Université Pierre et Marie Curie

Ecole doctorale Complexité du Vivant

Institut Pasteur - Unité de RMN des Biomolécules

Amyloïdes fonctionnelles du pathogène opportuniste *Aspergillus fumigatus*

Par **Ariane Pillé**

Thèse de doctorat de Biophysique

Dirigée par Iñaki Guijarro

Présentée et soutenue publiquement le 25 septembre 2014

Devant un jury composé de :

Germain TRUGNAN	Président
Françoise GUERLESQUIN	Rapporteur
James STURGIS	Rapporteur
Sophie ZINN-JUSTIN	Examinateur
Muriel DELEPIERRE	Examinateur
Iñaki GUIJARRO	Directeur de thèse

Except where otherwise noted, this work is licensed under
http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/

Table des matières

Table des illustrations 1

Glossaire 3

Abréviations 5

Avant-propos 9

Chapitre 1 : Etat de l'art 11

I. Les champignons filamenteux 13

II. Les hydrophobines 17

Historique 17

Rôle biologique 18

Description et caractéristiques 22

Propriétés physico-chimiques 23

Etude structurale des hydrophobines 26

Applications 29

III. Les infections fongiques chez l'homme 33

IV. *Aspergillus fumigatus*, mécanisme de défense et pathogénicité 37

Les *Aspergillus*, généralités et pathogénicité 37

Pathogénicité chez l'homme et mécanismes de défenses 38

Aspergilloses 40

V. Les fibres amyloïdes 43

Historique 43

Les fibres amyloïdes liées à des maladies 47

Les fibres amyloïdes fonctionnelles 51

Caractéristiques et méthodes d'étude des fibres amyloïdes 56

Chapitre 2 : Hydrophobines d'*A. fumigatus* 61

I. Présentation générale 63

II. Description du projet 69

Chapitre 3 : Matériel et méthodes 71

I. Plasmides 73

II. Expression des protéines 73

Expression de UBP41 73

Expression des hydrophobines 73

III. Purification des protéines 74

Purification de UBP41 74

Purification des hydrophobines 75
IV. Expériences de RMN 76
V. Alkylation des cystéines 77
VI. Etudes des fibres *in vitro* 78
Fluorescence 78
Microscopie électronique à transmission 78
Chapitre 4 : Résultats et discussion 79
I. Expression et purification des hydrophobines 81
II. Attribution des signaux RMN 83
Stratégie d'attribution 83
Attribution de l'hydrophobine RodA 86
Attribution des hydrophobines RodB et RodC 87
III. Structure secondaire et dynamique interne 91
Analyse des déplacements chimiques et étude de la structure secondaire 91
Etude de la dynamique interne sur l'échelle des nano- picosecondes 95
IV. Structure tridimensionnelle 103
Détermination de la structure de RodA 103
Modélisation des structures de RodB et RodC 109
Comparaison avec les autres hydrophobines 110
V. Etude des bâtonnets 113
Etude in vitro 113
Etude in vivo 124
Comparaison avec les autres hydrophobines 126
VI. Etude des propriétés immunologiques de RodA 129
Chapitre 5 : Conclusion et perspectives 133
Bibliographie 141
Annexe 159

Table des illustrations

Figure 1 : Croissance apicale et bourgeonnement des hyphes des champignons filamenteux 13
Figure 2 : Schéma d'une baside et d'un asque 14
Figure 3 : Cycle de développement asexué des champignons filamenteux 15
Figure 4 : Tête aspergillaire et couche de bâtonnets 17
Figure 5 : Formation de la couche d'hydrophobines aux interfaces 19
Figure 6 : Modèle d'assemblage des hydrophobines aux interfaces des canaux d'air traversant le plectenchyme 20
Figure 7 : Alignement de séquence d'hydrophobines étudiées 22
Figure 8 : Profils hydropathiques d'hydrophobines 23
Figure 9 : Propriété d'inversion de polarité de surface des hydrophobines 24
Figure 10 : Structure et potentiel électrostatique de l'hydrophobine EAS 27
Figure 11 : Couche d'hydrophobines de classe I et II 28
Tableau 1 : Infections fongiques invasives 34
Figure 12 : Tête aspergillaire et aspergillum 37
Figure 13 : Schéma des voies respiratoires 39
Figure 14 : Aspergillome 41
Figure 15 : Aspergillose invasive 42
Tableau 2 : Exemples de l'incidence et du taux de mortalité de l'aspergillose invasise dans certaines pathologies 42
Figure 16 : Rudolf Virchow 43
Figure 17 : Structure chimique de colorants métachromatiques utilisés pour identifier les amyloïdes 45
Figure 18 : Premières évidences de la nature fibrillaire des dépôts amyloïdes 46
Tableau 3 : Protéines amyloïdes et leurs précurseurs chez l'homme 48
Tableau 4 : Amyloïdoses 49
Tableau 5 : Exemples de protéines amyloïdes fonctionnelles chez différents organismes 52
Figure 19 : Caractéristiques structurales des fibres amyloïdes 58
Figure 20 : Suivi au cours du temps de la formation de fibres amyloïdes par fluorescence 59
Figure 21 : Alignement des séquences des hydrophobines identifiées chez A. fumigatus 63
Figure 22 : Phénotype du mutant de délétion Δrodc 64
Figure 23 : Conidiophore et couche de bâtonnets à la surface des spores d'A. fumigatus 65
Figure 24 : Dégradation de la couche de bâtonnets au cours de la germination 66
Figure 25 : Stratégie d'attribution séquentielle 83
Figure 26 : Corrélations dans les expériences HNCACB et CACB(CO)NH 84
Figure 27 : Corrélations dans l'expérience HCCH-TOCSY 85
Figure 28 : Spectre ^{1}H-^{15}N HSQC de RodA 86

Figure 29 : Spectre ^{1}H-^{15}N HSQC de RodB 87
Figure 30 : Spectre ^{1}H-^{15}N HSQC de RodC 89
Figure 31 : Probabilité de structure secondaire des protéines RodA, RodB et RodC 92
Figure 32 : Comparaison des structures secondaires d'hydrophobines de classe I 93
Figure 33 : Dynamique interne de l'hydrophobine RodA 96
Figure 34 : Dynamique interne de l'hydrophobine RodB 98
Figure 35 : Dynamique interne de l'hydrophobine RodC 99
Figure 36 : « Random coil index » d'hydrophobines de classe I 101
Figure 37 : Angles dièdres du squelette peptidique 103
Tableau 6 : Angles de torsion et structures secondaires 103
Figure 38 : Ensemble de structures de l'hydrophobine RodA 106
Figure 39 : Rmsd calculés par résidu, nombre de nOe observés par résidu et effet nOe ^{1}H-^{15}N 107
Tableau 7 : Statistiques pour l'ensemble des 15 structures calculées de plus basse énergie de RodA 108
Figure 41 : Modélisation des structures de RodB et RodC 109
Figure 42 : Structures connues d'hydrophobines 111
Figure 43 : Suivi de la cinétique de formation des fibres amyloïdes de RodA par fluorescence 114
Figure 44 : Influence de la concentration en protéine sur la cinétique de formation des fibres amyloïdes 116
Figure 45 : Régions amyloïdogènes prédites chez RodA 117
Figure 46 : Impact d'une mutation ponctuelle en glycine sur la cinétique de formation des amyloïdes. 118
Figure 47 : Mutations en glycine et leurs impacts sur la cinétique de formation des fibres 119
Figure 48 : Comparaison de la couche de bâtonnets in vitro et in vivo 120
Figure 49 : Cinétique de formation des fibres amyloïdes pour la protéine repliée, tronquée et dépliée 121
Figure 50 : Comparaison de la morphologie des fibres formées par la protéine repliée, tronquée ou dépliée 122
Figure 51 : Etude in vivo par AFM des mutants de RodA 125
Figure 52 : Régions prédites comme amyloïdogènes chez les hydrophobines de classe I 126
Figure 53 : Comparaison des régions amyloïdogènes des hydrophobines RodA et EAS 128
Figure 54 : Test d'activation des cellules dendritiques par l'hydrophobine RodA 130
Figure 55 : Localisation de RodA après internalisation par une cellule dendritique 131
Figure 56 : Mutation des régions amyloïdogènes de RodA 138

Glossaire

Anamorphe : En mycologie, qualificatif qui désigne la forme ou le stade de reproduction asexuée d'un champignon quand il existe aussi une forme ou un stade sexué, dit téléomorphe. Le qualificatif holomorphe désigne les deux stades à la fois.

Appressorium : Système utilisé par les champignons pour pénétrer dans une cellule hôte végétale.

Ascomycète : Phylum des mycètes caractérisé par des spores formées à l'intérieur de « sacs » appelés asques.

Basidiomycète : Phylum des mycètes caractérisé par des spores formées à l'extrémité de cellules spécialisées, les basides.

Chorion : Enveloppe la plus externe de l'œuf.

Conidie : Spore assurant la multiplication asexuée des champignons et non capable de mobilité autonome.

Granulocytes : Globules blancs qualifiés de « non spécifiques » dans la mesure où ils ne sont pas dirigés contre un seul antigène.

Hémoptysie : Rejet, à l'occasion de toux, de sang provenant des voies aériennes sous-glottiques.

Métachromatique : En biochimie, désigne un colorant ayant la propriété de donner à certains tissus une teinte différente de sa couleur propre.

Mucilage : Substance végétale constituée de polysaccharides, qui gonflent au contact de l'eau en prenant une consistance visqueuse, parfois collante, semblable à la gélatine.

Mycorhize : Association symbiotique entre des champignons et les racines des plantes.

Neutropénie : Trouble hématologique caractérisé par un taux bas de granulocytes (ou polynucléaires) neutrophiles dans le sang.

Parenchyme pulmonaire : Partie intime du poumon composée des bronchioles respiratoires, des conduits alvéolaires et des alvéoles. Sa structure est composée de capillaires sanguins afin de faciliter le contact avec l'air alvéolaire.

Phialide : Cellule située à l'extrémité d'un conidiophore, de forme allongée, dont la fonction est de produire des spores.

Plectenchyme : Terme générique pour désigner tous types de tissus fongiques.

Réponse hypersensible : En pathologie végétale, la réponse hypersensible est le mécanisme spécifique de réaction des plantes à l'attaque d'un agent pathogène. Destinée à prévenir la propagation d'une infection locale, la réponse hypersensible se caractérise par la mort rapide des cellules voisines du point d'infection. Son rôle est de limiter la croissance et la propagation des agents pathogènes dans le reste de la plante.

Saprophyte : Organisme capable de se nourrir de matière organique non vivante par l'intermédiaire d'une membrane, suite à une réaction enzymatique libérant les nutriments présents dans la matière à ingérer. De nombreux champignons se développent selon un mode de nutrition saprophyte et croissent sur des arbres ou des feuilles mortes. Ils participent ainsi à la formation de l'humus. Ils jouent ainsi un rôle capital dans les cycles de la matière (cycle du carbone, cycle de l'azote).

Sarcoïdose : Maladie inflammatoire systémique de cause inconnue atteignant préférentiellement les poumons, mais pouvant atteindre n'importe quel autre organe. Aussi appelée maladie de Besnier-Boeck-Schaumann (BBS) ou lymphogranulomatose bénigne.

Séménogéline : Constituant du sperme produit par les vésicules séminales.

Sporophore : Organe de la « fructification » du mycélium des Fungi ou Mycota, partie la plus visible du macromycète qui est appelé en langage courant « champignon ».

Sporopollénine : Polymère naturel constituant principal de l'exine des pollens et des spores. Ce matériau, de nature lipidique, dont la composition exacte reste encore inconnue, fut d'abord découvert dans la paroi externe des spores et nommée sporine, tandis que celle présente dans la coque du pollen fut nommée pollénine. Par la suite, sporine et pollénine, s'avérant identiques, furent simplement regroupées sous l'appellation sporopollénine. Ce matériau fut ensuite retrouvé dans les parois d'algues unicellulaires (ex. *Chlorella vulgaris*).

Téléomorphe : En mycologie, qualificatif qui désigne la forme ou le stade de reproduction sexuée d'un champignon quand il existe aussi une forme ou un stade asexué, dit anamorphe. Le qualificatif holomorphe désigne les deux stades à la fois.

Thalle : Appareil végétatif ne possédant ni feuilles, ni tiges, ni racines. Les organismes sont alors qualifiés de thallophytes.

Abréviations

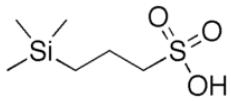
ABPA : Aspergillose Broncho-Pulmonaire Allergique

AFM : Microscopie à force atomique (« Atomic Force Microscopy »)

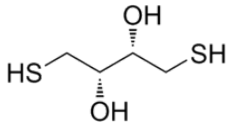
AI : Aspergillose Invasive

BMRB : « Biological Magnetic Resonance Bank »

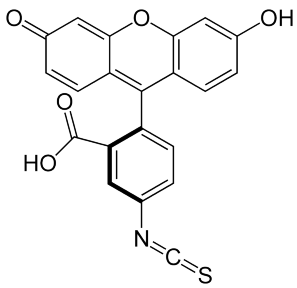
DSS : 4,4-diméthyl-4-silapentane-1-sulfonate de sodium



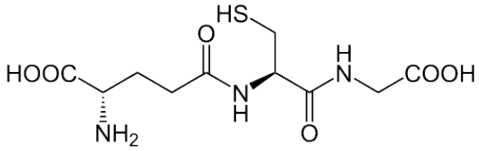
DTT : Dithiothréitol



FITC : Isothiocyanate de fluorescéine

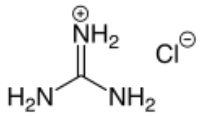


GSH : Glutathion réduit



GSSG : Glutathion oxydé

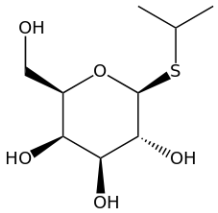
GuHCl : Chlorure de guanidium



HSQC : « Heteronuclear Single Quantum Coherence »

IAPP : « Islet Amyloid Polypeptide »

IPTG : Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside



LB : Milieu Luria-Bertani

nOe : Effet Overhauser nucléaire

NOESY : « Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY »

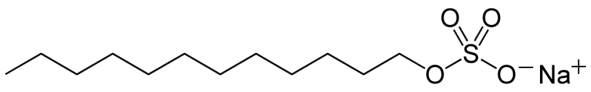
PAGE : « Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis »

RCI : « Random Coil Index »

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

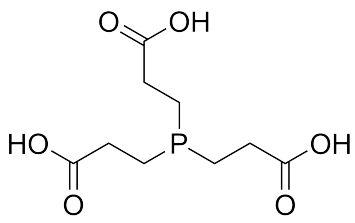
SAXS : Diffusion des rayons X aux petits angles (« Small Angle X-ray Scattering »)

SDS : Dodécylsulfate de sodium



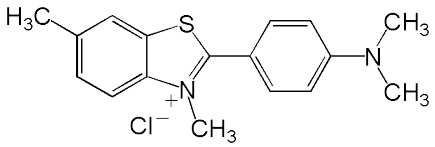
SELDI-TOF : « Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization – Time Of Flight »

TCEP : Tris-2-carboxyethyl-phosphine



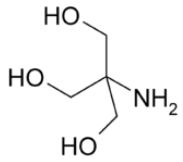
TEM : Microscopie électronique à transmission (« Transmission Electron Microscopy »)

ThT : Thioflavine T



TOCSY : « TOtal Correlation SpectroscopY »

TrisHCl : 2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol



VIH : Virus d'immunodéficience humaine

Avant-propos

Ces dernières décennies, avec le nombre croissant de personnes immunodéprimées, les infections par des pathogènes opportunistes, bactériens ou fongiques, ont considérablement augmenté. Parmi celles-ci, les infections fongiques sont de plus en plus préoccupantes du fait de la difficulté de diagnostic et de la faible efficacité des traitements existants. Ainsi, le champignon filamenteux *Aspergillus fumigatus* est devenu le principal pathogène fongique des voies respiratoires. Les infections liées à ce champignon, appelées aspergilloses, présentent des taux d'incidence et de mortalité très élevés et sont aujourd'hui un véritable problème de santé publique.

Les protéines fongiques de la famille des hydrophobines sont ubiquitaires chez les champignons filamenteux. De par leurs propriétés physico-chimiques remarquables, elles jouent un rôle essentiel dans différentes étapes du cycle de développement des champignons filamenteux et également dans leur pathogénicité.

Au cours de ma thèse, je me suis intéressée à l'étude structurale et fonctionnelle d'hydrophobines du pathogène opportuniste *Aspergillus fumigatus*. J'ai notamment étudié la protéine RodA qui forme une couche de fibres amyloïdes à la surface des spores. Cette couche hydrophobe permet de protéger les spores de la dessiccation, facilite leur dispersion dans l'air et confère aux conidies une inertie vis-à-vis du système immunitaire humain.

Afin d'introduire mon travail, je décrirai brièvement le cycle de vie des champignons filamenteux, les hydrophobines et leurs fonctions biologiques ainsi que les infections fongiques, en particulier les aspergilloses, et enfin les fibres amyloïdes. Je présenterai, plus en détail, les hydrophobines *d'A. fumigatus*, et en particulier l'hydrophobine RodA et son rôle dans les infections d'*A. fumigatus*.

Chapitre 1 : Etat de l’art

I. Les champignons filamenteux

D'aspect extérieur duveteux, les champignons filamenteux, communément appelés moisissures, sont omniprésents dans notre environnement. Ils sont présents aussi bien dans l'air que dans le sol, sur les surfaces, dans les denrées alimentaires et parfois dans l'eau. L'humidité favorise leur survie et leur croissance. Ils sont hétérotrophes vis-à-vis du carbone et doivent extraire de leur milieu des composés organiques déjà formés. Ce sont des organismes saprophytes qui se développent sur des substrats organiques en décomposition tels que les litières de feuilles, le compost ou les denrées alimentaires.[1] De ce fait, les champignons filamenteux sont essentiels dans le cycle de l'azote et du carbone. Comme tous les champignons, ce sont des organismes thallophytes, dépourvus de racines, de tiges et de feuilles. L'appareil végétatif, appelé thalle, est formé par des cellules, les hyphes, qui forment des filaments. Ces filaments peuvent s'assembler pour former un pseudo-tissu appelé plectenchyme existant sous différentes formes. La forme principale est le mycélium qui est constitué d'un enchevêtrement de nombreux filaments très fins et ramifiés. L'extension du mycélium conditionne la survie du champignon et se fait par croissance apicale des hyphes (Figure 1). Le bourgeonnement des hyphes à l'arrière de l'apex et l'anastomose, qui correspond à la fusion des parois cellulaires de deux hyphes, entraînent la ramification.

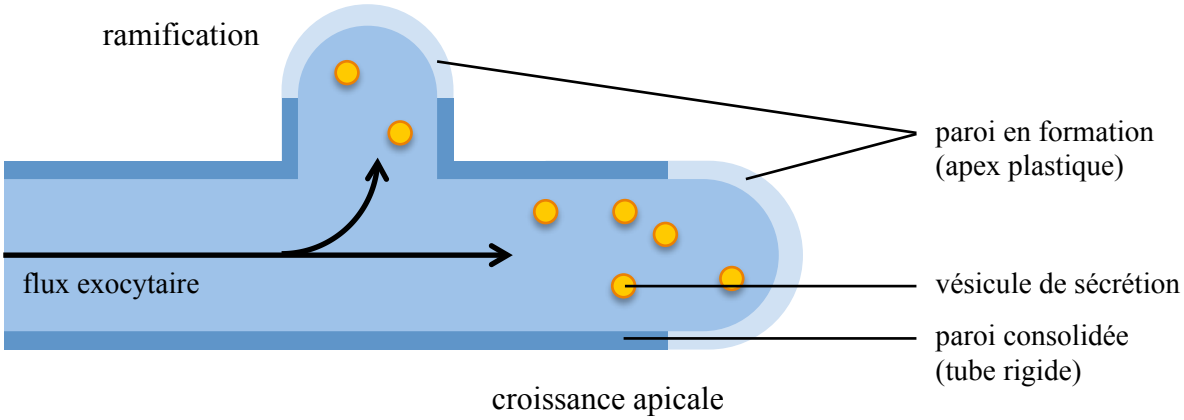


Figure 1 : Croissance apicale et bourgeonnement des hyphes des champignons filamenteux

Un déséquilibre alimentaire peut induire la phase reproductive avec la différenciation d'organes de dispersion et de reproduction. Chez les champignons filamenteux les modes de reproduction sexuée et asexuée coexistent et dépendent des conditions environnementales.[2] A ce jour, un cycle de reproduction sexuée a été observé pour près de la moitié des champignons

filamenteux. Cependant, l'étude des génomes a montré que tous les champignons filamenteux possèdent l'ensemble de gènes nécessaires à leur reproduction sexuée ce qui suggère l'existence d'un cycle de reproduction sexuée chez tous les champignons filamenteux.

La classification des champignons est basée sur la morphologie des spores produites. Ainsi deux familles distinctes existent chez les champignons filamenteux, les ascomycètes et les basidiomycètes. Les premiers produisent des spores regroupées dans des « sacs » appelés asques tandis que chez les seconds, les spores sont produites par des cellules spécialisées appelées basides (Figure 2). Chez certains basidiomycètes, au cours de la reproduction sexuée, le plectenchyme s'organise sous forme d'un sporophore. Cet organe de « fructification » du champignon se présente sous la forme d'un pied et d'un chapeau, la forme la plus connue des champignons.

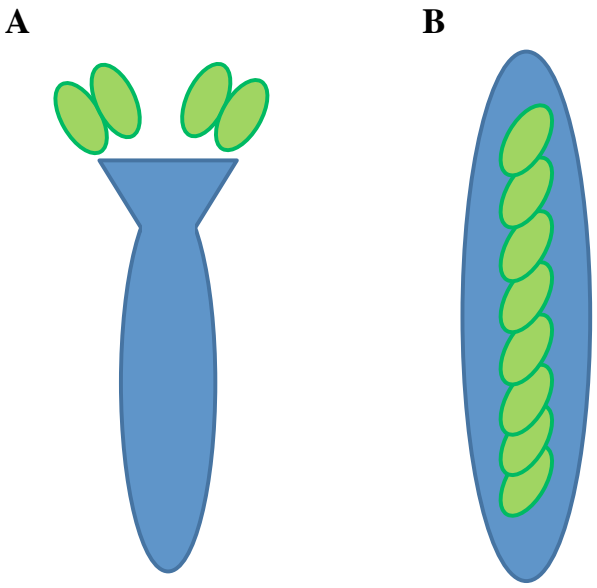


Figure 2 : Schéma d'une baside et d'un asque

(**A**) Schéma d'une baside, cellule spécialisée produisant les spores. Généralement quatre spores sont produites par baside. (**B**) Schéma d'un asque, enveloppe dans laquelle sont regroupées les spores. Généralement huit spores sont produites par asque.

Au cours du cycle asexué, dit haploïde, afin de coloniser de nouveaux environnements, le champignon produit des hyphes aériennes qui se différencient en structures reproductives, les conidiophores. Ces derniers produisent des spores ou conidies dont l'hydrophobicité de leur enveloppe externe permet une dispersion aisée dans l'air. Les spores dormantes sont résistantes à la dessiccation et aux rayons ultraviolets et peuvent survivre parfois des années. Lorsque les conditions sont adéquates, les conidies dormantes vont entrer en germination. La

plupart des spores germent en présence d'eau et d'oxygène sans exiger de sources alimentaires extérieures, cependant, pour certaines espèces, un apport de substrat alimentaire peut être nécessaire. Lors des premières étapes de la germination, les spores deviennent hydrophiles ce qui permet une pénétration d'eau donnant lieu à un gonflement de la conidie. La germination aboutit à la formation d'un tube germinatif qui va s'allonger et se ramifier pour former un nouveau mycélium (Figure 3).

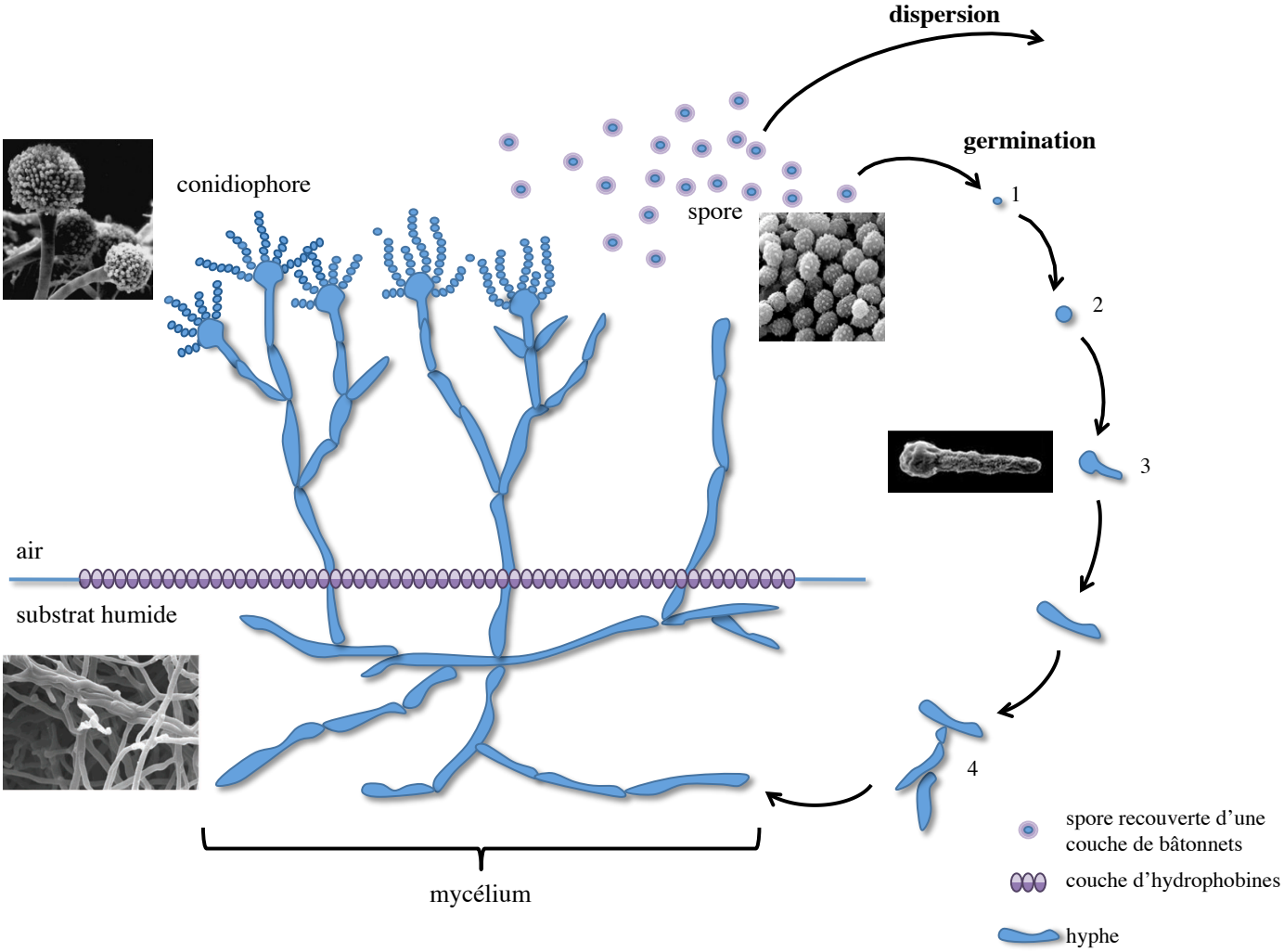


Figure 3 : Cycle de développement asexué des champignons filamenteux

Germination : (**1**) spore hydrophile (**2**) spore gonflée (**3**) tube germinatif (**4**) nouveau mycélium.

L'interface air-eau est caractérisée par une forte tension superficielle de 72 $mJ.m^{-2}$, ce qui représente un obstacle important pour la croissance aérienne des hyphes.[3] Le franchissement de cette barrière est rendu possible grâce à l'activité de protéines aux propriétés surfactantes appelées les hydrophobines. Ces protéines sont sécrétées par le champignon et permettent de réduire la tension de surface.[4] Les hydrophobines sont également retrouvées à la surface des hyphes aériennes et des conidies où elles s'auto-assemblent pour former une couche hydrophobe. C'est cette dernière qui permet aux hyphes aériennes et aux conidies de résister à la dessiccation et qui facilite la dispersion des spores dans l'air. [5,6]

Les hydrophobines ont un large spectre d'activités et sont impliquées dans de nombreuses étapes du développement fongique. Elles sont en particulier impliquées dans l'attachement des spores aux surfaces végétales et animales contribuant ainsi directement à la pathogénicité des champignons.[7] A ce jour, elles sont considérées comme étant uniques et ubiquitaires chez les champignons filamenteux.

II. Les hydrophobines

Historique

Les hydrophobines sont des protéines amphiphiles de faible poids moléculaire (< 20 kDa) qui font partie des protéines les plus tensio-actives connues.[8] Elles sont produites par les champignons sous forme soluble et polymérisent aux interfaces air-eau ou hydrophobes-hydrophiles pour former des couches amphipathiques.[6] Chez les champignons filamenteux, les hydrophobines ont été observées pour la première fois à la fin des années 1960. Des structures fibrillaires appelées bâtonnets (« rodlets » en anglais) sont mises en évidence par microscopie électronique à transmission (TEM) à la surface des structures aériennes de champignons filamenteux tels que *Penicillium*[9] et *Aspergillus*[10,11](Figure 4).

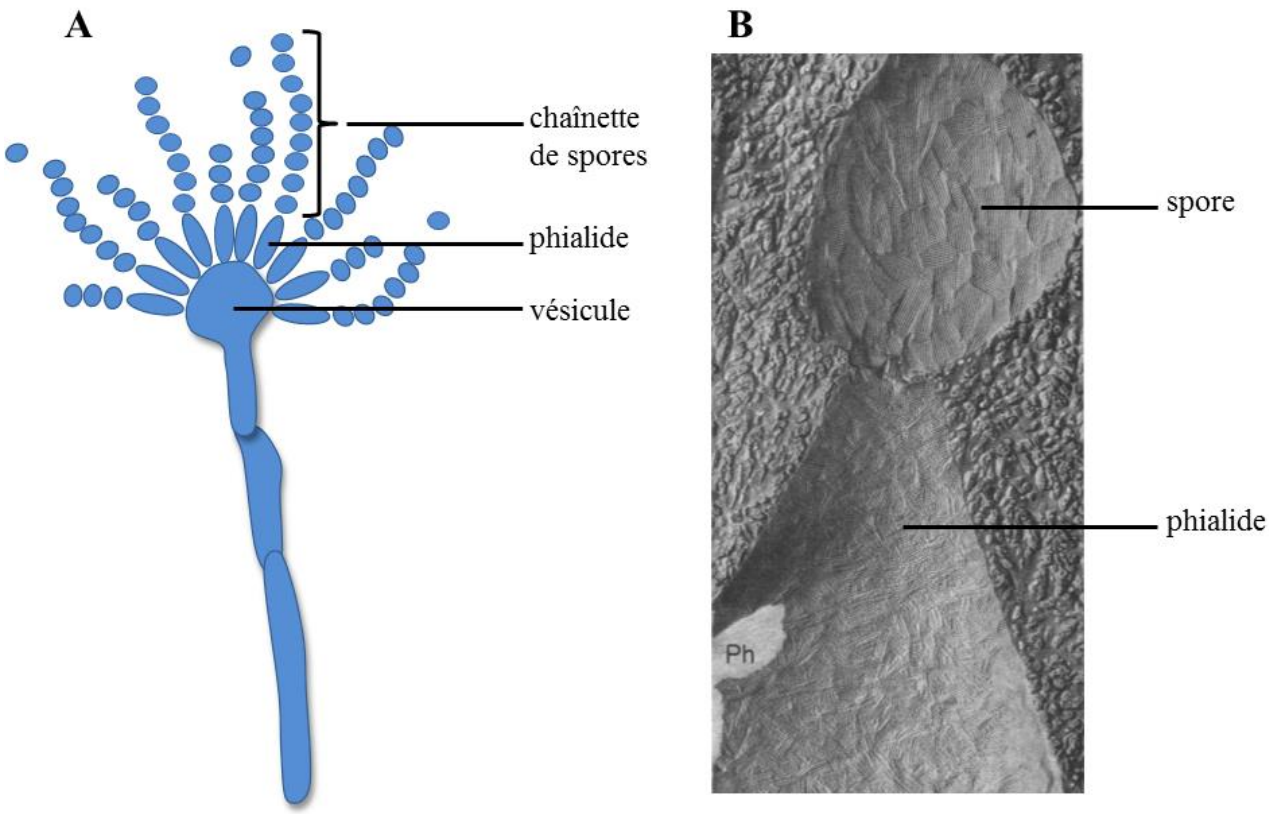


Figure 4 : Tête aspergillaire et couche de bâtonnets

(**A**) Schéma d'une tête aspergillaire avec la vésicule sur laquelle sont situées les phialides qui produisent les spores sous forme de chaînettes. (**B**) Observation au début des années 1970 de la morphologie en bâtonnets à la surface d'une conidie et d'une phialide d'*Aspergillus fumigatus* observée par TEM (x 60.000).[11]

En effet, il apparaît dans ces études que les structures aériennes de ces champignons, phialides (cellules à l'extrémité des conidiophores qui produisent les spores) ou spores, sont recouvertes d'une couche hydrophobe insoluble présentant cette morphologie en bâtonnets. Un rôle biologique des bâtonnets ne sera proposé qu'en 1978 par Dempsey et Beever à partir de l'étude d'un mutant de *Neurospora crassa* qui ne présente pas à la surface de ses spores ce motif en bâtonnets caractéristique.[12] Ils suggèrent que le rôle de ces bâtonnets est de conférer une imperméabilité à l'eau et de permettre aux spores de facilement se disperser dans l'air. Il fut supposé pendant un temps, que les bâtonnets étaient constitués de biopolymères tels que la cutine ou la sporopollénine avant de déterminer qu'ils étaient en fait constitués de protéines. Cependant, l'insolubilité de cette membrane a rendu difficiles les études visant à leur identification.[13]

Par la suite, en 1984, un autre axe d'étude a permis d'identifier le premier gène d'hydrophobine lors de l'analyse des gènes fortement exprimés au cours de la croissance de *Schizophyllum commune*.[14] Le nom d'hydrophobine a été introduit par Wessels *et al.* en se basant sur la séquence en acides aminés de ces protéines contenant une forte proportion de résidus apolaires.[13]

Rôle biologique

Les analyses de génomes ont mis en évidence que les hydrophobines existaient généralement sous forme de petites familles de gènes, entre deux et dix membres exprimés à différentes étapes du cycle de développement.[15] Cependant, il a été montré que chez certaines espèces plus de dix hydrophobines sont identifiées dans le génome, par exemple jusqu'à 33 hydrophobines sont retrouvées chez *Coprinus cinereus*.[16] Ces protéines remplissent une grande variété de fonctions. Elles aident le champignon à survivre et à s'adapter à son environnement et elles jouent divers rôles au cours du développement.[6] Ces différentes fonctions sont pour la plupart liées à des phénomènes de surface qui, à cette échelle, représentent l'une des forces dominantes.[8] Les multiples rôles des hydrophobines chez les champignons filamenteux ont été mis en évidence grâce à l'étude de mutants de délétion. Par exemple, une souche de *S. commune* chez qui le gène codant pour l'hydrophobine SC3 a été supprimé, est incapable de s'extraire de son milieu aqueux en formant des hyphes aériennes. Chez le mutant de délétion *Δroda* d'*A. fumigatus*, la couche de bâtonnets à la surface des spores n'est plus observée et les conidies sont alors hydrophiles.[17]

L'un des plus importants aspects fonctionnels des hydrophobines est leur capacité à s'auto-assembler en couches amphipathiques aux interfaces et à interagir avec les surfaces. En réduisant la tension superficielle, les couches d'hydrophobines permettent aux champignons d'échapper à leur environnement aqueux rendant possible le développement des hyphes aériennes. D'autre part, en exposant la face hydrophobe, elles confèrent une hydrophobicité aux surfaces fongiques exposées à l'air ce qui les protège de la dessiccation et facilite la dispersion des spores dans l'air (Figure 5).[18]

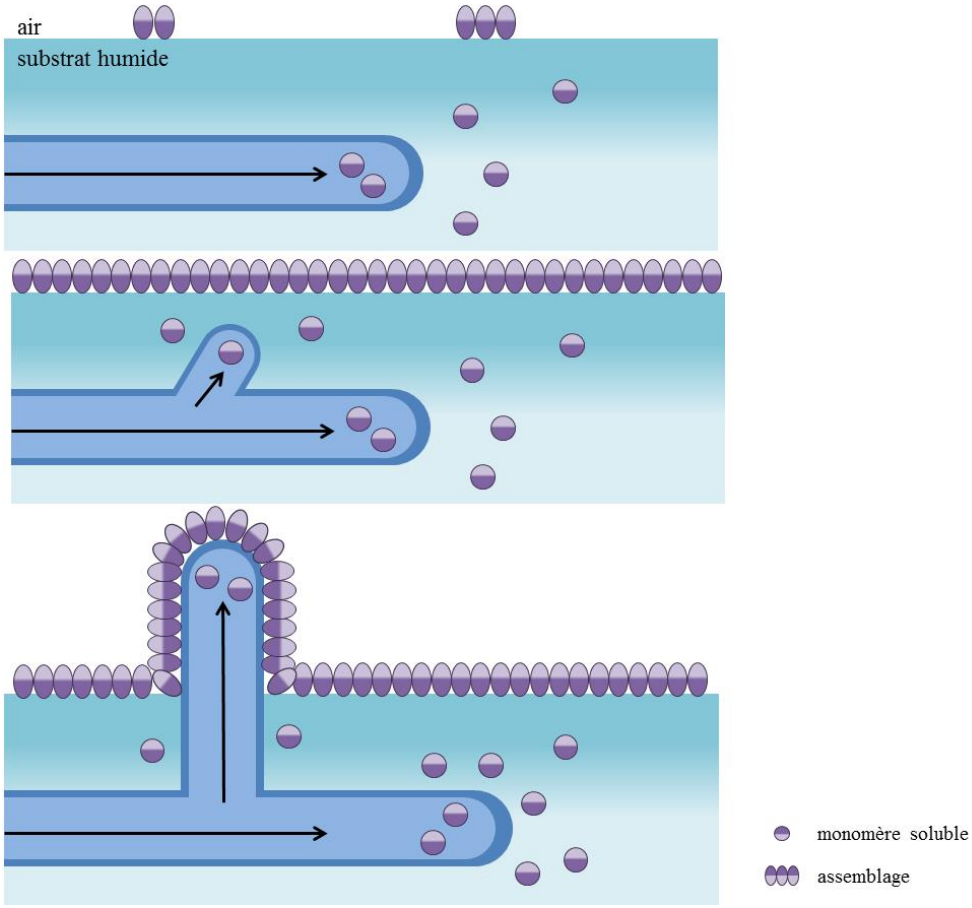


Figure 5 : Formation de la couche d'hydrophobines aux interfaces

Modèle proposé pour la formation de la couche amphipathique par auto-association des hydrophobines à l'interface air-eau et à la surface de l'hyphe aérienne. La couche d'hydrophobines diminue la tension de surface ce qui permet la croissance aérienne et protège de la dessiccation. [18]

Les couches d'hydrophobines sont connues pour être extrêmement résistantes. Ainsi, leur exposition sur les surfaces fongiques permet de protéger les champignons de leur environnement. Par exemple, chez *Conidobolus obscurus*, la couche de bâtonnets est

recouverte par une matrice extracellulaire mucilagineuse qui facilite l'adhésion des spores à leur substrat. Une fois que les conidies sont liées à leur hôte, la couche de bâtonnets est alors exposée pour augmenter leur résistance vis à vis de l'environnement.[19] De même, chez *Agaricus bisporus*, l'hydrophobine HypA est retrouvée au niveau de la cuticule du chapeau du champignon. Son rôle serait de former une couche protectrice pendant le développement du sporophore.[20]

Les échanges gazeux sont indispensables au développement du champignon et pour ce faire, de nombreux canaux d'air traversent le plectenchyme (tissus fongiques). Il est supposé que les hydrophobines sécrétées par les hyphes sous forme monomérique diffuseraient dans la matrice extracellulaire et s'auto-assembleraient aux interfaces de ces canaux (Figure 6). En les recouvrant d'une couche hydrophobe, les assemblages d'hydrophobines empêcheraient l'eau de s'infiltrer dans ces canaux et de les remplir par capillarité, maintenant, ainsi, l'efficacité des échanges gazeux.[21,22]

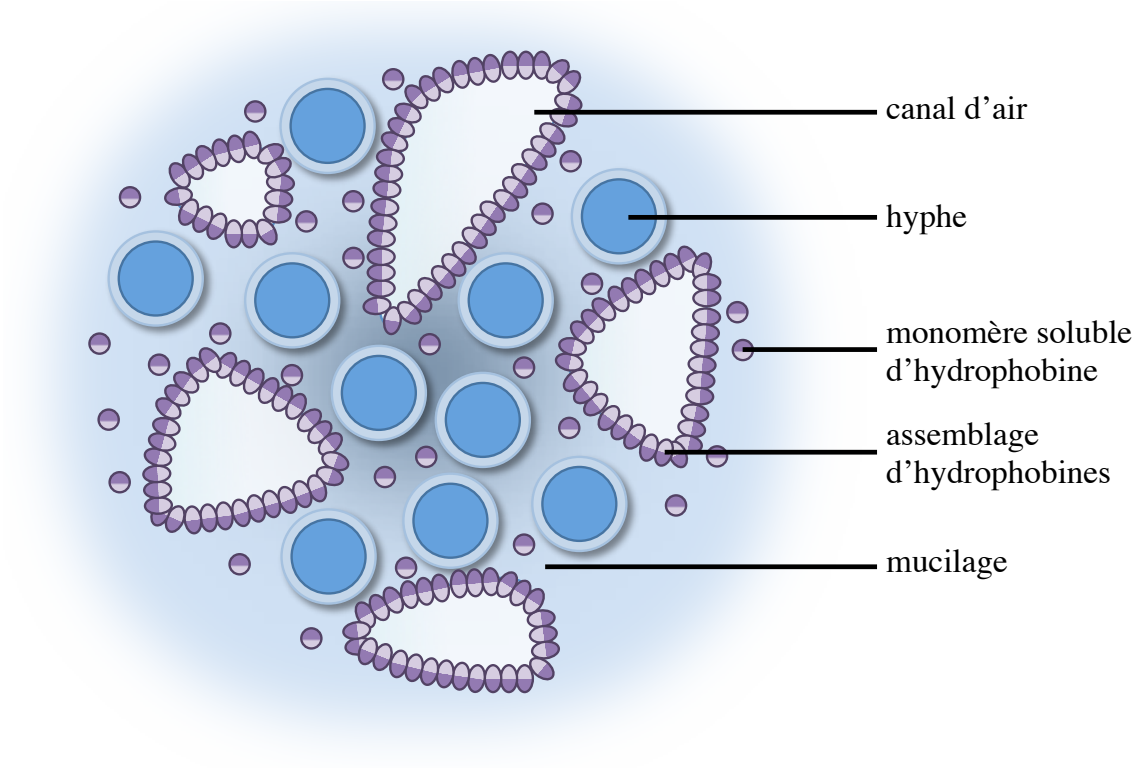


Figure 6 : Modèle d'assemblage des hydrophobines aux interfaces des canaux d'air traversant le plectenchyme

Les hydrophobines sont sécrétées par les hyphes sous forme de monomères solubles. Ces derniers diffusent dans l'environnement hydrophile et s 'assemblent aux interfaces des canaux d'air.[21]

Par ailleurs, il a également été montré que les hydrophobines interviennent dans les structures symbiotiques formées par des champignons et un autre organisme. Par exemple, elles sont retrouvées dans les interactions plantes-champignons[23] au niveau des mycorhizes, structures symbiotiques entre les champignons et les plantes[24,25]. De même, chez les lichens, organismes symbiotiques entre des champignons et des algues et/ou des cyanobactéries, des hydrophobines ont été observées à l'interface entre les deux partenaires.[26]

Les hydrophobines sont également impliquées dans les mécanismes d'adhésion des champignons filamenteux. Elles interviennent dans l'adhésion des hyphes sur un substrat solide[27] et dans l'adsorption de souches fongiques pathogènes à la surface des organismes hôtes, insectes ou plantes[28,29]. Leur rôle exact dans la virulence des champignons filamenteux reste souvent indéterminé. Dans le cas de *M. grisea*, un pathogène du riz, deux hydrophobines ont été identifiées comme étant impliquées dans la pathogénicité, MPG1[30] et MHP1[31]. L'hydrophobine MPG1 est un facteur de virulence et elle est nécessaire pour le développement du champignon lors de l'infection. Elle est fortement exprimée au cours de la conidiation, de la formation de l'appressorium et du développement des symptômes. Après la sporulation, la spore va adhérer à la surface de la plante, germer et former un organe appelé appressorium, organe qui permet au champignon de pénétrer à l'intérieur des cellules hôtes végétales en exerçant une pression mécanique. Il a été montré que MPG1 est responsable de la formation de la couche de bâtonnets à la surface des spores. Ainsi, elle interagit avec les surfaces hydrophobes où elle agirait comme un senseur développemental dans la formation de l'appressorium.[29] L'hydrophobine MHP1 est quant à elle fortement exprimée au cours des dernières étapes de l'infection. Les études sur le mutant de délétion ont montré que MHP1 est essentiel à la conidiation et à la survie des spores. De plus, ce mutant de délétion montre également une pathogénicité moindre. MHP1 interviendrait dans les dernières étapes de l'infection, par exemple, dans la propagation des lésions ou dans la senescence des cellules végétales.[31]

Description et caractéristiques

En plus de la grande proportion d'acides aminés hydrophobes, les hydrophobines présentent toutes un motif idiosyncratique de huit cystéines dans lequel la deuxième et la troisième ainsi que la sixième et la septième sont toujours adjacentes. Ce motif de huit cystéines formant quatre ponts disulfures permet aujourd'hui d'identifier une protéine comme membre de cette famille. Les hydrophobines présentent une faible similarité de séquence et une grande diversité de longueurs mises en évidence dans l'alignement de séquences de quelques hydrophobines les plus communément étudiées (Figure 7).[32] Malgré la faible identité de séquence, lorsque les séquences sont alignées par rapport aux cystéines, il apparaît que les hydrophobines possèdent des profils hydropathiques similaires (Figure 8).[33]

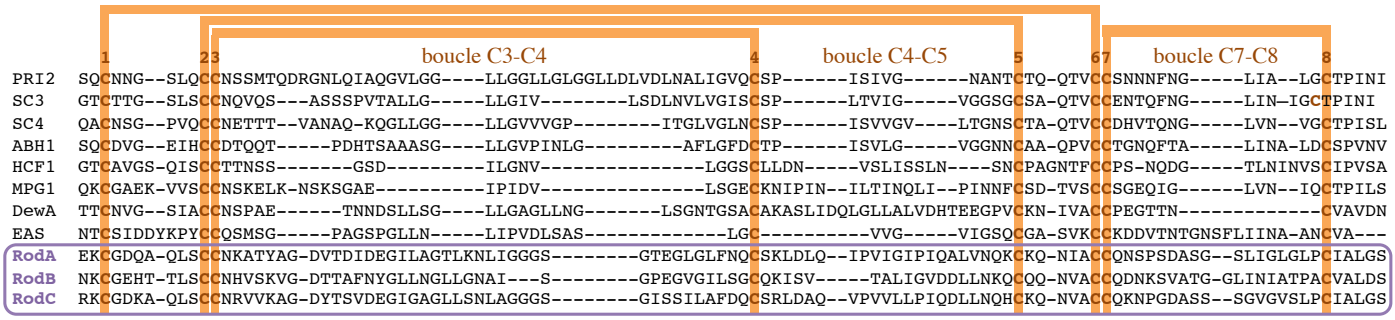


Figure 7 : Alignement de séquence d'hydrophobines étudiées

Les huit résidus de cystéine conservés et les ponts disulfures formés sont indiqués en orange. PRI2 : *A. aegerite* ; SC3 et SC4 : *S. commune* ; ABH1 : *A. bisporus* ; HCF1 : *C. fulvum* ; MPG1 : *M. grisea* ; DewA : *A. nidulans* ; EAS : *N. crassa* ; RodA, RodB et RodC : *A. fumigatus* (cadre violet). Les extrémités N- et C-terminales des hydrophobines ne sont pas montrées dans cette figure.

Des expériences de complémentation menées sur l'hydrophobine MPG1 de *Magnaporthe grisea* ont montré qu'en dépit de leur très faible pourcentage d'identité de séquence, les hydrophobines forment un groupe de protéines étroitement liées. Les résultats indiquent que la conservation des huit résidus de cystéines et la distribution similaire des acides aminés hydrophobes et hydrophiles au niveau de la séquence suffisent à assurer leur fonctionnalité.[34] Cependant, dans cette étude, six hydrophobines de divers champignons filamenteux ont été nécessaires pour rétablir partiellement le phénotype de la souche sauvage de *M. grisea*. De plus, les études menées ont montré que les hydrophobines d'un même

champignon remplissent différentes fonctions. Ainsi, leur taux d'expression et leur localisation varient en fonction du stade de développement du champignon. Cette spécialisation serait due en partie à la grande diversité de séquences observées au sein de cette famille.[22]

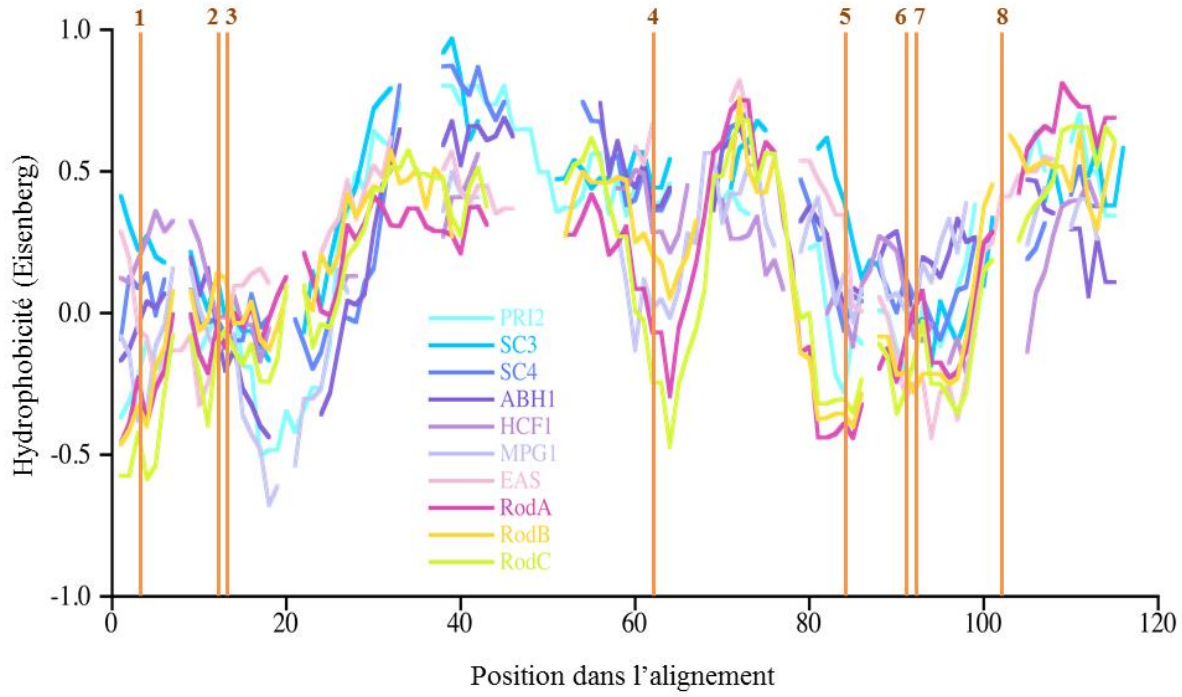


Figure 8 : Profils hydropathiques d'hydrophobines

Superposition des profils hydropathiques de plusieurs hydrophobines. Les positions des cystéines sont signalées en orange. Les profils hydropathiques sont montrés d'après l'alignement de la Figure 7.

