor of acid phosphatases from animal sources. However, contrary to the acid phosphatase from *P. chrysogenum*, PhoAp is not inhibited by high concentration of SDS. (iii) PhoAp is active on both mono- and di-phosphate esters. Phosphatases that share both phosphatase and phosphodiesterase activities have been described to date only in bacteria (O'Brien *et al.*, 2001). An acid phosphatase that hydrolyses both phosphomonoesters and phosphodiesteres has been found in *Penicillium funiculosum*, but this enzyme is only able to cleave aryl phosphates (Yoshida *et al.*, 1989). (iv) PhoAp is a GPI-anchored protein. Most other known acid phosphatases are secreted; examples of these secreted acid phosphatases are the Pho3p and Pho5p proteins of *S. cerevisiae* (Vogel & Hinnen, 1990), as well as numerous *Aspergillus* spp. phosphatases, including those from *Aspergillus ficuum*, *A. niger* and *Aspergillus nidulans* (Ehrlich *et al.*, 1994; MacRae *et al.*, 1988), and a phytase from *A. fumigatus* (Wyss *et al.*, 1999; Ullah *et al.*, 2000; Rodriguez *et al.*, 2000). The only other GPI-anchored phosphatase described is Pho610p from *K. marxianus* (Yoda *et al.*, 2000); this protein shares sequence similarity with AfPhoAp and is released from the cell wall of *K. marxianus* after its treatment with laminarinase. AfPhoAp also has enzymic features that are common to the fungal acid phosphatases described to date: (i) it has an acid pH optimum; (ii) it is inhibited by NaF, molybdate and vanadate; (iii) it is highly glycosylated;

and (iv) its synthesis is repressed by high concentrations of  $P_i$  (1 mM) in the extracellular medium. Phosphate-repressed acid phosphatases have been described in *S. cerevisiae* (Vogel & Hinnen, 1990), *A. niger* (MacRae *et al.*, 1988) and *P. chrysogenum* (Haas *et al.*, 1991, 1992). Phosphate is essential for the growth of all fungi (Jennings, 1995), and *A. fumigatus* was unable to grow at a  $P_i$  concentration lower than 10  $\mu$ M. PhoAp is part of an enzymic arsenal that allows *A. fumigatus* to utilize  $P_i$  from its environmental medium. Other enzymes which have a similar role in *A. fumigatus* include a phospholipase C recently characterized in our laboratory (Buitrago, unpublished data) and a phytase (Wyss *et al.*, 1999; Ullah *et al.*, 2000; Rodriguez *et al.*, 2000).

The extraction protocols used to recover PhoAp from the cell wall of *A. fumigatus* suggested that this protein is strongly associated with the cell-wall 1,3- $\beta$ -glucans. This association could result from covalent linkages, strong ionic interactions or lectin interactions. There are several arguments that favour a covalent linkage between PhoAp and the 1,3- $\beta$ -glucans. (i) Release of PhoAp from the cell wall was seen after 1,3- $\beta$ -glucanase treatment. (ii) A band migrating with the apparent molecular mass of PhoAp was also labelled by the anti-1,3- $\beta$ -glucan antibody; this labelling remained after PNGase F treatment and was associated with a shift in the molecular mass corresponding to the size of the N-glycan removed by the PNGase F treatment. (iii) PhoAp is a GPI-anchored protein and most proteins shown to be covalently linked to the *S. cerevisiae* cell wall are GPI-anchored proteins. The release of PhoAp from the cell wall of *A. fumigatus* by hydrofluoric acid (data not shown) is in agreement with a yeast-like configuration.

Other findings suggest that the strong association between PhoAp and 1,3- $\beta$ -glucan is not covalent. These include the following. (i) PhoAp is released from the cell wall of *A. fumigatus* by 1,3- $\beta$ -glucanase in minute amounts (as shown by Western-blot analysis; Fig. 5a), whereas the majority of PhoAp is extracted from the cell wall by the SDS/ $\beta$ -mercaptoethanol treatment or is actively secreted. A longer incubation time, of up to 3–4 days, or higher glycosylhydrolase concentrations did not modify the pattern and concentration of proteins released from the cell wall (data not shown). (ii) It was impossible to release all of the soluble proteins from the cell wall before 1,3- $\beta$ -glucanase treatment. Indeed, as shown in Fig. 2, incubation of the SDS/ $\beta$ -mercaptoethanol-treated cell-wall sample in a buffer at 37 °C overnight resulted in the passive release of soluble proteins that remained associated to the cell wall. This phenomenon was observed even when the SDS/ $\beta$ -mercaptoethanol treatment was repeated 10 times (data not shown). Soluble PhoAp could thus remain non-covalently associated with the cell wall and then be released by the 1,3- $\beta$ -glucanase because this treatment disrupts the constitutive polysaccharide network of the cell wall. (iii) The acid phosphatase of *S. cerevisiae* is a secreted protein that remains located at the surface of the cell (Linnemans *et al.*, 1977) and is strongly associated with cell-wall mannans and  $\beta$ -glucans. Mech-

**Table 1.** Comparative genomics of GPI-anchored proteins in *S. cerevisiae* and *A. fumigatus*

Genes that gave a different cell-wall or membrane localization for the encoded proteins in the Caro *et al.* (1997) and Hamada *et al.* (1998) studies or which were only tested by Caro *et al.* (1997) were not included in this table.

<i>S. cerevisiae</i> genes	Localization in <i>S. cerevisiae</i>	Homologues in <i>A. fumigatus</i> <sup>†</sup>
<b>GAS family</b>		
YMR 307W ( <i>GAS1</i> )	Membrane	<i>GEL 1</i> (P)
YLR 343W ( <i>GAS2</i> )	Membrane	<i>GEL 2</i>
YMR 215W ( <i>GAS3</i> )	Membrane	<i>GEL 3</i>
YOL 132W ( <i>GAS4</i> )	Membrane	<i>GEL 4</i> (P)
YOL 030W ( <i>GAS5</i> )	Membrane	<i>GEL 5</i>
		<i>GEL 6</i>
<b>YAP family</b>		
YDR 144C ( <i>MKC7</i> )	Membrane	1
YDR 349C ( <i>YAP6</i> )	Membrane	1
YLR 120C ( <i>YPS1</i> )	Membrane	1
YLR 121C ( <i>YPS3</i> )	Membrane	1
YIR 039C ( <i>YPS6</i> )	Membrane	1
<b>SPS2 family</b>		
YBR 078W ( <i>ECM33</i> )	Membrane	1 (P)
YCL 048W	Membrane	—
YDR 055W ( <i>PST1</i> )	Membrane	—
YDR 522C	Membrane	—
<b>PLB family</b>		
YMR 006C ( <i>PLB2</i> )	Membrane	1
YMR 008C ( <i>PLB1</i> )	Membrane	1
YOL 011W ( <i>PLB3</i> )	Membrane	1 (P)
<b>Others (non-clustered as family)</b>		
YDR 261C ( <i>EXG2</i> )	Membrane	1
YMR 200W ( <i>ROT1</i> )	Membrane	1
YNL 190W	Membrane	—
YCR 061W	Membrane	1
YNL 322C ( <i>KRE1</i> )	Membrane	—
YPL 261C	Membrane/cell wall	—
<b>CRH family</b>		
YEL 040C ( <i>CRH2</i> )	Cell wall	1 (P)
YGR 189C ( <i>CRH1</i> )	Cell wall	3 (P)
<b>FLO family</b>		
YAL 063C ( <i>FLO9</i> )	Cell wall	—
YAR 050W ( <i>PLO1</i> )	Cell wall	—
YHR 211W ( <i>FLO5</i> )	Cell wall	—
YKR 102W	Cell wall	—
YIR 019C ( <i>MUC1</i> )	Cell wall	—
<b>CWP family</b>		
YKL 096W	Cell wall	—
YKL 097W	Cell wall	—
<b>TIR family</b>		
YBR 067C ( <i>TIP1</i> )	Cell wall	—
YER 011W ( <i>TIR1</i> )	Cell wall	—
YIL 011W	Cell wall	—
YJR 150C	Cell wall	—
YJR 151C	Cell wall	—
YLR 040C	Cell wall	—



**Table 1.** (cont.)

<i>S. cerevisiae</i> genes	Localization in <i>S. cerevisiae</i>	Homologues in <i>A. fumigatus</i> *
YOR 009W	Cell wall	—
YOR 010C	Cell wall	—
<b>SED family</b>		
YDR 077W ( <i>SED1</i> )	Cell wall	—
YER 150W	Cell wall	—
<b>Agglutinin family</b>		
YJR 004C ( <i>AG<math>\alpha</math>1</i> )	Cell wall	—
YNR 044 ( <i>AGA1</i> )	Cell wall	—
<b>Others (non-clustered as family)</b>		
YOR 214C	Cell wall	—
YLR 110C ( <i>CCW12</i> )	Cell wall	—
YJL 078C ( <i>PRY3</i> )	Cell wall	—
YNL 390W ( <i>ECM19</i> )	Cell wall	—
YNL 300W	Cell wall	—
YCR 089W ( <i>FIG2</i> )	Cell wall	—
YDR 534C	Cell wall	—
YNL 327W ( <i>EGT2</i> )	Cell wall	—

\* —, Absence of a homologue of *S. cerevisiae* in the *A. fumigatus* database; nos 1–6 indicate the number of *A. fumigatus* homologues; (P), a protein also detected by proteome analysis in Bruneau *et al.* (2001).

anical disruption of the cell wall or its digestion with glucanase are necessary to release soluble Pho5p efficiently (Arnold, 1972). Pho5p was even considered to be covalently linked to the yeast cell wall (Arnold, 1972). AfPhoAp is highly glycosylated, and has 12 putative N-glycosylation sites. As has been suggested for the yeast phosphatase, high amounts of mannosylation of AfPhoAp could facilitate strong interactions with the cell-wall 1,3- $\beta$ -glucans. (iv) A genomic and proteomic analysis has suggested that the *A. fumigatus* GPI proteins are membrane-bound and not covalently linked to the cell wall.

The putative localization of the GPI-anchored proteins of *S. cerevisiae* in either the membrane or the cell wall has been investigated by Caro *et al.* (1997) and Hamada *et al.* (1998). Caro *et al.* (1997) based their results on the fact that plasma-membrane GPI proteins possess before their predicted GPI-attachment site a dibasic residue motif that is absent in cell-wall-associated GPI proteins. Hamada *et al.* (1998) constructed fusion proteins of 40 C-terminal amino acids for each predicted GPI protein with a reporter protein ( $\alpha$ -galactosidase) and considered that only cell-wall-associated GPI proteins were released by treatment of the cell wall with laminarinase; fusion proteins that were not released from the cell wall by the laminarinase treatment were exclusively classified as membrane-bound GPI proteins. Fifty-two GPI proteins had localizations that were in concordance of these two studies (Table 1). The search for homologues of these yeast GPI-anchored proteins in *A. fumigatus* was done by using the BLAST tool and the TIGR unfinished sequence database (<http://www.tigr.org/cgi-bin/Blast-Search>). This survey identified 22 *A. fumigatus* genes

that were homologous to genes of *S. cerevisiae* encoding GPI-anchored proteins (Table 1). Three of these genes (YDR 061C, YMR 200W and YCR 061W) were unique and the others belonged to the *GAS*, *SPS2*, *PLB*, *CRH* and *YAP* families. These results are in agreement with a recent proteome study of GPI-anchored proteins of *A. fumigatus* (Bruneau *et al.*, 2001): only the YDR 061C, YMR 200W, YCR 061W and *YAP* family genes were not identified in this electrophoretic analysis of GPI-bound proteins. Most of the *A. fumigatus* genes (18 out of 22) were homologues of genes that encoded membrane-bound proteins in *S. cerevisiae*. Among the genes encoding proteins with a putative cell-wall localization in *S. cerevisiae* (Caro *et al.*, 1997; Hamada *et al.*, 1998) only four homologues were found in the *A. fumigatus* databases. These genes belong to the *S. cerevisiae* *CRH* family. The four genes of this family have sequence signatures suggesting a 1,3- $\beta$ -glucanase activity (Rodriguez-Pena *et al.*, 2000), a finding that would question their covalent association with the cell wall.

Our comparative genomic analysis of *A. fumigatus* genes is in agreement with our biochemical analysis of the cell-wall proteins of *A. fumigatus*, in that it has shown a lack of proteins covalently associated with the cell wall of *A. fumigatus*. It has also suggested that GPI-anchored proteins in *A. fumigatus* seem to play only an enzymic role (*GEL* family) in cell-wall biogenesis (Mouyna *et al.*, 2000), without being covalently linked to the cell wall. These data show that the structural organization of the cell wall of the yeast *S. cerevisiae* and the fungus *A. fumigatus* is different. This difference is also seen at the level of the polysaccharide composition of the cell wall (Fontaine *et al.*, 2000).

The type of association that PhoAp has with the cell-wall 1,3- $\beta$ -glucans will only be elucidated by a chemical analysis of the C-terminal peptide of PhoAp, similar to that performed for Tip1 of *S. cerevisiae* (Fujii *et al.*, 1999). The low amount of protein obtained from *A. fumigatus* and its contamination with other cell-wall proteins have made these analyses inconclusive to date. Whatever the type of linkage between PhoAp and the cell wall, it is evident that this protein does not play a role in the organization of the cell wall of *A. fumigatus*, since its absence from medium with a high concentration of  $P_i$  is not associated with a reduction in fungal growth or in perturbation of cell-wall integrity.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by a studentship from Aventis Pharma (M.B.) and a research and development grant from Aventis Pharma/Institut Pasteur (J.-P.L.). We are grateful to R. Calderone for reviewing our manuscript.

## REFERENCES

- Ames, B. N. (1966). Assay of inorganic phosphate and phosphatases. *Methods Enzymol* **8**, 115–118.
- Arnold, W. N. (1972). Location of acid phosphatase and  $\beta$ -fructofuranosidase within yeast cell envelopes. *J Bacteriol* **112**, 1346–1352.
- Beauvais, A., Monod, M., Debeaupuis, J.-P., Diaquin, M., Kobayashi, H. & Latgé, J.-P. (1997). Biochemical and antigenic characterization of a new dipeptidyl-peptidase isolated from *Aspergillus fumigatus*. *J Biol Chem* **272**, 6238–6244.
- Bruneau, J. M., Magnin, T., Tagat, E., Legrand, R., Bernard, M., Diaquin, M., Fudali, C. & Latgé, J.-P. (2001). Proteome analysis of *Aspergillus fumigatus* identifies glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins associated to the cell wall biosynthesis. *Electrophoresis* **22**, 2812–2823.
- Calera, J. A., Paris, S., Monod, M., Hamilton, A. J., Debeaupuis, J.-P., Diaquin, M., Lopez-Medrano, R., Leal, F. & Latgé, J.-P. (1997). Cloning and disruption of the antigenic catalase gene of *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun* **65**, 4718–4724.
- Cao, L., Chan, C. M., Lee, C., Wong, S. S. Y. & Yuen, K. Y. (1998). MPI encodes an abundant and highly antigenic cell wall mannoprotein in the pathogenic fungus *Penicillium marneffei*. *Infect Immun* **66**, 966–973.
- Caro, L. H. P., Tettelin, H., Vossen, J. H., Ram, A. F. J., van den Ende, H. & Klis, F. M. (1997). *In silico* identification of glycosylphosphatidylinositol-anchored plasma-membrane and cell wall proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**, 1477–1489.
- Ehrlich, K. C., Montalbano, B. G., Mullaney, E. J., Dishinger, H. C., Jr & Ullah, A. H. J. (1994). An acid phosphatase from *Aspergillus ficuum* has homology to *Penicillium chrysogenum* PhoA. *Biochem Biophys Res Commun* **204**, 63–68.
- Ferguson, M. A. (1992). Colworth medal lecture. Glycosylphosphatidylinositol membrane anchors: the table of a tail. *Biochem Soc Trans* **20**, 243–256.
- Fontaine, T., Simenel, C., Dubreucq, G., Adam, O., Delepierre, M., Lemoine, J., Vorgias, C. E., Diaquin, M. & Latgé, J.-P. (2000). Molecular organization of the alkali-insoluble fraction of *Aspergillus fumigatus* cell wall. *J Biol Chem* **275**, 27594–27607.
- Fuglsang, C. C., Berka, R. M., Wahleithner, J. A., Kauppinen, S., Shuster, J. R., Rasmussen, G., Halkier, T., Dalboge, H. & Henrissat, B. (2000). Biochemical analysis of recombinant fungal mutanases. A new family of  $\alpha$ -1,3-glucanases with novel carbohydrate-binding domains. *J Biol Chem* **275**, 2009–2018.
- Fujii, T., Shimoi, H. & Imura, Y. (1999). Structure of the glucan-binding sugar chain of Tip1p, a cell wall protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **1427**, 133–144.
- Gerber, L. D., Kodukula, K. & Udenfriend, S. (1992). Phosphatidylinositol glycan (PI-G) anchored membrane proteins. Amino acid requirements adjacent to the site of cleavage and PI-G attachment in the COOH-terminal signal peptide. *J Biol Chem* **267**, 12168–12173.
- Gijsbers, R., Ceulemans, H., Stalmans, W. & Bollen, M. (2001). Structural and catalytic similarities between nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases and alkaline phosphatases. *J Biol Chem* **276**, 1361–1368.
- Haas, H., Redl, B., Leitner, E. & Stöffler, G. (1991). *Penicillium chrysogenum* extracellular acid phosphatase: purification and biochemical characterization. *Biochim Biophys Acta* **1074**, 392–397.
- Haas, H., Redl, B., Friedlin, E. & Stöffler, G. (1992). Isolation and analysis of the *Penicillium chrysogenum* *phoA* gene encoding a secreted phosphate-repressible acid phosphatase. *Gene* **113**, 129–133.
- Hamada, K., Fukuchi, S., Arisawa, M., Baba, M. & Kitada, K. (1998). Screening for glycosylphosphatidylinositol (GPI)-dependent cell wall proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **258**, 53–59.
- Hoyer, L. L., Clevenger, J., Hecht, J. E., Ehrhart, E. J. & Poulet, F. M. (1999). Detection of Als proteins on the cell wall of *Candida albicans* in murine tissues. *Infect Immun* **67**, 4251–4255.
- Jennings, D. H. (1995). Phosphorus. In *The Physiology of Fungal Nutrition*, pp. 252–287. Cambridge: Cambridge University Press.
- Kandasamy, R., Vedyappan, G. & Chaffin, W. L. (2000). Evidence for the presence of pir-like proteins in *Candida albicans*. *FEMS Microbiol Lett* **186**, 239–243.
- Kapteyn, J. C., Montijn, R. C., Dijkgraaf, G. J. P., Van den Ende, H. & Klis, F. M. (1995). Covalent association of  $\beta$ -1,3-glucan with  $\beta$ -1,6-glucosylated mannoproteins in cell walls of *Candida albicans*. *J Bacteriol* **177**, 3788–3792.
- Kapteyn, J. C., Montijn, R. C., Vink, E., de la Cruz, J., Llobell, A., Douwes, J. E., Shimoi, H., Lipke, P. N. & Klis, F. M. (1996). Retention of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall proteins through a phosphodiester-linked  $\beta$ -1,3/ $\beta$ -1,6-glucan heteropolymer. *Glycobiology* **6**, 337–345.
- Kapteyn, J. C., Van den Ende, H. & Klis, F. M. (1999). The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall. *Biochim Biophys Acta* **1426**, 373–383.
- Kapteyn, J. C., Hoyer, L. L., Hecht, J. E., Müller, W. H., Andel, A., Verkleij, A. J., Makarow, M., Van den Ende, H. & Klis, F. M. (2000). The cell wall architecture of *Candida albicans* wild-type cells and cell wall-defective mutants. *Mol Microbiol* **35**, 601–611.
- Klis, F. M. (1994). Review: cell wall assembly in yeast. *Yeast* **10**, 851–869.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- Latgé, J.-P., Moutaouakil, M., Debeaupuis, J.-P., Bouchara, J. P., Haynes, K. & Prévost, M. C. (1991). The 18-kilodalton antigen secreted by *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun* **59**, 2586–2594.
- Latgé, J.-P., Kobayashi, H., Debeaupuis, J.-P., Diaquin, M., Sarfati, J., Wieruszkeski, J. M., Parra, E. & Fournet, B. (1994). Chemical and immunological characterization of the extracellular galactomannan of *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun* **62**, 5424–5433.

- Linnemans, W. A. M., Boer, P. & Elbers, P. F. (1977). Localization of acid phosphatase in *Saccharomyces cerevisiae*: a clue to cell wall formation. *J Bacteriol* **131**, 638–644.
- Lipke, P. N., Wojciechowicz, D. & Kurjan, J. (1989). *AG $\alpha$ 1* is the structural gene for the *Saccharomyces cerevisiae*  $\alpha$ -agglutinin, a cell surface glycoprotein involved in cell–cell interactions during mating. *Mol Cell Biol* **9**, 3155–3165.
- Lu, C. F., Kurjan, J. & Lipke, P. N. (1994). A pathway for cell wall anchorage of *Saccharomyces cerevisiae*  $\alpha$ -agglutinin. *Mol Cell Biol* **14**, 4825–4833.
- MacRae, W. D., Buxton, F. P., Sibley, S., Garven, S., Gwynne, D. I., Davies, R. W. & Arst, H. N., Jr (1988). A phosphate-repressible acid phosphatase gene from *Aspergillus niger*: its cloning, sequencing and transcriptional analysis. *Gene* **71**, 339–348.
- Mouyna, I., Fontaine, T., Vai, M., Monod, M., Fonzi, W. A., Diaquin, M., Popolo, L., Hartland, R. P. & Latgé, J.-P. (2000). Glycosylphosphatidylinositol-anchored glucanoyltransferases play an active role in the biosynthesis of the fungal cell wall. *J Biol Chem* **275**, 14882–14889.
- Mouyna, I., Sarfati, J., Recco, P., Fontaine, T., Henrissat, B. & Latgé, J.-P. (2002). Molecular characterization of a cell wall associated  $\beta$ (1-3)endo-glucanase of *Aspergillus fumigatus*. *Med Mycol* (in press).
- Mrsa, V., Seidl, T., Gentzsch, M. & Tanner, W. (1997). Specific labelling of cell wall proteins by biotinylation. Identification of four covalently linked *O*-mannosylated proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**, 1145–1154.
- O'Brien, P. J. & Herschlag, D. (2001). Functional interrelationships in the alkaline phosphatase superfamily: phosphodiesterase activity of *Escherichia coli* alkaline phosphatase. *Biochemistry* **40**, 5691–5699.
- Ostanin, K., Harms, E. H., Stevis, P. E., Kuciel, R., Zhou, M. M. & Van Etten, R. L. (1992). Overexpression, site-directed mutagenesis, and mechanism of *Escherichia coli* acid phosphatase. *J Biol Chem* **267**, 22830–22836.
- Rodriguez, E., Mullaney, E. J. & Lei, X. G. (2000). Expression of the *Aspergillus fumigatus* phytase gene in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant enzyme. *Biochem Biophys Res Commun* **268**, 373–378.
- Rodriguez-Pena, J. M., Cid, V. J., Arroyo, J. & Nombela, C. (2000). A novel family of cell wall-related proteins regulated differently during the yeast life cycle. *Mol Cell Biol* **20**, 3245–3255.
- Saleh, M. T. & Belisle, J. T. (2000). Secretion of an acid phosphatase (SapM) by *Mycobacterium tuberculosis* that is similar to eukaryotic acid phosphatases. *J Bacteriol* **182**, 6850–6853.
- Schoffemeer, E. A. M., Vossen, J. H., van Doorn, A. A., Cornelissen, B. J. C. & Haring, M. A. (2001). FEM1, a *Fusarium oxysporum* glycoprotein that is covalently linked to the cell wall matrix and is conserved in filamentous fungi. *Mol Genet Genomics* **265**, 143–152.
- Stratford, M. (1994). Another brick in the wall? Recent developments concerning the yeast cell envelope. *Yeast* **10**, 1741–1752.
- Ullah, A. H. J., Sethumadhavan, K., Lei, X. G. & Mullaney, E. J. (2000). Biochemical characterization of cloned *Aspergillus fumigatus* phytase (PhyA). *Biochem Biophys Res Commun* **275**, 279–285.
- van der Vaart, J. M., Caro, L. H. P., Chapman, J. W., Klis, F. M. & Verrips, C. T. (1995). Identification of three mannoproteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **177**, 3104–3110.
- Van Etten, R. L., Davidson, R., Stevis, P. E., MacArthur, H. & Moore, D. L. (1991). Covalent structure, disulfide bonding and identification of reactive surface and active site residues of human prostatic acid phosphatase. *J Biol Chem* **266**, 2313–2319.
- Vogel, K. & Hinnen, A. (1990). The yeast phosphatase system. *Mol Microbiol* **4**, 2013–2017.
- Von Heijne, G. (1986). A new method for predicting signal sequence cleavage sites. *Nucleic Acids Res* **14**, 4683–4690.
- Vorgias, C. E., Tews, I., Perrakis, A., Wilson, K. J. & Oppenheim, A. B. (1993). Purification and characterization of the recombinant chitin degrading enzymes, chitinase A and chitobiase from *Serratia marcescens*. In *Chitin Enzymology*, pp. 417–422. Edited by R. A. A. Muzzarelli. Antona, Italy: European Chitin Society.
- Worley, K. C., Wiese, B. A. & Smith, R. F. (1995). BEAUTY: an enhanced BLAST-based search tool that integrates multiple biological information resources into sequence similarity search results. *Genome Res* **5**, 173–184.
- Wyss, M., Pasamontes, L., Friedlein, A. & 13 other authors (1999). Biophysical characterization of fungal phytases (*myo*-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases): molecular size, glycosylation pattern, and engineering of proteolytic resistance. *Appl Environ Microbiol* **65**, 359–366.
- Yoda, K., Ko, J. H., Nagamatsu, T., Lin, Y., Kaibara, C., Kawada, T., Tomishige, N., Hashimoto, H., Noda, Y. & Yamasaki, M. (2000). Molecular characterization of a novel yeast cell-wall acid phosphatase cloned from *Kluyveromyces marxianus*. *Biosci Biotechnol Biochem* **64**, 142–148.
- Yoshida, H., Oikawa, S., Ikeda, M. & Reese, E. T. (1989). A novel acid phosphatase excreted by *Penicillium funiculosum* that hydrolyzes both phosphodiester and phosphomonoesters with aryl leaving groups. *J Biochem* **105**, 794–798.
- Zverlov, V. V., Volkov, I. Y., Velikodvorskaya, T. V. & Schwarz, W. H. (1997). Highly thermostable endo-1,3- $\beta$ -glucanase (laminarinase) LamA from *Thermotoga neapolitana*: nucleotide sequence of the gene and characterization of the recombinant gene product. *Microbiology* **143**, 1701–1708.

Received 7 May 2002; revised 17 May 2002; accepted 10 June 2002.

**Les galactomannoprotéines**  
**de *Aspergillus fumigatus***

# **Galactomannoproteins of *Aspergillus fumigatus***

(en préparation)

**W. Morelle<sup>(1,3)</sup>, M. Bernard<sup>(1)</sup>, J.P. Debeaupuis<sup>(1)</sup>, M. Buitrago<sup>(1,4)</sup>, M. Tabouret<sup>(2)</sup>,  
J.P. Latgé<sup>(1)</sup>**

Address : (1) Unité des *Aspergillus*, Institut Pasteur, 25, rue du Docteur roux, 75724 Paris  
Cedex 15

(2) Sanofi Diagnostics Pasteur, Clinical Microbiology Division 59114  
Steenvoorde

(3) Present address : Université des Sciences et Technologies de Lille, Unité de  
Glycobiologie Structurale Fonctionnelle, UMR 8576 du CNRS, 59655  
Villeneuve d'Ascq

(4) Present address : Instituto Carlos III, Madrid, Spain

## ABSTRACT

Three glycoproteins of *Aspergillus fumigatus* with a galactofuranose containing N-glycan have been characterized. These proteins are a phospholipase C, an alkaline phosphatase and a phytase. Chemical characterization of the N-glycan suggests that it is a mixture of Hex<sub>5-13</sub>HexNAc<sub>2</sub> oligosaccharides ; the major molecular species corresponding to Hex<sub>6-8</sub>HexNAc<sub>2</sub>. The N- glycan contained at least one galactofuranose unit that was in a terminal non reducing position attached to the 2-position of Man. ELISA assays showed that the mixture of native PNGase-released oligosaccharides reacted positively with a monoclonal antibody that recognizes also a tetra β-1,5 galactofuran epitope.

## INTRODUCTION

Galactomannan (GM) is an essential molecule in the fungal life of the human opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. It is a polysaccharide that is an important structural component of the cell wall of *A. fumigatus* (Fontaine et al., 2000). GM is also secreted during growth *in vitro* (Latgé et al., 1994). Both secreted and cell wall GMs have a similar chemical organisation composed of a linear α-mannan core with a repeating tetramannose unit [-2M-6M-2M-2M] with side chains of β-(1,5) galactofuranosyl residues with an average degree of polymerization of 4, attached to the α-(1,2)-linked mannose residues of the mannan chain (Latgé et al., 1994, Fontaine et al., 2000). GM is also produced *in vivo* and is a well known *A. fumigatus* antigen. Antibodies directed against this polysaccharide have been detected in patients with aspergilloma and in experimentally infected animals or in rabbits or mice hyperimmunized with total extracts of *A. fumigatus* (Latgé et al., 1994, Sarfati et al., 1995). In addition, it has been repeatedly shown that this molecule circulates in the biological fluids of patients with invasive aspergillosis. Serological diagnosis of this threatful fungal infection remains indeed based on the detection of galactomannan in the serum, urine or bronchoalveolar lavages of infected patients (Stynen et al., 1995, Sulahian et al., 2001, Maertens et al., 1999) since heavily immunocompromised patients at risk for IA are not able to mount an antibody response against *A. fumigatus*. Monoclonal or polyclonal antibodies directed against GM have been used in the search for circulating antigens. The only commercial kit available for detection of GM is a sandwich ELISA based on the use of a rat monoclonal antibody EB-A2 that reacts specifically with the galactofuranose containing moiety of the GM. *In vitro* inhibition assays have shown that the

best inhibition was obtained with a tetra  $\beta$ -(1,5) galactofuranosoligosaccharide suggesting that this oligosaccharide was the epitope recognized by the MAb (Stynen et al., 1992).

Glycoproteins reacting positively with the anti-galactofuran antibodies EB-A2 have been identified in culture filtrates or mycelial extracts by Western blots experiments (Latgé et al., 1994, Haido et al., 1998). These results suggested that *A. fumigatus* can secrete both a polysaccharide GM and glycoproteins bearing a galactofuran moiety. Recently, an  $\alpha$ -galactosidase with a galactofuranose-rich N-glycan was identified in *A. niger*. Analysis of the N-glycan moiety of the  $\alpha$ -galactosidase showed that it was composed of a mixture of Hex<sub>7-26</sub> HexNAc<sub>2</sub> substituted with up to three  $\beta$ -galactofuranose residues (Wallis et al, 2001b).

In this work, we have isolated and characterized 3 major galactomannoproteins (GMPs) secreted by *A. fumigatus* in a glucose / peptone based medium. Biochemical and molecular analysis have shown that these galactomannoproteins were a phospholipase C, an alkaline phosphatase and a phytase. The chemical structure of the N-glycan has been characterized and shown to contain galactofuranose in terminal non-reducing position.

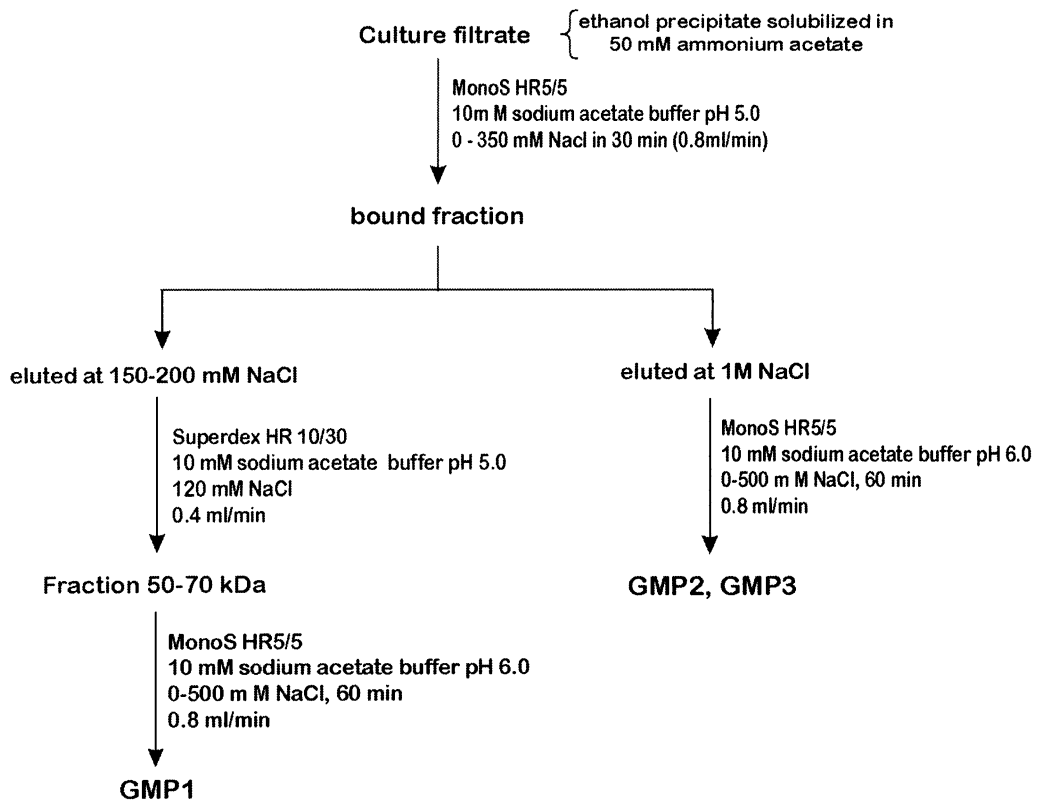


Figure 1 : Sequential purification steps to isolate 3 galactomannoproteins from *A. fumigatus* culture filtrate.



## MATERIAL AND METHODS

### Strains and standard culture conditions

*A. fumigatus* strain CBS 144-89 was grown in Sabouraud's liquid medium (SB) (2% glucose + 1% mycopeptone, Biokar, Beauvais, France). Cultures were performed in a 15 l fermenter in SB medium for 24 h at 25°C as previously described (Lalgé et al., 1994). *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  was the host strain for recombinant DNA manipulations. *Paracoccidioides brasiliensis*, strain B339, was grown in YPD at 37°C as previously described (Almeida et al., 1996).

### Preparation of protein extracts and protein purification

A culture filtrate from a 15 l fermenter was precipitated using 4 volumes of 100% ethanol overnight at 4°C. After centrifugation (5000 g, 10 min), the precipitate was resuspended in 100 ml of 50 mM ammonium acetate, ultrasonicated, centrifuged and the supernatant was dialysed against a 10 mM sodium acetate buffer pH 5.0. Sequential HPLC steps used to purify galactomannoproteins are shown in Fig. 1.

To obtain the gp43 antigen, culture supernatants from a 5 day-old culture of *P. brasiliensis* were inactivated with 0,02% thimerosal for 2 hours at 35°C and precipitated with 4 volumes of 100 % ethanol. The precipitate was resuspended in 10 mM sodium acetate buffer pH 5.0 and dialyzed against the same buffer.

### Protein analysis

Protein samples were analysed by SDS-PAGE (Laemmli, 1970) using 4 % stacking and 10 % separating gels. Proteins were stained with Coomassie blue or electrotransferred to nitrocellulose overnight at 30 V in a 50 mM Tris HCl pH 8.0 buffer containing 200 mM glycine, 20 % ethanol buffer. Blots were immunolabeled with an anti-galactomannan monoclonal antibody (EB-A2) (Stylen et al., 1992). MAb was used at a 1:10 000 dilution (0.27  $\mu$ g IgM/ml). Immunolabelling used a peroxidase anti-rat IgG (H+L) conjugate diluted 1:1000 and the ECL detection method of Amersham. Internal peptide sequencing was performed by J. D'Alayer (Plateau Technique d'Analyse et de Microséquence des Protéines, Institut Pasteur) on an Applied Biosystem 470 apparatus as described earlier (Beauvais et al., 1997). De-N-glycosylation of the protein was performed according to the manufacturer's instructions (Roche) in a 50 mM potassium phosphate buffer pH 7.0 containing 0.4% SDS, 2% n-octyl-glucoside, 1% 2- $\beta$ -mercaptoethanol, and N-glycosidase F (1U per 7

mg protein). The reaction was carried out at 37 °C overnight. Molecular shifts associated to N-deglycosylation were followed by SDS-PAGE after Coomassie blue staining of the protein.

### **Cloning procedures and DNA manipulations**

The sequence of the PLC was searched by screening a cosmid genomic library of *A. fumigatus* (kind gift of P. Borgia) with a [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP-labeled degenerate oligonucleotide 5' AACGAYCCYGAYCACGCYATCGGYAACAACATCGA 3' deduced from the amino acid sequencing of an internal peptide obtained after endolysin digestion of the glycoprotein purified. Positive clones were isolated. Restriction analysis, Southern blotting and subcloning of genomic DNA fragments into plasmids were performed according to standard protocols (Sambrook *et al.*, 1989). Sequencing of the plasmid inserts was made by Cybergene (France). The position of the introns was determined after amplification of cDNA by PCR using primers flanking the unique putative intron identified after analysis of the genomic sequence. Primers employed for that purpose were 5'-GGCTTCGTTTCATGAGCAG-3' and 5'-GCTGGAAGATGGACCGCT-3'.

### **Analysis of phospholipase (PLC), alkaline phosphatase and phytase activities**

Demonstration of the PLC activity was performed using <sup>14</sup>C radiolabelled phosphatidylcholine following a modification of the method of Johansen *et al.* (1996) : 5 µg of enzyme was mixed in 100 µl of 125 mM Tris buffer pH 6.0 containing 0.1 % deoxycholate with 10 µg of phosphatidylcholine (PC) containing 0.045 µCi <sup>14</sup>C phosphatidylcholine (L-3-Phosphatidylcholine, 1,2-di[1-<sup>14</sup>C]palmitoyl, Amersham). The reaction mixture was sonicated for 1 min in a bath sonicator and incubated overnight at 37 °C . A 10 µl sample of the reaction mixture was applied to a TLC plate (Silica gel 60 F<sub>254</sub>, Merck). Plates were eluted with petroleum ether/ethyl ether/acetic acid (50/50/1)(v/v/v). TLC plates were analyzed with a Storm (Molecular Dynamics). To quantify the PLC activity, a colorimetric assay was carried out using a modified version of the protocol of Kurioka *et al.* (1976). p-nitrophenyl phosphatidylcholine (PNPPC) was employed as substrate at 2.5 mM incubated with 10 µg of protein in 100 mM sodium acetate pH 5.0 buffer. The reaction mixture was incubated for 10 minutes at 37°C, and the assay was stopped with 1 ml of 6 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. The OD was measured at 410 nm. For Km determination, concentrations from 2.5 to 100 mM of PNPPC were used. Quantification of the lysis of different PLC substrates was done basically as described by Preuss *et al.*(2001). Briefly, mixtures of cold (5 µg) and radiolabelled substrates (0,02 µCi) in 2 µl were added to 150 µl of a 150 mM Tris HCl buffer pH 6.2 containing 5 µg protein and

0.1 % sodium deoxycholate. Radioactive substrates tested and their corresponding cold substrates were L-3-Phosphatidylcholine,1,2-di[1-<sup>14</sup>C]palmitoyl (Amersham), L-3-Phosphatidylethanolamine 1-palmitoyl-2-[1-<sup>14</sup>C]linoleoyl (Amersham) (PE), sphingomyelin [choline-methyl-<sup>14</sup>C] (NEN) (SM) and L-3-Phosphatidyl[2-<sup>3</sup>H] inositol (Amersham) (PI). After 1 hour incubation at 37°C, a partition with 500 µl chloroform/butanol/concentrated chlorhydric acid (10/10/6), 750 µl distilled water and the reaction mixture was performed. The radioactivity present in the upper and lower phase was quantified.

Alcaline phosphatase activity was measured using p-nitrophenylphosphate (PNPP, Sigma) as a substrate in a 100 mM Tris/HCl pH 8.0 buffer. 10 ng protein was incubated for 30 min at 37°C with 200 µg PNPP. The assay was stopped by addition of 3 volumes of 6 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

Phytase activity was performed as previously described (Pasamontes et al., 1997) using phytic acid (Sigma) as substrate at 5 mM in a sodium acetate 100 mM buffer pH 5.0. The reaction mixture is incubated at 37°C. Phosphate released was quantified by the method of Ames (1966).

### **Glycan isolation**

Purified galactomannoprotein was dialyzed against 50 mM ammonium hydrogen carbonate at 4°C for 48h. After lyophilization, the protein sample was dissolved in 1 ml of 600 mM Tris/HCl pH 8.5 and reduced with 500 µg DTT/mg protein (4-fold molar excess of dithiothreitol over the number of S-S bridges). The sample was flushed with argon and incubated at 37°C for 2h. After addition of 2.5 mg of iodoacetic acid per mg protein (5 molar excess over the DTT), the sample was flushed again with argon and incubated at 37°C for 2h in darkness. The sample was then extensively dialyzed against 50 mM ammonium hydrogen carbonate at 4°C and lyophilized. The reduced carboxymethylated protein was digested with L-1-tosylamide-2-phenylethylchloromethylketone (TPCK) bovine pancreas trypsin (EC 3.4.21.4, Sigma) with an enzyme-to-substrate ratio of 1:50 (by mass), and the mixture was incubated for 5h at 37°C in 50 mM ammonium bicarbonate buffer (pH 8.4). The reaction was terminated by boiling for 5 min before lyophilization.

An aliquot of the tryptic digest of the reduced/carboxymethylated protein was injected onto a C18 Sep-Pak column and the aqueous eluent tested for reactivity with EB-A2. It was verified that this aqueous C-18 Sep-Pack eluate gave always a negative reaction with the ELISA test since a positive reaction would indicate a non-covalent binding of galactofuran

molecules that would have contaminated the protein during extraction and purification procedures.

After running this control, PNGase F (EC 3.2.2.18, Roche Molecular Biochemicals) digestion was carried out in ammonium bicarbonate buffer (50 mM, pH 8.4) for 16h at 37°C using 6 U of the enzyme per mg of tryptic digest. The reaction was terminated by lyophilization and the products were purified on C18-Sep-Pak (Waters Ltd.) to separate the N-glycans from the de-N-glycosylated peptides. After conditioning the C18-Sep-Pak by sequential washing with methanol (5 ml), 1-propanol (5ml) and 5% acetic acid (2x5ml), the sample was loaded onto the Sep-Pak and eluted stepwise with 3 ml of 5% acetic acid, 2 ml of 20% 1-propanol, 2 ml of 40% 1-propanol, 2 ml of 60% 1-propanol and finally 2 ml of 1-propanol.

