

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Localisation de trois enzymes chez *C. Luciliae*: la glycérol-3-phosphate déshydrogénase, la glycérol kinase et l'hexokinase

Hene, Valérie

Award date:
1991

Awarding institution:
Université de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTES DES SCIENCES
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Tél. 081/72.41.11 - Telex 56222 Facnam-b - Telefax 081/23.03.91

LOCALISATION DE TROIS ENZYMES CHEZ *C.LUCILIAE*: LA GLYCEROL-3-PHOSPHATE DESHYDROGENASE, LA GLYCEROL KINASE ET L'HEXOKINASE

HENE Valérie

Resumé

Des expériences non publiées (Opperdoes et al) ont suggéré une localisation mitochondriale et glycosomiale pour la GDH et la GK de *C.luciliae*. Après centrifugations différentielle et isopycnique, on a localisé la GDH dans ces deux organites et trouvé un poids moléculaire supérieur à son homologue chez *T.brucei*. Par contre, la GK n' a été retrouvée que dans la mitochondrie, avec une activité 1000 fois inférieure à celle de *T.brucei*. L'hexokinase, chez *C.luciliae*, a été localisée dans le glycosome, tout comme chez *T.brucei* mais également dans la mitochondrie et a dans les deux organites, le même poids moléculaire que chez *T.brucei*. La GDH glycosomiale serait impliquée dans l'oxydation du NADH produit dans le glycosome, et la GDH mitochondriale dans le transfert des groupes NADH du cytosol à la mitochondrie. La GK, compte tenu de sa très faible activité, ne jouerait aucun rôle dans la glycolyse anaérobie. Toute son activité proviendrait de la mitochondrie où elle interviendrait dans la formation de glycérol-3-phosphate. La double localisation de l'hexokinase pourrait correspondre à des isoenzymes ou à une seule enzyme adoptant un comportement différent selon sa localisation cellulaire.

Mémoire de licence en Sciences biologiques
Septembre 1991

Promoteurs : Docteur F.R. Opperdoes

Co-promoteur : Docteur M.F. Ronveaux

REMERCIEMENTS

Au terme de ce mémoire, je voudrais exprimer ma profonde gratitude et mes remerciements:

au Docteur F.Opperdoes qui m'a accueillie au laboratoire de recherche des Maladies Tropicales. Sa compétence et sa gentillesse m'ont beaucoup aidées dans ce travail.

au Docteur M.F.Ronveaux, mon co-promoteur

au Docteur M.Callens pour ses conseils en enzymologie et sa sympathie.

au Docteur I.Coppens pour sa collaboration en microscopie électronique.

au Docteur E.Wiemer pour ses nombreux conseils en immunoempreinte

au Docteur P.Michels pour un emprunt qui m'a grandement aidée

à Mr Joris Van Roy pour sa compétence en fractionnement et son soutien constant lors de ce travail.

à Linda Kohl et Philippe Bastin pour leur aide si précieuse en cette fin de mémoire, leur sympathie et leurs nombreux conseils.

à tous les membres de l'Unité Trop pour l'ambiance de coopération, à Nicole pour ses photos.

Je n'oublierai pas Hugues et mes parents qui m'ont soutenue, aidée et encouragée durant toutes ces années d'étude.

TABLE DES MATIERES

RESUME

REMERCIEMENTS

TABLE DES MATIERES

ABREVIATIONS

Chapitre I. INTRODUCTION

I.1.GENERALITES	1
I.2.CLASSIFICATION	2
I.3.TRYPANOSOMA BRUCEI	4
1.Cycle	
2.Métabolisme	5
1.Substrats énergétiques	5
2.Le glycosome	5
A.Localisation de la glycolyse	5
B.Morphologie	5
C.Contenu enzymatique	6
D.Avantage de la compartimentation	6
3.Description du métabolisme	8
A.Forme sanguine	8
1.Glycolyse aérobie	8
2.Glycolyse anaérobie	10
B.Forme insecte	11
I.4.CRITHIDIA FASCICULATA	13
1.Présentation générale	13
2.Intérêt de Crithidia	15
3.Métabolisme	16
1.Substrats énergétiques	16
2.Description du métabolisme	16
I.5.METABOLISME DU GLYCEROL	18
1.Voie métabolique	
2.Enzymes étudiées	19
I.6.BUT DU TRAVAIL	20