Propriétés physico-chimiques

Toutes les hydrophobines étudiées s'auto-assemblent aux interfaces hydrophobes-hydrophiles sous forme d'une membrane amphipathique et inversent la polarité des surfaces. L'hydrophobicité de ces assemblages peut être évaluée en mesurant l'angle de contact d'une goutte d'eau sur une surface hydrophobe ou hydrophile en absence ou en présence d'hydrophobines. L'une des faces des monocouches d'hydrophobines est modérément à hautement hydrophile avec un angle de contact allant de 22° à 63°. La deuxième face présente une hydrophobicité pouvant être équivalente à celle du Teflon™ avec un angle de contact de l'ordre de 110°. *In vivo*, à l'interface air-eau, la couche amphipathique d'hydrophobines

s'oriente naturellement avec sa face hydrophile vers l'eau et sa face hydrophobe vers l'air permettant de diminuer la tension de surface. A la surface des spores ou des hyphes aériennes, la face hydrophile interagit avec la paroi cellulaire des champignons tandis que la face hydrophobe est exposée à l'air rendant ainsi leur surface hydrophobe, ce qui les protège de la dessiccation et facilite la dispersion des conidies.[6] *In vitro*, les hydrophobines sont capables de s'auto-assembler sur des surfaces aussi bien hydrophobes qu'hydrophiles simplement en séchant une solution d'hydrophobines sur la surface. Les angles de contact mesurés mettent ainsi en évidence une inversion de polarité des surfaces recouvertes d'une couche d'hydrophobines (Figure 9).

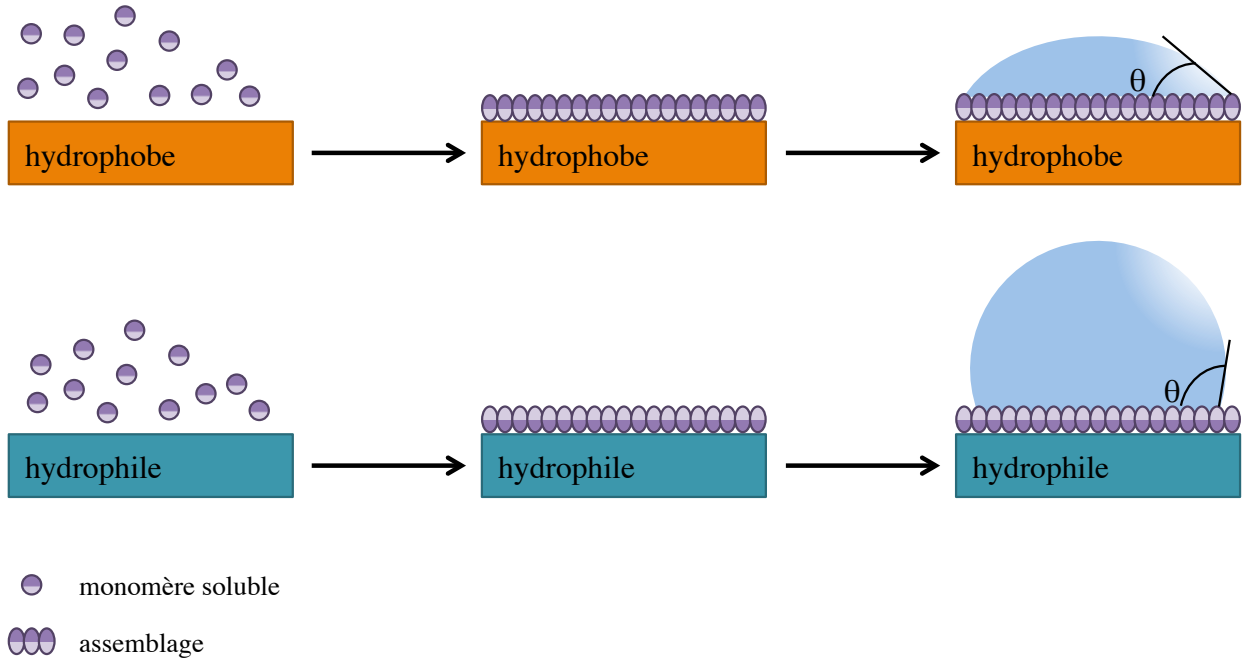


Figure 9 : Propriété d'inversion de polarité de surface des hydrophobines

Inversion de la polarité de surfaces hydrophobes et hydrophiles grâce à la couche d'hydrophobines caractérisée par l'angle de contact d'une goutte d'eau.

En se basant sur les profils hydropathiques, la solubilité et le type de couche formée lors de leur auto-association, les hydrophobines ont été divisées en deux sous-familles, la classe I et la classe II.[33] Ultérieurement, il a été montré que des intermédiaires à ces deux classes pouvaient exister en particulier chez les espèces *Aspergillus*.[35] Il est à noter qu'au sein de la famille des hydrophobines l'extrémité N-terminale, avant la première cystéine, est la région la plus variable en termes de séquence et de longueur. Cette extrémité contient également un

peptide signal de sécrétion hydrophobe, d'une vingtaine de résidus, clivé au cours de la sécrétion des hydrophobines.

Les hydrophobines de classe I ont été isolées chez les ascomycètes et les basidiomycètes. Elles présentent une très grande variabilité de séquences et de longueurs au niveau des régions situées entre les résidus de cystéine, en particulier entre la troisième et la quatrième cystéines.[7] La couche amphipathique qu'elles forment aux interfaces consiste en une mosaïque de fibres linéaires non branchées avec une morphologie en bâtonnets ayant une largeur d'une dizaine de nanomètres (Figure 4 B). Ces bâtonnets présentent toutes les caractéristiques des fibres amyloïdes.[18] Ils sont hautement insolubles et extrêmement stables résistant à un traitement de 2% SDS à 100°C. Ils ne peuvent être solubilisés que par un traitement avec des acides très concentrés tels que l'acide méthanoïque, l'acide fluorhydrique ou l'acide trifluoroacétique (TFA). Dans les conditions adéquates, les monomères solubles alors obtenus peuvent à nouveau former des fibres amyloïdes.[32]

Les hydrophobines de classe II n'ont été identifiées que chez les ascomycètes. Elles sont en général plus petites que les hydrophobines de classe I et présentent une moins grande variabilité de séquences et de longueurs au niveau des régions inter-cystéines.[7] Les longueurs des régions entre les cystéines 3 et 4 et entre les cystéines 4 et 5 sont très conservées au sein de cette classe.[36] Les couches formées lors de leur auto-association ne présentent ni la morphologie en bâtonnets, ni les caractéristiques des fibres amyloïdes. En comparaison avec les hydrophobines de classe I, la couche formée est beaucoup moins résistante et peut être solubilisée dans 60% d'éthanol ou 2% de SDS ainsi que dans divers solvants organiques et détergents.[32] Les hydrophobines de classe II peuvent également être dissociées par refroidissement ou en appliquant une pression sur la membrane.[6]

Malgré les différences morphologiques et physico-chimiques, les hydrophobines de classe I et de classe II remplissent leurs fonctions biologiques grâce à leurs propriétés amphipathiques et tensioactives. Le lien potentiel entre les différences physico-chimiques et les séquences des hydrophobines est difficile à établir. Néanmoins, mise à part la longueur plus conservée chez les hydrophobines de classe II, il existe quelques différences au niveau de la séquence. Tout d'abord les hydrophobines de classe II contiennent un plus grand nombre de résidus chargés. De plus, les hydrophobines de classe I contiennent des séquences prédites comme amyloïdogènes. Par ailleurs, chez les hydrophobines de classe I, les doublets de cystéines précèdent des résidus hydrophobes alors que chez les hydrophobines de classe II les doublets sont en amont de résidus hydrophobes.[37]

Etude structurale des hydrophobines

Sous forme monomérique

Les structures secondaires de plusieurs hydrophobines, SC3 et SC4 de *S. commune*, EAS de *N. crassa* ou encore ABH3 d'*Agaricus bisporus* ont été étudiées par dichroïsme circulaire et infra-rouge à transformée de Fourier. Pour chacune de ces protéines, les spectres obtenus sont caractéristiques de protéines structurées majoritairement en feuillet β. Cependant, selon les hydrophobines, le contenu en éléments de structure secondaire varie. Certaines hydrophobines telle que EAS de *N. crassa*, sont constituées uniquement de feuillets β et de boucles, tandis que d'autres hydrophobines, telles que SC3 de *S. commune*, présentent également un faible pourcentage d'hélices α. Il apparaît dans ces études que toutes les hydrophobines possèdent des régions peu ou pas structurées. De plus, pour l'ensemble des hydrophobines de classe I étudiées, le contenu en feuillet β augmente significativement lors de la formation des bâtonnets.[36] L'augmentation de la proportion de feuillets β chez les hydrophobines de classe I lors de leur auto-association, est cohérente avec la formation de fibres amyloïdes. En effet, celle-ci nécessite des changements conformationnels d'au moins une région pour former la structure β croisée constituant le cœur des fibres.

Aujourd'hui, seules quelques structures d'hydrophobines ont été résolues. Les premières ont été obtenues en 2005 et 2006 par cristallographie aux rayons X et correspondent aux hydrophobines de classe II, HFBI[38] et HFBII[39] de *Trichoderma reesei*, protéines qui présentent un fort pourcentage d'identité de séquence. Les autres structures d'hydrophobines disponibles ont été déterminées par résonance magnétique nucléaire (RMN) en solution et correspondent aux hydrophobines de classe I EAS de *Neurospora crassa*[40], DewA de *Aspergillus nidulans*[41] et l'hydrophobine de classe II NC2 de *N. crassa*[42]. L'ensemble de ces hydrophobines présente un cœur qui adopte une topologie de type tonneau β. Ce dernier est stabilisé par les quatre ponts disulfures. Les boucles reliant les brins constituant le tonneau β présentent quant à elles une grande variabilité de longueur, de flexibilité et de contenu en structures secondaires (Figure 10 A).[36] Par ailleurs, la présence de larges régions hydrophobes à la surface de ces protéines permet d'expliquer les propriétés surfactantes des hydrophobines (Figure 10 B).[32] En effet, les monomères, comme les membranes, sont amphipathiques. Cependant les monomères sont moins tensioactifs que les polymères.

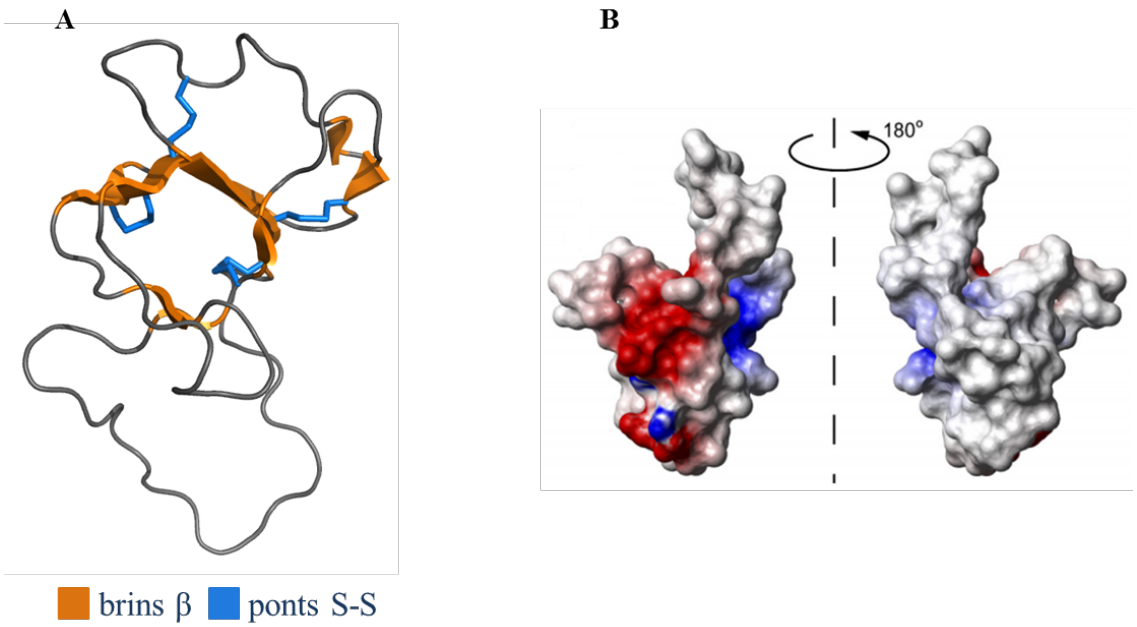


Figure 10 : Structure et potentiel électrostatique de l'hydrophobine EAS

(**A**) Structure de l'hydrophobines de classe I EAS de *N. crassa* (code PDB : 2FMC). (**B**) Potentiel électrostatique de l'hydrophobine EAS avec une face hydrophobe (en blanc) et une face hydrophile chargée (en rouge et bleu).

Sous forme polymérique

In vitro, la formation des fibres est initiée soit en exposant l'échantillon à l'air, soit en l'agitant afin d'augmenter la surface de contact air-eau, soit en le séchant sur une surface hydrophobe ou hydrophile, par exemple de mica pour les études de microscopie à force atomique (AFM). Les fibres alors formées présentent la même morphologie que celle observée à la surface des spores. La microscopie électronique à transmission (TEM), l'AFM et la diffraction des rayons X ont été utilisées dans les différentes études visant à caractériser l'auto-association des hydrophobines de classe I et de classe II.

Les assemblages en bâtonnets des hydrophobines de classe I possèdent un diamètre apparent d'environ 10 nm et des longueurs visibles allant de 35 nm à 240 nm (Figure 11 A).[12] Ces bâtonnets présentent toutes les caractéristiques des fibres amyloïdes.[43,44] En effet, ils interagissent de façon caractéristique avec les marqueurs des fibres amyloïdes tels que la thioflavine T (ThT) et le rouge Congo. De plus, ils montrent des clichés de diffraction des rayons X avec des taches de diffraction à 4,8 Å et à 10-12 Å correspondant respectivement

aux distances inter-brins et inter-feuillets de la structure β croisée.[40] Les fibres amyloïdes et leur caractérisation expérimentale seront présentées plus en détail dans la section I.V.

Les hydrophobines de classe II ont été moins étudiées que celles de classe I et les données disponibles concernent presque exclusivement les hydrophobines HFBI et HFBII de *T. reseii* qui présentent 72 % de similarité de séquence. Les hydrophobines de classe II s'auto-associent également sous forme de fibres[45] mais celles-ci ne possèdent pas les caractéristiques des fibres amyloïdes. De plus, elles présentent des dimensions beaucoup plus importantes avec des diamètres de l'ordre de 1 µm et des longueurs allant de 10 µm à des centaines de micromètres. Les mécanismes moléculaires de la formation des fibres sont encore aujourd'hui indéterminés mais grâce à la combinaison des données de diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS) et d'AFM, il semblerait que l'auto-association des hydrophobines HFBI et HFBII requièrent un intermédiaire tétramérique.[46] Des clichés de microscopie à force atomique ont montré que leur auto-association présente une structuration en domaines cristallins avec des motifs hexagonaux réguliers. En utilisant la technique de Langmuir-Blodgett, l'épaisseur du film formé a été mesurée à 13 Å, épaisseur compatible avec une monocouche (Figure 11 B).[47] La diffraction des rayons X employée pour caractériser ces agrégats fait apparaître que la structure est soit monoclinique soit hexagonale en fonction de la méthode employée pour leur formation. De plus, les clichés font apparaître des différences d'arrangements entre les hydrophobines HFBI et HFBII malgré un mécanisme passant par un intermédiaire tétramérique qui semblerait commun.[47]

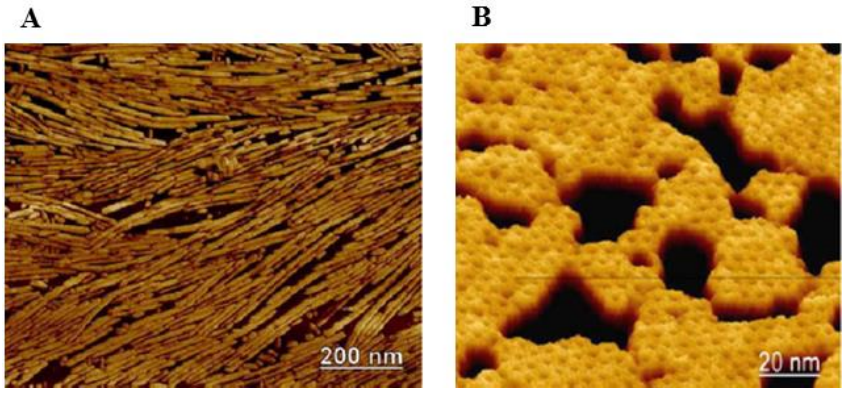


Figure 11 : Couche d'hydrophobines de classe I et II

(**A**) Cliché d'AFM de la monocouche formée *in vitro* par l'hydrophobine HGF1de *Grifola frondosa*.[48] (**B**) Cliché d'AFM de la membrane formée *in vitro* par HFBI montrant une structure organisée.[48]

Applications

Les propriétés physico-chimiques des hydrophobines, notamment leur capacité à inverser la polarité des surfaces et leurs propriétés tensioactives, les rendent très intéressantes d'un point de vue biotechnologique et elles ont un potentiel pour de multiples applications.

Applications industrielles

La capacité des hydrophobines à recouvrir des surfaces en s'auto-associant et à inverser la polarité, en fait de bons candidats pour des revêtements anti-salissures. En effet, les vitres des fenêtres ou des voitures souffrent de l'encrassement et la croissance d'organismes sur la coque des bateaux représente un problème conséquent pour l'industrie nautique. Ainsi, l'industrie est continuellement à la recherche d'une solution pour ces problèmes. Le développement d'un revêtement à base d'hydrophobines qui augmenterait l'hydrophobicité des surfaces traitées pourrait être une réponse à ces problèmes d'encrassement. De plus, il serait envisageable de coupler les hydrophobines à des composés inhibiteurs de croissance pour amplifier l'action du revêtement. En fonction de la longévité et du coût, ce type de revêtement protéique pourrait remplacer ceux utilisés actuellement. [49] Grâce à leurs propriété tensioactives, les hydrophobines pourraient être utilisées comme surfactants ou comme émulsifiants dans l'industrie alimentaires ou dans des produits ménagers.[8] Des applications industrielles pour stabiliser les lubrifiants de perforation de puits ont aussi été envisagées par des entreprises comme BASF et des brevets ont été déposés dans ce sens. Evidemment avant d'envisager une industrialisation des hydrophobines, il faudrait mettre au point une production à grande échelle. Il est à noter que des productions de l'ordre du kilogramme ont déjà été rapportées dans la littérature.[50]

Applications biomédicales

Avec les niveaux et les coûts de production actuels, les utilisations les plus réalistes résident dans des applications à haute valeur ajoutée. Ce type d'applications concerne en particulier le secteur médical et pharmaceutique. Les hydrophobines pourraient être utilisées dans les formulations de médicaments hydrophobes pour améliorer leur biodisponibilité et leurs caractéristiques pharmacocinétiques. Dans ce sens, des expériences avec l'hydrophobine SC3 et des formulations orales de drogues liposolubles dans des modèles murins ont été

réalisées.[51] De même, les hydrophobines HFBI et HFBII ont été utilisées pour recouvrir des nanoparticules de drogues afin de les fonctionnaliser.[52] Certaines hydrophobines, en particulier RodA d'*A. fumigatus*, ne déclenche pas de réponse immunitaire. Il est suggéré qu'elles pourraient être utilisées afin de masquer les régions immunogènes de certains médicaments protéiques afin de prolonger leur efficacité.[32] En ce qui concerne les implants médicaux, la biocompatibilité est un aspect primordial puisqu'un défaut peut conduire à un rejet. Ainsi en recouvrant les implants d'hydrophobines il serait possible de diminuer les risques de rejet.[53] Dans le domaine des biomatériaux, les revêtements d'hydrophobines pourraient également être employés pour réduire les interactions non-spécifiques. De plus, en optimisant l'hydrophilie, ces revêtements pourraient augmenter l'adhésion des cellules sur certaines surfaces. Par exemple, il a été montré qu'une couche d'hydrophobines permet d'obtenir de meilleurs résultats en terme de croissance et de morphologie pour des fibroblastes.[54]

Applications cosmétiques

L'industrie cosmétique est également connue pour ces applications à forte valeur ajoutée. Dans ce domaine, les hydrophobines représentent des protéines d'intérêt en particulier pour les produits capillaires. En effet, l'une des difficultés dans la formulation de ces produits est d'obtenir une adhésion ou une adsorption suffisante des substances actives sans que celles-ci soient éliminées par les shampoings. L'utilisation d'hydrophobines pourrait prolonger le temps de vie de ces substances sur plusieurs lavages, en faisant des additifs très intéressants. De plus, de par leurs propriétés tensioactives, elles pourraient être utilisées pour stabiliser des émulsions dans les crèmes ou les pommades.

Bio-senseurs et électrodes

L'un des problèmes fréquemment rencontré dans l'utilisation d'enzymes fixées sur des surfaces en tant que bio-senseurs est leur dégradation. Il a été montré que recouvrir la surface d'une couche d'hydrophobines au préalable permet de diminuer l'hydrophobicité, autorisant l'utilisation d'une plus grande variété de matériaux, et de prolonger le temps de vie et d'activité des enzymes fixées. Les enzymes peuvent être fixées aussi bien de façon covalente[55] via l'expression de protéines de fusion ou de façon non-covalente[56]. Par ailleurs, il est également possible d'immobiliser les enzymes au niveau de la face hydrophobe de la

couche d'hydrophobines pour étudier leur activité.[57] Dans le cas des lipases, leur fixation sur la face hydrophobe des couches d'hydrophobines entraîne une augmentation de leur activité comparable à celle observée sur d'autres supports hydrophobes.

D'autres études ont montré qu'une couche d'hydrophobines à la surface d'électrodes peut contrôler leur accessibilité vis-à-vis des composés en solution. Ainsi les hydrophobines permettent d'affiner la sensibilité et la spécificité des électrodes recouvertes.[58]

Méthodes séparatives

Le caractère amphiphile des hydrophobines peut être exploité dans des méthodes séparatives. En couplant les systèmes d'extraction biphasique avec les hydrophobines il est possible d'extraire des protéines directement du milieu de culture. En effet, dans un système d'extraction biphasique à base de détergents, les hydrophobines vont se retrouver dans la phase de détergent tandis que les autres protéines hydrophiles vont être dans la phase riche en polymères. Les hydrophobines peuvent ensuite être extraites par ajout d'oxyde d'éthylène ou d'oxyde de propylène. En exprimant les protéines d'intérêt en fusion avec une hydrophobine il est possible de les co-purifier rapidement et efficacement.[59,60]

III. Les infections fongiques chez l'homme

Il est largement reconnu que les pathogènes fongiques ont un impact conséquent sur la vie animale et végétale. Ainsi, un rapport récent dresse le bilan de l'implication de ces pathogènes au niveau de l'extinction de certaines espèces, de la sécurité alimentaire et de la perturbation des écosystèmes.[61] Pourtant, bien que les infections fongiques, notamment les infections nosocomiales, contribuent de façon substantielle à la morbidité et à la mortalité humaine, l'impact de ces maladies sur la santé publique reste mal évalué. De plus, malgré un besoin de tests diagnostics efficaces et de nouveaux médicaments, la recherche sur la pathophysiologie des infections fongiques chez l'homme reste en retard par rapport aux maladies dues à d'autres pathogènes. Au cours de leur vie, la majorité des individus contractent des infections fongiques superficielles qui sont généralement faciles à soigner. Par contre, des millions d'individus contractent des infections fongiques invasives très préoccupantes et qui sont bien plus difficiles à diagnostiquer et à traiter.[62]

Les infections superficielles de la peau et des ongles sont les maladies fongiques les plus répandues et affectent environ 25% de la population mondiale et jusqu'à 70% chez les plus de 70 ans.[63] L'incidence de chaque infection varie en fonction des conditions socioéconomiques, des zones géographiques et des habitudes culturelles. Les infections fongiques invasives sont beaucoup moins fréquentes mais elles sont associées à des taux de mortalité particulièrement élevés, généralement au-dessus de 50%, et chaque année elles sont responsables d'au moins 1,5 million de décès (Tableau 1).

Le système immunitaire inné des individus sains possède des mécanismes efficaces dans la prévention des infections fongiques. Cependant, leur incidence a considérablement augmenté au cours de ces dernières décennies du fait du vieillissement de la population et de l'augmentation des maladies immunosuppressives, des interventions médicales invasives et des traitements immunosuppresseurs. [62,64]

Maladie (espèce commune)	Localisation	Estimation nombre de personnes atteintes par an	Estimation taux de mortalité (%)
Mycoses invasives opportunistes			
Aspergillose (*A. fumigatus*)	mondiale	> 200 000	30 - 95
Candidose (*C. albicans*)	mondiale	> 400 000	46 - 75
Cryptococcose (*C. neoformans*)	mondiale	> 1 000 000	20 - 70
Mucormycose (*R. oryzae*)	mondiale	> 10 000	30 - 90
Pneumocystose (*P. jirovecii*)	mondiale	> 400 000	20 - 80
Mycoses dimorphiques endémiques[+]			
Histoplasmose (*H. capsulatum*)	Etats-Unis	~ 25 000	28 - 50
Paracoccidioidomycose (*P. brasilliensis*)	Brésil	~ 4 000	5 - 27
Penicilloise (*P. marneffei*)	Asie du sud-est	> 8 000	2 - 75

Tableau 1 : Infections fongiques invasives

Exemples des infections fongiques invasives parmi les plus significatives.[62] [+] Les mycoses dimorphiques peuvent être localisées dans différentes régions du monde, cependant dans la plupart des régions peu de données sont disponibles. Les chiffres sont relatifs aux régions pour lesquelles le plus de données sont disponibles.

La pathogénicité des champignons est déterminée par rapport à l'intensité d'immunosuppression qui prédispose à une infection. Ainsi la levure *Candida* et en particulier *C. albicans* est la plus répandue des infections nosocomiales fongiques et une immunosuppression relativement minime prédispose à une infection invasive. *Candida* est une levure retrouvée au niveau de la surface épithéliale de la plupart des individus sains. Des infections invasives préoccupantes peuvent avoir lieu dans le cas de patients fortement immunodéprimés et de patients ayant subi des interventions invasives ou ayant subi un traumatisme nécessitant un séjour prolongé en soin intensif.[65]

Le champignon filamenteux *Aspergillus* est la deuxième cause d'infections fongiques opportunistes et en particulier *A. fumigatus* qui intervient à des degrés intermédiaires d'immunosuppression.[64] La difficulté du diagnostic et les taux de mortalité très élevés (jusqu'à 95%[62]) en font un pathogène très dangereux. La contamination a lieu par les spores et il est ainsi le principal pathogène aéroporté.[64]

IV. *Aspergillus fumigatus*, mécanisme de défense et pathogénicité

Les *Aspergillus*, généralités et pathogénicité

Le nom *Aspergillus* apparaît dès 1729 et il est l'un des plus anciens noms usités pour décrire le règne fongique. En observant les structures microscopiques qui produisent les conidies, Pier Antonio Micheli note une ressemblance entre les têtes aspergillaires et l'*aspergillum* ou goupillon, ustensile utilisé par le clergé de l'Eglise romane pour asperger l'assemblée d'eau bénite (Figure 12).[66]

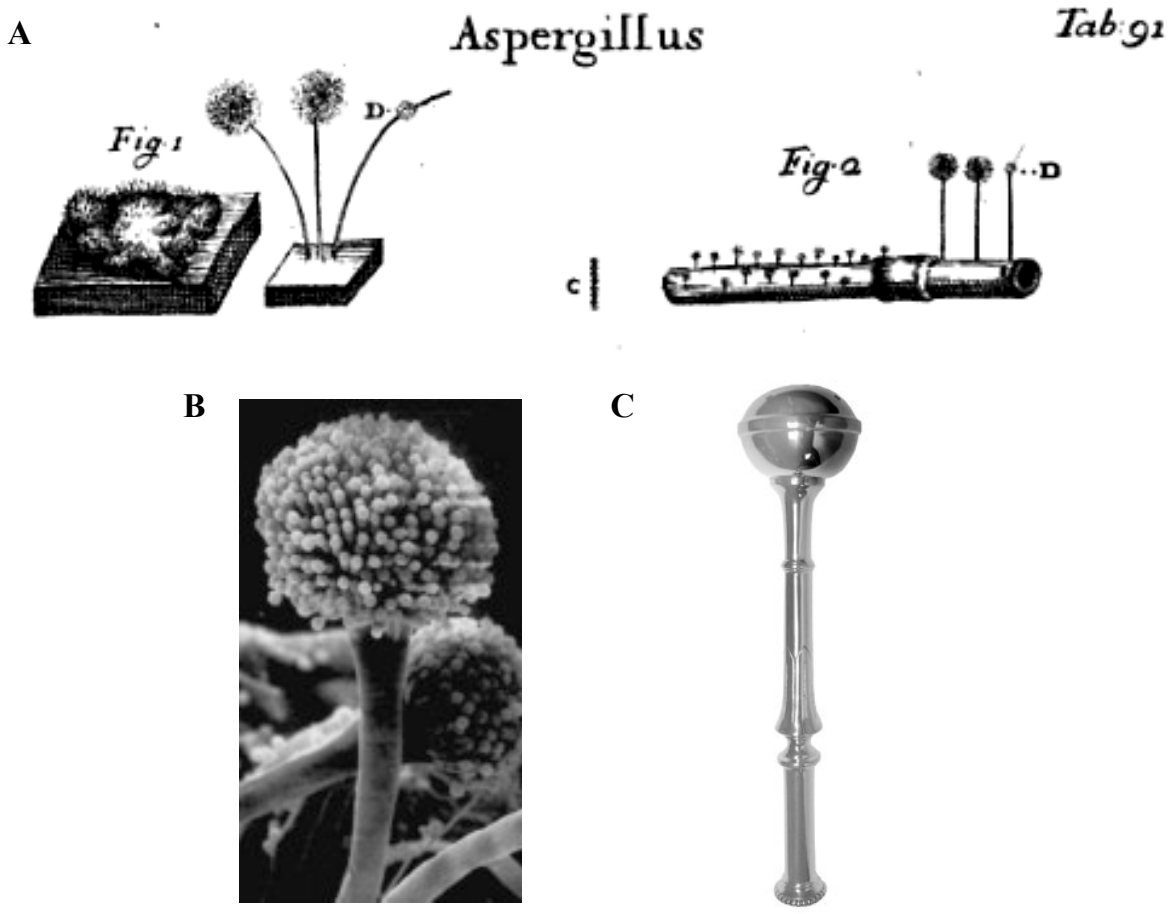


Figure 12 : Tête aspergillaire et aspergillum

(**A**) Planche descriptive d'*Aspergillus* dans le Planta Novarum de Micheli en 1729. (**B**) Tête aspergillaire caractéristique des structures reproductives des *Aspergillus*. (**C**) Aspergillum.

Depuis, le genre *Aspergillus* est l'un des plus étudiés et par conséquent des mieux connus parmi les champignons filamenteux. Les espèces *Aspergillus* sont pour la plupart des organismes saprophytes qui jouent un rôle essentiel dans le recyclage des sources de carbone et d'azote.[67] Ce sont des champignons ubiquitaires qui sont retrouvés aussi bien dans les régions arctiques que dans les régions tropicales.[68] Le genre *Aspergillus* comprend plus de 200 espèces, et leur nombre exact fait encore débat du fait de leur taxonomie complexe.[69] Plusieurs espèces *Aspergillus* sont utilisées dans l'industrie agro-alimentaire et pharmaceutique du fait de leurs activités enzymatiques. *A. niger* est par exemple utilisé pour la production d'acide citrique, d'amylases, de pectinases, de phytases et de protéases. *A. oryzae* est utilisé dans la fermentation des graines de soja pour la production de la sauce soja (shoyu) ainsi que dans la fermentation de la pâte miso et celle du riz pour la production de saké. *A. terreus* est, quant à lui, utilisé dans la fabrication de la lovastatine, un médicament anti-cholestérol.[67,70]

Le genre *Aspergillus* est également connu pour ses nombreux pathogènes à la fois végétaux et animaux. Parmi eux, *A. flavius* et *A. parasiticus* sont capables de contaminer un grand nombre de cultures en produisant des aflatoxines, substances carcinogènes hautement toxiques. La consommation de cultures contaminées peut causer des maladies très sérieuses voire létales et constitue un problème majeur dans les pays en développement.[71] Chez les animaux, aussi bien les oiseaux que les mammifères, *A. fumigatus* représente le pathogène principal et il est surtout impliqué dans des affections des voies respiratoires.[67]

Pathogénicité chez l'homme et mécanismes de défenses

Chez l'homme, environ 40 espèces *Aspergillus* ont été reportées comme étant pathogènes.[67] Cependant dans 95% des cas, les infections humaines sont dues à *A. fumigatus*.[72] Ce dernier peut survivre dans une très large gamme de substrats et de températures. Il est capable de se développer à 55°C, de survivre à des températures allant jusqu'à 70°C et se développe préférentiellement à 37°C, ce qui explique sa pathogénicité chez l'homme.[73] Il est un des champignons dont les spores disséminées dans l'air sont les plus abondantes sur la planète. Son taux de sporulation est très élevé et chaque conidiophore produit chaque jour des milliers de conidies. La dispersion de ces dernières dans l'air est uniquement liée aux perturbations de l'environnement et aux courants d'air. Une fois disséminées dans l'air, leur petite taille et leur hydrophobicité leur permettent d'être

maintenues en suspension. Chaque jour nous respirons des centaines de spores *d'A. fumigatus*[74]. Leur diamètre n'excédant pas 3 µm, celles-ci peuvent parvenir jusqu'aux bronchioles et alvéoles pulmonaires (Figure 13).[70]

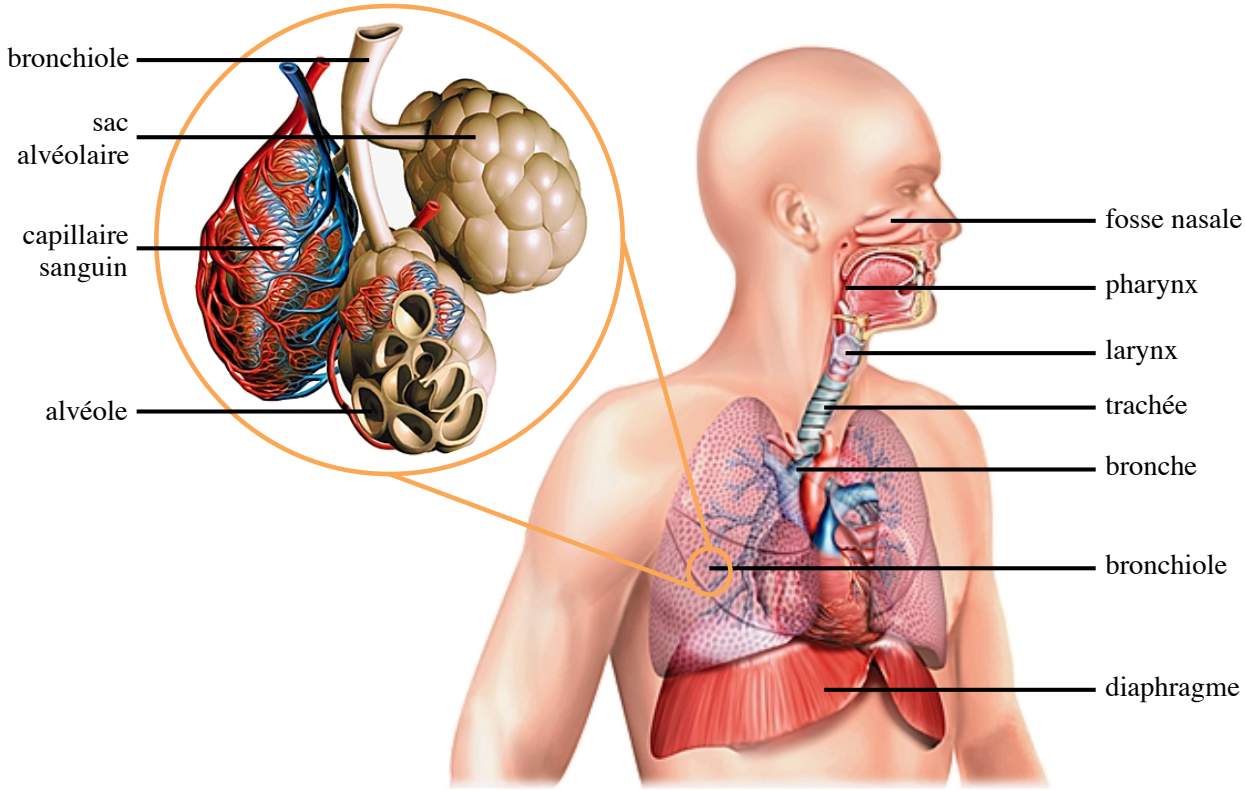


Figure 13 : Schéma des voies respiratoires

Plus les particules inhalées ont un diamètre faible plus elles vont pouvoir atteindre les cavités profondes.

La principale voie d'infection d'*A. fumigatus* est l'inhalation des spores qui représentent le morphotype infectieux du champignon. Cependant, le système immunitaire inné des individus sains est capable d'éliminer le champignon efficacement. L'épithélium des voies respiratoires supérieures via le mécanisme d'épuration muco-ciliaire constitue la première barrière de défense.[75] En effet, les conidies vont être piégées par le mucus puis transportées par le battement des cellules ciliées vers la jonction oropharyngée où elles sont soient avalées soient expectorées. Cette barrière physique est renforcée par les mécanismes de toux et d'éternuement et la majorité des spores inhalées sont ainsi éliminées. Les spores parvenant aux alvéoles pulmonaires sont confrontées aux macrophages alvéolaires qui représentent la première ligne de défense du système immunitaire contre les agents infectieux à ce niveau.[76]

Cette réponse est très efficace et les macrophages alvéolaires sont capables d'éliminer par phagocytose 90% des spores en 30 h.[77] La deuxième ligne de défense immunitaire est constituée par les neutrophiles polymorphonucléaires. Ces derniers forment une large population de phagocytes intravasculaires qui sont rapidement recrutés sur le site de l'infection pour renforcer les défenses. Ces neutrophiles jouent un rôle essentiel dans l'élimination des filaments d'*A. fumigatus* en libérant, dans le milieu extracellulaire, le contenu de leurs granulocytes qui va agir directement sur le champignon.[78] De plus, les cellules des voies respiratoires produisent une très large gamme de molécules antimicrobiennes qui permettent de préserver un environnement stérile dans les poumons. Ces molécules agiraient soit directement en tant qu'antibiotique endogène soit indirectement en facilitant l'élimination des agents infectieux par les phagocytes.[75] Jusqu'à il y a une vingtaine d'années, étant donnée l'efficacité de la réponse immunitaire innée, *A. fumigatus* était considéré comme un pathogène mineur. Du fait du nombre croissant de patients immunodéprimés et de la puissance des traitements immunosuppresseurs actuels, la situation a dramatiquement évolué et, ces dernières années, *A. fumigatus* est devenu le principal pathogène fongique aéroporté.[73]

Aspergilloses

A. fumigatus est responsable d'un certain nombre de maladies allergiques telles que l'asthme, la sinusite allergique ou l'alvéolite pulmonaire. Elles ont lieu lors d'une exposition prolongée et continue aux antigènes du champignon sans qu'il y ait colonisation mycélienne. Dans la majorité des cas, aucun traitement n'est nécessaire et un changement d'environnement est suffisant pour voir les symptômes disparaître. *A. fumigatus* est également responsable d'infections beaucoup plus sévères appelées aspergilloses telles que l'aspergillome, l'aspergillose broncho-pulmonaire allergique (ABPA) et l'aspergillose invasive (AI).

Aspergillome

L'aspergillome est une importante manifestation pulmonaire du champignon. Elle consiste en un développement du champignon sous forme de boule mycélienne à l'intérieur d'une cavité pulmonaire préexistante résultant d'une maladie antérieure telle que la tuberculose (Figure 14).[79] Historiquement, au début des années 1950, l'aspergillome

représentait la forme d'aspergillose la plus commune et aujourd'hui, elle touche encore entre 11% et 17% des patients atteints d'un syndrome cavitaire pulmonaire.[72] L'aspergillome est décrit comme un conglomérat d'hyphes condensées présentant des conidiophores à sa surface. La plupart des malades sont asymptomatiques mais des épisodes graves voire fatales d'hémoptysie (crachats de sang) peuvent avoir lieu lorsque les hyphes envahissent les artères bronchiques.[79]

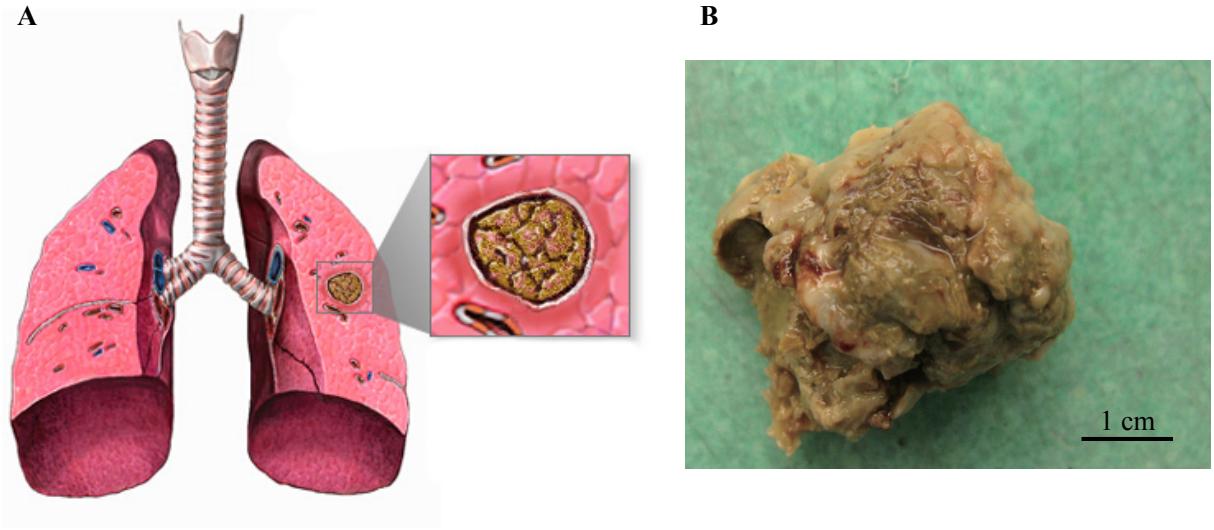


Figure 14 : Aspergillome

(**A**) Représentation de poumons avec un aspergillome dans une cavité. (**B**) Aspergillome, spécimen intact après extraction chirurgicale.[72]

Aspergillose broncho-pulmonaire allergique

L'ABPA est une hypersensibilité pulmonaire allergique complexe à *A. fumigatus* et il existe une corrélation entre son développement et la concentration des spores dans l'air.[79] Elle touche en particulier les patients atteints d'asthme atopique (entre 1 et 3,5%), jusqu'à 15% pour les patients asthmatiques sensibles à *A. fumigatus* et entre 7 à 35% des patients atteints de mucoviscidose.[73] L'ABPA reste mal diagnostiquée et, du fait des symptômes similaires, dans un tiers des cas elle est confondue avec la tuberculose.[80] Ses effets vont du simple asthme à une destruction des tissus pulmonaires. Dans le cas de patients non traités, elle peut évoluer en fibrose pulmonaire et en défaillance respiratoire.[73]

Aspergillose invasive

L'aspergillose invasive (AI) est la forme la plus grave d'aspergillose affectant surtout les patients sévèrement immunocompromis.[70] Elle est caractérisée par une invasion du système sanguin après germination des conidies dans les alvéoles pulmonaires (Figure 15).

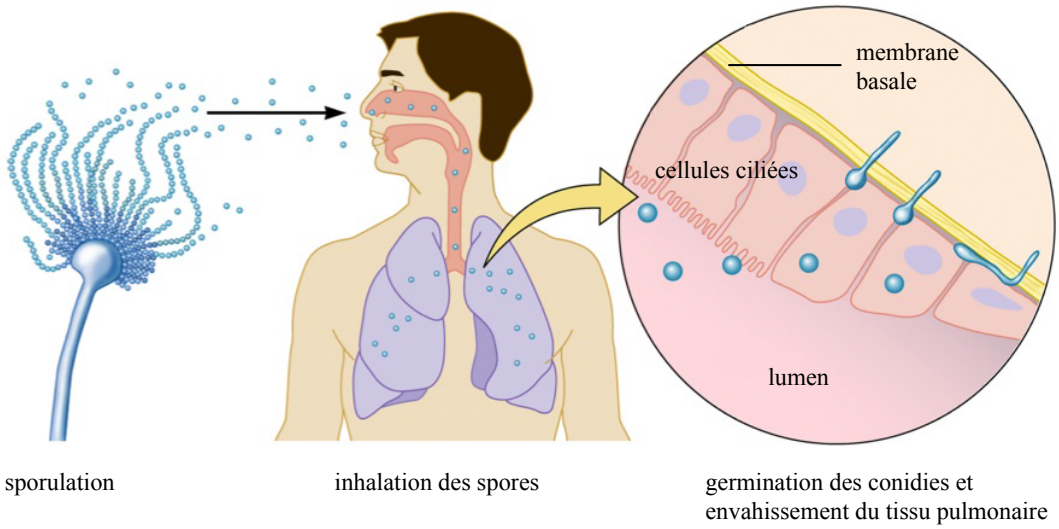


Figure 15 : Aspergillose invasive

Inhalation, pénétration et germination des spores d'*A. fumigatus* menant à une AI.[70]

Elle touche en particulier les patients atteints de leucémie ou de lymphome, les patients ayant subi une greffe de moelle osseuse ou d'organe solide, les patients atteints de maladies pulmonaires et de plus en plus de patients atteints du virus d'immunodéficience humaine (VIH).[81] Le taux de mortalité est de plus de 50% allant jusqu'à 90% dans les populations les plus à risque et il dépend de différents critères tels que le statut immunitaire de l'hôte, le site d'infection et le traitement appliqué (Tableau 2).[82] Par ailleurs, il est fortement probable que l'incidence de l'AI soit sous-estimée du fait de la faible sensibilité des méthodes cliniques et radiologiques et des tests diagnostiques.[83]

Pathologie	Incidence	Taux de mortalité
Leucémie et lymphome	5 à 25 %	50 %
Greffe de moelle osseuse	5 à 10 %	87 %
VIH	1 à 12 %	86 %

Tableau 2 : Exemples de l'incidence et du taux de mortalité de l'aspergillose invasise dans certaines pathologies

V. Les fibres amyloïdes

Historique

Le terme « amyloïde » a été introduit pour la première fois en 1854 par le médecin allemand Rudolph Virchow (Figure 16) et s'est rapidement popularisé. Auparavant, il n'existait pas de dénomination commune et unique à ces structures particulières et il est donc difficile de dater la première observation de fibres amyloïdes.[84] Au cours du 17ème siècle, les descriptions d'autopsies menées par Nicolaus Fontanus en 1639 et par Thomas Bartholin en 1657 et les travaux de Théophile Bonet (1620-1689) ou Malpighi (1628-1694) pourraient correspondre à l'observation des premières fibres amyloïdes.[85] En utilisant l'iode pour colorer un corps cérébral amylacé, Virchow met en évidence que après addition d'acide sulfurique, ces tissus anormaux se teintent en bleu pâle puis en violet. De ces expériences, il en conclut qu'ils sont constitués de cellulose ou d'amidon, la différence entre les deux n'étant pas bien établie à l'époque, et propose le nom amyloïde.[86]



Figure 16 : Rudolf Virchow

L'hypothèse de la nature cellulosique des amas amyloïdes durera peu de temps. En effet, dès 1859, Freidrich et Kekulé démontrent l'absence de cellulose dans ces amas. Pour cela, ils réalisent une analyse chimique du matériel extrait de différentes façons et parviennent à la conclusion que les amyloïdes sont de nature protéique.[87] Par la suite, en 1908, Hanssen démontre également cette nature protéique en mettant en évidence que les plaques amyloïdes peuvent être digérées par une protéase, la pepsine.[88] Jusqu'en 1938 et les travaux de Gellerstedt, la composition des amyloïdes était considérée comme unique et commune à tous les dépôts. En étudiant des plaques amyloïdes dans les îlots de Langerhans et en les comparant à des dépôts amyloïdes vasculaires, lorsqu'ils sont conjointement observés, celui-ci met en évidence une différence des propriétés de coloration.[89] Il en conclut alors que les deux types de dépôts sont différents sans pour autant explicitement conclure qu'il s'agit de protéines différentes.[90] Il faudra attendre les premiers séquençages pour que les amyloïdes soient considérées comme une classe de protéines ayant une certaine propension à changer de conformation pour former des fibres amyloïdes.[84] Ainsi, en 1971, Glenner *et al.* identifient pour la première fois une protéine associée à une amyloïdose. Il s'agit de la chaîne légère de l'immunoglobuline dans le cas d'une amyloïdose systémique associée à un myélome.[91]

De la fin du 19ème au début du 20ème siècle, les études sur les protéines amyloïdes évoluent depuis les observations macroscopiques de Virchow et ses contemporains vers une classification systématique des symptômes cliniques associés aux plaques amyloïdes.84 La coloration à l'iode, introduite par Virchow, est la première méthode d'identification des amyloïdes. Elle est rapidement remplacée par diverses colorations métachromatiques par exemple avec le violet de gentiane qui fait apparaître les dépôts rouge-violet sur fond bleuâtre (Figure 17 A)[92]. En 1922, Bennhold introduit la coloration au rouge Congo (Figure 17 C), substance bien connue dans l'industrie textile et qui présente une forte affinité pour les dépôts amyloïdes.[90] Peu de temps après, en 1927, Divry et Florkin mettent en évidence qu'à la lumière polarisée, les amas amyloïdes colorés au rouge Congo présentent une biréfringence vert-jaune.[93] Une méthode de coloration au rouge Congo, standardisée et optimisée, est proposée par Puchtler *et al.* en 1962[94] et elle reste encore aujourd'hui l'une des méthodes d'identification les plus spécifiques connues pour le diagnostic des amyloïdoses[92]. Plus tard, la thioflavine T (et S) sera introduite pour étudier les fibres amyloïdes (Figure 17 B). En effet, lorsqu'elle se lie à ces dernières, son signal de fluorescence augmente. Cependant, la réponse n'est pas identique pour toutes les fibres et le mode d'interaction est encore mal connu.