Sep-Pak purified N-glycans were digested with 0.5 U  $\alpha$ -mannosidase (from jack bean, EC 3.2.1.24, Roche Molecular Biochemicals) in 200  $\mu$ l of 50 mM ammonium acetate buffer, pH 4.5 for 48h at 37°C. The reaction was terminated by boiling for 5 min before lyophilization. Since Mc Conville et al. (1990) have shown that HF treatment only hydrolyzed glycosidic bonds involving residues in the furanose configuration and left the other linkages unbroken, N-glycans were also treated with 100  $\mu$ l of 48% HF (Aldrich) at 0°C for 48h. HF was removed under a stream of nitrogen for one hour (Schneider and Fergusson, 1995). Mannosidase and HF treated N-glycans were purified on a Sep-Pak column as described above and permethylated for MALD-MS and GC-MS analysis. When they were permethylated, N-glycans were eluted from the Sep-Pak with 50% acetonitrile.

### **Reactivity of N-glycans to anti-GM MAb**

To verify the presence or absence of galactofuranose residues in the different fractions containing N-glycans, a commercial sandwich ELISA developed for the detection of GM in blood samples was used (*Platelia Aspergillus*, BioRad) (Stynen et al., 1995). The GMP-protein at a concentration of 10-50 ng was employed as positive control. Equivalent amounts of N-glycans after different treatments were used. For each sample, 1/10 and 1/100 dilutions were tested. ELISA was performed as recommended by the manufacturer, except that the samples to be analysed were used without boiling in the extraction buffer.

### **Carbohydrate composition of N-glycan**

Monosaccharides from Sep-Pak purified N-glycans were analyzed by GLC as alditol acetates obtained after hydrolysis (4N trifluoroacetic acid, 100°C, 4h), reduction and

peracetylation (Sawardeker *et al.*, 1967). Derivatized monosaccharides were separated and quantified on a DB5 capillary column (25m x 0.32 mm, SGE) using a Delsi 200 apparatus (carrier gas, 0.7 bar helium ; temperature program, 120-180°C at 2°C/min and 180-240°C at 4°C/min).

### **MALD-MS and GC-MS analysis of N-glycans**

Permethylation using the sodium hydroxide procedure was performed according to Ciucanu and Kerek (1984). After derivatization, the reaction products were purified on C18-Sep-Pak (Waters Ltd.) according to Dell *et al.* (1994). Partially methylated alditol acetates were prepared from permethylated samples for GC-MS linkage analysis as described previously (Albersheim *et al.*, 1967). GLC-MS analysis were recorded using a Automass II 30 quadripolar mass spectrometer interfaced with a Carlo Erba 8000 Top gas chromatograph (Finnigan, Argenteuil, France). Electron ionization spectra were recorded using an ionization energy of 70 eV. Gas chromatograph was equipped with a CP-Sil 5CB/MS capillary column (25m x 0.32 mm, Chrompak) gas vector, and helium was at a flow rate of 2ml/min. The partially methylated alditol acetates were dissolved in methanol prior to on-column injection at 120°C. The GC oven was held at 120°C for 1 min before increasing to 200°C at 2°C/min and then to 240°C at 15°C/min.

### **Matrix-assisted desorption ioniation / time of flight (MALDI-TOF) analysis of N-glycans**

Reflectron spectra were performed on a VOYAGER DE STR Pro instrument (Perseptive Biosystem, Framingham, MA, USA). Desorption and ionization were obtained with a pulsed UV laser beam (nitrogen lazer,  $\lambda = 337$  nm). Irradiance was used slightly above the threshold of ion detection. Ion spectra resulted from positive ion mode analysis. Acceleration and reflector voltages were set up as follow : target voltage at 20 kV, first grid at 66 % of target voltage, delayed extraction at 200 nsec. Spectra were obtained by accumulation of 100 shots, calibration according to the manufacturer's recommendations. Sample were prepared by mixing directly on the target 1  $\mu$ l of oligosaccharide solution (about 25 pmol) and 1  $\mu$ l of 2.5-dihydroxybenzoic acid matrix solution (10 mg/ml dissolved in CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O(80:20 v/v)).

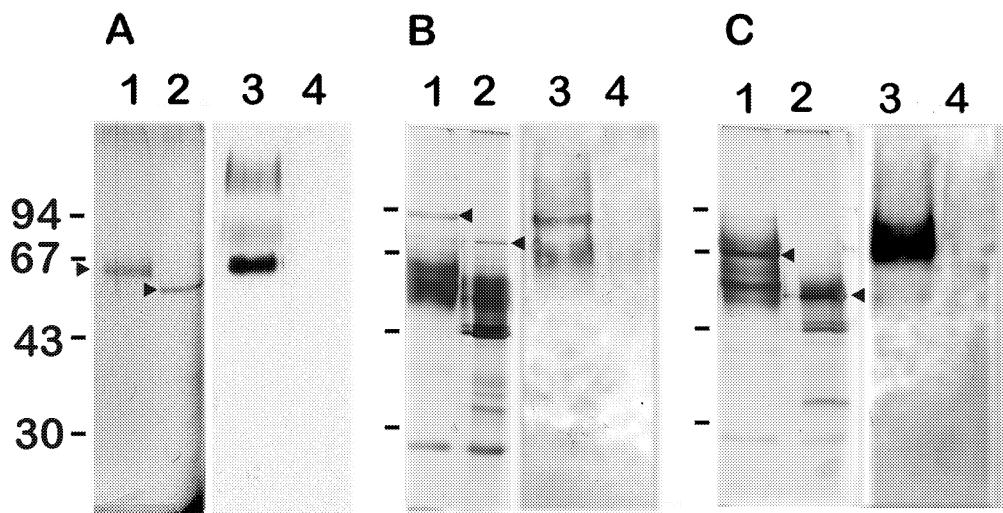


Figure 2 : Analysis of GMP1 (A), GMP2 (B) and GMP3 (C) on 10% SDS-PAGE stained with Coomassie blue (1,2) or transferred on nitrocellulose and revealed by Western-blot with the EB-A2 anti-galactofuran antibody (3,4) before (1,3) and after (2,4) the PNGase treatment. Arrow heads indicate GMP1 (A), GMP2 (B), GMP3 (C) before and after deglycosylation. GMP1 and GMP2 were analysed on SDS-PAGE after the first purification step.

## RESULTS

### Identification of galactomannoproteins

Three proteins (GMP1-3) reacting with the anti-galactofuran antibody were identified in the culture filtrate. These proteins bound to the anion exchange MonoS column. GMP1 was eluted at 160-200 mM NaCl at pH 5.0. GMP2 and 3 bound very strongly to this column since they were eluted initially with a 1M NaCl solution at pH 5.0. A further purification step with the fractions containing GMP2 and GMP3 was realised on the anion exchange MonoS column at pH 6.0. GMP2 and GMP3 were eluted at 250 mM NaCl and 375 mM NaCl, respectively.

Fig. 2 shows the apparent Mr of the native and N-deglycosylated GMPs. The molecular mass shift resulting from N-deglycosylation was between 10-15 kDa indicating the presence of small N-glycans. N-deglycosylation was always associated with the loss of the reactivity with the anti-GM MAb.

### Structural characterization of galactomannan N-glycans

Structural characterization of the N-glycans was hampered by the low amounts of purified GMPs. As a consequence, the N-glycans of GMP1 and GMP3 were only investigated with the oligosaccharides being always analyzed as mixtures.

#### 1. N-glycan of GMP1

##### *Native glycans released by PNGase F*

Gas chromatographic analysis showed that the mixture of PNGase F-released oligosaccharides contained mannose, galactose and N-acetyl-glucosamine in a molar ratio of 6.4 : 2.3 : 2.

Data from MALD-MS of permethylated PNGase F-released glycans eluting in the 50% aqueous acetonitrile (v/v) fraction from a C18 Sep-Pak are shown in figure 3A. The data indicated that the glycoprotein contained glycans with a Hex<sub>5-13</sub>HexNAc<sub>2</sub> composition. The major molecular ion observed corresponded to Hex<sub>6</sub>HexNAc<sub>2</sub> (m/z 1783). ELISA assays showed that the mixture of native PNGase-released oligosaccharides reacted positively with

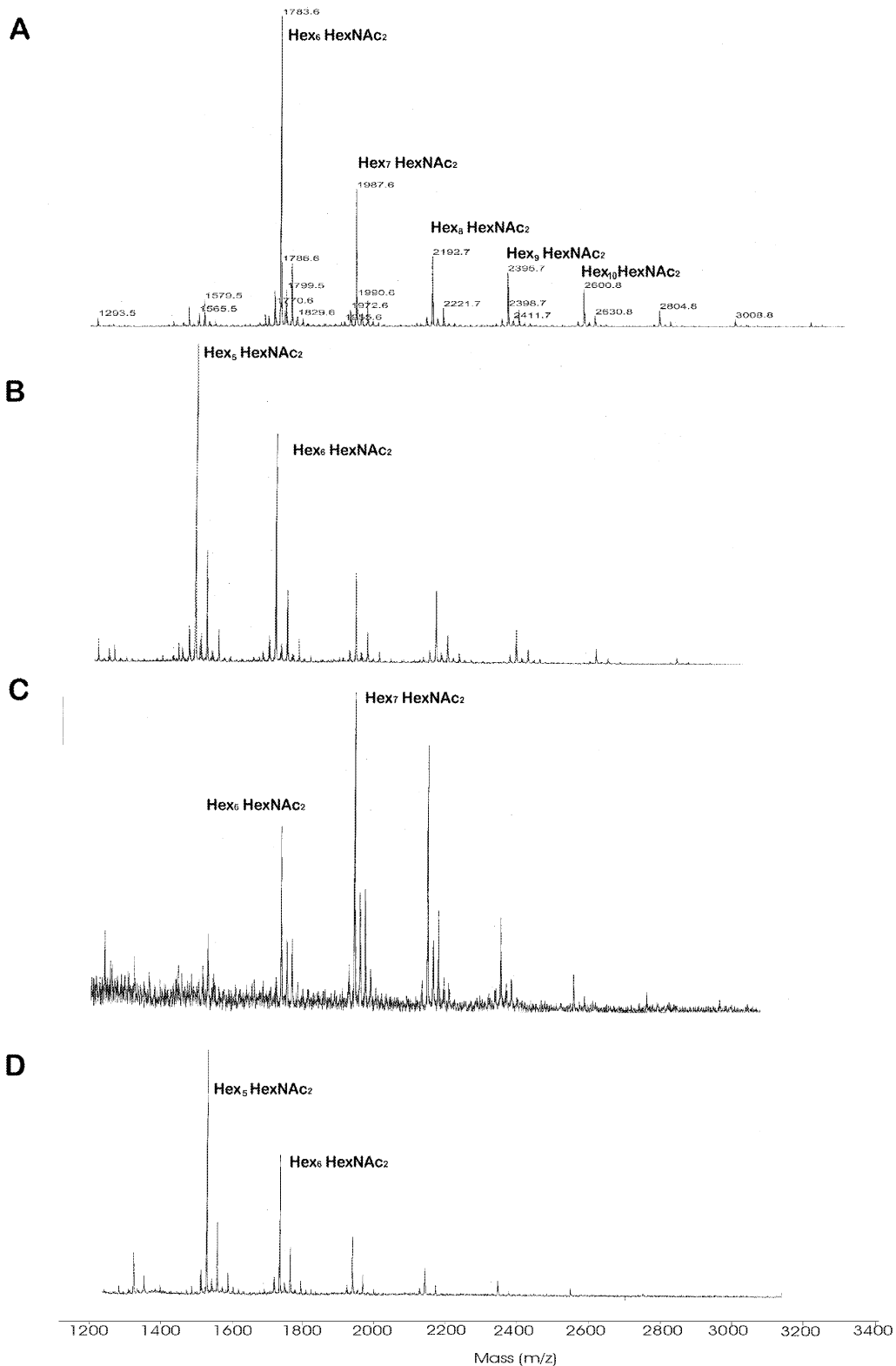


Figure 3 : MALD-MS spectra of permethylated N-glycans from *A. fumigatus* GMP1. The N-glycans were released from tryptic glycopeptides by digestion with PNGase F, separated from peptides by Sep-Pak purification and permethylated. The derivatized glycans were purified by Sep-Pak and the 50% (v/v) aqueous acetonitrile fraction was screened by MALD-MS. (A) Intact N-glycans. (B) N-glycans were treated with HF. (C) N-glycans were subjected to  $\alpha$ -mannosidase digestion. (D) N-glycans were treated with HF after  $\alpha$ -mannosidase digestion. Then N-glycans were permethylated. The derivatized glycans were purified by Sep-Pak and the 50% (v/v) aq. acetonitrile fraction was screened by MALD-MS. In B, C, D, major ions are indicated.



the anti-galactofuran EB-A2 Mab (data not shown). These experiments indicated the presence of galactofuranose residues in the mixture of N-glycans.

GC-MS analysis of partially methylated alditol acetates generated from the permethylated glycans is shown in Table 1. Key features of these data are as follow. (1) 3,6-Man, 2,6 Man, 2-Man, 6-Man and 4-GlcNAc are components of the N-glycan core; (2) Man and Gal are the nonreducing sugars ; (3) the fragmentation pattern of terminal Gal is consistent with a terminally linked hexofuranose sugar ; (4) no 5-Gal was detected suggesting that no chain of galactofuran are present in the N-glycan.

**Table 1 : GC-MS analysis of partially methylated alditol acetates obtained from the PNGase F released N-glycans of GMP1. The 50% acetonitrile fractions from Sep-Pak purifications of permethylated glycans were hydrolyzed, reduced with NaBD<sub>4</sub>, acetylated and analyzed by gas chromatography MS.**

Retention time (min)	Characteristic fragment ions	Assignment	Relative abundance
26.48 <sup>c</sup>	102, 118, 129, 145, 161, 162, 205	Terminal mannose	1.00
26.82 <sup>a</sup>	89, 102, 118, 162, 205, 278	Terminal galactofuranose	0.31
30.99 <sup>b</sup>	129, 130, 161, 190	2-linked mannose	0.76
32.03 <sup>d</sup>	99, 102, 118, 129, 162, 189, 233	6-linked mannose	0.17
36.10	129, 130, 189, 190	2,6-linked mannose	0.28
36.62 <sup>e</sup>	118, 129, 189, 234	3,6-linked mannose	0.25
41.25	117, 159, 233	4-linked GlcNAc	0.48

<sup>a</sup> Signal not observed after HF treatment of N-glycans.

<sup>b</sup> Signal less intense after HF treatment of N-glycans.

<sup>c</sup> Signal more intense after HF treatment of N-glycans.

<sup>d</sup> Signal more intense after treatment of N-glycans with Jack bean  $\alpha$ -mannosidase.

<sup>e</sup> Signal less intense after treatment of N-glycans with Jack bean  $\alpha$ -mannosidase.

#### *HF treatment and $\alpha$ -mannosidase digestion of N-glycans released by PNGase F*

GC-MS data showed that a 48h treatment at 0°C with 48 % HF removed all terminal galactofuranose residues from the N-glycans. In addition, HF treated N-glycans did not react with the anti-galactofuran MAb, eventhough the concentration of HF-treated N-glycans tested by ELISA was 100 times higher than untreated N-glycans (data not shown). The MALD-MS spectrum of permethylated HF-treated N-glycans eluting in the 50% aqueous acetonitrile (v/v) fraction from a C18 Sep-Pak is shown in figure 3. The overall MALD-MS pattern of the HF-treated glycan could be roughly superimposed to the native glycan if one hexose unit is removed (compare figures 3A and 3B). After HF treatment removing Gal<sub>f</sub> residues, the oligosaccharides had an average size of 6.2 (calculated as number of hexose units of each oligosaccharide species x % of each oligosaccharide species / 100) whereas the native oligosaccharides showed an average size of 7.1 hexose units. These data suggested the presence of one galactofuranosyl unit per average oligosaccharide. However, the molecular ion at m/z 1783 (Hex<sub>6</sub>HexNAc<sub>2</sub>) was present in a higher concentration than the Hex<sub>7</sub>HexNAc<sub>2</sub>

before HF treatment suggesting that another isomeric structure of Hex<sub>6</sub>HexNAc<sub>2</sub> without galactofuranose residue was also present in the original native mixture of N-glycans.

GC-MS data showed that after HF treatment, 2-linked Man was the only linked mannose residue which decreased significantly (data not shown) suggesting that terminal galactofuranose residues were attached to the 2-position of Man prior to HF treatment. This result was in agreement with Western blot data showing the absence of reactivity of a culture filtrate of *Paracoccidioides brasiliensis* with EB-A2. This extract contained the major glycoprotein gp43 that was characterized by the presence of β-D-galactofuranose linked in β-(1,6) to one of the mannosyl residues of the N-glycan mannan core (data not shown).

When native glycan pools were subjected to α-mannosidase digestion, prior to HF-treatment, the reactivity of the resulting N-glycans digested with α-mannosidase against the anti-GM MAb was identical to the reactivity of the native N-glycans indicating that this exomannosidase treatment did not remove any galactofuranose residues (data not shown). However, this treatment identified 2 populations of N-glycans. The first population corresponded to N-glycans without galactofuranose residues that were trimmed to HexHexNAc<sub>2</sub> (m/z 763), Hex<sub>2</sub>HexNAc<sub>2</sub> (m/z 967) and Hex<sub>3</sub>HexNAc<sub>2</sub> (m/z 1171) by the α-mannosidase treatment. The second population contained N-glycans with galactofuranose that were dominated by 3 major molecular ions at m/z 1783 (Hex<sub>6</sub>HexNAc<sub>2</sub>), 1987 (Hex<sub>7</sub>HexNAc<sub>2</sub>) and 2192 (Hex<sub>8</sub>HexNAc<sub>2</sub>) (Fig. 3C). After α-mannosidase digestion, GC-MS showed that galactose became the major non-reducing sugar of the N-glycan pool (data not shown). The presence of terminal mannose residues indicated that the α-mannosidase treatment was incomplete probably because of steric hindrance caused by the presence of galactofuranose residues.

After HF treatment of the α-mannosidase treated N-glycans the amount of Hex<sub>7</sub>HexNAc<sub>2</sub> was greatly reduced, and Hex<sub>5</sub>HexNAc<sub>2</sub> became the major molecular ion. This data suggested that some N-glycans greater in size than Hex<sub>6</sub>HexNAc<sub>2</sub> corresponding to the Hex<sub>7</sub>HexNAc<sub>2</sub> species observed after α-mannosidase treatment, carried more than one galactofuranose residue (Fig. 3D). The comparison of the calculated average size of the oligosaccharide recovered after α-mannosidase treatment showed indeed a difference of 1.7 hexose units, in agreement with the presence of more than 1 galactofuranose unit per N-glycan species. In agreement with data obtained with HF-treated native N-glycans, HF treatment of the α-mannosidase-treated glycans induced a significant reduction in the amount of the 2-linked mannose (data not shown). When these oligosaccharides obtained after α-

mannosidase digestion and HF treatment were subjected again to  $\alpha$ -mannosidase the expected major molecular ion at  $m/z$  763 (HexHexNAc<sub>2</sub>) and two minor molecular ions at  $m/z$  967 and 1171 which correspond respectively to Hex<sub>2-3</sub>HexNAc<sub>2</sub> were detected (data not shown).

The chemical and immunochemical data obtained above showed that GMP1 of *A. fumigatus* contained a heterogeneous mixture of N-glycans Hex<sub>5-13</sub>HexNAc<sub>2</sub>. The glycans fell into two classes of N-glycans: high mannose structures lacking Gal<sub>f</sub> residues and high mannose structures containing one to two galactofuranose residues. The galactofuranose residues are at the terminal non-reducing position attached to the 2 position of the mannose residues.

## 2. N-glycan of GMP3

N-glycans of GMP3 were released by PNGase treatment as described for GMP1. ELISA assays showed that the mixture of native PNGase-released oligosaccharides reacted positively with the anti-galactofuran EB-A2 Mab (data not shown). These experiments indicated the presence of galactofuranose residues in the mixture of N-glycans. The data of MALD-MS indicated that the glycoprotein contained glycans with a Hex<sub>6-12</sub>HexNAc<sub>2</sub> composition. The major native molecular ions observed corresponded to Hex<sub>7</sub>HexNAc<sub>2</sub> ( $m/z$  1581) and Hex<sub>8</sub>HexNAc<sub>2</sub> ( $m/z$  1743) indicating that GMP3 N-glycans were similar to GMP1 N-glycans in size. After HF treatment removing Gal<sub>f</sub> residues, the oligosaccharides had an average size of 7.3 whereas the native oligosaccharides showed an average size of 8.0 hexose units. These data suggested the presence of one galactofuranosyl unit per average oligosaccharide.

## Characterization of GMPs

### 1. GMP1

The internal peptide sequence (NDPDHAYGNNIE) obtained from the purified GMP1 allowed the isolation of a GMP1 specific *Xho*1-*Xba*1 fragment of 2.7 kb. The sequence revealed an ORF of 1418 pb with an intron with a size of 50 pb in position 562-612 that was confirmed by sequencing the 270 bp obtained by PCR surrounding the intron with cDNA as a template. The ORF encoded a putative protein of 456 amino acids with 5 predicted N-

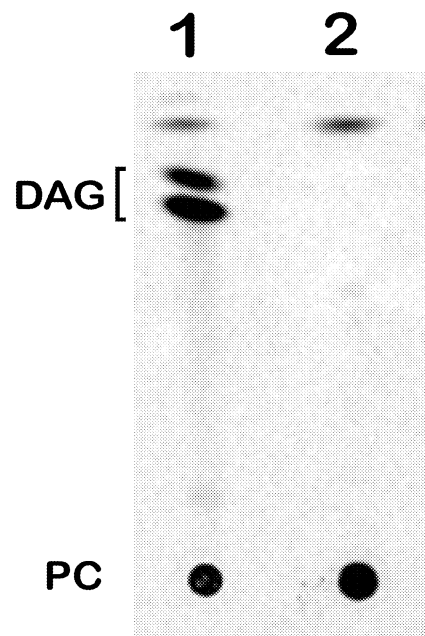


Figure 4 : TLC analysis of products released by hydrolysis of PC with PLC. (1) PLC activity, (2) negative control with *A. fumigatus* PLC heat inactivated. DAG : Diacylglycerol.

glycosylation sites, a predicted molecular mass of 49.8 kDa and a pI of 6.12. A stretch of hydrophobic amino acids was seen at the amino terminus and a putative signal peptide at the NH<sub>2</sub> terminus was predicted by the programme SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) and in agreement with the (-3-1) rule of Von Heijne (1986). The putative cleavage site was between the A18 and I19.

BLAST analysis of the deduced amino sequence of the *A. fumigatus* protein showed a high degree of similarity with bacterial phospholipases C (47 % and 38 % similarities with *M. tuberculosis* and *P. aeruginosa* PLC) and a putative phospholipase C from *Arabidopsis thaliana* (37 % similarity). No homologies were seen with other fungal phospholipases present in the database but BLAST against TIGR *Aspergillus fumigatus* database showed however the presence of two homologous sequences (clones 51 and 906) in the TIGR databases).

TLC analysis showed that upon incubation of the purified GMP1 with <sup>14</sup>C phosphatidylcholine (PC), diacylglycerol (DAG) was released showing that GMP1 had a PLC activity (Fig. 4). The enzymatic capacity to degrade different PLC substrates (PC, PE, SM, PI) was investigated. Under the experimental conditions tested, the most efficiently degraded substrate was sphingomyelin. Phosphatidylethanolamine was not cleaved. Under the same substrate concentration, the amount of radioactivity released from PC and PI was respectively 71 and 31 % of the amount released from sphingomyelin. Using pNPPC as a substrate, the enzyme had a Km value of  $3.85 \pm 0.7$  mM and a specific activity of  $30.2 \pm 8$  pmol/min/μg.

## **2. Characterisation of GMP2**

Two internal peptide sequences (FPVLGHQMTHSMD and ALGQLDDTLIIVTA) obtained from the 85 kDa protein matched with the clone 522 of the TIGR database. Blast of this clone with usual databases revealed that the putative protein had high homologies with alkaline phosphatases (62% with alkaline phosphatase of *Neurospora crassa*). The putative protein possessed 7 sites of N-glycosylation. The phosphatase activity was confirmed using PNPP and revealed it was active on this substrate at pH 8.0. The N-glycans of GMP2 were not analysed as this protein was in very low amount.

## **3. Characterization of GMP3**

An internal peptide sequence (KALARSVVPFIRASGS) obtained from the 70 kDa GMP3 protein matched with the clone 280 of the TIGR database. Search in public databases revealed that this protein was PhyAp, a secreted phytase from *A. fumigatus* previously characterized (Pasamontes et al., 1997, Rodriguez et al., 2000, Tomschy et al., 2000, 2002, Ullah et al., 2000). The *PHYA* gene is 465 amino acid which gave a theoretic molecular weight of 48 kDa. The protein possessed 7 putative N-glycosylation sites. It had high homologies with other phytases or acid phosphatases : 66 %, 61 % and 48 % identity to phytases of *A. niger*, *A. terreus* and *Myceliophthora thermophila*, respectively (Pasamontes et al., 1997).

## DISCUSSION

Galactofuranose containing molecules have been repeatedly shown to be important antigens among human fungal pathogens. This is true for *Aspergillus* species but also in *Paracoccidioides brasiliensis* (Almeida et al., 1996), *Sporothrix schenckii* and dermatophytes (Lloyd, 1970, Travassos et al., 1985). The major exocellular antigens of *P. brasiliensis* used to detect the presence of antibodies in patients with paracoccidioidomycosis is a 43 kDa glycoprotein which contains a N-linked oligosaccharide terminated by a  $\beta$  D-galactofuranosyl residues 1 $\rightarrow$ 6 linked to the mannosyl residues. However, in contrast to *A. fumigatus* GMPs, the antigenicity of gp43 was due to the peptide moiety rather than to the galactofuranose containing N-glycan. Antibodies directed against the galactofuran moiety of the galactomannan have been found in immunocompetent patients infected with *A. fumigatus* (Latgé et al, 1994). The role of these galactofuran determinants in the host immune reactions has not been investigated yet during *Aspergillus* infections.

The characterization of the N-glycan of the *A. fumigatus* GMPs is in agreement with the general composition of oligosaccharides of *Aspergillus* glycoproteins (Maras et al., 1999): (1) an average oligosaccharide size of Hex<sub>5-10</sub>GlcNAc<sub>2</sub> has been reported. Large mannan chains (Hex<sub>50-200</sub>) present in *S. cerevisiae* and other yeasts, have never been identified in filamentous fungi ; (2) Galf has been shown in several *Aspergillus* glycoproteins such as the  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -galactosidase of *A. niger* or the  $\beta$ -galactosidase of *A. oryzae* (Wallis et al., 2001a, 2001b, Takayanagi et al., 1994) ; (3) when present, Galf is at the non-reducing terminal position ; (4) N-glycan with or without Galf has been also shown to be present simultaneously on the same glycoprotein but it is unknown if this is constitutive or due to the action of an exo-galactofuranosidase shown to be present in various *Aspergillus* species (Rietschel-Berst et al., 1977) ; alternatively, as in *S. cerevisiae*, the nature of the peptide to which the N-glycan is anchored could determine the nature of the N-glycan (Orlean, 1997). Galactose residues found at the non-reducing end of N-glycans serve as stop signal for further mannose addition, similarly to the role proposed for  $\alpha$ -(1,3) mannose in *S. cerevisiae* (Dean, 1999).

The structure of the N-glycan of the PLC of *A. fumigatus* looked similar to the N-glycan of the  $\alpha$ -galactosidase from *A. niger*. The mannan oligosaccharides of the N-glycan of the  $\alpha$ -galactosidase of *A. niger* were of a slightly higher molecular weight with most abundant

components being Hex<sub>10-15</sub>HexNAc<sub>2</sub> whereas they were Hex<sub>6-8</sub>HexNAc<sub>2</sub> and Hex<sub>7-8</sub>HexNAc<sub>2</sub> in *A. fumigatus* PLC and phytase, respectively. The chemical organisation of the N-glycan has not been precisely determined since N-glycans of *A. fumigatus* and *A. niger* were analysed as a mixture due to the limited amounts of purified protein. Further chemical characterization would require the separation and purification of each of the major oligosaccharides released by PNGase treatment. In spite of the lack of definite structure, both studies in *A. niger* and *A. fumigatus* have shown that N-glycans from these 2 species showed a common essential features : galactofuranose is present as single residues linked to the C-2 of non-reducing terminal mannose residues. The recognition of N-glycans of these *Aspergillus* glycoproteins by the monoclonal EB-A2 questioned the previously established identity of the epitope recognized by this monoclonal antibody. Using chemically synthesized galactofurans of different sizes, we showed that the best oligosaccharide recognized was a tetra  $\beta$ -(1,5) galactofuran (Stynen et al., 1992). The absence of  $\beta$ -1,5 galactofuran chains in the N-glycans of *Aspergillus* GMPs suggest that an oligomannan substituted with a galactofuranose on its terminal non-reducing end can be also recognized by this monoclonal antibody. Identification of the Galf-Man epitope from the GMPs N-glycan is presently impossible since the enzymatic cleavage of the side chains of the N-glycan is not possible in absence of available endomannanase. However, our data showed that the linkage between the galactofuranose and the oligomannan is critical : a  $\beta$ -1,2 linkage allows IgM binding whereas a  $\beta$ -1,6 linkage, as in gp 43 of *P. brasiliensis*, prevents antigen recognition.

Two other GMPs have been found in either the culture filtrate or in the cell wall of *A. fumigatus* (unpublished data). GMP4 was isolated after incubation of a mycelium or cell wall extracts in a 50mM Tris HCl pH 7.5 buffer for 2 hours at 4°C with or without 50mM DTT (100  $\mu$ g dry weight material/ml buffer), followed by a purification on a ConA-sepharose column. Three polypeptides with apparent Mrs of 240 kDa, 160 kDa and 94 kDa reacted with the anti-galactomannan MAb EB-A2. Sequencing of the bands positive with the MAb EB-A2 showed that these 3 polypeptides corresponded to the same protein that was a homolog of a protein of *Botrytis cinerea* of unknown function. GMP5 of the culture filtrate did not bind to the MonoS column at pH 5.0 and was further eluted from a Mono Q anion exchange column at pH 8.8 with 160 mM NaCl. Internal peptide sequences (DLTSYVNL, TGTQNGGNF, KLGPDLLNPGTDAYSGYLPTG, VRGAVNWEDGYK, KYTRAVTRAVEYACBDF) were obtained from this 89 kDa protein and matched with the clone 278 of the TIGR database. No homologs were found in the public databases. Interrogations of NCBI database revealed astonishing similarities with various ATP binding proteins in plants and fungi. Both GMP4



and GMP5 were N-glycosylated as shown by a reduction of Mr of these proteins (10 kDa in GMP4 and 7 kDa in GMP5) following treatment of the proteins with PNGaseF. However the deglycosylated GMP4 and GMP5 still reacted with the MAb EB-A2 suggesting that the association of GMP4 with the galactofuran was either due to another type of glycosylation than N-glycosylation (O-glycosylation, phosphodiester link...) or was not covalent. In addition, all crude cell wall and culture filtrate extracts contained a band reacting with EB-A2 as a smear after SDS-PAGE that was trypsin-resistant and not extracted by chloroform/methanol (v/v). This charged galactofuran-containing polysaccharide has not been identified yet.

Besides being a main component of fungal species such as *Aspergillus* and *Penicillium*, galactofuranose is also present in the cell walls of mycobacteria, in the lipopolysaccharide O-antigens of a variety of Gram-negative bacteria and in cell envelope components of eukaryotic parasites. The broad distribution of Galf in critical structures of pathogenic microorganisms and its absence in higher eukaryotes makes the biosynthetic pathway of Galf an attractive target for the development of new antimicrobial drugs. The first enzyme involved in this biosynthetic pathway has been well characterized. It is an UDP-Galp mutase that converts UDP-galactopyranose to UDP-galactofuranose (Sanders et al., 2001). This enzyme has not been identified in *A. fumigatus* and no homologous sequence was found in the last release of the *A. fumigatus* TIGR-database. The first step of the galactofuranose pathway in *A. fumigatus* remains unknown as well as the enzyme(s) responsible for the elongation of the galactofuran side chains or the transferases adding the galactofuranose at the terminal non reducing end of the mannan of the N-glycan.

All GMPs of *A. fumigatus* are secreted enzymes that can be an essential part of a phosphate-scavenging system. For example, the main function of the PLC of *A. fumigatus* could be to retrieve phosphate from phospholipids. Such a role has been shown for the *P. aeruginosa* PLC that is regulated at the transcriptional level by Pi. In *A. fumigatus*, the PLC is also submitted to phosphate repression : it is absent in 2 defined media containing high amount of phosphate (75 mM) and repressed in a Sabouraud medium supplemented with 75 mM phosphate (data not shown). The PLC could also have a role in the virulence of the fungus because of its ability to hydrolyse phagocyte or alveolar cell membranes as well as phospholipids of the lung surfactant. Extracellular phospholipases have been recognized as virulence factors for a large numbers of bacterial and fungal pathogens such as *Mycobacterium*, *Clostridium*, *Listeria*, *Pseudomonas* (Gomez et al., 2000, Johansen et al. 1996, Goldfine et al., 1993, Camilli et al., 1991, Portnoy et al., 1994, Titball, 1993). *Candida albicans* (Leidich et al., 1998, Ghanoum, 2000) and *Cryptococcus neoformans* (Cox et al.,

2001). In spite of its ability to cleave phosphatidylcholine and sphingomyelin, *A. fumigatus* PLC was not able to lyse erythrocytes (data not shown), a property often associated with the involvement of PLC in bacterial virulence. The lack of any cytolytic of the *A. fumigatus* PLC would suggest that this enzyme does not play a direct role in fungal pathogenicity unless, as shown with non-hemolytic bacterial PLC, GMP1 can act in conjunction with other microbial enzymes to cause cell lysis (Titball, 1993, Gomez et al., 2001). Such mechanism is possible in *A. fumigatus* where multiple extracellular phospholipases, including PLA, PLB, PLC and PLD, have been identified in culture filtrates (Birch et al., 1996). In addition, the absence of cell lysis does not preclude a role on cell membrane : cell lysis following erythrocyte incubation with some PLC is only seen if the cells are cooled after treatment or incubated with EDTA. The 2 other enzymes alkaline phosphatase and phytase are directly responsible for phosphate retrieval from the external medium. This study and the identification of an acid phosphatase as the major cell wall protein (Bernard et al., 2002) suggest that *A. fumigatus* growth is highly depending on free phosphate availability and that phosphate scavenging could be a way to restrict the growth of *A. fumigatus in vivo*.

## REFERENCES

- Albersheim, P., Nevins, D. J., English, P. D. & Karr, A. (1967).** A method for the analysis of sugars in plant cell-wall polysaccharides by gas-liquid chromatography. *Carbohydr. Res.* **5**, 340-345.
- Almeida, I. C., Neville, D. C., Mehlert, A., Treumann, A., Ferguson, M. A., Previato, J. O. & Travassos, L. R. (1996).** Structure of the N-linked oligosaccharide of the main diagnostic antigen of the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Glycobiology* **6**, 507-515.
- Ames, B. N. (1966).** Assay of inorganic phosphate and phosphatases. *Methods Enzymol.* **8**, 115-118.
- Beauvais, A., Monod, M., Debeaupuis, J. P., Diaquin, M., Kobayashi, H. & Latgé, J. P. (1997).** Biochemical and antigenic characterization of a new dipeptidyl-peptidase isolated from *Aspergillus fumigatus*. *J. Biol. Chem.*, 6238-6244.
- Birch, M., Robson, G., Law, D. & Denning, D. W. (1996).** Evidence of multiple extracellular phospholipase activities of *Aspergillus fumigatus*. *Infect. Immun.* **64**, 751-755.
- Camilli, A., Goldfine, H. & Portnoy, D. A. (1991).** *Listeria monocytogenes* mutants lacking phosphatidylinositol-specific phospholipase C are avirulent. *J. Exp. Med.* **173**, 751-754.
- Ciucanu, I. & Kerek, F. (1984).** A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydr. Res.* **131**, 201-217.
- Cox, G. M., McDade, H. C., Chen, S. C., Tucker, S. C., Gottfredsson, M., Wright, L. C., Sorrell, T. C., Leidich, S. D., Casadevall, A., Ghannoum, M. A. & Perfect, J. R. (2001).** Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*. *Mol. Microbiol.* **39**, 166-175.
- Dean, N. (1999).** Asparagine-linked glycosylation in the yeast Golgi. *Biochem. Biophys.* **1426**, 309-322.
- Dell, A., Reason, A. J., Khoo, K. H., Panico, M., McDowell, R. A. & Morris, H. R. (1994).** Mass spectrometry of carbohydrate-containing biopolymers. *Methods Enzymol.* **230**, 108-132.
- Fontaine, T., Simenel, C., Dubreucq, G., Adam, O., Delepierre, M., Lemoine, J., Vorgias, C. E., Diaquin, M. & Latgé, J. P. (2000).** Molecular organization of the alkali-insoluble fraction of *Aspergillus fumigatus* cell wall. *J. Biol. Chem.* **275**, 27594-27607.
- Ghannoum, M. A. (2000).** Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin. Microbiol. Rev.* **13**, 122-143.
- Goldfine, H., Johnston, N. C. & Knob, C. (1993).** Nonspecific phospholipase C of *Listeria monocytogenes*: activity on phospholipids in Triton X-100-mixed micelles and in biological membranes. *J. Bacteriol.* **175**, 4298-4306.

- Gomez, A., Mve-Obiang, A., Vray, B., Remacle, J., Chemlal, K., Meyers, W. M., Portaels, F. & Fonteyne, P. A. (2000).** Biochemical and genetic evidence for phospholipase C activity in *Mycobacterium ulcerans*. *Infect. Immun.* **68**, 2995-2997.
- Gomez, A., Mve-Obiang, A., Vray, B., Rudnicka, W., Shamputa, I. C., Portaels, F., Meyers, W. M., Fonteyne, P. A. & Realini, L. (2001).** Detection of phospholipase C in nontuberculous mycobacteria and its possible role in hemolytic activity. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 1396-13401.
- Haido, R. M. T., Silva, M. H., Ejzemberg, R., Leitao, E. A., Hearn, V. M., Evans, G. V. & Barreto Bergter, E. (1998).** Analysis of peptidogalactomannans from the mycelial surface of *Aspergillus fumigatus*. *Med. Mycol.* **36**, 313-321.
- Johansen, K. A., Gill, R. E. & Vasil, M. L. (1996).** Biochemical and molecular analysis of phospholipase C and phospholipase D activity in mycobacteria. *Infect. Immun.* **64**, 3259-3266.
- Kurioka, S. & Matsuda, M. (1976).** Phospholipase C assay using p-nitrophenylphosphorylcholine together with sorbitol and its application to studying the metal and detergent requirement of the enzyme. *Anal. Biochem.* **75**, 281-289.
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Latgé, J. P., Kobayashi, H., Debeaupuis, J. P., Diaquin, M., Sarfati, J., Wieruszkeski, J. M., Parra, E. & Fournet, B. (1994).** Chemical and immunological characterization of the galactomannan secreted by *Aspergillus fumigatus*. *Infect. Immun.* **62**, 5424-5433.
- Leidich, S. D., Ibrahim, A. S., Fu, Y., Koul, A., Jessup, C., Vitullo, J., Fonzi, W., Mirbod, F., Nakashima, S., Nozawa, Y. & Ghannoum, M. A. (1998).** Cloning and disruption of caPLB1, a phospholipase B gene involved in the pathogenicity of *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.* **273**, 26078-26086.
- Lloyd, K. O. (1970).** Isolation, characterization and partial structure of peptidogalactomannans from the yeast form of *Cladosporium werneckii*. *Biochemistry* **9**, 3446-3453.
- Maertens, J., Verhaegen, J., Demuyne, H., Brock, P., Verhoef, G., Vandenberghe, P., Van Eldere, J., Verbist, L. & Boogaerts, M. (1999).** Autopsy-controlled prospective evaluation of serial screening for circulating galactomannan by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for hematological patients at risk for invasive aspergillosis. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 3223-3228.
- Maras, M., van Die, I., Contreras, R. & van den Hondel, C. A. (1999).** Filamentous fungi as production organisms for glycoproteins of bio-medical interest. *Glycoconj. J.* **16**, 99-107.
- McConville, M. J., Homans, S. W., Thomas-Oates, J. E., Dell, A. & Bacic, A. (1990).** Structures of the glycoinositolphospholipids from *Leishmania major*. A family of novel galactofuranose-containing glycolipids. *J. Biol. Chem.* **265**, 7385-7394.

**Orlean, P. (1997).** Biogenesis of yeast wall and surface components. In *The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces. Cell cycle and cell biology*, pp. 231-294. Edited by J. R. Pringle, J. R. Broach & E. W. Jones. N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.

**Pasamontes, L., Haiker, M., Wyss, M., Tessier, M. & van Loon, A. P. (1997).** Gene cloning, purification, and characterization of a heat-stable phytase from the fungus *Aspergillus fumigatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 1696-1700.

**Portnoy, D. A., Smith, G. A. & Goldfine, H. (1994).** Phospholipases C and the pathogenesis of Listeria. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **27**, 357-361.

**Preuss, I., Kaiser, I. & Gehring, U. (2001).** Molecular characterization of a phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase C. *Eur. J. Biochem.* **268**, 5081-5091.

**Rietschel-Berst, M., Jentoft, N. H., Rick, P. D., Pletcher, C., Fang, F. & Gander, J. E. (1977).** Extracellular exo- $\beta$ -D-galactofuranosidase from *Penicillium charlesii*. *J. Biol. Chem.* **252**, 3219-3226.

**Rodriguez, E., Mullaney, E. J. & Lei, X. G. (2000).** Expression of the *Aspergillus fumigatus* phytase gene in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **268**, 373-378.

**Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989).** Molecular cloning : a laboratory manual. 2nd ed. Cold spring Harbor laboratory, Cold spring Harbor, N.Y.

**Sanders, D. A., Staines, A. G., McMahon, S. A., McNeil, M. R., Whitfield, C. & Naismith, J. H. (2001).** UDP-galactopyranose mutase has a novel structure and mechanism. *Nat. Struct. Biol.* **8**, 858-863.

**Sarfati, J., Boucias, D. & Latgé, J. P. (1995).** Antigens of *Aspergillus fumigatus* produced *in vivo*. *J. Med. Vet. Mycol.* **33**, 9-14.