Chapitre II. MATERIELS ET METHODES

II.1.SOUS-ESPECE	21
II.2.CULTURE ET COMPTAGE DE CELLULES	21
II.3.LAVAGES ET HOMOGENEISATION DES CELLULES	21
II.4.CENTRIFUGATION DIFFERENTIELLE	22
1.Introduction	22
2.Présentation des résultats	24
II.5.CENTRIFUGATION ISOPYCNIQUE	25
1.Principe	25
2.Fabrication du gradient	26
3.Procédure	26
4.Traitement des fractions après centrifugation	26
II.6.DOSAGES BIOCHIMIQUES	28
1.Dosage des protéines	28
2.Dosage des enzymes marqueurs	29
A.Mannosidase	29
B.Pyruvate kinase	30
C.Malate déshydrogénase	31
D.Hexokinase	31
E.3'nucléotidase	32
F.Catalase	33
3.Dosage de la glycérol-3-phosphate déshydrogénase	33
1.Optimalisation des conditions de dosage	33
2.Centrifugations	34
4.Dosage de la glycérol kinase	34
1.Optimalisation des conditions de dosage et centrifugation différentielle	35
2.Gradient	36
5.Dosage de l'alcool déshydrogénase	36
II.7.OPTIMALISATION DES CONDITIONS DE DOSAGE	37
1.Recherche de pH optimal	37
2.Etude de la linéarité	37
3.Cinétique enzymatique	37

II.8.GEL D'ÉLECTROPHORESE SDS-POLYACRYLAMIDE	38
1.Principe	38
2.Composition du gel	38
1.Gel de séparation	38
2.Gel de concentration	39
3.Préparation des échantillons	39
II.9.IMMUNOEMPREINTE	39

Chapitre III.RESULTATS

III.1.OPTIMALISATION DES CONDITIONS DE DOSAGE	44
1.Recherche du pH optimal	44
2.Activité de la glycérol kinase en fonction du pH	45
3.Etude cinétique	47
1.Glycérol-3-phosphate déshydrogénase	47
2.Glycérol kinase	47
III.2.CENTRIFUGATION DIFFERENTIELLE	49
1.Distribution des protéines	49
2.Distribution des enzymes marqueurs	49
3.Distribution des enzymes étudiées	50
1.Glycérol-3-phosphate déshydrogénase	50
2.Glycérol kinase	50
III.3.CENTRIFUGATION ISOPYCNIQUE	51
1.Distribution des protéines	51
2.Distribution des enzymes marqueurs	52
3.Distribution des enzymes étudiées	55
1.Glycérol-3-phosphate déshydrogénase	55
2.Glycérol kinase	55
3.Hexokinase	55
III.4.DISTRIBUTION DES ENZYMES APRES CORRECTION	55
1.Glycérol-3-phosphate déshydrogénase	55
2.Glycérol kinase	56
3.Hexokinase	56
III.5.ETUDE CINETIQUE	59

Abréviations

AANS: acide aminonaphtosulfonique
AMP: adénosine-5'-monophosphate
ADP: adénosine-5'-diphosphate
DHAP: dihydroxyacétone phosphate
DONS: dioctyl sodium sulphosuccinate
HK: hexokinase
GAPDH: glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
G-3-P: glycérol-3-phosphate
mM: millimolaire
µM: micromolaire
MDH: malate déshydrogénase
MES: 2-(N-morpholino) éthanesulfonic acid
M.U: 4-méthylumbelliféryl- α -D-mannopyranoside
NADH: nicotinamide adénine dinucléotide (forme réduite)
NAD⁺: nicotinamide adénine dinucléotide (forme oxydée)
PEP: phosphoénolpyruvate.
GAP: glycéraldéhyde-phosphate
GDH: glycérol-3-phosphate déshydrogénase
GK: glycérol kinase
LDH: lactate déshydrogénase
PBS: phosphate buffer saline (solution de NaCl 137 mM et de KCl 2,7 mM, tamponnée par du NaH₂PO₄ 8mM et par du KH₂PO₄ 1,5 mM à pH 7,4)
PK: pyruvate kinase
SDS: sodium dodécyl sulfate
TMB: tétraméthylbenzidine
TEA: triéthanolamine
PVDF: polyvinyl