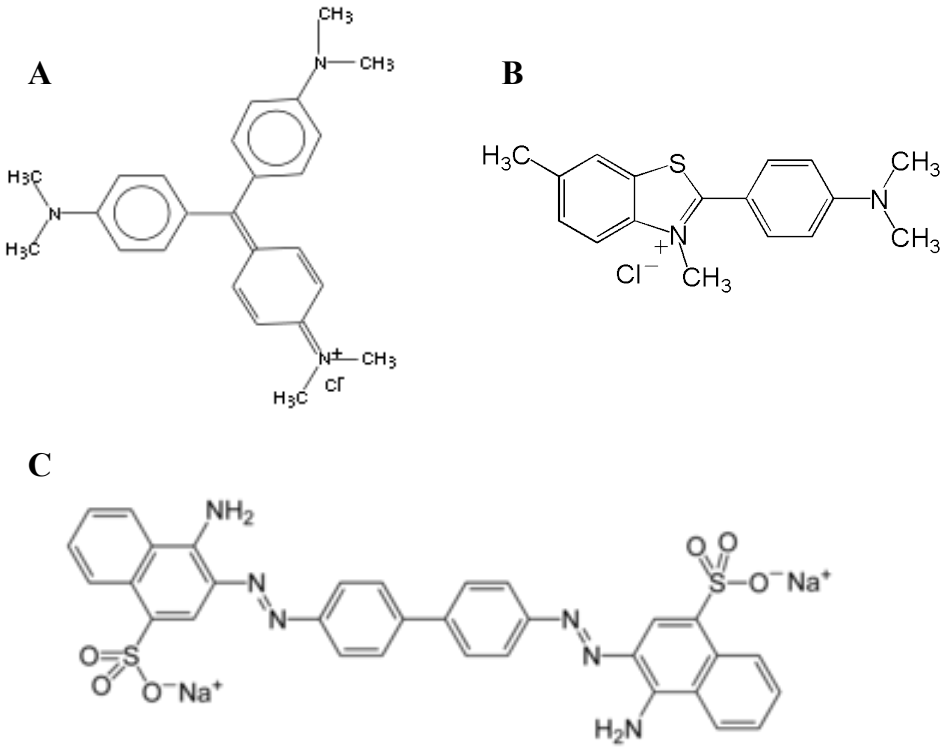


Figure 17 : Structure chimique de colorants métachromatiques utilisés pour identifier les amyloïdes

(**A**) Structure du violet de gentiane (nom commun donné au mélange de méthyl violets 2B, 6B et 10B selon que la molécule contient 4, 5 ou 6 groupements méthyles). Ici le méthyl violet 10B. (**B**) Structure de la thioflavine T. (**C**) Structure du rouge Congo.

La compréhension des plaques amyloïdes et de leur structure a progressé parallèlement aux technologies disponibles pour leur étude. La biréfringence observée par coloration au rouge Congo des dépôts amyloïdes suggère l'existence d'une structure ordonnée à l'échelle microscopique, contrairement à l'hypothèse d'un amas amorphe, prédominante jusqu'alors. Dans l'idée de démontrer l'existence d'une structure ordonnée, Cohen et Calkins, en ayant recours à la microscopie électronique, révèlent la structure fibrillaire des plaques amyloïdes dans divers tissus pathologiques animaux et humains (Figure 18).[95] Cette découverte sera confirmée par de nombreuses études[96,97] et mènera au concept d'une organisation structurale spécifique des plaques amyloïdes indépendante de leurs origines.[90] Ces travaux établissent que les plaques amyloïdes possèdent une structure fibrillaire microscopique sous forme de faisceaux de fibres linéaires, non branchées et rigides présentant une épaisseur entre 60 et 130 Å et une longueur entre 100 nm et 1,6 µm.

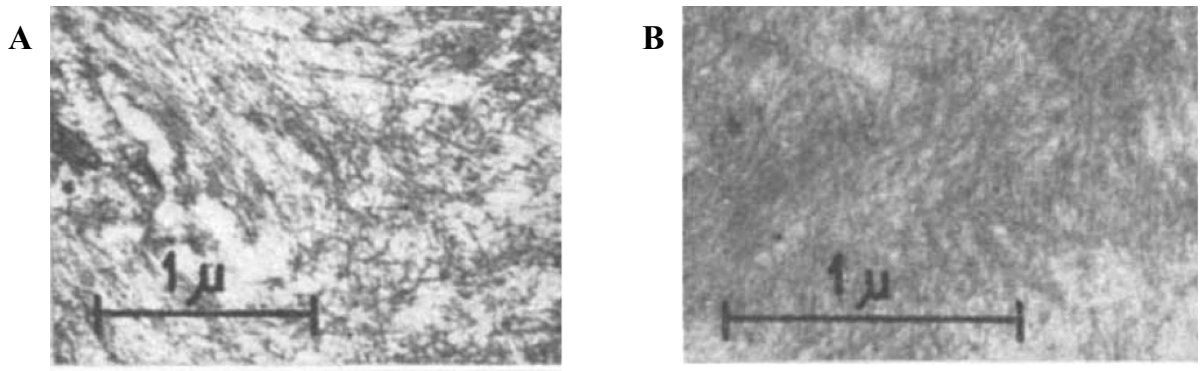


Figure 18 : Premières évidences de la nature fibrillaire des dépôts amyloïdes

Clichés de microscopie électronique mettant en évidence la nature fibrillaire des amyloïdes.[95] (**A**) Coupe d'un glomérule rénal de lapin atteint d'une amyloïdose induite par des injections de caséine révélant un arrangement aléatoire de fibres amyloïdes (x 17 500). (**B**) Coupe de tissu sous-cutané humain obtenu par biopsie d'un patient atteint d'amyloïdose systémique révélant des fibres amyloïdes organisées en faisceau (x 23 500).

En 1968, Eanes et Glenner ont recours à la diffraction des rayons X pour étudier les fibres amyloïdes extraites de divers tissus. Sur les clichés de diffraction, les auteurs observent deux types de réflexions qui consistent en deux arcs diamétralement opposés. Les premiers sont situés en position méridionale à 4,75 Å et les seconds en position équatoriale à 10-11 Å. Le motif observé sur les clichés est caractéristique d'une structure organisée en feuillet β croisé.[98] Des résultats identiques seront obtenus dans de nombreuses études[99,100] et l'ensemble de ces travaux révèlent que le feuillet β croisé s'oriente perpendiculairement à l'axe long de la fibre. Les réflexions à 4,7 Å correspondent à la distance inter-brins tandis que celles à 10-11 Å correspondent à la distance inter-feuillets.[101] Cette structure β croisée semble être à l'origine de la résistance inhabituelle des fibres amyloïdes à la dégradation et par conséquent de leur dépôt progressif.[90] En comparant les clichés de diffraction de fibres amyloïdes obtenues *in vitro* et de celles extraites de tissus, Glenner et ses collaborateurs mettent en évidence une forte similarité.[101] Par ailleurs, il apparaît dans certaines études que la formation de fibres amyloïdes est le résultat de la combinaison de plusieurs facteurs tels que la séquence en acides aminés et l'environnement de la protéine concernée.[102] Il est à noter que les plaques amyloïdes ne sont pas formées de la seule protéine sous forme de fibre mais contiennent également des protéines additionnelles, des glycosaminoglycanes ou des protéoglycanes.[103]

Les fibres amyloïdes liées à des maladies

De nombreuses pathologies humaines sont liées à un mauvais repliement des protéines. Le plus grand nombre d'entre elles sont liées à la conversion de peptides ou de protéines spécifiques sous leurs formes solubles fonctionnelles vers des agrégats fibrillaires bien ordonnés sous forme de fibres amyloïdes. Ces structures sont également appelées plaques amyloïdes quand elles s'accumulent au niveau extracellulaire.[104] Les pathologies associées à la formation d'agrégats amyloïdes sont dénommées amyloïdoses et aujourd'hui 27 protéines sont répertoriées comme étant impliquées dans celles-ci chez l'homme (Tableau 3).[105] Ces maladies peuvent être classées en trois groupes : les amyloïdoses neurodégénératives pour lesquelles l'agrégation se fait au niveau du système nerveux central, les amyloïdoses non-neuropathiques systémiques pour lesquelles l'agrégation a lieu dans différents tissus et les amyloïdoses non-neuropathiques localisées pour lesquelles l'agrégation a lieu dans un seul type de tissus autre que le cerveau (Tableau 4).[104] Les principaux organes et tissus concernés sont les reins, le cœur, le tube digestif, le foie, la peau, les articulations, les yeux et les nerfs périphériques. Ainsi, les amyloïdoses regroupent un très grand nombre de maladies caractérisées par le dépôt de protéines sous forme de fibres amyloïdes dans divers organes et tissus.[103] Les amyloïdoses systémiques sont généralement létales et représentent aujourd'hui une cause de décès sur mille dans les pays développés.[106] Le diagnostic des amyloïdoses est essentiellement histologique et leur classification relie une série de signes cliniques avec la nature biochimique de la protéine amyloïde impliquée.

Les amyloïdoses sont diverses et peuvent être classées en fonction de leur origine. Les amyloïdoses primaires ou primitives dont l'origine est inconnue ne sont associées à aucune maladie préexistante, au contraire des amyloïdoses secondaires ou acquises. Ces dernières sont une complication d'une maladie préexistante qui soit augmente considérablement les quantités d'une protéine potentiellement amyloïdogène normale soit produit une protéine amyloïdogène anormale.[106] Ces deux types d'amyloïdoses sont dites sporadiques et représentent 85% des amyloïdoses.[104] Les amyloïdoses héréditaires résultent de la mutation d'un gène codant pour une protéine la rendant amyloïdogène. Elles constituent 10% des amyloïdoses. Enfin, 5 % d'entre elles peuvent être transmises comme les encéphalopathies spongiformes.[106] Il est à noter que certaines de ces maladies telles qu'Alzheimer et Parkinson sont sporadiques mais des prédispositions génétiques bien documentées existent.

Protéine Amyloïde	Précurseur	Systémique (S) ou Localisée (L)
AL	Immunoglobuline (chaîne légère)	S, L
AH	Immunoglobuline (chaîne lourde)	S, L
Aβ_2M	Microglobuline-β_2	S
ATTR	Transthyrétine	S
AA	(Apo)sérum AA	S
AApoAI	Apolipoprotéine AI	S, L
AApoAII	Apolipoprotéine AII	S
AApoAIV	Apolipoprotéine AIV	S
AGel	Gelsoline	S
ALys	Lysozyme	S
AFib	Fibrinogène (chaîne α)	S
ACys	Cystatine C	S
Abri	ABriPP	S
ALect2	Leukocyte CF2	S
ADan	ADanPP	S
Aβ	AβPP (protéine précurseur Aβ)	L
APrP	Protéine prion	L
ACal	(Pro)calcitonine	L
AIAPP	IAPP (islet amyloid polypeptide)	L
AANF	Facteur atrial natriurétique (ANF)	L
APro	Prolactine	L
AIns	Insuline	L
Amed	Lactadhérine	L
AKer	Kérato-épithéline	L
ALac	Lactoferrine	L
AOaap	ODAM (Odontogenic ameloblast-associated protein)	L
ASemI	Semenogéline I	L

Tableau 3 : Protéines amyloïdes et leurs précurseurs chez l'homme

Exemples de protéines amyloïdes impliquées dans des pathologies chez l'homme et leurs précurseurs.[105]

Maladie	Protéine ou peptide impliqué	Nombre de résidus	Structure native de la protéine ou du peptide
Amyloïdoses neurodégénéraives			
Acquises			
Alzheimer	Peptide amyloïde β (Aβ)	40 ou 42	Intrinsèquement désordonné
Encéphalopathies spongiformes (kuru, Creutzfeldt-Jakob…)	Prion	253	Intrinsèquement désordonné (1-120) et hélice α (121-130)
Parkinson	α-synucléine	140	Intrinsèquement désordonné
Démence fronto-temporale	Tau	352-441	Intrinsèquement désordonné
Huntington	Huntingtine avec queue polyQ	3144	Majoritairement désordonné
Héréditaires			
Démence britannique familiale	ABri	23	Intrinsèquement désordonné
Amyloïdoses non-neuropathiques systémiques			
Amyloïdose AL	Immunoglobuline (chaîne légère)	90	Feuillet β
Amyloïdose AL	Fragments de SAP	76-104	Hélice α
Amyloïdose ApoAI	Fragment Nter de l'apolipoprotéine AI	80-93	Intrinsèquement désordonné
Amyloïdoses non-neuropathiques localisées			
Diabète de type II	Amyline (IAPP)	37	Intrinsèquement désordonné
Cataracte	γ-crystalline	variable	Feuillet β

Tableau 4 : Amyloïdoses

Exemples de pathologies humaines associées à la formation de dépôts amyloïdes.[104]

Les amyloïdoses peuvent être associées à une perte de fonction d'une protéine dont le pool diminue à cause de l'agrégation ou à une toxicité des agrégats précurseurs des fibres ou des fibres elles même.[104] Il a été clairement établi que les précurseurs des fibres peuvent être toxiques et peuvent modifier la perméabilité des membranes. De même, il a été montré que les fibres sont capables de perforer les membranes par pression mécanique. Cependant, pour un certain nombre d'amyloïdoses, dont Alzheimer ou le diabète de type II, il n'est pas clairement établi si la formation des plaques amyloïdes est la cause de la maladie ou un résultat. Ainsi, chez les patients atteints d'Alzheimer, ou chez les modèles murins, une faible corrélation existe entre la déficience cognitive et l'abondance des dépôts amyloïdes.[90,106] De la même façon, la présence d'amyloïdes pourrait n'être qu'un épiphénomène parmi les encéphalopathies spongiformes transmissibles bien qu'elles soient caractéristiques de certains types en particulier pour les maladies de Creutzfeldt-Jakob et le kuru. L'histoire de leur découverte et de l'identification des agents pathogènes responsables est particulièrement intéressante. En 1957, Gajdusek étudie la maladie kuru identifiée chez une petite population isolée de Nouvelle Guinée. Il met en évidence qu'elle est transmise lors de cérémonie funéraire durant lesquelles un cannibalisme rituel est pratiqué. Initialement, il est suggéré que la maladie soit due à un virus.[107] Il faut attendre 1982 et les travaux de Prusiner sur le prion pour que la nature protéique de l'agent pathogène soit révélée.[108]

L'identification de protéines non associées à des maladies pouvant former des fibres amyloïdes *in vitro*[109,110] a mené au concept que la capacité de former des fibres amyloïdes, dans des conditions appropriées, est une propriété génériques des protéines. Ces études ont suggéré que la prévention de la formation de fibres amyloïdes est l'une des forces qui façonnent l'évolution des protéines.[111,112]

Les fibres amyloïdes fonctionnelles

Un nombre toujours croissant de protéines ont été identifiées comme étant capables de former des agrégats fibrillaires fonctionnels. Leurs caractéristiques morphologiques, structurales et spectroscopiques ont permis de les classer dans la famille des amyloïdes sans qu'aucune pathologie ne leur soit associée.[104] La découverte de ces amyloïdes fonctionnelles et de la capacité de nombreuses protéines à former des fibres *in vitro* fut une surprise. En effet, pendant plus d'un siècle les amyloïdes avaient été associées uniquement à des pathologies humaines puis animales avant qu'un rôle physiologique ne soit découvert pour certaines d'entre elles.[113] Les amyloïdes fonctionnelles ont été initialement identifiées chez les bactéries.[114] Plus tard, elles ont été retrouvées chez des organismes eucaryotes, tout d'abord dans des micro-organismes tels que les champignons[6], puis chez les insectes[115] et même chez l'homme[116] (Tableau 5). De plus, de nombreuses protéines amyloïdes fonctionnelles potentielles ont été reportées[117,118] mais soit la fonction est mal définie soit les preuves expérimentales de leur nature amyloïde sont insuffisantes. Contrairement aux amyloïdes associées à des pathologies, les amyloïdes fonctionnelles sont le produit de processus cellulaires coordonnés et régulés pour éviter que des dommages cellulaires, voire la mort cellulaire, ne résultent de la fibrillation.[119]

Le premier exemple des fibres amyloïdes fonctionnelles a été identifié chez les bactéries, telles *E. coli* et les espèces *Salmonella*, qui utilisent des amyloïdes extracellulaires appelées curlis. Les curlis sont le principal composant protéique de la matrice extracellulaire produite par les bactéries pendant la formation de biofilms. Les curlis induisent une importante réponse inflammatoire de l'hôte, elles participent à l'adhésion sur les cellules hôtes et elles augmentent la capacité des bactéries à résister à l'environnement de l'hôte.[120] Pour assembler les curlis, *E. coli* possède une machinerie spécifique de nucléation-précipitation hautement régulée impliquant six protéines codées par deux opérons, *csgAB* et *csgDEFG*. Les fibres sont constituées par la protéine CsgA et leur nucléation est initiée par CsgB. La protéine CsgG a été localisée au niveau du feuillet interne de la membrane externe où elle servirait de plateforme d'assemblage aux curlis. La protéine CsgD quant à elle est supposée être un régulateur transcriptionnel et CsgE et CsgF sont des facteurs putatifs d'assemblage des curlis. En effet, bien que leurs rôles exacts n'aient pas été établis, il a été montré que CsgE est important dans la stabilisation aussi bien de CsgA que de CsgB et CsgF est nécessaire pour une fibrillation efficace.[114]

Protéine	Organisme	Fonction des fibres amyloïdes formées
	Bactéries	
Curli	Ex : *Escherichia coli*	Colonisation de surface inerte et liaison aux protéines de l'hôte
Chapline	Ex : *Streptomyces coelicolor*	Réduction de la tension superficielle et développement des filaments aériens
Harpines	Ex : *Xanthomonas axonopodis*	Déclenchement de la réponse hypersensible des plantes colonisées
Microcine E492	*Klebsiella pneumoniae*	Inhibition de la croissance des bactéries environnantes
	Levures	
Sup35	*Saccarhomyces cerevisiae*	Facilitation du dépassement du codon stop donnant lieu à de nouveaux phénotypes
	Champignons filamenteux	
HET-s	*Podospora anserine*	
Hydrophobine	Ex : *A. fumigatus*	Réduction de la tension superficielle Protection des spores Participation aux mécanismes d'adhésion
	Animaux	
ApCPEB	*Aplaysia californica*	Stabilisation des synapses neuronales
Protéines du chorion	Insecte et poisson	Protection de l'œuf et structure de son enveloppe
Fibroïne	Ex : *Bombyx mori*	Constitution du cocon
Spidroïne	Araignée Ex : *Nephila edulis*	Formation des fils de soie de la toile
Pmel17	*Homo sapiens*	Formation dans les mélanosomes de striations fibrillaires servant d'échafaudage aux granulocytes

Tableau 5 : Exemples de protéines amyloïdes fonctionnelles chez différents organismes

Les bactéries filamenteuses ont un cycle de développement très proche de celui des champignons filamenteux.[4] Chez ces bactéries, une famille de protéines capables de former des fibres amyloïdes a été identifiée, par exemple SapB chez *Streptomyces coelicolor*[121] et la steptofactine chez *S. tendae*[122]. Ces protéines, appelées chaplines, présentent des caractéristiques communes aux hydrophobines. Elles possèdent en particulier des propriétés surfactantes ce qui leur permet de réduire la tension superficielle et elles s'auto-assemblent sous forme de couches amphipathiques à l'interface air-eau permettant l'attachement aux surfaces hydrophobes[123] et le développement des filaments aériens[124]. Il est intéressant de noter que les chaplines chez les bactéries filamenteuses et les hydrophobines chez les champignons filamenteux présentent les mêmes caractéristiques et remplissent le même rôle dans le développement aérien des filaments. Ces deux familles de protéines mettent en évidence une évolution convergente chez les micro-organismes filamenteux qui produisent des protéines amphiphiles capables de s'auto-assembler aux interfaces air-eau pour former des couches amphipathiques nécessaires à la formation des structures aériennes.

Chez certaines bactéries, des protéines amyloïdes sont associées à des mécanismes cytotoxiques inhibant la croissance des cellules voisines.[120] Les microcines font partie de la vaste famille des bactériocines qui regroupe des protéines antimicrobiennes produites par les bactéries.[125] Ces protéines sont sécrétées dans le milieu extracellulaire et inhibent la croissance des bactéries avoisinantes. Elles ciblent préférentiellement les bactéries phylogénétiquement proches de celle par laquelle elles sont produites.[126] Aujourd'hui, 15 microcines ont été identifiées et parmi elles, la microcine E492 (ou Mcc) produite par *Klebsiella pneumoniae*. Il a été montré que cette protéine agit en formant des canaux ioniques dans la membrane cellulaire des bactéries cibles menant à sa perméabilisation. Des études montrent que Mcc forme des fibres amyloïdes *in vivo* et que la polymérisation de la protéine coïncide avec une perte de l'activité antibactérienne.[127] Ainsi, il est suggéré que les amyloïdes de Mcc constitueraient un réservoir d'oligomères toxiques qui seraient relâchés lors des modifications de l'environnement.[125] Les harpines utilisent quant à elles le caractère cytotoxique des fibres amyloïdes. Ces protéines sont sécrétées par les pathogènes des plantes et induisent la réponse hypersensible.[120] Cette dernière est un mécanisme de défense des plantes qui vise à ralentir la croissance extracellulaire des pathogènes en provoquant la mort des cellules végétales sur le site de l'infection.[128] Les harpines sont essentielles à la virulence et leur interaction avec les membranes des cellules végétales induit divers mécanismes de perméabilisation de ces dernières.[129]

Chez la levure *S. cerevisiae*, différents phénotypes sont associés à la présence de protéines amyloïdes.[130] Par exemple, la protéine Sup35 est un facteur de terminaison de la traduction. Cette protéine permet d'éviter que la synthèse protéique dépasse le codon stop. Lorsque Sup35 forme des fibres amyloïdes, cette régulation est perdue ce qui conduit à un allongement en C-terminal de certaines protéines.[131] Ainsi, Sup35 joue un rôle important dans la plasticité phénotypique. De plus, il a été montré que sous certaines conditions les populations de levure possédant Sup35 sous forme de fibres amyloïdes présentent des avantages sélectifs de croissance.[113]

Chez les champignons filamenteux, les hyphes fongiques de colonies voisines ont la capacité de fusionner pour former des cellules hétérocaryotes où deux noyaux différents coexistent dans un même cytoplasme. Cette fusion est liée à des protéines amyloïdogènes. Dans le génome fongique de *Podospora anserine*, le locus *het* contrôle la viabilité du mycélium de fusion. En effet, les hétérocaryotes dont le locus *het* diffère sont éliminés.[132] Deux allèles du gène *het* existent, *het-S* codant pour la protéine HET-S et *het-s* codant pour la protéine HET-s. La protéine HET-s a la capacité de former des fibres amyloïdes contrairement à HET-S.[133] L'interaction des fibres amyloïdes HET-s avec les protéines solubles HET-S induit une réaction d'incompatibilité et inhibe ainsi la fusion des hyphes de champignons génétiquement incompatibles.[120]

Les protéines CPEB sont des protéines se liant à l'ARN, très conservées et localisées au niveau des synapses neuronales. La protéine CPEB du mollusque *Aplaysia californica* (apCPEB) stimule la traduction des ARNm qui lui sont associés. Lorsque cette protéine forme des fibres amyloïdes, son activité de stimulation est plus importante que lorsqu'elle est sous sa forme soluble.[104] Ainsi, il est suggéré que apCPEB est impliquée dans le maintien à long terme des modifications synaptiques impliquées dans le stockage de la mémoire.[118]

Pour les animaux ovipares, il est nécessaire de protéger les œufs de leur environnement. Chez les insectes et les poissons, l'œuf ne possède pas de coquille et le chorion, enveloppe la plus externe des œufs, est alors la première barrière contre les multiples menaces extérieures. Cette enveloppe essentiellement constituée de protéines, protège l'ovocyte et le développement embryonnaire des variations de température, des pressions mécaniques, des protéases, des bactéries, des virus, etc. Elle assure également des fonctions physiologiques essentielles en permettant la fécondation de l'œuf, les échanges gazeux, etc.[134] Il existe plus de 200 protéines du chorion regroupées en deux classes A et B. Il a été montré que les domaines centraux des protéines des deux classes forment des fibres amyloïdes.[115,135] Les

travaux d'Iconomidou *et al.* montrent ainsi que les protéines du chorion représentent un exemple de protéines amyloïdes protectives.[134]

Les araignées ainsi que certains insectes comme le ver à soie (*Bombyx mori*) ont la capacité de synthétiser de la soie qui est sécrétée par des glandes dédiées.[136] Les insectes dans leur ensemble produisent une grande variété de soies mais un même individu ne produit qu'un seul type de soie. Les araignées ont la particularité de posséder plusieurs glandes spécialisées leur permettant de produire des soies très différentes les unes des autres, souvent simultanément.[137] Ces organismes ont développé des systèmes sophistiqués leur permettant de produire et de stocker des protéines à des concentrations très élevées en solution mais également de contrôler la conversion de ces protéines solubles pour former des fibres de soie.[138] De nombreuses études ont été menées afin de caractériser la structure et les mécanismes de formation des fibres de soie de *Bombyx mori* du fait de son utilisation dans l'industrie textile.[139,140] La soie des araignées quant à elle est moins bien caractérisée.[138] Les études menées sur les différents types de soies, d'insectes ou d'araignées, montrent que la soie est structurée sous forme de fibres amyloïdes. Des études *in vitro* semblent indiquer que la formations des fibres amyloïdes constituant la soie passe par un intermédiaire agrégé amorphe.[141] De plus, il a été montré que la fibrillation pouvait avoir lieu à faible concentration, montrant ainsi que l'état liquide cristallin dans lequel se trouvent les fibroïnes et les spidroïnes dans les glandes n'est pas nécessaire à la formation des fibres amyloïdes.[142]

Des protéines amyloïdes fonctionnelles ont également été retrouvées chez l'Homme. Les mélanosomes sont des organites intracellulaires des mélanocytes spécialisés dans la synthèse et le stockage de la mélanine dont le rôle principal est la protection pigmentaire contre les UV. Son assemblage est le résultat d'une voie métabolique hautement contrôlée.[143] Il a été montré que les mélanocytes des mammifères produisent une glycoprotéine appelée Pmel17. Cette protéine polymérise sous forme de fibres amyloïdes sur lesquelles la mélanine est séquestrée et concentrée pendant le processus multi-étapes de la biogénèse des mélanosomes. Kelly et ses collaborateurs ont également montré qu'une endoprotéolyse est nécessaire à l'assemblage de Pmel17 sous forme de fibres amyloïdes. Cette protéase clé est la furine, et elle clive Pmel17 pendant la maturation des pré-mélanosomes pour donner deux peptides, un fragment β associé à la membrane et un fragment cytosolique α (Mα). Seul le fragment Mα de Pmel17 est capable de former des fibres.[116]

Caractéristiques et méthodes d'étude des fibres amyloïdes

Caractérisation des fibres amyloïdes

Longtemps les seules informations structurales disponibles sur les fibres amyloïdes provenaient des méthodes d'imagerie telles que la microscopie électronique et, plus récemment la microscopie à force atomique et des clichés de diffraction des rayons X. Malgré les données structurales obtenues, il était considéré que les fibres amyloïdes ne pouvaient être caractérisées en détail à l'échelle moléculaire car elles n'étaient pas cristallines, qu'elles constituaient des objets trop grands pour la RMN en solution et à cause de la difficulté d'obtention de préparations homogènes.[104] Depuis les premières observations de la topologie β croisée des fibres amyloïdes, de nombreux autres aspects structuraux communs ont été caractérisés. Les amyloïdes sont définies comme des structures fibrillaires allongées et non ramifiées, obtenues par la polymérisation de centaines à des milliers de polypeptides monomériques. Les fibres présentent classiquement une largeur de 5-15 nm et une longueur allant d'une centaine de nanomètres à quelques micromètres.

Comme il a été dit précédemment, les propriétés spectrales de certains colorants sont modifiées lorsqu'ils se lient aux fibres amyloïdes. C'est notamment le cas du rouge Congo et de la thioflavine T. Lors de son association aux fibres amyloïdes, le rouge Congo présente, à la lumière polarisée une biréfringence vert-dorée due à l'anisotropie des fibres. En ce qui concerne la thioflavine T (ThT), le signal de fluorescence de la sonde augmente en présence de fibres amyloïdes. Il est à noter que ces colorants ne sont pas totalement spécifiques des fibres amyloïdes et il est possible d'observer des faux positifs comme des faux négatifs.

La structure β croisée constitue le cœur des fibres amyloïdes. Cette topologie correspond à un empilement de brins β, généralement de 5 à 7 résidus, perpendiculairement à l'axe de la fibre (Figure 19 A). Elle donne lieu à des clichés de diffraction des fibres caractéristiques sur lesquels les taches de réflexion méridionales à 4,7 Å correspondent à la distance inter-brins et les taches de réflexion équatoriales à 10 – 12 Å correspondent à la distance inter-feuillets (Figure 19 B).[144] L'utilisation de la cryo-microscopie électronique et de la diffraction aux rayons X a permis d'obtenir des modèles de la structure β croisée, sans pouvoir atteindre une résolution atomique.[145,146] La microscopie électronique ou la microscopie à force atomique sont particulièrement bien adaptées à l'étude de la morphologie des fibres amyloïdes. En effet, ces deux techniques permettent d'accéder facilement à la

longueur et la largeur des fibres (Figure 19 C). En 2005, des études sur des nanocristaux d'un peptide issu de la protéine Sup35[147] et sur le peptide Aβ[148] ont fourni les premiers détails atomiques de la structure β croisée des fibres. Les études réalisées par l'équipe de David Eisenberg sur le peptide Sup35 ont notamment révélé l'importance de la complémentarité des chaînes latérales pour les intéractions entre les feuillets β. Le développement de la RMN du solide a repoussé les limites du champ d'étude des fibres amyloïdes. Son utilisation conjointe avec des méthodes de modélisation a permis de déterminer ou de caractériser les structures de fibres amyloïdes formées par différentes protéines.[149–151] Les fibres amyloïdes présentent généralement des propriétés de relaxation de spins favorables et, dans certains cas après une longue recherche de conditions, donnent lieu à des échantillons relativement homogènes permettant l'obtention de données RMN de qualité. De plus, une large gamme d'expériences peut être employée pour accéder à des contraintes expérimentales sur la conformation du squelette peptidique, l'organisation supramoléculaire des feuillets β, la conformation et les contacts inter-résidus des chaînes latérales et l'arrangement général et la symétrie des sous-unités. Ainsi la RMN du solide est devenue la méthode de choix pour obtenir des informations structurales et déterminer la structure des fibres amyloïdes.[151]

La structure β croisée, formée par de courtes séquences peptidiques dites amyloïdogènes, constitue l'épine dorsale des fibres amyloïdes autour de laquelle le reste de la protéine va se placer. Les fibres sont constituées de plusieurs protofilaments contenant chacun des structures de type β croisé. Le nombre de protofilaments et l'association entre ceux-ci sont fortement dépendants des conditions de formation des fibres et donnent lieu au polymorphisme observé pour les fibres amyloïdes.

Dans le cas des hydrophobines, les fibres amyloïdes, ou bâtonnets, constitués par deux ou plusieurs protofilaments vont s'associer latéralement (perpendiculairement à la longueur de la fibre) pour former une couche aux interfaces hydrophobe/hydrophile ou air/eau.

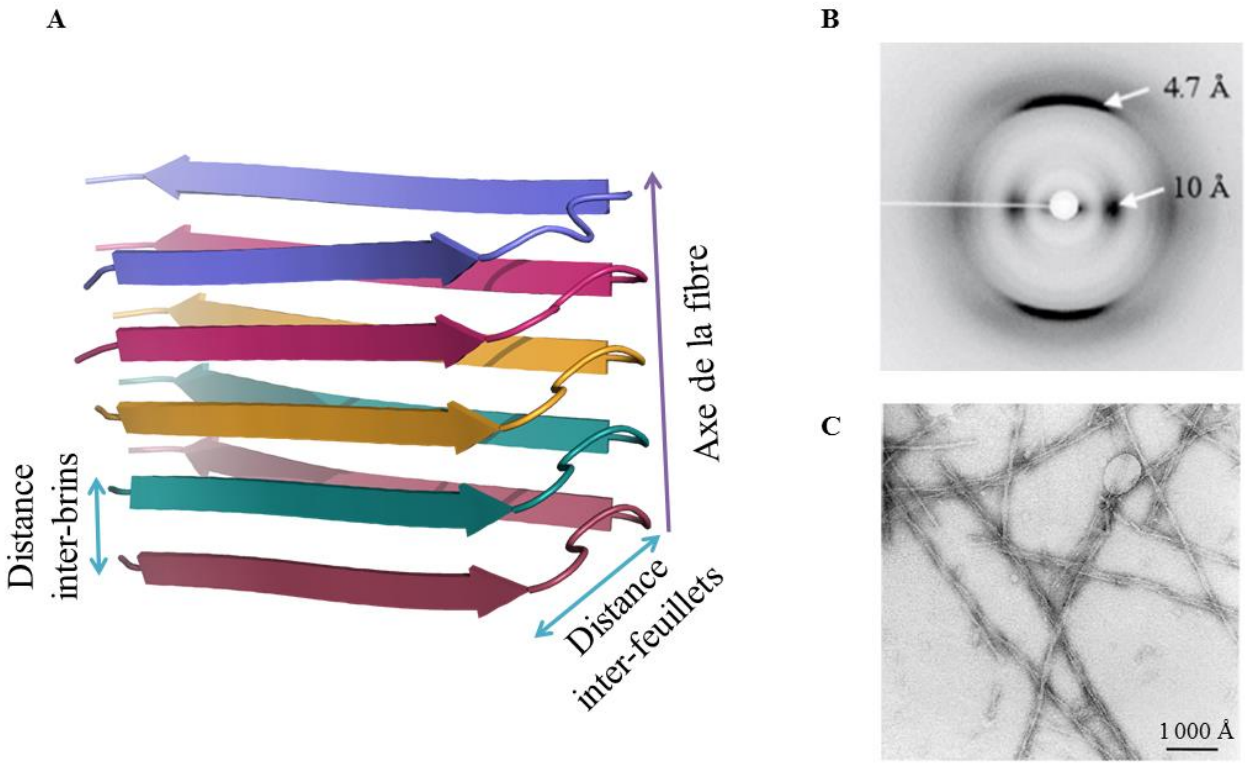


Figure 19 : Caractéristiques structurales des fibres amyloïdes

(**A**) Structure quaternaire β croisée de fibres amyloïdes formées par la protéine Aβ associée à la maladie d'Alzheimer.[148] (**B**) Cliché de diffraction de fibres de la protéine Aβ avec les taches de réflexion méridionales à 4,7 Å qui correspondent à la distance inter-brins et les taches de réflexion équatoriales qui correspondent à la distance inter-feuillets.[152] (**C**) Cliché de microscopie électronique de fibres amyloïdes formées par un domaine SH3.[109]

Formation des fibres amyloïdes

Les fibres amyloïdes sont formées par des protéines ou des peptides initialement en solution. Dans le cas des protéines globulaires natives, des changements de conformation doivent avoir lieu afin d'exposer dans une conformation adéquate les séquences amyloïdogènes qui vont s'associer pour former la structure β croisée. Il est possible de suivre ce processus par dichroïsme circulaire (DC) ou par infra-rouge à transformée de Fourrier (FTIR) puisqu'au cours de la fibrillation, le contenu en brins β augmente. L'élucidation du mécanisme complet de fibrillation requiert l'identification de tous les états conformationnels et des structures oligomériques adoptés par la chaîne polypeptidique au cours du processus.[153] L'identification et la caractérisation des oligomères qui précèdent la formation des fibres

représentent l'un des enjeux de l'étude des fibres amyloïdes du fait de leur cytotoxicité mise en évidence dans de nombreuses amyloïdoses.[104]

Il a été établi que la formation des fibres amyloïdes est associée à un phénomène de nucléation. Le suivi au cours du temps de la conversion d'une protéine de sa forme soluble vers sa forme fibrillaire peut être effectué par fluorescence en présence de ThT. Les profils de cinétique présente typiquement une phase de latence, suivie d'une phase de croissance exponentielle rapide (Figure 20).[154] La phase de latence est supposée être le temps nécessaire à la formation des associations intermoléculaires donnant lieu aux « noyaux ». Une fois ces « noyaux » formés, la croissance des fibres se fait rapidement par association de monomères ou d'oligomères à ces noyaux. L'intensité du signal de fluorescence observé dépend de la quantité de fibres, de l'environnement de la thioflavine T en interaction avec les fibres et par conséquent de la structure et de la nature des fibres formées.

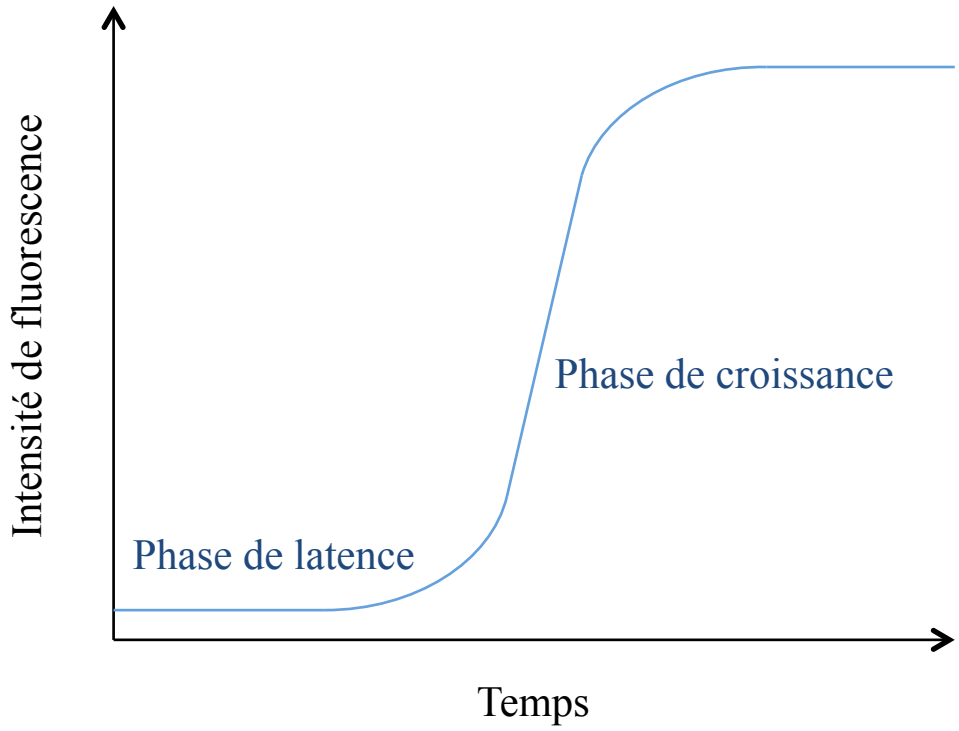


Figure 20 : Suivi au cours du temps de la formation de fibres amyloïdes par fluorescence

Chapitre 2 : Hydrophobines d'*A. fumigatus*

I. Présentation générale

Chez *A. fumigatus*, entre 5 et 7 hydrophobines, nommées de RodA à RodG,[35,155] ont été identifiées en fonction des critères de sélection (Figure 21). Les hydrophobines RodA, RodB et RodC présentent 50% de similarité entre elles et possèdent le profil typique des hydrophobines de classe I que ce soit le motif de huit cystéines ou la disposition des régions hydrophobes et hydrophiles. L'hydrophobine RodF appartient également à la classe I et RodG est considérée comme une hydrophobine intermédiaire aux deux classes.[35] Selon les études, RodD et RodE ne sont pas considérées comme des hydrophobines à part entière puisque ni l'une ni l'autre ne présente le motif caractéristique de huit cystéines. [35] En effet, dans la séquence de RodD, seules sept cystéines sont dénombrées et l'un des doublets de cystéines est absent. De plus, cette hydrophobine possède une très longue région C-terminale après la dernière cystéine contrairement aux autres hydrophobines décrites. Chez RodE on retrouve onze cystéines et deux de ces cystéines supplémentaires sont situées entre les deux doublets de cystéines. Cela est contraire aux autres hydrophobines identifiées pour lesquelles, le cas échéant, les cystéines supplémentaires sont toujours situées soit en amont soit en aval du motif caractéristique. De plus, aucun peptide signal n'a été identifié chez RodE ce qui signifierait que cette protéine n'est pas sécrétée, ce qui est l'un des critères d'identification des hydrophobines.

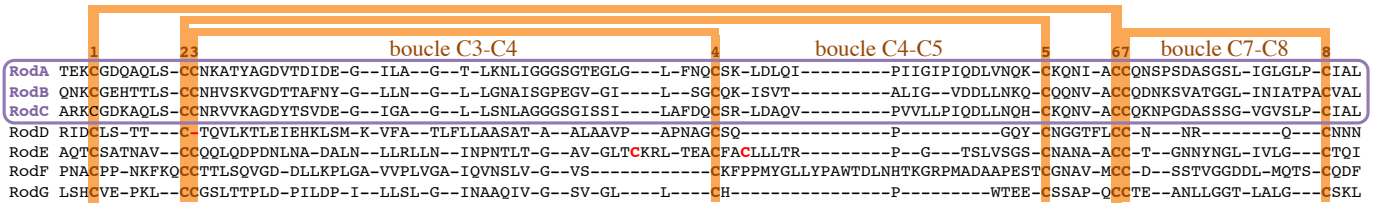


Figure 21 : Alignement des séquences des hydrophobines identifiées chez *A. fumigatus*

Alignement des séquences des sept hydrophobines identifiées chez *A. fumigatus*. Les extrémités N-terminal et C-terminal ne sont pas montrées. Les hydrophobines RodA, RodB et RodC (cadre violet) présentent ~50% d'identité de séquence. Dans la séquence de RodD, une des cystéines du doublet C2-C3 est manquante (en rouge). Dans la séquence de RodE, trois cystéines supplémentaires sont présentes, une en N-terminal (non montrée), une dans la boucle C3-C4 (en rouge) et une dans la boucle C4-C5 (en rouge). Les huit cystéines et les quatre ponts disulfures sont représentés en orange.

L'étude de mutants de délétion de chacune des sept hydrophobines d'A. *fumigatus* est réalisée par nos collaborateurs (J.P. Latgé, Unité Aspergillus, Institut Pasteur). Leurs études indiquent que même si toutes les hydrophobines ont un certain impact sur la durée de vie des spores à 37°C, les protéines RodC et RodE sont celles qui ont l'impact le plus important.[156] A l'issue de trois mois d'incubation à 37°C, alors que 80% des conidies sauvages survivent, uniquement 2 à 3% des conidies des mutants Δ*rodc* et Δ*rode* restent viables. En plus de leur effet sur la survie des spores, les protéines RodC et RodE sont importantes pour la conidiation étant donné que les mutants Δ*rodc* et Δ*rode* produisent environ trois fois moins de spores que la souche sauvage (Figure 22) (Anne Beauvais communication personnelle). Ainsi, RodC et RodE jouent des rôles importants dans la conidiation et dans la survie des spores à 37°C.

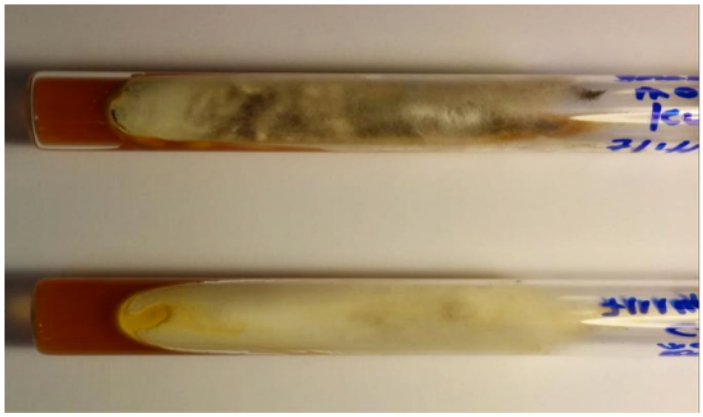


Figure 22 : Phénotype du mutant de délétion Δ*rodc*

Cultures de la souche sauvage (haut) et Δ*rodc* (bas) d'*A. fumigatus* après conidiation. La souche sauvage montre la couleur vert-noirâtre caractéristique des spores recouvertes de RodA et dont la couleur provient de la mélanine de la paroi cellulaire. Contrairement aux conidies sauvages, les conidies du mutant de délétion se retrouvent sous le mycélium aérien et sont peu nombreuses (Anne Beauvais communication personnelle).

Les hydrophobines RodA et RodB ont été isolées à partir des conidies.[157] Des études de mutagenèse visant à les caractériser d'un point de vue fonctionnel, ont montré que les mutants *Δrodb* présentent une couche de bâtonnets à la surface de leurs conidies contrairement aux mutants *Δroda*. Par contre, les spores des doubles mutants *Δroda*/*Δrodb* ne présentent pas la même morphologie que celle des mutants *Δroda*. Ainsi, il semblerait que RodB n'intervient pas dans la formation des bâtonnets à la surface des spores mais joue un rôle important dans le maintien structural de la paroi cellulaire de celles-ci. Par ailleurs, il a été montré que

l'hydrophobine RodB est très fortement exprimée au cours de la formation du biofilm et il est suggéré qu'elle participerait à l'hydrophobicité de ce dernier.[155] Aujourd'hui, le rôle biologique de RodB reste incertain.

L'hydrophobine RodA semble être seule responsable de la formation de la couche de bâtonnets qui recouvre les spores, permettant leur dispersion et leur adhésion aux structures hôtes (Figure 23). De plus, elle joue un rôle déterminant dans la réponse immunitaire. En effet, nos collaborateurs, ont montré que RodA permet une inertie des conidies vis-à-vis du système immunitaire.[158] Des études précédentes avaient montré que les conidies dormantes ne sont pas reconnues par les cellules du système immunitaire inné et ne déclenchent donc aucune réponse. Par contre, lorsque les conidies entrent en germination, à partir du stade de conidie gonflée, celles-ci sont reconnues par le système immunitaire.[159] Il est connu que les premières étapes de la germination correspondent à une hydratation des spores aboutissant à l'obtention de conidies gonflées. Cette hydratation est rapide et elle est suivie d'une modification des propriétés de surface des spores.[160]

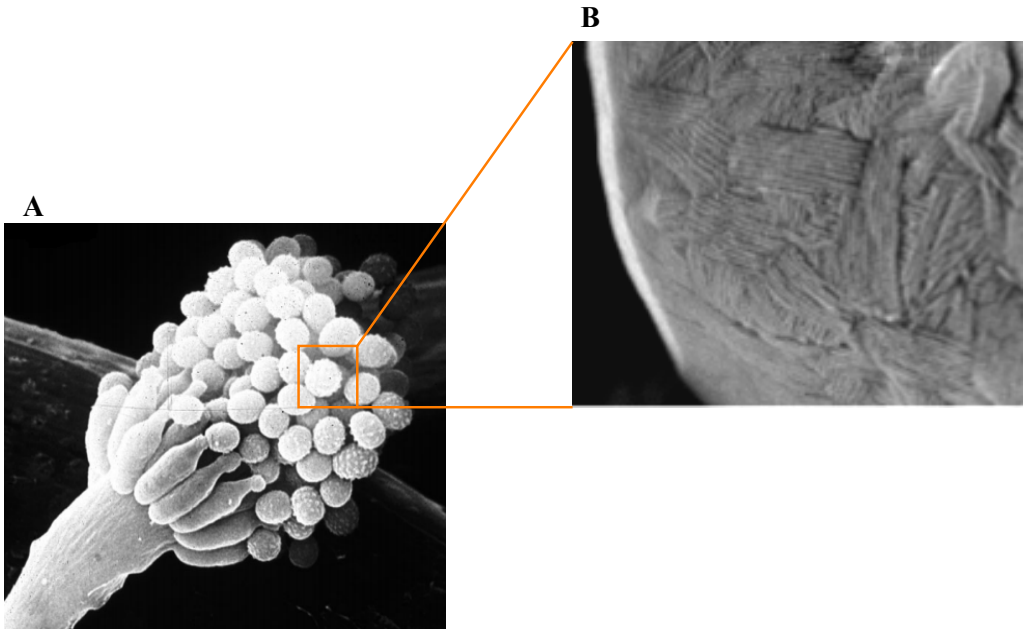


Figure 23 : Conidiophore et couche de bâtonnets à la surface des spores d'*A. fumigatus*

Images obtenues par microscopie électronique à balayage : (**A**) conidiophore d'*A. fumigatus* (**B**) couche de bâtonnets recouvrant une conidie d'*A. fumigatus*.

Afin de suivre la dynamique de la surface cellulaire, en particulier la structure et l'hydrophobicité, nos collaborateurs (Y. Dufrêne, Unité de Chimie des Interfaces, Université Catholique de Louvain) ont réalisé une étude d'AFM en temps réel sur une conidie unique d'*A. fumigatus* pendant la germination.[161] Cette étude met en évidence qu'au cours de la germination la couche de bâtonnets présente à la surface des spores est éliminée en quelques heures. Elle laisse place à une couche amorphe supposée correspondre à la couche de polysaccharides présente au niveau de la paroi cellulaire interne des conidies (Figure 24). De plus, la perte de la couche de bâtonnets s'accompagne de la perte de l'hydrophobicité des spores qui en fin de germination sont hydrophiles permettant alors leur hydratation qui aboutit à la formation de conidies gonflées.