**Sawardeker, J. S., Sloneker, J. H. & Jeanes, A. (1965).** Quantitative determination of monosaccharides as their alditol acetates by gas liquid chromatography. *Analyt. Biochem.* **37**, 1602-1604.

**Schneider, P. & Ferguson, M. A. (1995).** Microscale analysis of glycosylphosphatidylinositol structures. *Methods Enzymol.* **250**, 614-630.

**Stynen, D., Goris, A., Sarfati, J. & Latgé, J. P. (1995).** A new sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay to detect galactofuran in patients with invasive aspergillosis. *J. Clin. Microbiol.* **33**, 497-500.

**Stynen, D., Sarfati, J., Goris, A., Prévost, M. C., Lesourd, M., Kamphuis, H., Darras, V. & Latgé, J. P. (1992).** Rat monoclonal antibodies against galactomann. *Infect. Immun.* **60**, 2237-2245.

- Sulahian, A., Boutboul, F., Ribaud, P., Leblanc, T., Lacroix, C. & Derouin, F. (2001).** Value of antigen detection using an enzyme immunoassay in the diagnosis and prediction of invasive aspergillosis in two adult and pediatric hematology units during a 4-year prospective study. *Cancer* **91**, 311-318.
- Takayanagi, T., Kimura, A., Chiba, S. & Ajisaka, K. (1994).** Novel structures of N-linked high-mannose type oligosaccharides containing alpha-D-galactofuranosyl linkages in *Aspergillus niger* alpha-D-glucosidase. *Carbohydr. Res.* **256**, 149-158.
- Titball, R. W. (1993).** Bacterial phospholipases C. *Microbiol. Rev.* **57**, 347-366.
- Tomschy, A., Brugger, R., Lehmann, M., Svendsen, A., Vogel, K., Kostrewa, D., Lassen, S. F., Burger, D., Kronenberger, A., van Loon, A. P., Pasamontes, L. & Wyss, M. (2002).** Engineering of phytase for improved activity at low pH. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 1907-1913.
- Tomschy, A., Tessier, M., Wyss, M., Brugger, R., Broger, C., Schnoebelen, L., Van Loon, A. P. G. M. & Pasamontes, L. (2000).** Optimization of the catalytic properties of *Aspergillus fumigatus* phytase based on the three-dimensional structure. *Protein Science* **9**, 1304-1311.
- Travassos, L. R. (1985).** *Sporothrix schenckii*. In *Fungal dimorphism, with emphasis on fungi pathogenic for humans*, pp. 121-156. Edited by P. J. Szanislo & J. L. Harris: plenum Press, New York.
- Ullah, A. H., Sethumadhavan, K., Lei, X. G. & Mullaney, E. J. (2000).** Biochemical characterization of cloned *Aspergillus fumigatus* phytase (phyA). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **275**, 279-285.
- Von Heijne, G. (1986).** A new method for predicting signal sequence cleavage sites. *Nucl. Acids Res.* **14**, 4683-4690.
- Wallis, G. L., Easton, R. L., Jolly, K., Hemming, F. W. & Peberdy, J. F. (2001b).** Galactofuranoic-oligomannose N-linked glycans of alpha-galactosidase A from *Aspergillus niger*. *Eur. J. Biochem.* **268**, 4134-4143.
- Wallis, G. L., Hemming, F. W. & Peberdy, J. F. (2001a).** An extracellular beta-galactofuranosidase from *Aspergillus niger* and its use as a tool for glycoconjugate analysis. *Biochim. Biophys. Acta* **1525**, 19-28.

**Protéines GPI de *A.***  
*fumigatus*

Jean-Michel Bruneau<sup>1\*</sup>  
 Thierry Magnin<sup>3\*</sup>  
 Eric Tagat<sup>1</sup>  
 Raymond Legrand<sup>2</sup>  
 Muriel Bernard<sup>3</sup>  
 Michel Diaquin<sup>3</sup>  
 Claude Fudali<sup>2</sup>  
 Jean-Paul Latgé<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Infectious Disease Group,  
 Biochemistry Department

<sup>2</sup>Core Research Functions,  
 Biophysics Department,  
 Aventis–Hoechst  
 Marion Roussel,  
 Romainville, France

<sup>3</sup>Unité des *Aspergillus*,  
 Institut Pasteur,  
 Paris, France

## Proteome analysis of *Aspergillus fumigatus* identifies glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins associated to the cell wall biosynthesis

Previous studies in *Aspergillus fumigatus* (Mouyna I., Fontaine T., Vai M., Monod M., Fonzi W. A., Diaquin M., Popolo L., Hartland R. P., Latgé J.-P., *J. Biol. Chem.* 2000, 275, 14882–14889) have shown that a glucanosyltransferase playing an important role in fungal cell wall biosynthesis is glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchored to the membrane. To identify other GPI-anchored proteins putatively involved in cell wall biogenesis, a proteomic analysis has been undertaken in *A. fumigatus* and the protein data were matched with the yeast genomic data. GPI-anchored proteins of *A. fumigatus* were released from membrane preparation by an endogenous GPI-phospholipase C, purified by liquid chromatography and separated by two-dimensional electrophoresis. They were characterized by their peptide mass fingerprint through matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight (MALDI-TOF)-mass spectrometry and by internal amino acid sequencing. Nine GPI-anchored proteins were identified in *A. fumigatus*. Five of them were homologs of putatively GPI-anchored yeast proteins (Csa1p, Crh1p, Crh2p, Ecm33p, Gas1p) of unknown function but shown by gene disruption analysis to play a role in cell wall morphogenesis. In addition, a comparative study performed with chitin synthase and glucanosyl transferase mutants of *A. fumigatus* showed that a modification of the growth phenotype seen in these mutants was associated to an alteration of the pattern of GPI-anchored proteins. These results suggest that GPI-anchored proteins identified in this study are involved in *A. fumigatus* cell wall organization.

**Keywords:** Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins / Proteomics / Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis / Mass spectrometry / *Aspergillus fumigatus* / Cell wall EL 4538

### 1 Introduction

Glycosylphosphatidylinositol (GPI) proteins anchored to the plasma membrane are known to play a role in fungal morphogenesis and cell wall organization. Two types of functions have been assigned to these proteins depending on their localization in the cell wall. First, numerous reports have shown that GPI-mannoproteins are bound covalently to cell wall polysaccharides in yeast [1–4]. These mannoproteins are linked to the cell wall  $\beta$ -1,6-glucan through a remnant of their GPI-anchor encompassing the ethanolamine-phosphate moiety and several mannose residues [5, 6]. These proteins have a biological

function such as filamentation, mating, flocculation, or adhesion to the external matrix which requires their localization at the cell surface [7–9]. Their covalent association with the polysaccharides is a way for the proteins to reach and stay at the cell surface. The role of these proteins in maintaining the cell wall shape remains debatable since deletion mutants grow equally well as the parental strain [4]. Second, GPI-bound proteins can display enzymatic properties playing an active role in cell wall biosynthesis. A family of  $\beta$ -1,3-glucanosyltransferases encoded by GPI-proteins has been identified in *Aspergillus fumigatus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, and *Candida maltosa* [10–17]. Gene disruption experiments have shown that this enzymatic activity, that is responsible for the elongation of the cell wall  $\beta$ -1,3-glucans, was essential for mould and yeast morphogenesis.

With the exception of the  $\beta$ -1,3-glucanosyltransferase mentioned above, other enzymes involved in the remodeling of the neosynthesized polysaccharides are unknown. The location in the periplasmic space of GPI-proteins make them ideal candidates for such function and

**Correspondence:** Dr. Jean-Michel Bruneau, Infectious Disease Group, Biochemistry Department, Aventis–Hoechst Marion Roussel, 102 route de Noisy 93235 Romainville Cedex, France  
**E-mail:** jean-michel.bruneau@aventis.com  
**Fax:** +33-(0)-1-4991-3116

**Abbreviations:** CRD, cross reacting determinant; GPI, glycosylphosphatidylinositol; OG, octylglycoside; Q, quadrupole; PCMPSA, *p*-chloromercuriphenylsulfonic acid; PLC, phospholipase C; SB3-10: *N*-decyl-*N,N*-dimethyl-3-ammonio-1-propane-sulfonate

\* J.-M. B. and T. M. contributed equally to this paper



prompted us to identify as many GPI-anchored proteins as possible in our model organism, *A. fumigatus*, using a selective proteomics approach. Membrane-bound proteins are not usually amenable to 2-D electrophoresis [18, 19]. To identify membrane-bound GPI-proteins, we have taken advantage of the fact that upon cleavage by a GPI-specific phospholipase C (GPI-PLC), GPI-anchored proteins are released in a soluble form and the terminal anchor is transformed into the so-called cross-reacting determinant (CRD), an inositol 1,2-cyclic phosphate containing structure [20]. Antibodies reacting specifically with this structure have been used to trace the presence of released GPI-anchored proteins. In this report, we show the identification of nine different GPI-anchored proteins in *A. fumigatus* and compare their sequence to the genomic databases in view to identify GPI-anchored proteins common to yeast and filamentous fungi which could have a role in cell wall morphogenesis.

## 2 Materials and methods

### 2.1 Strains and fungal cultures

CBS 144-89 and LAR 2965B2 strains are clinical isolates of *A. fumigatus*. The construction of cell wall mutants  $\Delta$ CHSE/ $\Delta$ CHSG and  $\Delta$ GEL1/ $\Delta$ GEL2 will be reported elsewhere (Mellado *et al.*, manuscript in preparation; Mouyna *et al.*, manuscript in preparation). Flasks containing 50 mL of Sabouraud liquid medium (2% glucose, 1% mycopeptone; Biokar, Beauvais, France) were inoculated and shaken for 3 days at 200 rpm at 25°C. These precultures were then inoculated into a 2 L fermenter (LSL Biolaffitte SA, Saint-Germain en Laye, France) containing 1.2 L Sabouraud liquid medium. Cultures were performed at 25°C for 24 h with an agitation of 500 rpm and an aeration of 0.5 L air per min. The mycelium was then collected by paper filtration under vacuum and extensively washed with water before use.

### 2.2 Preparation of the anti-CRD polyclonal antibodies

Hy/Cr rabbits (Charles River France) were immunized by subcutaneous injection of 1 mg of sVSG protein (provided by M.A. Ferguson; [21]) in Freund's complete adjuvant. One boost injection was done after 2 weeks with 0.5 mg sVSG in Freund's incomplete adjuvant. Bleeding of the rabbit was done 3 weeks after the last immunization and anti-CRD antibodies were purified by affinity chromatography on a sVSG column prepared by coupling of the protein on CNBr activated Sepharose CL-4B (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) according to the

specifications of the manufacturer. The purified antibodies fractions were assayed by Western blotting and immunodetection as described below.

### 2.3 Preparation of *A. fumigatus* membranes and purification of CRD-positive proteins

#### 2.3.1 Preparation of *A. fumigatus* membranes

Mycelium was resuspended (0.3 g fresh weight mL<sup>-1</sup>) in a 200 mM Tris-HCl buffer, pH 8, containing 50 mM EDTA, 1 mM PMSF, and disrupted for 3 min in a CO<sub>2</sub>-cooled MSK homogenizer (B. Braun Biotech, Bailly, France) with 1 mm-diameter glass beads. Cell walls were removed by centrifugation at 4000 × *g* for 15 min at 4°C. The supernatant was centrifuged at 100 000 × *g* for 1 h at 4°C. The membrane pellet was homogenized in a 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.5, containing 5 mM EDTA, 0.5 mM PMSF, 1 mM DTT using a glass-glass potter and immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until used. When required, 5 mM *p*-chloromercuriphenylsulfonic acid (PCMPSA) was added to buffers to prevent GPI-PLC driven cleavage of GPI-anchor during the extraction procedure.

#### 2.3.2 Solubilization of CRD-positive proteins

Membranes were thawed and  $\beta$ -*n*-octylglucopyranoside and PMSF were added to reach a final concentration of 1% and 0.5 mM respectively. A 30 min–1 h incubation at room temperature released GPI-anchored proteins from the membrane homogenate. The preparation was ultracentrifuged at 100 000 × *g* for 1 h at 4°C and the supernatant was used for CRD-positive protein purification.

#### 2.3.3 CRD-positive protein purification

Solubilized proteins from the previous step were diluted fivefold with a buffer containing 25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7, 5 mM EDTA (buffer B) with 0.5 M (NH<sub>2</sub>)SO<sub>4</sub> added to it (buffer A). This solution was loaded onto a previously equilibrated (buffer A) 25 mL Octyl Sepharose column (Sigma, St. Louis, MO, USA) at a flow rate of 0.5 mL min<sup>-1</sup> and optical density at 280 nm was recorded. Fractions were collected as soon as proteins begun to exit from the column (flow-through fraction). After a wash with buffer A followed by a wash with buffer B until optical density returned to the baseline, bound material was eluted by means of a 30 min linear gradient at 0.5 mL min<sup>-1</sup> from buffer B to 50% ethylene glycol in the same buffer. Eluted proteins were collected and saved for further treatment (ethylene glycol eluate). The flow-

through fraction, containing most of the CRD-positive proteins, was dialyzed extensively against water (four dialysis bath changes) and freeze-dried using a Heto Drywinner 6-55 freeze dryer (Fisher Bioblock Scientific, Ulkirch, France). Since the ethylene glycol eluate contained low amount of proteins, material was accumulated from four identical experiments and processed in an identical manner as compared to the flow-through fraction.

## 2.4 Electrophoresis separation

For SDS-PAGE (1-D) separation, protein samples were solubilized in reducing sample buffer (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 3% SDS, 5%  $\beta$ -mercaptoethanol, 10% glycerol) and heated for 5 min at 100°C. Proteins were separated on a 8% acrylamide Tris-glycine polyacrylamide gel from Novex (Invitrogen, Leek, The Netherlands). For 2-D electrophoresis, freeze-dried purified proteins were solubilized in 1 mL of sample buffer containing 6 M urea (Merck, Darmstadt, Germany), 2 M thiourea (BioRad, Richmond, CA, USA), 4 mM tributylphosphine (Acros Organic, Geel, Belgium), 2% CHAPS, 2% SB 3–10, 0.5% Immobilines pH 4–6.5 (Pharmacia, Uppsala, Sweden), and a trace of bromophenol blue. Any insoluble material was removed by centrifugation at 10 000  $\times g$ . This sample was used to rehydrate 180  $\times$  3  $\times$  0.5 mm Immobiline dry strips pH 3–10 NL or pH 4–7 (IPG strips; Amersham Pharmacia Biotech) in an IPGPhor system (Amersham Pharmacia Biotech) for 10 h at 50 V. Isoelectrofocusing separation was carried out using the following programming steps: gradient from 50 to 500 V in 1 h, gradient from 500 to 1000 V in 1 h, gradient from 1000 to 3000 V in 1 h, hold at 8000 V to achieve a total migration of 100 kVh. IPG-strips were then equilibrated in 50 mM Tris-HCl, pH 8.3, 6 M urea, 2 M thiourea, 30% glycerol, 2% SDS (equilibration buffer) containing 1% DTT for 10 min followed by equilibration buffer containing 2.5% iodoacetamide and a trace of bromophenol blue for 10 min. Equilibrated IPG-strips were loaded on the top of Excel-Gel 12–14% acrylamide (Amersham Pharmacia Biotech) and the second dimension was done according to the specifications of the manufacturer. 2-D gels were either stained with 0.2% Coomassie blue or transferred to nitrocellulose for Western blotting.

## 2.5 Western blotting

After 1-D electrophoresis separation, proteins were transferred to ECL nitrocellulose (NC) membranes (Amersham Pharmacia Biotech) using the Novex X Cell II blot module (Invitrogen) in the conditions recommended by the manufacturer. Transfer of 2-D gels was performed in a Nova Blot system (Amersham Pharmacia Biotech) at a constant

current of 0.8 mA cm<sup>-2</sup> of membrane for 2 h. The NC membrane was then incubated for 2 h at room temperature or overnight at 4°C in a blocking solution containing 5% non-fat dry milk (Life Technologies, Paisley, Scotland) and 0.05% Tween 20 in phosphate-buffered saline (PBS; Life Technologies). After two washes with 0.05% Tween 20 in PBS to remove proteins in excess, the membrane was then incubated for 1 h at room temperature in a solution containing a 1:75 dilution in PBS, 0.05% Tween 20 of an anti-CRD purified antiserum (see above). The NC membrane was washed three times in PBS, 0.05% Tween 20 (10 min each) and incubated for 1 h at room temperature in a solution containing a 1:2500 dilution in PBS, 0.05% Tween 20 of a donkey anti-rabbit IgG-horseradish peroxidase conjugate (Amersham Pharmacia Biotech). Bound antibodies were detected using the enhanced chemiluminescence (ECL) reagents and autoradiography on ECL-Hyperfilm (Amersham Pharmacia Biotech). Pre-stained proteins were used for calibration (Full range Rainbow; Amersham Pharmacia Biotech).

## 2.6 Protein identification and searches in sequence databases

Coomassie blue stained gels images were acquired using a Personal Densitometer SI (Amersham Pharmacia Biotech). Molecular weight and isoelectric point of protein spots were determined through calculation by comparison with a molecular weight standard (standard MARK 12; Novex, San Diego, CA, USA) loaded on one edge of each gel, and the theoretical pH gradient shape of IPG strips, respectively, using the Melanie3 2D electrophoresis imaging software (GeneBio).

### 2.6.1 In-gel digestion of protein spots

Coomassie blue stained protein spots which were CRD-positive, were excised from the gels and cut in approximately 1 mm<sup>2</sup> pieces. In-gel digestion by bovine trypsin (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) was done in a Digest Pro workstation (Abimed, Langenfeld, Germany). Gel slices were washed for 10 min with acetonitrile followed by a 10 min rehydration by 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>. This step was repeated twice. Proteins were then reduced at 37°C for 30 min, washed with acetonitrile for 10 min (room temperature), and alkylated for 15 min using 10 mM dithiothreitol and 50 mM iodoacetamide, respectively. After three 10-min acetonitrile washes, the temperature was set at 37°C and gel slices were dried under a nitrogen flux. Gel pieces were then rehydrated by a 25  $\mu$ g/mL solution of bovine trypsin in 0.01% TFA (10 min) followed by 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (15 min). Excess of protease was removed and 25 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> was added to cover the

gel pieces. Digestion was allowed to proceed for 6 h. Peptides were then extracted by two acetonitrile incubations (15 min), followed by three extractions by 10% formic acid (10 min) and acetonitrile (15 min) at room temperature. Peptides extracts were pooled and dried under vacuum in a speed-vac centrifuge (Savant Instruments, Holbrook, NY, USA). For Edman sequencing of internal peptides, in-gel digestion by Lys-C (Roche Diagnostics), separation of peptides by microbore reversed-phase HPLC and *N*-terminal sequencing of peptides was performed as previously described [22].

### 2.6.2 Desalting of samples and mass spectrometry analysis of tryptic digests

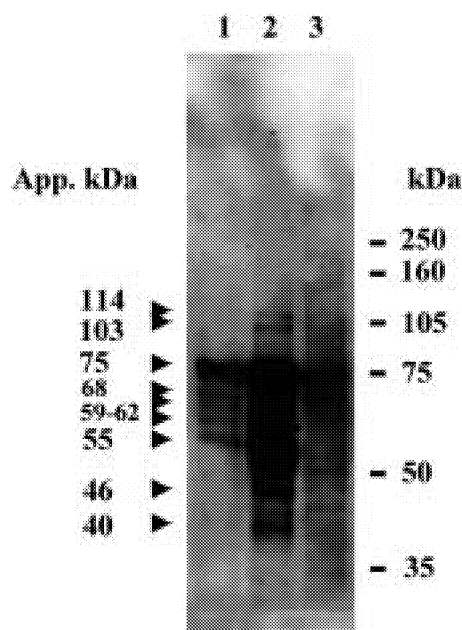
Peptides were solubilized by 10  $\mu$ L of 2% formic acid and loaded on a previously equilibrated (50% acetonitrile followed by 2% formic acid) ZipTip C18 pipette tips (Millipore, Bedford, MA, USA). Tips were washed with 2% formic acid and peptides were eluted using 10  $\mu$ L of a solution containing 60% acetonitrile, 2% formic acid in water. 0.5  $\mu$ L of sample was mixed with 0.5  $\mu$ L of MALDI matrix (saturated solution of dihydroxybenzoic acid) on the MALDI-TOF target and allowed to dry. MALDI-TOF-MS spectra were acquired and recorded with a Voyager DE-STR mass spectrometer (PerSeptive Biosystems, Framingham, MA, USA) using an accelerating voltage of 21 kV in the reflector mode. When necessary, residual peptide samples were used to obtain amino acid sequences information. For nano-ES-MS/MS, samples were infused using the nanoelectrospray source kit (Protona A/S, Odense, Denmark) for the Finnigan TSQ 7000 (ThermoQuest, Austin, TX, USA). Samples were resuspended in 5  $\mu$ L of water, 50% methanol, 0.5% formic acid and sprayed at 0.6–0.7 kV. Under these conditions, MS/MS was done on the doubly charged protonated molecules using argon (2.5 millitorr) as collision gas at 20–38 eV. Scan accumulation was done until sufficient signal was obtained. Quadrupole (Q)-TOF-MS/MS analysis was done in a similar way using a Q-TOF2 system (Micromass, Manchester, England) except that doubly, triply or quadruply charged ions were obtained. Transformation of multicharged-spectra into monocharged spectra was done with the Maxent 3.0 program (Micromass) and interpretation of data was done using the Pepseq program [23] included in the Biolynx software (Micromass). MALDI-TOF-MS and MS/MS data were matched against the NCBI nr and the Genome Therapeutics Corporation Pathogenome databases using the MS-Fit and MS-Seq and/or MS-Edman programs (assembled into the Protein Prospector package. Baker, P. R. and Clauser, K. R. <http://prospector.ucsf.edu>), respectively, over an intranet connection. Searches were done over the

full molecular weight and isoelectric point range in order to have the best chance to identify the proteins. Concerning MS-Fit, mass accuracy was set at  $\pm 50$  ppm for most MALDI-TOF analysis (internal calibration was done with trypsin autolysis generated ions). Possible post-translational and chemical modifications such as oxidation of methionine, *N*-terminal acetylation, *N*-terminal pyroglutamic acid, carbamidomethylation of cysteine, and modification of cysteine by acrylamide, were taken into consideration for the queries. Protein sequences homologies were determined using the Wisconsin analysis Package version 10.1 from the Genetics Computer Group (Madison, WI, USA) through the SeqWeb Version 1.2 interface.

## 3 Results

### 3.1 Purification of CRD-positive proteins and separation by 2-D electrophoresis

Previous studies have shown that membrane preparations of *A. fumigatus* contained GPI-anchored proteins that can be labeled specifically with anti-CRD antibodies after cleavage by exogenous GPI-phospholipase C [11]. Incubation of *A. fumigatus* membrane preparations for 1 h at room temperature in a Tris-EDTA-PMSF-DTT buffer resulted in the release of CRD-positive protein bands (Fig. 1). The number and amount of proteins labeled by the anti-CRD antibodies was highly increased after incubation of the membrane preparations for 30 to 60 min with 1% octylglucoside (OG) (Fig. 1). This increase was due to the activation of an endogenous GPI-PLC of *A. fumigatus* since: (i) known inhibitors of phosphatidylinositol specific (PI)-PLC such as PCMPSA (5 mM) or HgCl<sub>2</sub> (1 mM) blocked the release of these CRD-positive proteins and (ii) similar Western blot patterns were obtained when a crude membrane preparation of *A. fumigatus* was incubated with bacterial commercial PI-PLC from *Bacillus thuringiensis* (data not shown). The optimal concentration of OG was 1% although 0.5% was also effective in increasing the signal compared to the untreated membranes. GPI-PLC activation was not detergent-specific since other nonionic detergents such as Triton X-100 at a concentration of 0.1% stimulated also the release of CRD-positive proteins, although less effectively (data not shown). SDS-PAGE 1-D gels showed that major CRD-positive signals were obtained for proteins with apparent molecular masses between 114 and 40 kDa. Since the soluble fraction of the OG-treated membrane preparation contained also numerous CRD-negative proteins, purification of CRD-positive proteins was carried out. Hydrophobic interaction liquid chromatography using Octyl-Sepharose was the most efficient procedure to separate GPI-



**Figure 1.** Presence of GPI-anchored proteins and of a GPI-phospholipase C activity in membrane preparations of *A. fumigatus*. 16  $\mu$ L of a microsomal membrane preparation were incubated at room temperature for 1 h in the conditions described below. The mixture was centrifuged and 5  $\mu$ L of supernatant (36  $\mu$ g protein) was diluted twice with 2 $\times$  reducing SDS sample buffer, boiled for 5 min, and loaded on a 8% Tris-glycine polyacrylamide gel. Proteins were transferred to nitrocellulose and immunodetection was done with the affinity-purified anti-CRD antiserum as described in the experimental procedures. Following ECL detection, the film was exposed for 10 min. Lane 1, membranes alone; 2, membranes in the presence of 1% *n*-OG; 3, membranes in the presence of 1% *n*-OG and 5 mM PCMPA. Molecular weights are indicated on the right and arrow heads indicate the position of the major signals. Calculated molecular masses of these proteins are noted on the left as apparent kDa (App. kDa).

anchored proteins from the bulk of membrane proteins. The majority of CRD-positive proteins was not retained on the column or was eluted during the low-ionic-strength wash, and only two of them, with molecular masses of 103 and 114 kDa, were eluted during an ethylene glycol gradient.

Further separation of GPI-proteins that did not bind to Octyl-Sepharose, was achieved by 2-D electrophoresis. In early experiments, separations by 2-D electrophoresis were done using nonlinear pH 3–10 gradient for the first dimension, and premade 12–14% acrylamide gradient gels for the second dimension. All CRD-positive proteins were located in the acidic separation part of the gel (data not shown). Therefore, subsequent separations were

done in pH 4–7 18 cm IPG strips for the first dimension. An example of pH 4–7 separation is shown in Fig. 2. Nineteen CRD-positive spots (Fig. 2A) could be matched with Coomassie blue stained protein spots on the original gels (Fig. 2B). The pattern, in terms of size separation, was similar to the one previously obtained in 1-D SDS-PAGE (see Fig. 1 for comparison). However, the 40 and 45 kDa signals observed in 1-D SDS-PAGE were missing suggesting that some protein degradation or cleavage of the GPI-anchor occurred during the purification steps. IEF separation shows a number of horizontally aligned spots indicating that more than a single polypeptide was present at a given molecular weight, some of them being likely isoforms of the same protein. The latter was particularly true for the 75 kDa signal, which was made of eight regularly spaced protein spots.

### 3.2 Identification of the Octyl-Sepharose unbound CRD-positive proteins

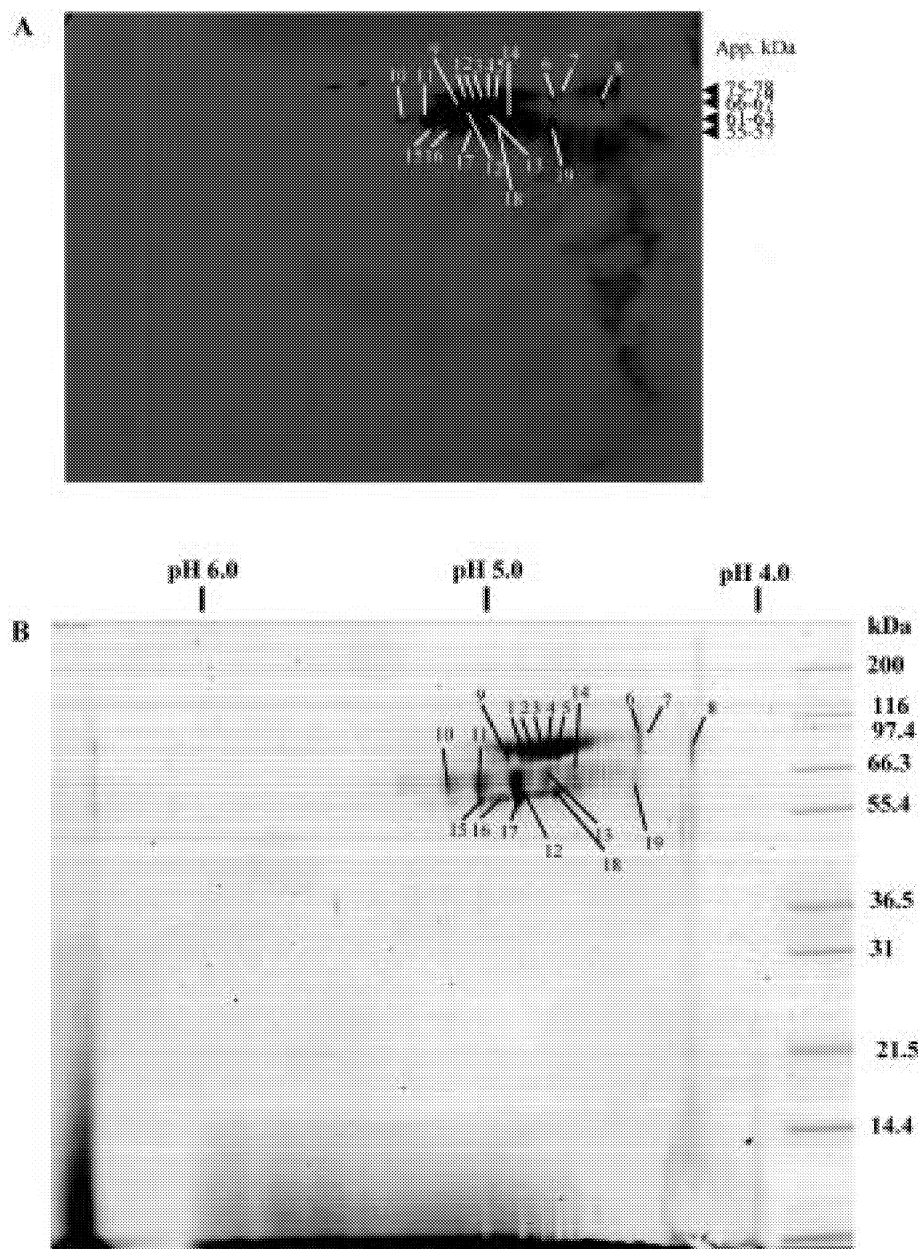
Identification of the different GPI-anchored proteins separated by 2-D electrophoresis (Fig. 2) is shown in Table 1. The same CRD-positive protein pattern was seen when two different wild-type mutants (CBS 144-89 and LAR 2965B2) were analyzed, showing that the proteins identified were representative of the *A. fumigatus* species and not of a peculiar strain (data not shown).

#### 3.2.1 Spots 1-5

These five spots matched with the most abundant CRD-positive protein that had a molecular mass of 75 kDa. The major polypeptide (spot 5) was subjected to Lys-C endoprotease digestion and *N*-terminal Edman sequencing of the purified peptides. Two of the peptides yielded the sequences (K)HNPLVLYDSVTK and (K)TGYVNYDVDT. When matched to the NCBI nr database, similarities with the *Penicillium chrysogenum* (accession P37274; [24]) and *Aspergillus niger* (accession P34724; [25]) phosphate-repressible acid phosphatase gene product PhoAp were found. Five protein spots among the eight migrating at the same molecular mass were analyzed by nano-ES-MS/MS. All the spots (spots 1–5) corresponded to the *A. fumigatus* PhoA protein, suggesting that all these eight polypeptides were isoforms of the same protein (Table 1).

#### 3.2.2 Spots 6, 7

Two proteins migrating at a slightly higher molecular mass than PhoAp (78 kDa) with isoelectric points of 4.43 and 4.39 (Table 1) were unambiguously matched with an already known *A. fumigatus* allergen named rAsp f9 ([26];



**Figure 2.** 2-D electrophoresis separation of proteins present in the flow-through fraction of the Octyl-Sepharose column. Proteins were separated in pH 4–7 IPG-strips for the first dimension and in acrylamide 12–14% gradient gels for the second dimension as described in the experimental procedures. (A) Separated proteins were transferred to nitrocellulose and immunodetection was done with anti-CRD antiserum and autoradiography after revelation with a horseradish peroxidase (HRP)-conjugate. Following ECL detection, the film was exposed for 1 min. Arrow heads on the right indicate the correspondence of the CRD-positive signals found also on 1-D separation together with the calculated apparent molecular masses (App. kDa). (B) Coomassie blue staining of a gel done in the same conditions than in (A). Protein spots that were visible on both images are labeled from 1 to 19 and indicated with an arrow. Molecular masses are indicated on the right.

GenBank accession no. AJ223327). This protein displayed 46% identity with the *Saccharomyces cerevisiae* CRH1/YGR189C gene product, a putative GPI cell wall protein [27, 28]. The calculated isoelectric point of Crh1p (4.56) was similar to the one calculated from spot 6 migration. In contrast, the 53 kDa molecular mass calculated upon the sequence of Crh1p was much lower than the one obtained with its ortholog in *A. fumigatus*. The increase in molecular mass between the observed *A. fumigatus* homolog and the calculated molecular mass of the *S. cerevisiae* Crh1p may result from the presence of *N*- and *O*-glycans attached to this protein. Indeed

Crh1p contains three potential *N*-glycosylation sites as well as a Ser- and Thr-rich C-terminal region, a typical feature of highly *O*-glycosylated proteins.

### 3.2.3 Spot 8

Only two amino acid sequences were obtained from peptides derived from spot 8 migrating between 67 and 75 kDa. One sequence was unambiguously matched with a pathogenome incomplete entry that showed 32 and 35% identity at the nucleotide level with a *Cocci-*

**Table 1.** Identification of the CRD-positive proteins separated by 2-D electrophoresis

Spot <sup>a)</sup> no.	Exp. <sup>a)</sup> <i>M<sub>r</sub></i>	Exp. pI <sup>a)</sup>	MS-Fit output <sup>b)</sup>		Calc. <i>M<sub>r</sub></i> <sup>c)</sup>	Calc. pI <sup>c)</sup>	MS/MS <sup>d)</sup>		MS-Seq/MS-Edman results <sup>e)</sup>	
			Nb pep. matched/ total	Seq. cover.			Sequence tag	Method	Name	
1	75 000	4.87					YSPV ...	ES-MS/MS	PA7501739816: homologies with <i>P. chrysogenum</i> / <i>A. niger</i> PhoA	
2	75 000	4.84					KHNPLV(LYD)SVTK	ES-MS/MS	PA7501739816	
3	75 000	4.80					(SP)VSNVEGVA(FNR)	ES-MS/MS	PA7501739816	
							TGYVNYDVD ...	ES-MS/MS	PA7501739816	
4	75 000	4.76					TGYVNYDVDTTNCR	ES-MS/MS	PA7501739816	
5	75 000	4.73					KHNPLVLYDSVTK	ES-MS/MS	PA7501739816	
6	78 000	4.43	13/45	35%	32 318	4.63	LGSWAGGD(PSN) ...	ES-MS/MS	NCBI 2979890 rAspF9 <i>A. fumigatus</i>	
							FPQTPMR	ES-MS/MS	NCBI 2979890	
							DPQNTGI/LI/LAQSQQFK	Q-TOF-MS	Not found	
							( ) SSVSSD	Q-TOF-MS	NCBI6321628 Crh1p of <i>S. cerevisiae</i>	
7	78 000	4.39	8/12	23%	32 318	4.63	(VP)VG(PQ)G(AEFTV)AK	ES-MS/MS	PA7501803123: rAspF9 <i>A. fumigatus</i>	
							TLTY ...	ES-MS/MS	PA7501803131: rAspF9 <i>A. fumigatus</i>	
							LGSWAGGD(PSN)(PK)	ES-MS/MS	PA7501803131	
							I/LV VASSAPK	ES-MS/MS	Not found	
8	67 000	4.23					NTGI/LI/LAQV ...	Q-TOF-MS	Not found	
							CLCSQANYGYGIR	ES-MS/MS	PA7501939934: homologies with <i>Csa1p C. albicans</i>	
9	66 000	4.8–4.9	10/17	21%	52 305	4.64	LSFVMoxNQYYK	Q-TOF-MS	PA7501832353 Epd1 homolog	
							(AD)PAW ...	Q-TOF-MS	PA7501832353	
							(AD)PAWNTDLYKR	Q-TOF-MS	PA7501832353	
							(SS)LLVGYATDDD ...	Q-TOF-MS	PA7501832353	
10	61 000	5.14	Identical fingerprint than spot 11							
11	61 000	5.03					NDELSSIDL ...	ES-MS/MS	PA7501829984: Ecm33p homolog	
12	61 000	4.89					VVTGAVDF ...	ES-MS/MS	PA7501829984	
							VVTGAVDFSGK	ES-MS/MS	PA7501829984	
							DELSSIDL ...	ES-MS/MS	PA7501829984	
							QYMYPQT ...	ES-MS/MS	PA7501914965: Utr2p homolog	
13	62 000	4.77					QYMOxYPQTSPR	ES-MS/MS	PA7501914965	
							SDWVY ...	ES-MS/MS	PA7501914974: Utr2p homolog	
							QYMOxY(PQT)PSR	ES-MS/MS	PA7501914965	
							(QY)MY ...	ES-MS/MS	PA7501914965	
14	63 000	4.67					QYMY ...	ES-MS/MS	PA7501914965	
15	57 000	5.02	10/10	20%	48 000	4.94		nd	NCBI 3608406: Gel1p	
16	57 000	4.94	Identical fingerprint than spot 14					nd		
17	57 000	4.88	17/27	36%	48 000	4.94	FKELG ...	ES-MS/MS	NCBI 3608406	
							GPGFAGP(GSQD)R	ES-MS/MS	NCBI 3608406	

**Table 1.** Continued

Spot <sup>a)</sup> no.	Exp. <sup>a)</sup> <i>M<sub>r</sub></i>	Exp. <i>pI</i> <sup>a)</sup>	MS-Fit output <sup>b)</sup>		Calc. <i>M<sub>r</sub></i> <sup>c)</sup>	Calc. <i>pI</i> <sup>c)</sup>	MS/MS <sup>d)</sup>		MS-Seq/MS-Edman results <sup>e)</sup>	
			Nb pep. matched/ total	Seq. cover.			Sequence tag	Method	Name	
18	57 000	4.74	8/10	15%	48 000	4.94	ELPD ...	ES-MS/MS	NCBI 3608406	
							TSG ...	ES-MS/MS	NCBI 3608406	
							GNA ...	ES-MS/MS	NCBI 3608406	
							GPGFAGPGSQDR	ES-MS/MS	NCBI 3608406	
19	55 000	4.45					TQVLSSSGSF ...	ES-MS/MS	PA7501727705: Unknown protein	
							LOY(PT)SR	ES-MS/MS	PA7501727705	

- a) Experimental molecular weight (Exp. *M<sub>r</sub>*) and isoelectric point (Exp. *pI*) as determined by the protein spots migration in 2-D electrophoresis
- b) Results given by the MS-Fit program when queried with the peptide mass fingerprint of the indicated protein. The number of peptides, among the total used for the query, that matched with the identified protein (Nb pep. Matched) is indicated as well as the sequence coverage (Seq. cover.) of this protein with the matching peptides
- c) Calculated molecular weight (Calc. *M<sub>r</sub>*) and isoelectric point (Calc. *pI*) based on the amino acid sequence of the identified protein
- d) Indicates the MS/MS method used for obtaining amino acid sequence information from the protein as well as the obtained sequence tags. Residues between brackets correspond to nonfragmented ions found in MS/MS spectra. Mox indicates an oxidized methionine, I/L indicates the presence of either a isoleucine or a leucine (isomers) in sequence tags that could not be matched with a sequence present in databases. Although Gln and Lys cannot be discriminated in MS (isobar amino acids), Gln (Q) was chosen when found within a sequence  
nd, not done
- e) The pathogenome (PA) or the NCBI identifier is indicated as well as the name of the protein if known in *A. fumigatus* or the name noted in the sequence annotation. Annotations in pathogenome sequences, were generated by a Blast search of the public databases with the pathogenome entries.

*dioides immitis* immunoreactive cell wall protein named ag2 and the mycelial surface antigen Csa1p of *C. albicans* ([29]; GenBank accession no. AF080221), respectively. The deduced amino acid sequence of Csa1p suggested that the C-terminus contains a core of hydrophobic residues that could function as a GPI-anchoring determinant.

### 3.2.4 Spot 9

As can be seen in Fig. 2A, a CRD-positive train of spots was seen just below the PhoAp signal. This signal accounted for the 68 kDa response obtained in 1-D gels. This protein was identified by Q-TOF-MS/MS as an homolog of Epd1p of *Candida maltosa* (Table 1), a known GPI-anchored membrane protein homologous of the Gelps of *A. fumigatus* [14]. The sequences obtained from this protein were however different from the ones of Gel1p, Gel2p and Gel3p, the three members of the GEL family identified in *A. fumigatus* [12]. This result indicated the presence of a new member of this gene family that we have named Gel4p.

### 3.2.5 Spots 10–11

The major CRD-positive signal at 61 kDa in Fig. 2A was identified as isoforms of an homolog of the *S. cerevisiae* putative GPI-anchored membrane protein Ecm33p [30]. *ECM33/YBR078W* was found during a genetic screen aimed at identifying genes involved in *S. cerevisiae* cell surface biosynthesis and architecture [30]. ECM33 mutant had indeed a disturbed cell wall biosynthesis as shown by increased sensitivity to Calcofluor white and zymolyase [31].

### 3.2.6 Spots 12–14

The three other CRD-positive polypeptides also detected at 61 kDa were isoforms of the putative GPI-cell wall protein Utr2p, although spot 12 consisted in a mixture of Utr2p and Ecm33p homologs. *UTR2/CRH2/YELO40W* belongs to the same gene family than *CRH1* [27]. Interestingly, *CRH1/CRH2* double null mutant was more sensitive to Congo red and Calcofluor white than either single mutant and parental wild type strain and had an increased amount of alkali-soluble glucan [32].

### 3.2.7 Spots 15–18

The CRD-positive response corresponding to protein spots 15, 16, 17, and 18 in Fig. 2B were due to the presence of the GPI-anchored glucanoyltransferase Gel1p previously identified in *A. fumigatus*. Six sequence tags obtained from these different spots matched without any mismatch with this protein. In addition, 36% coverage of the Gel1p sequence was obtained with the peptide mass fingerprint. Gel1p migrates at 57 kDa and isoforms were present between *pI* 4.74 and 5.02. These values were in agreement with those calculated from the sequence data (48 kDa, *pI* 4.78) since it was previously shown that Gel1p was *N*-glycosylated [10, 11]. The identification of this known membrane GPI-anchored protein in our 2-D gels confirmed also the specificity of the immunolabelling with anti-CRD antibodies.

### 3.2.8 Spot 19

Amino acid sequences were obtained from the 55 kDa protein but could not be assigned to known proteins although the two sequences obtained from spot 19 could be matched unambiguously with a Pathogenome database entry (see Table 1).