I. INTRODUCTION

I.1. GENERALITES

Les Trypanosomatidæ sont des protozoaires uniflagellés appartenant à l'ordre des Kinetoplastidae.

Ces parasites sont largement répandus: *Trypanosoma* est un parasite des mammifères, des insectes, des oiseaux, des reptiles et des poissons, *Leishmania* infecte les mammifères et les reptiles, *Phythomonas* colonise les plantes et *Crithidia* les arthropodes.

Les trypanosomatidæ sont responsables d'importantes infections parasitaires qui affectent l'homme et le bétail.

En Afrique tropicale, *Trypanosoma brucei rhodiense* et *Trypanosoma brucei gambiense* provoquent la maladie du sommeil. Une étude de l' Organisation Mondiale pour la Santé (OMS) rapporte 25.000 nouveaux cas par an (1989-1990). *Trypanosoma brucei brucei*, *Trypanosoma congolense* et *Trypanosoma vivax* sont responsables d'une maladie similaire chez le bétail: le nagana, qui tue 3 millions de têtes de bétail par an. En Amérique latine, *Trypanosoma cruzi* est l'agent de la maladie de Chagas qui touche 16 à 18 millions de personnes.

Leishmania donovani provoque les leishmanioses viscérales (Kala-Azar) tandis que *L.tropica* et *L.brasiliensis* sont responsables des leishmanioses cutanées et cutanéomuqueuses (au total 400.000 nouveaux cas par an, Modabber, 1987). Les leishmanioses sont répandues dans presque toutes les parties tropicales et sous-tropicales du monde.

I.2.CLASSIFICATION

Les Trypanosomatidæ sont divisés en deux classes d'après le nombre d'hôtes infectés par le parasite au cours de son cycle:

-les Trypanosomatidæ inférieurs ou monoxènes effectuent l'entiereté de leur cycle de vie dans un seul hôte: c'est le cas de *Crithidia* et d'*Herpetomonas*.

-les Trypanosomatidæ supérieurs ou hétéroxènes sont soumis à un passage obligatoire dans deux hôtes: un vertébré et un invertébré: c'est le cas de *Trypanosoma*.

Il existe une autre classification basée sur le type d'hôte. Dans ce cas, les Trypanosomatidæ sont divisés en stercoraires et en salivaires. (voir figure 1.1)

-les stercoraires, comme *Crithidia*, commencent leur développement dans l'estomac et le terminent dans l'intestin ou le rectum de l'insecte comme *Crithidia*. La contamination s'effectue par les fèces.

-les salivaires, comme les trypanosomes africains effectuent leur maturation finale dans les glandes salivaires et sont transmis lors d'un repas sanguin (Mollyneux et Ashford, 1983).