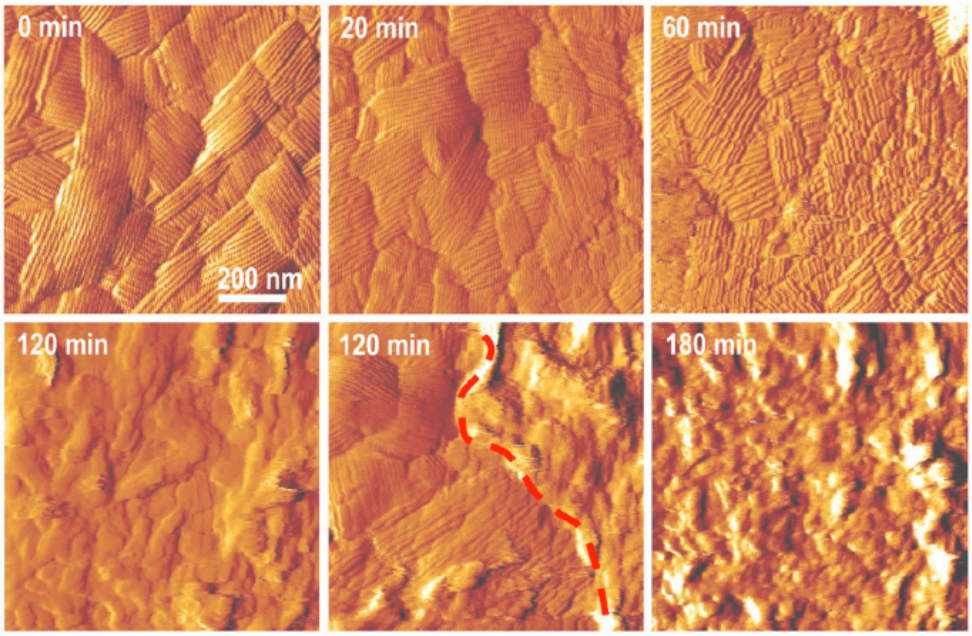


Figure 24 : Dégradation de la couche de bâtonnets au cours de la germination

Suivi de la dégradation de la couche de bâtonnets à la surface d'une spore au cours de la germination par AFM. Au bout de 3 h, une couche amorphe, supposée être composée de polysaccharides de la paroi cellulaire interne, est observée à la place de la couche de bâtonnets. Après 2 h, la couche amorphe et la couche structurée en bâtonnets coexistent.[161]

Ces résultats suggèrent que l'inertie des conidies dormantes vis-à-vis du système immunitaire est due à la couche de bâtonnets présente à la surface des spores. Or, cette couche est exclusivement constituée de l'hydrophobine RodA. Les propriétés immunologiques de RodA ont été étudiées par nos collaborateurs (J.P. Latgé, Unité Aspergillus, Institut Pasteur et J. Bayry, Unité 1138, INSERM). La maturation des cellules dendritiques humaines n'est observée ni pour les conidies dormantes, recouvertes de la couche de bâtonnets, ni pour l'hydrophobine RodA extraite des spores, même à des fortes concentrations. De même, le niveau basal des cytokines n'est pas affecté par RodA et aucune stimulation de la lymphoprolifération n'est observée. A l'inverse, le mutant de délétion *Δroda* ne présente pas de couche de bâtonnets à la surface des conidies et celles-ci sont reconnues par le système immunitaire. Une réponse immunitaire est également observée lorsque la couche de bâtonnets est éliminée des spores de la souche sauvage par traitement chimique.[158] L'hydrophobine RodA permet donc de rendre les spores inertes vis-à-vis du système immunitaire inné.

II. Description du projet

Cette thèse se situe dans un projet global portant sur l'étude de la structure et de la fonction des hydrophobines d'*A. fumigatus*. Il est mené en étroite collaboration avec des laboratoires spécialisés dans différents domaines, en particulier dans la biologie d'*A. fumigatus* (J.P. Latgé, Unité Aspergillus, Institut Pasteur), en immunologie (J. Bayry, Unité 1138, INSERM) ainsi que dans l'étude des hydrophobines (M. Sunde, School of Medical Science, University of Sydney) et en AFM (Y. Dufrêne, Unité de Chimie des Interfaces, Université Catholique de Louvain). Le but de ce projet est tout d'abord de déterminer le rôle des différentes hydrophobines dans le cycle de développement du champignon. Cette étude menée dans l'équipe de J. P. Latgé consiste en l'étude de mutants de délétion des hydrophobines et la caractérisation des phénotypes observés, morphologie, croissance, survie, conidiation, etc. Il consiste également à étudier la fonction et l'auto-assemblage des hydrophobines d'*A. fumigatus*. Il s'intéresse en particulier aux hydrophobines de classe I, RodA, RodB et RodC. En effet, RodA et RodB sont exprimées au niveau des spores, qui constituent le morphotype infectieux et leurs mutants de délétion, simples ou doubles, présentent des phénotypes très intéressants, en particulier le mutant Δ*roda*. Le mutant de délétion Δ*rodc* présente également un phénotype intéressant qui met en évidence l'importance de l'hydrophobine RodC dans la conidiation et la survie des spores. L'auto-assemblage des hydrophobines est étudié via des méthodes biophysiques, la caractérisation de mutants (*in vitro* et *in vivo*) et la protéolyse ménagée.

En ce qui concerne RodA, ce projet vise également à identifier les éléments structuraux importants dans l'inertie de cette hydrophobine vis-à-vis du système immunitaire et à comprendre la dégradation de la couche de bâtonnets nécessaire à la germination des spores. D'autre part, l'étude de l'auto-assemblage de RodB et de RodC devrait être importante pour comprendre le mécanisme général de la formation d'amyloïdes fonctionnelles par les hydrophobines. Le projet s'attache également à mieux comprendre le rôle biologique de ces deux hydrophobines et à identifier leur conformation fonctionnelle, globulaire ou fibrillaire.

Afin de caractériser d'un point de vue structural l'auto-assemblage des hydrophobines, il est indispensable de connaître la structure de la forme soluble. Ainsi le premier objectif de cette thèse a été l'étude de la forme monomérique soluble de RodA (142 résidus) et la détermination de sa structure. Dans cette optique, la protéine a été exprimée non marquée, marquée ^{15}N et doublement marquée $^{15}N/^{13}C$. Différents spectres RMN ont été enregistrés, permettant, en premier lieu, d'attribuer les signaux du squelette et des chaînes latérales, d'étudier la structure secondaire et la dynamique interne et enfin, de déterminer la structure de la protéine. Par la suite, l'auto-association de RodA sous forme de fibres amyloïdes a été suivie par fluorescence en présence de ThT et la morphologie des bâtonnets obtenus a été observée par TEM.

Afin d'étudier le mécanisme de formation et la structure des fibres, il est nécessaire d'identifier les régions impliquées dans la structure β-croisée, constituant le cœur des fibres. Pour ce faire, des simples mutants en glycine ont été produits et leur cinétique de fibrillation a été étudiée par fluorescence en présence de ThT (coll. M. Sunde). Par la suite, les régions ainsi identifiées ont été mutées dans leur ensemble afin d'étudier la fibrillation en absence de ces régions amyloïdogènes. De même, l'importance de la structure et de l'extrémité N-terminale dans la formation et la morphologie des fibres a été caractérisée. Les mutants ont également été étudiés *in vivo* afin de valider les résultats obtenus *in vitro* (coll. J.P. Latgé et Y. Dufrêne).

Les propriétés immunologiques de RodA ont été étudiées. Les liens entre la structure de RodA sous différentes formes, la protéine dépliée, la protéine dépliée dont les groupements thiols ont préalablement été alkylés, la protéine soluble repliée et la protéine sous forme de bâtonnets et son inertie vis-à-vis du système immunitaire ont été analysés (coll. J. Bayry).

L'étude des hydrophobines RodB (125 résidus) et RodC (134 résidus) a été initiée au laboratoire. Des stratégies similaires à celle utilisée pour RodA seront appliquées pour ces deux protéines. L'étude de RodB est menée en collaboration avec M. Sunde et l'étude de RodC sera réalisée au laboratoire.

Chapitre 3 : Matériel et méthodes

I. Plasmides

Les plasmides codant pour les hydrophobines et leurs mutants ont été produits par la société Proteogenics. Les gènes synthétiques de RodA (AFUA_5G09580), RodB (AFUA_1G17250) et RodC (AFUA_8G07060) codent pour les protéines sans le peptide signal situé à l'extrémité N-terminale qui est clivée par les champignons lors de la sécrétion.

II. Expression des protéines

Expression de UBP41

Afin d'obtenir les hydrophobines, une étape de protéolyse par la déubiquitinase UBP41 est prévue. La protéase est exprimée à l'aide de cellules *E. coli* BL21 (DE3), transformées par le plasmide pHUE-UBP41. Ce plasmide porte notamment un gène de résistance à l'ampicilline et le gène synthétique codant pour l'enzyme UBP41 en fusion avec une queue hexa-histidine. La culture est réalisée à 37°C en présence d'ampicilline à 100 $\mu g.mL^{-1}$, en milieu riche Luria-Bertani (LB). Quand la culture atteint une densité optique de 0,6 à 600 nm, l'expression est induite à l'isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), à 0,5 mM final, pendant 3 h. Les cellules sont récupérées par centrifugation (10 min à 10000 x g à 4°C), lavées avec un tampon TrisHCl 150 mM, NaCl 300 mM, pH 8, centrifugées à nouveau (10 min à 10000 x g à 4°C) et le culot est congelé à -80°C.

Expression des hydrophobines

Les protéines recombinantes RodA, RodB et RodC sont surexprimées chez *E. coli* BL21 (DE3) sous forme de protéines de fusion (H6-Ub-RodA, H6-Ub-RodB et H6-Ub-RodC) avec l'ubiquitine (Ub) et une séquence de poly-histidine (H6) en N-terminal. Le gène codant pour la protéine de fusion d'intérêt a été inséré dans un plasmide pET-28b (Invitrogen) qui porte un gène de résistance à la kanamycine. Un site de clivage spécifique de l'enzyme déubiquitinase UBP41 est inséré entre l'ubiquitine et l'hydrophobine. L'ubiquitine aide à solubiliser la protéine pendant sa renaturation *in vitro* et la queue poly-histidine permet la purification par chromatographie d'affinité.

Les cultures sont réalisées à 37°C en présence de kanamycine (50 µg.mL^{-1}). Les protéines non-marquées sont obtenues à partir de culture en milieu riche (LB). Pour le marquage isotopique uniforme ^{15}N et $^{15}N/^{13}C$, les protéines sont obtenues à partir de cultures en milieu minimum M9 (Na_2HPO_4 : 6 g.L^{-1}, KH_2PO_4 : 3 g.L^{-1}, NaCl : 5 g.L^{-1}, $MgSO_4$: 1 M, $CaCl_2$: 0,1 M). Le milieu minimum contient du chlorure d'ammonium $^{15}NH_4Cl$ à 0,5 g.L^{-1}et du glucose $^{13}C_6H_{12}O_6$ à 2 g.L^{-1} comme seules sources d'azote et de carbone respectivement. Afin de faciliter la croissance bactérienne, des extraits de levure sans acides aminés et sans sulfate d'ammonium (0,43 g.L^{-1}, DIFCO) sont ajoutés au milieu de culture. Quand les cultures atteignent une densité optique de 0,6 à 600 nm, l'expression est induite à l'IPTG (0,5 mM final) pendant 4 h. Les cellules sont récupérées par centrifugation (10 min à 10000 x g à 4°C), lavées avec un tampon TrisHCl 150 mM, NaCl 300 mM, pH 8, centrifugées à nouveau (10 min à 10000 x g à 4°C) et le culot est conservé à -80°C. La production des protéines de fusion est suivie par électrophorèse sur gels de polyacrylamide en conditions dénaturantes et réductrices (SDS-PAGE).

III. Purification des protéines

Purification de UBP41

Après décongélation, afin de récupérer l'extrait cellulaire contenant les protéines, le culot bactérien est solubilisé dans un tampon TrisHCl 50 mM, NaCl 150 mM, β-mercaptoéthanol 4 mM, pH 8 en présence de lysozyme et d'anti-protéases (COMPLETE), puis soniqué. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation (30 min à 10000 x g à 4°C). L'enzyme UBP41 est purifiée par chromatographie d'affinité sur colonne de nickel (HiTrap™ Chelating HP 1 mL, GE Healthcare) équilibrée dans un tampon TrisHCl 20 mM, NaCl 300 mM, imidazole 20 mM, β-mercaptoéthanol 4 mM, pH 8. La protéine est éluée avec le même tampon préparé avec une concentration en imidazole de 300 mM. L'enzyme UBP41 récupérée en sortie de colonne est aliquotée et conservée à -80°C.

Purification des hydrophobines

La protéine de fusion se trouve majoritairement dans la fraction insoluble. Il est donc nécessaire de solubiliser les corps d'inclusion. Pour cela, le culot bactérien est décongelé et remis en suspension dans un tampon urée 8 M, TrisHCl 10 mM, NaH_2PO_4 100 mM, β-mercaptoéthanol 4 mM, pH 8 (tampon A). Après incubation sous agitation pendant 1 h à température ambiante, les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation (40 min à 10000 x g à 20°C) et le surnageant est récupéré et filtré.

La protéine H6-Ub-RodA (H6-Ub-RodB ou H6-Ub-RodC) est alors purifiée par chromatographie d'affinité sur colonne de nickel (HiTrap™, GE Healthcare) équilibrée dans le tampon A. Une fois l'échantillon chargé, la colonne est lavée successivement avec le tampon d'équilibrage puis le même tampon préparé à pH 6,3. La protéine de fusion est éluée avec le même tampon préparé à pH 4,3.

Le repliement oxydatif de la protéine récupérée est réalisé par dialyse à 4°C contre le tampon de repliement (acétate de sodium 50 mM, NaCl 100 mM, pH 5) en présence d'un couple oxydant/réducteur : glutathion réduit/oxydé (GSH 10 mM, GSSG 1 mM). Après renaturation, la protéine de fusion est dialysée contre un tampon de clivage (TrisHCl 50 mM, NaCl 50 mM, $CaCl_2$ 2 mM, pH 8) et incubée pendant 2 h à 37°C en présence de la déubiquitinase UBP41 (rapport de concentration 20 : 1 w/w hydrophobine : protéase).

Afin de séparer l'hydrophobine RodA (RodB ou RodC) de l'ubiquitine (H6-Ub), de l'enzyme UBP41 (qui contient une queue d'histidine) et de l'éventuelle protéine de fusion non clivée, une chromatographie d'affinité est réalisée sur colonne de nickel (HiTrap™). La colonne est équilibrée avec un tampon TrisHCl 50 mM, NaCl 300 mM, $CaCl_2$ 2 mM, imidazole 20 mM, pH 8, puis l'échantillon est déposé après ajustement de sa concentration en imidazole et en NaCl. Les hydrophobines sont éluées avec le tampon d'équilibrage alors que l'ubiquitine, la protéine de fusion et la protéase sont retenues sur la colonne.

Pour la dernière étape de purification, une chromatographie en phase inverse (RPC, colonne PepRPC HR 10/10, Amersham Biosciences) est réalisée. Après ajustement du pH à 4, la protéine est déposée sur la colonne équilibrée dans un tampon méthanol 10%, TFA 0,1%. La protéine est éluée avec un gradient linéaire de 0 à 100% de tampon méthanol 10%, acétonitrile 90%, TFA 0,1% en 90 min. Dans le cas de RodA, deux fractions sont obtenues en sortie de colonne, une correspondant à la protéine repliée et la deuxième à la protéine non

repliée. L'hydrophobine est récupérée en sortie de colonne et lyophilisée puis conservée à 4°C. La pureté des hydrophobines est suivie par électrophorèse sur gels de polyacrylamide en conditions dénaturantes et réductrices (SDS-PAGE). La concentration est estimée par un dosage BCA (Pierce). L'identité ainsi que l'intégrité des protéines, sont vérifiées par spectrométrie de masse « Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization - Time Of Flight » (SELDI-TOF, spectromètre Cyphergen). L'état de repliement de la protéine contenue dans les différentes fractions séparées par RPC est analysé par RMN à l'aide de spectres HSQC ^{1}H-^{15}N pour les protéines marquées au ^{15}N ou des spectres une dimension ^{1}H pour les échantillons non marqués.

Le même protocole est suivi pour les mutants de RodA. Les protéines RodA, RodB et RodC correspondent respectivement aux résidus [19 - 159], [17 - 140] et [23 - 155] des protéines sauvages munies du peptide signal en N-terminal.

A l'issue de ce protocole, les hydrophobines recombinantes ainsi que les mutants de RodA sont obtenus avec une sérine en position N-terminal provenant de la protéine de fusion.

IV. Expériences de RMN

Les échantillons pour les expériences de RMN sont préparés pour RodA dans un tampon acétate deutéré 20 mM, pH 4,3 contenant 10% de D_2O, pour RodB dans un tampon phosphate 50 mM pH 6,5 contenant 12% de D_2O et pour RodC dans un tampon acétate deutéré 50 mM, pH 4,5 contenant 10% de D_2O. Les échantillons sont introduits dans des tubes Shigemi 4 mm (Shigemi inc., Allison Park). La concentration des échantillons est de 0,15 mM à 0,4 mM pour RodA, de 0,3 mM pour RodB et de 0,2 mM à 0,6 mM pour RodC. Les expériences de RMN sont réalisées sur un spectromètre Direct Drive 600 (Agilent, Santa Clara) avec un champ magnétique de 14,1 Teslas et équipé d'une sonde cryogénique. L'acquisition, le traitement et l'analyse des spectres ont été réalisés en utilisant les logiciels Vnmrj 4.0 (Agilent, Santa Clara), NMRPipe[162], NMR View 5.0[163] et CcpNmr Analysis[164]. Les expériences sont réalisées à 25°C pour RodA et RodB et à 25°C, 35°C et 45°C pour RodC. Les déplacements chimiques sont référencés par rapport au sel de sodium du sulfonate de 4,4 dimethyl-4-silapentane (DSS).

L'attribution des signaux RMN a été réalisée à l'aide d'expériences hétéronucléaires bi- et tridimensionnelles : HSQC ^{1}H-^{15}N et ^{1}H-^{13}C[165], HNHA[166], HN(CA)CO, HNCA[165,167], HNCO, HNCACB, CACB(CO)NH[167], C(CCTOCSY)NNH, H(CCTOCSY)NNH et HCCH-TOCSY[168] (« TOtal Correlation SpectroscopY »). Les cycles aromatiques ont été reliés aux chaînes aliphatiques en faisant usage d'expériences qui corrèlent les protons Hδ et Hε aux carbones β, (HB)CB(CGCD)HD et (HB)CB(CGCDCE)HE.[169]

La structure secondaire a été étudiée à partir des déplacements chimiques de la chaîne principale et des carbones Cβ à l'aide du logiciel PECAN[170].

La dynamique des protéines a été étudiée par des mesures de la relaxation du noyau ^{15}N. Dans cette optique, les vitesses de relaxation longitudinale (R1) et transversale (R2), ainsi que l'effet nOe hétéronucléaire ^{1}H-^{15}N ont été déterminés. Les délais de recyclage de l'aimantation sont de 2,14 s pour toutes les expériences de relaxation. Le temps de saturation dans les expériences nOe ^{1}H-^{15}N est de 3 s. Les erreurs des valeurs de R1, R2 et du nOe ^{1}H-^{15}N sont estimées à partir de l'écart type du bruit dans les expériences respectives et des simulations de Monte-Carlo. La dynamique interne des protéines à l'échelle des pico-nanosecondes a aussi été étudiée en utilisant les déplacements chimiques de la chaîne principale et des carbones Cβ à l'aide de la méthode RCI (« Random Coil Index »).

Afin de déterminer la structure en solution des protéines, les expériences HSQC NOESY ^{1}H-^{15}N et ^{1}H-^{13}C (« Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY ») aromatique et aliphatique ont été enregistrées avec des temps de mélange de 120 ms.[165,171] Les angles de torsion de la chaîne principale de la protéine RodA, φ et ϕ, ont été calculés grâce au logiciel TALOS+[142] et à partir de l'expérience HNHA (angle φ). Le logiciel ARIA[172] couplé à CNS[173] a été utilisé pour attribuer les spectres NOESY et déterminer la structure tridimensionnelle de l'hydrophobine RodA. Avec le logiciel ARIA, les protocoles standards ont été utilisés avec la correction de la diffusion de spin et le « network anchoring » (filtrage par réseaux d'interaction).

V. Alkylation des cystéines

Afin d'étudier l'hydrophobine RodA sous sa forme non repliée, la formation des ponts disulfures est bloquée par alkylation des fonctions thiols des cystéines. La protéine non repliée lyophilisée est solubilisée dans un tampon GuHCl 6 M, TrisHCl 100 mM à pH 7 ou à

pH 8. Les potentiels ponts disulfures formés sont réduits avec un large excès de DTT (rapport stœchiométrique 10 : 1 DTT : cystéine) en incubant 1 h à 37°C sous flux d'azote. Les cystéines sont alkylées par la N-éthylmaléimide (pH 7) ou l'iodoacétamide (pH 8) (rapport stœchiométrique 10 : 1 agent alkylant : DTT) en incubant 1 h à 37°C sous flux d'azote. L'alkylation est arrêtée par ajout d'un large excès de β-mercaptoéthanol (rapport stœchiométrique 10 : 1 β-mercaptoéthanol : agent alkylant).

RodA alkylée par la N-éthylmaléimide ou l'iodoacétamide est ensuite purifiée par RPC en suivant le même protocole que celui utilisé lors de la purification de la protéine. L'hydrophobine alkylée est récupérée en sortie de colonne, lyophilisée puis conservée à 4°C.

VI. Etudes des fibres *in vitro*

Fluorescence

La formation de fibres *in vitro* est suivie par fluorescence en présence de thioflavine T (ThT) sur des plaques 96 puits (Grenier) avec un spectrofluorimètre SAFAS Xenius (SAFAS, Monaco) à des longueurs d'onde d'émission et d'excitation de 415 nm et de 484 nm respectivement avec des fentes d'excitation et d'émission de 5 nm. Les concentrations en protéine sont de 25 $\mu g.ml^{-1}$, 50 $\mu g.ml^{-1}$ et 100 $\mu g.ml^{-1}$. La concentration en ThT est de 40 µM. Les tampons utilisés sont acétate de sodium 20 mM pH 5 et glycine 20 mM pH 3. La fibrillation est déclenchée par agitation orbitale à 7,4 Hz à 30°C, 35°C, 40°C et 45°C et la fluorescence est mesurée à intervalles réguliers après une minute d'agitation, pendant 5 h.

Microscopie électronique à transmission

Les échantillons obtenus par agitation orbitale sont déposés sur des grilles de carbone (EMS, maille 400), préalablement chargées négativement, puis colorés à l'acétate d'uranyle 2,5 %. Les grilles sont observées sur un microscope électronique (FEI TECNAI T12).

Chapitre 4 : Résultats et discussion

I. Expression et purification des hydrophobines

Les protéines RodA, RodB et RodC sont produites chez *E. coli* sous forme de protéines de fusion, avec l'ubiquitine portant une queue polyhistidine en N-terminal. Les hydrophobines, qui à l'état natif contiennent huit résidus de cystéine oxydés et impliqués dans des ponts disulfures, sont exprimées au niveau du cytoplasme, un milieu réducteur qui ne permet pas la formation de liaisons S-S. Ainsi, les protéines de fusion se retrouvent majoritairement dans la fraction insoluble.

La stratégie de purification consiste donc, dans un premier temps, à solubiliser les protéines de fusion (H6-Ub-RodX) à l'aide d'un agent chaotrope, l'urée 8 M, et à les purifier par chromatographie d'affinité sur colonne de nickel en conditions dénaturantes et réductrices. Dans un deuxième temps, la renaturation oxydative des protéines est réalisée en présence d'un couple oxydant/réducteur (GSSG/GSH) qui permet la formation/rupture des liaisons S-S au cours du repliement. L'ubiquitine permet d'augmenter le rendement de renaturation probablement par la solubilisation d'intermédiaires de repliement.

Après renaturation, l'ubiquitine portant la queue polyhistidine est clivée à l'aide de la déubiquitinase UBP41. Les hydrophobines sont alors séparées de l'ubiquitine, de la déubiquitinase et de l'éventuelle protéine de fusion résiduelle sur colonne de nickel.

La protéine est obtenue après une ultime étape de purification par RPC permettant de séparer la protéine repliée de la protéine non repliée, de l'ubiquitine éventuelle et de fragments. Le suivi par spectroscopie UV met en évidence, pour RodB et RodC, un pic isolé et symétrique, correspondant à la protéine repliée. Dans le cas de RodA, un pic attenant contenant de la protéine non repliée avec la masse attendue pour RodA est présent sur le chromatogramme. La recherche de conditions de renaturation n'a pas permis d'augmenter la fraction de protéine repliée.

La pureté, l'identité, ainsi que l'intégrité des protéines obtenues, ont été vérifiées par SDS-PAGE, par spectrométrie de masse SELDI-TOF et par microséquençage N-terminal. Des spectres RMN HSQC ^{1}H-^{15}N ont permis d'identifier la protéine repliée. Dans le cas de RodA, le repliement natif de la protéine recombinante a été validé grâce à la comparaison des spectres RMN HSQC ^{1}H-^{15}N de la protéine recombinante et de la protéine extraite du champignon. Après optimisation, les rendements sont d'environ 10 mg de protéine marquée par litre de culture.

II. Attribution des signaux RMN

Stratégie d'attribution

Afin d'attribuer les signaux, les protéines ont été marquées au ^{15}N et doublement marquées au $^{15}N/^{13}C$. L'attribution séquentielle est basée sur les transferts d'information à travers les liaisons intra- et inter-résidus (résidus i et i-1). Ces transferts font appel aux interactions de couplage scalaire entre noyaux. La stratégie d'attribution séquentielle repose sur le spectre HSQC ^{1}H-^{15}N qui corrèle le proton et l'azote de chaque groupement amide du squelette peptidique (Figure 25 A). Ce spectre montre un signal pour chaque groupement amide et constitue une empreinte de la structure de la protéine. Les spectres tridimensionnels corrèlent les protons ou carbones des chaînes latérales avec le groupement amide du résidu i ou du résidu i-1 selon les expériences (Figure 25 B). L'acronyme de chaque expérience renseigne quant à la nature des corrélations observées en précisant les noyaux pour lesquels les fréquences de résonances sont collectées (indiqués en pleine lettre) et les noyaux passivement impliqués dans le transfert de cohérence (indiqués entre parenthèse ou en minuscule).

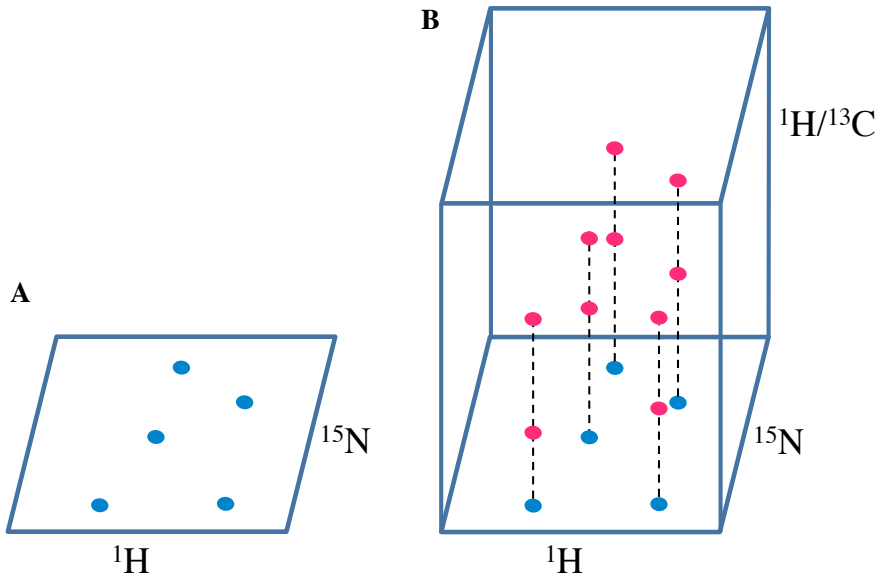


Figure 25 : Stratégie d'attribution séquentielle

(**A**) Spectre HSQC ^{1}H-^{15}N. (**B**) Corrélations dans les expériences tridimensionnelles, en rose pics observés, en bleu projection des pics sur le plan ^{1}H-^{15}N.

Les atomes H(N), N et Cα de la chaîne principale et les Cβ ont été attribués, selon une stratégie classique, à l'aide des expériences HNCACB et CACB(CO)NH (Figure 26). Ces expériences complémentaires permettent de relier les signaux du groupement amide du résidu i à ceux des carbones Cα et Cβ des résidus i et i-1 et de distinguer les corrélations provenant du résidu i et du résidu i-1. Dans l'expérience HNCACB, le groupement amide d'un résidu i est corrélé avec les Cα et Cβ des résidus i et i-1. Les Cα présentent des taches de corrélation positives alors que les Cβ présentent des taches négatives, ce qui permet de les distinguer (Figure 26 A). Dans l'expérience CACB(CO)NH, seules les corrélations du groupement amide du résidu i avec les Cα et Cβ du résidu i-1 sont observables (Figure 26 B).

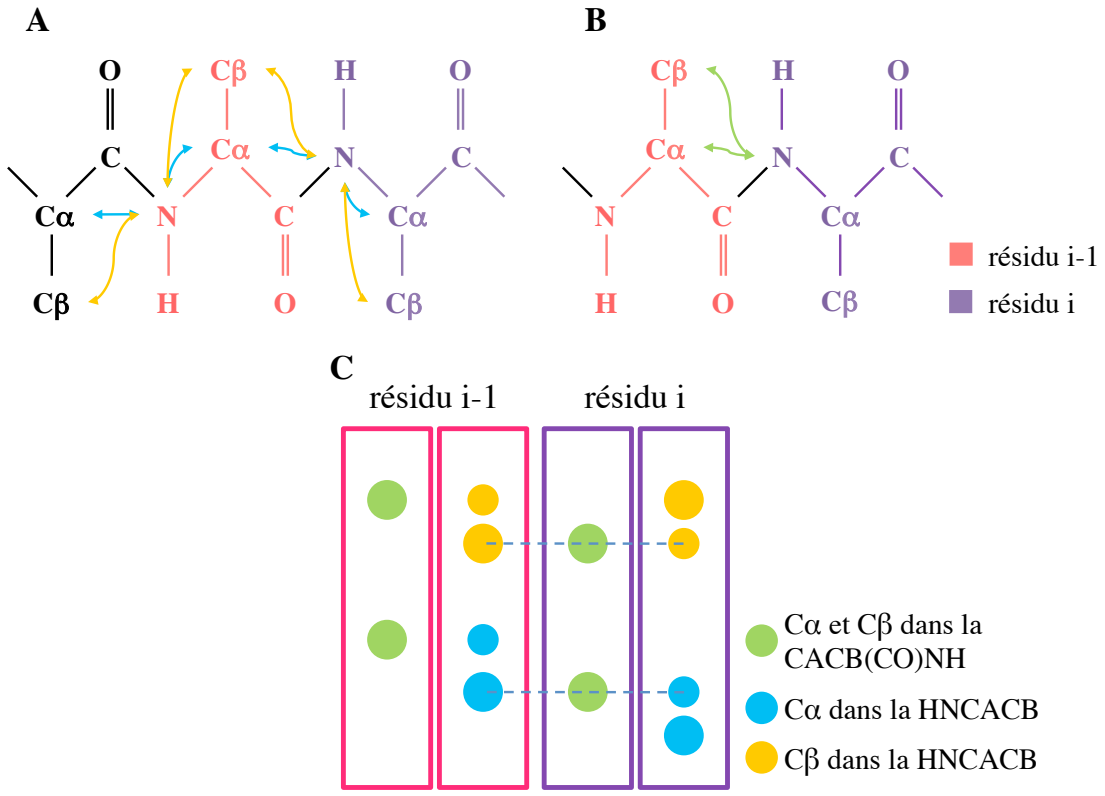


Figure 26 : Corrélations dans les expériences HNCACB et CACB(CO)NH

(**A**) Corrélations dans l'expérience HNCACB, en bleu donnant lieu à des taches positives, en jaune donnant lieu à des taches négatives. (**B**) Corrélations dans l'expérience CACB(CO)NH. (**C**) Stratégie d'attribution des Cα et Cβ avec les expériences HNCACACB et CBCA(CO)NH.

Les expériences HNCO et HNHA ont été utilisées afin d'attribuer respectivement les carbonyles et les protons Hα du squelette polypeptidique. Les protons et les carbones des chaînes latérales aliphatiques ont été identifiés à l'aide des expériences C(CCTOCSY)NNH, H(CCTOCSY)NNH et HCCH-TOCSY. Les deux premières expériences corrèlent les groupements amides du résidu i avec les carbones et les protons du résidu i-1. L'expérience HCCH-TOCSY permet de corréler les protons et les carbones d'un même résidu entre eux (Figure 27).

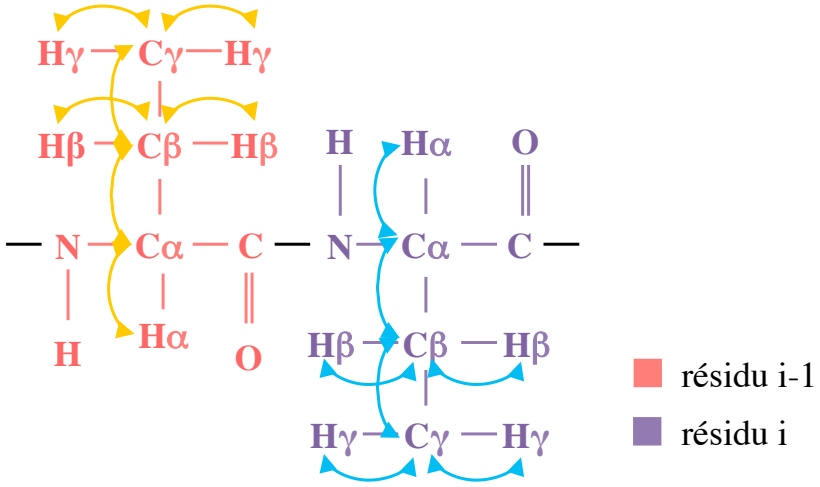


Figure 27 : Corrélations dans l'expérience HCCH-TOCSY

Dans l'expérience HCCH-TOCSY, la magnétisation est transférée depuis un proton (aliphatique) de la chaîne latérale vers le carbone auquel il est relié. Ce transfert est suivi par un mélange isotopique ^{13}C et un transfert retour vers les protons aliphatiques pour la détection. Les corrélations des protons et des carbones de la chaîne latérale des résidus i-1et i sont respectivement représentées en orange et bleu.

Enfin, les attributions des protons et des carbones aromatiques ont été obtenues à partir des expériences bidimensionnelles (HB)CB(CGCD)HD et HB(CBCGCDCE)HE, ainsi que d'une expérience HSQC ^{1}H-^{13}C avec excitation sélective de la région des aromatiques. Ces deux premières expériences permettent de relier le Cβ d'un résidu aux protons δ et ε du cycle aromatique de ce même résidu.

Attribution de l'hydrophobine RodA

En ce qui concerne l'hydrophobine RodA, le spectre HSQC ^{1}H-^{15}N présente une dispersion caractéristique d'une protéine repliée (Figure 28).

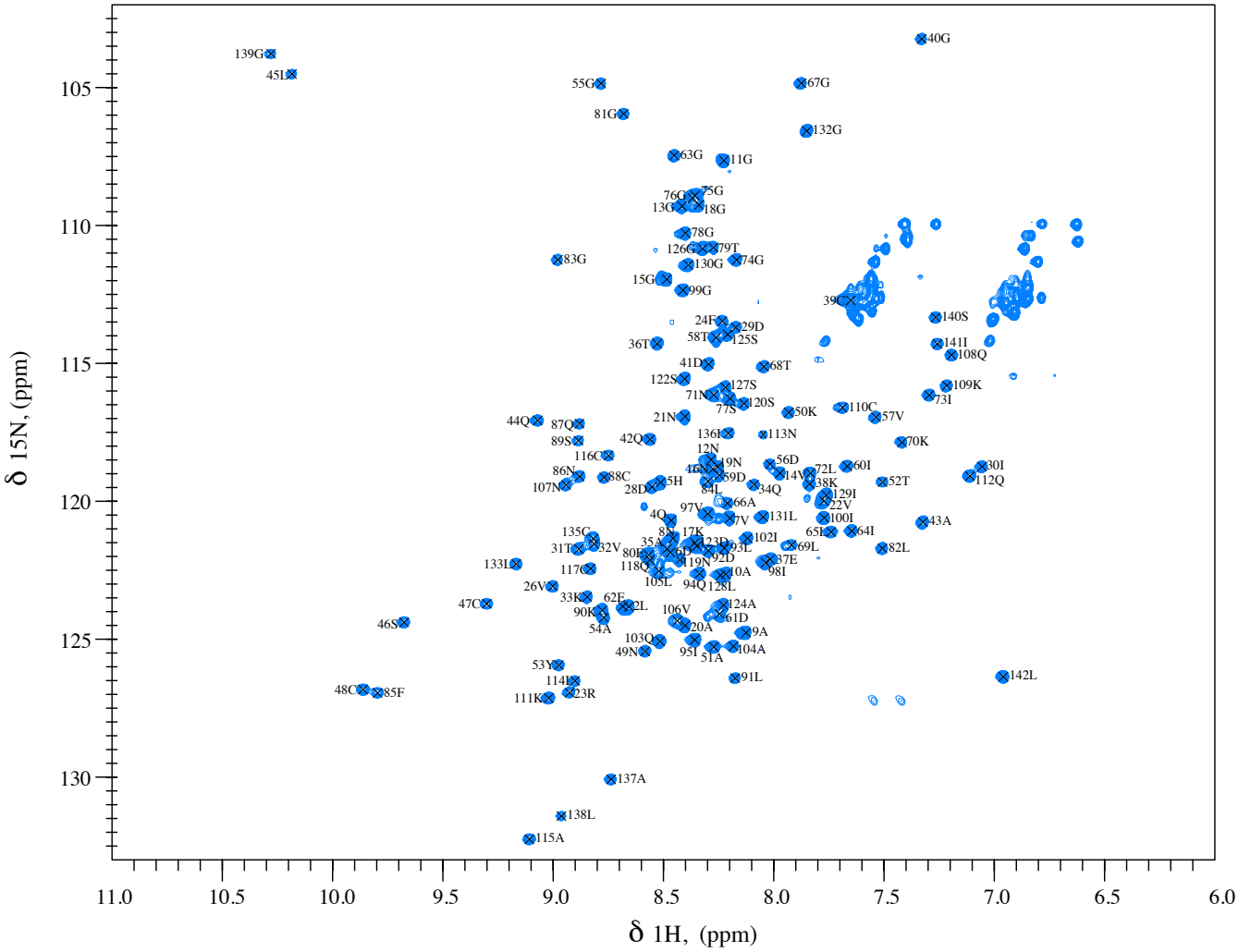


Figure 28 : Spectre ^{1}H-^{15}N HSQC de RodA

Le spectre a été enregistré à 25°C, dans un tampon CD_3COONa 20 mM, 10 % D_2O, pH 4,3. Les attributions sont indiquées uniquement pour les groupements amides. Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en ppm et sont référencés par rapport au 4,4-diméthyl-4-silapentane-1-sulfonate de sodium (DSS).

En suivant la stratégie standard décrite, les résonances ^{1}H, ^{15}N et ^{13}C de la protéine ont été identifiées menant à une attribution quasi complète. Les résonances qui n'ont pas été attribuées correspondent à des groupements échangeables des chaînes latérales de 4 résidus d'asparagine, 8 résidus de lysine et un résidu d'arginine, ainsi que certains groupements non-

échangeables des chaînes latérales (K33 Cδ, K111 CεHε$_2$, F23 Cδ, F85 Cε et CζHζ), les carbones des fonctions carbonyles du squelette de 8 résidus précédents des résidus de proline et celui du résidu C-terminal.

Voir en annexe article Pille et al. Biomolecular NMR assignments (2014).

Attribution des hydrophobines RodB et RodC

Le spectre HSQC ^{1}H-^{15}N de l'hydrophobine RodB présente lui aussi une dispersion caractéristique d'une protéine repliée (Figure 29).

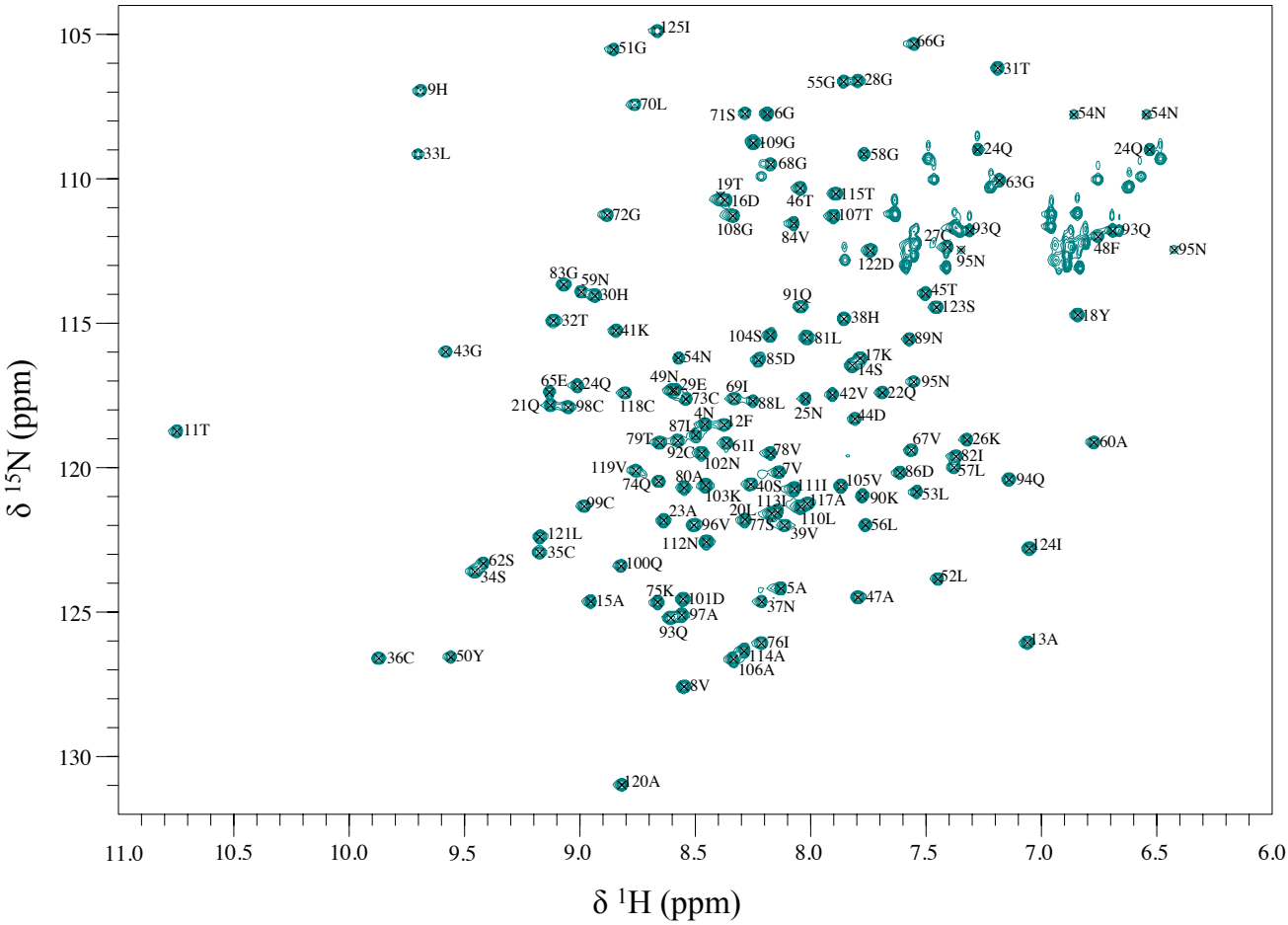


Figure 29 : Spectre ^{1}H-^{15}N HSQC de RodB

Le spectre a été enregistré à 25°C, à l'aide d'un échantillon dans un tampon phosphate 50 mM, 12 % D_2O, pH 6,5. Les attributions sont indiquées uniquement pour les groupements amides. Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en ppm et sont référencés par rapport au DSS.

Une stratégie d'attribution similaire à celle menée pour RodA a été mise en place ce qui a permis l'attribution de l'ensemble des signaux correspondant aux protons amides de la chaîne principale à l'exception de celui du deuxième résidu, qui s'échange vraisemblablement trop rapidement avec le solvant en raison des effets inductifs du groupement NH_3^+ du résidu N-terminal. De plus, la majorité des carbones et protons non échangeables ont également été attribués (98% des résidus, 97% du squelette et 91% des chaînes latérales).

Dans le cas de l'hydrophobine RodC, les expériences ont, dans un premier temps, été réalisées à 25°C. Le spectre HSQC ^{1}H-^{15}N de RodC à 25°C contient plus de corrélations qu'attendu, ce qui indique que plus d'une conformation de la protéine est présente (Figure 30).

L'existence de plusieurs formes de la protéine ainsi que de régions non structurées caractérisées par une faible dispersion des signaux et d'autre part, la faible intensité de certains signaux, se traduisent respectivement par un encombrement spectral et par l'absence de signaux dans les expériences tridimensionnelles. Certains signaux sont dédoublés du fait de la présence des cinq résidus de proline dans l'extrémité N-terminale. L'augmentation de la température à 35°C puis à 45°C a permis d'améliorer la qualité des spectres et a notamment affiné les raies de signaux qui n'étaient pas visibles à 25°C. L'interprétation des spectres à ces deux températures a permis l'attribution séquentielle de 90% des résonances de la chaîne principale et des carbones β (attribution Régine Dazzoni).

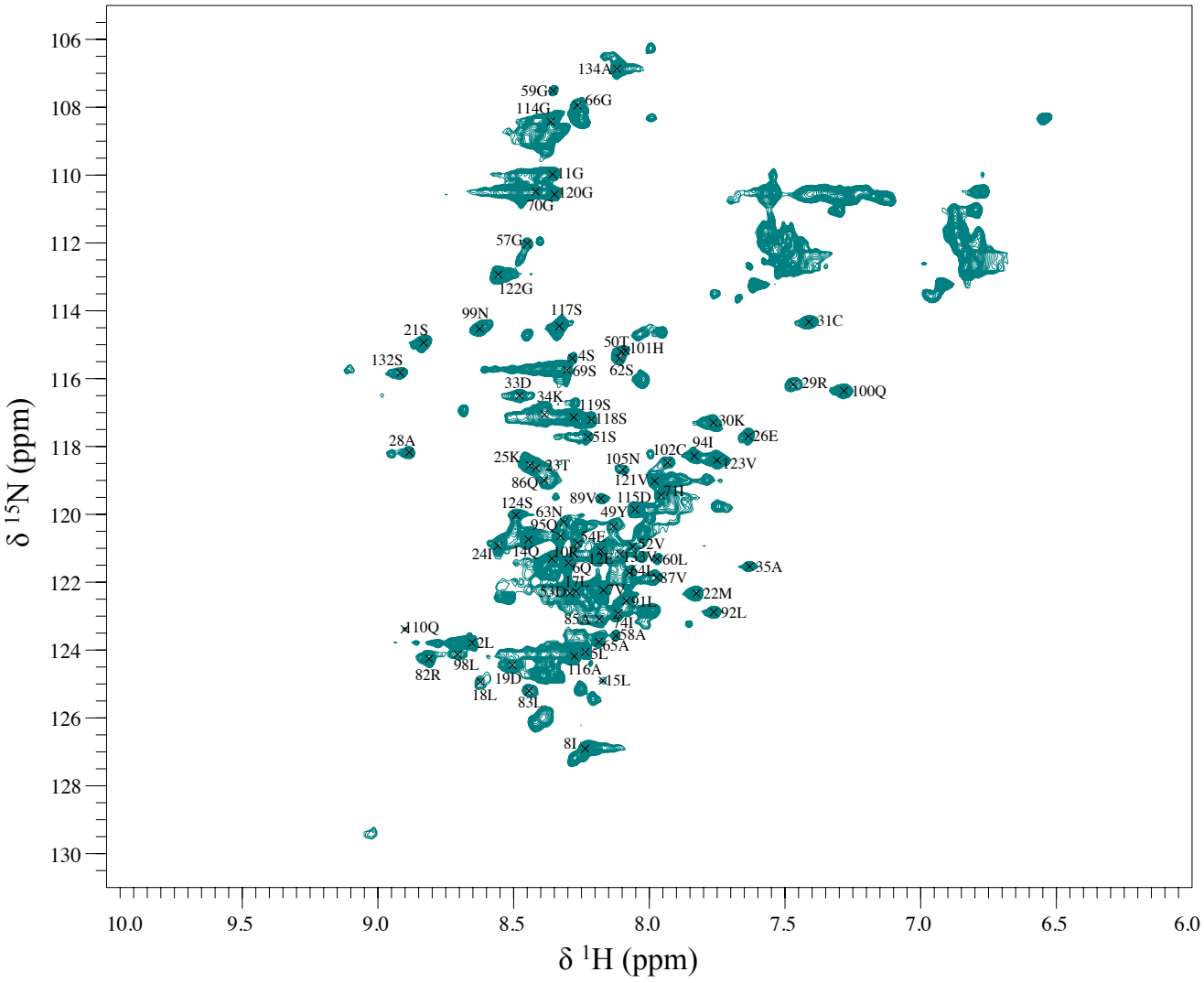


Figure 30 : Spectre ^{1}H-^{15}N HSQC de RodC

Le spectre a été enregistré à 35°C, dans un tampon CD_3COONa 50 mM, 10 % D_2O, pH 4,5. Les attributions sont indiquées uniquement pour les groupements amides. Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en ppm et sont référencés par rapport au DSS.

III. Structure secondaire et dynamique interne

Analyse des déplacements chimiques et étude de la structure secondaire

Les déplacements chimiques dépendent de la nature et de l'environnement chimique du noyau considéré. Ainsi, il a été montré que leur analyse renseigne notamment sur l'état d'oxydoréduction des résidus de cystéines.[174] L'étude des déplacements chimiques des Cα et des Cβ des résidus de cystéines des hydrophobines RodA, RodB et RodC indiquent que pour chacune de ces protéines les huit résidus de cystéines sont impliqués dans des ponts disulfures.

De même, les déplacements chimiques sont fortement influencés par les éléments de structure secondaire dans lesquels les résidus sont impliqués. Ainsi, les structures secondaires induisent des variations de déplacements chimiques caractéristiques par rapport à ceux des mêmes atomes dans une protéine non repliée. Ils peuvent donc être utilisés pour étudier la structure secondaire des protéines.

Les déplacements chimiques de la chaîne principale et des carbones Cβ des trois hydrophobines ont été analysés à l'aide du logiciel PECAN (« Protein Energetic Conformational Analysis from NMR chemical shifts »)[170]. Ce logiciel combine, dans un modèle énergétique, les informations de la séquence en acides aminés et des déplacements chimiques de la chaine principale et des carbones β, afin d'identifier les conformations de basse énergie et de déterminer les éléments de structure secondaire. Ces calculs permettent d'obtenir une probabilité de structure secondaire.

Les résultats mettent en évidence des structures secondaires similaires chez les trois hydrophobines (Figure 31). En effet, elles présentent une structure majoritairement en brins β à proximité des ponts disulfures. De plus, chez les protéines RodA et RodB deux hélices α sont retrouvées tandis que chez l'hydrophobine RodC une seule hélice α, correspondant à la première hélice de RodA et de RodB, est retrouvée (Figure 32).