### 3.3 Identification of the Octyl-Sepharose bound CRD-positive proteins

Ethylene glycol eluates from the Octyl-Sepharose column contained two CRD-positive proteins with apparent molecular masses of 114 and 103 kDa (Fig. 1). Proteins were subjected to 1-D SDS-PAGE and Coomassie blue staining. The amount of the 103 kDa molecule was too low even after four enrichment steps to allow its identification. Two sequence tags obtained from the 114 kDa protein (IQDFDAAGYIDR and ALMNGAGAIK) matched with a Pathogenome entry (PA7501726476) that shared strong homologies with phospholipases from various organisms. Particularly, 76 and 43% identity in a 110 amino acids overlap was found with a phospholipase B from *Penicillium chrysogenum* (accession GenBank X60348; [33]) and Plb3p encoded by the YOL011W gene from *S. cerevisiae* (accession GenBank Z74753; Hughes and Pohl, 1996 unpublished), respectively. Interestingly, the C-terminal region of Plb3p contains a motif for a putative GPI anchor attachment [34].

### 3.4 Comparative analysis of GPI-proteins of *A. fumigatus* wild-type and cell wall mutants

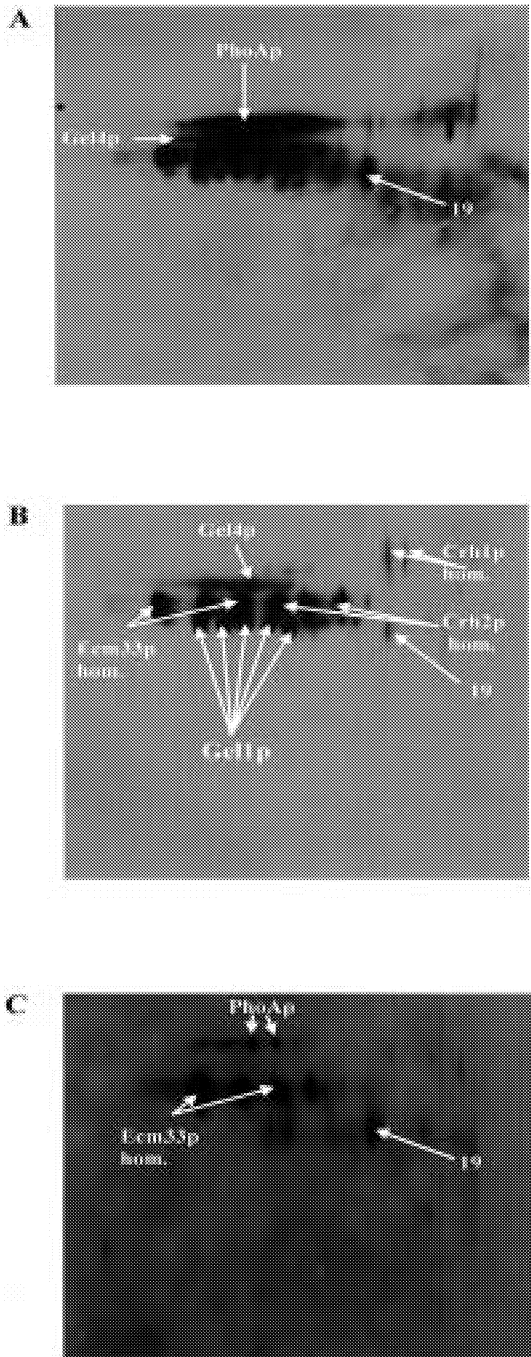
Since it was recently shown that at least some members of the GPI-anchored protein family had a functional role in cell wall biosynthesis [11], it was of interest to investigate the population of CRD-positive proteins present in the membrane of cell wall mutants. The two mutants selected were a double chitin synthase ( $\Delta CHSE/\Delta CHSG$ ) and a double glucanoyltransferase ( $\Delta GEL1/\Delta GEL2$ ) mutants which are the only *A. fumigatus* cell wall mutants which displayed to date the most reduced growth phenotype (Mellado *et al.*, manuscript in preparation; Mouyna *et al.*, manuscript in preparation). The comparison of the patterns of GPI-anchored proteins showed a marked difference between the mutants and the wild-type parental strain (Fig. 3) although the total amount of proteins used for the purification were similar for the mutant and wild-type strains (verified by Coomassie staining in 1-D SDS PAGE, not shown). No additional CRD-positive proteins were detected in both mutants. In contrast, various CRD-positive spots were missing in the membrane preparations of the two mutants. In the  $\Delta CHSE/\Delta CHSG$  mutant, the signal corresponding to PhoAp disappeared almost entirely and the signal corresponding to spots 8 and 19 decreased significantly. The other CRD-positive spots remained unchanged.

Changes were the most pronounced in the  $\Delta GEL1/\Delta GEL2$  double mutant. A global decrease in the CRD signal was apparent in this mutant since the time exposure of the X-ray film had to be highly increased ( $\times 7$ ) to be able to identify CRD-positive proteins when a similar amount of starting material was used for the purification. In spite of this long time exposure, almost all the CRD-positive signals disappeared. The strongest signal was seen for Ecm33p and spot 19. The PhoAp signal was decreased but was comparatively more abundant than in the case of the  $\Delta CHSE/\Delta CHSG$  mutant. The absence of the Gel 1p signal was in agreement with the disruption of *GEL1*. These results showed that cell wall perturbations consecutive to the disruption of the chitin synthase and glucanoyltransferase genes were associated to a modification of the expression or anchoring of GPI-anchored proteins in *A. fumigatus*.

## 4 Discussion

Interest in the study of GPI-bound proteins comes from recent studies showing that GPI-proteins play a role in cell wall biogenesis. Enzymes involved in cell wall bio-





**Figure 3.** 2-D electrophoresis separation patterns comparison of *A. fumigatus* wild-type and mutants extracts. Separation conditions are identical to the ones in Fig. 2A. (A) Wild-type, (B)  $\Delta$ CHSE/ $\Delta$ CHSG mutant, (C)  $\Delta$ GEL1/ $\Delta$ GEL2 mutant. Figures are close views of area of gels containing the protein spots. Film exposure was 1 min for images shown in (A) and (B) and 7 min for the one shown in (C). Spots indicated by an arrow were individually digested by trypsin and analyzed by MS/MS. Ecm33p hom., Crh1p hom., Crh2p hom. stands for homologs of the *S. cerevisiae* corresponding proteins.

synthesis common to both filamentous and yeast pathogens such as *Aspergillus* and *Candida* are ideal targets for the development of new antifungals [35]. Comparing GPI- proteins of *A. fumigatus* to other yeast GPI-proteins has indeed brought a new insight in the understanding of the role of these GPI-proteins in fungal cell wall biosynthesis. In *A. fumigatus*, nine GPI-anchored proteins were identified. Six of these proteins have a putative enzymatic function as shown by comparison with the databases, two  $\beta$ 1-3-glucanosyltransferases (Gel1p and Gel4p), one phosphatase, one phospholipase (Plb3p) and  $\beta$ 1-3 or  $\beta$ 1-3/1-4 glucanases (Crh1p/Crh2p). In contrast, no homolog of the GPI-CWPs putatively covalently bound to *S. cerevisiae* cell wall polysaccharides was identified in *A. fumigatus*. This result is in agreement with an unpublished biochemical study from our laboratory suggesting that no proteins are covalently linked to  $\beta$ 1-3 glucan and chitin in *A. fumigatus* (Bernard *et al.*, manuscript in preparation).

Three members of the Gelp (Gel1-3) family of *A. fumigatus* were already cloned and sequenced [12]. In our membrane preparations, we have identified two members of the Gelp family. One is the already mentioned Gel1p whereas the second one is a new member of the Gelp family, called Gel4p. If the absence of Gel3p in the 2-D pattern was in agreement with its lack of expression under normal growth conditions, it was astonishing to see that Gel2p was not detected in our 2-D gels whereas the gene was transcribed under the growth conditions used in this study [12]. This result indicated that either Gel2p was processed and destroyed through proteolytic cleavage or present in a too low amount to be identified. This result indicated that not all the expressed proteins were identified by our 2-D electrophoresis approach and confirmed the interest to complement a proteome approach by a transcriptome that showed that *GEL2* was indeed transcribed.

Three additional GPI-anchored proteins identified in *A. fumigatus* have been previously described as putatively GPI-anchored and involved in cell wall maintenance in the budding yeast. Ecm33p has been found in genetic screens aimed at identifying genes involved in cell wall biosynthesis (De Groot *et al.*, submitted) [30] and in a genome-wide analysis of disruption phenotypes [31] in *S. cerevisiae*. *ECM33* null mutants displayed Calcofluor white, K1 killer toxin, zymolyase and hygromycin B hypersensitivity as well as a reduced mannose/glucose ratio [30]. Crh1p and Crh2p, although not found in the above-mentioned screens, are considered to be potential glycosidases involved at different stages of the yeast life cycle [32]. In addition, *CRH1* transcription was found to be regulated through the cell integrity

signaling pathway [36] and increased following the disruption of *FKS1*, the putative catalytic subunit of  $\beta$ 1-3 glucan synthase [37].

Three GPI-anchored proteins identified in *A. fumigatus* were not found in *S. cerevisiae*. No homolog was found in databases for the polypeptide of spot 19. Spot 8 is homologous to a cystein-rich hydrophobin Csa1p of *C. albicans* which is preferentially expressed during the mycelial growth phase [29] and is restricted to the sites of cell surface elongation. The major GPI-anchored protein present in *A. fumigatus* membrane fraction is a homolog of the acid-phosphatase PhoAp from *Penicillium chrysogenum* and *A. niger* [24]. An acid-phosphatase, Pho610, has been described to be cell wall associated in the yeast *Kluyveromyces marxianus* [38]. A 46% amino acids identity was found between Pho610 and the phosphate repressible acid-phosphatase PhoA from *P. chrysogenum*. In addition, Pho610 was found to be GPI-anchored. This suggests a similarity between the *A. fumigatus* PhoAp found in this study and the *Kluyveromyces* enzyme.

This proteome study in *A. fumigatus* suggests that GPI-anchored proteins common to both yeast and filamentous fungi such as CRHs and ECM33 could play a similar enzymatic role in the construction of the fungal cell wall of both yeast and moulds since (i) membrane enzymes involved in cell wall biosynthesis such as *FKS*, *CHS*, *AGS*, *GEL*, have a very conserved function among yeast and moulds, and (ii) the structure of the polysaccharidic core of filamentous fungi and yeasts is very conserved [2, 39]. Disruption of the genes encoding these GPI-proteins in *A. fumigatus* and production of recombinant proteins are presently undertaken to investigate the enzymatic role of these GPI-anchored proteins in the organization of the cell wall of *A. fumigatus*.

*The authors are very grateful to J.-P. Le Caer and V. Labas from the Ecole Supérieure de Physique et de Chimie Industrielle, Paris, France, for conducting MALDI-TOF and Q-TOF-MS/MS measurements, and J. Dalayer, from Institut Pasteur, Paris, France, for Edman sequencing experiments. We also thank N. Jiwani and C. Lorbert for installing and maintaining the bioinformatics tools and databases on the Aventis Hoechst Marion Roussel intranet.*

Received January 22, 2001

## 5 References

- [1] Kapteyn, J. C., Montijn, R. C., Vink, E., de la, C. J., Llobell, A., Douwes, J. E., Shimoi, H., Lipke, P. N., Klis, F. M., *Glycobiology* 1996, 6, 337–345.
- [2] Kollar, R., Reinhold, B. B., Petrakova, E., Yeh, H. J., Ashwell, G., Drgonova, J., Kapteyn, J. C., Klis, F. M., Cabib, E., *J. Biol. Chem.* 1997, 272, 17762–17775.
- [3] Lu, C. F., Montijn, R. C., Brown, J. L., Klis, F., Kurjan, J., Bussey, H., Lipke, P. N., *J. Cell. Biol.* 1995, 725, 333–340.
- [4] van der Vaart, J. M., Caro, L. H., Chapman, J. W., Klis, F. M., Verrips, C. T., *J. Bacteriol.* 1995, 177, 3104–3110.
- [5] Fujii, T., Shimoi, H., Iimura, Y., *Biochim. Biophys. Acta* 1999, 1427, 133–144.
- [6] Wojciechowicz, D., Lu, C. F., Kurjan, J., Lipke, P. N., *Mol. Cell Biol.* 1993, 13, 2554–2563.
- [7] McCormak, B. P., Ghorri, N., Falkow, S., *Science* 1999, 285, 578–582.
- [8] Hoyer, L. L., *Trends Microbiol.* 2001, 9, 176–180.
- [9] Guo B., Styles C. A., Feng, Q., Fink, G. R., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000, 97, 12158–12163.
- [10] Hartland, R. P., Fontaine, T., Debeauvais, J. P., Simenel, C., Delepierre, M., Latge, J. P., *J. Biol. Chem.* 1996, 271, 26843–26849.
- [11] Mouyna, I., Fontaine, T., Vai, M., Monod, M., Fonzi, W. A., Diaquin, M., Popolo, L., Hartland, R. P., Latge, J. P., *J. Biol. Chem.* 2000, 275, 14882–14889.
- [12] Mouyna, I., Monod, M., Fontaine, T., Henrissat, B., Lechenne, B., Latge, J. P., *Biochem. J.* 2000, 347, 741–747.
- [13] Muhlschlegel, F. A., Fonzi, W. A., *Mol. Cell Biol.* 1997, 17, 5960–5967.
- [14] Nakazawa, T., Horiuchi, H., Ohta, A., Takagi, M., *J. Bacteriol.* 1998, 180, 2079–2086.
- [15] Nakazawa, T., Takahashi, M., Horiuchi, H., Ohta, A., Takagi, M., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2000, 64, 369–377.
- [16] Saporito-Irwin, S. M., Birse, C. E., Sypher, P. S., Fonzi, W. A., *Mol. Cell Biol.* 1995, 15, 601–613.
- [17] Popolo, L., Vai, M., Gatti, E., Porello, S., Bonfante, P., Balestrini, R., Alberghina, L., *J. Bacteriol.* 1993, 175, 1879–1885.
- [18] Molloy, M. P., *Anal. Biochem.* 2000, 280, 1–10.
- [19] Wilkins, M. R., Gasteiger, E., Sanchez, J. C., Bairoch, A., Hochstrasser, D. F., *Electrophoresis* 1998, 19, 1501–1505.
- [20] Zamze, S. E., Ferguson, M. A., Collins, R., Dwek, R. A., Rademacher, T. W., *Eur. J. Biochem.* 1988, 176, 527–534.
- [21] Cardoso de Almeida, M. L., Turner, M. J., *Nature* 1983, 302, 349–352.
- [22] Bruneau, J. M., Yea, C. M., Spinella-Jaegle, S., Fudali, C., Woodward, K., Robson, P. A., Sautes, C., Westwood, R., Kuo, E. A., Williamson, R. A., Ruuth, E., *Biochem. J.* 1998, 336, 299–303.
- [23] Rozenski J., Samson I., Janssen G., Busson R., Van Aerschot A., Herdewijn P., *Org. Mass Spectrom.* 1994, 29, 654–658.
- [24] Haas, H., Redl, B., Friedlin, E., Stoffler, G., *Gene* 1992, 113, 129–133.
- [25] Ehrlich, K. C., Montalbano, B. G., Mullaney, E. J., Dischinger, H. C. Jr., Ullah, A. H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1994, 204, 63–68.
- [26] Cramer R., *Int. Arch. Allergy Immunol.* 1998, 115, 99–114.
- [27] Caro, L. H., Tettelin, H., Vossen, J. H., Ram, A. F., van den, E. H., Klis, F. M., *Yeast* 1997, 13, 1477–1489.
- [28] Rodriguez-Pena, J. M., Cid, V. J., Sanchez, M., Molina, M., Arroyo, J., Nombela, C., *Yeast* 1998, 14, 853–860.
- [29] Lamarre, C., Deslauriers, N., Bourbonnais, Y., *Mol. Microbiol.* 2000, 35, 444–453.
- [30] Lussier, M., White, A. M., Sheraton, J., di Paolo, T., Treadwell, J., Southard, S. B., Horenstein, C. I., Chen-Weiner, J., Ram, A. F., Kapteyn, J. C., Roemer, T. W., Vo, D. H., Bondoc, D. C., Hall, J., Zhong, W. W., Sdicu, A. M., Davies, J., Klis, F. M., Robbins, P. W., Bussey, H., *Genetics* 1997, 147, 435–450.

- [31] Ross-Macdonald, P., Coelho, P. S., Roemer, T., Agarwal, S., Kumar, A., Jansen, R., Cheung, K. H., Sheehan, A., Symoniatis, D., Umansky, L., Heidtman, M., Nelson, F. K., Iwasaki, H., Hager, K., Gerstein, M., Miller, P., Roeder, G. S., Snyder, M., *Nature* 1999, 402, 413–418.
- [32] Rodriguez-Pena, J. M., Cid, V. J., Arroyo, J., Nombela, C., *Mol. Cell Biol.* 2000, 20, 3245–3255.
- [33] Masuda, N., Kitamura, N., Saito, K., *Eur. J. Biochem.* 1991, 202, 783–787.
- [34] Merkel, O., Fido, M., Mayr, J. A., Pmger, H., Raab, F., Zandonella, G., Kohlwein, S. D., Paltauf, F., *J. Biol. Chem.* 1999, 274, 28121–28127.
- [35] Beauvais, A., Latge, J. P., *Drug Resistance Updates* 2001, 4, 38–49.
- [36] Jung, U. S., Levin, D. E., *Mol. Microbiol.* 1999, 34, 1049–1057.
- [37] Terashima, H., Yabuki, N., Arisawa, M., Hamada, K., Kitada, K., *Mol. Gen. Genet.* 2000, 264, 64–74.
- [38] Yoda, K., Ko, J. H., Nagamatsu, T., Lin, Y., Kaibara, C., Kawada, T., Tomishige, N., Hashimoto, H., Noda, Y., Yamasaki, M., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2000, 64, 142–148.
- [39] Fontaine, T., Simenel, C., Dubreucq, G., Adam, O., Delepierre, M., Lemoine, J., Vorgias, C. E., Diaquin, M., Latge, J. P., *J. Biol. Chem.* 2000, 275, 27594–27607.

**Morphologie de mutants de  
paroi de *Aspergillus*  
*fumigatus***

**Title : Growth and cell wall organization of mutants of *Aspergillus fumigatus* affected in  $\beta$ -glucan and chitin biosynthesis**

**Running title : Morphogenesis of *A. fumigatus* cell wall mutants**

**Authors : Muriel Bernard, Jean-Paul Latgé**

**Address : Institut Pasteur, Unité des Aspergillus, 25 rue du Docteur Roux, 75 024 Paris cedex 15**

**Corresponding author : M. Bernard, Unité des Aspergillus  
25 rue du Docteur Roux 75 024 Paris cedex 15  
Tel : (33) 1 45 68 82 25  
Fax : (33) 1 40 61 34 19  
Email : mbernard@pasteur.fr**

## ABSTRACT

The growth parameters of *A. fumigatus* wild type strains and  $\beta$ -(1,3)glucanosyltransferases (*gel*) and chitin synthases (*chs*) mutants were analysed during 20 hours of growth encompassing conidial swelling, establishment of polarization, first septum formation and mycelial extension associated with an increase in septal numbers and branches. In contrast to other strains, *chs* mutants bypassed dormancy. Polarized growth [germination] was not associated with mitosis. When germ tubes with one septum were analysed, only the apical cell of *gel* germlings had reduced size and number of nuclei compared to its wild type parent. The smaller size of the colony of the mutants was not due to a reduction in the specific growth rate but to a reduced apical cell size and an increase in the branching of the mycelium. Although the overall growth perturbations (reduction in size and nuclear number of the apical cell, hyphal growth unit and extension rate) were similar for the 2 mutants, the morphology of the mycelium of the 2 mutants was different: the measurement of the mean length of the branches in the leading hyphae showed that the branches of the *gel* mutant were smaller than its parental strain. In contrast, the mean length of the branches was similar in the *chs* and parental strain, but the interval between branches was shorter in the *chs* mutant than in the parental strain. The organization of the cell wall was investigated using various reagents which specifically label the main structural polysaccharides of the cell wall ( $\alpha$ -(1,3) glucan,  $\beta$ -(1,3) glucan, chitin and galactomannan) and several proteins known to be associated with the cell wall. Cytochemical studies showed that the mycelial cell wall surface is covered by a layer of galactomannan and proteins, but no difference was seen in the localization of the cell wall polysaccharides and proteins studied in the cell wall mutants and parents.

## INTRODUCTION

The mycelium of filamentous fungi is composed of an apical cell and intercalary compartments separated by septa. Active cell wall growth and nuclear division are confined to the apical cell whereas intercalary compartments are dormant and become activated only when forming new branch points (Katz and Rosenberger, 1971). Although less studied than the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* and the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*, morphological events that occur during growth of the filamentous fungi seem to be correlated with the mitotic cycle (Fiddy and Trinci, 1976a; Harris, 1999, 2001; Wolkow et al., 1996). The duplication (or mitotic) cycle of filamentous fungi follows several sequential steps that have been best characterized in *A. nidulans*. These steps include, (1) Following dormancy, the uninucleate, asexual spores grow isotropically until the first mitotic event. (2) After the first division, a germ tube appears and the germling elongates by apical growth. (3) When the germling reaches a certain cell size, cytokinesis is initiated by the formation of a septum at the base of the germ tube. During this time, unlike yeast cells, multiple rounds of nuclear division occur in the absence of cytokinesis. This apical growth zone is active throughout the time of hyphal growth, whereas yeast cells grow apically only during the initial stage of budding (Guertin et al, 2002). Subsequently, septa are formed at regular intervals along the hypha after each round of mitosis. Nuclei in the subapical compartments are arrested in interphase, while the nuclei in the apical compartment undergo a synchronous mitotic division.

The association between morphological events and cell cycle progression has been mainly investigated using different cell cycle inhibitors and various temperature sensitive *A. nidulans* mutants affected in nuclear distribution, division and septation (Harris et al., 1998 ; Harris et al., 1999, Wolkow et al., 1996). These studies have shown that, (1) mitotic nuclear division and septation are synchronized, and (2) an unknown post mitotic cell size control is required to start cytokinesis. One of the key factors that regulates morphogenesis in filamentous fungi is the relative volume of cytoplasm per nucleus in the mycelium (Fiddy and Trinci, 1976a, 1976b).

No one to date has correlated morphogenetic variations to mutations that affect cell size without affecting mitosis. One way to study the effect of variation in cell size without effecting mitosis is to analyse cell wall mutants. Moreover, septa are composed of polysaccharides ( $\beta$ -glucan and chitin), and it would be interesting to determine if mutations in glucan and chitin synthesis associated with septa perturbations would affect morphogenesis.

In yeast, cell wall mutations affect septum formation and cytokinesis (Baladron et al, 2002; Kuranda and Robbins, 1991; Cid et al, 1995). Such investigations have been undertaken in *A. fumigatus* for two reasons: (1) understanding the morphological events associated with filamentous growth may be a key issue in the analysis of the pathobiology of *A. fumigatus* in its human host and (2) mutants affected in cell wall glucanosyltransferases and chitin synthase (Mellado et al, 2003 ; Mouyna et al, submitted) have a significantly reduced growth rate. These mutants are appropriate tools to investigate the relationship of nuclei, septum distribution and growth rate in *A. fumigatus*.



## METHODS

### Strains and growth conditions

*A. fumigatus* strains CBS 144-89 (DAL) and 237 are single spore, clinical isolates. The *gel* mutant was deficient in the two  $\beta$ -(1,3) glucanosyltransferases *GEL1* and *GEL2* and was constructed from strain CBS 144-89 (Mouyna et al., 2003, submitted). The *chs* mutant was derived from strain Af 237 by double disruption of the two chitin synthase genes *CHSG* and *CHSE* (Mellado et al., 2003). Both mutants have a significant reduction in colony size compared to wild type, parental strains.

To investigate growth, cultures of all strains were performed on glass cover slips (22 x 22 mm). A conidial suspension in aqueous 0.05 % Tween 20 was suspended in RPMI 1640 (Gibco) supplemented with 0.3 g/l glutamine and 10% fetal calf serum (FCS) (Gibco) at a final concentration of  $10^5$  conidia/ml (for the 12 first hours of growth and analysis of cells with a maximum of one septum) or  $10^4$  conidia/ml (for branched hyphae analysed between 12 and 24 hours of growth) ; 200  $\mu$ l of medium containing conidia were deposited on the surface of the cover slips and incubated at 37°C in a humid atmosphere saturated with 5 % CO<sub>2</sub>. The conidia adhered tightly to the cover slips. At regular intervals, each cover slip was removed and processed for microscopy. This synthetic medium was chosen for study since (i) RPMI is used for susceptibility testing of antifungal drugs and (ii) germinated conidia and mycelium adhere to the cover slips immersed in this medium thus facilitating the cytochemical processing of the organism.

### Staining and microscopy

#### *Fixation*

Fungal cells attached to cover slips were fixed in a 3% para-formaldehyde solution (30% stock solution, heated and diluted in PBS) for 30 minutes at room temperature. The fixative was then removed, and the residual aldehydes were quenched following the addition of one- ml of 50 mM NH<sub>4</sub>Cl for 10 minutes. The cover slips were then rinsed 3 times with PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.3) and stored in PBS at 4°C.

#### *Staining*

Calcofluor white (CFW, Fluorescent Brightener 28, Sigma) and the fluorochrome DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole, Sigma) were used to stain the cell wall [including the septa] and nuclei, respectively. Cover slips were sequentially incubated in 0.05% saponin in PBS for 30 minutes, then CFW (1  $\mu$ g/ml) in the same saponin-PBS solution for 10 minutes,

and washed 3 times by PBS for 20 seconds. Cover slips were deposited on a 20  $\mu$ l drop of DAPI solution (10  $\mu$ g/ml in distilled water) and observed directly under a fluorescent microscope.

Chitin was stained with FITC-labeled wheat germ agglutinin (WGA) (Sigma). Cover slips with fixed, germinating conidia were incubated with 10  $\mu$ g of FITC-WGA in 1-ml of PBS for 30 minutes, washed 3 times with PBS, and mounted on a microscope slide. Specificity of the lectin labelling was evaluated by incubating WGA for one hour in PBS containing 10 mg/ml of chitopentaose (Sigma) before incubation with the germinating conidia.

Immunolabeling assays for galactomannan,  $\alpha$ -(1,3) glucan and  $\beta$ -(1,3) glucan were performed with an anti-galactomannan rat monoclonal antibody (EB-A2) used for the diagnosis of aspergillosis (kind gift of M. Tabouret, BioRad Pasteur, Steenworde) (Stynen et al., 1991), the myeloma MOPC104E mouse IgM (Sigma), which has been shown to be  $\alpha$ -(1,3) glucan specific (Eissenberg et al., 1997), and an anti- $\beta$ -1,3 glucan mouse IgG monoclonal antibody (Australia Biosupplies, Victoria, Australia) (Meikle et al., 1991). For immunolabeling with EB-A2-MAb, cover slips with fixed germlings were incubated in PBS containing 5 % BSA for 1 hour, then in the MAb (30  $\mu$ g IgM per ml also diluted in 5% BSA-PBS) for 1 hour. After 3 extensive washes in 5 % BSA-PBS, the cover slips were incubated for 30 minutes with goat anti-rat IgG (H+L) coupled with Texas Red (Jackson Immunoresearch) diluted 1/200. For immunolabeling with the MOPC104E IgM and anti- $\beta$ -1,3 glucan IgG, cover slips with fixed germlings were incubated in PBS containing 5 % BSA, 5% goat serum and 5% mouse serum for 1 hour. Then, the  $\alpha$ -(1,3) glucan antibody diluted 1/100, or the  $\beta$ -(1,3) glucan antibody, diluted at a 50  $\mu$ g IgG (H+L) per ml, were added in the same buffer for one hour. After 3 extensive washes in 5 % BSA/goat serum-PBS, the cover slips were incubated for 30 minutes with goat anti-mouse IgG coupled with FITC (Jackson Immunoresearch), diluted 1/200 in 5 % BSA/goat serum-PBS. Then, 2 washes with PBS containing 5% BSA and two washes with PBS were done, and cover slips were mounted on a microscope slide and examined under a fluorescent microscope. To ensure specificity, the  $\alpha$  and  $\beta$ -(1,3) glucan antibody were incubated respectively with 10 mg/ml laminarin (Sigma) or with 10 mg/ml of an alkali-soluble extract prepared from the *A. fumigatus* cell wall (Fontaine et al., 2000) that contains more than 70%  $\alpha$  1-3 glucan.

The localization of four different *A. fumigatus* cell wall-associated proteins was also performed by immunolabeling. Detection of the GPI-anchored 80-kDa acid phosphatase PhoAp (Bernard et al., 2002), a 60-kDa phospholipase C (PLC) (Morelle et al., manuscript in

preparation), a 88-kDa dipeptidylpeptidase (Beauvais et al., 1997) and a 18-kDa RNase (Latgé et al., 1991) was performed using a rabbit polyclonal antibody raised against a peptide of PhoAp (Bernard et al., 2002), a mouse polyclonal antibody raised against the deglycosylated PLC (Morelle et al., manuscript in preparation), a rabbit polyclonal antibody raised against the 88-kDa protein, and a rabbit polyclonal antibody raised against the 18-kDa protein, respectively. For immunolabeling, cover slips with fixed germlings were incubated in PBS containing 5 % BSA for 1 hour, then reacted with the antibodies [diluted 1/100 (1/20 for PLC) in 5% BSA] for 1 hour. Specificity of the labelling was verified using preimmune rabbit or mouse sera. After 3 extensive washes in 5 % BSA-PBS, cover slips were incubated for 30 minutes with goat anti-rabbit IgG (H+L) coupled with Texas Red (Jackson Immunoresearch) or goat anti-mouse IgG (H+L) coupled with FITC diluted 1/200. Then 2 washes with PBS containing 5% BSA and two washes with PBS were performed, and cover slips were mounted on a microscope slide and examined under a fluorescent microscope.

## Microscopy

Germlings and young colonies were photographed using a Leica DMLB microscope and a Coolsnap camera from Roper Scientific. Measurements were determined using the software Meta Vue from the same company. The following parameters were calculated: (1) specific growth rate ( $h^{-1}$ ) =  $1/x \, dx/dt$  (  $x$  = hyphal length in  $\mu m$ ,  $t$  = time in hour ); (2) hyphal growth unit (HGU) ( $\mu m^{-1}$ ) = total mycelial length / number of apices; (3) the ratio of hyphal length to nuclear number ( $\mu m$ ), referred to subsequently as Hn; (4) mean tip extension rate ( $\mu m \, h^{-1}$ ) =  $2 (H_1 - H_0) / B_0 + B_1$  with  $H_0$  and  $H_1$  being the total hyphal length of the mycelium at zero time and one hour later and  $B_0$  and  $B_1$  being the number of branches at zero time and one hour later.

All experiments reported here were repeated at least twice. When required, a statistical analysis was done by one or two way variance analysis followed by the Duncan's multiple range test (SuperAnova software Abacus concepts, Inc., Berkeley, CA). Mutant characteristics were only compared to their wild type parental strains (*chs* mutant vs 237 strain and *gel* mutant vs DAL strain) since significant differences were found between the 2 wild type strains 237 and DAL.

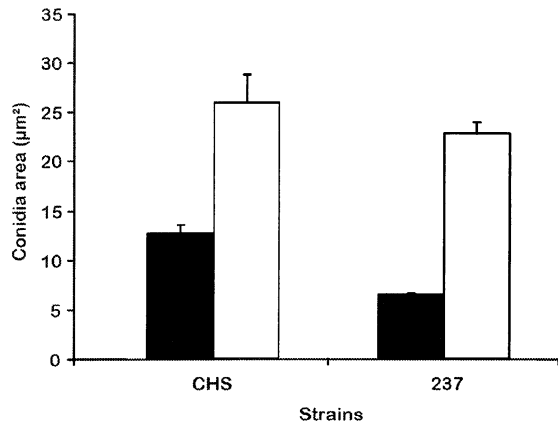


Figure 1 : Increase in conidial size (estimated as the conidial surface in  $\mu\text{m}^2$ ) during isotropic germination of conidia. Filled bars correspond to resting conidia ; open bars correspond to swollen conidia after 2 hours for strain CHS and 6 hours for strain 237. Conidia of strain DAL and GEL mutants were similar to 237 (not shown).

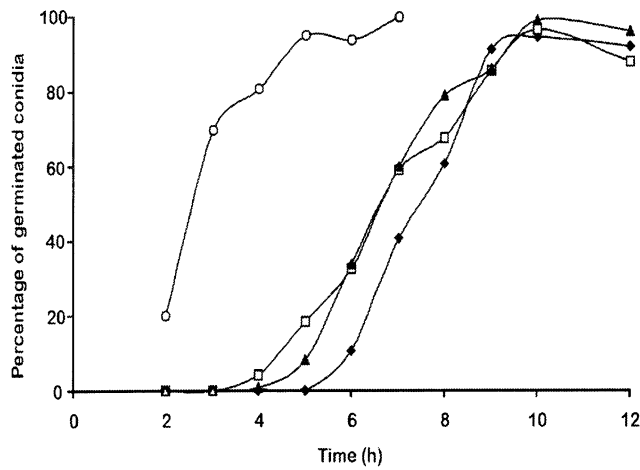


Figure 2 : Germination kinetics of the 4 strains. (◆) DAL wt strain, (□) GEL mutant, (○) CHS mutant and (▲) 237 wt strain.

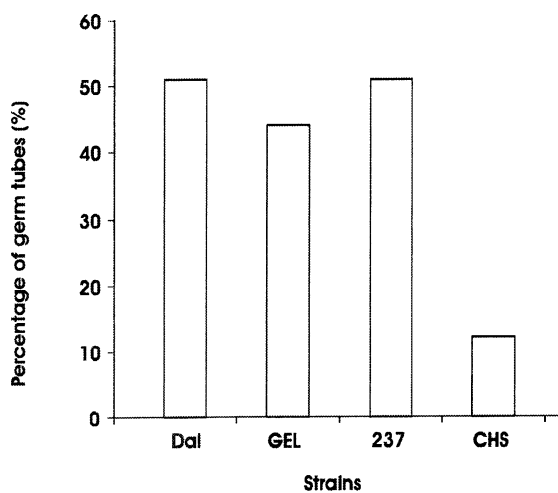


Figure 3 : Percentage of germlings with one nucleus for the four strains.

## RESULTS

### 1) GROWTH ANALYSIS

Mycelial growth of *A. fumigatus* was studied for up to 20 hours, which was of sufficient duration to follow all morphogenetic events, including: (1) conidial swelling, (2) establishment of polarization, (3) first septum formation, (4) mycelial extension associated with an increase in septal numbers and the initiation of branching. These events were compared in cell wall mutants with reduced growth rate and their parental strains.

#### A) Conidial germination and germ tube growth

##### 1) Conidia swelling

*chs* mutant resting conidia were larger than conidia of strains DAL, *gel* and 237. As they have often a bottle shape, conidial size is expressed as total area. Conidia of strain 237 had an area of  $6.5 \pm 0.2 \mu\text{m}^2$  whereas the *chs* mutant had larger conidia ( $12.7 \pm 0.8 \mu\text{m}^2$ ) (Figure 1). For strains *gel* and DAL, results were similar to strain 237 (data not shown). All conidia were uninucleate, although we occasionally observed (< 1 %) conidia with two nuclei.

In our culture conditions, the conidial size of DAL, *gel* and 237 did not change for the first 3 hours of incubation. In contrast, conidia of the *chs* mutant started to swell immediately after they were suspended in the culture medium such that the area of the *chs* mutant conidia increased 1.4-fold, whereas the conidia of the other strains increased 1.9-fold during isodiametric growth. Swollen *chs* mutant conidia remained larger than strain 237 conidia (Fig. 1). This result indicates that conidia of the *chs* mutant bypassed dormancy.

##### 2) Growth polarization

Germ tubes were initially seen after 4-5 hours of incubation of conidia in our culture conditions for both wild-type strains and the *gel* mutant. The last conidia to germinate were observed after 10 hours of incubation in the medium. In contrast, the *chs* mutant germinated earlier than either the *gel* mutant or strains 237 and DAL: all *chs* mutant conidia had germinated by about 5 hours of incubation (Fig. 2). These data indicate the extreme heterogeneity of the conidial population of all strains, since in the same conidial preparations, germination is not synchronous.

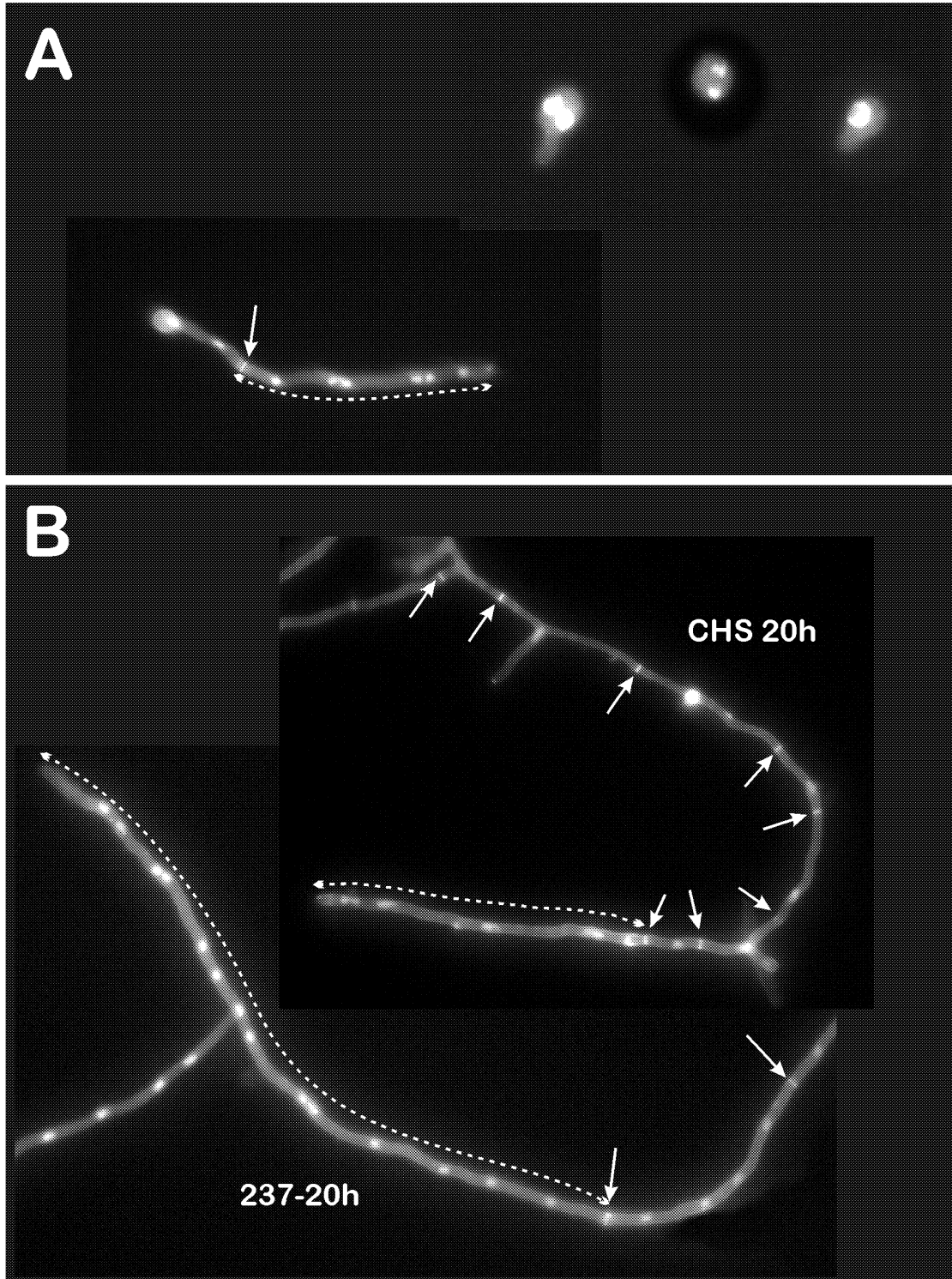


Figure 4 : Examples of nuclear conditions and hyphal septation in germinating conidia of strain 237 after 6 hours (swollen conidium and germinated conidia) and 12 hours of culture (germ tube with one septum) (A), and hyphae (B) of wild type strain 237 and the *chs* mutant. Magnification : X40. Dotted line represents the apical cell. Arrows indicate the septa.

Polarized growth [germination] was not associated with mitosis. Indeed, a majority of conidia had formed a germ tube before undergoing mitosis (Fig. 3). Around 50 % of the germ tubes of the wt strains and *gel* mutant had only one nucleus (Figures 3). This percentage was reduced in the *chs* mutant : the number of germinated conidia with a single nucleus was only about 10% in this *chs* mutant (Figures 3). Figure 4A is an example of germinated conidia (strain 237) after 6 hours culture showing that mitosis can occur before or after polarization.

### 3) Germ tubes with one septum

Measurements of germ tubes that have one septum were taken at 12 h for DAL, *gel* and 237 and 7 h for *chs* to take into account the dormancy of the DAL, *gel* and 237 strains, in order to analyze cells that were morphologically similar. This time is referred to as T1. When total hyphal length was plotted against time, during a time interval between T1-4h to T1+1h, our data demonstrate that growth was exponential for the 4 strains. Interestingly, specific growth rates for the 4 strains were similar (Table 1).

**Table 1 : Growth parameters of germinating conidia with one septum**

Strains	Apical cell		Intermediary cell		Specific growth rate (h <sup>-1</sup> )
	Nuclei number	Length (µm)	Nuclei number	Length (µm)	
Dal	5.4 ± 0.5	30.0 ± 1.5	1.7 ± 0.2	6.5 ± 0.6	0.33 ± 0.02
<i>gel</i>	3.6 ± 0.2*	19.7 ± 1.9*	1.6 ± 0.1	7.1 ± 1.1	0.31 ± 0.05
237	4.7 ± 0.4	35.7 ± 1.7	1.6 ± 0.2	8.5 ± 0.9	0.28 ± 0.02
<i>chs</i>	5.7 ± 0.6	37.0 ± 2.4	1.7 ± 0.2	9.9 ± 0.7	0.36 ± 0.04

The *gel* mutant, Dal and 237 strains were grown for 12 hours, whereas the *chs* mutant was grown for 7 hours. Growth rates were calculated between 8 and 13 hours of growth for the *gel* mutant, Dal and 237 strains and between 3 and 8 hours for the *chs* mutant.

Numbers followed by an asterisk are significantly different (p<0.05). Dual comparisons Dal vs *gel* and 237 vs *chs* were performed.

The distance from the conidial wall to the first septum [average of 5-10 µm] was not different among all 4 strains, and all strains contained 1-2 nuclei in this segment. The apical cell of *gel* mutant germlings had a reduced size (20 µm) and number of nuclei (average of 3.6) compared to its wild type parent [DAL] (Table 1). However, the ratio of hyphal length to nuclear number (Hn) in apical cells was not significantly different between *gel* mutant and DAL strains with values of 5.6 and 5.9 µm, respectively. In contrast to the *GEL* mutation, disruption of the *CHS* genes did not induce a modification of the apical cell size and number of nuclei. These results show that the defect in polarized growth associated with the *GEL*

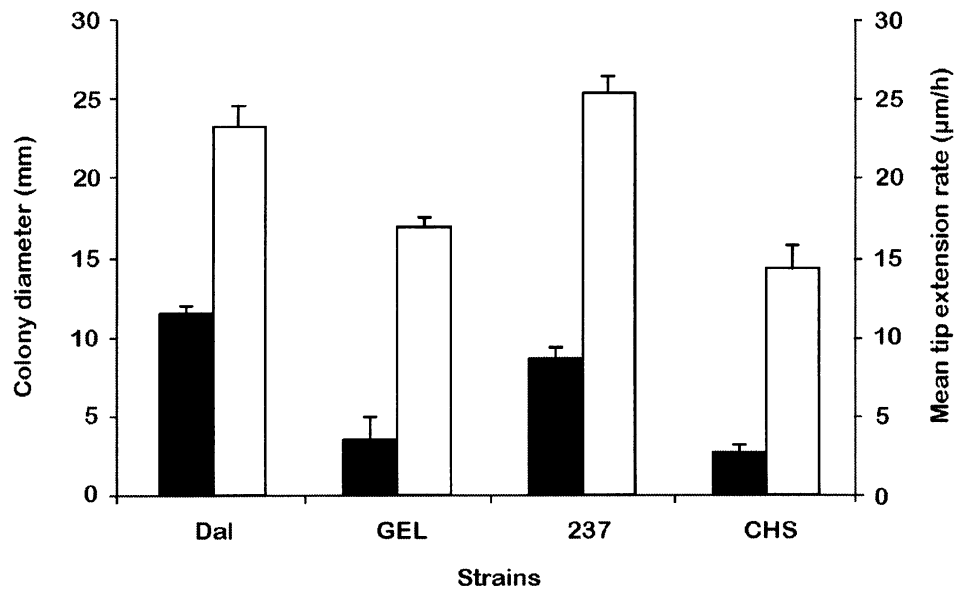


Figure 5 : Mean hyphal extension rate ( $\mu\text{m h}^{-1}$ ) and diameter of the colony (mm) of strains after 4 days of culture in RPMI at 37°C with  $\text{CO}_2$ .



mutation is seen immediately after germination whereas the polarized growth of the *CHS* mutant was not altered during early growth. In all strains, cells with a septum have at least 4 nuclei [apical cell+intermediary compartments], suggesting that at least 2 mitotic cycles are required for cytokinesis (Table 1). Figure 4B is an example of strain 237 germlings with one septum.

## **B) Colony formation**

This parameter was evaluated at  $22 \pm 1$  h for DAL, *gel* and 237 strains and  $17 \pm 1$  h for *chs* mutant (this time point is referred to as T2) since the CHS mutant has completed its germination in 5 h. At T2, all colonies had numerous septa (>5) and branches (>4) but were still amenable to measurement of growth parameters microscopically. Specific growth rates were similar at T1 and T2, making data comparable for these 2 growth times (Table 1 and Table 2).

### **1) Apical cell in a colony**

A general feature for 237, DAL and GEL*gel* strains but not for the *chs* mutant is that the size of the apical cell and number of nuclei per apical cell at T2 are significantly higher than at T1 (Tables 1 and 2). For example, the apical cell of DAL at T2 measured 86  $\mu\text{m}$  and contained 16 nuclei whereas it was only 30  $\mu\text{m}$  with 5 nuclei at T1. Both *gel* and *chs* mutants had a smaller apical cell that contained fewer nuclei than their respective parental wild type strain. However, the *gel* mutant showed a significant increase in the apical cell size between T1 and T2, whereas there was no significant difference in the length of the apical cell of the *chs* mutant at T1 and T2. In addition, Hn for *chs* was higher than 237 ( $6.7 \pm 0.6 \mu\text{m}$  vs  $4.6 \pm 0.3 \mu\text{m}$ ) whereas Hn for GEL and DAL were not significantly different ( $4.8 \pm 0.2 \mu\text{m}$  vs  $4.6 \pm 0.3 \mu\text{m}$ ).

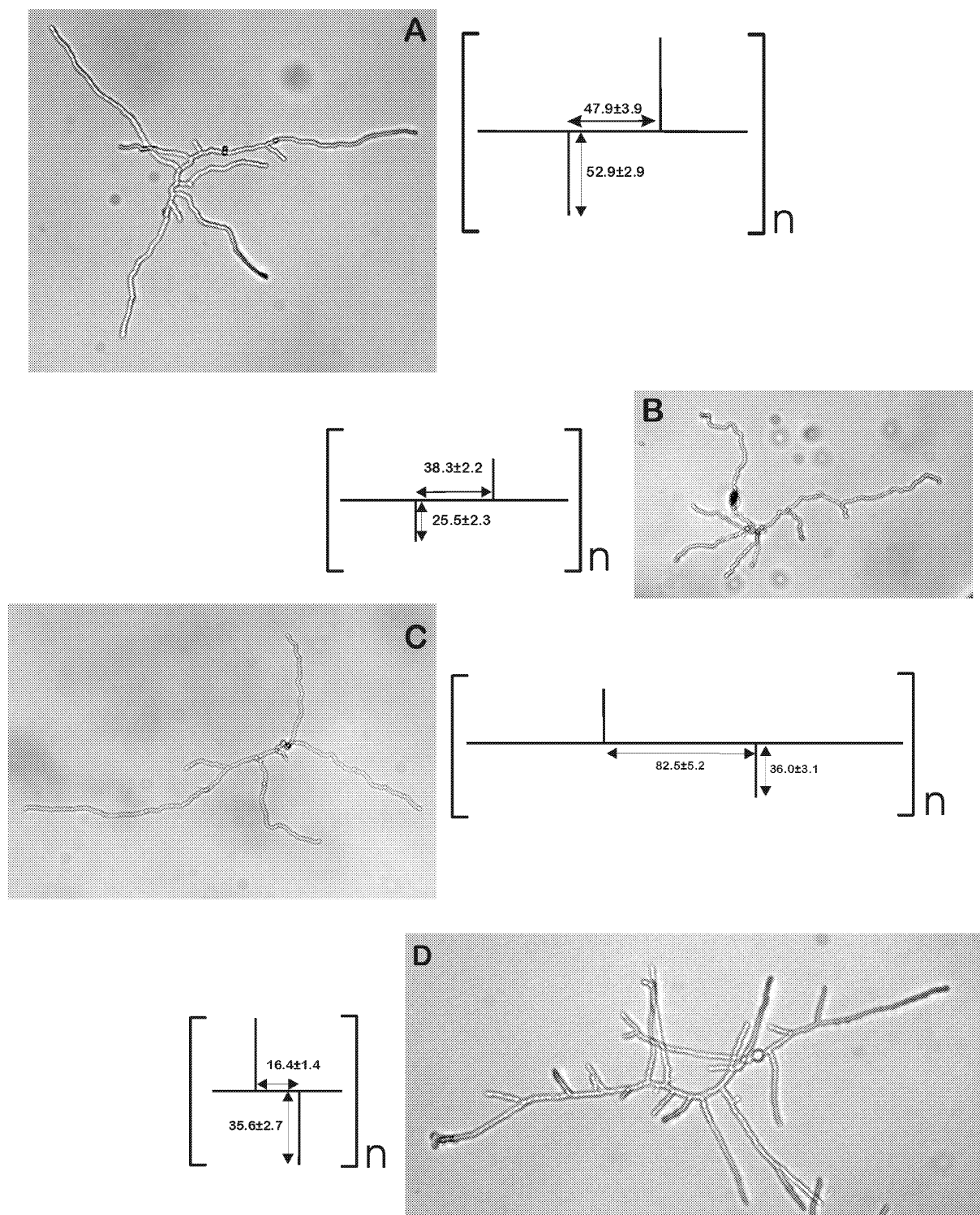


Figure 6 : Colonies after 24 hours culture in RPMI medium and characteristics of growth patterns of GEL, DAL, 237 and CHS strains. A : Dal ; B : Gel ; C : 237 ; D : CHS.

**Table 2 : Growth parameters of the colony**

Strains	Apical cell		Intermediary cell		HGU ( $\mu\text{m}$ )	Specific growth rate ( $\text{h}^{-1}$ )
	Nuclei number	Length ( $\mu\text{m}$ )	Nuclei number	Length ( $\mu\text{m}$ )		
Dal	$15.7 \pm 0.9$	$85.6 \pm 4.8$	$3.3 \pm 0.3$	$17.6 \pm 1.4$	$83.0 \pm 4.0$	$0.28 \pm 0.01$
<i>gel</i>	$9.7 \pm 0.6^*$	$44.4 \pm 2.5^*$	$4.0 \pm 0.3^*$	$22.9 \pm 1.9^*$	$58.8 \pm 2.3^*$	$0.29 \pm 0.02$
237	$18.6 \pm 1.7$	$80.5 \pm 5$	$3.7 \pm 0.2$	$17.4 \pm 0.9$	$102.8 \pm 4.6$	$0.25 \pm 0.01$
<i>chs</i>	$7.7 \pm 0.5^*$	$44.1 \pm 2.5^*$	$2.6 \pm 0.1^*$	$14.8 \pm 0.9^*$	$44.9 \pm 2.3^*$	$0.33 \pm 0.05$

The *gel* mutant, Dal and 237 strains were grown for 22 hours, whereas the *chs* mutant was grown for 17 hours. Growth rates were calculated between 19 and 24 hours of growth for the *gel* mutant, Dal and 237 strains and between 15 and 20 hours for the *chs* mutant. Numbers followed by an asterisk are significantly different ( $p < 0.05$ ). Dal and 237 were compared respectively with *gel* and *chs*.

## 2) Intercalary cells

The intercalary cells refer to the compartments separated by septa that occur below apical cells. The morphological parameters of these cells were significantly different from the apical cell in all strains examined : they were shorter and contained less nuclei than the apical cell (Table 2). In addition, the intercalary compartment of *chs* was smaller and contained fewer nuclei than strain 237. In contrast, the intercalary cell of the *gel* mutant was longer and contained more nuclei than the parental DAL strain (Table 2).

## 3) Branching

The hyphal growth unit (HGU) (a reliable mathematical representation of mycelial branching) of both the *chs* and *gel* mutants was half that of the parental wild type strains, indicating a hyperbranching due to the cell wall mutations (Table 2). Cell wall mutations did not effect the specific growth rate since similar values were calculated for mutants and wild type strains (Table 2). Accordingly, the mean tip extension rates of the mycelium of the 2 mutants [*gel* & *chs*] had lower values than those of the 2 wild-type strains (Fig. 5). These results indicate that tip extension was reduced in the mutants, in agreement with the reduction in the diameter of their colonies after 4 days of culture in the same conditions (Fig. 5). So, the smaller size of the colony of the mutants was not due to a reduction in the specific growth rate but to an increase in the branching of the mycelium. Although the overall growth perturbations (reduction in apical cell size, HGU and extension rate) were similar for the 2 mutants, the morphology of the mycelium of the 2 mutants was different. The mycelium of the *gel* mutant had a twisted appearance whereas the *chs* mutant had very straight branches. In

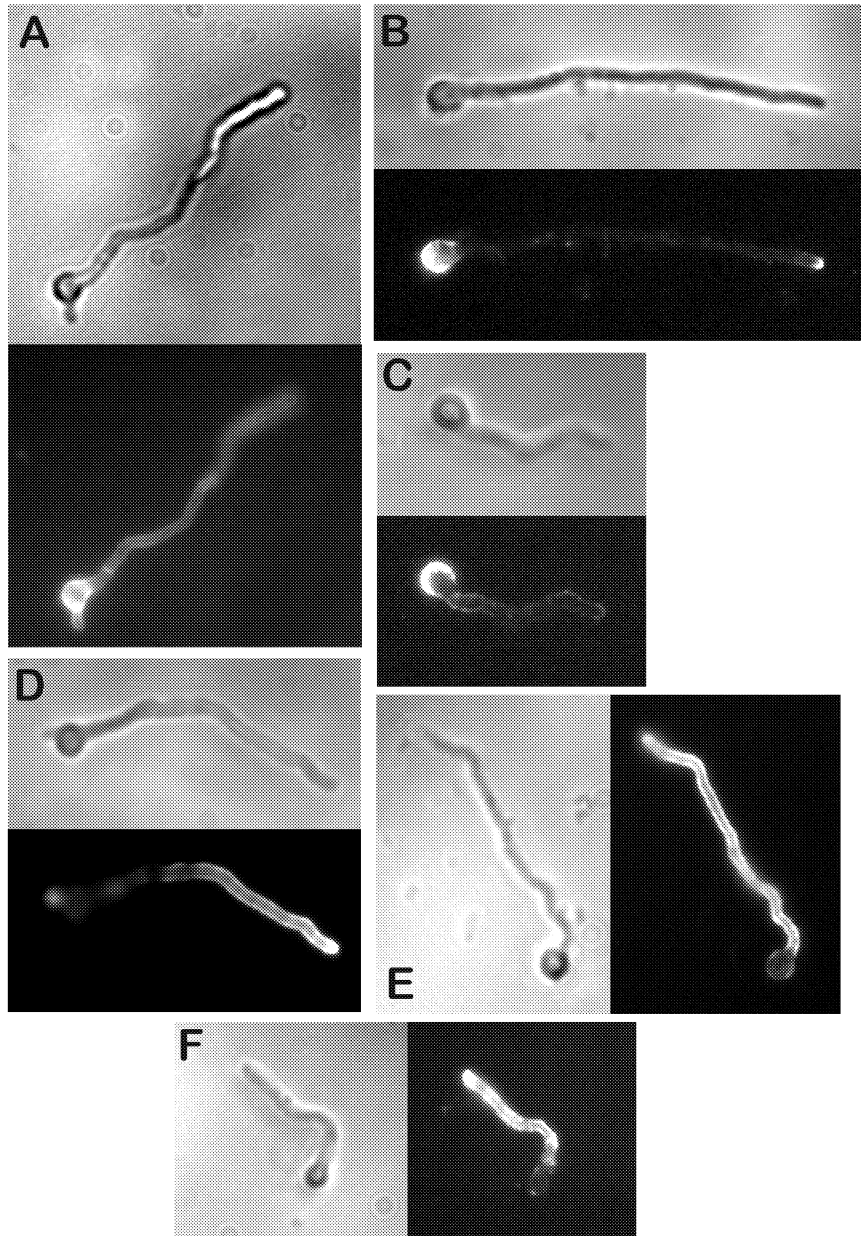


Figure 7 : Examples of labelled cell wall components. Dal strain germ tubes were labelled with (A) WGA coupled to FITC, (B) anti- $\beta$ -(1,3) glucan antibody, (C) anti- $\alpha$ -(1,3) glucan antibody, (D) anti-galactomannan antibody, (E) antibody directed against the 18 kDa ribonuclease and (F) antibody against PhoAp (similar labelling seen with other strains are not shown..

the *gel* mutant had a twisted appearance whereas the *chs* mutant had very straight branches. In addition, the measurement of the mean length of the branches in the leading hyphae showed that the branches of the *gel* mutant were smaller than its parental strain. In contrast, the mean length of the branches was similar in the *chs* and 237 strains, but the interval between branches was shorter in the *chs* mutant than in the strain 237. The suggested growth phenotypes of each strain are illustrated in Fig. 6.

## 2) CELL WALL ORGANIZATION

Since *GEL* and *CHS* mutations were shown previously to be associated with modifications in the polysaccharide and protein composition of the cell wall of *A. fumigatus* (Mouyna et al., submitted, Mellado et al., 2003, Bruneau et al., 2001), the organization of the cell wall was investigated using various reagents which specifically label cell wall molecules. Two types of molecules were selected for localization studies: (1) the structural polysaccharides of the cell wall :  $\alpha$ -(1,3) glucan,  $\beta$ -(1,3) glucan, chitin and galactomannan and (2) proteins such as the 18-kDa ribonuclease, the 88-kDa dipeptidylpeptidase V, the 80-kDa acid phosphatase and the 60-kDa phospholipase C that were shown previously to be associated with the cell wall.

In spite of their growth differences, cell wall labelling of the 2 wild type strains and the *gel* and *chs* mutants was similar with each of the (immuno) cytochemical reagents. Fig. 7 is an example of the labeling obtained with the specific antibodies or lectin used to localize cell wall molecules. Galactomannan was the only polysaccharide identified at the surface of the mycelium, whereas anti  $\alpha$ - and  $\beta$ -(1,3) glucan monoclonal antibodies only reacted with the surface of the conidium and not with the mycelium. Similarly, WGA stained the conidium and also faintly the septa but not the mycelial cell wall. These results suggest that chitin,  $\alpha$ - and  $\beta$ -(1,3) glucan were not exposed at the cell surface of the mycelium. Interestingly, chitin emerged at the cell surface only at the septum rings for both chitin synthase mutant and parental strain. In contrast, antibodies directed against all proteins mentioned above labeled intensively the mycelial cell wall in its entire length. A higher apical labelling was sometimes seen, but this observation was not consistent. These results demonstrate that cell wall polysaccharides are covered by a layer of proteins. No differences were seen in the localization of any proteins in the 4 strains.

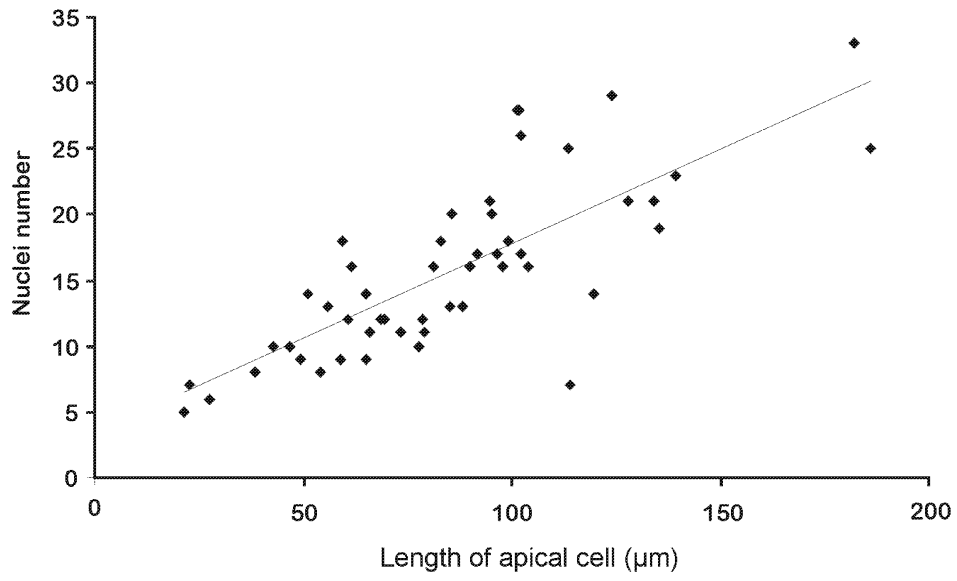


Figure 8 : Correlation of the number of nuclei with the length of the apical cell of strain 237 (similar data obtained with other strains are not shown).

## DISCUSSION

The growth parameters of *A. fumigatus* wild type strains and cell wall mutants were analysed in this study. Previous to our new observations, only a single study of the growth characteristics of a wild type strain of *A. fumigatus* has been reported (Momany and Taylor, 2000). On the other hand, the growth of *A. nidulans* wild type strains as well as septation and mitosis mutants has been carefully analysed previously (reviewed in Harris, 2001).

Our data with the 2 wild type strains of *A. fumigatus* are in agreement with the general growth laws established by Trinci (1979) that characterize the mycelial extension by filamentous fungi. Those laws include, (i) hyphal extension is exponential. Specific growth rate and doubling time (measuring the duration of a mitotic cycle) observed with *A. fumigatus* in our culture conditions are  $0.3 \text{ h}^{-1}$  and 2.2 h in average respectively and are comparable to values reported by Trinci (1974) and Fiddy and Trinci (1976a) for *A. nidulans* and other filamentous fungi grown at  $25^{\circ}\text{C}$  on malt extract agar where values of  $0.3 \text{ h}^{-1}$  and 2-3 h were obtained. (ii) Hyphal length is correlated with the number of nuclei (Fig. 8) and the number of hyphal apices (data not shown). The average hyphal length per nucleus ( $H_n$ ) of *A. fumigatus* was 5-6  $\mu\text{m}$  per nucleus, similar to both the intercalary compartments and apical cell. Similar values were reported for *A. nidulans* (Trinci, 1974). (iii) Branching in filamentous fungi is an event which is physiologically analogous to cell division in unicellular organisms and which controls exponential growth in these fungi. (iv) The length of the intercalary compartments and apical cells increased over time. Acceleration in extension rates that occurred over time was correlated with an increase in the length of the apical compartment (Tables 1, 2) (Fig. 5). The length of the apical cell was always higher than intercalary compartments. These data are in agreement with the fact that the apical compartment defines the peripheral growth zone.

However, we have observed several differences compared to previous *Aspergillus* studies, including, (i) Wolkow et al (1996) indicated that the septum is formed during or following the third nuclear division. These authors never found septa in germlings with less than 4 nuclei, whereas Fiddy and Trinci (1976) showed that septa occurred in germlings with 4-8 nuclei. Momany and Taylor (2000) noted that in *A. fumigatus* and in *A. nidulans*, formation of the first septum occurred after the fourth mitotic division. We found that septa are formed between the second and third mitotic divisions since germlings with one septum, as described in Table 1, had between 4 and 8 nuclei. (ii) Harris (1999) indicated that polarized conidia of *A. nidulans* were always multinucleate (with a majority of cells with 4 nuclei). In the study of Momany and Taylor (2000), the isotropic to polar growth switch in *A. fumigatus*

preceded the first mitotic division in only 22 % of the cells, while in *A. nidulans* this switch did not occur until after the first mitosis. We have shown that polarization could be obtained in 50 % of the conidia of *A. fumigatus* prior to the first mitosis. (iii) The same discrepancies were observed in the appearance of the second germ tube. Harris (1994) reported that the second germ tube in *A. nidulans* was formed at the time the first septum is formed. Momany and Taylor (2000) noted that formation of a second germ tube started only after the third mitosis in both *A. fumigatus* and *A. nidulans*. By the fifth mitotic division, only 19 % of *A. fumigatus* and 98 % of *A. nidulans* germlings possessed a second germ tube. In our study, although most of germinated conidia with 2 germ tubes had 4 nuclei, some conidia with 2 germlings had only 2 nuclei (data not shown). In addition, septum deposition was not always anterior to bipolarization since for example 50 % of bipolarized conidia of the *chs* mutant did not have any septa (data not shown).

The discrepancies seen between the different *Aspergillus* studies could have different explanations: (1) Conidial populations are very heterogenous and measurements often result from a mixture of cells at different growth stages. (2) Wild type strains used in these studies are different. Our data show that numerous growth parameters are strain specific. For example, the values for the number of nuclei per  $\mu\text{m}$  of apical cell ( $5.9 \pm 0.5 \mu\text{m}$  vs  $8.6 \pm 0.7 \mu\text{m}$ , respectively for DAL and 237), and HGU ( $8.3 \pm 4 \mu\text{m}$  vs  $10.3 \pm 5 \mu\text{m}$ ) were significantly different between the two wild type strains.(Fig. 6 and Table 2). (3) Culture conditions used in previous studies were different from the RPMI/FCS/ $\text{CO}_2/37^\circ\text{C}$  conditions used here. It was shown previously that the nutrient environment of the fungus seems to influence greatly the cytological events. Accordingly, Harris (1999) noted that germination in poor media is associated with the occurrence of polarization before the first mitosis. In contrast, Momany and Taylor (2000) did not see any difference in polarization when *A. fumigatus* was grown in a poor and a rich medium. All these data show that cell size and mitosis are associated somehow with the ability of a filamentous fungus to undergo cytokinesis. However, nobody has yet defined the rule for the start and control of the different morphogenetic events such as the mechanism(s) regulating the distribution of nuclei within the cytoplasm. Most importantly, a correlation between mitosis, cytokinesis and polarization does not seem to exist since the environment plays an essential role in monitoring the master regulator(s) responsible for these morphogenetic changes. In *A. fumigatus* identifying these key regulators will be difficult due to the heterogeneity and asynchrony observed in a population of germinating conidia.



Mutations in genes affecting the biosynthesis of the 2 major structural polysaccharides of the *A. fumigatus* cell wall, chitin and  $\beta$ -(1,3) glucan (Fontaine et al, 2000) resulted in a similar phenotype. First the extension of the apical cell was reduced. Such a morphological event can result from the incorrect deposition of cell wall polysaccharides and the compensatory replacement of these polymers by others. For example, the *chs* mutant compensates for the reduction in chitin content of the cell wall by an increase in  $\alpha$ -(1,3) glucan. Similarly the concentration of chitin in the *gel* mutant is highly increased (Mellado et al, 2003, Mouyna et al, submitted). Such modifications were not associated with a change in localization of  $\alpha$ -(1,3) glucan and chitin, as shown by WGA and anti- $\alpha$ -(1,3) glucan antibody labelling experiments. Second, the specific growth rate is not reduced by the mutation suggesting that cell wall deposition and cellular expansion are two biochemical events that are controlled by different master regulators. A similar finding was reported for chitin synthase mutants of *A. oryzae* (Muller et al, 2002). Third, hyperbranching has been a strategy used by the *A. fumigatus chs* mutant to compensate for the reduction in the length of apical branches without a decrease in the specific growth rate. Mutations in filamentous fungi that result in a hyperbranching phenotype are common (Lauter et al, 1998, Perkins et al, 1982). Our data are in agreement with the model of Watters and Griffith (2001) which suggested that branching in *Neurospora crassa* is determined by the excess of the rate of supply over the rate of deposition at the apex. It would be also interesting to analyse the interaction of genes involved in hyperbranching and cell wall biosynthesis. In addition, the two cell mutations studied effect fungal growth in different ways. Disruption of glucanosyltransferase genes associated with an increase in the chitin level of the cell wall, strongly affected the apical growth of the branches. Similarly in yeast, an increase in the amount of cell wall chitin that occurs in mutants with perturbed cell wall integrity is often associated with slow growth (Lagorce, 2002). Chitin synthase mutations associated with a reduction in the cell wall chitin stimulated branching without affecting apical growth of the branches. Likewise, with the *chs* mutant bipolarization during germination as well as the number of mycelial branches was higher than in the parental 237 strain. For example, at the time where 100 % of the conidia had germinated, 50 % of germinated conidia of the *chs* mutant had 2 germ tubes whereas this percentage never reached 10 % in wild type parental strain (data not shown). Cell wall mutants will be also essential to our understanding of the factors responsible for fungal dormancy, since the *chs* mutant does not have dormant conidia, i.e., their use will help identify which pathways are shut down during conidiation that are responsible for the induction of dormancy.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Richard Calderone for critically reading this manuscript and Jean-Paul Debeaupuis for his help for illustrations.

## REFERENCES

- Baladron, V., Ufano, S., Duenas, E., Martin-Cuadrado, A. B., del Rey, F. & Vazquez de Aldana, C. R. (2002).** Eng1p, an endo-1,3- $\beta$ -glucanase localized at the daughter side of the septum, is involved in cell separation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic* **1**, 774-786.
- Beauvais, A., Monod, M., Debeaupuis, J. P., Diaquin, M., Kobayashi, H. & Latgé, J. P. (1997).** Biochemical and antigenic characterization of a new dipeptidyl-peptidase isolated from *Aspergillus fumigatus*. *J. Biol. Chem.*, 6238-6244.
- Bernard, M., Mouyna, I., Dubreucq, G., Debeaupuis, J. P., Fontaine, T., Vorgias, C., Fuglsang, C. & Latgé, J. P. (2002).** Characterization of a cell-wall acid phosphatase (PhoAp) in *Aspergillus fumigatus*. *Microbiol.* **148**, 2819-2829.
- Bruneau, J. M., Magnin, T., Tagat, E., Legrand, R., Bernard, M., Diaquin, M., Fudali, C. & Latgé, J. P. (2001).** Proteome analysis of *Aspergillus fumigatus* identifies glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins associated to the cell wall biosynthesis. *Electrophoresis* **22**, 2812-2823.
- Cid, V. J., Duran, A., Del Rey, F., Snyder, M. P., Nombela, C. & Sanchez, M. (1995).** Molecular basis of cell integrity and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* **59**, 345-386.
- Eissenberg, L. G., Moser, S. A. & Goldman, W. E. (1997).** Alterations to the cell wall of *Histoplasma capsulatum* yeasts during infection of macrophages or epithelial cells. *J. Infect. Dis.* **175**, 1538-1544.
- Fiddy, C. & Trinci, A. P. J. (1976a).** Mitosis, septation, branching and the duplication cycle in *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* **97**, 169-184.
- Fiddy, C. & Trinci, A. P. J. (1976b).** Nuclei, septation, branching and growth of *Geotrichum candidum*. *J. Gen. Microbiol.*, 185-192.
- Fontaine, T., Simenel, C., Dubreucq, G., Adam, O., Delepierre, M., Lemoine, J., Vorgias, C. E., Diaquin, M. & Latgé, J. P. (2000).** Molecular organization of the alkali-insoluble fraction of *Aspergillus fumigatus* cell wall. *J. Biol. Chem.* **275**, 27594-27607.
- Guertin, D. A., Trautmann, S. & McCollum, D. (2002).** cytokinesis in eukaryotes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**, 155-178.
- Harris, S. D. (1999).** Morphogenesis is coordinated with nuclear division in germinating *Aspergillus nidulans* conidiospores. *Micriob.* **145**, 2747-2756.
- Harris, S. D. (2001).** Septum formation in *Aspergillus nidulans*. *Curr. Op. Microbiol.* **4**, 736-739.
- Harris, S. D., J.L., M. & Hamer, J. E. (1994).** Identification and characterization of *Aspergillus nidulans* mutants defective in cytokinesis. *Genetics* **136**, 517-532.

- Harris, S. D. & Kraus, P. R. (1998).** Regulation of septum formation in *Aspergillus nidulans* by a DNA damage checkpoint pathway. *Genetics* **148**, 1055-1067.
- Katz, D. & Rosenberger, R. F. (1971).** Hyphal wall synthesis in *Aspergillus nidulans*: effect of protein synthesis inhibition and osmotic shock on chitin insertion and morphogenesis. *J. Bacteriol.* **108**, 184-190.
- Kuranda, M. J. & Robbins, P. W. (1991).** Chitinase is required for cell separation during growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **266**, 19758-19767.
- Lagorce, A. (2002).** Etude du mécanisme de compensation induit en réponse à des mutations pariétales chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. *Thèse de doctorat, Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse*.
- Latgé, J. P., Moutaouakil, M., Debeaupuis, J. P., Bouchara, J. P., Haynes, K. A. & Prévost, M. C. (1991).** The 18 kDa antigen secreted by *Aspergillus fumigatus*. *Infect. Immun.* **59**, 2586-2594.
- Lauter, F. R., Marchfelder, U., Russo, V. E. A., Yamashiro, C. T., Yatzkan, E. & Yardens, O. (1998).** Photoregulation of cot-1, a kinase-encoding gene involved in hyphal growth in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet. Biol.* **23**, 300-310.
- Meikle, P. J., Bonig, I., Hoogenraad, N. J., Clarke, A. E. & Stone, B. A. (1991).** The location of (1-3)- $\beta$ -glucans in the walls of pollen tubes of *Nicotiana glauca* using a (1-3)- $\beta$ -glucan-specific monoclonal antibody. *Planta* **185**, 1-8.
- Mellado, E., Dubreucq, G., Mol, P., Sarfati, J., Paris, S., Diaquin, M., Holden, D. W., Rodriguez-Tudela, J. L. & Latgé, J. P. (2003).** Cell wall biogenesis in a double chitin synthase mutant (chsG-/chsE-) of *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genet. Biol.* (sous presse).
- Momany, M. & Taylor, I. (2000).** Landmarks in the early duplication cycles of *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus nidulans* : polarity, germ tube emergence and septation. *Microbiology* **146**, 3279-3284.
- Morelle, W., Bernard, M., Debeaupuis, J. P., Buitrago-Serna, M. J., Tabouret, M. & Latgé, J. P. (2003).** Galactomannoproteins in *Aspergillus fumigatus*. (manuscrit en préparation).
- Mouyna, I., Morelle, W., Vai, M., Monod, M., Léchenne, B., Fontaine, T., Beauvais, A., Sarfati, J., Prévost, M. C. & Latgé, J. P. (2003).** Deletion of *GEL2* encoding for a  $\beta$ (1-3)glucanosyltransferase affects morphogenesis and virulence in *A. fumigatus*. *Mol. Microbiol.*, (soumis).
- Müller, C., Hjort, C. M., Hansen, K. & Nielsen, J. (2002).** Altering the expression of two chitin synthase genes differentially affects the growth and morphology of *Aspergillus oryzae*. *Microbiology* **148**, 4025-4033.

**Perkins, D. D., Radford, A., Newmeyer, D. & Bjorkman, M. (1982).** Chromosomal loci of *Neurospora crassa*. *Microbiol. Rev.* **46**, 426-570.

**Stynen, D., Sarfati, J., Symoens, F., Goris, A., Nolard, N. & Latgé, J. P. (1991).** Rat monoclonal antibodies against exocellular carbohydrate antigens of *Aspergillus* and dermatophytes. In *Fungal cell wall and immune response*, pp. 181-193. Edited by J. P. Latgé & D. G. Boucias. Heidelberg: Springer Verlag.

**Trinci, A. P. J. (1973).** The hyphal growth unit of wild type and spreading colonial mutants of *Neurospora crassa*. *Arch. Mikrobiol.* **91**, 127-136.

**Trinci, A. P. J. (1974).** A study of the kinetics of hyphal extension and branch initiation of fungal mycelia. *J. Gen. Microbiol.* **81**, 225-236.

**Trinci, A. P. J. (1978).** The duplication cycle and vegetative development in moulds. In *The filamentous fungi*, pp. 132-163. Edited by J. E. Smith, Berry, D.R.: Arnold E.

**Watters, M. K. & Griffiths, A. J. F. (2001).** Tests of a cellular model for constant branch distribution in the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 1788-1792.

**Wolkow, T. D., Harris, S. T. & Hamer, J. E. (1996).** Cytokinesis in *Aspergillus nidulans* is controlled by cell size, nuclear positioning and mitosis. *J. Cell Sc.* **109**, 2179-2188.

# **Conclusion générale et perspectives**

## **4 CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES**

Mon travail de recherche a été centré sur la caractérisation des protéines associées à la paroi du champignon pathogène *A. fumigatus*. Ce chapitre résumera les résultats obtenus sur différentes protéines associées à la paroi de *A. fumigatus* et les comparera aux données existantes chez *S. cerevisiae* en insistant particulièrement sur les problèmes techniques et conceptuels rencontrés lors de l'analyse des protéines pariétales. Enfin, des perspectives de recherche à court et moyen terme qui résultent de mon travail de recherche seront présentées.

### **4.1 Les protéines de la paroi**

#### **4.1.1 Prépondérance des protéines solubles dans la paroi de *A. fumigatus***

Les protéines pariétales qui sont extraites par un traitement de la paroi avec un détergent (SDS) et un agent réducteur ( $\beta$ -mercaptoéthanol) contiennent essentiellement deux familles de molécules : (1) des protéines sécrétées qui sont en transit dans la paroi; l'utilisation d'anticorps spécifiques a montré que les 3 antigènes majeurs sécrétés de *A. fumigatus* (la ribonucléase, la dipeptidylpeptidase et la catalase) étaient présents dans cet extrait ; (2) des protéines membranaires et/ou intracellulaires qui se retrouvent fortement associées par des liaisons non covalentes aux différents polymères constitutifs de la paroi consécutivement à la préparation de l'extrait pariétal par broyage aux billes de verre (Molloy et al., 1989). La technique de biotinylation des protéines de surface à l'aide d'un réactif non perméable (Mrsa et al., 1997, Cappellaro et al., 1998) peut se révéler très utile pour ne marquer que les protéines pariétales et éliminer les protéines intracellulaires mais en aucun cas elle ne permet de s'affranchir totalement des protéines membranaires qui peuvent contaminer les extraits pariétaux. Utilisée sur le mycélium de *A. fumigatus*, cette technique de biotinylation a révélé (par Western-blot à l'aide de Streptavidine couplée à la phosphatase alcaline) un profil de protéine similaire à celui obtenu après coloration au bleu de Coomassie, suggérant ainsi une faible contamination des extraits pariétaux par des protéines intracellulaires (non publié).

La proportion de protéines associées de façon non spécifique à la paroi représente la majorité des protéines de la paroi (3,5% du poids sec de la paroi de *A. fumigatus*) alors que les protéines qui restent associées à la paroi après traitement SDS/ $\beta$ -mercaptoéthanol sont en très

faible quantité (0,1% du poids sec de la paroi). Il est donc très difficile de prouver que les protéines qui seront isolées ultérieurement par traitement enzymatique sont des protéines liées de façon covalente aux polysaccharides pariétaux et non des contaminations par des protéines solubles. Dans les études réalisées sur la levure, ce problème n'a pas été soulevé mais les témoins et précautions nécessaires ont été rarement effectués.

#### **4.1.2 Protéines fortement associées à la paroi de *A. fumigatus***

L'extraction de protéines qui seraient associées de façon covalente aux polysaccharides pariétaux résulte logiquement de la dégradation spécifique des polysaccharides pariétaux par  $\beta$ -1,3 glucanase,  $\alpha$ -1,3 glucanase et chitinase. Des glycosylhydrolases recombinantes sont aujourd'hui disponibles et leur utilisation assure la spécificité de la liaison clivée en raison de l'absence d'activité contaminante qui, à l'inverse, ont été mises en évidence dans la plupart des préparations commerciales.

Une seule protéine libérée spécifiquement par  $\beta$ -1,3 glucanase a pu être mise en évidence chez *A. fumigatus*. C'est une phosphatase acide (PhoAp) qui est en faible quantité dans la paroi (0,1% du poids sec de la paroi) et qui est fortement associée au  $\beta$ -1,3 glucane. Du fait de son activité enzymatique et de sa faible quantité dans la paroi, elle ne semble pas avoir un rôle essentiel dans l'organisation de la paroi, d'autant plus que sa disparition en présence de fortes concentrations en phosphate dans le milieu de culture ne se traduit pas par des modifications morphologiques. Aucune protéine associée à la chitine et à l' $\alpha$ -1,3 glucane n'a pu être mise en évidence. L'absence d' $\alpha$ -mannanase recombinante n'a pas permis d'analyser les protéines potentiellement associées au galactomannane. Des hydrolyses chimiques telles que l'acétolyse ou l'oxydation périodique qui dégradent les chaînes de mannanes sont difficilement utilisables car elles dégradent les protéines au moins dans nos conditions expérimentales qui sont les suivantes : acide acétique/anhydride acétique/acide sulfurique (10/10/1) pendant 3 à 24 heures à température ambiante pour l'acétolyse et 25 à 100 mM de méta-périodate de sodium pendant 1 à 7 jours à 4°C pour l'oxydation périodique.

Par ailleurs, les associations protéine-polysaccharide dans la paroi de *A. fumigatus* restent difficiles à analyser pour les raisons suivantes. Des extractions successives de la paroi avec le mélange SDS/ $\beta$ -mercaptoéthanol sont obligatoires pour éliminer efficacement les protéines associées de façon non covalente. Cependant, ces extractions présentent deux inconvénients. (1) Des extractions successives de la paroi avec le mélange SDS/ $\beta$ -mercaptoéthanol (jusqu'à 10 fois) ne permettent pas d'éliminer totalement les protéines



associées de façon non covalente. (2) L'utilisation de SDS pour extraire les protéines est un obstacle majeur à la purification ultérieure des protéines ainsi extraites car, le SDS qui reste associé aux protéines, empêche d'utiliser l'arsenal des techniques de chromatographie, notamment d'échange d'ions, pour les purifier. Or, ce type d'extraction est indispensable et ne peut être remplacé par une autre technique car les traitements avec des détergents non ioniques comme l'octylglucoside ou le Triton X100 ou des agents dénaturants comme l'urée 8M ou le chlorure de sodium 5M ne sont pas du tout efficaces pour libérer la paroi des protéines associées de façon non covalente. En outre, les extraits obtenus par traitement SDS/ $\beta$ -mercaptoéthanol ou glucanases sont toujours contaminés par des molécules de galactomannane, neutres ou chargées, qu'il est très difficile d'isoler des protéines par les techniques classiques de chromatographies d'échange d'ion, d'interaction hydrophobe ou d'affinité lectinique.

Les travaux réalisés chez la levure montrent que les seules protéines ancrées aux  $\beta$ -1,3 glucanes pariétaux sont des protéines GPI ou des protéines PIR (Kapteyn et al., 1999a, Mrsa et al., 1997, Klis et al., 2002). Aucun homologue des protéines GPI pariétales identifiées chez *S. cerevisiae* (mis à part *CRH1* et *CRH2* qui ont des homologies avec des exo-glucanases) n'a été retrouvé dans la séquence du génome de *A. fumigatus*, confirmant ainsi les résultats biochimiques. En revanche, les familles de protéines considérées comme exclusivement membranaires chez *S. cerevisiae* ont des homologues chez *A. fumigatus* (Bernard et al., 2002). *A. fumigatus* peut de plus posséder des protéines ancrées GPI uniques et spécifiques comme l'ont montré les travaux en électrophorèse 2D de Bruneau et al. (2001) : les homologues de Gasp, Ecm33p, Crh1p et Crh2p de *S. cerevisiae* ont été retrouvés chez *A. fumigatus* mais deux protéines, PhoAp et Csa1p, n'ayant pas d'homologue chez *S. cerevisiae*, ont été également identifiées.

Aucune protéine spécifiquement relarguée par  $\beta$ -élimination (NaOH 30 mM à 4°C pendant 16 heures) n'a pu être mise en évidence (résultats non publiés). De plus, aucun homologue des protéines PIR isolées par  $\beta$ -élimination chez *S. cerevisiae* (*PIR1/CCW6*, *CCW7/PIR2/HSP150*, *CCW8/PIR3*, *CCW11/CCW5/PIR4*) n'a été identifié dans le génome de *A. fumigatus*. Ceci est donc en accord avec les résultats de biochimie.