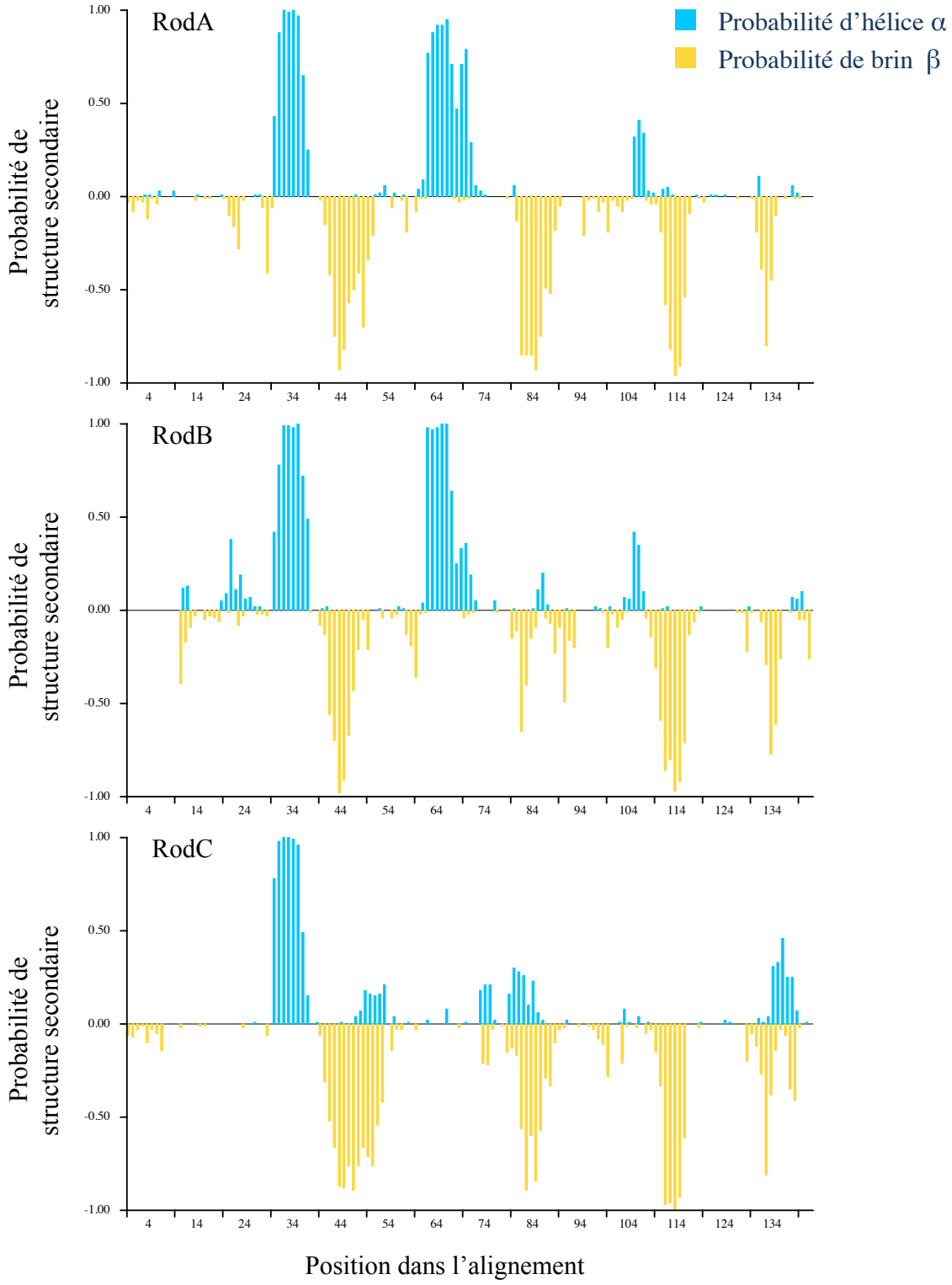


Figure 31 : Probabilité de structure secondaire des protéines RodA, RodB et RodC

Probabilité de structure secondaire pour chaque résidu calculée à partir des déplacements chimiques à l'aide du logiciel PECAN. Les déplacements chimiques de la chaîne principale et des carbones β ont été utilisés pour les hydrophobines RodA, RodB et RodC. Les structures secondaires sont montrées d'après l'alignement de la Figure 7.

La comparaison des structures secondaires des hydrophobines d'*A. fumigatus*, RodA, RodB et RodC, avec celles des hydrophobines de classe I d'autres champignons filamenteux, MPG1, EAS et DewA, permet de souligner les différences et les ressemblances entre ces protéines (Figure 32). Ainsi, la grande variabilité de séquences au sein de cette famille se traduit par une grande variabilité d'éléments de structure secondaire. Cependant certains motifs communs sont retrouvés, en particulier au niveau des ponts disulfures. La superposition des brins β dans les régions des cystéines, brins qui forment le tonneau β, suggère que la topologie en tonneau β est conservée au sein de la famille des hydrophobines. De plus, il apparaît également que pour l'ensemble des hydrophobines de classe I, aucun élément de structure secondaire n'est présent dans la boucle C7-C8. Enfin, pour les hydrophobines possédant une longue extrémité N-terminale, une hélice α en amont et à proximité de la première cystéine est observée.

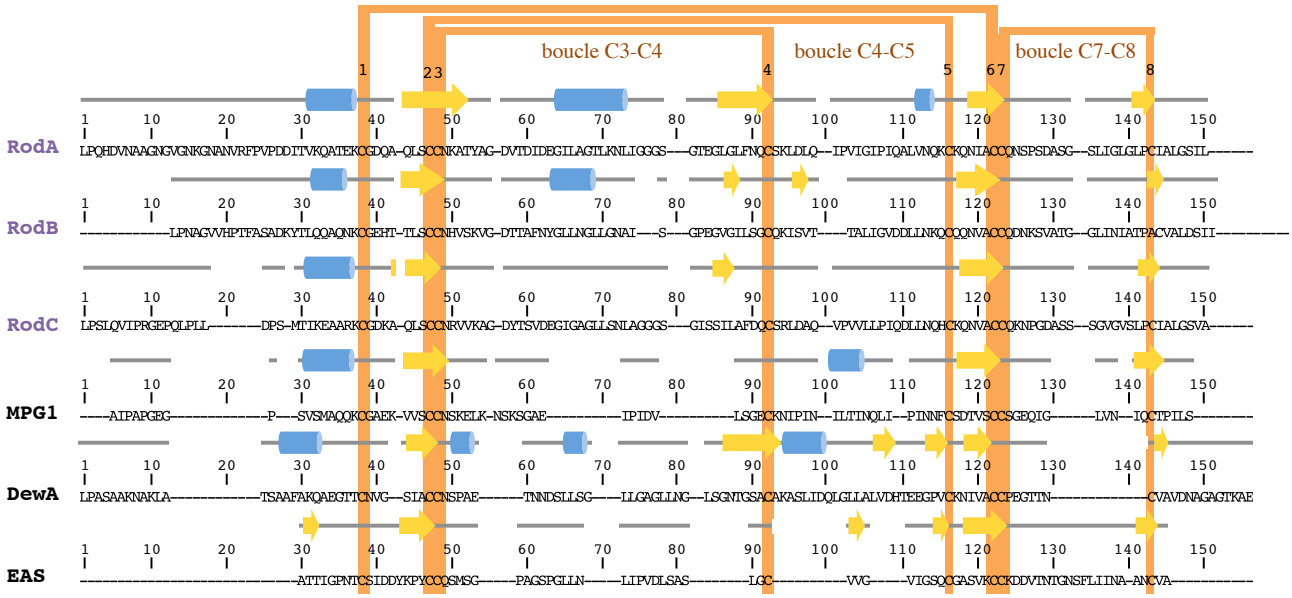


Figure 32 : Comparaison des structures secondaires d'hydrophobines de classe I

Alignement des séquences et des structures secondaires des hydrophobines de classe I RodA (*A. fumigatus*), RodB (*A. fumigatus*), RodC (*A. fumigatus*), MPG1 (*M. grisea*), EAS (*N. crassa*) et DewA (*A. nidulans*). L'alignement a été réalisé avec ClustalW[175] en contraignant les positions des cystéines. Les structures secondaires de RodA, RodB, RodC et MPG1 ont été obtenues avec le logiciel PECAN et celles de EAS et de DewA à partir de leurs structures tridimensionnelles. Les hélices α et les feuillets β sont indiqués respectivement par des cylindres bleus et des flèches jaunes. La position des cystéines et la topologie des ponts disulfures sont indiquées en orange.

Les autres régions des hydrophobines, les boucles C3-C4 et C4-C5, présentent une grande variabilité de longueur et de contenu en éléments de structure secondaire. Par exemple en ce qui concerne la boucle C4-C5, celle-ci est très courte chez EAS et ne présente aucune structure secondaire chez RodA, RodB et RodC tandis qu'une hélice α est retrouvée chez MPG1 et DewA. Dans la boucle C3-C4, aucune structure secondaire n'est présente pour RodC, MPG1 et EAS alors que des hélices α sont identifiées pour RodA, RodB et DewA.

Etude de la dynamique interne sur l'échelle des nano- picosecondes

Paramètres de relaxation et effet nOe hétéronucléaire ^{1}H-^{15}N

Les paramètres de relaxation du noyau ^{15}N tels que les vitesses de relaxation longitudinale (R_1) et transversale (R_2), ainsi que l'effet nOe hétéronucléaire ^{1}H-^{15}N dépendent de la réorientation des « vecteurs » N-H et donnent accès à la dynamique interne des protéines. Par ailleurs, le rapport des vitesses de relaxation R_2 et R_1 permet d'estimer le temps de corrélation, τ_c, de la protéine. Ainsi, à 25°C, pour RodA le τ_c calculé est de 8,5 ± 0,5 ns, pour RodB de 7,2 ± 0,3 ns et pour RodC, il est de 8,9 ± 0,6 ns à 35°C. Ces valeurs sont en accord avec des formes monomériques pour des protéines de respectivement 142, 125 et 134 résidus.

La vitesse de relaxation transversale R_2 est une fonction monotone du temps de réorientation des noyaux ^{15}N. La valeur de R_2 est d'autant plus grande que le temps de réorientation des « vecteurs » N-H est long. Ainsi, les régions flexibles d'une protéine présentent des R_2 plus faibles que les régions rigides. La vitesse de relaxation longitudinale R_1 peut être décomposée en deux parties : une fonction croissante du temps de réorientation pour des fréquences de réorientation élevées ($\omega\tau << 1$, où ω est la fréquence de résonance du noyau ^{15}N dans un champ magnétique donné et τ est le temps de réorientation du noyau ^{15}N) et une fonction décroissante pour des fréquences de réorientation faibles ($\omega\tau >> 1$). Ainsi des régions désordonnées d'une protéine pourront présenter des valeurs de R_1 plus élevées que les régions rigides. La valeur de l'effet nOe hétéronucléaire (« nuclear Overhauser effect »), quant à elle, est corrélée à l'amplitude des mouvements à l'échelle des temps des nano- aux picosecondes. Plus cette valeur est faible plus l'amplitude de mouvement est élevée et donc plus la région est flexible.

Dans le cas de RodA, les valeurs de R_1, R_2 et nOe ^{1}H-^{15}N indiquent la présence de régions extrêmement dynamiques (Figure 33). L'extrémité N-terminale (jusqu'au résidu 21) présente des valeurs de R_2 faibles et des valeurs de nOe ^{1}H-^{15}N négatives ou faibles < 0,5. De même, les résidus 72 à 80 de la boucle C3-C4, ceux de la boucle C4-C5 (91 à 104) et ceux de la boucle C7-C8 (119 à 132) présentent des paramètres de relaxation en accord avec une forte flexibilité.

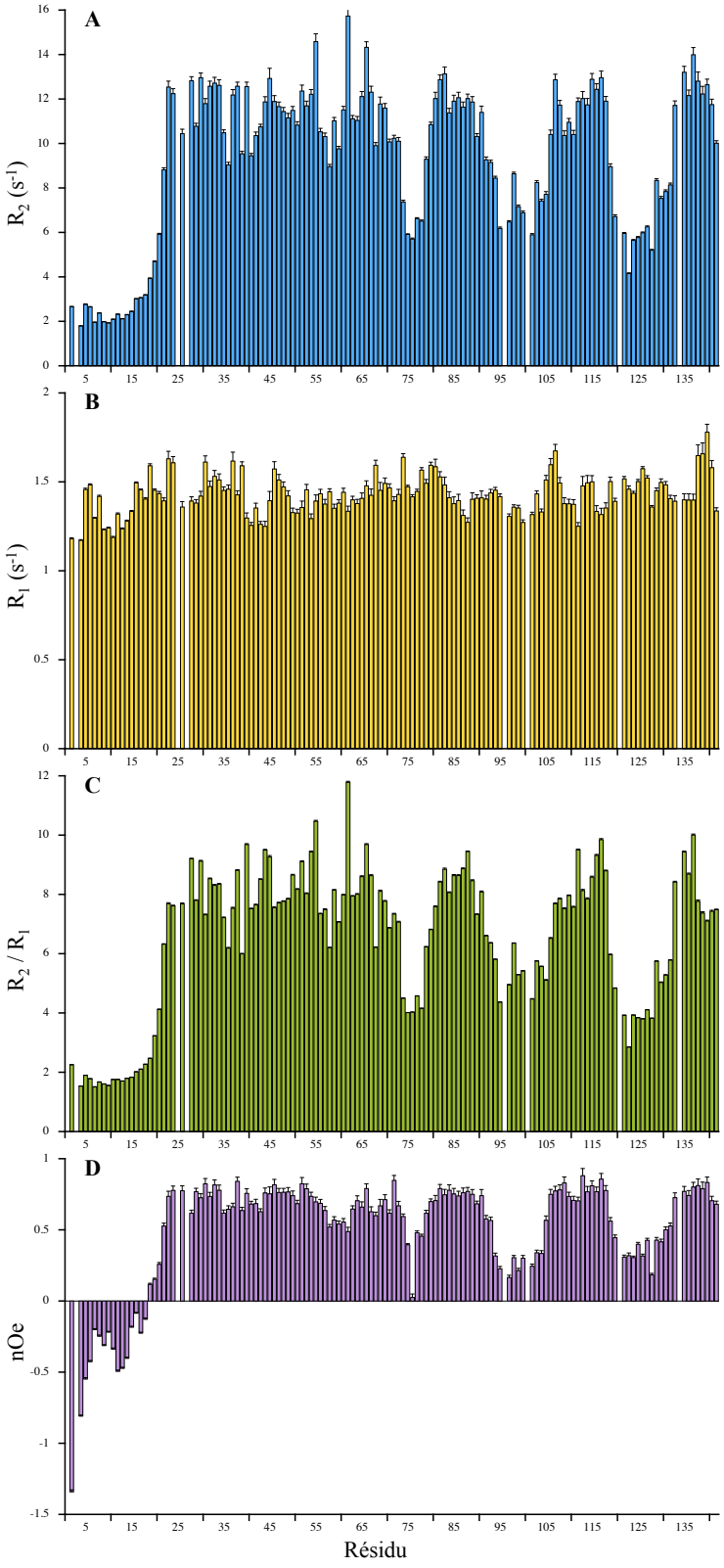


Figure 33 : Dynamique interne de l'hydrophobine RodA

Expériences réalisées sur un spectromètre avec une fréquence de résonance ^{1}H de 600 MHz à 25°C. (**A**) Vitesse de relaxation R_2. (**B**) Vitesse de relaxation R_1. (**C**) Rapport des vitesses de relaxation R_2/R_1. (**D**) Effet nOe hétéronucléaire ^{1}H-^{15}N.

En ce qui concerne RodB, les valeurs de R_1, de R_2 et de l'effet nOe hétéronucléaire sont homogènes le long de la séquence à l'exception de la région N-terminale, résidus 1 à 9, et entre les résidus 104 et 111 correspondant à la boucle C7-C8. Ces deux régions présentent des valeurs de R_2 et des nOe ^{1}H-^{15}N faibles et des valeurs de R_1 élevées. L'ensemble de ces résultats indique la présence d'une région N-terminale non ordonnée ainsi que celle d'une boucle très flexible entre les résidus 104 et 111.

Dans le cas de RodC (Figure 35), les profils de R_1, de R_2 et du nOe hétéronucléaires ^{1}H-^{15}N révèlent comme pour RodA et RodB la présence d'une extrémité N-terminale non structurée (résidus 2 à 16). De plus, ces valeurs indiquent, comme chez l'hydrophobine RodA, une dynamique interne importante pour la boucle C4-C5 (résidus 84 à 94) et la boucle C7-C8 (résidus 112 à 122). Il est à noter qu'à la différence de RodA, la quasi-totalité de la boucle C3-C4 (résidus 46 à 70) présente une forte flexibilité alors que pour RodA seuls quelques résidus (72-80) dépourvus de structure secondaire sont concernés.

Ainsi pour les trois hydrophobines RodA, RodB et RodC, la région N-terminale et la boucle C7-C8 semblent très flexibles voire désordonnées. De plus chez RodA et RodC, des régions dynamiques sont également présentes dans les boucles C3-C4 et C4-C5.

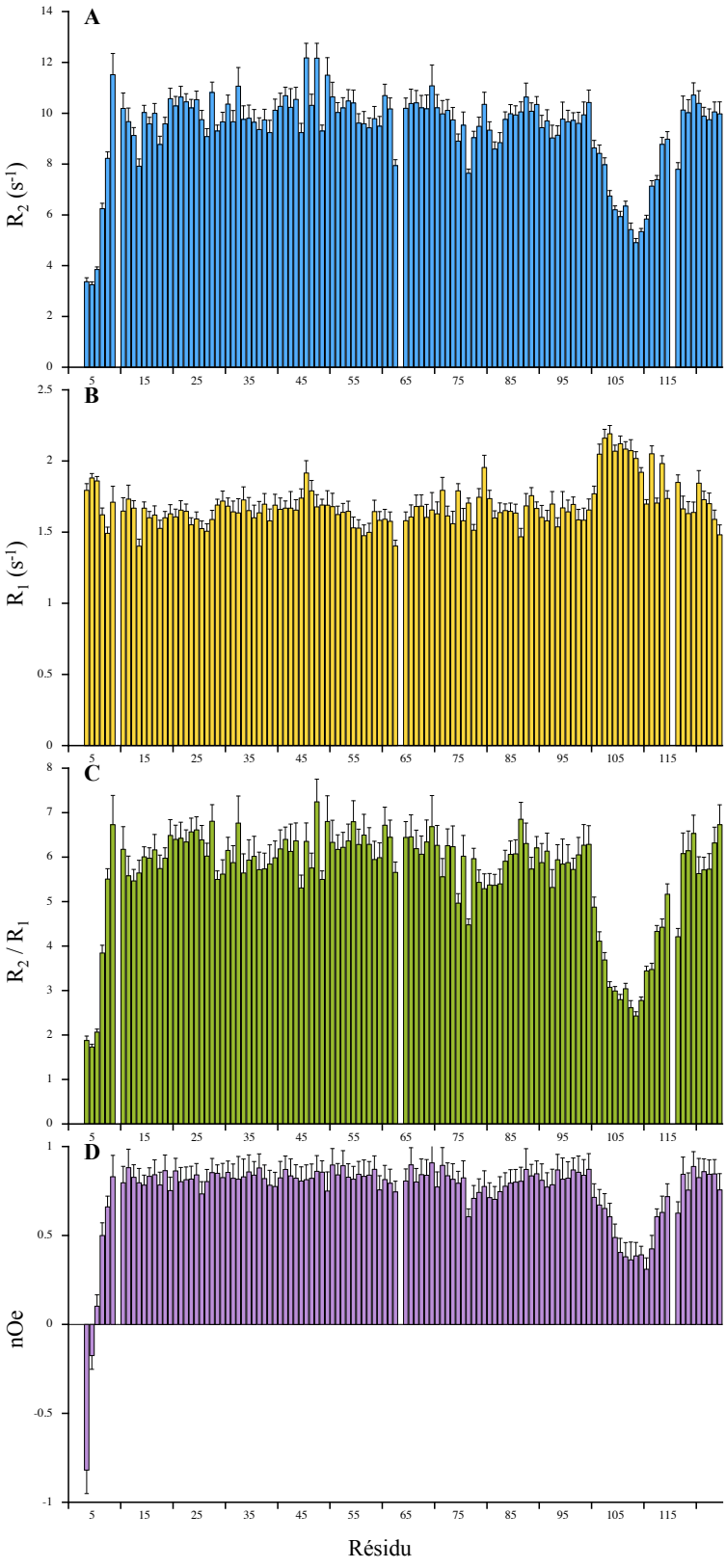


Figure 34 : Dynamique interne de l'hydrophobine RodB

Expériences réalisées sur un spectromètre avec une fréquence de résonance ^{1}H de 600 MHz à 25°C. (**A**) Vitesse de relaxation R_2. (**B**) Vitesse de relaxation R_1. (**C**) Rapport des vitesses de relaxation R_2/R_1. (**D**) Effet nOe hétéronucléaire ^{1}H-^{15}N.

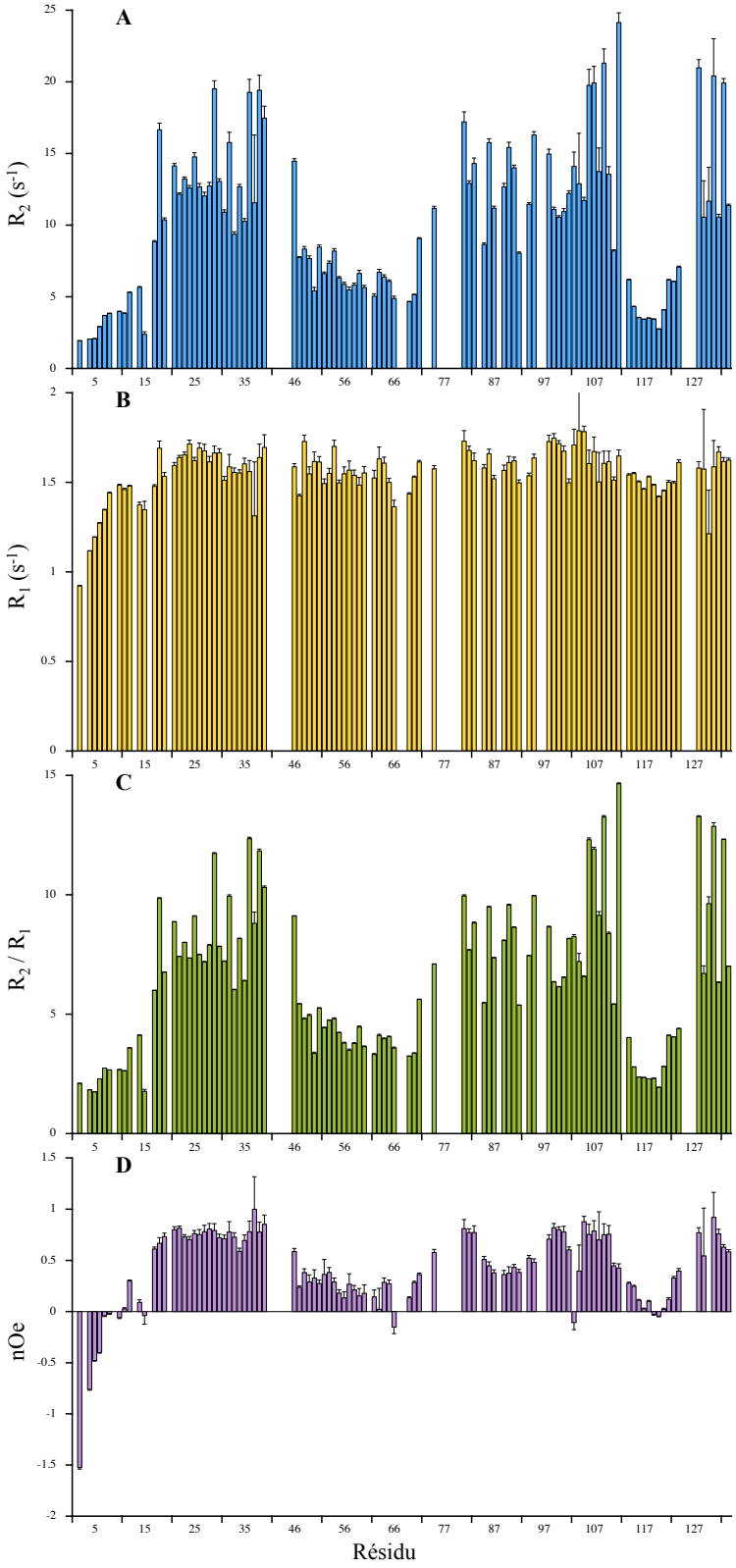


Figure 35 : Dynamique interne de l'hydrophobine RodC

Expériences réalisées sur un spectromètre avec une fréquence de résonance ^{1}H de 600 MHz à 35°C. (**A**) Vitesse de relaxation R_2. (**B**) Vitesse de relaxation R_1. (**C**) Rapport des vitesses de relaxation R_2/R_1. (**D**) Effet nOe hétéronucléaire ^{1}H-^{15}N.

Comparaison avec les autres hydrophobines

La dynamique interne d'une protéine peut également être estimée par l'analyse quantitative des déplacements chimiques grâce à la méthode RCI (« Random Coil Index »)[176]. Cette méthode empirique exploite la corrélation entre les déplacements chimiques secondaires et la dynamique interne de la protéine. Le déplacement chimique secondaire correspond au déplacement chimique d'un atome donné, d'un résidu donné par rapport au déplacement chimique de ce même atome dans une protéine non structurée. A partir des déplacements chimiques secondaires des atomes de la chaîne principale, le logiciel RCI calcule le « Random Coil Index » ou RCI qui reflète l'état de structuration de la molécule. Les valeurs de RCI sont d'autant plus élevées que la flexibilité est grande.

Pour les trois hydrophobines d'*A. fumigatus* étudiées, des valeurs de RCI élevées sont observées pour les résidus situés au niveau de l'extrémité N-terminale et de la boucle C7-C8. Dans le cas de RodA et de RodC, il en est de même pour les résidus situés au niveau des boucles C3-C4 et C4-C5 (Figure 36). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus à partir des vitesses de relaxation et de l'effet nOe hétéronucléaire ^{1}H-^{15}N.

Les RCIs d'autres hydrophobines de classe I ont été calculés à partir des déplacements chimiques déposés à la BMRB (Biological Magnetic Resonance Bank) et comparés à ceux des hydrophobines d'*A. fumigatus* (Figure 36). La grande variabilité de séquence au sein de cette famille se traduit également par une grande variabilité de dynamique. Cependant, certains points communs sont à noter, en particulier la présence d'une région flexible au niveau de la boucle C7-C8 chez toutes les hydrophobines, à l'exception de DewA chez qui la boucle C7-C8 est très courte. Chez les hydrophobines possédant une extrémité N-terminale longue, celle-ci est fortement dynamique, voire non structurée. Les régions centrées sur les cystéines sont quant à elle rigides chez toutes les hydrophobines. Cette rigidité est en accord avec les structures secondaires calculées.

En ce qui concerne les autres régions, les boucles C3-C4 et C4-C5, la grande variabilité observée pour les structures secondaires est également observée pour la dynamique. De plus, l'hydrophobine DewA qui possède une longue extrémité C-terminale par rapport aux autres hydrophobines présente une forte dynamique dans cette région.

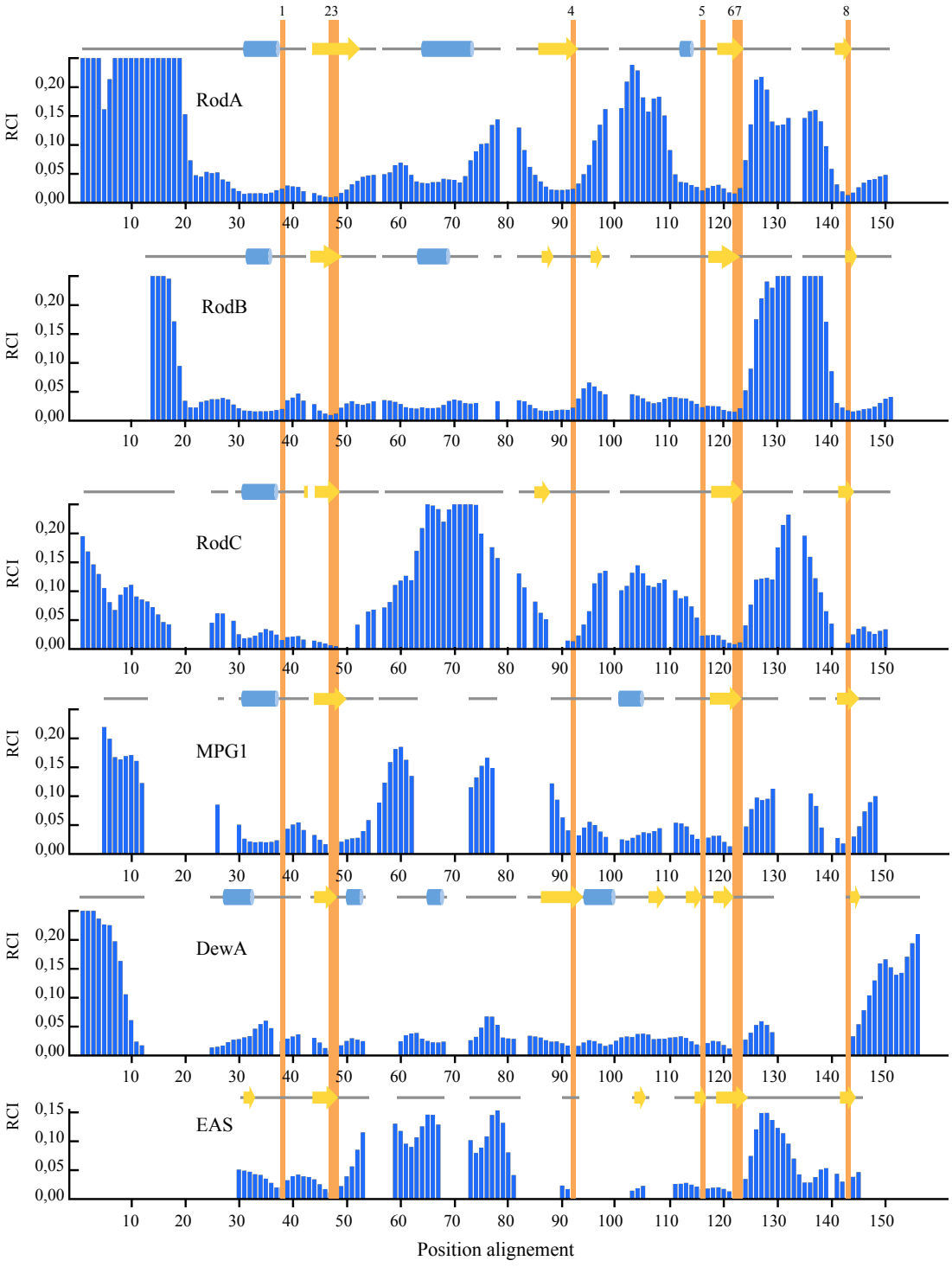


Figure 36 : « Random coil index » d'hydrophobines de classe I

Valeurs des RCI des hydrophobines de classe I RodA (*A. fumigatus*), RodB (*A. fumigatus*), RodC (*A. fumigatus*), MPG1 (*M. grisea*), EAS (*N. crassa*) et DewA (*A. nidulans*) en fonction de l'alignement montré en Figure 32. Une valeur de RCI élevée indique une forte flexibilité. Pour des raisons de visualisation, les RCIs des régions N-terminales de RodA, RodB et DewA et ceux de la boucle C7-C8 de RodB sont tronquées. La position des cystéines est indiquée en orange.

IV. Structure tridimensionnelle

Détermination de la structure de RodA

Contraintes d'angles dièdres

Afin de déterminer la structure tridimensionnelle de la protéine RodA, les contraintes d'angles dièdres et de distances ont été déterminées. Le squelette peptidique d'une protéine est caractérisé par trois angles dièdres, φ, ψ et ω (Figure 37). L'angle de torsion φ correspond à l'angle formé par CO_i-$C\alpha_i$ – N_i-CO_{i-1}. L'angle de torsion ψ est défini par l'angle N_i-CO_{i-1} - $C\alpha_i$-N_{i-1}. L'angle de torsion ω, quant à lui, traduit la configuration, généralement *trans*, de la liaison peptidique et dans la grande majorité des cas ω = 180°.

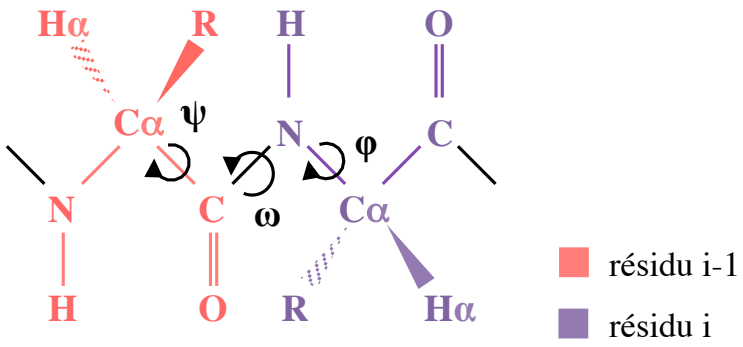


Figure 37 : Angles dièdres du squelette peptidique

Le groupement R représente la chaîne latérale des résidus. La liaison peptidique possède généralement une configuration *trans* soit ω = 180°.

Les valeurs des angles φ et ψ déterminent l'orientation des liaisons du squelette peptidique et elles sont caractéristiques des éléments de structure secondaire des protéines (Tableau 6).

Structure secondaire	φ min	φ max	ψ min	ψ max
Feuillet β	-140	-100	90	130
Hélice α	-80	-40	-70	-30

Tableau 6 : Angles de torsion et structures secondaires

Angles φ et ψ dans les structures secondaires déterminés par Ramachandran *et al.*[177]

Les contraintes d'angles dièdres peuvent être extraites par différentes méthodes. La première méthode est une méthode empirique basée sur l'équation de Karplus qui corrèle la constante de couplage scalaire ^3J à la valeur de l'angle de torsion θ[178,179] :

$$^3J(\theta) = A\cos^2\theta + B\cos\theta + C$$

Dans cette relation empirique, A, B et C sont des coefficients semi-empiriques qui dépendent des atomes impliqués ainsi que de l'angle de torsion θ considéré.

L'expérience RMN HNHA permet de déterminer les constantes de couplage scalaire $^3J_{HN\text{-}H\alpha}$ et d'accéder à la valeur de l'angle dièdre φ comme décrit dans la littérature.[166]

Les valeurs des angles dièdres φ et ψ du squelette peptidique ont également été déterminées à partir des déplacements chimiques, des HN, Hα, Cα, Cβ, CO et N, en utilisant le logiciel TALOS+.[180,181] Comme il a été dit précédemment, les déplacements chimiques sont fortement dépendants de la structure secondaire qui est directement reliée aux angles dièdres. A partir d'une base de données structurale de plus de 200 protéines, le logiciel prédit les angles de torsion d'un résidu en prenant en compte les déplacements chimiques du résidu et ceux de ses deux voisins.

Contraintes de distances

L'effet Overhauser nucléaire (nOe) représente la principale source d'information pour la détermination de structures en RMN. Les signaux nOe témoignent des couplages dipolaires entre protons à travers l'espace. L'intensité du pic de corrélation de deux protons est reliée à la distance, d, séparant ces deux protons. Le signal de corrélation décroit en $1/d^6$, ce qui permet de mesurer des distances maximales d'environ 5 Å. Ainsi, les contraintes de distance obtenues sont des contraintes locales et il est nécessaire d'acquérir un grand nombre d'informations afin de déterminer la structure d'une protéine. Pour obtenir les contraintes de distances pour la protéine RodA, les expériences NOESY HSQC ^1H-^{15}N et ^1H-^{13}C aromatique et aliphatique ont été enregistrées.

Attribution des signaux nOe et détermination de la structure de RodA

L'attribution des signaux nOe et la détermination de la structure de l'hydrophobine RodA ont été réalisées à l'aide du logiciel ARIA[172] couplé à CNS[173]. Le logiciel ARIA

(« Ambiguous Restraints Iterative Assignment ») utilise une méthode itérative basée sur la notion de nOe ambigu. Dans un premier temps, à la première itération, un ensemble de structures aléatoires est généré. Le logiciel ARIA attribue chaque pic nOe en incluant toutes les possibilités en accord avec les déplacements chimiques. Les volumes (ou intensités) sont convertis en distances en suivant l'approximation de paires de spins isolés ($d \alpha 1/r^6$). Les attributions ambiguës sont traduites en contraintes de distances ambiguës, dans lesquelles chaque attribution contribue à la distance cible. La calibration, qui permet le passage des volumes aux distances, est réalisée à partir de la somme des distances observées ($\Sigma 1/d^6$) dans les structures de plus basse énergie et la somme des volumes correspondants. La contribution de chaque attribution à un nOe est aussi calculée à partir des structures de plus basse énergie et les attributions qui contribuent faiblement sont filtrées. Etant donné que la plupart des attributions sont inconsistantes, elles ne peuvent être en accord avec une même structure. Ainsi, via un protocole itératif, les fausses attributions et les pics de bruit sont identifiés et filtrés. A chaque itération le logiciel construit un ensemble de contraintes, calcule des structures et sélectionne les structures de plus basse énergie pour calculer les contraintes de l'itération suivante. La tolérence de violation d'une distance pour un nOe diminue à chaque itération, de 1000 Å à l'itération initiale, permettant d'inclure toutes les attributions possibles, à 0,1 Å pour la dernière itération.

L'ensemble de structures de RodA (Figure 38 A) a été calculé à partir des contraintes de distance et d'angle dièdre. Les statistiques des 15 structures de plus basse énergie sont présentées dans le Tableau 7. La structure déterminée est en accord avec les structures secondaires calculées avec le logiciel PECAN et les données de dynamique (R_1, R_2, nOe hétéronucléaire). En effet, la protéine présente une topologie en tonneau β stabilisé par les quatre ponts disulfures. Le tonneau β est connecté par des boucles et l'une d'elle, la boucle C3-C4, contient une hélice α. La deuxième hélice α est retrouvée en amont de la première cystéine. Le tonneau β est très contraint par les ponts disulfures ce qui est en accord avec les valeurs de R_1, R_2 et nOe hétéronucléaire qui indiquent une rigité au niveau des brins β. Les deux autres boucles qui relient le tonneau β, les boucles C4-C5 et C7-C8, sont peu convergentes, en accord avec la forte flexibilité mise en évidence par les paramètres de relaxation du noyau ^{15}N. De plus, l'ensemble des structures met en évidence le caractère désordonné de l'extrémité N-terminale (résidus 1-21) (Figure 39). Par la suite, pour une meilleur visualisation, la protéine sera représentée sans l'extrémité N-terminale (Figure 38 B).

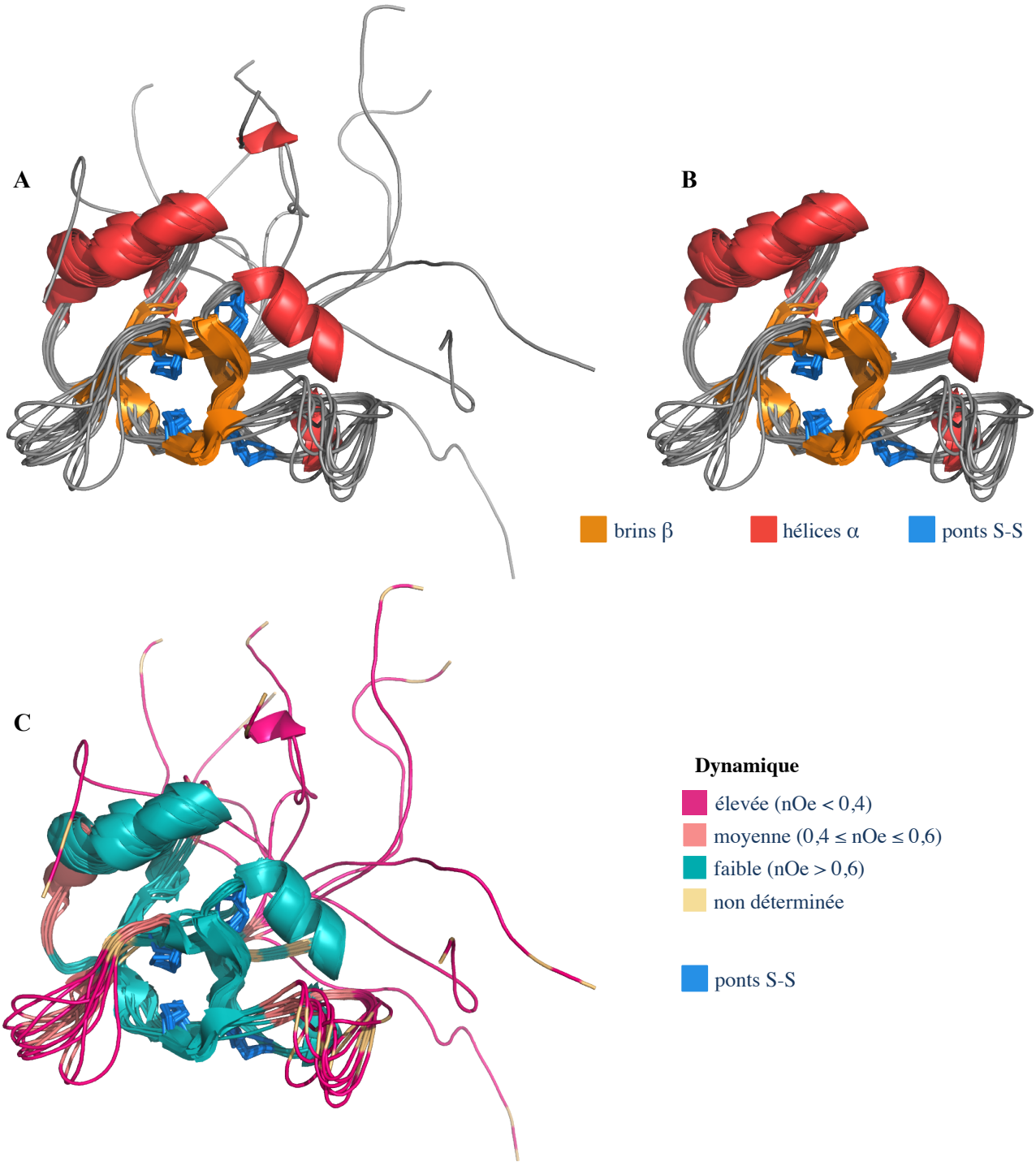


Figure 38 : Ensemble de structures de l'hydrophobine RodA et dynamique interne

Ensemble de structures de l'hydrophobine RodA déterminées à l'aide du logiciel ARIA couplé à CNS. (**A**) Structures de RodA avec l'extrémité N-terminale. (**B**) Structures de RodA sans l'extrémité N-terminale (résidus 22-142). (**C**) Dynamique interne de l'hydrophobine RodA sur l'échelle des ns-ps, ici l'effet nOe hétéronucléaire ^{1}H-^{15}N. Les résidus non renseignés correspondent au premier résidu en N-terminal et aux résidus de proline.

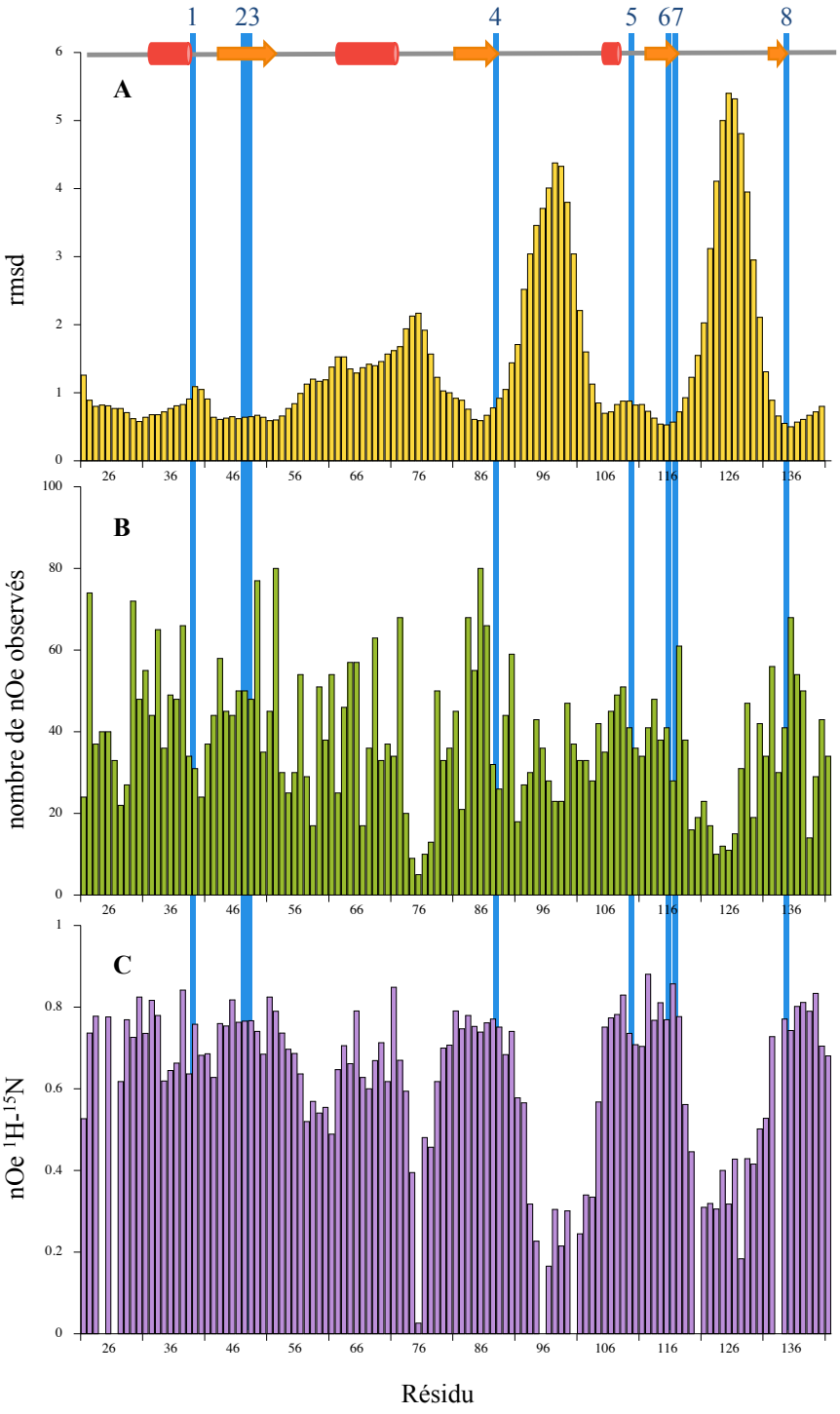


Figure 39 : Rmsd calculés par résidu, nombre de nOe observés par résidu et effet nOe ^{1}H-^{15}N

(**A**) Rmsd calculé par résidu pour 15 structures (résidus 22-142). (**B**) Nombre de nOes observés par résidu (résidus 22-142). (**C**) Effet nOe hétéronucléaire ^{1}H-^{15}N (résidus 22-142). La position des cystéines est indiquée en bleu. En ce qui concerne la structure secondaire de RodA, les hélices α et les feuillets β sont représentés respectivement par des cylindres rouges et des flèches oranges.

Paramètre	Valeur*	
Contrainte par monomère	(1-142)	(22-142)
Nombre de contraintes de distance non ambiguës	2006	1927
Nombre de contraintes de distance ambiguës	673	613
Nombre total de contraintes de distance	2679	2540
Intra-résiduelles |j-1| = 0	994	912
Séquentielles |j-1| = 1	719	664
Moyenne distance 2 ≤ |j-1| ≤ 4	416	414
Longue distance 4 < |j-1|	550	550
Nombre de contraintes d'angles dièdres φ et ψ	154	154
Nombre de liaisons hydrogène	0	0
Violations des contraintes de distance résiduelles		
Nombre > 0,3 Å	1 ± 1	2 ± 0,7
Nombre > 0,1 Å	36 ± 5	29 ± 2
RMSD des nOes (Å)	0,02 ± 0,002	0,03 ± 0,01
Violations des contraintes d'angle dièdre résiduelles		
Nombre ≥ 5°	1,6 ± 1,0	2,1 ± 1,2
RMSD des angles dièdres (°)	1,2 ± 0,1	1,2 ± 0,1
Energie (kcal/mol)		
Totale	-4122 ± 53	-3419 ± 24
Van der Waals	-313 ± 18	-293 ± 13
Electrostatique	-4862 ± 74	-4037 ± 28
RMSD moyen par paires	(22-142)	(22-72,80-92, 105-118, 132-142)+
Atomes du squelette N, Cα et CO	1,9 ± 0,4	0,9 ± 0,2
Atomes lourds	2,3 ± 0,4	1,5 ± 0,2
Diagramme de Ramachandran		
Résidus dans les régions les plus favorables	71,0 %	
permises	26,8 %	
tolérées	1,7 %	
interdites	0,5 %	
Structure Z scores	(1-142)	(22-142)
Compacité de seconde génération	-3,6 ± 0,2	-3,4 ± 0,2
Apparence du diagramme de Ramachandran	-5,2 ± 0,3	-5,2 ± 0,4
Normalité des rotamères χ_1 / χ_2	-4,4 ± 0,4	-4,8 ± 0,8
Conformation du squelette	-14 ± 1,4	-14,7 ± 1,9
Liaisons hydrogène non satisfaites	31	29

Tableau 7 : Statistiques pour l'ensemble des 15 structures calculées de plus basse énergie de RodA

* Les résidus pour lesquels les statistiques sont données sont indiqués entre parenthèses.

+ Le RMSD est donné pour les résidus présentant une faible dynamique.

Modélisation des structures de RodB et RodC

Les protéines RodA, RodB et RodC sont des homologues proches. Les hydrophobines RodB et RodC présentent respectivement une identité de séquence par rapport à RodA de 45 % et 61 % sur 110 résidus. Par ailleurs, en excluant les régions N-terminales non structurées des protéines, leurs structures secondaires sont similaires. Dans l'attente de la détermination de la structure tridimensionnelle de RodB et de RodC, des modèles par homologie de leurs structures, basés sur la structure de RodA, ont été déterminés. Les modèles, ont été calculés à l'aide du logiciel MODELLER[182,183] (Figure 40). Leurs analyses, réalisées avec le logiciel PROCHECK[184], indique une bonne géométrie avec uniquement 1,1 % pour RodB et 1,2 % pour RodC des résidus dans les régions interdites du schéma de Ramachandran.

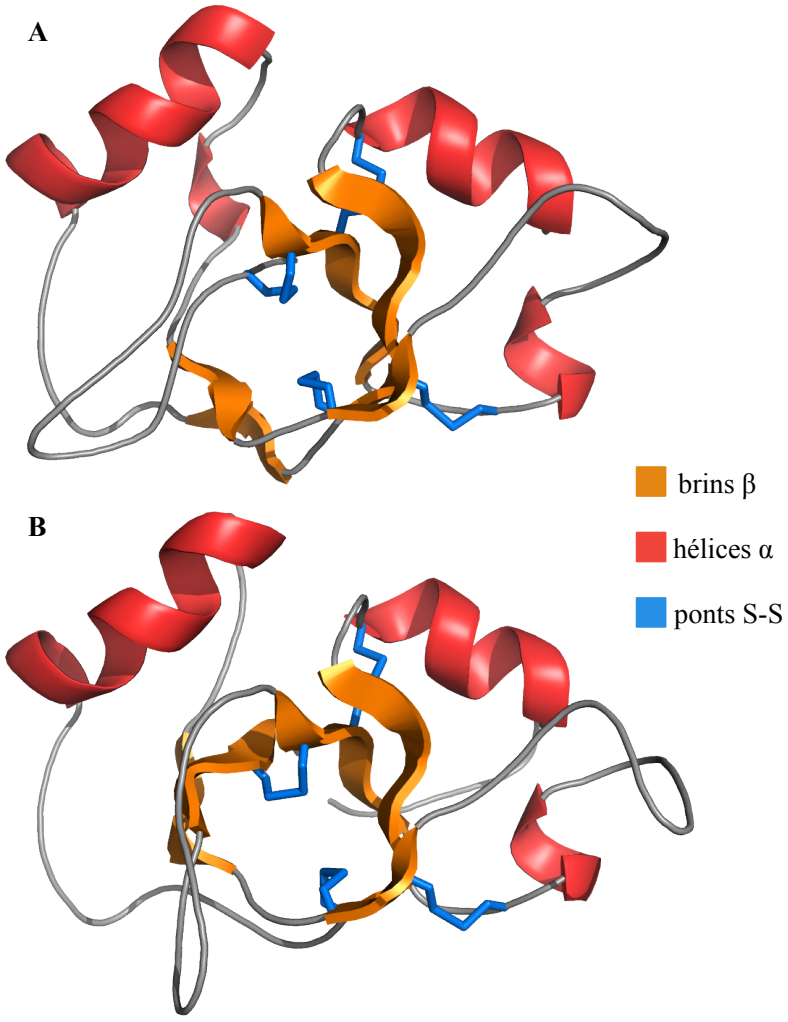


Figure 40 : Modélisation des structures de RodB et RodC

Modèles par homologie de (**A**) RodB entre les résidus (17-124) et (**B**) RodC entre les résidus (14-134) obtenus avec le logiciel MODELLER[183].

Dans le cas de RodB, le modèle obtenu à l'aide du logiciel MODELLER est en accord avec les structures secondaires déterminées à l'aide du logiciel PECAN bien que les limites des différents éléments ne soient pas exactement identiques. En effet, les brins β identifiés par PECAN constituent le tonneau β et les deux hélices α, celle dans la région N-terminale, en amont de la première cystéine, et celle dans la boucle C3-C4 sont retrouvées dans le modèle.

En ce qui concerne RodC, exceptée l'hélice α de la boucle C3-C4 (résidus 54-65) présente dans la structure de RodA et dans le modèle, les structures secondaires déterminées à partir des données RMN et dans le modèle sont très semblables. De plus, des interactions nOe, attendues d'après le modèle entre atomes situés au niveau des feuillets β et de l'hélice α N-terminale, ainsi que plusieurs interactions entre atomes localisés loin dans la séquence et prédites par le modèle, ont été observées et attribuées de façon non ambiguë dans le spectre NOESY-HSQC ^{1}H-^{15}N. Ceci indique que le modèle est globalement en accord avec la structure de RodC. Néanmoins, au niveau de la boucle C3-C4 le modèle semble erroné. En effet, le modèle est basé sur la structure de RodA qui présente une hélice α dans la boucle C3-C4 alors que dans RodC cette boucle est très flexible et ne contient pas d'élément de structure secondaire régulière (résultats Régine Dazzoni).

Comparaison avec les autres hydrophobines

Aujourd'hui, peu de structures d'hydrophobines ont été déterminées. Il s'agit des hydrophobines de classe I EAS de *N. crassa* et DewA de *A. nidulans* et des hydrophobines de classe II HFBI et HFBII de *T. reseii* et NC2 de *N. crassa* (Figure 41).

La comparaison des structures de ces hydrophobines et celle de l'hydrophobine RodA met en évidence la conservation de la topologie en tonneau β stabilisé par les quatre ponts disulfures, ou pseudo-tonneau β dans le cas de DewA et NC2, pour les hydrophobines de classe I et de classe II. Cependant, la grande diversité de séquence et de longueur observée dans les régions inter-cystéines se traduit par une grande diversité de structure, en particulier pour les hydrophobines de classe I. En effet, les hydrophobines de classe II présentent une plus faible variabilité de séquence et de longueur et leurs structures sont similaires.

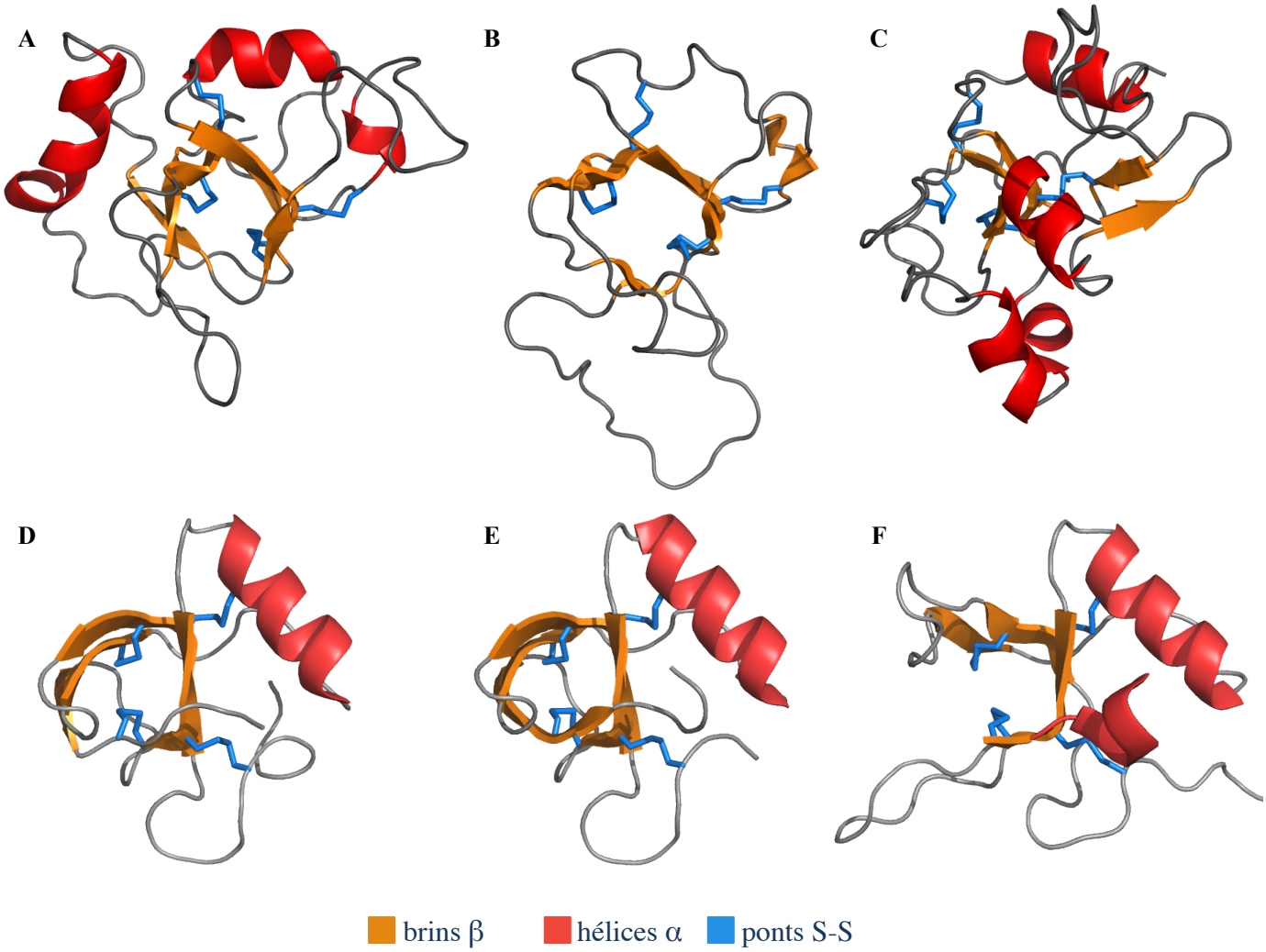


Figure 41 : Structures connues d'hydrophobines

Structures des hydrophobines de classe I (**A**) RodA de *A. fumigatus* (**B**) EAS de *N. crassa* (code PDB : 2FMC) (**C**) DewA de *A. nidulans* (2LSH) et de classe II (**D**) HFBI de *T. reseii* (2FZ6) (**E**) HFBII de *T. reseii* (1R2M) (**F**) NC2 de *N. crassa* (4AOG). Les structures sont alignées par rapport aux ponts disulfures.

V. Etude des bâtonnets

Etude in vitro

Etude de la formation des fibres amyloïdes par fluorescence

Le cœur des fibres amyloïdes adopte une conformation β croisée qui consiste en des feuillets β formés par des courtes séquences peptidiques, dites amyloïdogènes, qui s'auto-associent entre elles. La formation des fibres amyloïdes est un phénomène de nucléation. La première étape consiste en une phase de latence durant laquelle ont lieu les changements de conformation et les associations moléculaires nécessaires à l'exposition des séquences amyloïdogènes. La formation de la structure β croisée a lieu au cours de la deuxième étape qui est une phase exponentielle avant d'atteindre un plateau à l'équilibre. Dans le cas des hydrophobines, les changements de conformation pendant l'étape de nucléation s'initient à l'interface air/eau et la tension superficielle est une force motrice pour que la fibrillation ait lieu.[185] La cinétique de formation des fibres amyloïdes peut être suivie par fluorescence en présence d'un marqueur des fibres amyloïdes, par exemple la thioflavine T (Figure 42). Les cinétiques de formation des fibres sont effectuées avec agitation afin d'augmenter la surface d'interface air/eau.

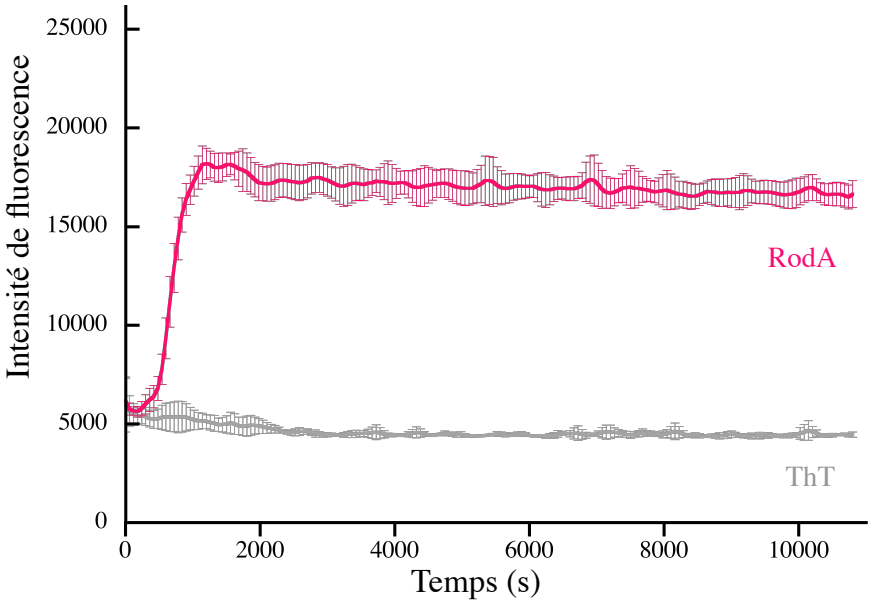


Figure 42 : Suivi de la cinétique de formation des fibres amyloïdes de RodA par fluorescence

La cinétique de formation des fibres est suivie en présence de ThT dans un tampon acétate de sodium 20 mM à pH 5. La formation de fibre est déclenchée par agitation orbitale (12 Hz) à 35°C. Après une phase de latence (entre 0 et 500 s), une augmentation du signal de fluorescence est observée dans une phase exponentielle correspondant à la fibrillation (entre 500 s et 1200 s). En rose, signal de fluorescence de RodA en présence de ThT. En gris, contrôle négatif avec la ThT seule. Les courbes et les barres d'erreur correspondent respectivement à la moyenne et à l'écart type de cinq expériences.

In vitro, la fibrillation des protéines est influencée par de nombreux paramètres, en particulier la concentration en protéine, la température, le pH, le type et la vitesse d'agitation. Afin d'optimiser les conditions de formation des bâtonnets de RodA, ces différents paramètres ont été ajustés. La cinétique de formation des fibres amyloïdes est suivie à des concentrations en protéine de 25 $\mu g.ml^{-1}$, 50 $\mu g.ml^{-1}$ et 100 $\mu g.ml^{-1}$. Les tampons testés sont acétate de sodium 20 mM pH 5 et glycine 20 mM pH 3 à des températures de 30°C, 35°C, 40°C et 45°C. Des expériences préliminaires avaient permis d'établir que la fibrillation est plus efficace à pH 5 qu'à pH 7 et pH 8. L'agitation est de type double orbital.

L'augmentation de la température accélère la formation des fibres avec une phase de latence plus courte. Il est important de trouver une température pour laquelle une phase de latence bien définie soit observée sans que celle-ci soit trop longue. A partir des essais réalisés, il apparaît que dans le cas de RodA la température optimum est 35°C. En ce qui concerne le

pH, le tampon acétate pH 5 est le plus approprié. En effet, avec le tampon glycine pH 3, le temps de latence est beaucoup plus long, à 40°C et à une concentration en protéine de 25 µg.ml^{-1} il est de 6000 s contre 100 s à pH 5. De plus, la phase de croissance des fibres est également ralentie et l'amplitude de l'incrément de fluorescence de la ThT est plus faible, ce qui pourrait indiquer une fibrillation moins importante.

Contrairement à ce qui est classiquement observé, la phase de latence est d'autant plus longue que la concentration en protéine est élevée (Figure 43). Ainsi, à 35°C et à pH 5, la phase latence est de ~1800 s à 100 µg.ml^{-1}, de ~700 s à 50 µg.ml^{-1} et de ~500 s à 25 µg.ml^{-1}. La phase exponentielle, quant à elle, n'est pas influencée par la concentration en protéine. Il faut signaler que pour des associations moléculaires pour lesquelles la phase limitante de la cinétique est une interaction intemoléculaire, la durée de latence devrait être plus courte à forte concentration. Cependant, dans le cas de RodA, une inhibition par la protéine elle-même est observée. L'origine et le mécanisme de cette inhibition restent à l'heure actuelle méconnus. Aux concentrations utilisées, la forme initiale de RodA avant agitation est monomérique, ce qui écarte la possibilité qu'une forme oligomérique initialement en solution et non compétente pour la fibrillation soit à l'origine de ce phénomène. D'autre part, la tension superficielle des solutions de RodA est trop forte pour empêcher sa fibrillation (M. Sunde - communication personnelle).[185] Enfin, la formation d'oligomères en dehors du chemin de formation des fibres ne peut pas non plus expliquer ce phénomène. Une analyse cinétique plus poussée à différentes concentrations et températures et avec d'autres sondes comme la diffusion dynamique de la lumière devra être effectuée pour élucider le mécanisme d'auto-inhibition observé pour RodA.

Par la suite, les études de cinétique de formation des fibres amyloïdes de la protéine sauvage et des mutants sont réalisées dans un tampon acétate de sodium 20 mM à pH 5, à 35°C et à des concentrations de 25 µg.ml^{-1} et 50 µg.ml^{-1}.

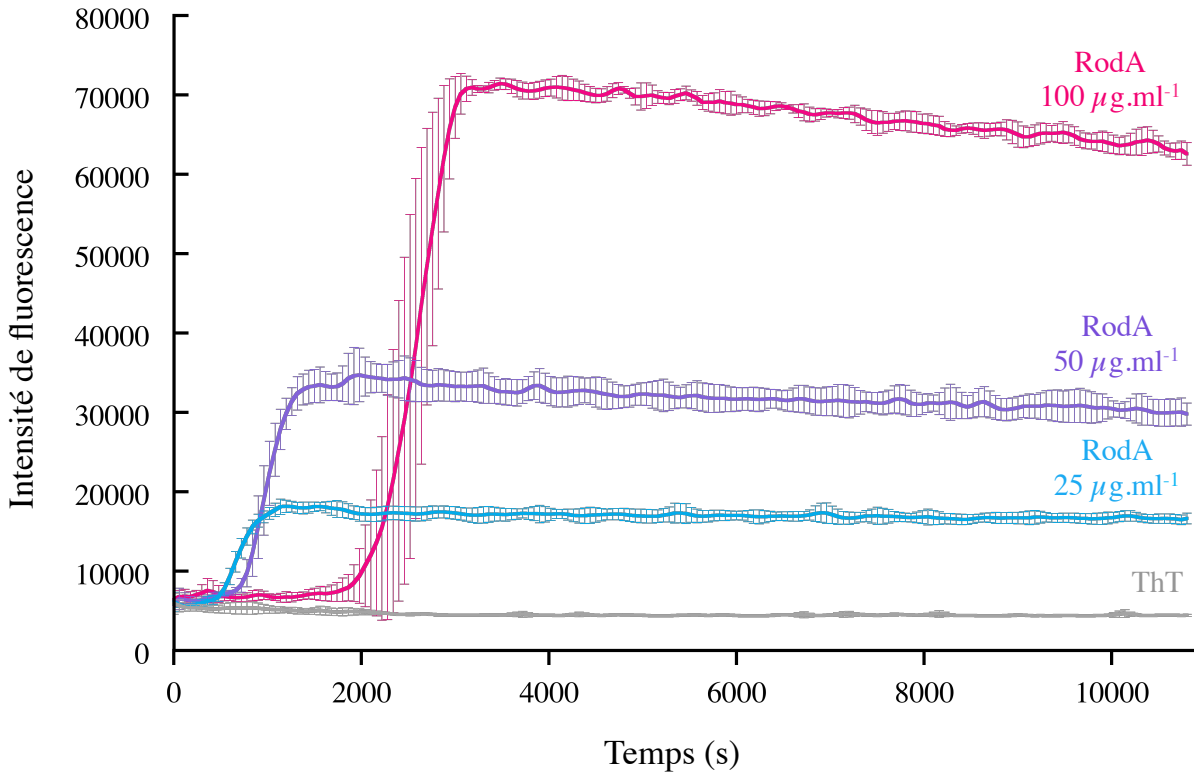


Figure 43 : Influence de la concentration en protéine sur la cinétique de formation des fibres amyloïdes

Cinétique de formation des fibres amyloïdes de RodA suivie en présence de ThT à 35°C dans un tampon acétate de sodium 20 mM à pH 5 à des concentrations en protéine de 25 µg.ml^{-1} (en bleu), 50 µg.ml^{-1} (en violet) et 100 µg.ml^{-1} (en rose). En gris, contrôle négatif avec la ThT seule. Les courbes et les barres d'erreur correspondent respectivement à la moyenne et à l'écart type de cinq expériences.

Identification des séquences amyloïdogènes

Les séquences amyloïdogènes peuvent être prédites par différents algorithmes qui prennent en compte des critères tels que la propension à former des feuillets β à l'agrégation, la complémentarité des chaînes latérales et l'hydrophobicité d'une séquence. Chez l'hydrophobine RodA, des séquences faiblement amyloïdogènes prédites par l'algorithme AMYLPRED[186] sont situées dans les boucles C4-C5 et C7-C8 et au niveau d'un des brins β (Figure 44). La formation des fibres amyloïdes nécessite que les régions impliquées dans la structure β croisée soient exposées et adoptent des modifications conformationnelles. Le tonneau β est très contraint par les ponts disulfures et il est donc peu enclin à adopter des changements conformationnelles. Il est plus probable que ces changements aient lieu au niveau des boucles, en particulier dans les boucles C4-C5 et C7-C8 qui présentent une forte flexibilité.

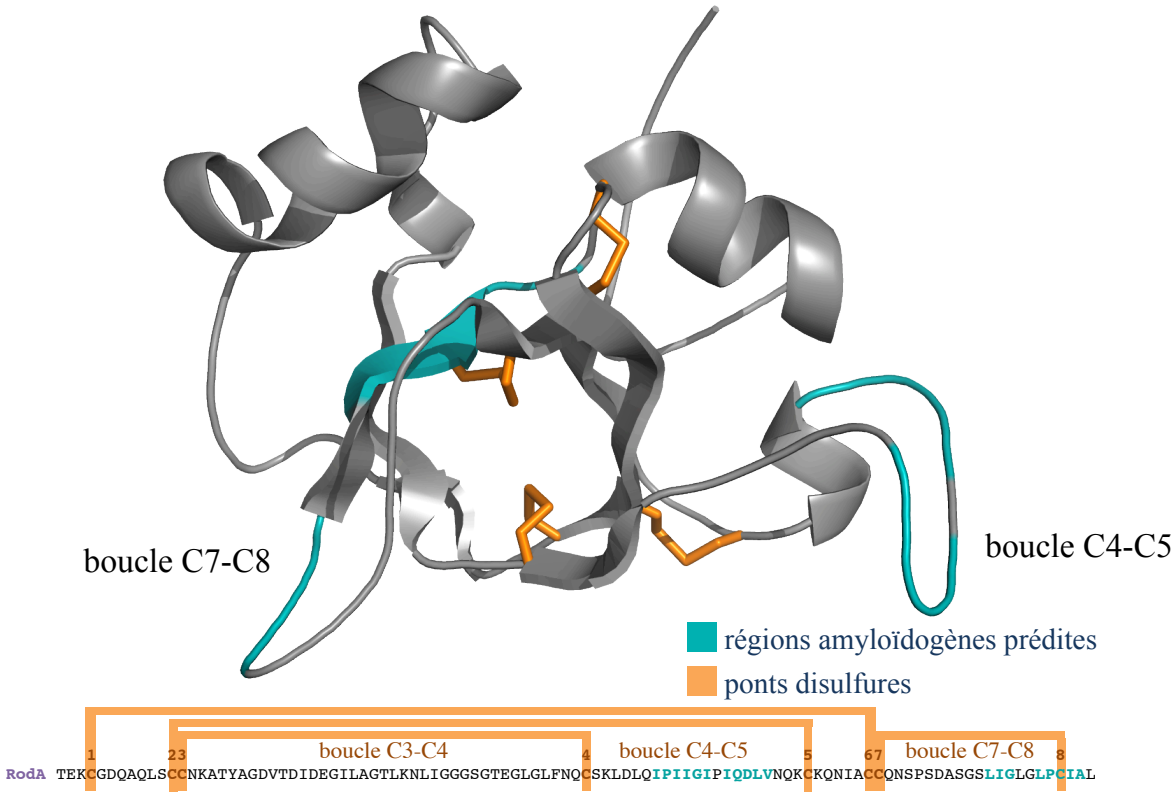


Figure 44 : Régions amyloïdogènes prédites chez RodA

Les régions amyloïdogènes sont prédites à l'aide du logiciel AMYLPRED[186] et sont représentées en bleu sur la structure et la séquence de l'hydrophobine RodA. Les ponts disulfures sont indiqués en orange. L'algorithme AMYLPRED est un consensus de cinq critères différents, la propension à former des agrégats de type β selon l'algorithme TANGO[187], la présence de motifs amyloïdogènes et la compacité.

Afin d'identifier les résidus impliqués dans la structure β croisée des fibres amyloïdes, une étude de mutagénèse a été réalisée. La stratégie consiste à effectuer des mutations ponctuelles en glycine (X → G) sur l'ensemble de la séquence en se concentrant essentiellement dans les régions prédites comme étant amyloïdogènes. Des mutations en glycine sont choisies parce que ces résidus sont peu favorables à former des structures secondaires. De plus, le degré de liberté de sa chaîne principale devrait se traduire par une plus longue recherche de la conformation adéquate pour la formation de la structure β croisée et donc par un ralentissement de la cinétique lorsque l'une de ces mutations est effectuée dans une région impliquée dans la formation de la structure β croisée. Dans ce cas, il en résulte un ralentissement de la cinétique de formation des fibres qui se traduit par un temps de latence plus long. L'impact de ces mutations sur la cinétique de formation des fibres est étudié par fluorescence en présence d'un marqueur des fibres amyloïdes, la ThT (Figure 45).

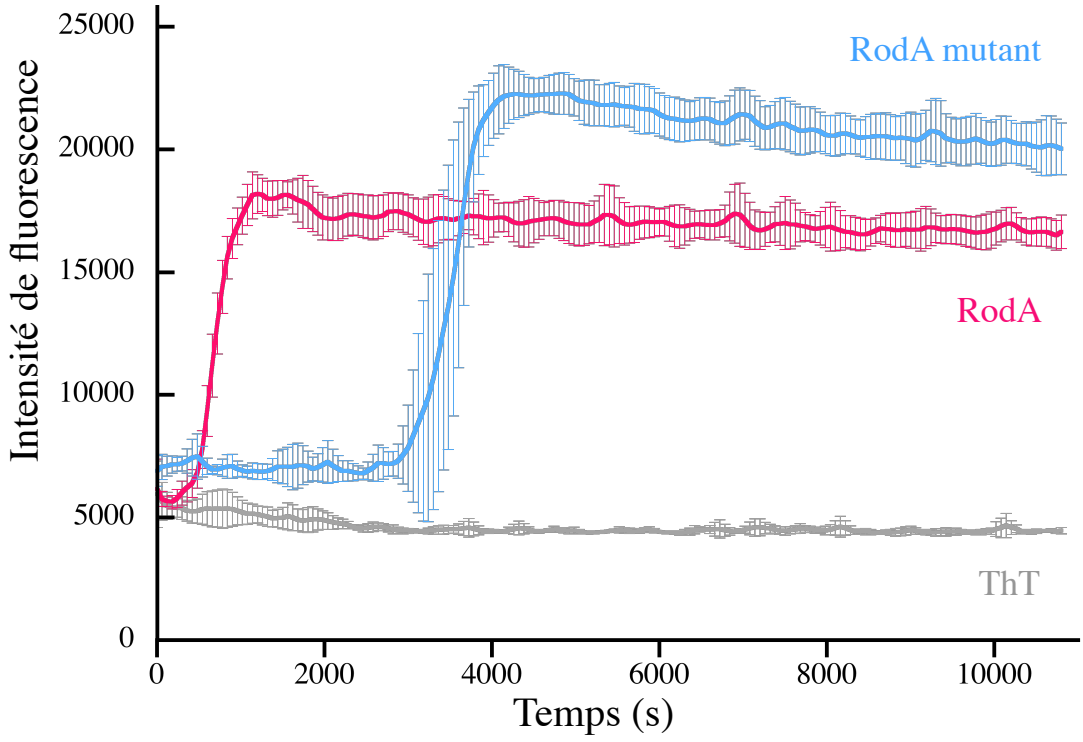


Figure 45 : Impact d'une mutation ponctuelle en glycine sur la cinétique de formation des amyloïdes.

La cinétique de formation des fibres est suivie en présence de ThT. Pour la protéine sauvage (en rose) une phase de latence entre 0 et 500 s est observée. Pour le mutant (en bleu) une phase de latence entre 0 et 2500 s est observée. Les concentrations en protéine sont de 25 $\mu g.ml^{-1}$. Le contrôle négatif est réalisé avec la thioflavine seule (en gris).

Pour l'hydrophobine RodA, 14 mutants ponctuels en glycine ont été étudiés (coll. M. Sunde). Les mutations sont réparties sur l'ensemble de la séquence, à l'exception de l'extrémité N-terminale, avec trois mutations dans la boucle C3-C4, cinq mutations dans la boucle C4-C5 et six mutations dans la boucle C7-C8 (Figure 46). Les mutations ayant les impacts les plus importants sont situées dans les boucles C4-C5 et C7-C8, régions qui sont prédites comme amyloïdogènes. De plus, il est intéressant de noter que ces régions correspondent à des régions flexibles de la protéine.

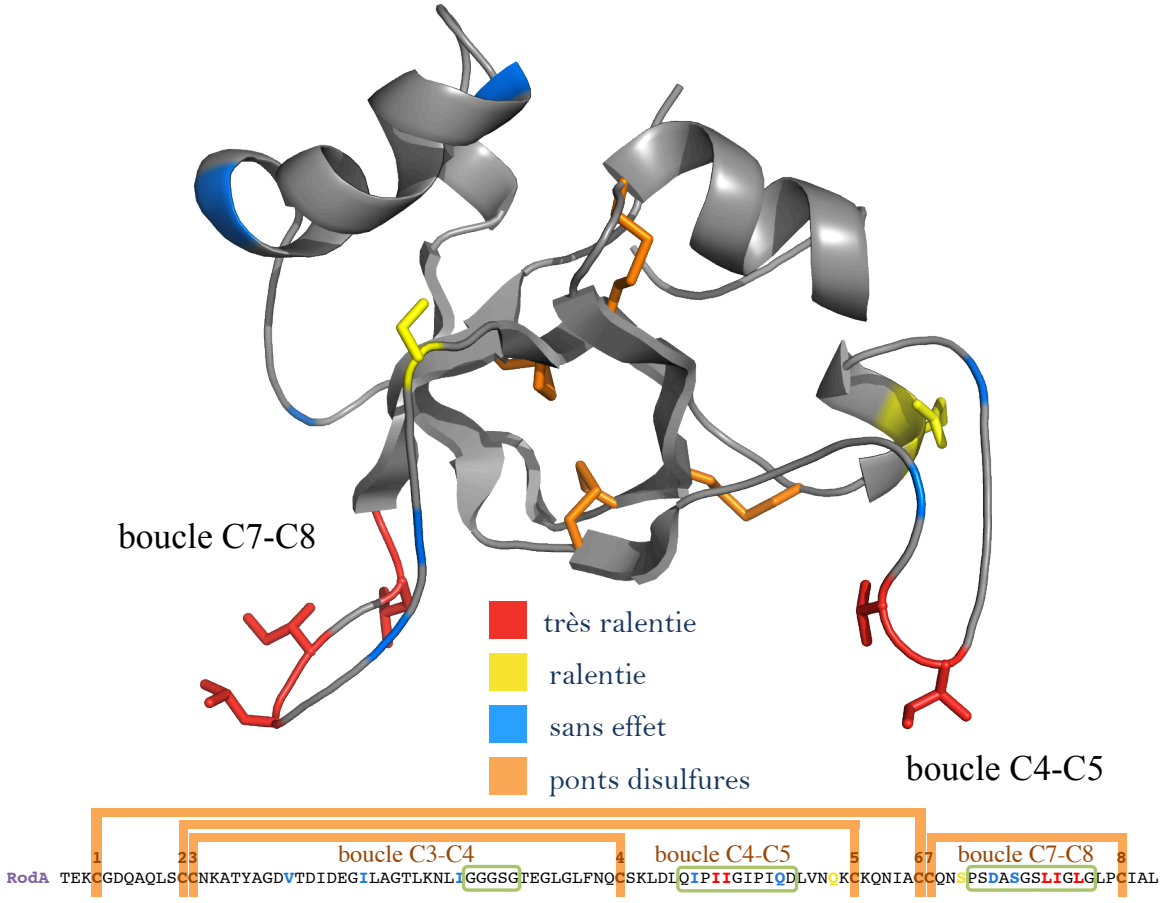


Figure 46 : Mutations en glycine et leurs impacts sur la cinétique de formation des fibres

L'ensemble des mutations ponctuelles en glycine réalisées chez RodA pour identifier les régions impliquées dans la structure β croisée sont représentées sur la structure et sur la séquence. Les mutations ayant un fort impact sur la cinétique de formation des fibres menant à un temps de latence plus long sont représentées en rouge. Les mutations ralentissant peu la formation des fibres sont représentées en jaune et celles n'ayant aucun effet sur la cinétique en bleu. Les ponts disulfures sont indiqués en orange. Les régions dynamiques sont signalées par des encarts verts sur la séquence.

Etude de la morphologie des bâtonnets

La microscopie électronique à transmission permet l'observation d'objets à l'échelle du nanomètre. Cette technique a été utilisée afin de caractériser la morphologie des fibres formées *in vitro*. Les fibres formées par RodA sous agitation orbitale présentent une morphologie très similaire à celle observée *in vivo* à la surface des spores (Figure 47). Sur les clichés de microscopie avec coloration négative, la grille apparaît entièrement recouverte d'une couche uniforme et très organisée de bâtonnets. Les fibres présentent des longueurs d'une centaine de nanomètres et une largeur de 10 nm comme celles observées sur les spores.

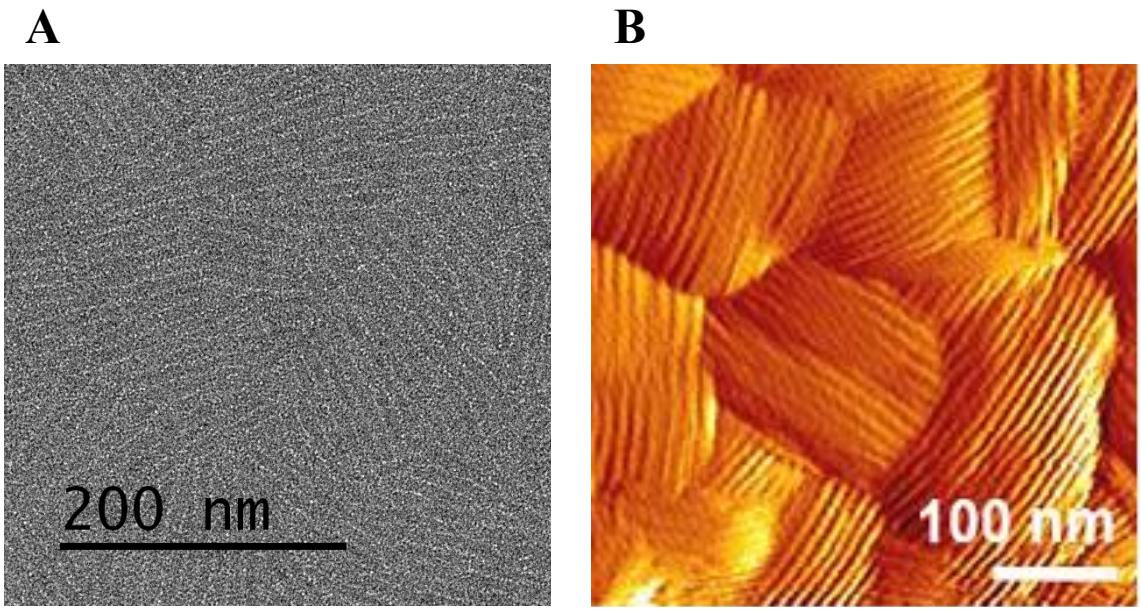


Figure 47 : Comparaison de la couche de bâtonnets *in vitro* et *in vivo*

(**A**) Observation par TEM des fibres amyloïdes de RodA formées *in vitro* par agitation orbitale. (**B**) Observation par AFM de la couche de bâtonnets à la surface des spores (coll. Y. Dufrêne).

Afin de déterminer l'importance de la structure du monomère et également le rôle de l'extrémité N-terminale dans la formation des fibres amyloïdes et leur organisation, la protéine non repliée, obtenue dans la fraction attenante à celle de la protéine repliée en fin de RPC, ainsi qu'un mutant de la protéine, sans les 21 premiers résidus, ont été étudiés. La cinétique de formation des fibres est suivie par fluorescence en présence de ThT comme décrit précédemment (Figure 48). Sur les profils de fluorescence, les cinétiques de RodA et de RodA tronquée sont identiques. Ces résultats indiquent que l'extrémité N-terminale de la

protéine ne participe pas dans la formation de la structure β croisée ni dans la formation d'éventuels intermédiaires des fibres amyloïdes impliqués dans des étapes cinétiquement limitantes.

En ce qui concerne la protéine non repliée, la cinétique est très différente de celles observées jusque-là. En effet, les phases de latence et exponentielle sont plus longues et le signal de fluorescence est beaucoup plus intense que ceux observés pour la protéine native. Ces résultats suggèrent que les fibres formées par la protéine non repliée pourraient différer de celles formées par la protéine native.

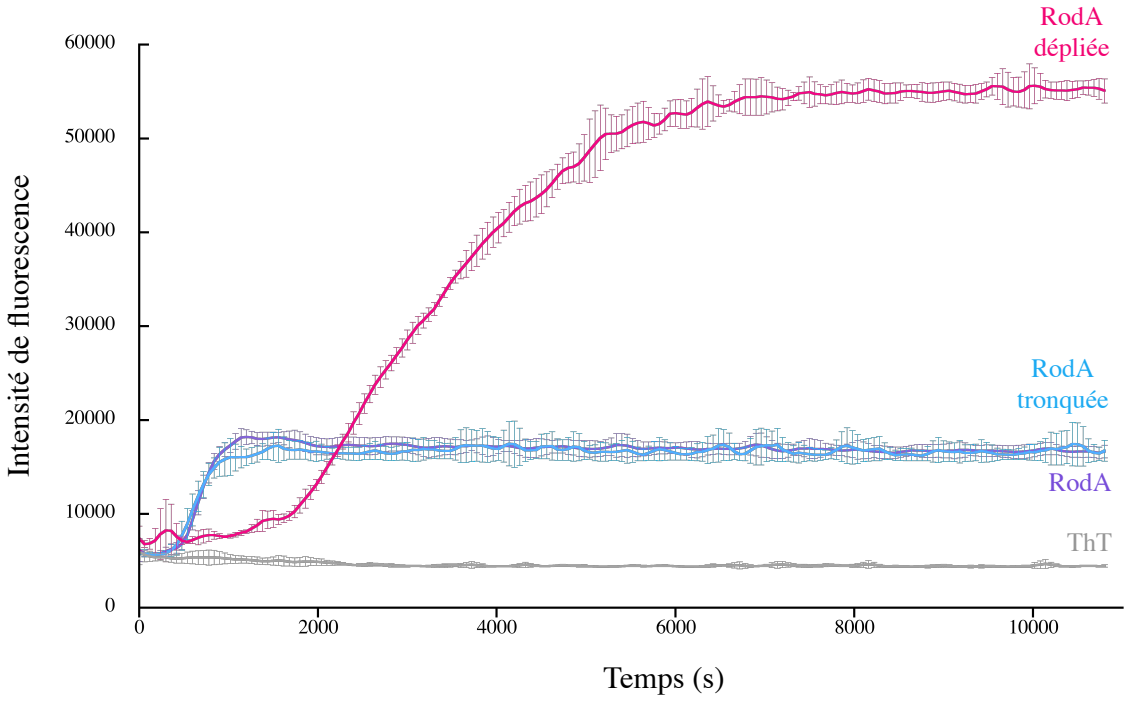


Figure 48 : Cinétique de formation des fibres amyloïdes pour la protéine repliée, tronquée et dépliée

Cinétique de formation des fibres amyloïdes de RodA (en violet), RodA tronquée (en bleu) et RodA non repliée (en rose) suivie en présence de ThT à 35°C dans un tampon acétate de sodium 20 mM pH 5 à des concentrations en protéines de 25 µg.ml^{-1}. Pour la protéine dépliée, les cinétiques sont réalisées en présence de l'agent réducteur TCEP (Tris-2-carboxyéthyl-phosphine) 100 µM. Le contrôle négatif est réalisé avec la ThT seule (en gris). Les courbes et les barres d'erreur correspondent respectivement à la moyenne et à l'écart type de cinq expériences.

Les morphologies des fibres formées par la protéine tronquée et la protéine non repliée ont été caractérisées par TEM (Figure 49).

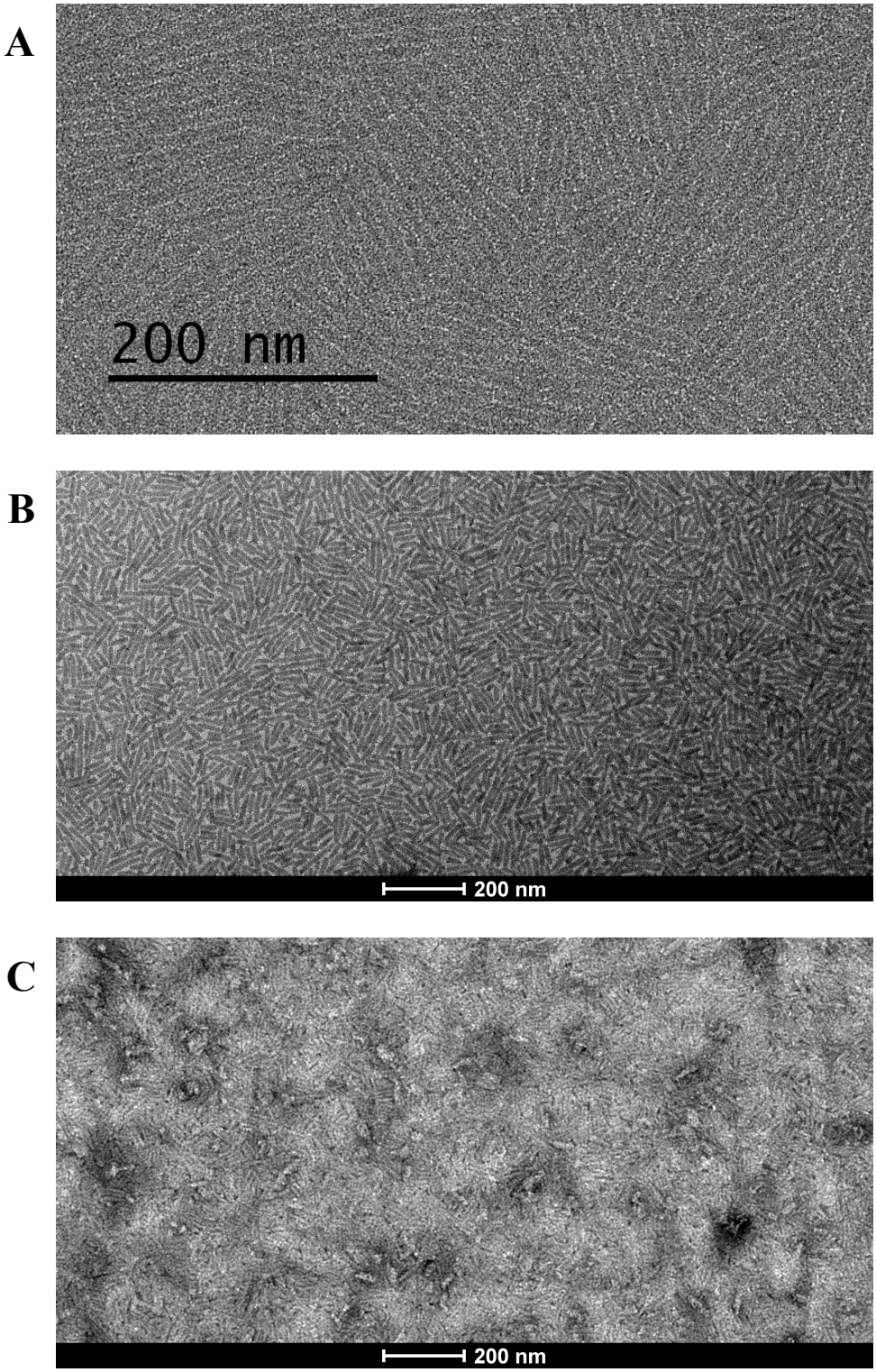


Figure 49 : Comparaison de la morphologie des fibres formées par la protéine repliée, tronquée ou dépliée

Observation par TEM des fibres amyloïdes de (**A**) RodA, (**B**) RodA tronquée et (**C**) RodA non repliée formées *in vitro* par agitation orbitale.

Dans le cas de la protéine RodA tronquée, Les fibres observées présentent la même largeur (10 nm) que les fibres de la protéine sauvage mais ont une morphologie très différente (Figure 49 B). En effet, les fibres obtenues sont généralement plus courtes et ne s'organisent pas sous forme d'une couche homogène et uniforme mais sont isolées les unes des autres.

En ce qui concerne la protéine RodA non repliée, l'échantillon présente une grande hétérogénéité aussi bien pour la répartition sur la grille que pour la morphologie des fibres (Figure 49 C). En effet, les fibres obtenues présentent des longueurs très variables généralement plus courtes que pour la protéine native. De plus, les fibres ne s'organisent pas sous forme d'une couche ordonnée, et par endroits des amas de fibres sont observés. Il est vraisemblable que les séquences amyloïdogènes de RodA soient impliquées dans les structures β croisées des ces fibres hétérogènes.

L'ensemble de ces observations indique que l'extrémité N-terminale et la structure de la forme monomérique sont essentielles à l'obtention de la couche de bâtonnets. Ainsi, l'extrémité N-terminale de RodA, qui est désordonnée chez la protéine native, n'intervient pas dans la formation de la structure β croisée, constituant le cœur des fibres amyloïdes, mais elle est impliquée dans la formation de la couche de bâtonnets où elle pourrait intervenir dans des interactions latérales permettant l'organisation très ordonnée observée pour la protéine entière et *in vivo* à la surface des spores.

Etude in vivo

Afin de valider les résultats obtenus *in vitro*, une étude de mutagénèse a également été menée *in vivo* (coll. équipes J.P. Latgé et Y. Dufrêne). Tout d'abord un simple mutant en glycine (I129G) correspondant à une des mutations ponctuelles ayant un fort impact sur la cinétique de fibrillation *in vitro* a été caractérisé. La couche de bâtonnets présente à la surface des spores a été analysée 3 jours et 10 jours après conidiation. Pour la souche sauvage (Figure 50 A), 3 jours après conidiation, les spores sont entièrement recouvertes de la couche de bâtonnets bien structurés. Pour le mutant RodA I129G (Figure 50 B), 3 jours après conidiation, des bâtonnets mal définis sont observés à la surface de certaines spores uniquement. Après 10 jours, la surface des spores est hétérogène et des régions hydrophiles d'apparence amorphes coexistent avec des régions hydrophobes recouvertes de bâtonnets. Le retard de la formation de la couche de bâtonnets observé *in vivo* est donc en accord avec les résultats obtenus *in vitro*, où le temps de latence est plus long et la formation des fibres ralentie.

L'importance des cystéines a également été testée *in vivo*. Un simple mutant de cystéine (C110S) a été produit et, dans ce cas, la grande majorité des spores observées présentent une surface amorphe. Il est possible d'observer pour certaines conidies des structures organisées (Figure 50 C). Cependant, ces structures sont moins denses que les bâtonnets observés à la surface des spores de la souche sauvage. Un mutant de quatre cystéines a aussi été étudié. Les cystéines mutées correspondent aux quatre cystéines des doublets, C47, C48, C116 et C117. Dans la souche sauvage, ces quatre cystéines sont impliquées dans les quatre ponts disulfures. Pour ce mutant, la surface des spores est hydrophile et totalement amorphe (Figure 50 D). Ces résultats indiquent soit que la protéine n'est pas sécrétée (protéolyse ou accumulation à l'intérieur des spores), soit que les ponts disulfures sont nécessaires à la formation de la couche de bâtonnets. De plus, une quantification de RodA après extraction à l'acide fluorhydrique et une identification par western blot indiquent que pour le quadruple mutant des cystéines, il n'y a pas de protéine à la surface des spores.

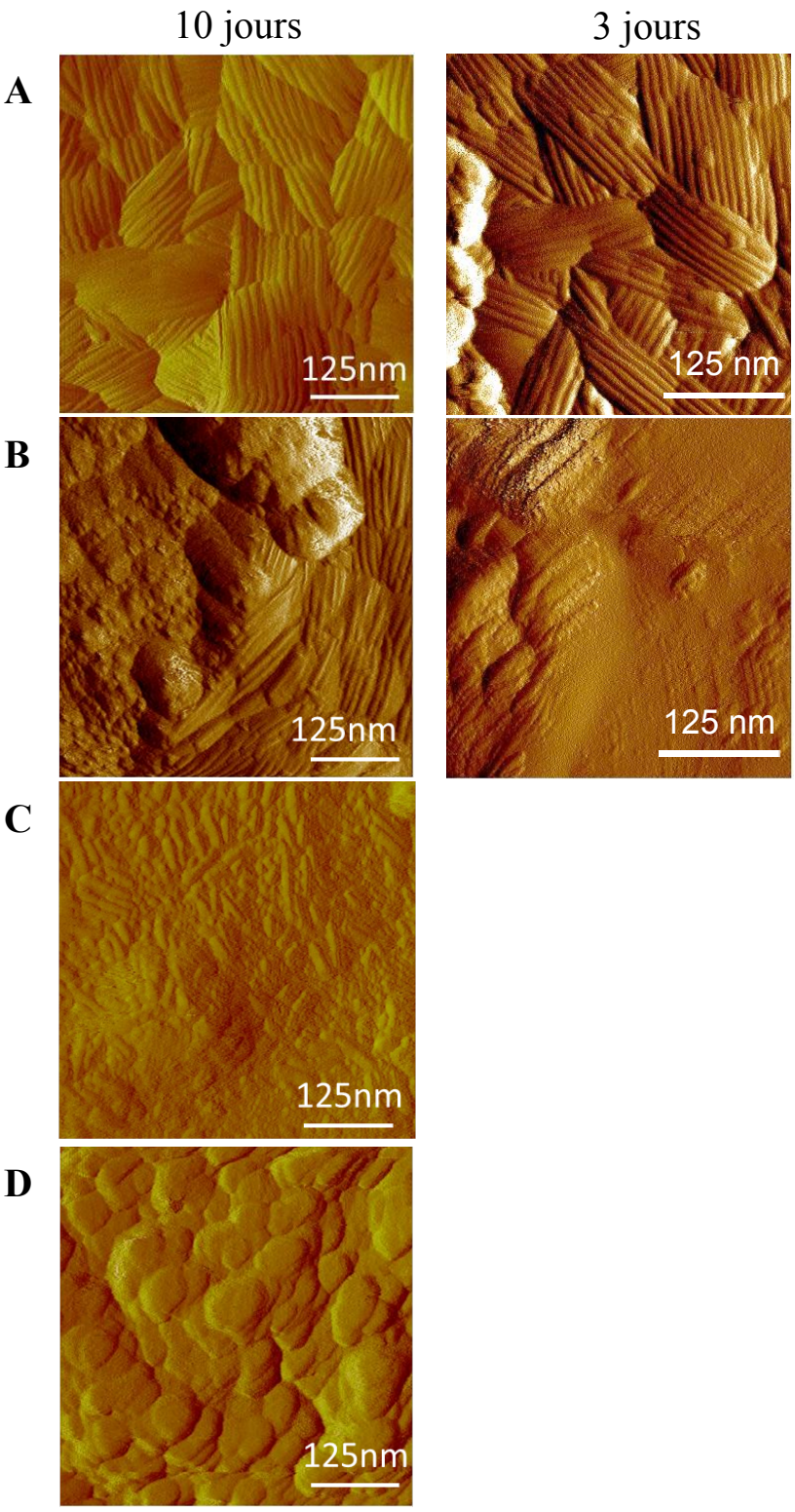


Figure 50 : Etude *in vivo* par AFM des mutants de RodA

Observation par AFM de la surface des spores d'*A. fumigatus* 10 et 3 jours après conidiation pour (**A**) souche sauvage et (**B**) mutant RodA I129G et 10 jours après conidiation pour (**C**) mutant RodA C110S et (**D**) mutant RodA C47S-C48S-C116S-C117S. (clichés Y. Dufrêne)

Comparaison avec les autres hydrophobines

Prédiction des séquences amyloïdogènes

La formation de fibres amyloïdes est une caractéristique des hydrophobines de classe I. Les séquences amyloïdogènes ont été prédites pour plusieurs d'entre elles (Figure 51).