Enfin, des homologues des protéines libérées de la paroi par agents réducteurs ont été recherchés. La plupart de ces protéines a été retrouvée par une recherche d'homologues dans le génome de *A. fumigatus* : Bgt1p (homologue de Bgl2p), Scw3p, Scw4p, Scw10p, Cts1p, Exg1p. Cependant ces protéines n'ont pas été identifiées par séquençage peptidique dans

l'extrait DTT car le traitement du mycélium de *A. fumigatus* par un agent réducteur comme le DTT extrait de très nombreuses protéines. La question de la rupture spécifique des ponts disulfures par les agents réducteurs se pose, étant donné la grande quantité de protéines solubles qui peuvent être libérées de cette façon.

Toutes ces données suggèrent donc qu'il n'y a pas de protéine jouant un rôle essentiel dans l'organisation de la paroi de *A. fumigatus* qui soit associée de façon covalente aux polysaccharides.

#### **4.1.3 La liaison de PhoAp aux $\beta$ -1,3 glucanes**

La forte association des  $\beta$ -1,3 glucanes aux protéines peut avoir deux origines : (1) soit une liaison non covalente ; le relargage du complexe protéine-glucane résulte alors de l'ouverture des mailles du réseau tridimensionnel de la paroi consécutivement à la dégradation des glucanes ; (2) soit une liaison covalente. La mise en évidence de cette liaison doit être prouvée chimiquement par l'analyse structurale de l'oligosaccharide faisant le lien entre le glucose terminal du polysaccharide et un acide aminé de la protéine concernée. Chez *S. cerevisiae*, la preuve chimique de cette liaison a été obtenue 2 fois pour la protéine Tip1 (Fujii et al., 1999) et pour une protéine de nature inconnue (Kollar et al., 1997).

Pour connaître la nature de l'association entre PhoAp et les  $\beta$ -1,3 glucanes, trois stratégies différentes ont été mises en place (Annexe). (1) La première consiste à tester l'affinité de PhoAp pour les  $\beta$ -1,3 glucanes. Ainsi, des essais de « binding » de PhoAp, isolée de la paroi par simple incubation dans un tampon, avec des  $\beta$ -1,3 glucanes ( $\beta$ -1,3 glucane linéaire couplé à des billes d'agarose ou fraction alcali-insoluble de paroi) ont été réalisés. Ces expériences n'ont cependant pas permis de mettre en évidence une affinité particulière de PhoAp pour les  $\beta$ -1,3 glucanes. (2) La deuxième stratégie consiste à isoler et caractériser la nature du peptide C-terminal de la protéine. Suivant l'hypothèse considérée, celui-ci peut être libre (association de PhoAp non covalente) ou lié à des sucres (association covalente de PhoAp aux sucres par la partie glycosidique de l'ancre GPI). La digestion de PhoAp par la trypsine en présence d'eau marquée à  $^{18}\text{O}$  suivie de l'analyse des peptides libérés par spectrométrie de masse pourrait permettre de repérer sélectivement le peptide C-terminal, qui ne serait pas marqué à  $^{18}\text{O}$  s'il était libre contrairement aux autres peptides de la protéine. Ce peptide pourrait alors être caractérisé par sa masse. Cette stratégie a échoué et aucun peptide C-terminal n'a pu être identifié par cette méthode. (3) La structure de la liaison protéine GPI/ $\beta$ -1,6 glucane décrite par Fujii et al. (1999) pour la protéine Tip1p montre que la liaison

entre protéine et  $\beta$ -1,6 glucane implique l'ancre GPI et l'extrémité non réductrice du  $\beta$ -1,6 glucane contrairement aux autres types de glycosylation (N- ou O-glycosylation) pour lesquelles les sucres sont associés à la protéine par leur extrémité réductrice. Un marquage spécifique avec un fluorochrome des sucres réducteurs potentiellement associés à la protéine par l'ancre GPI est alors envisageable et permettrait d'isoler, après digestion trypsique, le glycopeptide C-terminal. Cette stratégie a été appliquée à PhoAp et a aussi échoué (Annexe). Plusieurs raisons peuvent être mises en avant pour expliquer ces échecs : (1) PhoAp est présente dans la paroi en très faible concentration et (2) sa purification est d'autant plus difficile que la paroi a subi un traitement préalable au SDS. Ces résultats montrent l'extrême difficulté qu'il existe à démontrer l'existence ou l'absence d'une liaison covalente entre protéines et polysaccharides. Ceci est vrai chez *A. fumigatus* mais est aussi vrai chez *S. cerevisiae*.

Le fait qu'une protéine soit relarguée de la paroi par laminarinase est seulement un argument en faveur d'une liaison covalente de la protéine aux  $\beta$ -1,3 glucanes. L'identification chimique de la liaison sucre-protéine est nécessaire pour prouver l'existence de la liaison protéine-polysaccharide.

Les différents résultats obtenus permettent d'établir un schéma de l'organisation hypothétique des protéines à l'intérieur de la paroi de *A. fumigatus* (Figure 23). Cette organisation est différente de celle décrite chez la levure (*S. cerevisiae* ou *C. albicans*). Des protéines impliquées dans la biosynthèse de la paroi (famille GEL) et dans la nutrition (PhoAp, dipeptidylpeptidase...) sont présentes dans la paroi. Leur rétention dans la paroi serait assurée soit par un ancrage à la membrane plasmique, soit par piégeage dans le réseau polysaccharidique de la paroi. Leur ancrage aux polysaccharides pariétaux ne semble pas indispensable à leur activité biologique. Pour aller plus loin dans l'étude des protéines associées à la paroi, il serait intéressant d'analyser les protéines relarguées dans le milieu au cours de la régénération des protoplastes. Ceci a déjà été réalisé chez *S. cerevisiae* (Kapteyn et al., 1995, Pardo et al., 1999) et a permis de caractériser certaines protéines pariétales et de décrire les étapes successives de glycosylation de ces protéines. Chez *A. fumigatus*, cette technique, appliquée à différents temps de régénération des protoplastes et couplée à l'analyse en gel 2D, permettrait de différencier les protéines qui au cours de la régénération des protoplastes restent piégées dans la paroi.

## ***4.2 Une nouvelle famille de protéines antigéniques glycosylées par du galactofuranose***

Les extractions pariétales à l'aide de SDS/ $\beta$ -mercaptoéthanol, DTT,  $\beta$ -(1,3) glucanase,  $\alpha$ -(1,3) glucanase et chitinase s'accompagnent de la libération de matériel de haut poids moléculaire migrant sur gel de polyacrylamide et réagissant avec un anticorps anti-galactomannane. Nous nous sommes donc intéressés à ce matériel associé au galactomannane afin d'étudier si des glycoprotéines de *A. fumigatus* pouvaient porter des chaînes de N-glycane particulières comme celles décrites chez la levure (chaînes de 100-200 résidus mannose chez *S. cerevisiae*, chaînes portant à la fois de l' $\alpha$ -mannane et du  $\beta$ -mannane reliés entre eux par une liaison phosphodiester chez *C. albicans*). Cette étude nous a amené à découvrir une nouvelle classe de glycoprotéines extracellulaires dont les N-glycane portent un galactofuranose en position terminale lié en  $\beta$ -(1,2) à la chaîne de mannane. Trois protéines ont ainsi été caractérisées : une phospholipase C, une phytase et une phosphatase alcaline. Les étapes de biosynthèse de ce N-glycane particulier et le rôle de ce type de glycosylation, décrit pour la première fois chez *A. fumigatus*, restent à définir. L'étude des protéines intracellulaires et de leur réactivité avec l'anticorps anti-galactomannane est indispensable afin de voir si cette glycosylation est uniquement associée à des protéines sécrétées ou pas.

D'autres protéines reconnues par l'anticorps spécifique des chaînes de galactofurane ont pu être mises en évidence. Cependant, l'association au galactofurane ne semble pas être liée à une chaîne de N-glycane puisque le signal ne disparaît pas après action de la N-glycosidase F. Trois hypothèses se présentent : (1) l'association de ces protéines au galactomannane est non spécifique, ceci est fortement envisageable étant donné la présence de grandes quantités de galactomannane soluble présentes dans les différents extraits. (2) L'épitope galactofurane se trouve sur une chaîne de O-glycane. Cette hypothèse est aussi possible étant donné la mise en évidence par l'équipe de Baretto-Berger (Haido et al., 1998) d'un complexe glycoprotéique extrait au Cétavlon possédant des résidus galactofuranose sensibles à la  $\beta$ -élimination. (3) L'épitope galactomannane est porté par une chaîne polysaccharidique particulière qui n'est pas N- ou O-liée mais qui pourrait être liée à la protéine par liaison phosphodiester. Cependant, la caractérisation chimique de la liaison ne sera possible qu'après la purification de ces protéines et l'élimination du galactomannane soluble présent dans les différents extraits.

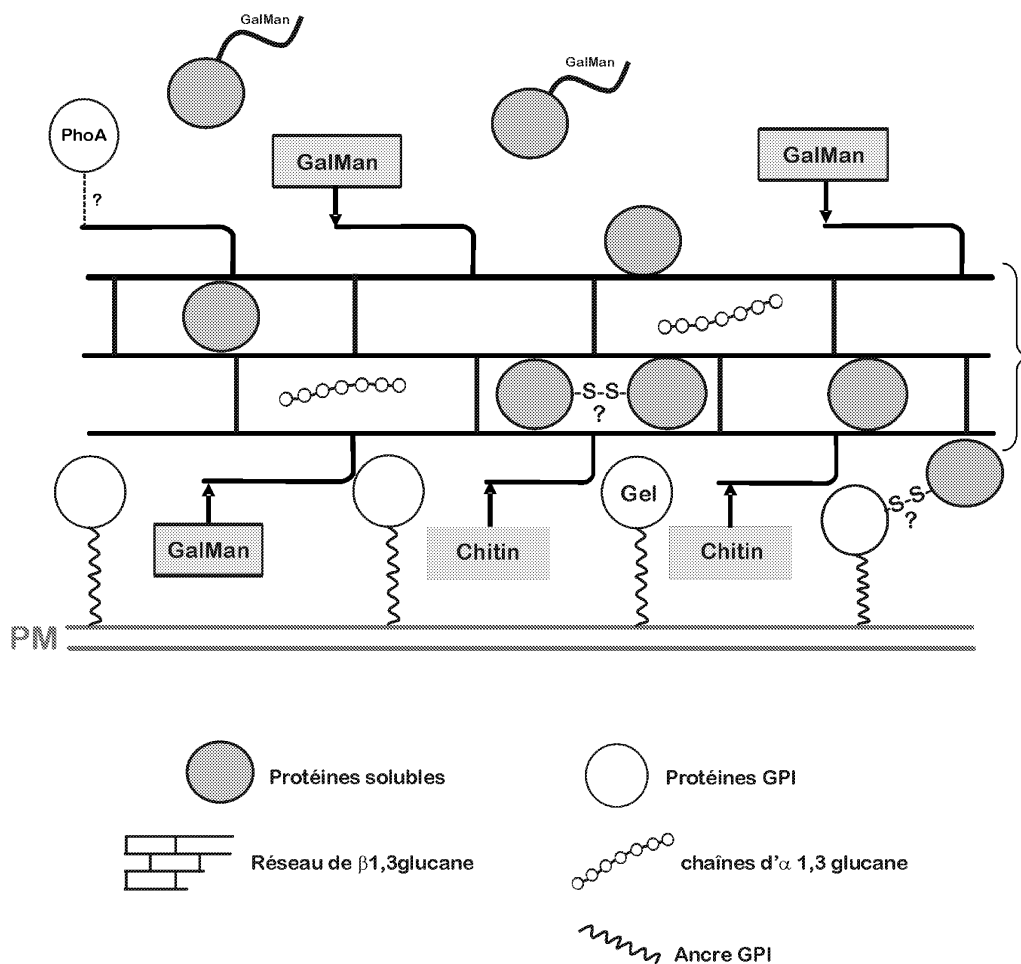


Figure 23 : Organisation hypothétique des protéines dans la paroi du champignon *A. fumigatus*.

### 4.3 L'analyse de mutants de paroi

Devant l'absence de résultats concluant à un rôle essentiel des protéines pariétales dans l'organisation de la paroi, nous avons étudié la morphogenèse de *A. fumigatus* chez les souches sauvages de cette espèce et les deux seuls mutants de paroi ayant une croissance réduite : le double mutant *gel1/gel2* et le double mutant *chsE/chsG*. Le but de cette analyse était double : caractériser les paramètres de croissance et étudier la distribution d'un grand nombre de composants polysaccharidiques et protéiques dans la paroi de *A. fumigatus* au cours des différentes étapes de la croissance.

Les paramètres de croissance du mycélium de *A. fumigatus* devaient d'abord être définis puisque la seule l'étude (Momany & Taylor, 2000) qui avait étudié pour la première fois les étapes de germination et de cytokinèse chez cette espèce donnait des résultats incomplets. Les différentes étapes de croissance ont été caractérisées. Après une période de

dormance, les spores uninucléées gonflent de façon isotropique puis il y a polarisation de la cellule et apparition d'un tube germinatif. La première mitose peut avoir lieu avant ou après la naissance du tube germinatif. Ce tube s'allonge par croissance apicale. Le premier septum apparaît généralement avant la troisième mitose. Ensuite, la cytokinèse se poursuit par la formation en position subapicale d'autres septa à intervalles réguliers. Au cours de la croissance, la cellule apicale s'agrandit et des branchements apparaissent au niveau de différents compartiments subapicaux.

La mutation des gènes codant pour les chitine synthases et glucanosyltransférases s'est traduite par une augmentation du branchement du mycélium aussi bien chez le mutant chitine synthase que chez le mutant glucanosyltransférase, montrant ainsi qu'une altération des gènes intervenant dans la biosynthèse de la paroi peut être associée à un hyper branchement. Le fait que la cellule apicale des mutants soit plus courte et que le mycélium soit plus branché suggère que l'arrivée *de novo* de matériel au niveau de la cellule apicale n'est pas associée à l'allongement de la cellule en raison d'un défaut probable dans l'organisation de la paroi au niveau de l'apex mais que la présence d'un volume nouveau cytoplasmique se traduit plutôt par l'émergence d'un branchement. Ce résultat suggère que formation d'un branchement et élongation de la cellule apicale sont différemment contrôlés. L'élongation de la cellule apicale du mutant *gel1/gel2* est immédiatement bloquée tandis que celle du mutant chitine synthase est plus tardive, suggérant que les gènes codant pour les chitine synthases interviennent après ceux codant pour les glucanosyltransférases au cours de la biosynthèse de la paroi.

Ensuite la localisation des polysaccharides pariétaux et des protéines au niveau de la surface cellulaire n'a mis en évidence aucune différence significative entre les mutants. Ainsi, bien qu'il y ait des variations dans les quantités respectives de chaque polysaccharide composant la paroi entre les mutants et les souches sauvages, leur distribution en surface du tube germinatif n'est pas altérée. Une analyse immunocytochimique des couches internes de la paroi et des septa doit être maintenant entreprise.

## ***4.4 Perspectives***

### **4.4.1 Rôle des protéines GPI dans la biosynthèse de la paroi de *A.***

#### ***fumigatus***

L'analyse par protéomique et génomique comparative des protéines GPI suggère que la majeure partie de ces protéines GPI chez *A. fumigatus* pourraient avoir un rôle dans la

biosynthèse de la paroi. Chez *S. cerevisiae*, l'implication de ces protéines GPI dans la biosynthèse de la paroi a été montrée de deux façons : (1) un grand nombre de ces protéines ont des homologies de séquence avec des glucanases ou des mannosidases (Crh1p, Crh2p, Kre1p, Dcw1p, Dfg5p) (Rodriguez-Pena et al., 2000, Kitagaki et al., 2002) et /ou (2) leur disruption entraîne une modification des propriétés de la paroi liée à une plus grande sensibilité au Calcofluor ou au Rouge Congo et souvent à une réduction de la croissance (Dcw1p, Ecm33p, Crh1p, Crh2p) (Rodriguez-Pena et al., 2000, Kitagaki et al., 2002, Lussier et al., 1997). Cependant, une activité enzymatique n'a été décrite que pour Gel1p et Gel2p qui sont des  $\beta$ -1,3 glucanosyltransférases (Mouyna et al., 2000a, 2000b). Or, les autres protéines peuvent aussi avoir des activités essentielles au remodelage de la paroi comme par exemple le branchement du  $\beta$ -1,3 glucane ou l'assemblage de la chitine ou du galactomannane au  $\beta$ -1,3 glucane. L'ancrage de ces protéines à la membrane par l'intermédiaire de l'ancre GPI est un moyen de faciliter leur activité de remodelage au niveau de la paroi mais leur rôle exact dans l'élaboration de la paroi reste inconnu, d'autant plus que la disruption de ces gènes est rarement létale chez *S. cerevisiae*. Il apparaît donc intéressant de définir leur rôle chez *A. fumigatus*. Pour cela, la solubilisation de ces protéines par action d'une PI-PLC endogène (phosphatidylinositol phospholipase C) sur une préparation membranaire puis la recherche d'activités glucanase ou transglycosidase dans cet extrait pourrait apporter des informations sur l'activité de ces protéines GPI et mettre en évidence de nouvelles activités enzymatiques intervenant dans le remodelage des polysaccharides pariétaux. De plus, la disruption systématique de ces gènes peut être envisagée afin de caractériser les mutants. Cependant, l'existence de familles multigéniques (famille Crhp, Gelp, Dfg5p) est un obstacle à l'obtention de simples mutants ayant un phénotype marqué. L'approche biochimique semble donc la plus adaptée pour isoler des activités nouvelles impliquées dans le remodelage de la paroi.

#### **4.4.2 Rôle des protéines pariétales dans le métabolisme du phosphate**

Parmi les différentes protéines pariétales et extracellulaires qui ont été caractérisées, plusieurs d'entre elles sont impliquées dans le métabolisme du phosphate : une phosphatase acide PhoAp, une phytase PhyAp, une phosphatase alcaline et une phospholipase C ont été isolées. Par ailleurs, des homologues des gènes *PLB1*, *PLB2*, *PLB3* qui sont des protéines GPI codant pour des phospholipases B (non essentielles) chez *S. cerevisiae* ont été trouvés chez *A. fumigatus*. Ainsi, le métabolisme du phosphate semble avoir un rôle très important chez *A.*

*fumigatus*. Or, les protéines impliquées dans cette voie métabolique sont généralement exprimées en fonction de la présence de phosphate inorganique dans le milieu de culture. Chez *A. fumigatus*, on peut imaginer qu'elles sont exprimées différemment *in vivo* et *in vitro* et qu'elles peuvent être essentielles *in vivo* au développement du champignon. Ainsi, l'étude de l'expression différentielle des gènes impliqués dans cette voie métabolique à partir d'un projet transcriptome peut se révéler très intéressante et permettre de distinguer les enzymes exprimées particulièrement *in vivo* et jouant ainsi un rôle potentiel dans la virulence. De même, il est connu que le métabolisme du fer a une grande importance chez les pathogènes. Or, trois protéines GPI impliquées dans le transport du fer ont été récemment mise en évidence chez *S. cerevisiae* (Protchenko et al., 2001). Il serait donc intéressant de savoir si ces protéines sont présentes chez *A. fumigatus* et d'étudier l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme du fer.

#### **4.4.3 Synthèse de la chaîne de N-glycane associée aux galactomannoprotéines**

La mise en évidence de protéines glycosylées par du galactofuranose soulève plusieurs interrogations sur la synthèse des N-glycanes chez *A. fumigatus*, la synthèse plus particulière du galactofuranose et, d'une manière plus générale, la synthèse du galactomannane. En outre, lipogalactomannane vient d'être récemment mis en évidence chez *A. fumigatus* (Costachel, communication personnelle). A ce jour, rien n'est connu sur les mécanismes impliqués dans ces activités de biosynthèse du galactomannane et des N-glycanes galactofuranosylés mis à part la mise en évidence récente d'un.

Quatre types d'enzymes sont indispensables à la synthèse de ces chaînes.

(1) Des mannosyltransférases interviennent dans l'élongation de la chaîne du N-glycane. Aucune mannosyltransférase n'a été décrite à ce jour chez *A. fumigatus*. Des homologues de *MNN9*, *VANI*, *ANP1* et *OCH1* appartenant au complexe réalisant l'élongation des chaînes d' $\alpha$ -1,6 mannane chez *S. cerevisiae* (Jungmann & Munro, 1998) ont été mis en évidence chez *A. fumigatus*. Or, il n'y a pas d' $\alpha$ -1,6 mannane linéaire chez *A. fumigatus*. Il est donc essentiel de définir le rôle de ces protéines chez *A. fumigatus*, à savoir si elles sont impliquées dans la synthèse des N-glycanes et/ou dans l'élongation de la chaîne linéaire de mannane du galactomannane. Au vu de l'unité de répétition du mannane du galactomannane, on peut imaginer qu'au moins une activité  $\alpha$ -1,6 mannosyltransférase et une activité  $\alpha$ -1,2 mannosyltransférase sont nécessaires à la synthèse des N-glycanes et/ou galactomannane.



Ainsi, l'approche génomique qui a permis d'identifier un certain nombre de gènes codant pour des mannosyltransférases putatives doit être couplée à la recherche d'activités mannosyltransférases par méthode biochimique. Un tel projet nécessite d'identifier, au préalable, les accepteurs potentiels de ces activités qui pourraient être un oligosaccharide (un dimannoside comme Man $\alpha$ -1,2Man ou Man $\alpha$ -1,6Man) (Jungmann & Munro, 1998, Doering, 1999) ou un oligosaccharide couplé à un lipide (Abdian et al., 2000).

(2) La synthèse de galactofurane probablement tout d'abord la présence d'une galactose mutase qui permet de transformerait l'UDP-galactopyranose en UDP-galactofuranose, seul nucléosucré pouvant être utilisé pour synthétiser les chaînes de galactofurane. Des enzymes de ce type ont été identifiées et caractérisées chez *Trypanosoma* et *Mycobacterium* (Sanders et al., 2001, Pan et al., 2001). Cependant, aucun homologue n'a été trouvé chez *A. fumigatus* à ce jour.

(3) Ensuite, une activité galactofuranosyltransférase est indispensable au transfert du galactofuranose sur la chaîne de mannane. De telles enzymes ont été décrites chez *S. pombe* (Yoko-O et al., 1998, Chappell et al., 1994). Il s'agit de Gmh3p et Gma12p qui transfèrent un UDP-galactose sur un accepteur oligomannane. Or, *MNN10* de *S. cerevisiae* présente des homologies avec *GMA12*. Ainsi, on peut imaginer que l'homologue de *MNN10* chez *A. fumigatus* code pour une galactosyltransférase.

(4) Enfin, une galactofuranosyltransférase capable de synthétiser les chaînes de galactofurane reste à découvrir. Chez *Mycobacterium*, la mise en évidence d'une telle enzyme (GlfTp) a montré que cette activité nécessitait un accepteur lipidique (Kremer et al., 2001). Aucune activité de ce genre n'a été décrite à ce jour chez *A. fumigatus* bien qu'elle semble essentielle à la synthèse des chaînes de N-mannanes avec galactofuranose et du galactomannane.

#### **4.4.4 Actine et septines dans la cytokinèse chez *A. fumigatus***

Lors de la caractérisation des différentes étapes de germination et de cytokinèse chez *A. fumigatus*, le rôle de l'actine dans l'établissement de chaque étape n'a pas du tout été pris en compte. Or, il est décrit chez *A. nidulans* que l'actine joue un rôle essentiel dans les mouvements intracellulaires, la polarisation de la cellule et la détermination des sites actifs de croissance (Momany et al., 1997). Elle se retrouve sous deux formes différentes dans la cellule fongique : des filaments, alignés de façon parallèle à l'axe de polarisation, et des patches, mobiles, qui sont associés aux invaginations de la membrane plasmique qui se

concentrent au niveau des sites de croissance active et de formation de la paroi. Ainsi la localisation de l'actine permettrait de comprendre certains mécanismes mis en jeu lors de la croissance apicale et le branchement. Cependant, le réseau d'actine de *A. fumigatus* n'a pas été étudié à ce jour. La phalloïdine, utilisée chez les autres eucaryotes, ne se fixe pas à l'actine des champignons. Le suivi de l'actine et de son rôle au cours la cytokinèse implique donc l'utilisation d'un anti-corps anti-actine.

Par ailleurs, d'autres protéines sont impliquées dans les processus de polarisation de la cellule et de cytokinèse (branchement, septation...). Ce sont les septines, qui sont des GTPases, et sont impliquées dans les processus d'organisation cellulaire : polarisation, branchement, septation à la fois chez *S. cerevisiae* et chez *A. nidulans* (Fares et al., 1996, Westfall & Momany, 2002). Chez la levure, elles sont impliquées dans la sporulation, la reconnaissance du site de bourgeonnement, le maintien de la polarité et elles sont localisées à la périphérie de la cellule au niveau du bourgeon (Casamayor & Snyder, 2002). Chez *A. nidulans*, une famille de 5 gènes codant pour des septines a été mise en évidence (Momany et al., 2001) et des anticorps dirigés contre ces protéines ont été synthétisés et ont permis de les localiser. Elles se concentrent au niveau du site de septation de façon dépendante à l'actine, elles semblent être un déterminant des sites de branchement et de bipolarisation où elles sont localisées sous forme d'un anneau. Ainsi, elles se révèlent être le seul marqueur de site de branchement connu.

L'étude et la localisation de ces protéines chez *A. fumigatus* peut apporter des informations sur les mécanismes d'organisation cellulaire et le trafic des enzymes de synthèse des polysaccharides de la paroi. De plus, l'analyse morphologique des mutants de paroi a mis en évidence un ralentissement de la croissance apicale au profit d'un branchement des cellules, c'est à dire une modification des sites actifs de croissance. Les septines peuvent être associées à ces modifications. Ainsi, un projet sur l'identification des septines de *A. fumigatus* et leur localisation par la production d'anticorps spécifique permettrait d'approfondir les mécanismes mis en jeu lors de la cytokinèse.

# **Références bibliographiques**

## 5 RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdian, P. L., Lellouch, A. C., Gautier, C., Ielpi, L. & Geremia, R. A. (2000). Identification of essential amino acids in the bacterial alpha -mannosyltransferase aceA. *J. Biol. Chem.* **275**, 40568-40575.
- Algranati, D., Behrens, N., Carminatti, H. & Cabib, E. (1966). Mannan synthetase from yeast. *Meth. Enzymol.* **13**, 411-416.
- Arvindekar, A. U. & Patil, N. B. (2002). Glycogen-a covalently linked component of the cell wall in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **19**, 131-139.
- Aufauvre-Brown, A., Mellado, E., Gow, N. A. R. & Holden, D. W. (1997). *Aspergillus fumigatus chsE*: a gene related to *CHS3* of *Saccharomyces cerevisiae* and important for hyphal growth and conidiophore development but not pathogenicity. *Fungal Genet. Biol.* **21**, 141-152.
- Bailey, D. A., Feldmann, P. J., Bovey, M., Gow, N. A. & Brown, A. J. (1996). The *Candida albicans* HYR1 gene, which is activated in response to hyphal development, belongs to a gene family encoding yeast cell wall proteins. *J. Bacteriol.* **178**, 5353-5360.
- Ballou, C. E. (1990). Isolation, characterization, and properties of *Saccharomyces cerevisiae* mnn mutants with nonconditional protein glycosylation defects. *Methods Enzymol.* **185**, 440-70.
- Ballou, C. E. & Frevert, J. (1985). *Saccharomyces cerevisiae* structural cell wall mannoprotein. *Biochemistry* **24**, 753-759.
- Ballou, L., Cohen, R. E. & Ballou, C. E. (1980). *Saccharomyces cerevisiae* mutants that make mannoproteins with a truncated carbohydrate outer chain. *J. Biol. Chem.* **255**, 5986-5991.
- Ballou, C. E. (1976). Structure and biosynthesis of the mannan component of the yeast cell envelope. In *Advances in Microbial Physiology*. Edited by A. H. Rose & D. W. Tempest. London, NY, San Francisco: Academic Press.
- Barreto-Bergter, E., Travassos, L. R. & Gorin, P. A. J. (1980). Chemical structure of the D-galacto-D-mannan component from hyphae of *Aspergillus niger* and other *Aspergillus* spp. *Carbohydr. Res.* **86**, 273-285.
- Bart-Delabesse, E., Sarfati, J., Debeaupuis, J. P., van Leeuwen, W., van Belkum, A., Bretagne, S. & J.P., L. (2001). Comparison of restriction fragment length polymorphism, microsatellite length polymorphism, and random amplification of polymorphic DNA analyses for fingerprinting *Aspergillus fumigatus* isolates. *J. Clin. Microb.* **39**, 2683-2686.
- Beauvais, A., Bruneau, J. M., Mol, P. C., Buitrago, M. J., Legrand, R. & Latgé, J. P. (2001). Glucan synthase complex of *Aspergillus fumigatus*. *J. Bact.* **183**, 2273-2279.
- Beauvais, A., Drake, R., Ng, K., Diaquin, M. & Latgé, J. P. (1993). Characterization of the 1,3-beta-glucan synthase of *Aspergillus fumigatus*. *J. Gen. Microbiol.* **39**, 3071-3078.
- Beauvais, A., Morelle, W., Diaquin, M. & Latgé, J. P. (2003). Two  $\alpha(1-3)$  glucan synthases with different functions in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryotic Cell Soumis*.
- Bom, I. J., Dielbandhosing, S. K., Harvey, K. N., Oomes, S. J. C. M., Klis, F. M. & Brul, S. (1998). A new tool for studying the molecular architecture of the fungal cell wall: one-step purification of recombinant *Trichoderma*  $\beta(1-6)$ -glucanase expressed in *Pichia pastoris*. *Biochem. Biophys. Acta* **1425**, 419-424.
- Bourdineaud, J. P., van der Vaart, J. M., Donzeau, M., de Sampaio, G., Verrips, C. T. & Lauquin, G. J. (1998). Pmt1 mannosyl transferase is involved in cell wall incorporation of several proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* **27**, 85-98.

- Bozza, S., Gaziano, R., Spreca, A., Bacci, A., Montagnoli, C., di Francesco, P. & Romani, L. (2002).** Dendritic cells transport conidia and hyphae of *Aspergillus fumigatus* from the airways to the draining lymph nodes and initiate disparate Th responses to the fungus. *J. Immunol.* **168**, 1362-71.
- Braun, B. R., Head, W. S., Wang, M. X. & Johnson, A. D. (2000).** Identification and Characterization of *TUP1*-Regulated Genes in *Candida albicans*. *Genetics* **156**, 31-44.
- Brown, J. S., Aufauvre-Brow, A. & Holden, D. W. (1998).** Insertional mutagenesis of *Aspergillus fumigatus*. *Mol. Gen. Genet.* **259**, 327-335.
- Bruneau, J. M. (2001).**  $\beta$ -1,3 glucane synthase et protéines ancrées par un glycosylphosphatidylinositol chez *Aspergillus fumigatus* : analyse du protéome de *Candida albicans* sous l'effet d'antifongiques. *Thèse, Université Paris VII*.
- Bruneau, J. M., Magnin, T., Tagat, E., Legrand, R., Bernard, M., Diaquin, M., Fudali, C. & Latgé, J. P. (2001).** Proteome analysis of *Aspergillus fumigatus* identifies glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins associated to the cell wall biosynthesis. *Electrophoresis* **22**, 2812-2823.
- Bulawa, C. E. (1993).** Genetics and molecular biology of chitin synthesis in fungi. *Annu. Rev. Microbiol.* **47**, 505-534.
- Bulawa, C. E., Slater, M., Cabib, E., Au-Young, J., Sburlati, A., Adair, W. L. J. & Robbins, P. W. (1986).** The *Saccharomyces cerevisiae* structural gene for chitin synthase is not required for chitin synthesis *in vivo*. *Cell* **46**, 213-225.
- Cabib, E., Roh, D. H., Schmidt, M., Crotti, L. B. & Varma, A. (2001).** The Yeast Cell Wall and Septum as Paradigms of Cell Growth and Morphogenesis. *J. Cell Biol.* **276**, 19679-19682.
- Calera, J. A., Paris, S., Monod, M., Hamilton, A. J., Debeauvais, J. P., Diaquin, M., Lopez-Medrano, R., Leal, F. & Latgé, J. P. (1997).** Cloning and disruption of the antigenic catalase gene of *Aspergillus fumigatus*. *Infect. Immun.* **65**, 4718-4724.
- Cao, L., Chan, C. M., Lee, C., Wong, S. S. & Yuen, K. Y. (1998).** *MP1* Encodes an Abundant and Highly Antigenic Cell Wall Mannoprotein in the Pathogenic Fungus *Penicillium marneffeii*. *Infect. Immun.* **66**, 966-973.
- Cappellaro, C., Morsa V. & Tanner, W. (1998).** New Potential Cell Wall Glucanases of *Saccharomyces cerevisiae* and Their Involvement in Mating. *J. Bacteriol.* **180**, 5030-5037.
- Caro, L. H., Tettelin, H., Vossen, J. H., Ram, A. F., van den Ende, H. & Klis, F. M. (1997).** *In silico* identification of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored plasma-membrane and cell wall proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**, 1477-1489.
- Casamayor, A. & Snyder, M. (2002).** Bud-site selection and cell polarity in budding yeast. *Curr. Opin. Microbiol.* **5**, 179-186.
- Casanova, M., Lopez-Ribot, J. L., Monteagudo, C., Llombart-Bosch, A., Sentandreu, R. & Martinez, J. P. (1992).** Identification of a 58-kilodalton cell surface fibrinogen-binding mannoprotein from *Candida albicans*. *Infect. Imm.* **60**, 4221-4229.
- Casanova, M., Gil, M. L., Cardenoso, L., Martinez, J. P. & Sentandreu, R. (1989).** Identification of wall-specific antigens synthesized during germ tube formation by *Candida albicans*. *Infect. Immun.* **57**, 262-71.
- Cenci, E., Mencacci, A., Del Sero, G., Bacci, A., Montagnoli, C., Fè D'ostiani, C., Mosci, P., Bachmann, M., Bistoni, F., Kopf, M. & Romani, L. (1999).** Interleukin-4 causes susceptibility to invasive pulmonary aspergillosis through suppression of protective type I responses. *J. Infect. Dis.* **180**, 1957-1968.
- Cenci, E., Perito, S., Enssle, K. H., Mosci, P., Latgé, J. P., Romani, L. & Bistoni, F. (1997).** Th1 and Th2 cytokines in mice with invasive aspergillosis. *Infect. Immun.* **65**, 564-570.
- Chappell, T. G., Hajibagheri, M. A., Ayscough, K., Pierce, M. & Warren, G. (1994).** Localization of an alpha 1,2 galactosyltransferase activity to the Golgi apparatus of *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Biol. Cell.* **5**, 519-528.

- Chazalet, V., Debeaupuis, J. P., Sarfati, J., Lorthoraly, J., Ribaud, P., Shah, P., Cornet, M., Vu Thien, H., Gluckman, E., Brücker, G. & Latgé, J. P. (1998).** Molecular typing of environment and patients isolates of *Aspergillus fumigatus* in various hospital situation. *J. Clin. Microbiol.* **36**, 1494-1500.
- Chiller, T., Farrokshad, K., Brummer, E. & Stevens, D. A. (2000).** Influence of human sera on the *In vitro* activity of the echinocandin caspofungi (MK-0991) against *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 3302-3305.
- Cid, V. J., Duran, A., Del Rey, F., Snyder, M. P., Nombela, C. & Sanchez, M. (1995).** Molecular basis of cell integrity and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* **59**, 345-386.
- Cormak, B. P., Ghori, N. & Falkow, S. (1999).** An adhesin of the yeast pathogen *Candida glabrata* mediating adherence to human epithelial cells. *Science* **285**, 578-582.
- Coulot, P., Bouchara, J. P., Renier, G., Annaix, V., Planchenault, C., Tronchin, G. & Chabasse, D. (1994).** Specific interactions of *Aspergillus fumigatus* with fibrinogen and its role in cell adhesion. *Infect. Immun.* **62**, 2169-2177.
- Cutler, J. E. (2001).** N-glycosylation of yeast, with emphasis on *Candida albicans*. *Med. Mycol.* **39**, 75-86.
- d'Enfert, C., Weidner, G., Mol, P. C. & Brakhage, A. A. (1999).** Transformation systems of *Aspergillus fumigatus*. New tools to investigate fungal virulence. *Contrib. Microbiol.* **2**, 149-66.
- De Nobel, H. & Lipke, P. N. (1994).** Is there a role for GPIs in yeast cell-wall assembly ? *Trends Cell Biol.* **4**, 42-45.
- De Nobel, J. H. & Barnett, J. A. (1991).** Passage of molecules through yeast cell walls: a brief essay-review. *Yeast* **7**, 313-323.
- De Nobel, H., Klis, F. M., Munnik, F. M., Priem, J. & Van Den Ende, H. (1990a).** An assay of relative cell wall porosity in *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* **6**, 483-490.
- De Nobel, J. G., Klis, F. M., Priem, J., Munik, T. & Van Den Ende, H. (1990b).** The glucanase-soluble mannoproteins limit cell wall porosity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **6**, 491-499.
- De Sampaio, G., Bourdineaud, J. P. & Lauquin, G. J. (1999).** A constitutive role for GPI anchors in *Saccharomyces cerevisiae*: cell wall targeting. *Mol Microbiol* **34**, 247-56.
- Dean, N. (1999).** Asparagine-linked glycosylation in the yeast Golgi. *Biochem. Biophys.* **1426**, 309-322.
- Delgado, M. L., O'Connor, J. E., Azorin, I., Renau-Piqueras, J., Gil, M. L. & Gozalbo, D. (2001).** The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase polypeptides encoded by the *Saccharomyces cerevisiae* *TDH1*, *TDH2* and *TDH3* genes are also cell wall proteins. *Microbiology* **147**, 411-417.
- DeMarini, D. J., Adams, A. E. M., Fares, H., De Virgilio, C., Valle, G., Chuang, J. S. & Pringle, J. R. (1997).** A septin-based hierarchy of proteins required for localized deposition of chitin in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *J. Cell Biol.* **139**, 75-93.
- Denning, D. W., Anderson, M. J., Turner, G., Latgé, J. P. & Bennett, J. W. (2002).** Sequencing the *Aspergillus fumigatus* genome. *Lancet Infect. Dis.* **2**, 251-253.
- Denning, D. W. (1998).** Invasive aspergillosis. *Clin. Infect. Dis.* **26**, 781-805.
- Denning, D. W., Hanson, L. H. & Stevens, D. A. (1990).** *In vitro* activity of saperconazole (R 66 905) compared with amphotericin B and itraconazole against *Aspergillus* species. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **9**, 693-698.
- Destruelle, M., Holzer, H. & Klionsky, D. J. (1994).** Identification and characterization of a novel yeast gene: the YGPI gene product is a highly glycosylated secreted protein that is synthesized in response to nutrient limitation. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 2740-2754.

- Dijkgraaf, G. J., Abe, M., Ohya, Y. & Bussey, H. (2002).** Mutations in Fks1p affect the cell wall content of  $\beta$ -1,3- and  $\beta$ 1,6-glucan in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **19**, 671-690.
- Doering, T. L. (1999).** A Unique  $\alpha$ -1,3 Mannosyltransferase of the Pathogenic Fungus *Cryptococcus neoformans*. *J. Bacteriol.* **181**(17), 5482-5488.
- Douglas, C. M. (2001).** Fungal beta(1,3)-D-glucan synthesis. *Med. Mycol.* **39 Suppl 1**, 55-66.
- Douglas, C. M., Foor, F., Marrinan, J. A., Morin, N., Nielsen, J. B., Dahl, A. M., Mazur, P., Baginsky, W., Li, W., El-Sherbeini, M., Clemas, J. A., Mandala, S. M., Frommer, F. R. & Kurtz, M. B. (1994a).** The *Saccharomyces cerevisiae* FKS1 (ETG1) gene encodes an integral membrane protein which is a subunit of 1,3- $\beta$ -D-glucan synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **91**, 12907-12911.
- Douglas, C. M., Marrinan, J. A., Li, W. & Kurtz, M. B. (1994b).** A *Saccharomyces cerevisiae* mutant with echinocandin-resistant  $\beta$ -1,3-D-glucan synthase. *J. Bacteriol.* **176**, 5686-5696.
- Eissenberg, L. G., Moser, S. A. & Goldman, W. E. (1997).** Alterations to the cell wall of *Histoplasma capsulatum* yeasts during infection on macrophages or epithelial cells. *J. Infect. Dis.* **175**, 1538-1544.
- Elorza, M. V., Murgui, A. & Sentandreu, R. (1985).** Dimorphism in *Candida albicans*: contribution of mannoproteins to the architecture of yeast and mycelial cell walls. *J. Gen. Microbiol.* **131**, 2209-16.
- Eng, W. K., Faucette, L., McLaughlin, M. M., Cafferkey, R., Koltin, Y., Morris, R. A., Young, P. R., Johnson, R. K. & Livi, G. P. (1994).** The yeast *FKS1* gene encodes a novel membrane protein, mutations in which confer FK506 and cyclosporin A hypersensitivity and calcineurin-dependent growth. *Genetics* **151**, 61-71.
- Ernst, J. F. & Prill, S. K. (2001).** O-glycosylation. *Med Mycol* **39**, 67-74.
- Fares, H., Goetsch, L. & Pringle, J. R. (1996).** Identification of a developmentally regulated septin and involvement of the septins in spore formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **132**, 399-411.
- Ferguson, M. A. (1999).** The structure, biosynthesis and functions of glycosylphosphatidylinositol anchors, and the contributions of trypanosome research. *J. Cell Sci.* **112**, 2799-809.
- Ferguson, M. A. (1992).** Colworth medal lecture. Glycosylphosphatidylinositol membrane anchors: the table of a tail. *Biochem. Soc. Trans.* **20**, 243-256.
- Firon, A., Beauvais, A., Latgé, J. P., Couvé, E., Grosjean-Cournoyer, M. C. & d'Enfert, C. (2002).** Characterization of essential genes by parasexual genetics in the human fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*: impact of genomic rearrangements associated with electroporation of DNA. *Genetics* **161**, 1077-1087.
- Fleet, G. H. (1991).** Cell walls. In *The Yeasts*, pp. 199-277. Edited by A. H. Rose & J. S. Harrison. New York: Academic Press.
- Flury, I., Benachour, A. & Conzelmann, A. (2000).** YLL031c belong to a novel family of membrane proteins involved in the transfer of ethanolaminephosphate onto the core structure of glycosylphosphatidylinositol anchors in yeast. *J. Biol. Chem.* **275**, 24458-24465.
- Fontaine, T., Magnin, T., Melhert, A., Lamont, D., Latgé, J. P. & Ferguson, M. A. J. (2003).** Structures of the glycosylphosphatidylinositol membrane anchors from *Aspergillus fumigatus* membrane proteins. *Glycobiology* **13**, (in press).
- Fontaine, T., Simenel, C., Dubreucq, G., Adam, O., Delepierre, M., Lemoine, J., Vorgias, C. E., Diaquin, M. & Latgé, J. P. (2000).** Molecular organization of the alkali-insoluble fraction of *Aspergillus fumigatus* cell wall. *J. Biol. Chem.* **275**, 27594-27607.
- Fontaine, T., Hartland, R., Beauvais, A., Diaquin, M. & Latgé, J. P. (1997a).** Purification and characterization of an endo-1,3- $\beta$ -glucanase from *Aspergillus fumigatus*. *Eur. J. Biochem.*, 315-321.

- Fontaine, T., Hartland, R. P., Diaquin, M., Simenel, C. & Latgé, J. P. (1997b). Differential patterns of activity displayed by two exo- $\beta$ -1,3 glucanases associated with the *Aspergillus fumigatus* cell wall. *J. Bacteriol.* **179**, 3154-3163.
- Frevert, J. & Ballou, C. E. (1985). *Saccharomyces cerevisiae* structural cell wall mannoprotein. *Biochemistry* **24**, 753-9.
- Fujii, T., Shimoi, H. & Iimura, Y. (1999). Structure of the glucan-binding sugar chain of Tip1p, a cell wall protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* **1427**, 133-144.
- Gander, J. E., Jentoft, N. H., Drewes, L. R. & Rick, P. D. (1974). The 5-O-beta-D-galactofuranosyl-containing exocellular glycopeptide of *Penicillium charlesii*. Characterization of the phosphogalactomannan. *J. Biol. Chem.* **249**, 2063-2072.
- Garcia-Rodriguez, L. J., Trilla, J. A., Castro, C., Valdivieso, M. H., Duran, A. & Roncero, C. (2000). Characterization of the chitin biosynthesis process as a compensatory mechanism in the *fks1* mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **478**, 84-88.
- Garner, R. E., Rubanowice, K., Sawyer, R. T. & Hudson, J. A. (1994). Secretion of TNF- $\alpha$  by alveolar macrophages in response to *Candida albicans* mannan. *J. Leukoc. Biol.* **55**, 161-168.
- Gaynor, E. C., Mondesert, G., Grimme, S. J., Reed, S. I., Orlean, P. & Emr, S. D. (1999). MCD4 encodes a conserved endoplasmic reticulum membrane protein essential for glycosylphosphatidylinositol anchor synthesis in yeast. *Mol. Biol. Cell* **10**, 627-48.
- Gemmill, T. R. & Trimble, R. B. (1999). Overview of N- and O-linked oligosaccharide structures found in various yeast species. *Biochem. Biophys. Acta* **1426**, 227-237.
- Gentsch, M. & Tanner, W. (1997). Protein-O-glycosylation in yeast: protein-specific mannosyltransferases. *Glycobiology* **7**, 481-6.
- Gentsch, M. & Tanner, W. (1996). The PMT gene family: protein O-glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae* is vital. *Embo J.* **15**, 5752-5789.
- Girardin, H., Paris, S., Rault, J., Bellon-Fontaine, M. N. & Latgé, J. P. (1999). The role of the rodlet structure on the physicochemical properties of *Aspergillus* conidia. *Appl. environm. microbiol.* **29**, 364-369.
- Girrbach, V., Zeller, T., Priesmeier, M. & Strahl-Bolsinger, S. (2000). Structure-function analysis of the dolichyl phosphate-mannose protein O-mannosyltransferase ScPmt1p. *J. Biol. Chem.* **275**, 19288-19296.
- Goodley, J. M., Clayton, Y. M. & Hay, R. J. (1994). Environmental sampling for *Aspergilli* during building construction on a hospital site. *J. Hosp. Infect.* **26**, 27-35.
- Graziutti, M., Przepiorka, D., Rex, J. H., Braunschweig, I., Vadhan-Raj, S. & Savary, C. A. (2001). Dendritic cell-mediated stimulation of the *in vitro* lymphocyte response to *Aspergillus*. *Bone Marrow Transplant* **27**, 647-652.
- Grimme, S. J., Westfall, B. A., Wiedman, J. M., Taron, C. H. & Orlean, P. (2001). The essential Smp3 protein is required for addition of the side-branching fourth mannose during assembly of yeast glycosylphosphatidylinositols. *J Biol Chem* **276**, 27731-9.
- Groll, A. H., Mickiene, D., Petraitis, V., Petraitiene, R., Ibrahim, K. H., Piscitelli, S. C., Bekersky, I. & Walsh, T. J. (2001). Compartmental pharmacokinetics and tissue distribution of the antifungal echinocandin lipopeptide micafungin (FK463) in rabbits. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 3322-3327.
- Groll, A. H., Shah, P. M., Mentzel, C., Schneider, M., Just-Nuebling, G. & Huebner, K. (1996). Trends in the postmortem epidemiology of invasive fungal infections at a University hospital. *J. Infect.* **33**, 23-32.
- Haido, R. M. T., Silva, M. H., Ejzemberg, R., Leitao, E. A., Hearn, V. M., Evans, G. V. & Barreto Bergter, E. (1998). Analysis of peptidogalactomannans from the mycelial surface of *Aspergillus fumigatus*. *Med. Mycol.* **36**, 313-321.



- Hamada, K., Terashima, H., Arisawa, M., Yabuki, N. & Kitada, K. (1999).** Amino acid residues in the omega-minus region participate in cellular localization of yeast glycosylphosphatidylinositol-attached proteins. *J Bacteriol* **181**, 3886-9.
- Hamada, K., Terashima, H., Arisawa, M. & Kitada, K. (1998a).** Amino acid sequence requirement for efficient incorporation of glycosylphosphatidylinositol-associated proteins into the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **273**, 26946-26953.
- Hamada, K., Fukuchi, S., Arisawa, M., Baba, M. & Kitada, K. (1998b).** Screening for glycosylphosphatidylinositol (GPI)-dependent cell wall proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* **258**, 53-59.
- Hartland, R. P., Fontaine, T., Debeauvais, J. P., Simenel, C., Delepierre, M. & Latgé, J. P. (1996).** A novel  $\beta$ -(1-3)-glucanoyltransferase from the cell wall of *Aspergillus fumigatus*. *J. Biol. Chemis.* **271**, 26843-26849.
- Hearn, V. M., Escott, G. M., Glyn, E., Evans, V. & Adams, D. J. (1998).** Complex chitinolytic system of *Aspergillus fumigatus*. *Microbios* **93**, 85-104.
- Hebart, H., Bollinger, C., Fisch, P., Sarfati, J., Meisner, C., Baur, M., Loeffler, J., Monod, M., Latgé, J. P. & Einsele, H. (2002).** Analysis of t-cell responses to *Aspergillus fumigatus* antigens in healthy individuals and patients with hematological malignancies. *Blood* **100**, 4521-4528.
- Hernandez, L. M., Ballou, L., Alvarado, E., Tsai, P. K. & Ballou, C. E. (1989).** Structure of the phosphorylated *N*-linked oligosaccharides from the *mnn9* and *mnn10* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **264**, 13648-13659.
- Herscovics, A. (1999).** Processing glycosidases of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Acta* **1426**, 275-285.
- Herscovics, A. & Orlean, P. (1993).** Glycoprotein biosynthesis in yeast. *Faseb J.* **7**, 540-50.
- Hochstenbach, F., Klis, F. M., Van Den Ende, H., Van Donselaar, E., Peters, P. J. & Klausner, R. D. (1998).** Identification of a putative alpha-glucan synthase essential for cell wall construction and morphogenesis in fission yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 9161-9166.
- Hoyer, L. L. (2001).** The *ALS* gene family of *Candida albicans*. *Trends in Microbiol.* **9**, 176-180.
- Hsi, K. L., Nuwaysir, L. & Dupont, D. R. (1999).** An alternative method for the isolation and identification of C-terminal peptide of protein. *Prot. Pept. Lett.* **6**, 195-201.
- Ibrahim-Granet, O., Philippe, B., Boleti, H., Boisvieux-Ulrich, E., Grenet, D., Stern, M. & Latgé, J. P. (2003).** Phagocytosis and intracellular fate of *Aspergillus fumigatus* conidia in alveolar macrophages. *Infect. Immun.* **71**, 891-903.
- Inoue, S. B., Takewaki, N., Takasuka, T., Moi, T., Adachi, M., Fuji, Y., Miyamoto, C., Arisawa, M., Furuichi, Y. & Watanabe, T. (1995).** Characterization and gene cloning of 1,3- $\beta$ -D-glucan synthase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **231**, 845-854.
- Iranzo, M., Aguado, C., Palloti, C., Canizares, J. V. & Mormeneo, S. (2002).** The use of trypsin to solubilize wall proteins from *Candida albicans* led to the identification of chitinase 2 as an enzyme covalently linked to the yeast wall structure. *Res. Microbiol.* **153**, 227-232.
- Jahn, B., Boukhallouk, F., Lotz, J., Langfelder, K., Wanner, G. & Brakhage, A. A. (2000).** Interaction of human phagocytes with pigmentless *Aspergillus* conidia. *Infect. Immun.* **68**, 3736-3739.
- Jaton-Ogay, K., Paris, S., Huerre, M., Quadroni, M., Falchetto, R., Togni, G., Latgé, J. P. & Monod, M. (1994).** Cloning and disruption of the gene encoding an extracellular metalloprotease of *Aspergillus fumigatus*. *Mol. Microbiol.* **14**, 917-928.
- Jensen, H. E., Stynen, D., Sarfati, J. & Latgé, J. P. (1993).** Detection of galactomannan and the 18 kDa antigen from *Aspergillus fumigatus* in serum and urine from cattle with systemic aspergillosis. *J. Vet. Med.* **24**, 397-408.

- Jentoft, N. (1990). Why are proteins O-glycosylated ? *Trends Biochem. Sci.* **15**, 291-194.
- Jigami, Y. & Odani, T. (1999). Mannosylphosphate transfer to yeast mannan. *Biochim. Biophys. Acta* **1426**, 335-345.
- Jouault, T., Lepage, G., Bernigaud, A., Trinel, P. A., Fradin, C., Wieruszeski, J. M., 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.
- Jouault, T., Bernigaud, A., Lepage, G., Trinel, P. A. & Poulain, D. (1994). The *Candida albicans* phospholipomannan induces *in vitro* production of tumour necrosis factor- $\alpha$  from human and murine macrophages. *Immunol.* **83**, 268-273.
- Jungmann, J., Rayner, J. C. & Munro, S. (1999). The *Saccharomyces cerevisiae* protein Mnn10p/Bed1p is a subunit of a Golgi mannosyltransferase complex. *J. Biol. Chem.* **274**, 6579-6585.
- Jungmann, J. & Munro, S. (1998). Multi-protein complexes in the cis Golgi of *Saccharomyces cerevisiae* with alpha alpha-1,6-mannosyltransferase activity. *EMBO J.* **17**, 423-434.
- Kan, V. L. & Bennett, J. E. (1991). beta (1-4) oligoglucosides inhibit the binding of *Aspergillus fumigatus* conidia to human monocytes. *J. Infect. Dis.* **163**, 1154-1156.
- Kan, V. L. & Bennett, J. E. (1988). Lectin-like attachments sites on murine pulmonary alveolar macrophages bind *Aspergillus fumigatus* conidia. *J. Infect. Dis.* **158**, 407-414.
- Kanbe, T. & Cutler, J. E. (1998). Minimum chemical requirements for adhesin activity of the acid-stable part of *Candida albicans* cell wall phosphomannoprotein complex. *Infect. Imm.* **66**, 5812-5818.
- Kandasamy, R., Vedyappan, G. & Chaffin, W. J. (2000). Evidence for the presence of Pir-like proteins in *Candida albicans*. *FEMS Microbiol. Lett.* **186**, 239-243.
- Kapteyn, J. C., ter Riet, B., Vink, E., Blad, S., De Nobel, H., Van Den Ende, H. & Klis, F. M. (2001). Low external pH induces HOG1-dependent changes in the organisation of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Mol. Microbiol.* **39**, 469-479.
- Kapteyn, J. C., Hoyer, L. L., Hecht, J. E., Muller, W. H., Andel, A., Verkleij, A. J., Makarow, M., Van Den Ende, H. & Klis, F. M. (2000). The cell wall architecture of *Candida albicans* wild-type cells and cell wall-defective mutants. *Mol. Microbiol.* **35**, 601-611.
- Kapteyn, J. C., Van Den Ende, H. & Klis, F. M. (1999a). The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall. *Biochim. Biophys. Acta* **1426**, 373-383.
- Kapteyn, J. C., Van Egmond, P., Sievi, E., Van Den Ende, H., Makarow, M. & Klis, F. M. (1999b). The contribution of the O-glycosylated protein Pir2p/Hsp150 to the construction of the yeast cell wall in wild-type cells and beta 1,6-glucan-deficient mutants. *Mol. Microbiol.* **31**, 1835-1844.
- Kapteyn, J. C., Ram, A. F. J., Groos, E. M., Kollar, R., Montijn, R. C., Van Den Ende, H., Llobell, A., Cabib, E. & Klis, F. M. (1997). Altered extent of cross-linking of  $\beta$ 1,6-glucosylated mannoproteins to chitin in *Saccharomyces cerevisiae* mutant with reduced cell wall  $\beta$ 1,3-glucan content. *J. Bacteriol.* **179**, 6279-6284.
- Kapteyn, J. C., Montijn, R. C., Vink, E., de la Cruz, J., Llobell, A., Douwes, J. E., Shimoi, H., Lipke, P. N. & Klis, F. M. (1996). Retention of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall proteins through a phosphodiester-linked  $\beta$ -1,3- $\beta$ -1,6-glucan heteropolymer. *Glycobiology* **6**, 337-345.
- Kapteyn, J. C., Dijkgraaf, G. J., Montijn, R. C. & Klis, F. M. (1995a). Glucosylation of cell wall proteins in regenerating spheroplasts of *Candida albicans*. *FEMS Microbiol. Lett.* **128**, 271-277.
- Kapteyn, J. C., Montijn, R. C., Dijkgraaf, G. J., Van Den Ende, H. & Klis, F. M. (1995b). Covalent association of  $\beta$ -1,3-glucan with  $\beta$ -1,6-glucosylated mannoproteins in cell walls of *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* **177**, 3788-3792.

- Kapteyn, J. C., Montijn, R. C., Dijkgraaf, G. J. P. & Klis, F. M. (1994).** Identification of  $\beta$ -1,6-glycosylated cell wall proteins in yeast and hyphal forms of *Candida albicans*. *Eur. J. Cell. Biol.* **65**, 402-407.
- Katayama, S., Hirata, D., Arellano, M., Pérez, P. & Toda, T. (1999).** Fission yeast  $\alpha$ -glucan synthase *mok1* requires the actin cytoskeleton to localize the sites of growth and plays an essential role in cell morphogenesis downstream of protein kinase C function. *J. Cell Biol.* **144**, 1173-1186.
- Kitagaki, H., Wu, H., Shimoi, H. & Ito, K. (2002).** Two homologous genes, DCW1 (YKL046c) and DFG5, are essential for cell growth and encode glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored membrane proteins required for cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* **46**(4), 1011-1022.
- Klebl, F. & Tanner, W. (1989).** Molecular cloning of a cell wall exo- $\beta$ -1,3-glucanase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **171**, 6259.
- Klis, F. M., Mol, P., Hellingwerf, K. & Brul, S. (2002).** Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* **26**, 239-256.
- Klis, F. M., de Groot, P. & Hellingwerf, K. (2001).** Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans*. *Med. Mycol.* **39**, 1-8.
- Klis, F. M. (1994).** Review: cell wall assembly in yeast. *Yeast* **10**, 851-869.
- Kobayashi, H., Komido, M., Watanabe, M., Matsuda, K., Suzuki, M., Ikeda, T., Oyamada, H., Shibata, N. & Suzuki, S. (1994).** Structure of cell wall mannan of *Candida kefyr* IFO 0586. *Infect. Imm.* **62**, 4425-4431.
- Kobayashi, H., Debeaupuis, J. P., Bouchara, J. P. & Latgé, J. P. (1993).** An 88-kilodalton antigen secreted by *Aspergillus fumigatus*. *Infect. Immun.* **61**, 4767-4771.
- Kollar, R., Reinhold, B. B., Petrakova, E., Yeh, H. J. C., Ashwell, G., Drgonova, J., Kapteyn, J. C., Klis, F. M. & Cabib, E. (1997).** Architecture of the yeast cell wall:  $\beta$ -1-6-glucan interconnects mannoprotein,  $\beta$ (1-3)-glucan, and chitin. *J. Biol. Chem.* **272**, 17762-17788.
- Kollar, R., Petrakova, E., Ashwell, G., Robbins, P. W. & Cabib, E. (1995).** Architecture of the yeast cell wall. The linkage between chitin and beta (1-3)-glucan. *J. Biol. Chem.* **270**, 1170-1178.
- Kondo, K. & Inouye, M. (1991).** *TIP1*, a cold shock-inducible gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **266**, 17537-17544.
- Kopecka, M. & Kreger, D. R. (1986).** Assembly of microfibrils *in vivo* and *in vitro* from (1-3)-beta-D-glucan from yeast cell walls. *Arch. Microbiol.* **143**, 387-395.
- Kopecka, M., Phaff, H. J. & Fleet, G. H. (1974).** Demonstration of a fibrillar component in the cell wall of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and its chemical nature. *J. Cell Biol.* **62**, 66-76.
- Kostova, Z., Rancour, D. M., Menon, A. K. & Orlean, P. (2000).** Photoaffinity labelling with P3-(4-azidoaniliod)uridine 5'-triphosphate identifies *gpi3p* as the UDP-GlcNAc-binding subunit of the enzyme that catalyses formation of GlcNAc-phosphatidylinositol, the first glycolipid intermediate in glycosylphosphatidylinositol synthesis. *Biochem.* **350 Pt3**, 815-822.
- Kozel, T. R. & Lupan, D. M. (1996).** Humoral Immunity. In *The Mycota. V: Human and animal relationships*, pp. 99-116. Edited by D. H. Howard & J. D. Miller. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag.
- Kremer, L., Dover, L. G., Morehouse, C., Hitchin, P., Everett, M., Morris, H. R., Dell, A., Brennan, P. J., McNeil, M. R., Flaherty, C., Duncan, K. & Besra, G. S. (2001).** Galactan biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. Identification of a bifunctional UDP-galactofuranosyltransferase. *J. Biol. Chem.* **276**, 26430-26440.
- Kuranda, M. J. & Robbins, P. W. (1991).** Chitinase is required for cell separation during growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **266**, 19758-19767.
- Kuranda, M. J. & Robbins, P. W. (1987).** Cloning and heterologous expression of glycosidase genes from *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 2585-2589.

- Lajeau Chaffin, W., Lopez-Ribot, J. L., Casanova, M., Gozalbo, D. & Martinez, J. P. (1998).** Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 130-180.
- Lamarre, C., Deslauriers, N. & Bourbonnais, Y. (2000).** Expression cloning of the *Candida albicans* CSA1 gene encoding a mycelial surface antigen by sorting of *Saccharomyces cerevisiae* transformants with monoclonal antibody-coated magnetic beads. *Mol. Microbiol.* **35**, 444-453.
- Lasker, B. A. (2002).** Evaluation of performance of four genotypic methods for studying the genetic epidemiology of *Aspergillus fumigatus* isolates. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 2886-2892.
- Latgé, J. P. & Calderone, R. (2002).** Host-microbe interactions : fungi invasive human fungal opportunistic infections. *Curr. Opin. Microbiol.* **5**, 355-358.
- Latgé, J. P. (2001).** The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. *Trends Microbiol.*, 382-389.
- Latgé, J. P. (1999).** *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**, 310-350.
- Latgé, J. P., Kobayashi, H., Debeaupuis, J. P., Diaquin, M., Sarfati, J., Wieruszeski, J. M., Parra, E. & Fournet, B. (1994).** Chemical and immunological characterization of the galactomannan secreted by *Aspergillus fumigatus*. *Infect. Immun.* **62**, 5424-5433.
- Latgé, J. P., Moutaouakil, M., Debeaupuis, J. P., Bouchara, J. P., Haynes, K. A. & Prévost, M. C. (1991).** The 18 kDa antigen secreted by *Aspergillus fumigatus*. *Infect. Immun.* **59**, 2586-2594.
- Leidich, S. D., Kostova, Z., Latek, R. R., Costello, L., Drapp, D. A., Gray, W., Fassler, J. S. & Orlean, P. (1995).** Temperature-sensitive yeast Gpi anchoring mutants *gpi2* and *gpi3* are defective in the synthesis of N-acetylglucosaminyl phosphatidylinositol. Cloning of the *GPI2* gene. *J. Biol. Chem* **270**, 13029-13035.
- Li, R. K. & Cutler, J. E. (1993).** Chemical definition of an epitope/adhesin molecule on *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.* **268**, 18293-18299.
- Lipke, P. N., Wojciechowicz, D. & Kurjan, J. (1989).** *AGal* is the structural gene for the *Saccharomyces cerevisiae*  $\alpha$ -agglutinin, a cell surface glycoprotein involved in cell-cell interactions during mating. *Mol. Cell. Biol.* **9**, 3155-3165.
- Lipke, P. N. & Ovalle, R. (1998).** Cell Wall Architecture in Yeast: New Structure and New Challenges. *J. Bacteriol.* **180**, 3735-3740.
- Lloyd, K. O. (1970).** Isolation, characterization and partial structure of peptido galactomannans from the yeast form of *Cladosporium werneckii*. *Biochemistry* **9**, 3446-3453.
- Lopez-Ribot, J. L. & Chaffin, W. L. (1996).** Members of the Hsp70 family of proteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **178**, 4724-4726.
- Lu, C. F., Montijn, R. C., Brown, A. J., Klis, F., Kurjan, J., Bussey, H. & Lipke, P. N. (1995).** Glycosyl phosphatidylinositol-dependent cross-linking of  $\alpha$ -agglutinin and  $\beta$ 1,6-glucan in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *J. Cell Biol.* **128**, 333-340.
- Lu, C. F., Kurjan, J. & Lipke, P. N. (1994).** A pathway for cell wall anchorage of *Saccharomyces cerevisiae* alpha-agglutinin. *Mol. Cell Biol.* **14**, 4825-4833.
- Lussier, M., Sdicu, A. M. & Bussey, H. (1999).** The KTR and MNN1 mannosyltransferase families of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* **1426**, 323-334.
- Lussier, M., White, A. M., Sheraton, J., di Paolo, T., Treadwell, J., Southard, S. B., Horenstein, C. I., Chen-Weiner, J., Ram, A. F., Kapteyn, J. C., Roemer, T. W., Vo, D. H., Bondoc, D. C., Hall, J., Zhong, W. W., Sdicu, A. M., Davies, J., Klis, F. M., Robbins, P. W. & Bussey, H. (1997).** Large scale identification of genes involved in cell surface biosynthesis and architecture in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **147**, 435-450.

- Marcilla, A., Elorza, M. V., Mormeneo, S., Rico, H. & Sentandreu, R. (1991).** *Candida albicans* mycelial wall structure: supramolecular complexes released by zymolyase, chitinase and beta-mercaptoethanol. *Arch. Microbiol.* **155**, 312-319.
- Marr, K. A., Carter, R. A., Crippa, F., Wald, A. & Corey, L. (2002).** Epidemiology and outcome of mould infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin. Infect. Dis.* **34**, 909-917.
- Mazur, P. & Baginsky, W. (1996).** *In vitro* activity of 1,3- $\beta$ -D-glucan synthase requires the GTP-binding protein Rho1. *J. Biol. Chem.* **271**, 14604-14609.
- Mazur, P., Morin, N., Baginsky, W., El-Sherbeini, M., Clemas, J. A., Nielsen, J. B. & Foor, F. (1995).** Differential expression and function of two homologous subunits of yeast 1,3- $\beta$ -glucan synthase. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 5671-5681.
- Mellado, E., Dubreucq, G., Mol, P., Sarfati, J., Paris, S., Diaquin, M., Holden, D. W., Rodriguez-Tudela, J. L. & Latgé, J. P. (2003).** Cell wall biogenesis in a double chitin synthase mutant (*chsG*/*chsE*-) of *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genet. Biol.* (sous presse).
- Mellado, E., Aufauvre-Brown, A., Gow, N. A. R. & Holden, D. W. (1996a).** The *Aspergillus fumigatus chsC* and *chsG* genes encode class III chitin synthase with different functions. *Mol. Microbiol.* **20**, 667-679.
- Mellado, E., Specht, C. A., Robbins, P. W. & Holden, D. W. (1996b).** Cloning and characterization of *chsD*, a chitin synthase-like gene of *Aspergillus fumigatus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **143**, 69-76.
- Mellado, E., Aufauvre-Brown, A., Specht, C. A., Robbins, P. W. & Holden, D. W. (1995).** A multigene family related to chitin synthase genes of yeast in the opportunistic pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Mol. Gen. Genet.* **246**, 353-359.
- Minke, R. & Blackwell, J. (1978).** The structure of  $\alpha$ -chitin. *J. Mol. Biol.* **120**, 167-181.
- Molloy, C., Shepherd, M. G. & Sullivan, D. J. (1989).** Identification of envelope proteins of *Candida albicans* by vectorial iodination. *Microbios* **57**, 73-83.
- Momany, M. & Taylor, I. (2000).** Landmarks in the early duplication cycles of *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus nidulans* : polarity, germ tube emergence and septation. *Microbiology* **146**, 3279-3284.
- Momany, M., Zhao, J., Lindsey, R. & Westfall, P. J. (2001).** Characterization of the *Aspergillus nidulans* septin (*asp*) gene family. *Genetics* **157**, 969-977.
- Momany, M. & Hamer, J. E. (1997).** Relationship of Actin, Microtubules, and Crosswall Synthesis During septation in *Aspergillus nidulans*. *Cell Motility and the Cytoskeleton* **38**, 373-384.
- Monod, M., Fatih, A., Jatou-Ogay, K., Paris, S. & Latgé, J. P. (1995).** The secreted proteases by pathogenic species of *Aspergillus* and their possible role in virulence. *Can. J. Bot.* **73**, 1081-1086.
- Montijn, R. C., Van Wolsen, P., De Hoog, S. & Klis, F. M. (1997).**  $\beta$ -glucosylated proteins in the cell wall of the black yeast *Exophiala (wangiella) dermatitidis*. *Microbiol.* **143**, 1673-1680.
- Montijn, R. C., van Rinsum, J., van Schagen, F. A. & Klis, F. M. (1994).** Glucomannoproteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* contain a novel type of carbohydrate side chain. *J. Biol. Chem.* **269**, 19338-19342.
- Morelle, W., Lemoine, J. & Strecker, G. (1998).** Structural analysis of O-linked oligosaccharide-alditols by electrospray-tandem mass spectrometry after mild periodate oxidation and derivatization with 2-aminopyridine. *Anal. Biochem.* **259**, 16-27.
- Mormeneo, S., Rico, H., Iranzo, M., Aguado, C. & Sentandreu, R. (1996).** Study of supramolecular structures released from the cell wall of *Candida albicans* by ethylenediamine treatment. *Arch. Microbiol.* **166**, 327-335.

- Mormeneo, S., Marcilla, A., Iranzo, M. & Sentandreu, R. (1994).** Structural mannoproteins released by small  $\beta$ -elimination from *Candida albicans* cell walls. *FEMS Microbiol. Lett.* **123**, 131-136.
- Mouassite, M., Camougrand, N., Schwob, E., Demaison, G., Laclau, M. & Guerin, M. (2000).** The 'SUN' family: yeast SUN4/SCW3 is involved in cell septation. *Yeast* **16**, 905-19.
- Moukadiri, I., Jaafar, L. & Zueco, J. (1999).** Identification of Two Mannoproteins Released from Cell Walls of a *Saccharomyces cerevisiae* mnn1 mnn9 Double Mutant by Reducing Agents. *J. Bacteriol.* **181**, 4741-4745.
- Moukadiri, I., Armero, J., Abad, A., Sentandreu, R. & Zueco, J. (1997).** Identification of a mannoprotein present in the inner layer of the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **179**, 2154-2162.
- Moutaouakil, M., Monod, M., Prévost, M. C., Bouchara, J. P., Paris, S. & Latgé, J. P. (1993).** Identification of the 33 kDa alkaline protease of *Aspergillus fumigatus* *in vitro* and *in vivo*. *J. Med. Microbiol.* **39**, 393-399.
- Mouyna, I., Morelle, W., Vai, M., Monod, M., Léchenne, B., Fontaine, T., Beauvais, A., Sarfati, J., Prévost, M. C. & Latgé, J. P. (2003).** Deletion of *GEL2* encoding for a  $\beta$ (1-3)glucanosyltransferase affects morphogenesis and virulence in *A. fumigatus*. *Mol. Microbiol.*, (soumis).
- Mouyna, I., Sarfati, J., Recco, P., Fontaine, T., Henrissat, B. & Latgé, J. P. (2002).** Molecular characterization of a cell wall-associated  $\beta$ (1-3) endoglucanase of *Aspergillus fumigatus*. *Med. Mycol.* **40**, 455-464.
- Mouyna, I., Fontaine, T., Vai, M., Monod, M., Fonzi, W. A., Diaquin, M., Popolo, L., Hartland, R. P. & Latgé, J. P. (2000b).** GPI-anchored glucanosyltransferases play an active role in the biosynthesis of the fungal cell wall. *J. Biol. Chem.* **275**, 14882-14889.
- Mouyna, I., Monod, M., Fontaine, T., Henrissat, B., Léchenne, B. & Latgé, J. P. (2000a).** Identification of the catalytic residues of the first family of  $\beta$ (1-3)glucanosyltransferases identified in fungi. *Biochem. J.* **347**, 741-747.
- Mouyna, I., Hartland, R. P., Fontaine, T., Diaquin, M. & Latgé, J. P. (1998).** A  $\beta$ (1-3) glucanosyltransferase isolated from the cell wall of *Aspergillus fumigatus* is an homolog of the yeast Bgl2p. *Microbiology* **144**, 3171-3180.
- Mrsa, V., Ecker, M., Strahl-Bolsinger, S., Nimtz, M., Lehle, L. & Tanner, W. (1999b).** Deletion of New Covalently Linked Cell Wall Glycoproteins Alters the Electrophoretic Mobility of Phosphorylated Wall Components of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **181**, 3076-3086.
- Mrsa, V. & Tanner, W. (1999a).** Role of NaOH-extractable cell wall proteins Ccw5p, Ccw6p, Ccw7p and Ccw8p (members of the Pir protein family) in stability of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Yeast* **15**, 813-820.
- Mrsa, V., Seidl, M., Gentsch, M. & Tanner, W. (1997).** Specific labeling of cell wall proteins by biotinylation. Identification of four covalently linked O-mannosylated proteins of *S. cerevisiae*. *Yeast* **13**, 1145-1149.
- Mrsa, V., Klebl, F. & Tanner, W. (1993).** Purification and characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* *BGL2* gene product, a cell wall endo- $\beta$ -1,3-glucanase. *J. Bacteriol.* **175**, 2102-2106.
- Mrsa, V., Ugarkovi, T. & Barbari, S. (1992).** Binding of *Saccharomyces cerevisiae* extracellular proteins to glucane. *Arch. Biochem. Biophys.* **296**, 569-574.
- Mühlschlegel, F. A. & Fonzi, W. A. (1997).** *PHR2* of *Candida albicans* encodes a functional homolog of the pH-regulated gene *PHR1* with an inverted pattern of pH-dependent expression. *Mol. Cell Biol.* **17**, 5960-5967.
- Muniz, M. & Riezman, H. (2000).** Intracellular transport of GPI-anchored proteins. *EMBO J.* **19**, 10-15.
- Munro, C. A. & Gow, N. A. R. (2001).** Chitin synthesis in human pathogenic fungi. *Med. Mycol.* **39**, 41-53.
- Nakajima, T. & Ballou, C. E. (1974a).** Structure of the linkage region between the polysaccharide and protein parts of *Saccharomyces cerevisiae* mannan. *J. Biol. Chem.* **249**, 7685-7694.

- Nakajima, T. & Ballou, C. E. (1974b).** Characterization of the carbohydrate fragments obtained from *Saccharomyces cerevisiae* mannan by alkaline degradation. *J. Biol. Chem.* **249**, 7679-7684.
- Nakasawa, T., Takahashi, M., Horiuchi, H., Ohta, A. & Takagi, M. (2000).** Cloning and characterization of *EPD2*, a gene required for efficient pseudohyphal formation of a dimorphic yeast, *Candida maltosa*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**, 369-377.
- Nakayama, K. I., Feng, Y., Tanaka, A. & Jigami, Y. (1998).** The involvement of *mnn4* and *mnn6* mutations in mannosylphosphorylation of *O*-linked oligosaccharide in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* **1425**, 225-262.
- Ninin, E., Milpied, N., Moreau, P., André-Richet, B., Morineau, N., Mahé, B., Vigier, M., Imbert, B. M., Morin, O., Harousseau, J. L. & Richet, H. (2001).** Longitudinal study of bacterial, viral, and fungal infections in adult recipients of bone marrow transplants. *Clin. Infect. Dis.* **33**, 41-47.
- Nishikawa, A., Poster, J. B., Jigami, Y. & Dean, N. (2002).** Molecular and phenotypic analysis of CaVRG4, encoding an essential Golgi apparatus GDP-mannose transporter. *J. Bacteriol.* **184**, 29-42.
- Nuoffer, C., Horvarth, A. & Riezman, H. (1993).** Analysis of the sequence requirements for glycosylphosphatidylinositol anchoring of *Saccharomyces cerevisiae* Gas1 protein. *J. Biol. Chem.* **268**, 10558-10563.
- Nuoffer, C., Jenö, P., Conzelmann, A. & Riezman, H. (1991).** Determinants for glycosylphospholipid anchoring of the *Saccharomyces cerevisiae* GAS1 protein to the plasma membrane. *Mol. Cell Biol.* **11**, 27-37.
- Ohishi, K., Inoue, N., Maeda, Y., Takeda, J., Riezman, H. & Kinoshita, T. (2000).** Galp and Gpi8p are components of a glycosylphosphatidylinositol (GPI) transamidase that mediates attachments of GPI to proteins. *Mol. Biol. Cell* **11**, 1523-1533.
- Ono, N., Yabe, T., Sudoh, M., Nakajima, T., Yamada-Obake, T., Arisawa, M. & Yamada-Okabe, H. (2000).** The yeast Chs4 protein stimulates the trypsin-sensitive activity of chitin synthase 3 through an apparent protein-protein interaction. *Microbiology* **146**, 395-391.
- Orlean, P. (1997).** Biogenesis of yeast wall and surface components. In *The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces. Cell cycle and cell biology*, pp. 231-294. Edited by J. R. Pringle, J. R. Broach & E. W. Jones. N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.
- Orlean, P., Ammer, H., Watzel, M. & Tanner, W. (1986).** Synthesis of an *O*-glycosylated cell surface protein induced in yeast by  $\alpha$  factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 6263-6266.
- Osumi, M. (1998).** The ultrastructure of yeast: cell wall structure and formation. *Micron* **29**, 207-233.
- Pan, F., Jackson, M., Ma, Y. & McNeil, M. (2001).** Cell Wall Core Galactofuran Synthesis Is Essential for Growth of Mycobacteria. *J. Bacteriol.* **183**, 3991-3998.
- Pardo, M., Monteoliva, L., Pla, J., Sanchez, M., Gil, M. L. & Nombela, C. (1999).** Two-dimensional analysis of proteins secreted by *Saccharomyces cerevisiae* regenerating protoplasts: a novel approach to study the cell wall. *Yeast* **15**, 459-472.
- Paris, S., Debeaupuis, J. P., Crameri, R., Cary, M., Charlès, F., Prévost, M. C., Schmitt, C., Philippe, B. & Latgé, J. P. (2003a).** Conidial hydrophobins of *Aspergillus fumigatus*. *Appl. Anv. Microbiol.* **69**, 1581-1588.
- Paris, S., Wysong, D., Debeaupuis, J. P., Shibuya, K., Philippe, B., Diamond, R. D. & Latgé, J. P. (2003b).** Catalases of *Aspergillus fumigatus*. *Infect. Imm. (in press)*.
- Paris, S., Boisvieux-Ulrich, E., Crestani, B., Houcine, O., Taramelli, D., Lombardi, L. & Latgé, J. P. (1997).** Internalization of *Aspergillus fumigatus* conidia by epithelial and endothelial cells. *Infect. Immun.* **65**, 1510-4.

- Pastor, F. I. J., Valentin, E., Herrero, E. & Sentandreu, R. (1984).** Structure of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. Mannoproteins released by zymolyase and their contribution to wall architecture. *Biochim. Biophys. Acta* **802**, 292-300.
- Philippe, B., Ibrahim-Granet, O., Prévost, M. C., Gougerot-Pocidalò, M. A., Sanchez-Perez, M., Van der Meer, A. & Latgé, J. P. (2003).** Killing of *Aspergillus fumigatus* by alveolar macrophages is mediated by reactive oxidant intermediates. *Infect. Imm. (in press)*.
- Pishko, E. J., Kirkland, T. N. & Cole, G. T. (1995).** Isolation and characterization of two chitinase-encoding genes (*cts1*, *cts2*) from the fungus *Coccidioides immitis*. *Gene* **167**, 173-177.
- Popolo, L. & Vai, M. (1999).** The Gas1 glycoprotein, a putative wall polymer cross-linker. *Biochim. Biophys. Acta* **1426**, 385-400.
- Popolo, L., Vai, M., Gatti, E., Porello, S., Bonfante, P., Belestini, R. & Alberghina, L. (1993).** Physiological analysis of mutants indicates involvement of the *Saccharomyces cerevisiae* GPI-anchored protein gp115 in morphogenesis and cell separation. *J. Bacteriol.* **175**, 1879-1885.
- Poster, J. B. & Dean, N. (1996).** The yeast VRG4 gene is required for normal Golgi functions and defines a new family of related genes. *J. Biol. Chem.* **271**, 3837-45.
- Protchenko, O., Ferea, T., Rashford, J., Tiedeman, J., Brown, P. O., Botstein, D. & Philpott, C. C. (2001).** Three Cell Wall Mannoproteins Facilitate the Uptake of Iron in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **276**, 49244-49250.
- Qadota, H., Python, C. P., Inoue, S. B., Arisawa, M., Ankaru, Y., Zheng, Y., Watanabe, T., Levin, D. E. & Ohya, Y. (1996).** Identification of yeast Rho1p GTPase as a regulatory subunit of 1,3- $\beta$ -glucan synthase. *Science* **272**, 279-281.
- Ram, A. F. J., Van Den Ende, H. & Klis, F. M. (1998).** Green fluorescent protein-cell wall fusion proteins are covalently incorporated into the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **162**, 249-255.
- Ram, A. F. J., Brekelmans, S. S. C., Oehlen, L. J. W. & Klis, F. M. (1995).** Identification of two cell cycle regulated genes affecting the  $\beta$ 1,3-glucan content of cell walls in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **358**, 164-170.
- Raper, K. B. & Fennell, D. I. (1965).** *Aspergillus fumigatus* group. In *The Genus Aspergillus*, pp. 238-268. Edited by K. B. Raper & D. I. Fennell. Baltimore: William & Wilkins.
- Riederer, M. A. & Hinnen, A. (1991).** Removal of *N*-glycosylation sites of the yeast acid phosphatase severely affects protein folding. *J. Bacteriol.* **173**, 3539.
- Rodriguez-Pena, J. M., Rodriguez-Pena, C., Alvarez, A., Nombela, C. & Arroyo, J. (2002).** Mechanisms for targeting of the *Saccharomyces cerevisiae* GPI-anchored cell wall protein Crh2p to polarised growth sites. *J. Cell Sci.* **115**, 2549-2558.
- Rodriguez-Pena, J. M., Cid, V. J., Arroyo, J. & Nombela, C. (2000).** A novel family of cell wall-related proteins regulated differently during the yeast life cycle. *Mol. Cell Biol.* **20**, 3245-3255.
- Roncero, C. (2002).** The genetic complexity of chitin synthesis in fungi. *Curr. Genet.* **41**, 367-378.
- Roy, A., Lu, C. F., Marykwas, D. L., Lipke, P. N. & Kurjan, J. (1991).** The *AGA1* product is involved in cell surface attachment of the *Saccharomyces cerevisiae* cell adhesion glycoprotein a-agglutinin. *Mol. Cell Biol.* **11**, 4196-4206.
- Ruiz-Herrera, J., Mormeneo, S., Vanaclocha, P., Font-de-Mora, J., Iranzo, M., Puertes, I. & Sentandreu, R. (1994).** Structural organization of the components of the cell wall from *Candida albicans*. *Microbiol.* **140**, 1513-1523.
- Sakaguchi, O., Yokota, K. & Suzuki, M. (1969).** Immunochemical and biochemical studies of fungi. XIII: On the galactomannans isolated from mycelia and cultures filtrates of several filamentous fungi. *Jpn. J. Microbiol.* **13**, 1-7.