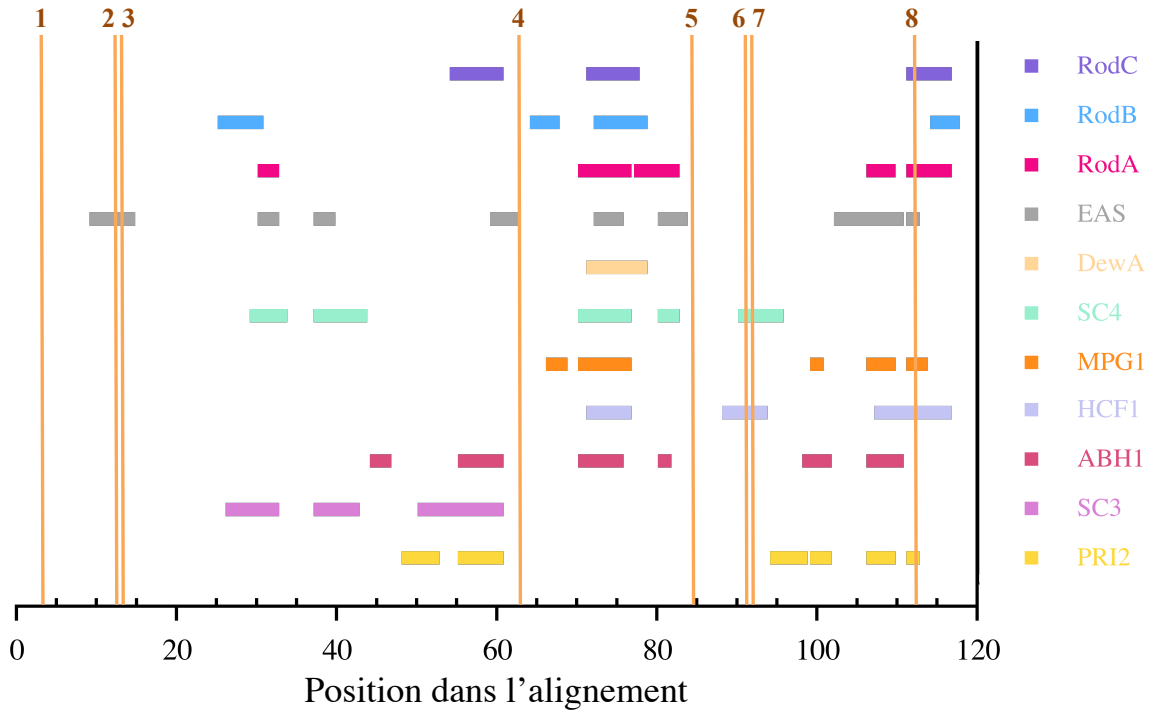


Figure 51 : Régions prédites comme amyloïdogènes chez les hydrophobines de classe I

Les régions amyloïdogènes sont prédites à l'aide des logiciels AMYLPRED[186] pour les protéines RodA, RodB et RodC de *A. fumigatus* ; EAS de *N. crassa* ; DewA de *A. nidulans* ; SC3 et SC4 de *S. commune*; MPG1 de *M. grisea* ; HCF1 de *C. fulvum* ; ABH1de *A. bisporus* ; PRI2 de *A. aegerite*. Les positions des cystéines sont indiquées en orange. Les régions amyloïdogènes prédites sont montrées d'après l'alignement de séquence de la Figure 7.

Les séquences prédites sont pour la plupart situées dans les boucles inter-cystéines reliant le tonneau β, C3-C4, C4-C5 et C7-C8. Sur l'alignement des séquences amyloïdogènes, il ressort qu'il n'existe pas de séquence consensus pour l'ensemble des hydrophobines. Par exemple, pour les hydrophobines d'*A. fumigatus*, RodC et RodB présentent des séquences prédites dans les boucles C3-C4 et C4-C5 cependant les séquences prédites dans la boucle

C3-C4 des deux protéines ne se superposent pas. De plus, la protéine RodA présente des séquences amyloïdogènes dans les boucles C4-C5 et C7-C8. Il en va de même pour l'ensemble des hydrophobines. Ainsi, chez SC3 de *S. commune*, les séquences amyloïdogènes prédites sont toutes localisées dans la boucle C3-C4. Dans le cas de DewA d'*A. nidulans*, une seule région amyloïdogène est prédite et celle-ci est située dans la boucle C4-C5.

L'hydrophobine EAS de *N. crassa* présente de multiples séquences amyloïdogènes situées dans les trois boucles inter-cystéines. Nos collaborateurs dans l'équipe de M. Sunde ont mené des études visant à identifier la séquence constituant le cœur des fibres.

Identification de la séquence amyloïdogène chez EAS de *N. crassa*

Une stratégie de mutagenèse similaire à celle employée pour RodA, a été adoptée pour identifier les résidus impliqués dans la structure β croisée de l'hydrophobine EAS.[188] L'étude des effets de mutations ponctuelles (X → G) sur les cinétiques de formation de fibres a permis d'identifier les régions amyloïdogènes de EAS. Il s'agit d'une séquence située dans la boucle C7-C8 alors que chez RodA deux séquences ont été identifiées dans les boucles C4-C5 et C7-C8. Le peptide impliqué dans la formation de la structure β croisée pour EAS est un pentapeptide, FLIIN (Figure 52). Chez RodA il s'agirait de deux peptides, IIGI dans la boucle C4-C5 et SLIGL dans la boucle C7-C8. Il est intéressant de remarquer que ces séquences se trouvent toutes dans des boucles flexibles et non dans la région du tonneau β, région qui est rigide et contrainte par les liaisons S-S.

En ce qui concerne EAS, une séquence amyloïdogène est également prédite au niveau de la boucle C3-C4. Chez cette protéine, cette région inter-cystéine est la plus longue et la plus flexible. Cependant, des études, menées par nos collaborateurs dans l'équipe de M. Sunde, ont clairement établi que cette région n'est pas impliquée dans la formation de la structure β croisée.[189] En effet, les simples mutants de cette région ainsi que le mutant chez qui la région C3-C4 a été supprimée forme des fibres ayant la même morphologie que la souche sauvage.

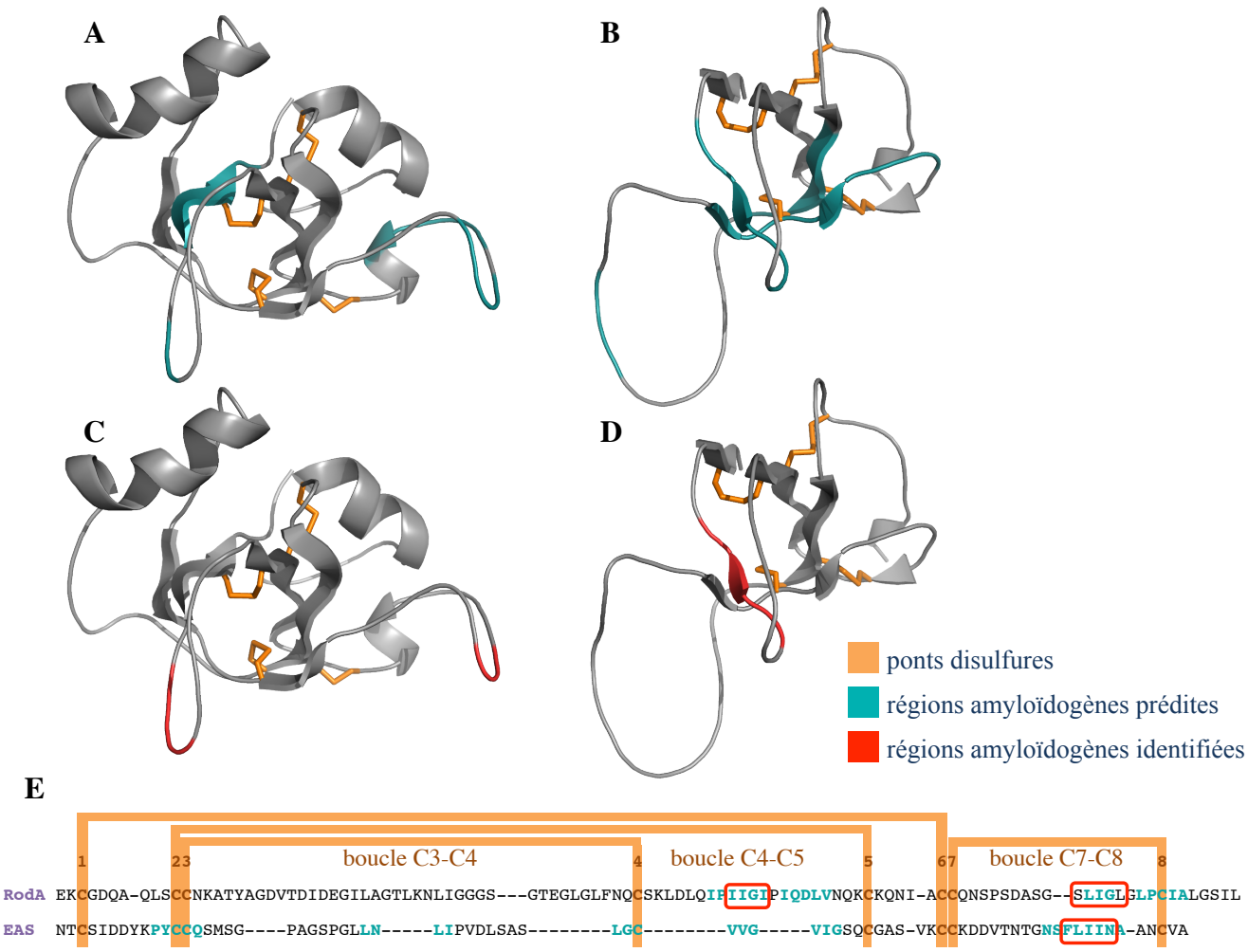


Figure 52 : Comparaison des régions amyloïdogènes des hydrophobines RodA et EAS

Structures des hydrophobines (**A**) RodA d'*A. fumigatus* et (**B**) EAS de *N. crassa* où les séquences amyloïdogènes prédites sont indiquées en bleu. Structures des hydrophobines (**C**) RodA d'*A. fumigatus* et (**D**) EAS de *N. crassa* où les séquences amyloïdogènes identifiées par mutagénèse sont indiquées en rouge. (**E**) Alignement des séquences de RodA et EAS. Les régions amyloïdogènes prédites sont indiquées en bleu, les séquences identifiées par mutagénèse sont signalées par des encarts rouges. Les ponts disulfures sont indiqués en orange.

L'ensemble de ces résultats indique que l'auto-assemblage des hydrophobines de classe I sous forme de fibres amyloïdes pourrait présenter des mécanismes différents où diverses régions des hydrophobines seraient impliquées dans la structure β croisée. Néanmoins, la boucle C7-C8 semble être importante pour plusieurs hydrophobines.

VI. Etude des propriétés immunologiques de RodA

Afin d'établir les potentielles relations existant entre la structure de RodA et son inertie vis-à-vis du système immunitaire, la protéine sous différentes formes ainsi que des mutants ont été étudiés. Les propriétés immunologiques ont été analysées pour la protéine dépliée, la protéine dépliée dont les groupements thiols ont été alkylés, la protéine repliée, la protéine sous forme de bâtonnets ainsi que pour de simples mutants et des mutants des cystéines (coll. J. Bayry). Les groupements thiols des huit résidus de cystéines de la protéine non repliée ont été alkylés, après réduction d'éventuels ponts disulfures par le DTT, avec deux agents alkylants différents, l'iodoacétamide et la N-éthylmaléimide.

Les différentes formes de la protéine et les mutants sont incubés avec différentes cellules du système immunitaire inné (cellules dendritiques, lymphocytes T) et l'activation de ces cellules est mesurée. Pour l'ensemble des protéines testées, aucune induction de signal d'activation n'est enregistrée (Figure 53).

Ces résultats indiquent que l'inertie de RodA vis-à-vis du système immunitaire inné humain n'est pas liée à sa structure puisqu'aucune réponse n'est enregistrée ni pour les bâtonnets ni pour la forme soluble repliée ni pour la forme soluble dépliée ni pour les mutants. Les propriétés immunologiques de cette hydrophobine seraient donc liées à sa séquence. Mais reste à savoir si la protéine est internalisée par les cellules dendritiques et le cas échéant à connaître le devenir de la protéine dans les cellules immunitaires.

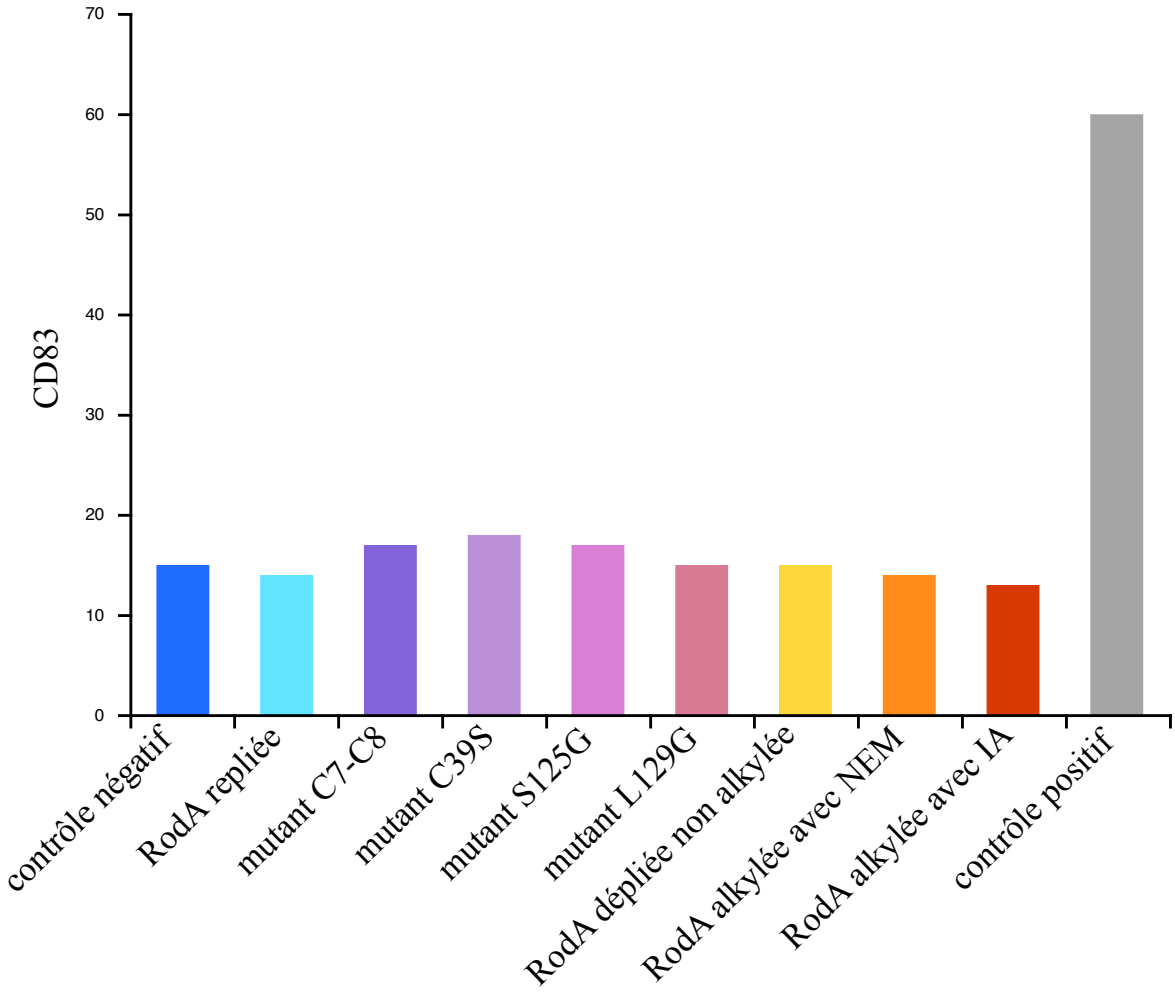


Figure 53 : Test d'activation des cellules dendritiques par l'hydrophobine RodA

Mesure de l'induction du signal d'activation de cellules dendritiques incubées avec RodA monomérique repliée, un mutant des cystéines C7-C8, un mutant C39S, deux mutants ponctuels de la boucle C7-C8 S125G et L129G, RodA dépliée non alkylée, RodA dépliée alkylée avec la N-éthylmaléimide et RodA dépliée alkylée avec l'iodoacétamide. Le contrôle positif correspond à la ribonucléase d'*A. fumigatus*. Le contrôle négatif correspond aux conidies dormantes recouvertes de bâtonnets de RodA. La glycoprotéine CD83 (expression en unités arbitraires) est un marqueur de la maturation des cellules dendritiques. (résultats J. Bayry)

Une cause possible de l'inertie immunitaire de RodA pourrait être le défaut d'internalisation de cette protéine par les cellules dendritiques. Afin d'évaluer cette possibilité, des expériences de fluorescence où le noyau et le cytosquelette des cellules dendritiques ainsi que l'hydrophobine ont été marqués avec des sondes fluorescentes, ont été menées. Sur les clichés obtenus, bien que l'hydrophobine RodA ne stimule pas l'activation des cellules dendritiques, il apparaît qu'elle est internalisée par ces dernières (Figure 54).

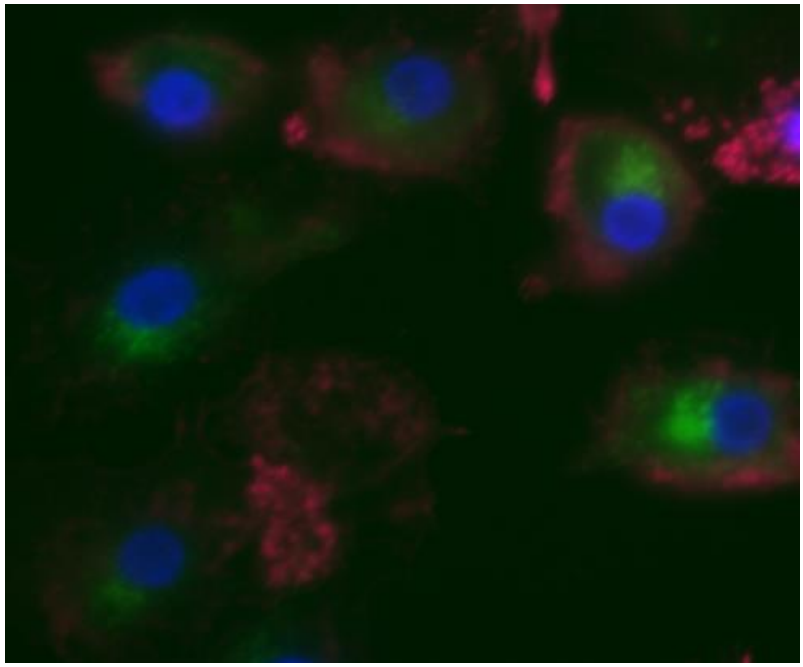


Figure 54 : Localisation de RodA après internalisation par une cellule dendritique

Cliché de fluorescence d'une cellule dendritique après internalisation de l'hydrophobine RodA. Le noyau (chromatine) est coloré en bleu, le cytosquelette (actine) en rouge et l'hydrophobine RodA marquée au FITC en vert. (cliché J. Bayry)

En ce qui concerne les propriétés immunologiques de RodA, il a été montré que celles-ci ne sont pas liées à sa structure (bâtonnets, monomère ou dépliée) mais à sa séquence. Cependant, bien que les cellules du système immunitaire ne soient pas activées par l'hydrophobine, celle-ci est internalisée par les cellules dendritiques. Il reste maintenant à déterminer le devenir de la protéine après internalisation. La protéine est-elle protéolysée et présentée sous forme de peptides non immunogènes ? La protéine est-elle résistante à la protéolyse ?

Chapitre 5 : Conclusion et perspectives

Etude des hydrophobines d'*A. fumigatus* sous forme monomérique

Au cours de cette thèse, l'expression et la purification des hydrophobines du champignon pathogène *A. fumigatus*, RodA, RodB et RodC, non marquées, marquées ^{15}N et doublement marquées $^{15}N/^{13}C$ ont été réalisées. Ces trois protéines ont ensuite été étudiées par RMN dans l'optique de déterminer leur structure en solution. L'attribution des signaux du squelette peptidique des trois protéines ainsi que celle des chaînes latérales pour RodA et RodB, a été effectuée.

La structure secondaire des protéines a été étudiée à partir des déplacements chimiques à l'aide du logiciel PECAN et comparée à celle d'autres hydrophobines de classe I. Les structures secondaires de RodA, de RodB et de RodC montrent de fortes similarités malgré la faible identité de séquence de ces protéines. Celles-ci présentent quatre brins β dans des régions équivalentes selon l'alignement de séquences. Les brins β retrouvés chez les hydrophobines d'*A. fumigatus* sont également présents chez les autres hydrophobines de classe I, ce qui suggère que ces hydrophobines ont une topologie similaire en tonneau β stabilisé par les quatre ponts disulfures. Chez RodA et RodB, deux hélices α sont identifiées, l'une en amont de la première cystéine et l'autre dans la boucle C3-C4. Chez RodC, seule une de ces hélices est retrouvée, celle dans l'extrémité N-terminale. La comparaison des structures secondaires met en évidence que les hydrophobines ayant une extension N-terminale suffisamment longue en amont de la première cystéine possèdent, à proximité de celle-ci, une hélice α stabilisée par des interactions avec le tonneau β.

L'étude de la dynamique interne des protéines RodA, RodB et RodC, à l'échelle des nano- picosecondes, a également été réalisée à partir d'expériences de relaxation du noyau ^{15}N et à partir des déplacements chimiques de la chaîne principale. Les résultats ont permis de dévoiler une région N-terminale désordonnée et une région flexible chez RodA, RodB et RodC au niveau de la boucle C7-C8 de même qu'au niveau des boucles C3-C4 et C4-C5 chez RodA et RodC. De façon intéressante, chez les hydrophobines de classe I les boucles entre les cystéines C3-C4, C4-C5 et C7-C8, de longueur et de séquence très variables, diffèrent en terme d'éléments de structure secondaire et de dynamique. Cependant, la boucle C3-C4 et la boucle C7-C8 montrent en général au moins un segment très flexible, excepté pour la boucle C7-C8 de la protéine DewA qui est très courte par rapport à celle des autres hydrophobines caractérisées structuralement.

Les structures secondaires et les données de dynamique permettent d'étayer et d'illustrer certaines caractéristiques de la forme soluble des hydrophobines. Tout d'abord, malgré la faible similarité de séquence, les hydrophobines de classe I et de classe II adoptent une topologie en tonneau β, qui forme le cœur hydrophobe des protéines, stabilisé par le motif des quatre ponts disulfures. En ce qui concerne les boucles inter-cystéines chez les hydrophobines de classe I, la forte variabilité de séquence et de longueur se traduit par des fortes différences de contenu en éléments de structures secondaires et de flexibilité.

La structure de l'hydrophobine RodA a été déterminée à partir des expériences RMN. La protéine présente, comme illustré par l'étude de sa structure secondaire, une topologie en tonneau β stabilisé par les ponts disulfures ainsi que les deux hélices α identifiées par le logiciel PECAN. De plus, le manque de convergence de l'ensemble des structures au niveau de l'extrémité N-terminale ainsi que la forte flexibilité des boucles C4-C5 et C7-C8 sont corrélés à la forte dynamique mise en évidence par les expériences de relaxation. A partir des structures de RodA, des modèles des structures des hydrophobines RodB et RodC ont été obtenus en utilisant le logiciel MODELLER. Ces structures présentent également une topologie en tonneau β et dans le cas de RodC, l'arrangement des brins β du tonneau a été validé par l'attribution de signaux nOe. Cependant, des différences sont à noter entre ces trois hydrophobines d'*A. fumigatus*, en particulier l'absence de l'hélice α dans la boucle C3-C4 chez RodC, présente chez RodA et RodB. La comparaison des six structures disponibles d'hydrophobines de classe I et II permet de faire ressortir la conservation de la topologie en tonneau β au sein de cette famille. Cependant, l'alignement de ces structures souligne également la grande variabilité de structure observée en particulier au sein de la classe I, même au niveau du tonneau β.

Dans la continuité de cette thèse, l'attribution de RodC sera complétée et les structures de RodB et RodC seront déterminées.

Mécanisme de formation des fibres et des bâtonnets de RodA

Les fibres de RodA ont été obtenues *in vitro*. Celles-ci présentent une morphologie en bâtonnets très similaire à celle observée à la surface des spores *in vivo*. En effet, *in vitro* comme *in vivo*, la protéine forme des couches avec des bâtonnets d'une largeur de 10 nm organisés de façon régulière. L'auto-association de la protéine est initiée par agitation et la cinétique de fibrillation est suivie par fluorescence en présence de ThT.

En vue d'établir un modèle du mécanisme de formation des fibres et de leur structure, il est indispensable d'identifier les régions impliquées dans la formation de la structure β croisée située au cœur des fibres. Dans cette optique, les séquences amyloïdogènes ont été prédites par le logiciel AMYLPRED. Par la suite, une étude de mutagénèse a été menée et les cinétiques de formation des fibres de 14 simples mutants en glycine ont été analysées. De ces expériences, il ressort que les mutations menant aux élongations de la phase de latence les plus importantes sont localisées dans les boucles C4-C5 et C7-C8 et correspondent à des régions de 4 à 5 résidus.

L'étude des mutants *in vivo* menée par nos collaborateurs (coll. J.P. Latgé) est en accord avec les résultats obtenus *in vitro*. Ainsi, pour les simples mutants dans les régions identifiées comme amyloïdogènes par l'étude des simples mutants *in vitro*, la formation *in vivo* des bâtonnets à la surface des spores est retardée. De plus, l'étude des mutants des cystéines a montré que la structure du monomère est nécessaire afin que la protéine soit sécrétée à la surface des conidies.

Afin de valider ces résultats, trois mutants seront étudiés, *in vitro* et *in vivo*, le mutant de la séquence amyloïdogène de la boucle C4-C5 (IIGI → GSGS), le mutant de la séquence amyloïdogène de la boucle C7-C8 (SLIGL → SGSGS) et le mutant des deux régions amyloïdogènes (Figure 55). Les cinétiques de fibrillation et les morphologies des fibres potentiellement obtenues seront caractérisées. De plus, les peptides isolés correspondant aux séquences identifiées seront étudiés par fluorescence en présence de ThT et par TEM afin de déterminer leur capacité à former des fibres amyloïdes. Il pourra également être envisagé de supprimer ces séquences et de réaliser des protéines chimères en greffant ces séquences chez des hydrophobines de classe II afin d'essayer d'introduire la capacité de former des fibres amyloïdes. Enfin, la capacité à former des fibres par les formes non repliées des mutants décrits ci-dessus sera évaluée.

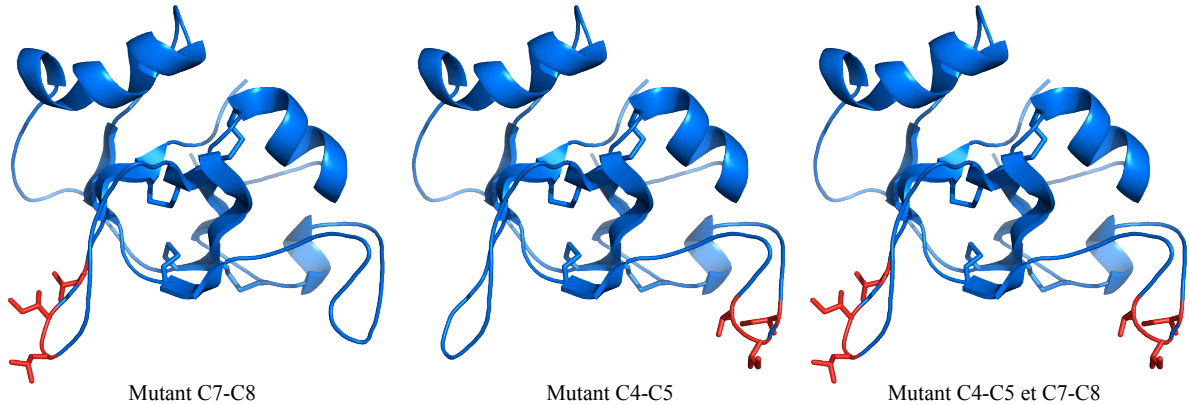


Figure 55 : Mutation des régions amyloïdogènes de RodA

Poursuite de l'étude de mutagénèse afin d'identifier les régions impliquées dans la formation de la structure β croisée. Les résidus qui seront mutés en glycine ou en sérine sont représentés en rouge.

La protéine RodA a également été étudiée sous sa forme non repliée et sous sa forme tronquée, sans les 21 premiers résidus non structurés. Les différentes morphologies des fibres obtenues *in vitro* malgré une cinétique de fibrillation similaire de ces protéines indiquent que la structure du monomère d'une part, et l'extrémité N-terminale d'autre part, sont essentielles à la formation d'une couche bien organisée sous forme de bâtonnets. Les résultats indiquent également que l'extrémité N-terminale non structurée serait impliquée dans les interactions latérales entre les bâtonnets, ce qui permettrait l'obtention d'une couche bien organisée à la surface des spores.

Une stratégie de mutagénèse similaire à celle mise en place pour RodA sera adoptée pour RodC. Treize mutants ponctuels distribués tout au long de la séquence mais surtout dans les régions des boucles flexibles et les régions prédites comme amyloïdogènes seront étudiés et leurs cinétiques d'auto-assemblage seront caractérisées. De plus, la protéine tronquée de son extrémité N-terminale non structurée sera également étudiée. Parallèlement, nos collaborateurs étudieront la localisation de RodC *in vivo*, son rôle biologique et analyseront des mutants intéressants mis en évidence lors d'études structurales et biophysiques *in vitro*.

Par la suite, dans le but d'établir un modèle de la structure des fibres, la protéolyse ménagée sera employée afin de déterminer les régions exposées au niveau des fibres. Par ailleurs, nous envisageons d'étudier l'échange isotopique H/D au niveau des fibres par RMN en solution de la forme monomérique. Enfin, la structure des couches de bâtonnets sera caractérisée par RMN du solide. Ces informations couplées à l'étude des mutants *in vivo*,

devraient permettre d'identifier les régions impliquées dans la polymérisation et d'obtenir un modèle de la structure des bâtonnets d'hydrophobines jouant des rôles importants chez le pathogène *A. fumigatus*, en particulier, la survie des spores et l'inertie vis à vis du système immunitaire.

Propriétés immunologiques de RodA

En collaboration avec J. Bayry, il a été montré au cours de cette thèse que l'inertie de RodA vis-à-vis du système immunitaire inné est indépendante de la structure. Ainsi, les propriétés immunologiques de RodA sont liées à sa séquence. De plus, il a été observé que malgré son inertie vis-à-vis des cellules dendritiques, RodA est internalisée par celles-ci. Ces travaux seront poursuivis afin de déterminer le devenir de l'hydrophobine après internalisation. A l'aide de la protéine marquée avec le fluorophore ALEXA, des cinétiques seront mises en place dans le but de préciser si la protéine est clivée. Ceci permettra de déterminer si l'inertie immunitaire de RodA est due au fait que celle-ci est résistante à la protéolyse ou au fait que les peptides obtenus par protéolyse et présentés à la surface des cellules dendritiques ne sont pas immunogènes.

Bibliographie

1. Talbot, N. Fungal biology. Coming up for air and sporulation. *Nature* **398,** 295–296 (1999).

2. O'Gorman, C., Fuller, H. T. & Dyer, P. Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen Aspergillus fumigatus. *Nature* **457,** 471–474 (2009).

3. Wösten, H. Hydrophobins: multipurpose proteins. *Annu. Rev. Microbiol.* **55,** 625–646 (2001).

4. Wösten, H. *et al.* How a fungus escapes the water to grow into the air. *Curr. Biol. CB* **9,** 85–88 (1999).

5. Elliot, M. & Talbot, N. Building filaments in the air: aerial morphogenesis in bacteria and fungi. *Curr. Opin. Microbiol.* **7,** 594–601 (2004).

6. Wösten, H. & de Vocht, M. Hydrophobins, the fungal coat unravelled. *Biochim. Biophys. Acta* **1469,** 79–86 (2000).

7. Kershaw, M. J. & Talbot, N. J. Hydrophobins and Repellents: Proteins with Fundamental Roles in Fungal Morphogenesis. *Fungal Genet. Biol.* **23,** 18–33 (1998).

8. Linder, M., Szilvay, G., Nakari-Setälä, T. & Penttilä, M. Hydrophobins: the protein-amphiphiles of filamentous fungi. *FEMS Microbiol. Rev.* **29,** 877–896 (2005).

9. Remsen, C., Hess, W. & Sassen, M. Fine structure of germinating Penicillium megasporum conidia. *Protoplasma* **64,** 439–451 (1967).

10. Hess, W. & Stocks, D. Surface characteristics of Aspergillus conidia. *Mycologia* **61,** 560–571 (1969).

11. Ghiorse, W. & Edwards, M. Ultrastructure of Aspergillus fumigatus conidia development and maturation. *Protoplasma* **76,** 49–59 (1973).

12. Beever, R. & Dempsey, G. Function of rodlets on the surface of fungal spores. *Nature* **272,** 608–610 (1978).

13. Wessels, J., de Vries, O., Asgeirsdóttir, S. & Springer, J. The thn mutation of Schizophyllum commune, which suppresses formation of aerial hyphae, affects expression of the Sc3 hydrophobin gene. *J. Gen. Microbiol.* **137,** 2439–2445 (1991).

14. Dons, J., Springer, J., de Vries, S. & Wessels, J. Molecular cloning of a gene abundantly expressed during fruiting body initiation in Schizophyllum commune. *J. Bacteriol.* **157,** 802–808 (1984).

15. Sunde, M., Kwan, A., Templeton, M., Beever, R. & Mackay, J. Structural analysis of hydrophobins. *Micron Oxf. Engl. 1993* **39,** 773–784 (2008).

16. Littlejohn, K. A., Hooley, P. & Cox, P. W. Bioinformatics predicts diverse< i> Aspergillus hydrophobins with novel properties. *Bioinforma. Predicts Diverse Aspergillus Hydrophobins Nov. Prop.* **27,** 503–516 (2012).

17. Thau, N. *et al.* rodletless mutants of Aspergillus fumigatus. *Infect. Immun.* **62,** 4380–4388 (1994).

18. Gebbink, M., Claessen, D., Bouma, B., Dijkhuizen, L. & Wösten, H. Amyloids--a functional coat for microorganisms. *Nat. Rev. Microbiol.* **3,** 333–341 (2005).

19. Latgé, J.-P., Cole, G. T., Horisberger, M. & Prévost, M.-C. Ultrastructure and chemical composition of the ballistospore wall ofConidiobolus obscurus. *Exp. Mycol.* **10,** 99–113 (1986).

20. De Groot, P. W. J., Schaap, P. J., Sonnenberg, A. S. M., Visser, J. & Van Griensven, L. J. L. D. The Agaricus bisporus hypA Gene Encodes a Hydrophobin and Specifically Accumulates in Peel Tissue of Mushroom Caps during Fruit Body Development. *J. Mol. Biol.* **257,** 1008–1018 (1996).

21. Luis G. Lugones *et al.* Hydrophobins line air channels in fruiting bodies of Schizophyllum commune and Agaricus bisporus. *Mycol. Res.* **103,** (1999).

22. Van Wetter, M., Wösten, H., Sietsma, J. & Wessels, J. Hydrophobin gene expression affects hyphal wall composition in Schizophyllum commune. *Fungal Genet. Biol. FG B* **31,** 99–104 (2000).

23. Viterbo, A. & Chet, I. TasHyd1, a new hydrophobin gene from the biocontrol agent Trichoderma asperellum, is involved in plant root colonization. *Mol. Plant Pathol.* **7,** 249–258 (2006).

24. Tagu, D. & Martin, F. Molecular analysis of cell wall proteins expressed during the early steps of ectomycorrhiza development. *New Phytol.* **133,** 73–85 (1996).

25. Duplessis, S. *et al.* Cloning and expression analysis of a new hydrophobin cDNA from the ectomycorrhizal basidiomycete Pisolithus. *Curr. Genet.* **39,** 335–339 (2001).

26. Honegger, R. Developmental biology of lichens. *New Phytol.* **125,** 659–677 (1993).

27. Wösten, H., Schuren, F. & Wessels, J. Interfacial self-assembly of a hydrophobin into an amphipathic protein membrane mediates fungal attachment to hydrophobic surfaces. *EMBO J.* **13,** 5848–5854 (1994).

28. Kazmierczak, P., Kim, D., Turina, M. & Van Alfen, N. A Hydrophobin of the chestnut blight fungus, Cryphonectria parasitica, is required for stromal pustule eruption. *Eukaryot. Cell* **4,** 931–936 (2005).

29. Talbot, N. *et al.* MPG1 Encodes a Fungal Hydrophobin Involved in Surface Interactions during Infection-Related Development of Magnaporthe grisea. *Plant Cell* **8,** 985–999 (1996).

30. Talbot, N. J., Ebbole, D. J. & Hamer, J. E. Identification and characterization of MPG1, a gene involved in pathogenicity from the rice blast fungus Magnaporthe grisea. *Plant Cell* **5,** 1575–1590 (1993).

31. Kim, S., Ahn, I.-P., Rho, H.-S. & Lee, Y.-H. MHP1, a Magnaporthe grisea hydrophobin gene, is required for fungal development and plant colonization. *Mol. Microbiol.* **57,** 1224–1237 (2005).

32. Bayry, J., Aimanianda, V., Guijarro, J., Sunde, M. & Latgé, J.-P. Hydrophobins--unique fungal proteins. *PLoS Pathog.* **8,** (2012).

33. Wessels, J. G. H. Developmental Regulation of Fungal Cell Wall Formation. *Annu. Rev. Phytopathol.* **32,** 413–437 (1994).

34. Kershaw, M., Wakley, G. & Talbot, N. Complementation of the mpg1 mutant phenotype in Magnaporthe grisea reveals functional relationships between fungal hydrophobins. *EMBO J.* **17,** 3838–3849 (1998).

35. Jensen, B., Andersen, M., Pedersen, M., Frisvad, J. & Søndergaard, I. Hydrophobins from Aspergillus species cannot be clearly divided into two classes. *BMC Res. Notes* **3,** 344 (2010).

36. Sunde, M., Kwan, A., Templeton, M., Beever, R. & Mackay, J. Structural analysis of hydrophobins. *Micron Oxf. Engl. 1993* **39,** 773–784 (2008).

37. Wessels, J. Hydrophobins: proteins that change the nature of the fungal surface. *Adv. Microb. Physiol.* **38,** 1–45 (1997).

38. Hakanpää, J. *et al.* Two crystal structures of Trichoderma reesei hydrophobin

HFBI--the structure of a protein amphiphile with and without detergent interaction. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **15,** 2129–2140 (2006).

39. Hakanpää, J. *et al.* Atomic resolution structure of the HFBII hydrophobin, a self-assembling amphiphile. *J. Biol. Chem.* **279,** 534–539 (2004).

40. Kwan, A. *et al.* Structural basis for rodlet assembly in fungal hydrophobins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103,** 3621–3626 (2006).

41. Morris, V., Kwan, A. & Sunde, M. Analysis of the structure and conformational states of DewA gives insight into the assembly of the fungal hydrophobins. *J. Mol. Biol.* **425,** 244–256 (2013).

42. Ren, Q., Kwan, A. & Sunde, M. Solution structure and interface-driven self-assembly of NC2, a new member of the Class II hydrophobin proteins. *Proteins* (2013).

43. Mackay, J. *et al.* The hydrophobin EAS is largely unstructured in solution and functions by forming amyloid-like structures. *Struct. Lond. Engl. 1993* **9,** 83–91 (2001).

44. Butko, P. *et al.* Spectroscopic evidence for amyloid-like interfacial self-assembly of hydrophobin Sc3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **280,** 212–215 (2001).

45. Takai, S. Pathogenicity and cerato-ulmin production in Ceratocystis ulmi. *Nature* **252,** 124–126 (1974).

46. Torkkeli, M., Serimaa, R., Ikkala, O. & Linder, M. Aggregation and self-assembly of hydrophobins from Trichoderma reesei: low-resolution structural models. *Biophys. J.* **83,** 2240–2247 (2002).

47. Paananen, A. *et al.* Structural hierarchy in molecular films of two class II hydrophobins. *Struct. Hierarchy Mol. Films Two Cl. II Hydrophobins* **42,** 5253–5258 (2003).

48. Markus B. Linder. Hydrophobins: Proteins that self assemble at interfaces. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **14,** (2009).

49. Hektor, H. & Scholtmeijer, K. Hydrophobins: proteins with potential. *Curr. Opin. Biotechnol.* **16,** 434–439 (2005).

50. Wohlleben, W. *et al.* Recombinantly produced hydrophobins from fungal analogues as highly surface-active performance proteins. *Eur. Biophys. J. EBJ* **39,** 457–468 (2010).

51. Haas Jimoh Akanbi, M. *et al.* Use of hydrophobins in formulation of water

insoluble drugs for oral administration. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **75,** 526–531 (2010).

52. Valo, H. K. *et al.* Multifunctional Hydrophobin: Toward Functional Coatings for Drug Nanoparticles. *ACS Nano* **4,** 1750–1758 (2010).

53. Janssen, M. I. *et al.* Coating with genetic engineered hydrophobin promotes growth of fibroblasts on a hydrophobic solid. *Biomaterials* **23,** 4847–4854 (2002).

54. Janssen, M. I. *et al.* Promotion of fibroblast activity by coating with hydrophobins in the β-sheet end state. *Biomaterials* **25,** 2731–2739 (2004).

55. Linder, M., Szilvay, G. R., Nakari-Setälä, T., Söderlund, H. & Penttilä, M. Surface adhesion of fusion proteins containing the hydrophobins HFBI and HFBII from Trichoderma reesei. *Protein Sci.* **11,** 2257–2266 (2002).

56. Corvis, Y., Walcarius, A., Rink, R., Mrabet, N. T. & Rogalska, E. Preparing Catalytic Surfaces for Sensing Applications by Immobilizing Enzymes via Hydrophobin Layers. *Anal. Chem.* **77,** 1622–1630 (2005).

57. Palomo, J. M. *et al.* Solid-Phase Handling of Hydrophobins: Immobilized Hydrophobins as a New Tool To Study Lipases. *Biomacromolecules* **4,** 204–210 (2003).

58. Bilewicz, R. *et al.* Modification of Electrodes with Self-Assembled Hydrophobin Layers. *J. Phys. Chem. B* **105,** 9772–9777 (2001).

59. Selber, K. *et al.* Large-scale separation and production of engineered proteins, designed for facilitated recovery in detergent-based aqueous two-phase extraction systems. *Process Biochem.* **39,** 889–896 (2004).

60. Linder, M. *et al.* The Hydrophobins HFBI and HFBII from Trichoderma reesei Showing Efficient Interactions with Nonionic Surfactants in Aqueous Two-Phase Systems. *Biomacromolecules* **2,** 511–517 (2001).

61. Fisher, M. *et al.* Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature* **484,** 186–194 (2012).

62. Brown, G. *et al.* Hidden killers: human fungal infections. *Sci. Transl. Med.* **4,** (2012).

63. Havlickova, B., Czaika, V. & Friedrich, M. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses* **51 Suppl 4,** 2–15 (2008).

64. Perlroth, J., Choi, B. & Spellberg, B. Nosocomial fungal infections:

epidemiology, diagnosis, and treatment. *Med. Mycol.* **45,** 321–346 (2007).

65. Pfaller, M. & Diekema, D. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin. Microbiol. Rev.* **20,** 133–163 (2007).

66. Micheli, P. A. *Nova plantarum genera*. (1729).

67. Gugnani, H. Ecology and taxonomy of pathogenic aspergilli. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* **8,** 57 (2003).

68. Kurup, V. & Kumar, A. Immunodiagnosis of aspergillosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **4,** 439–456 (1991).

69. Peterson, S. Phylogenetic analysis of Aspergillus species using DNA sequences from four loci. *Mycologia* **100,** 205–226 (2008).

70. Dagenais, T. & Keller, N. Pathogenesis of Aspergillus fumigatus in Invasive Aspergillosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **22,** 447–465 (2009).

71. Wild, C. & Gong, Y. Mycotoxins and human disease: a largely ignored global health issue. *Carcinogenesis* **31,** 71–82 (2010).

72. Moodley, L., Pillay, J. & Dheda, K. Aspergilloma and the surgeon. *J. Thorac. Dis.* **6,** 202–209 (2014).

73. Latgé, J. Aspergillus fumigatus and aspergillosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **12,** 310–350 (1999).

74. Falvey, D. & Streifel, A. Ten-year air sample analysis of Aspergillus prevalence in a university hospital. *J. Hosp. Infect.* **67,** 35–41 (2007).

75. Balloy, V. & Chignard, M. The innate immune response to Aspergillus fumigatus. *Microbes Infect.* **11,** 919–927 (2009).

76. Philippe, B. *et al.* Killing of Aspergillus fumigatus by alveolar macrophages is mediated by reactive oxidant intermediates. *Infect. Immun.* **71,** 3034–3042 (2003).

77. Schaffner, A., Douglas, H., Braude, A. & Davis, C. Killing of Aspergillus spores depends on the anatomical source of the macrophage. *Infect. Immun.* **42,** 1109–1115 (1983).

78. Levitz, S. & Diamond, R. Mechanisms of resistance of Aspergillus fumigatus Conidia to killing by neutrophils in vitro. *J. Infect. Dis.* **152,** 33–42 (1985).

79. Chotirmall, S. *et al.* Aspergillus-associated airway disease, inflammation, and the innate immune response. *BioMed Res. Int.* **2013,** 723129 (2013).

80. Agarwal, R. *et al.* Allergic bronchopulmonary aspergillosis: review of literature and proposal of new diagnostic and classification criteria. *Clin. Exp. Allergy* **43,** 850–873 (2013).

81. Lin, S., Schranz, J. & Teutsch, S. Aspergillosis case-fatality rate: systematic review of the literature. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **32,** 358–366 (2001).

82. Cornillet, A. *et al.* Comparison of epidemiological, clinical, and biological features of invasive aspergillosis in neutropenic and nonneutropenic patients: a 6-year survey. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **43,** 577–584 (2006).

83. Perlroth, J., Choi, B. & Spellberg, B. Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. *Med. Mycol.* **45,** 321–346 (2007).

84. Sipe, J. & Cohen, A. Review: history of the amyloid fibril. *Rev. Hist. Amyloid Fibril* **130,** 88–98 (2000).

85. Cohen, A. S. in *Amyloidosis* (eds. Marrink, J. & M.D, M. H. V. R.) 3–19 (Springer Netherlands, 1986).

86. Virchow, R. Ueber eine im Gehirn und Rückenmark des Menschen aufgefundene Substanz mit der chemischen Reaction der Cellulose. *Arch. Für Pathol. Anat. Physiol. Für Klin. Med.* **6,** 135–138 (1854).

87. Friedreich, P. D. N. & Kekulé, P. D. A. Zur Amyloidfrage. *Arch. Für Pathol. Anat. Physiol. Für Klin. Med.* **16,** 50–65 (1859).

88. Hanssen, O. Ein Beitrag zur chemie der amyloiden entartung. *Biochem Z* **13,** 185–198 (1908).

89. Gellerstedt, N. Die elektive, insuläre (Para-) Amyloidose der Bauchspeicheldrüse. *Zugleich En Beitrag Zur Kennt. 'senilen Amyloidose' Beitr Path Anat* **101,** 1–13 (1938).

90. Westermark, P. in *Amyloid Proteins* (ed. Sipe, J. D.) 2–27 (Wiley-VCH Verlag GmbH, 2005).

91. Glenner, G. G., Terry, W., Harada, M., Isersky, C. & Page, D. Amyloid fibril proteins: proof of homology with immunoglobulin light chains by sequence analyses. *Science*

172, 1150–1151 (1971).

92. Cohen, A. *Coeur et médecine interne*. (De Boeck Secundair, 2002).

93. Divry, P. & Florkin, M. Sur les proprietes optiques de l'amyloide. *CR Soc Biol* **97,** 1808–1810 (1927).

94. Puchtler, H., Sweat, F. & Levine, M. On the Binding of Congo Red by Amyloid. *J. Histochem. Cytochem.* **10,** 355–364 (1962).

95. Cohen, A. S. & Calkins, E. Electron Microscopic Observations on a Fibrous Component in Amyloid of Diverse Origins. *Nature* **183,** 1202–1203 (1959).

96. Gueft, B. & Ghidoni, J. J. The site of formation and ultrastructure of amyloid. *Am. J. Pathol.* **43,** 837 (1963).

97. Terry, R. D., Gonatas, N. K. & Weiss, M. Ultrastructural studies in Alzheimer's presenile dementia. *Am. J. Pathol.* **44,** 269 (1964).

98. Eanes, E. D. & Glenner, G. G. X-Ray Diffraction Studies on Amyloid Filaments. *J. Histochem. Cytochem.* **16,** 673–677 (1968).

99. Bonar, L., Cohen, A. S. & Skinner, M. M. Characterization of the Amyloid Fibril as a Cross-β Protein. *Exp. Biol. Med.* **131,** 1373–1375 (1969).

100. Sunde, M. *et al.* Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction. *J. Mol. Biol.* **273,** 729–739 (1997).

101. Glenner, G. G., Eanes, E. D., Bladen, H. A., Linke, R. P. & Termine, J. D. β-pleated sheet fibrils a comparison of native amyloid with synthetic protein fibrils. *J. Histochem. Cytochem.* **22,** 1141–1158 (1974).

102. Kelly, J. W. The environmental dependency of protein folding best explains prion and amyloid diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95,** 930–932 (1998).

103. Uversky, V. N. & Permiakov, E. A. *Methods in Protein Structure and Stability Analysis: Luminescence spectroscopy and circular dichroism*. (Nova Publishers, 2007).

104. Chiti, F. & Dobson, C. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu. Rev. Biochem.* **75,** 333–366 (2006).

105. Sipe, J. *et al.* Amyloid fibril protein nomenclature: 2010 recommendations from the nomenclature committee of the International Society of Amyloidosis. *Amyloid Int. J. Exp. Clin. Investig. Off. J. Int. Soc. Amyloidosis* **17,** 101–104 (2010).

106. Pepys, M. B. Amyloidosis. *Amyloidosis.* **57,** 223–241 (2006).

107. Glasse, R. Cannibalisme et kuru chez les Fore de Nouvelle Guinée. *L'Homme* **8,** 22–36 (1968).

108. Liberski, P. P. Historical overview of prion diseases: a view from afar. *Folia Neuropathol. Assoc. Pol. Neuropathol. Med. Res. Cent. Pol. Acad. Sci.* **50,** 1–12 (2012).

109. Guijarro, J. I., Sunde, M., Jones, J. A., Campbell, I. D. & Dobson, C. M. Amyloid fibril formation by an SH3 domain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95,** 4224–4228 (1998).

110. Stefani, M. & Dobson, C. M. Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution. *J. Mol. Med.* **81,** 678–699 (2003).

111. Dobson, C. M. Protein misfolding, evolution and disease. *Trends Biochem. Sci.* **24,** 329–332 (1999).

112. Monsellier, E. & Chiti, F. Prevention of amyloid-like aggregation as a driving force of protein evolution. *EMBO Rep.* **8,** 737–742 (2007).

113. Fowler, D., Koulov, A., Balch, W. & Kelly, J. Functional amyloid--from bacteria to humans. *Trends Biochem. Sci.* **32,** 217–224 (2007).

114. Chapman, M. R. *et al.* Role of Escherichia coli Curli Operons in Directing Amyloid Fiber Formation. *Science* **295,** 851–855 (2002).

115. Iconomidou, V. A., Vriend, G. & Hamodrakas, S. J. Amyloids protect the silkmoth oocyte and embryo. *FEBS Lett.* **479,** 141–145 (2000).

116. Berson, J. F. *et al.* Proprotein convertase cleavage liberates a fibrillogenic fragment of a resident glycoprotein to initiate melanosome biogenesis. *J. Cell Biol.* **161,** 521–533 (2003).