- Samson, R. A. (1999).** The genus *Aspergillus* with special regard to the *Aspergillus fumigatus* group. *Contrib. Microbiol.* **2**, 5-20.
- Santos, B. & Snyder, M. (1997).** Targeting of chitin synthase 3 to polarized growth sites in yeast requires Chs5p and Myo2p. *J. Cell. Biol.* **136**, 95-110.
- Santos, B., Duran, A. & Valdivieso, H. (1997).** *CHS5*, a gene involved in chitin synthesis and mating in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 2485-2496.
- Sanz, M., Trilla, J. A., Duran, A. & Roncero, C. (2002).** Control of chitin synthesis through She1p, a functional homologue of Chs4p specifically induced during sporulation. *Mol. Microbiol.* **43**, 1183-1195.
- Saporito-Irwin, S. M., Birse, C. E., Sypherd, P. S. & Fonzi, W. A. (1995).** *PHR1*, a pH-regulated gene of *Candida albicans*, is required for morphogenesis. *Mol. Cell Biol.* **15**, 601-613.
- Schoffemeer, E. A. M., Vossen, J. H., van Doorn, A. A., Cornelissen, B. J. C. & Haring, M. A. (2001).** FEM1, a *Fusarium oxysporum* glycoprotein that is covalently linked to the cell wall matrix and is conserved in filamentous fungi. *Mol. Genet. Genomics* **265**, 143-152.
- Schreiner, R., Schnabel, E. & Wieland, F. (1994).** Novel N-glycosylation in eukaryotes: laminin contains the linkage unit  $\beta$ -glucosylasparagine. *J. Cell Biol.* **124**, 1071-1081.
- Sekiya-Kawasaki, M., Abe, M., Saka, A., Watanabe, D., Kono, K., Minemura-Asakawa, M., Ishihara, S., Watanabe, T. & Ohya, Y. (2002).** Dissection of upstream regulatory components of the Rho1p effector, 1,3-beta-glucan synthase, in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **162**, 663-76.
- Sharma, D. K., Hilley, J. D., Bangs, J. D., Coombs, G. H., Mottram, J. C. & Menon, A. K. (2000).** Soluble GPI8 restores glycosylphosphatidylinositol anchoring in a trypanosome cell-free system depleted of luminal endoplasmic reticulum proteins. *Biochem. J.* **351 Pt3**, 717-722.
- Sheehan, D. J., Hitchcock, C. A. & Sibley, C. M. (1999).** Current and emerging azole antifungal agents. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**, 40-79.
- Shibata, N., Ikuta, K., Imai, T., Satoh, Y., Satoh, R., Suzuki, A., Kojima, C., Kobayashi, H., Hisamichi, K. & 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.
- Shibata, N., Mizugami, K., Takano, K. & Suzuki, A. (1983).** Isolation of mannan-protein complexes from viable cells of *Saccharomyces cerevisiae* X2180-1A wild type and *Saccharomyces cerevisiae* X2180-1A-5 mutant strains by the action of zymolyase-60,000. *J. Bacteriol.* **156**, 550-558.
- Shimoi, H., Iimura, Y. & Obata, T. (1995).** Molecular cloning of *CWPI*: a gene encoding a *Saccharomyces cerevisiae* cell wall protein solubilized with *Rarobacter faecitabidus* protease I. *J. Biochem.* **118**, 302-311.
- Silverman, S. J., Sburlati, A., Slater, M. L. & Cabib, E. (1988).** Chitin synthase 2 is essential for septum formation and cell division in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 4735-4739.
- Smits, G. J., van den Ende, H. & Klis, F. M. (2001).** Differential regulation of cell wall biogenesis during growth and development in yeast. *Microbiology* **147**, 781-794.
- Smits, G. J., Kapteyn, J. C., van den Ende, H. & Klis, F. M. (1999).** Cell wall dynamics in yeast. *Cur. Op. Microbiol.* **2**, 348-352.
- Staab, J. F. & Sundstrom, P. (1998).** Yeast sequencing reports. Genetic organization and sequence analysis of the hypha-specific cell wall protein gene *HWPI* of *Candida albicans*. *Yeast* **14**, 681-686.
- Stevens, D. A., Kan, V. L., Judson, M. A., Morrison, V. A., Dummer, S., Denning, D. W., Bennett, J. E., Walsh, T. J., Patterson, T. F. & Pankey, G. A. (2000).** Practice guidelines for diseases caused by *Aspergillus*. *Clin. Infect. Dis.* **30**, 696-709.

- 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**, 45592-45603.
- Strahl-Bolsinger, S. & Scheinost, A. (1999).** Transmembrane topology of Pmt1p, a member of an evolutionarily conserved family of protein o-mannosyltransferases. *J. Biol. Chem.* **274**, 9068-9075.
- Strahl-Bolsinger, S., Gentsch, M. & Tanner, W. (1999).** Protein O-mannosylation. *Biochem. Biophys. Acta* **1426**, 297-307.
- Stratford, M. (1994).** Another brick in the wall ? Recent developments concerning the yeast cell envelope. *Yeast* **10**, 1741-1752.
- Surarit, R., Gopal, P. K. & Shepherd, M. G. (1988).** Evidence for a glycosidic linkage between chitin and glucan in the cell wall of *Candida albicans*. *J. Gen. Microbiol.* **134**, 1723-1730.
- Sutterlin, C., Escribano, M. V., Gerold, P., Maeda, A., Mazon, M. J., Kinoshita, T., Schwarz, R. T. & Riezman, H. (1998).** *Saccharomyces cerevisiae* GPI10, the functional homologue of human PIG-B, is required for glycosylphosphatidylinositol-anchor synthesis. *Biochem. J.* **332**, 153-159.
- Takada, H., Araki, Y. & Ito, E. (1981).** Structure of polygalactosamine produced by *Aspergillus parasiticus*. *J. Biochem.* **89**, 1265-1274.
- Taron, C. H., Wiedman, J. M., Grimme, S. J. & Orlean, P. (2000).** Glycosylphosphatidylinositol biosynthesis defects in Gpi11p- and Gpi13p-deficient yeast suggest a branched pathway and implicate gpi13p in phosphoethanolamine transfer to the third mannose. *Mol Biol Cell* **11**, 1611-30.
- Teunissen, A. W. & Steensma, H. Y. (1995).** Review: the dominant flocculation genes of *Saccharomyces cerevisiae* constitute a new subtelomeric gene family. *Yeast* **11**, 1001-1013.
- Thau, N., Monod, M., Crestani, B., Roland, C., Tronchin, G., Latgé, J. P. & Paris, S. (1994).** Rodletless mutants of *Aspergillus fumigatus*. *Infect. Immun.* **62**, 4380-4388.
- Tiede, A., Bastisch, I., Schubert, J., Orlean, P. & Schmid, R. E. (1999).** Biosynthesis of glycosylphosphatidylinositols in mammals and unicellular microbes. *Biol. Chem.* **380**, 503-523.
- Tkacz, J. S. & DiDomenico, B. (2001).** Antifungals: what's in the pipeline. *Curr. Opin. Microbiol.* **4**, 540-545.
- Toh-E, A., Yasunaga, S., Nisogi, H., Tanaka, K., Oguchi, T. & Yashushi, M. (1993).** Three yeast genes, *PIR1*, *PIR2*, and *PIR3*, containing internal tandem repeats, are related to each other, and *PIR1* and *PIR2* are required for tolerance to heat shock. *Yeast* **9**, 481-494.
- Trilla, J. A., Duran, A. & Roncero, C. (1999).** Chs7p, a new protein involved in the control of protein export from the endoplasmic reticulum that is specifically engaged in the regulation of chitin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell. Biol.* **145**, 1153-1163.
- Trilla, J. A., Cos, T., Duran, A. & Roncero, C. (1997).** Characterization of *CHS4* (*CAL2*), a gene of *Saccharomyces cerevisiae* involved in chitin biosynthesis and allelic to *SKT5* and *CSD4*. *Yeast* **13**, 795-807.
- Vai, M., Gatti, E., Lacana, E., Popolo, L. & Alberghina, L. (1991).** Isolation and deduced amino acid sequence of the gene encoding gp115, a yeast glycosylphospholipid-anchored protein containing a serine-rich region. *J. Biol. Chem.* **266**, 12242-12248.
- Valdivia, R. H., Baggot, D., Chuang, J. S. & Schekman, R. (2002).** The yeast clathrin adaptor protein complex 1 is required for the efficient retention of a subset of late Golgi membrane proteins. *Dev. Cell* **2**, 283-294.
- Valdivieso, M. H., Ferrario, L., Vai, M., Duran, A. & Popolo, L. (2000).** Chitin synthesis in a *gas1* mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **182**, 4752-4757.
- Valdivieso, M. H., P.C., M., Shaw, J. A., Cabib, E. & Duran, A. (1991).** *CAL1*, a gene required for activity of chitin synthase 3 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **114**, 101-109.

- Valentin, E., Herrero, E., Rico, H., Miragall, F. & Sentandreu, R. (1987). Cell wall mannoproteins during the population growth phases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* **148**.
- Valentin, E., Herrero, E. & Sentandreu, R. (1986). Incorporation of mannoproteins into the walls of aculeacin A-treated yeast cells. *Arch. Microbiol.* **146**, 214-220.
- Valentin, E., Herrero, E., Postor, F. I. J. & Sentandreu, R. (1984). Solubilization and analysis of mannoprotein molecules from the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* **130**, 1419-1428.
- van Berkel, M. A. A., Caro, L. H. P., Montijn, R. C. & Klis, F. M. (1994). Glucosylation of chimeric proteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **1994**, 135-138.
- van der Vaart, J. M., te Biesebeke, R., Chapman, J. W., Klis, F. M. & Verrips, C. T. (1996a). The  $\beta$ -1,6-glucan containing side-chain of cell wall proteins of *Saccharomyces cerevisiae* is bound to the glycan core of the GPI moiety. *FEMS Microbiol. Lett.* **145**, 401-407.
- van der Vaart, J. M., van Schagen, F. S., Mooren, A. T. A., Chapman, J. W., Klis, F. M. & Verrips, C. T. (1996b). The retention mechanism of cell wall proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. Wall-bound Cwp2p is  $\beta$ -1,6-glucosylated. *Biochem. Biophys. Acta* **1291**, 206-214.
- van der Vaart, J. M., Caro, L. H., Chapman, J. W., Klis, F. M. & Verrips, C. T. (1995). Identification of three mannoproteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **177**, 3104-3110.
- van Rinsum, J., Klis, F. M. & Van Den Ende, H. (1991). Cell wall glucomannoproteins of *Saccharomyces cerevisiae* mnn9. *Yeast* **7**, 717-726.
- Vongsamphanh, R., Fortier, P. K. & Ramotar, D. (2001). Pir1p Mediates Translocation of the Yeast Apn1p Endonuclease into the Mitochondria To Maintain Genomic Stability. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 1647-1655.
- Vossen, J. H., Müller, W. H., Lipke, P. N. & Klis, F. M. (1997). Restrictive glycosylphosphatidylinositol anchor synthesis in *cwh6/gpi3* yeast cells causes aberrant biogenesis of cell wall proteins. *J. Bacteriol.* **179**, 2202-2209.
- Wald, A., Leisenring, W., Van Burik, J. A. & Bowden, R. A. (1997). Epidemiology of *Aspergillus* infections in a large cohort of patients undergoing bone marrow transplantation. *J. Infect. Dis.* **175**, 1459-1466.
- Wang, X. H. (1997). *MNN6*, a member of the *KRE2/MNT1* family, is the gene for mannosylphosphate transfer in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **272**, 18117-18124.
- Wasylnka, J. A. & Moore, M. M. (2002). Uptake of *Aspergillus fumigatus* conidia by phagocytic and non phagocytic cells *in vitro*: quantitation using strains expressing green fluorescent protein. *Infect. Imm.* **70**, 3156-3163.
- Watanabe, A., Ohishi, K., Maeda, Y., Nakamura, N. & Kinoshita, T. (1999). Mammalian PIG-L and its yeast homologue Gpi12p are N-acetylglucosaminylphosphatidylinositol de N-acetylases essential in glycosylphosphatidylinositol biosynthesis. *Biochim. J.* **339**, 185-192.
- Watzel, M., Klis, F. & Tanner, W. (1988). Purification and characterization of the inducible a agglutinin of *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J.* **7**, 1483-1488.
- Westfall, P. J. & Momany, M. (2002). *Aspergillus nidulans* septin AspB plays pre- and postmitotic roles in septum, branch, and conidiophore development. *Mol. Biol. Cell.* **13**, 110-118.
- Wojciechowicz, D., Lu, C. F., Kurjan, J. & Lipke, P. N. (1993). Cell surface anchorage and ligand-binding domains of the *Saccharomyces cerevisiae* cell adhesion protein  $\alpha$ -agglutinin, a member of the immunoglobulin superfamily. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 2554-2563.
- Yoda, K., Ko, J. H., Nagamatsu, T., Lin, Y., Kaibara, C., Kawada, T., Tomishige, N., Hashimoto, H., Noda, T. & Yamasaki, M. (2000). Molecular characterization of a novel yeast cell-wall acid phosphatase cloned from *Kluyveromyces marxianus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**, 142-148.

- Yoko-o, T., Roy, S. K. & Jigami, Y. (1998).** Differences in *in vivo* acceptor specificity of two galactosyltransferases, the *gmh3+* and *gma12+* gene products from *Schizosaccharomyces pombe*. *Eur. J. Biochem.* **257**, 630-637.
- Yun, D. J., Zhao, Y., Pardo, J. M., Narasimhan, M. L., Damsz, B., Lee, H., Abad, L. R., D'Urzo, M. P., Hasegawa, P. M. & Bressan, R. A. (1997).** Stress proteins on the yeast cell surface determine resistance to osmotic, a plant antifungal protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 7082-7087.
- Ziman, M., Chuang, J. S., Stung, M., Hamamoto, S. & Schekma, R. (1998).** Chs6p-dependent anterograde transport of Chs3p from the chitosome to the plasma membrane in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell.* **9**, 1565-1576.
- Zlotnik, H., Fernandez, M. P., Bowers, B. & Cabib, E. (1984).** *Saccharomyces cerevisiae* mannoproteins form an external cell wall layer that determines wall porosity. *J. Bacteriol.* **159**, 1018-1026.
- Zverlov, V. V., Volkov, I. Y., Velikodvorskaya, T. V. & Schwarz, W. H. (1997).** Highly thermostable endo-1,3-beta-glucanase (laminarinase) LamA from *Thermotoga neapolitana*: nucleotide sequence of the gene and characterization of the recombinant gene product. *Microbiology* **143**, 1701-1708.

# **Annexe**

## **6 ANNEXE : ETUDE DE LA LIAISON PHOAp- $\beta$ (1,3) GLUCANES**

PhoAp est la seule protéine pariétale intimement associée aux  $\beta$ -1,3 glucanes. Après sa libération de la paroi par une  $\beta$ -(1,3) glucanase, elle migre sur gel d'électrophorèse associé à un  $\beta$ -(1,3) glucane qui est reconnu par un anticorps anti- $\beta$ -(1,3) glucane. Trois stratégies ont été mises en œuvre pour tenter d'analyser le type de liaison entre PhoAp et les  $\beta$ -(1,3) glucanes.

### **6.1 Analyse de l'affinité de PhoAp pour les $\beta$ -(1,3) glucanes**

Pour mettre en évidence une liaison de type lectinique ou d'adsorption non spécifique entre PhoAp et les  $\beta$ -(1,3) glucanes, PhoAp est incubée en présence de  $\beta$ -(1,3) glucanes et son affinité pour ces sucres est évaluée.

#### **6.1.1 Méthodes**

##### ***Préparation de PhoAp :***

Le mycélium est incubé dans un tampon Tris/HCl 50 mM pH 7,5 à 4°C pendant 2 heures. De cette façon, un ensemble de protéines est relargué de la paroi (Mr de 95 kDa à 10 kDa) parmi lesquelles PhoAp.

##### ***Différents accepteurs testés :***

Deux types de  $\beta$ -(1,3) glucanes ont été utilisés.

(1) Des billes d'agarose (Agarose Adipic Acid Hydrazide, Amersham) sur lesquelles des chaînes linéaires de  $\beta$ -1,3 glucane activées peuvent être associées par liaison covalente. Pour ce faire, des oligosaccharides de  $\beta$ -(1,3) glucane sont générés par acétolyse de curdlan : incubation de 500 mg de curdlan avec 50 ml de réactif (acide acétique/anhydride acétique/acide sulfurique, 10/10/1) pendant 24h à 20°C sous agitation magnétique. Ensuite, les chaînes libérées sont réduites et déacétylées (NaOH 2N, NaBH<sub>4</sub> 10 mg/ml pendant une nuit à température ambiante) puis purifiées par gel filtration sur une colonne Sephadex G15 (élution avec 0,1% acide acétique dans l'eau) afin d'éliminer les sels et les petits DP (<5). Les chaînes de  $\beta$ -1,3 glucane ainsi obtenues sont ensuite activées par oxydation périodique (NaIO<sub>4</sub>

100 mM pendant 15 minutes à l'obscurité) afin de générer des radicaux aldéhydes libres à partir des extrémités réductrices libres. Ces fonctions aldéhydes vont alors pouvoir réagir avec les groupements amines des billes d'agarose. Pour cela, les billes sont mises en présence de ces  $\beta$ -1,3 glucanes activés dans le tampon de couplage (acétate de sodium 0,1 M, pH 5) et le couplage se fait sur la nuit à température ambiante (selon les instructions du fabricant). Les billes sont alors filtrées et lavées sur verre fritté avec le tampon de couplage puis elles sont reprises dans du tampon Tris HCl 50 mM pH 7,5 et NaCl 0,5 M.

(2) La fraction alcali-insoluble (AIS) de paroi contenant des  $\beta$ -1,3 glucanes, de la chitine et du galactomannane est préparée de la façon décrite par Fontaine et al. (2000). Cette fraction est reprise dans du tampon Tris HCl 50 mM pH 7,5 et NaCl 0,5 M.

#### ***Réaction de binding :***

L'extrait contenant PhoAp est incubé avec ces différentes matrices contenant du  $\beta$ -1,3 glucane en présence de NaCl 0,5 M, DTT 50 mM à 4°C pendant 2 heures.

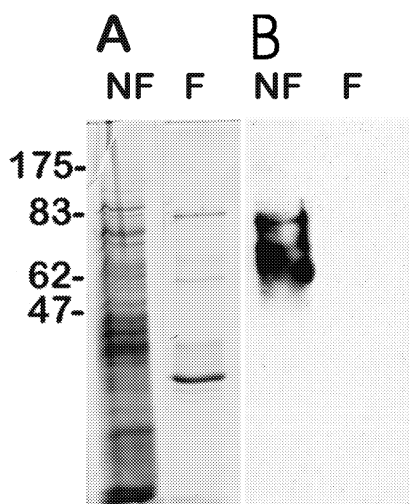
#### ***Mise en évidence du « binding » :***

La fraction insoluble contenant les  $\beta$ -1,3 glucanes et des protéines potentiellement associées est récupérée par centrifugation (10 minutes à 13000 rpm). Elle est lavée trois fois avec le tampon Tris HCl 50 mM pH 7,5 et NaCl 0,5 M puis extraite avec du SDS 2% et du  $\beta$ -mercaptoéthanol 40 mM afin de solubiliser les protéines piégées par l'accepteur. Ensuite les deux fractions sont analysées sur gel SDS-PAGE et PhoAp peut-être détectée par immunoempreinte avec un anticorps anti-PhoAp.

### **6.1.2 Résultats**

Aucune protéine n'a été retenue par le  $\beta$ -1,3 glucane couplé à des billes d'agarose. On peut penser que la chaîne de curdlan est trop courte pour pouvoir interagir avec une protéine. Avec l'AIS de paroi, plusieurs protéines de différentes tailles semblent retenues mais PhoAp ne peut être détectée parmi ces protéines ; elle reste dans la fraction non fixée (Figure 24). Il semble donc qu'elle n'ait pas d'affinité particulière pour les polysaccharides de la paroi. Cependant, il est possible que la partie alcali-insoluble modifiée par le traitement à chaud en présence de soude 1 M n'ait pas les mêmes propriétés que la paroi brute pour s'associer à PhoAp. Cela suggère donc qu'il serait plus judicieux d'utiliser de la paroi intacte mais celle-ci a l'inconvénient de contenir déjà PhoAp associée aux  $\beta$ -1,3 glucanes.

Les expériences de « binding » n'ont pas permis de donner de réponse sur l'association de PhoAp avec les  $\beta$ -1,3 glucanes pariétaux. La nécessité d'avoir un témoin positif, c'est-à-dire une protéine connue pour son « binding » spécifique aux  $\beta$ -1,3 glucanes, semble évidente pour pouvoir conclure qu'il n'y a pas de « binding » de PhoAp aux  $\beta$ -1,3 glucanes. Par ailleurs, pour pouvoir utiliser de la paroi intacte dans ces expériences, il est nécessaire de marquer PhoAp spécifiquement, par exemple par biotinylation ou radioactivité, pour pouvoir ensuite la distinguer des autres formes de PhoAp déjà présentes dans la paroi.



**Figure 24 :** « Binding » de PhoAp à la fraction alcali-insoluble de la paroi. Après incubation de l'AIS avec PhoAp, la partie soluble, contenant les protéines non fixées (NF) est séparée de la fraction insoluble contenant les protéines potentiellement fixées (F). Les deux fractions sont analysées sur gel SDS-PAGE 10% et révélée soit par coloration au bleu de Coomassie (A), soit par immunoempreinte à l'aide de l'anti-PhoA (B).

## 6.2 Analyse du peptide C-terminal d'une protéine

Si PhoAp est associée aux glucanes de la paroi par son ancre GPI, l'extrémité C-terminale de cette protéine n'est pas libre mais liée à un sucre. La technique de spectrométrie de masse décrite ci-dessous permet de marquer spécifiquement tous les peptides de la protéine et de différencier le peptide en position C-terminale.



### 6.2.1 Méthode

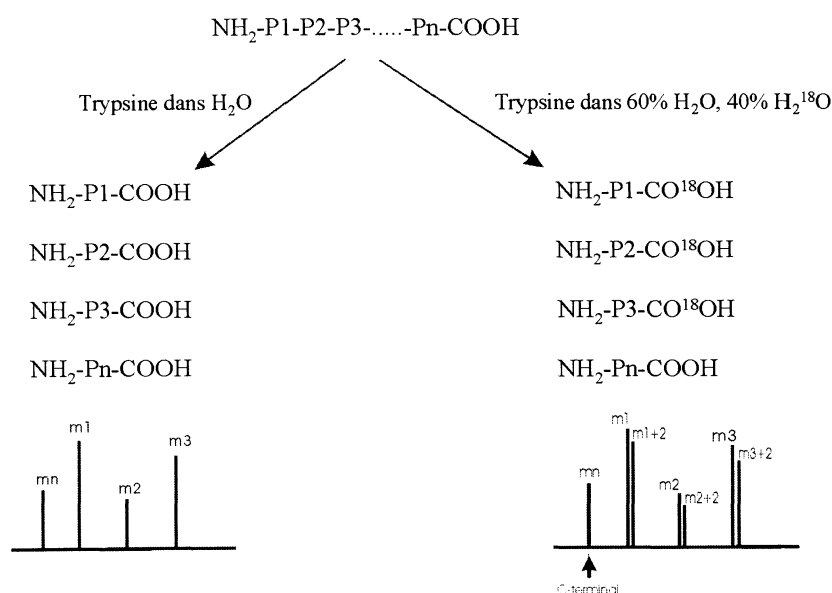
Ce travail a été réalisé en collaboration avec Jean-Pierre Lecaer à l'Unité de Neurobiologie et Diversité Cellulaire de l'École Supérieure de Physique et Chimie Industrielle de Paris.

#### *Digestion de PhoA par la trypsine :*

PhoAp est extraite de la paroi de deux façons : (1) par traitement Quantazyme de la paroi ou (2) par incubation du mycélium en présence de trypsine (Bernard et al., 2001). La deuxième préparation est un témoin positif pour lequel le C-terminal de PhoAp est libre. PhoAp est ensuite traitée à la PNGaseF afin d'éliminer les N-glycanes (Bernard et al., 2001). Après migration sur gel de polyacrylamide à 10%, la bande correspondant à PhoAp est découpée et est soumise à la digestion par la trypsine. La digestion par la trypsine se fait directement sur le gel de polyacrylamide en présence d'eau marquée à l' $^{18}\text{O}$  (40%  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  et 60%  $\text{H}_2\text{O}$ ). De cette façon là, tous les peptides libérés posséderont une extrémité C-terminale marquée à l'eau lourde tandis que le peptide C-terminal de la protéine ne sera pas marqué à l'eau lourde (Figure 25).

#### *Analyse en MALDI-TOF :*

Ensuite le mélange de peptides obtenus à partir de PhoAp est analysé en spectrométrie de masse sur un appareil VOYAGER DE STR Pro de type MALDI-TOF (Perseptive Biosystem, Framingham, MA, USA). Sur le spectre de masse, les peptides internes seront facilement identifiables car l'insertion d'eau lourde entraîne un dédoublement de chaque pic. Seul le pic correspondant au peptide C-terminal ne sera pas dédoublé (Figure 25). Le pic correspondant au peptide C-terminal peut-être identifié à partir de la séquence de PhoAp, il est donc possible de vérifier si le peptide considéré correspond bien au C-terminal de la protéine et si ce peptide est libre ou associé à des sucres. Cependant, cette technique nécessite (i) d'avoir une protéine extrêmement pure afin de ne détecter que le seul peptide C-terminal correspondant à PhoAp, (ii) que la protéine soit déglycosylée, (iii) que tous les peptides issus de la digestion de la protéine se désorbent du gel de polyacrylamide.



**Figure 25 : Principe de l'identification de peptide C-terminal d'une protéine par spectrométrie de masse après hydrolyse trypsique en présence d'eau marquée à l'<sup>18</sup>O. mn correspond à la masse du peptide n.**

## 6.2.2 Résultats

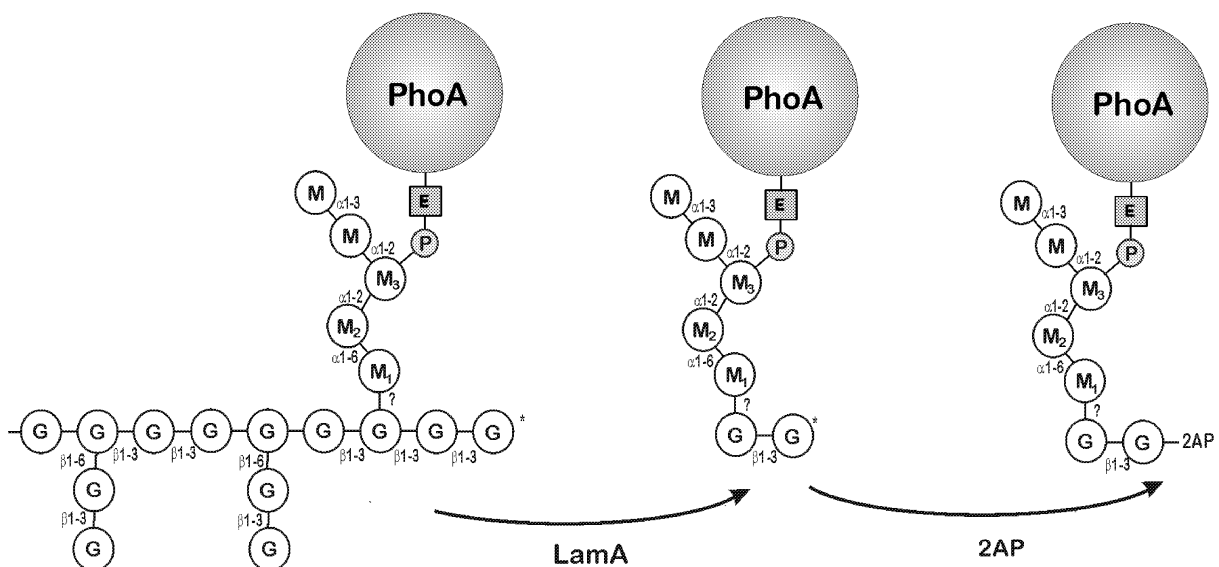
Sur les spectres de PhoAp obtenus soit à partir de PhoAp associées aux β-1,3 glucanes, soit à partir de PhoAp libre, la majorité (> 90%) des pics présente un dédoublement. Parmi ces pics, plusieurs peptides de PhoAp ont été identifiés. Par ailleurs, plusieurs pics non dédoublés sont aussi présents. Néanmoins, aucune masse ne correspond au peptide C-terminal de PhoAp qui aurait pu être libéré par la trypsine. Comment expliquer un tel résultat ? (1) Bien qu'ayant été traitée à la PNGase, PhoAp peut encore être glycosylée car elle porte plusieurs sites de O-glycosylation, particulièrement au niveau du C-terminal. Dans ce cas, la masse attendue pour le peptide C-terminal est différente de celle calculée à partir de la séquence protéique. (2) PhoAp n'est pas totalement pure et il se peut que les pics correspondant à des peptides C-terminaux qui sont observés correspondent à des peptides de protéines contaminantes. Par ailleurs, certains peptides hydrophiles, peuvent ne pas être désorbés du gel SDS-PAGE après digestion par la trypsine.

Une autre technique de marquage du C-terminal d'une protéine existe (Hsi et al., 1999). Elle consiste à traiter les protéines avec de la glycinamide en présence de carbodiimide après réduction et alkylation de la protéine. Ceci permet de bloquer toutes les fonctions carboxyliques de la protéine, c'est à dire celle du C-terminal et celles des acides glutamiques (Glu) et des acides aspartiques (Asp). La protéine est ensuite digérée par une protéase, ce qui

génère de nouvelles fonctions carboxyliques. Les peptides libérés sont alors déposés sur une colonne qui retient spécifiquement les groupes carboxyliques, le peptide C-terminal qui n'en contient pas est non retenu et donc séparé des autres peptides. Il peut alors être analysé en spectrométrie de masse. L'inconvénient de cette technique est qu'elle nécessite une quantité de protéine importante (5-10 mg) et, vu les faibles quantités de PhoAp dont nous disposons, cette technique n'a pu être utilisée.

### 6.3 Marquage des sucres réducteurs par la 2'-amino-pyridine

Si PhoAp est associée aux  $\beta$ -1,3 glucanes par son ancre GPI chez *A. fumigatus*, une structure impliquant le lien protéine- $\beta$ -1,3 glucane peut être imaginée en tenant compte à la fois de la structure décrite pour Tip1p chez la levure et de la structure de l'ancre GPI chez *A. fumigatus* (Fontaine et al., 2003, Fujii et al., 1999). La structure hypothétique représentée dans la figure 26 suggère que le  $\beta$ -1,3 glucane serait associé à l'ancre GPI par son extrémité non réductrice. Il est alors possible marquer les extrémités réductrices libres des  $\beta$ -1,3 glucanes à l'aide d'un fluorochrome et de digérer ensuite la protéine afin d'isoler le peptide de la protéine qui sera alors fluorescent et pourra être purifié et séquencé.



**Figure 26 :** Structure hypothétique de l'ancrage de PhoAp aux  $\beta$ -1,3 glucanes et principe de la méthode de marquage des  $\beta$ -1,3 glucanes. \*, sucre réducteur, M, mannose, G, glucose. Lam A,  $\beta$ -1,3 glucanase, 2AP, 2'-amino-pyridine.

### 6.3.1 Méthodes

#### ***Isolation de PhoAp :***

PhoAp est extraite de la paroi préalablement traitée SDS 2 % /  $\beta$ -mercaptoéthanol 40 mM par digestion avec une  $\beta$ -1,3 glucanase (Bernard et al., 2002). Ensuite, une extraction avec du SDS 2 % à chaud est nécessaire pour pouvoir relarguer efficacement PhoAp. En effet sans ce traitement, PhoAp n'est pratiquement pas relarguée de la paroi (<10%). Cependant, la présence de grande quantité de SDS gêne les étapes ultérieures de purification et de traitement de la protéine. Ainsi, trois dialyses contre de l'urée 6 M suivies de deux dialyses contre l'eau sont nécessaires afin d'éliminer le détergent. Ensuite, la protéine est précipitée avec 4 volumes d'éthanol. Le culot est repris dans un tampon imidazole/acide acétique 100 mM pH 6,2.

#### ***Digestion de PhoAp :***

PhoAp est ensuite digérée par une autre endo- $\beta$ -1,3 glucanase (Laminarinase A de *Thermotoga neapolitana*, protéine recombinante exprimée chez *E. coli*, Zverlov et al., 1997) qui libère spécifiquement du glucose, du laminaribiose et du laminaritriose. Cette digestion permet ainsi d'obtenir une protéine de taille homogène (bande plus fine sur gel de polyacrylamide (Bernard et al., 2001), car les chaînes de glucane auxquelles elle est associée ne possèdent plus que quelques unités de glucose. Cette étape sert également à libérer des extrémités réductrices nouvellement formées et qui seront réactives.

#### ***Marquage des $\beta$ -1,3 glucanes :***

Après dialyse contre de l'eau pour éliminer les résidus glucose libérés par LamA, les  $\beta$ -1,3 glucanes réducteurs sont couplés à la 2-aminopyridine (2AP) sur leur extrémité réductrice selon un protocole décrit par Morelle et al. (1998). Après la réaction, le mélange est dialysé contre H<sub>2</sub>O afin d'éliminer les réactifs. PhoAp devient insoluble et est récupérée par centrifugation.

#### ***Digestion trypsique :***

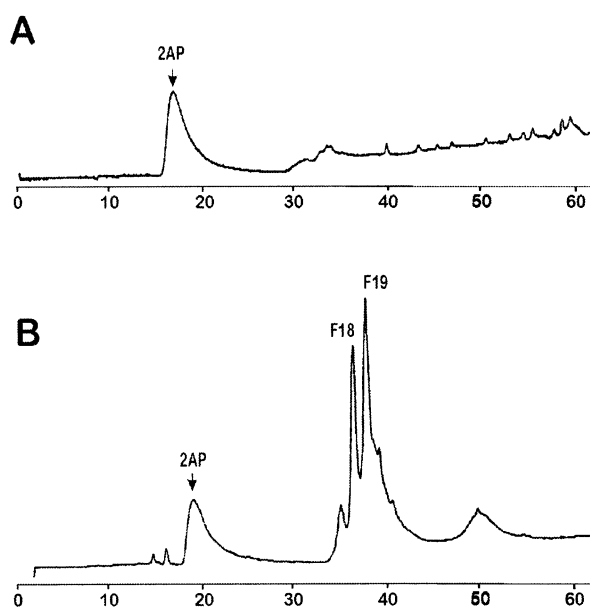
La protéine PhoAp est purifiée sur gel SDS-PAGE. La préparation de PhoAp est déposée sur gel SDS-PAGE 10 %. Après migration, le gel est coloré à l'amidoblack et la bande correspondant à PhoAp est découpée en petits morceaux (1 mm/1 mm). Ces morceaux de gel sont lavés avec du tampon carbonate 50 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2 fois puis avec de l'acétonitrile 50% 1 fois. Ensuite, ils sont repris dans du tampon 50 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pH 8,4 et digérés avec 12,5  $\mu$ g/ml de trypsine pendant une nuit à 37°C. Les peptides libérés sont extraits avec de l'acide trifluoroacétique (ATFA) 5 % (2 fois) et 50 % acétonitrile dans ATFA 5 % (1 fois).

#### ***Séparation et analyse des peptides :***

Les peptides et glycopeptides obtenus sont séparés par HPLC sur une colonne en phase inverse de C18 avec un gradient en acétonitrile (2 % à 18 % acétonitrile dans ATFA 0,05 % en 40', puis 18 % à 60 %, en 10'). La détection est réalisée grâce à un détecteur fluorimétrique (excitation = 315 nm, émission = 400 nm). Les peptides qui sont détectés par fluorescence sont collectés et analysés en spectrométrie de masse (MALDI-TOF). L'analyse en spectrométrie de masse a été réalisée en collaboration avec le laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et Technologies de Lille sur un appareil VOYAGER DE STR Pro (Perseptive Biosystem, Framingham, MA, USA).

### 6.3.2 Résultats

L'analyse sur colonne de C18 des peptides et glycopeptides libérés par la digestion trypsique de PhoAp met en évidence 2 pics fluorescents (F18 et F19) majoritaires élués entre 6 et 8% acétonitrile (Figure 27B). Le marquage, en parallèle, de la BSA avec la 2AP permet de montrer que ce marquage est spécifique de la préparation contenant PhoAp. En effet, l'analyse sur C18 des peptides libérés après digestion de la BSA marquée à la 2AP ne met en évidence aucun pic fluorescent (Figure 27A) bien que la quantité de BSA traitée par la 2AP soit 10 fois supérieure à celle de PhoAp.



**Figure 27 : Chromatogrammes obtenus à partir des peptides et glycopeptides isolés de la BSA (A) et de PhoAp (B) séparés par HPLC sur une colonne C18 et détectés par fluorescence.**

L'analyse en spectrométrie de masse de la fractions 18 met en évidence un glycopeptide majoritaire dont le pic majoritaire est à 3426 et les pics minoritaires incrémentés de 162 (correspondant à un hexose) (Figure28A). La fraction 19 contient aussi un glycopeptide dont le pic majoritaire est à 2615 (Figure28B) et les pics minoritaires sont incrémentés de 162 (Figure 28). Le glycopeptide de la fraction 19 est identique à celui de la fraction 18 avec une différence de masse correspondant à 5 hexoses. Ceci suggère que les deux pics fluorescents observés sur le chromatogramme de la C18 correspondent au même peptide qui, dans le cas de la fraction 18, possède 5 hexoses supplémentaires.

Cependant, les masses correspondant à ce glycopeptide ne correspondent à aucune masse théorique calculée à partir de la séquence de protéine et de la structure polysaccharidique hypothétique présentée dans la figure 26. En outre, le fort taux de glycosylation des fractions 18 et 19 a empêché tout séquençage peptidique. Des expériences supplémentaires sont nécessaires pour (1) voir si les étapes de préparation du glycopeptide terminal n'ont pas entraîné une modification de sa masse et (2) vérifier que les peptides identifiés par spectrométrie de masse sont effectivement fluorescents.

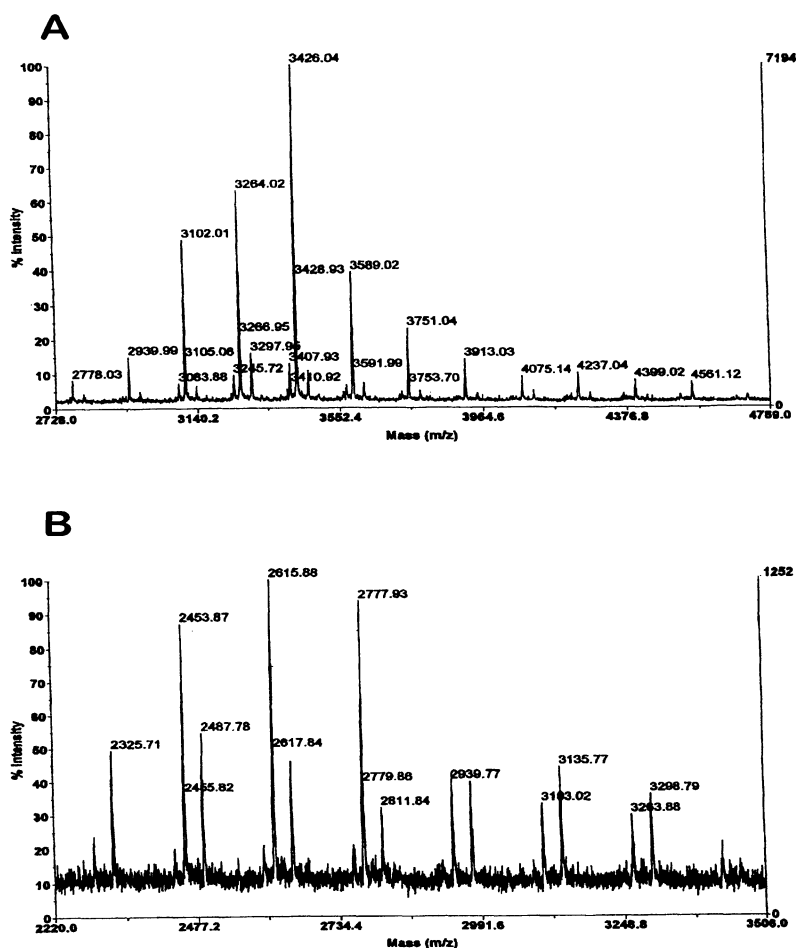


Figure 28 : Spectre de masse MALD-MS des fractions F18 (A) et F19 (B).

Les résultats obtenus peuvent être interprétés de deux façons. (1) Les pics observés en fluorescence correspondent à des artéfacts. Dans ce cas, soit le peptide fluorescent attendu n'a pas été identifié sur le chromatogramme, soit il n'existe pas, remettant ainsi en question notre hypothèse. (2) La liaison de PhoAp aux  $\beta$ -1,3 glucanes est différente de celle décrite chez la levure et ne met pas en jeu une liaison phosphodiester. Dans ce cas, la confirmation de la séquence du peptide est indispensable. Dans ce cas, la confirmation de la séquence du peptide est nécessaire pour aller plus loin.

En résumé, aucune des 3 stratégies utilisées ne nous a permis de conclure sur le mode d'association covalent ou non covalent de PhoAp aux  $\beta$ -1,3 glucanes de la paroi de *A. fumigatus*.

## Résumé

La paroi du champignon filamenteux *A. fumigatus* conditionne la croissance et est responsable du maintien de l'intégrité cellulaire lors de l'infection. Les protéines de la paroi de ce champignon filamenteux n'avaient pas été étudiées jusqu'à présent alors qu'elles semblent jouer un rôle essentiel dans la structuration de la paroi de la levure modèle *S. cerevisiae*. Une approche essentiellement biochimique a permis de caractériser les protéines associées à la paroi de *A. fumigatus*. La majorité des protéines pariétales chez *A. fumigatus* sont des protéines solubles. Une seule protéine est relarguée à partir de la paroi par un traitement  $\beta$ - (1,3) glucanase : c'est une phosphatase acide qui possède une ancre GPI et dont l'expression est réprimée en présence de phosphate inorganique. Par ailleurs, une étude des protéines GPI chez *A. fumigatus* par génomique comparative a montré que les protéines GPI décrites comme associées de façon covalente à la paroi chez la levure n'ont pas d'homologue chez *A. fumigatus*. Ainsi, l'organisation des protéines au sein de la paroi de *A. fumigatus* est différente de celle de la levure : les protéines pariétales ne semblent pas avoir un rôle essentiel dans l'élaboration de la paroi. Ensuite, une nouvelle famille de glycoprotéines portant un N-glycane lié à un galactofuranose en position terminale a été décrite. Cette famille comprend : une phospholipase C, une phosphatase alcaline et une phytase. Enfin, une analyse morphologique de deux mutants chitine synthase et gluconosyltransférase a permis d'associer la réduction de la croissance à un hyper-branchement du mycélium et à une diminution de la taille de la cellule apicale sans que l'organisation globale des polysaccharides pariétaux et le taux de croissance spécifique soient affectés.

## Abstract

*A. fumigatus* is the major pathogen among filamentous fungi. Its cell wall is involved in cell growth and responsible for cellular integrity during infection. Cell wall proteins had not been studied before. Their study showed that : (i) the majority of proteins present in the cell wall are soluble proteins in transit to be secreted ; (ii) the main protein that is released by  $\beta$ - (1,3)glucanase treatment from an SDS/ $\beta$  mercaptoethanol-treated cell wall is an acid phosphatase that has been characterized enzymatically and is a GPI-anchored protein whose expression is repressed by phosphate ; (iii) a comparative genomic analysis has confirmed the biochemical study and showed that none of the GPI-anchored proteins covalently bound to polysaccharides in yeast have homologues in *A. fumigatus*. These results suggested that organization of proteins in *A. fumigatus* cell wall is different from what is known about *S. cerevisiae* and that cell wall associated proteins do not play an essential role in the structural organization of the cell wall of *A. fumigatus*. Besides, a new class of glycoproteins has been described : galactomannanproteins (GMP) having a N-glycan with a terminal galactofuransose. This study has shown that, in contrast to yeast cells, the GMPs do not have an N-glycan with a long N-mannan backbone. Finally, an analysis of morphogenesis growth of two cell wall mutants having a reduced growth and a pattern of GPI anchored proteins different from the parent strains showed that that reduced growth is associated to an hyperbranching of the mycelium and a reduced apical cell size. Although cell wall polysaccharides content was different, localization of these polysaccharides in the cell wall does not differ between each strain.