117. Diociaiuti, M. *et al.* Calcitonin forms oligomeric pore-like structures in lipid membranes. *Biophys. J.* **91,** 2275–2281 (2006).

118. Si, K., Lindquist, S. & Kandel, E. R. A neuronal isoform of the aplysia CPEB has prion-like properties. *Cell* **115,** 879–891 (2003).

119. Badtke, M. P., Hammer, N. D. & Chapman, M. R. Functional amyloids signal their arrival. *Sci. Signal.* **2,** pe43 (2009).

120. Hammer, N. D., Wang, X., McGuffie, B. A. & Chapman, M. R. Amyloids:

friend or foe? *J. Alzheimers Dis. JAD* **13,** 407–419 (2008).

121. Willey, J., Santamaria, R., Guijarro, J., Geistlich, M. & Losick, R. Extracellular complementation of a developmental mutation implicates a small sporulation protein in aerial mycelium formation by S. coelicolor. *Cell* **65,** 641–650 (1991).

122. Richter, M., Willey, J. M., Süßmuth, R., Jung, G. & Fiedler, H.-P. Streptofactin, a novel biosurfactant with aerial mycelium inducing activity from Streptomyces tendae Tü 901/8c. *FEMS Microbiol. Lett.* **163,** 165–171 (1998).

123. Claessen, D. *et al.* Two novel homologous proteins of Streptomyces coelicolor and Streptomyces lividans are involved in the formation of the rodlet layer and mediate attachment to a hydrophobic surface. *Mol. Microbiol.* **44,** 1483–1492 (2002).

124. Claessen, D. *et al.* A novel class of secreted hydrophobic proteins is involved in aerial hyphae formation in Streptomyces coelicolor by forming amyloid-like fibrils. *Genes Dev.* **17,** 1714–1726 (2003).

125. Shahnawaz, M. & Soto, C. Microcin amyloid fibrils A are reservoir of toxic oligomeric species. *J. Biol. Chem.* **287,** 11665–11676 (2012).

126. Duquesne, S., Petit, V., Peduzzi, J. & Rebuffat, S. Structural and functional diversity of microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **13,** 200–209 (2007).

127. Bieler, S. *et al.* Amyloid formation modulates the biological activity of a bacterial protein. *J. Biol. Chem.* **280,** 26880–26885 (2005).

128. Greenberg, J. T. Programmed cell death: a way of life for plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93,** 12094–12097 (1996).

129. Oh, J. *et al.* Amyloidogenesis of type III-dependent harpins from plant pathogenic bacteria. *J. Biol. Chem.* **282,** 13601–13609 (2007).

130. Blanco, L. P., Evans, M. L., Smith, D. R., Badtke, M. P. & Chapman, M. R. Diversity, biogenesis and function of microbial amyloids. *Trends Microbiol.* **20,** 66–73 (2012).

131. Paushkin, S. V., Kushnirov, V. V., Smirnov, V. N. & Ter-Avanesyan, M. D. In vitro propagation of the prion-like state of yeast Sup35 protein. *Science* **277,** 381–383 (1997).

132. Bernet, J. In Podospora anserina, protoplasmic incompatibility genes are involved in cell death control via multiple gene interactions. *Heredity* **68,** 79–87 (1992).

133. Coustou, V., Deleu, C., Saupe, S. & Begueret, J. The protein product of the het-s heterokaryon incompatibility gene of the fungus Podospora anserina behaves as a prion analog. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94,** 9773–9778 (1997).

134. Iconomidou, V. A., Cordopatis, P., Hoenger, A. & Hamodrakas, S. J. The silkmoth eggshell as a natural amyloid shield for the safe development of insect oocyte and embryo: insights from studies of silkmoth chorion protein peptide-analogues of the B family. *Biopolymers* **96,** 723–733 (2011).

135. Iconomidou, V. A. *et al.* Amyloid-like fibrils from an 18-residue peptide analogue of a part of the central domain of the B-family of silkmoth chorion proteins. *FEBS Lett.* **499,** 268–273 (2001).

136. Craig, C. L. Evolution of arthropod silks. *Annu. Rev. Entomol.* **42,** 231–267 (1997).

137. Vollrath, F. & Knight, D. P. Liquid crystalline spinning of spider silk. *Nature* **410,** 541–548 (2001).

138. Kenney, J. M., Knight, D., Wise, M. J. & Vollrath, F. Amyloidogenic nature of spider silk. *Eur. J. Biochem. FEBS* **269,** 4159–4163 (2002).

139. Takahashi, Y., Gehoh, M. & Yuzuriha, K. Structure refinement and diffuse streak scattering of silk (Bombyx mori). *Int. J. Biol. Macromol.* **24,** 127–138 (1999).

140. Li, G. *et al.* The natural silk spinning process. A nucleation-dependent aggregation mechanism? *Eur. J. Biochem. FEBS* **268,** 6600–6606 (2001).

141. Martel, A. *et al.* Silk Fiber Assembly Studied by Synchrotron Radiation SAXS/WAXS and Raman Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **130,** 17070–17074 (2008).

142. Rammensee, S., Slotta, U., Scheibel, T. & Bausch, A. R. Assembly mechanism of recombinant spider silk proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105,** 6590–6595 (2008).

143. Kelly, J. W. & Balch, W. E. Amyloid as a natural product. *J. Cell Biol.* **161,** 461–462 (2003).

144. Dobson, C. M. Principles of protein folding, misfolding and aggregation. *Princ. Protein Fold. Misfolding Aggreg.* **15,** 3–16 (2004).

145. Blake, C. & Serpell, L. Synchrotron X-ray studies suggest that the core of the transthyretin amyloid fibril is a continuous beta-sheet helix. *Struct. Lond. Engl. 1993* **4,** 989–

998 (1996).

146. Jiménez, J. L. *et al.* Cryo-electron microscopy structure of an SH3 amyloid fibril and model of the molecular packing. *EMBO J.* **18,** 815–821 (1999).

147. Nelson, R. *et al.* Structure of the cross-β spine of amyloid-like fibrils. *Nature* **435,** 773–778 (2005).

148. Lührs, T. *et al.* 3D structure of Alzheimer's amyloid-β(1–42) fibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102,** 17342–17347 (2005).

149. Wasmer, C. *et al.* Amyloid Fibrils of the HET-s(218–289) Prion Form a β Solenoid with a Triangular Hydrophobic Core. *Science* **319,** 1523–1526 (2008).

150. Van Melckebeke, H. *et al.* Atomic-Resolution Three-Dimensional Structure of HET-s(218−289) Amyloid Fibrils by Solid-State NMR Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **132,** 13765–13775 (2010).

151. Tycko, R. Solid-State NMR Studies of Amyloid Fibril Structure. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **62,** 279–299 (2011).

152. Stromer, T. & Serpell, L. Structure and morphology of the Alzheimer's amyloid fibril. *Microsc. Res. Tech.* **67,** 210–217 (2005).

153. Nilsson, M. Techniques to study amyloid fibril formation in vitro. *Methods San Diego Calif* **34,** 151–160 (2004).

154. Biancalana, M. & Koide, S. Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* **1804,** 1405–1412 (2010).

155. Beauvais, A. *et al.* An extracellular matrix glues together the aerial-grown hyphae of Aspergillus fumigatus. *Cell. Microbiol.* **9,** 1588–1600 (2007).

156. Beauvais, A., Fontaine, T., Aimanianda, V. & Latgé, J.-P. Aspergillus Cell Wall and Biofilm. *Mycopathologia* 1–7 (2014).

157. Paris, S. *et al.* Conidial hydrophobins of Aspergillus fumigatus. *Appl. Environ. Microbiol.* **69,** 1581–1588 (2003).

158. Aimanianda, V. *et al.* Surface hydrophobin prevents immune recognition of airborne fungal spores. *Nature* **460,** 1117–1121 (2009).

159. Hohl, T. M. *et al.* Aspergillus fumigatus Triggers Inflammatory Responses by Stage-Specific β-Glucan Display. *PLoS Pathog* **1,** e30 (2005).

160. Osherov, N. & May, G. S. The molecular mechanisms of conidial germination. *FEMS Microbiol. Lett.* **199,** 153–160 (2001).

161. Dague, E., Alsteens, D., Latgé, J.-P. & Dufrêne, Y. High-resolution cell surface dynamics of germinating Aspergillus fumigatus conidia. *Biophys. J.* **94,** 656–660 (2008).

162. Delaglio, F. *et al.* NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *J. Biomol. NMR* **6,** 277–293 (1995).

163. Johnson, B. A. & Blevins, R. A. NMR View: A computer program for the visualization and analysis of NMR data. *J. Biomol. NMR* **4,** 603–614 (1994).

164. Vranken, W. F. *et al.* The CCPN data model for NMR spectroscopy: Development of a software pipeline. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **59,** 687–696 (2005).

165. Kay, L., Keifer, P. & Saarinen, T. Pure absorption gradient enhanced heteronuclear single quantum correlation spectroscopy with improved sensitivity. *J. Am. Chem. Soc.* **114,** 10663–10665 (1992).

166. Vuister, G. W. & Bax, A. Quantitative J correlation: a new approach for measuring homonuclear three-bond J(HNH.alpha.) coupling constants in 15N-enriched proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **115,** 7772–7777 (1993).

167. Muhandiram, D. R. & Kay, L. E. Gradient-Enhanced Triple-Resonance Three-Dimensional NMR Experiments with Improved Sensitivity. *J. Magn. Reson. B* **103,** 203–216 (1994).

168. Grzesiek, S., Anglister, J. & Bax, A. Correlation of Backbone Amide and Aliphatic Side-Chain Resonances in 13C/15N-Enriched Proteins by Isotropic Mixing of 13C Magnetization. *J. Magn. Reson. B* **101,** 114–119 (1993).

169. Yamazaki, T., Forman-Kay, J. D. & Kay, L. E. Two-dimensional NMR experiments for correlating carbon-13.beta. and proton.delta./.epsilon. chemical shifts of aromatic residues in 13C-labeled proteins via scalar couplings. *J. Am. Chem. Soc.* **115,** 11054–11055 (1993).

170. Eghbalnia, H. R., Wang, L., Bahrami, A., Assadi, A. & Markley, J. L. Protein energetic conformational analysis from NMR chemical shifts (PECAN) and its use in determining secondary structural elements. *J. Biomol. NMR* **32,** 71–81 (2005).

171. Zhang, O., Kay, L. E., Olivier, J. P. & Forman-Kay, J. D. Backbone 1H and 15N resonance assignments of the N-terminal SH3 domain of drk in folded and unfolded states using enhanced-sensitivity pulsed field gradient NMR techniques. *J. Biomol. NMR* **4,** 845–858 (1994).

172. Rieping, W. *et al.* ARIA2: automated NOE assignment and data integration in NMR structure calculation. *Bioinforma. Oxf. Engl.* **23,** 381–382 (2007).

173. Brünger, A. T. *et al.* Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **54,** 905–921 (1998).

174. Sharma, D. & Rajarathnam, K. 13C NMR chemical shifts can predict disulfide bond formation. *J. Biomol. NMR* **18,** 165–171 (2000).

175. Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22,** 4673–4680 (1994).

176. Berjanskii, M. V. & Wishart, D. S. A Simple Method To Predict Protein Flexibility Using Secondary Chemical Shifts. *J. Am. Chem. Soc.* **127,** 14970–14971 (2005).

177. Ramachandran, G. N., Ramakrishnan, C. & Sasisekharan, V. Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *J. Mol. Biol.* **7,** 95–99 (1963).

178. Karplus, M. Contact Electron-Spin Coupling of Nuclear Magnetic Moments. *J. Chem. Phys.* **30,** 11–15 (1959).

179. Karplus, M. Vicinal Proton Coupling in Nuclear Magnetic Resonance. *J. Am. Chem. Soc.* **85,** 2870–2871 (1963).

180. Cornilescu, G., Delaglio, F. & Bax, A. Protein backbone angle restraints from searching a database for chemical shift and sequence homology. *J. Biomol. NMR* **13,** 289–302 (1999).

181. Shen, Y., Delaglio, F., Cornilescu, G. & Bax, A. TALOS+: a hybrid method for predicting protein backbone torsion angles from NMR chemical shifts. *J. Biomol. NMR* **44,** 213–223 (2009).

182. Sali, A. & Blundell, T. L. Definition of general topological equivalence in protein structures: A procedure involving comparison of properties and relationships through

simulated annealing and dynamic programming. *J. Mol. Biol.* **212,** 403–428 (1990).

183. Webb, B. & Sali, A. in *Protein Struct. Predict.* (ed. Kihara, D.) 1–15 (Springer New York, 2014).

184. Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S. & Thornton, J. M. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.* **26,** 283–291 (1993).

185. Morris, V. *et al.* Recruitment of class I hydrophobins to the air:water interface initiates a multi-step process of functional amyloid formation. *J. Biol. Chem.* **286,** 15955–15963 (2011).

186. Frousios, K. K., Iconomidou, V. A., Karletidi, C.-M. & Hamodrakas, S. J. Amyloidogenic determinants are usually not buried. *BMC Struct. Biol.* **9,** 44 (2009).

187. Fernandez-Escamilla, A.-M., Rousseau, F., Schymkowitz, J. & Serrano, L. Prediction of sequence-dependent and mutational effects on the aggregation of peptides and proteins. *Nat. Biotechnol.* **22,** 1302–1306 (2004).

188. Macindoe, I. *et al.* Self-assembly of functional, amphipathic amyloid monolayers by the fungal hydrophobin EAS. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109,** 11 (2012).

189. Kwan, A. *et al.* The Cys3-Cys4 loop of the hydrophobin EAS is not required for rodlet formation and surface activity. *J. Mol. Biol.* **382,** 708–720 (2008).

Annexe

Biomol NMR Assign
DOI 10.1007/s12104-014-9555-1

ARTICLE

^{1}H, ^{13}C and ^{15}N resonance assignments of the RodA hydrophobin from the opportunistic pathogen *Aspergillus fumigatus*

Ariane Pille · Ann H. Kwan · Ivan Cheung · Matthew Hampsey · Vishukumar Aimanianda · Muriel Delepierre · Jean-Paul Latgé · Margaret Sunde · J. Iñaki Guijarro

Received: 12 February 2014 / Accepted: 15 March 2014
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2014

Abstract Hydrophobins are fungal proteins characterised by their amphipathic properties and an idiosyncratic pattern of eight cysteine residues involved in four disulphide bridges. The soluble form of these proteins spontaneously self-assembles at hydrophobic/hydrophilic interfaces to form an amphipathic monolayer. The RodA hydrophobin of the opportunistic pathogen *Aspergillus fumigatus* forms an amyloid layer with a rodlet morphology that covers the surface of fungal spores. This rodlet layer bestows hydrophobicity to the spores facilitating their dispersal in the air and rendering the conidia inert relative to the human immune system. As a first step in the analysis of the solution structure and self-association of RodA, we report the ^{1}H, ^{13}C and ^{15}N resonance assignments of the soluble monomeric form of RodA.

Keywords Hydrophobin · Functional amyloids · Rodlets · Cell wall · *Aspergillus fumigatus* · NMR

Biological context

Hydrophobins are small (<20 kDa) amphipathic proteins produced by most filamentous fungi. These proteins with remarkable physicochemical properties are defined by a pattern of eight cysteine (Cys) residues that form four disulphide bonds (C1–C6, C2–C5, C3–C4, C7–C8) (Kwan et al. 2006). They are produced in a soluble form that spontaneously self-assembles at hydrophobic/hydrophilic or air/water interfaces to form amphipathic monolayers with high surfactant activity. Hydrophobins are divided in two classes based on their sequence, hydropathy and on the physicochemical characteristics of the monolayers (Wosten et al. 1994). Class I hydrophobins show very little conservation in their amino acid sequence and vary in size, with different spacings between cysteine residues; these hydrophobins associate into very robust monolayers that are resistant to detergents even at boiling temperatures and require concentrated acids to dissociate. Class I hydrophobin monolayers show a very well ordered rodlet morphology and display the hallmarks of amyloid fibres (Wosten and de Vocht 2000). The amino acid sequences of class II hydrophobins are more conserved, they show less size and inter-cysteine-spacing variability; the corresponding monolayers do not contain amyloid fibres and can be disaggregated with detergents and hot

A. Pille · M. Delepierre · J. Iñaki Guijarro (✉)
Unité de RMN des Biomolécules, Dépt. Biologie Structurale et Chimie, Institut Pasteur, 25 rue Du Dr. Roux, 75015 Paris, France
e-mail: inaki.guijarro@pasteur.fr

A. Pille · M. Delepierre · J. Iñaki Guijarro
CNRS UMR 3528, 75015 Paris, France

A. Pille
Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, IFD, 4 Place Jussieu, 75252 Paris Cedex 05, France

A. H. Kwan · I. Cheung · M. Hampsey
School of Molecular Bioscience, University of Sydney, Sydney, NSW 2006, Australia

V. Aimanianda · J.-P. Latgé
Unité des Aspergillus, Dépt de Parasitologie et Mycologie, Institut Pasteur, 28 rue Du Dr. Roux, 75015 Paris, France

M. Sunde
School of Medical Sciences, University of Sydney, Sydney, NSW 2006, Australia

UNCORRECTED PROOF

Journal : Large 12104 | Dispatch : 20-3-2014 | Pages : 6
Article No. : 9555 | LE | TYPESET
MS Code : BNMR-D-14-00010 | CP | DISK

alcohol solutions. Although some degree of order has been observed for hydrophobins HFBI (Szilvay et al. 2007) and NC2 monolayers (Ren et al. 2013a), class II hydrophobins seem to form less well ordered monolayers. The structures of the soluble forms of hydrophobins from both classes that self-associate into monolayers are quite different but show a common central β-barrel stabilised by the four disulphide bridges and surrounding loops of different length and secondary structure (Sunde et al. 2008). The biological functions of hydrophobins rely on the formation of the amphipathic monolayers. Hydrophobins are used by fungi to breach the air/water barrier and develop aerial hyphae by lowering the surface tension of the aqueous environment, to prevent water-logging, to facilitate aerial growth and spore dispersion, to participate in the extracellular matrix and biofilms as well as to form a protective layer during fruiting body development. Hydrophobins can also participate in host-fungi interactions and have been described as pathogenicity factors in plant- or entomo-pathogenic fungi. The surfactant activity of hydrophobins and the capacity to reverse the wettability of surfaces offers the possibility to use these proteins for different biotechnological applications such as drug delivery, cell attachment, surface functional modification and protein purification. The biological functions, structural knowledge and biotechnical applications of hydrophobins have been reviewed in (Wosten 2001; Scholtmeijer et al. 2001; Tucker and Talbot 2001; Linder et al. 2005; Bayry et al. 2012; Ren et al. 2013b).

Aspergillus fumigatus is an opportunistic pathogen than can cause a variety of diseases in immunocompromised individuals that range from allergies to threatful invasive aspergillosis. This filamentous fungus has become the major aerial fungal pathogen of humans and represents a major burden in terms of morbidity, mortality and cost for hospitals (Hayes and Denning 2013). The conidia, which are the infective form of the fungus, are covered by a rodlet layer formed by the class I hydrophobin RodA (Paris et al. 2003). This proteinaceous coat bestows hydrophobicity to the spores facilitating their dispersal in the air and masks pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) thus rendering the conidia inert relative to the innate and adaptive immune systems (Aimanianda et al. 2009). With the aim of understanding the mechanism of rodlet formation and the rodlet structure, as well as shedding light on the possible links between the structure of RodA and its immunologic characteristics, we are analysing the solution structure of RodA, its self-assembly, the structure of the rodlets and the immunological characteristics of RodA mutants. Here we describe the ^{1}H, ^{15}N, ^{13}C resonance assignments of the soluble form of RodA and the comparison of its secondary structure and dynamics with that of other hydrophobins.

Materials and methods

Protein preparation

The RodA gene sequence (AAB07707) was cloned into a pHUE expression vector used for other hydrophobins (Kwan et al. 2006) to generate the plasmid pHUE-RodA. The resulting plasmid encodes for a fusion protein (H_6-Ub-RodA) of N-terminal hexa-histidine-tagged ubiquitin (H_6-Ub) coupled to RodA and contains a deubiquinating UBP41 enzyme cleavage site between the ubiquitin and RodA proteins. The plasmid also codes for ampicillin resistance.

The protein H_6-Ub-RodA was expressed using the *Escherichia coli* BL21 (DE3) strain. Bacteria were grown at 37 °C in minimal M9 media supplemented with 0.43 g/L of yeast extract without amino acids and without ammonium sulphate (DIFCO), and containing $^{15}NH_4Cl$ (0.52 g/L, ≥98 %) and $^{13}C_6$ glucose (2 g/L, ≥98 %) as sole sources of nitrogen and carbon, respectively. When cultures reached an absorbance of 0.6 at 600 nm, expression was induced with 0.5 mM isopropyl-β-thio-galactopyranoside. Cells were harvested by centrifugation at 6700 g and 4 °C after 3 h of induction, resuspended in 150 mM Tris–HCl, 300 mM NaCl pH 8, re-pelleted by centrifugation and frozen at −80 °C.

The fusion protein was obtained simultaneously from both the soluble and insoluble fractions under denaturing and reducing conditions, purified by affinity chromatography and folded under oxidative conditions. To extract the protein, the cell pellet was thawed and solubilised with buffer A (10 mM TrisHCl, 100 mM NaH_2PO_4, 4 mM β-mercaptoethanol [βME], 8 M urea pH 8). After eliminating the cell debris by centrifugation, H_6-Ub-RodA was loaded into a nickel column (Hitrap™, GE Healthcare) pre-equilibrated with buffer A. The column was successively washed with the equilibrating buffer prepared at pH 8 and at pH 6.3. The fusion protein was then eluted with the same buffer prepared at pH 4.3. Oxidative refolding was performed by dialysis of the eluted protein at 4 °C against the refolding buffer (50 mM sodium acetate, 100 mM NaCl, pH 5) supplemented with a redox glutathione couple (10 mM reduced, 1 mM oxidised).

RodA was obtained from the fusion protein by cleavage with UBP41 and further purification by affinity chromatography and reverse-phase high-pressure liquid chromatography (HPLC). After the refolding step, the H_6-Ub-RodA containing samples were dialysed against the cleavage buffer (50 mM TrisHCl, 50 mM NaCl, 2 mM $CaCl_2$, pH 8) and incubated at 37 °C for 2.5 h in the presence of the deubiquinating enzyme UBP41 (20:1 w:w protein:protease ratio). The UBP41 protease, which contains a hexa-histidine tag and cleaves at a specific C-terminal site on ubiquitin fusions, was previously prepared as described in (Kwan et al. 2006). H_6-ubiquitin, uncleaved

UNCORRECTED PROOF

Journal : Large 12104 | Dispatch : 20-3-2014 | Pages : 6
Article No. : 9555 | LE | TYPESET
MS Code : BNMR-D-14-00010 | CP | DISK

H_6-Ub-RodA and the histidine-tagged UBP41 protease were removed by affinity chromatography on a nickel HiTrap™ column. The column was pre-equilibrated with 50 mM TrisHCl, 300 mM NaCl, 2 mM $CaCl_2$, 20 mM imidazole, pH 8. The cleaved mixture was loaded on the column after adjusting the NaCl and imidazole concentrations to 300 and 20 mM, respectively. RodA was eluted with the equilibrating buffer. A final HPLC purification step using a semi-preparative reverse phase C18 column (PepRPC 15 µm HR 10/10, Amersham Biosciences) was performed to separate the folded from the unfolded/partially folded forms of RodA, as well as to further purify the protein. The HPLC column was equilibrated with 10 % methanol, 0.1 % TFA. After adjusting the pH to ca. 4 with HCl, the RodA sample was loaded on the column and a linear gradient from 0 to 100 % of acetonitrile (90 min) in equilibrating buffer was applied. Folded RodA-containing samples were pooled and lyophilised. Protein concentrations were determined by the bicinchoninic acid assay (BCA, Pierce Thermo Scientific) and/or absorption spectrophotometry, protein identity and integrity were monitored by SELDI-TOF (surface enhanced laser desorption/ionization time-of-flight) mass spectrometry and N-terminal microsequencing (Protein Analysis and Microsequencing Facility, Institut Pasteur), and purity was assessed by sodium-dodecyl-sulphate polyacrylamide gel electrophoresis under reducing conditions and NMR (^{15}N–^{1}H HSQC spectra). In addition, ^{15}N–^{1}H HSQC spectra served to establish the foldedness of the HPLC eluted fractions.

The recombinant protein obtained in this way consists of residues 19–159 of RodA and an additional N-terminal Ser residue that remains after cleavage of the fusion. The 18 N-terminal residues coded by the *RodA* gene, which correspond to the secretion signal and are expected to be cleaved by *A. fumigatus* upon secretion, were not cloned.

Doubly labelled RodA was also extracted by acid treatment from *A. fumigatus* spores obtained from minimal media containing ^{15}N NH_4Cl and $^{13}C_6$ glucose as described (Aimanianda et al. 2009) and purified by reverse-phase C18 HPLC as for the recombinant protein.

NMR spectroscopy

Doubly labelled (^{15}N, ^{13}C) recombinant RodA samples were prepared from lyophilised protein in 20 mM deuterated sodium acetate (CD_3COONa) buffer pH 4.3, 10 % D_2O at a protein concentration of 0.36 mM.

NMR experiments were recorded on an Agilent DirectDrive 600 spectrometer (Agilent Technologies, Santa Clara) with a proton resonating frequency of 599.4 MHz. The spectrometer was equipped with a triple resonance cryogenic probe. Experiments were run at 25 °C and referenced to internal sodium 4,4-dimethyl-4-silapentane-1-sulphonate following IUPAC recommendations. Data were collected using VnmrJ 3.2A (Agilent Technologies), processed with NMRPipe (Delaglio et al. 1995) and analysed with CCPNMR Analysis (Vranken et al. 2005).

Standard two- and three-dimensional experiments were recorded to assign chemical shifts to the protein ^{1}H, ^{13}C and ^{15}N nuclei. Backbone and CB resonances were assigned using [^{1}H-^{13}C/^{15}N] HSQC, HNCO, HNCACB, CBCA(CO)NH, HNCA and HNHA spectra. Side chains signals were assigned through H(CC-TOCSY)NNH, C(CC-TOCSY)NNH, HCCH-TOCSY, (HB)CB(CGCD)HD and (HB)CB(CGCDCE)HE experiments.

Typical spectral widths were 12.6 ppm for ^{1}H, 31.5 ppm for ^{15}N and 80 (aliphatic carbon), 14 (carbonyl), 30 (aromatic carbon), 36 (α carbon), or 22 ppm (β carbon) for ^{13}C spectral regions.

Assignments and secondary structure

Doubly labelled (^{15}N, ^{13}C) recombinant RodA was produced in *E. coli* as a fusion protein with His_6-tagged ubiquitin. The fusion protein was purified under denaturing conditions, refolded in vitro with a glutathione redox couple, cleaved and further purified by affinity chromatography and reverse-phase HPLC. ^{1}H–^{15}N HSQC spectra (Fig. 1) showed a chemical shift dispersion typical of folded proteins.

The ^{1}H, ^{13}C and ^{15}N resonances of RodA were identified following a standard strategy (see Methods) that led to nearly complete assignments. Only side chain exchangeable groups from 4 Asn residues, 8 Lys and one Arg residue, some non-exchangeable side chain resonances (K33 Cδ, K111 Cε$H\varepsilon_2$, F23 Cδ, F85 Cε and CζHζ) as well as 8 backbone carbonyls from residues preceding Pro residues and from the C-terminal residue, were not identified. All assigned chemical shifts have been deposited to the BMRB (accession code: 19782).

The redox state of the eight Cys residues of recombinant RodA was analysed using the Cys Cβ and Cα chemical shifts as described by Sharma and co-workers (Sharma and Rajarathnam 2000). The data is consistent with all the Cys residues being involved in disulphide bonds. Importantly, preliminary analysis of the pattern of ^{1}H-^{1}H nuclear Overhauser effects (nOes) observed in ^{13}C and ^{15}N edited NOESY spectra (not shown), unambiguously indicated that the disulphide bonds are formed by cysteines C1–C6 (39–116), C2–C5 (47–110), C3–C4 (48–88) and C7–C8 (117–135). The latter pattern is in accordance with the one established by chemical methods for other hydrophobins isolated from fungal sources (Kwan et al. 2006) or by X-ray crystallography from recombinant proteins (Hakanpaa et al. 2006a, b), supporting that this pairing is a

UNCORRECTED PROOF

Journal : Large 12104 Dispatch : 20-3-2014 Pages : 6
Article No. : 9555 LE TYPESET
MS Code : BNMR-D-14-00010 CP DISK

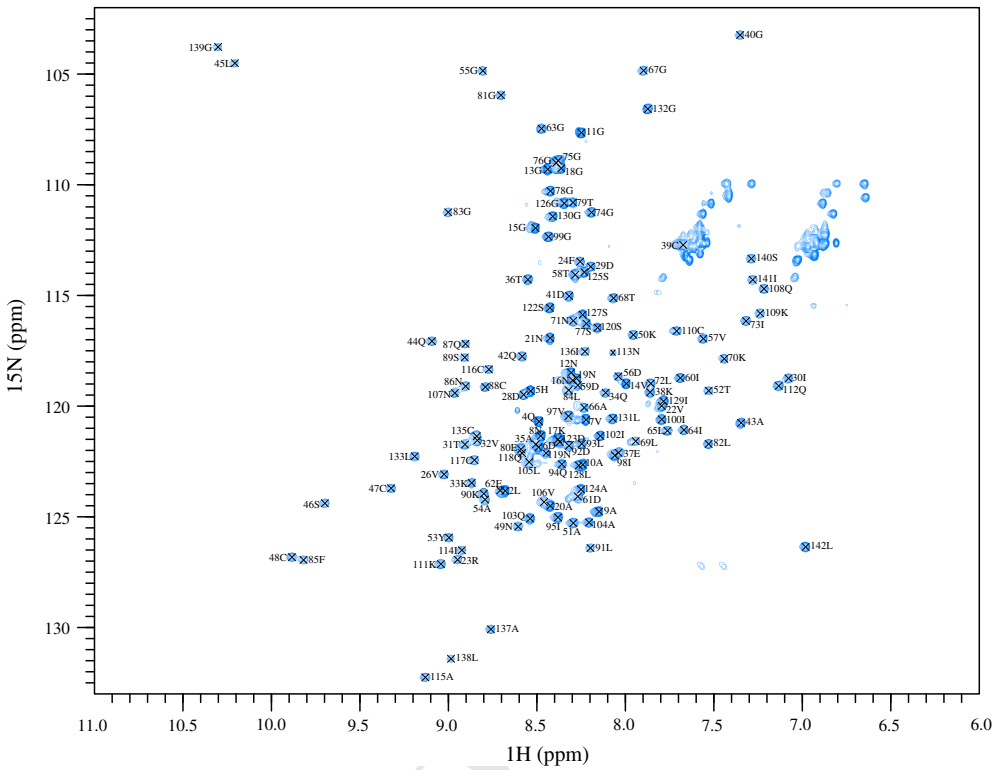


Fig. 1 $^{1}H–^{15}N$ HSQC spectrum of RodA. The spectrum was recorded at 25 °C in buffer CD3COONa 20 mM, 10 % D2O, pH 4.3. Assignments are shown only for backbone amide correlations. Chemical shifts (δ) are expressed in ppm relative to DSS (sodium 4,4-dimethyl-4-silapentane-1-sulphonate)

characteristic feature of hydrophobins. Furthermore, the superposition of $^{15}N–^{1}H$ HSQC spectra of the recombinant protein and the protein extracted from *A. fumigatus* spores (not shown) indicated that the recombinant and *A. fumigatus* proteins show the same structure and disulphide bond pattern. Therefore, the recombinant protein is natively folded and contains the native S–S bond topology.

The secondary structure of RodA was determined from the backbone and Cβ chemical shifts using the PECAN software (Eghbalnia et al. 2005). It consists of four β-strands (S1: Q44–T52, S2: L82–C88, S3: I114–C117, S4: L133–C135) and two α-helices (H1: V32–K38, H2: G63–L72). Except for helix H1, the secondary structure elements are located in the vicinity of cysteine residues (Fig. 2a).

The dynamics of RodA on the nano-pico second time scale were analysed using the RCI method (Berjanskii and Wishart 2005). RCI values, which are a quantitative measure of how close the backbone and CB chemical shifts of a given residue are to their corresponding "random coil" values, are positively correlated with the amplitude of motions on the nanosecond to picosecond time scale. Hence, the higher the RCI value, the higher the flexibility. The RCI values calculated for RodA indicated that the N-terminal region (S1–N19) is disordered and that the loops between cysteine residues C4–C5 and C7–C8, and to a lesser extent a region (N71–T79) of the long C3–C4 loop, are highly flexible (Fig. 2b).

Comparison with other class I hydrophobins

The comparison of the secondary structure and dynamics (RCI values) of RodA, and the class I hydrophobins EAS from *Neurospora crassa* (Kwan et al. 2006), DewA from *Aspergillus nidulans* (Morris et al. 2011a, 2013) and MPG1 from M*agnaporthe oryzae* (Rey et al. 2013) is shown in Fig. 2. The limited sequence similarity and varying length of these hydrophobins is translated into different secondary structures. Nevertheless, the proteins display common features centred on the four conserved disulphide bridges. Indeed, the four hydrophobins show β-strands in the vicinity of all the S–S bonds. This observation strongly suggests that the RodA (and MPG1) structure will show the characteristic β-barrel topology organised around the S–S bridges observed for EAS and DewA, as well as for the class II hydrophobins HFB1 and HFBII (Hakanpaa et al. 2006a, b). Besides the β-barrel secondary structure, two common features can be highlighted for these class I hydrophobins. The first is a C7–C8 loop devoid of secondary structures and the second is, for hydrophobins with long N-terminal regions preceding the first cysteine (C1), a disordered N-terminal sequence of varying length (high RCI values, Fig. 2b) followed by an α-helix close to the first disulphide bridge (C1–C6). In the case of DewA, the latter α-helix packs against the β-barrel and the alignment suggests that this might hold true for RodA and MPG1. The secondary structure content in other regions of the proteins, i.e. in the C3–C4 and C4–C5

UNCORRECTED

Journal : Large 12104 Dispatch : 20-3-2014 Pages : 6
Article No. : 9555 LE TYPESET
MS Code : BNMR-D-14-00010 CP DISK

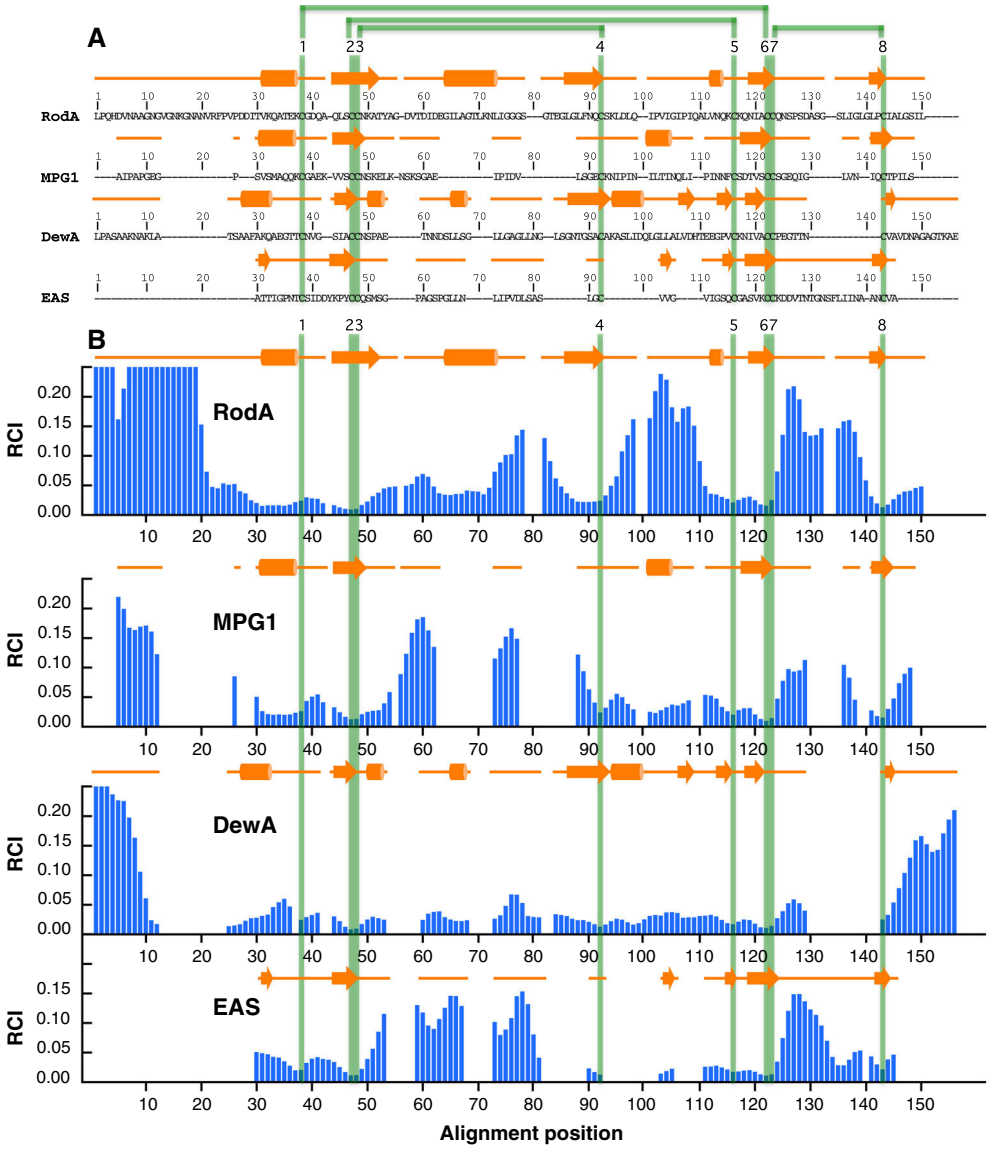


Fig. 2 **a** Sequence and secondary structure alignment of class I hydrophobins. Sequence alignment of class I hydrophobins with known structure and/or published chemical shifts was obtained by manual modification of a ClustalW alignment (Thompson et al. 1994) with constrained cysteine residue positions. Secondary structure was determined from backbone (N, C, Cα, Hα) and Cβ chemical shifts using the PECAN software (RodA and MPG1) or from structural ensembles (DewA and EAS) by means of the DSSP algorithm. α-helices are represented by cylinders and β-strands by arrows. Positions of Cys residues are numbered from 1 to 8 and are highlighted by horizontal green lines, while the disulphide topology is indicated by horizontal green lines. **b** Random coil index (RCI) as a function of alignment position. RCI values were calculated from chemical shifts deposited at the BMRB or in the case of EAS with unpublished chemical shifts, using the RCI software (Berjanskii and Wishart 2005). The RCI of the N-terminal residues of RodA and MPG1 are truncated for visualisation purposes. Secondary structure and Cys positions are displayed as in **a**. In **b**, blank spaces represent gap positions in the sequence alignment. Alignment position for RodA starts at residue 2, i.e., at the first residue belonging to RodA in the recombinant protein used in this work

regions, differs in the four proteins. In these regions, RodA shows two secondary structure elements that are not observed in EAS, DewA or MPG1: a long α-helix in the C3–C4 loop and a short α-helix in the C4–C5 loop. Regarding the nanosecond to picosecond dynamics, the RCI data indicates that the β-barrel region is rather rigid for the four proteins, while the C7–C8 and C3–C4 regions are flexible at least in some segment(s), except for DewA. The C4–C5 region of RodA also shows significant dynamics, a feature not observed in the corresponding region in other hydrophobins.

In summary, our data strongly suggest that RodA adopts the characteristic β-barrel topology observed in other hydrophobin structures, and indicates that it displays novel secondary structure elements, as well as a highly flexible N-terminal region and C4–C5 and C7–C8 loops. Interestingly, the highly flexible C7–C8 loop of EAS contains an

Journal : Large 12104 Dispatch : 20-3-2014 Pages : 6
Article No. : 9555 LE TYPESET
MS Code : BNMR-D-14-00010 CP DISK

amyloidogenic sequence (FLIIN) that has been shown by mutagenesis and peptide experiments to be implicated in the core cross β-structure of the EAS amyloid fibres (Macindoe et al. 2012). Flexibility of regions containing amyloidogenic sequences seems to be an important factor to allow the conformational changes that take place at the interface between hydrophobic and hydrophilic interfaces to form rodlets (Morris et al. 2011b). Amyloid prediction algorithms such as AMYLPRED (http://aias.biol.uoa.gr/AMYLPRED) predict an amyloidogenic sequence in the C7–C8 loop of RodA (data not shown). The assignments presented in this worked open the way for determining the structure of the soluble monomeric form of RodA, which will be valuable for the characterisation of the association mechanism into rodlets and for the study of RodA rodlets, which render the spores of the fungal pathogen *A. fumigatus* inert to the human immune system.

Acknowledgments This work was funded by the ANR-10-Blanc SVSE 3-009 HYDROPHOBIN project, the European Community's Seventh Framework Programme [FP7/2007-2013] under Grant Agreement No: 260338 ALLFUN and the French-Australian Science and Technology (FAST) Program 2011. The 600 MHz spectrometer was funded by the Région Ile de France and the Institut Pasteur. We thank Jacques D'Alayer (Institut Pasteur) for initial SELDI-TOF and for N-terminal sequencing experiments.

References

Aimanianda V, Bayry J, Bozza S, Kniemeyer O, Perruccio K, Elluru SR, Clavaud C, Paris S, Brakhage AA, Kaveri SV et al (2009) Surface hydrophobin prevents immune recognition of airborne fungal spores. Nature 460:1117–1121

Bayry J, Aimanianda V, Guijarro JI, Sunde M, Latge JP (2012) Hydrophobins—unique fungal proteins. PLoS Pathog 8:e1002700

Berjanskii MV, Wishart DS (2005) A simple method to predict protein flexibility using secondary chemical shifts. J Am Chem Soc 127:14970–14971

Delaglio F, Grzesiek S, Vuister GW, Zhu G, Pfeifer J, Bax A (1995) NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. J Biomol NMR 6:277–293

Eghbalnia HR, Wang L, Bahrami A, Assadi A, Markley JL (2005) Protein energetic conformational analysis from NMR chemical shifts (PECAN) and its use in determining secondary structural elements. J Biomol NMR 32:71–81

Hakanpaa J, Linder M, Popov A, Schmidt A, Rouvinen J (2006a) Hydrophobin HFBII in detail: ultrahigh-resolution structure at 0.75 A. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 62:356–367

Hakanpaa J, Szilvay GR, Kaljunen H, Maksimainen M, Linder M, Rouvinen J (2006b) Two crystal structures of Trichoderma reesei hydrophobin HFBI–the structure of a protein amphiphile with and without detergent interaction. Protein Sci 15:2129–2140

Hayes GE, Denning DW (2013) Frequency, diagnosis and management of fungal respiratory infections. Curr Opin Pulm Med 19:259–265

Kwan AH, Winefield RD, Sunde M, Matthews JM, Haverkamp RG, Templeton MD, Mackay JP (2006) Structural basis for rodlet assembly in fungal hydrophobins. Proc Natl Acad Sci USA 103:3621–3626

Linder MB, Szilvay GR, Nakari-Setala T, Penttila ME (2005) Hydrophobins: the protein-amphiphiles of filamentous fungi. FEMS Microbiol Rev 29:877–896

Macindoe I, Kwan AH, Ren Q, Morris VK, Yang W, Mackay JP, Sunde M (2012) Self-assembly of functional, amphipathic amyloid monolayers by the fungal hydrophobin EAS. Proc Natl Acad Sci USA

Morris VK, Kwan AH, Mackay JP, Sunde M (2011a) Backbone and sidechain (1)H, (13)C and (15)N chemical shift assignments of the hydrophobin DewA from *Aspergillus nidulans*. Biomol NMR Assign

Morris VK, Ren Q, Macindoe I, Kwan AH, Byrne N, Sunde M (2011b) Recruitment of class I hydrophobins to the air:water interface initiates a multi-step process of functional amyloid formation. J Biol Chem 286:15955–15963

Morris VK, Kwan AH, Sunde M (2013) Analysis of the structure and conformational states of DewA gives insight into the assembly of the fungal hydrophobins. J Mol Biol 425:244–256

Paris S, Debeaupuis JP, Crameri R, Carey M, Charles F, Prevost MC, Schmitt C, Philippe B, Latge JP (2003) Conidial hydrophobins of *Aspergillus fumigatus*. Appl Environ Microbiol 69:1581–1588

Ren Q, Kwan AH, Sunde M (2013a) Solution structure and interface-driven self-assembly of NC2, a new member of the Class II hydrophobin proteins. Proteins

Ren Q, Kwan AH, Sunde M (2013b) Two forms and two faces, multiple states and multiple uses: properties and applications of the self-assembling fungal hydrophobins. Biopolymers 100:601–612

Rey AA, Hocher A, Kwan AH, Sunde M (2013) Backbone and sidechain (1)H, (13)C and (15)N chemical shift assignments of the hydrophobin MPG1 from the rice blast fungus Magnaporthe oryzae. Biomol NMR Assign 7:109–112

Scholtmeijer K, Wessels JG, Wosten HA (2001) Fungal hydrophobins in medical and technical applications. Appl Microbiol Biotechnol 56:1–8

Sharma D, Rajarathnam K (2000) 13C NMR chemical shifts can predict disulfide bond formation. J Biomol NMR 18:165–171

Sunde M, Kwan AH, Templeton MD, Beever RE, Mackay JP (2008) Structural analysis of hydrophobins. Micron 39:773–784

Szilvay GR, Paananen A, Laurikainen K, Vuorimaa E, Lemmetyinen H, Peltonen J, Linder MB (2007) Self-assembled hydrophobin protein films at the air-water interface: structural analysis and molecular engineering. Biochemistry 46:2345–2354

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res 22:4673–4680

Tucker SL, Talbot NJ (2001) Surface attachment and pre-penetration stage development by plant pathogenic fungi. Annu Rev Phytopathol 39:385–417

Vranken WF, Boucher W, Stevens TJ, Fogh RH, Pajon A, Llinas M, Ulrich EL, Markley JL, Ionides J, Laue ED (2005) The CCPN data model for NMR spectroscopy: development of a software pipeline. Proteins 59:687–696

Wosten HA (2001) Hydrophobins: multipurpose proteins. Annu Rev Microbiol 55:625–646

Wosten HA, de Vocht ML (2000) Hydrophobins, the fungal coat unravelled. Biochim Biophys Acta 1469:79–86

Wosten HA, Asgeirsdottir SA, Krook JH, Drenth JH, Wessels JG (1994) The fungal hydrophobin Sc3p self-assembles at the surface of aerial hyphae as a protein membrane constituting the hydrophobic rodlet layer. Eur J Cell Biol 63:122–129

UNCORRECTED PROOF

Journal : Large 12104 | Dispatch : 20-3-2014 | Pages : 6
Article No. : 9555 | LE | TYPESET
MS Code : BNMR-D-14-00010 | CP | DISK

Amyloïdes fonctionnelles du pathogène opportuniste *Aspergillus fumigatus*

Résumé

Les **hydrophobines** sont de petites protéines fongiques (< 20 kDa) caractérisées par leurs propriétés amphipathiques et un motif idiosyncratique de huit cystéines impliquées dans quatre ponts disulfures. La forme soluble de ces protéines s'auto-assemble aux interfaces hydrophobe/hydrophile ou air/eau pour former une **monocouche amphipatique**. Les hydrophobines sont utilisées par les champignons pour franchir la barrière air/eau et développer des hyphes aériennes, pour recouvrir les spores les rendant hydrophobes, ce qui facilite leur dispersion dans l'air, ou pour participer dans la matrice extracellulaire. Les hydrophobines peuvent également intervenir dans les interactions hôte-champignon. L'hydrophobine RodA du **pathogène opportuniste *Aspergillus fumigatus*** forme une **couche de fibres amyloïdes** avec une **morphologie en bâtonnets** qui recouvre la surface des conidies. Cette couche de bâtonnets rend les spores, qui sont le morphotype infectieux, **inertes vis-à-vis du système immunitaire**. Nous aspirons à décrire l'auto-association de RodA en bâtonnets, caractériser la structure des fibres amyloïdes et établir les potentiels liens entre la structure et l'inertie immunologique. L'hydrophobine recombinante RodA exprimée chez *Escherichia coli* peut être **correctement repliée *in vitro*** et **s'auto-associe sous la forme de fibres amyloïdes** avec la même morphologie que les bâtonnets présents à la surface des spores. Comme première étape dans l'étude de l'auto-assemblage de RodA, la structure et la dynamique de RodA ont été étudiées par RMN en solution. En comparaison aux autres hydrophobines, la protéine présente de **nouveaux éléments structuraux** ainsi que d'autres **conservés**. Grâce à une **étude de mutagénèse**, des régions importantes dans la **formation des fibres** ont été identifiées, certaines impliquées dans le **cœur des fibres** et d'autres dans les **interactions latérales des bâtonnets**. Les **relations** entre la **structure** et les **propriétés immunologiques** ont également été établies. De plus, l'étude d'autres hydrophobines d'*A. fumigatus*, probablement impliquées dans la formation du biofilm (RodB) ou importantes pour la conidiation et la survie des spores (RodC), a été initiée.

Abstract

Hydrophobins are small fungal proteins (<20 kDa) characterised by their amphipatic properties and an idiosyncratic pattern of eight cysteine residues involved in four disulfide bridges. The soluble form of these proteins self-assembles at hydrophobic/hydrophilic or air/water interfaces to form an **amphipatic monolayer**. Hydrophobins are used by fungi to breach the air/water barrier and develop aerial hyphae, to cover spores rendering them hydrophobic, thus facilitating spore dispersal or to participate in the extracellular. Hydrophobins can also be involved in host-fungi interactions. The **RodA** hydrophobin of the threatful opportunistic **pathogen *Aspergillus fumigatus*** forms an **amyloid monolayer** with a **rodlet morphology** that covers the surface of fungal spores. This **rodlet coat renders the spores**, which are the infectious form of the mould, **inert relative to the immune system**. We aim at describing the self-association of RodA into rodlets, characterising the structure of the amyloid rodlets and shedding light on the possible relationships between structure and immunological inertness. **Recombinant RodA** expressed in *Escherichia coli* can be **successfully refolded *in vitro*** and it can **auto-associate into amyloid rodlets** that show the same morphology as the rodlets at the surface of the spores. As a first step in the analysis of the self-association of RodA, we have studied the **structure** and dynamics of RodA by **solution NMR** and shown that the protein **displays new as well as conserved structural features** relative to other hydrophobins. A **mutational analysis** has highlighted important residues for **rodlet formation** that may be involved on the one hand in the **spine of the amyloid fibres** and on the other hand on the **lateral association of the rodlets** to form a monolayer. We have also established the **relationship** between **structure** and **immunological inertness**. Furthermore, we have initiated the study of other hydrophobins from *A. fumigatus*, that are most likely involved in biofilm formation (RodB) or in conidiation and spore survival (RodC).

Mots clés : Hydrophobines ; RodA ; *Aspergillus fumigatus* ; Amyloïdes fonctionnelles ; RMN

Discipline : Biophysique

Adresse du laboratoire : Unité de RMN des Biomolécules
Institut Pasteur
25-28 rue du docteur Roux
75015 Paris