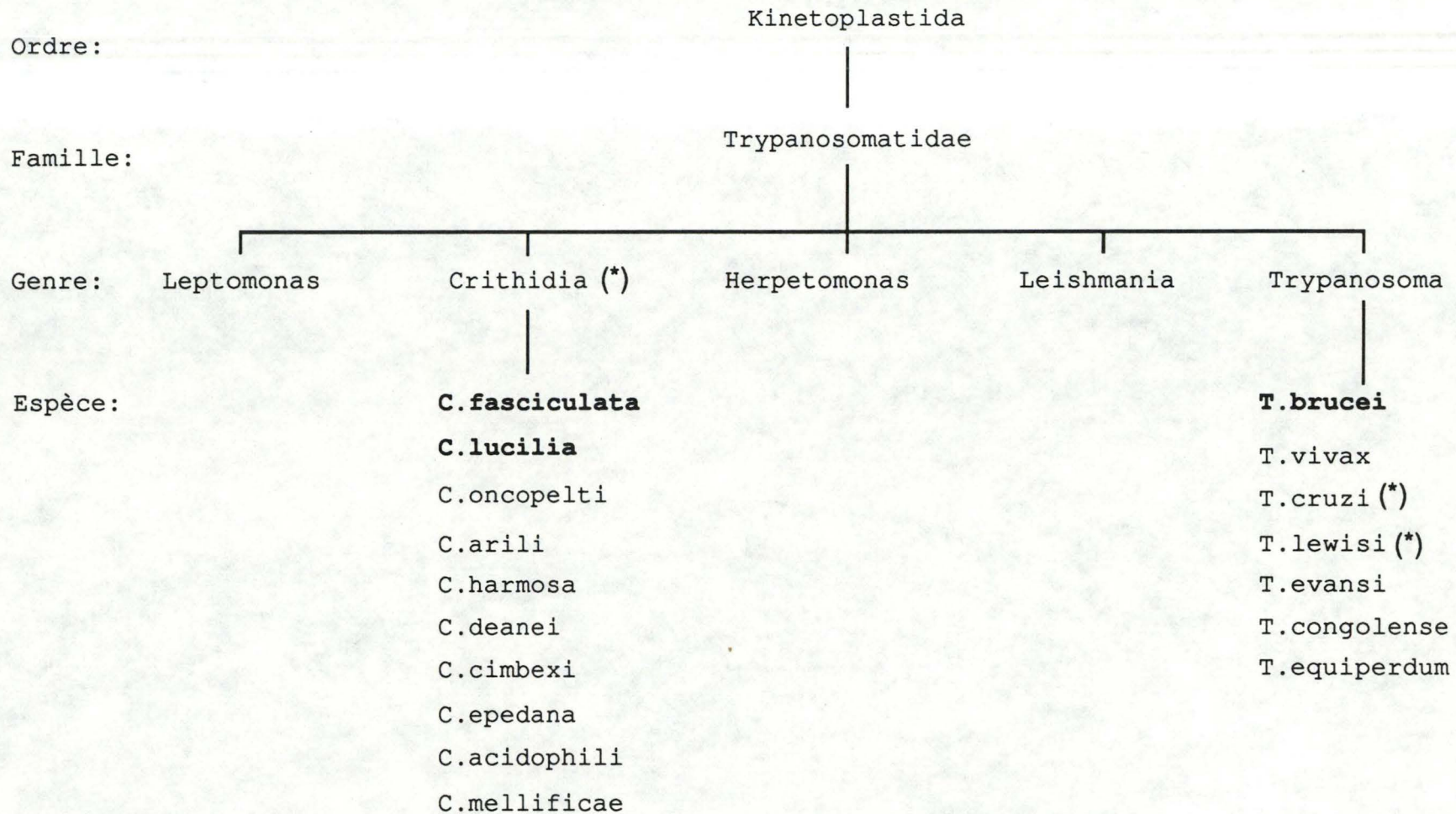


Figure 1.1: Classification des Trypanosomatidae: Chez les Trypanosoma et les Crithidia, les stercoraires sont marqués d'une astérisque (*).

I.3. *TRYPANOSOMA BRUCEI*

I.3.1. Cycle

Trypanosoma brucei brucei est très étudié pour plusieurs raisons: il est très facile à cultiver, il est non pathogène pour l'homme et il est représentatif des *Trypanosoma*. Dans le laboratoire de recherche sur les maladies tropicales, les travaux visent à mieux comprendre le métabolisme de ce parasite en l'étudiant en parallèle avec d'autres trypanosomatidæ (Figure 1.2.).

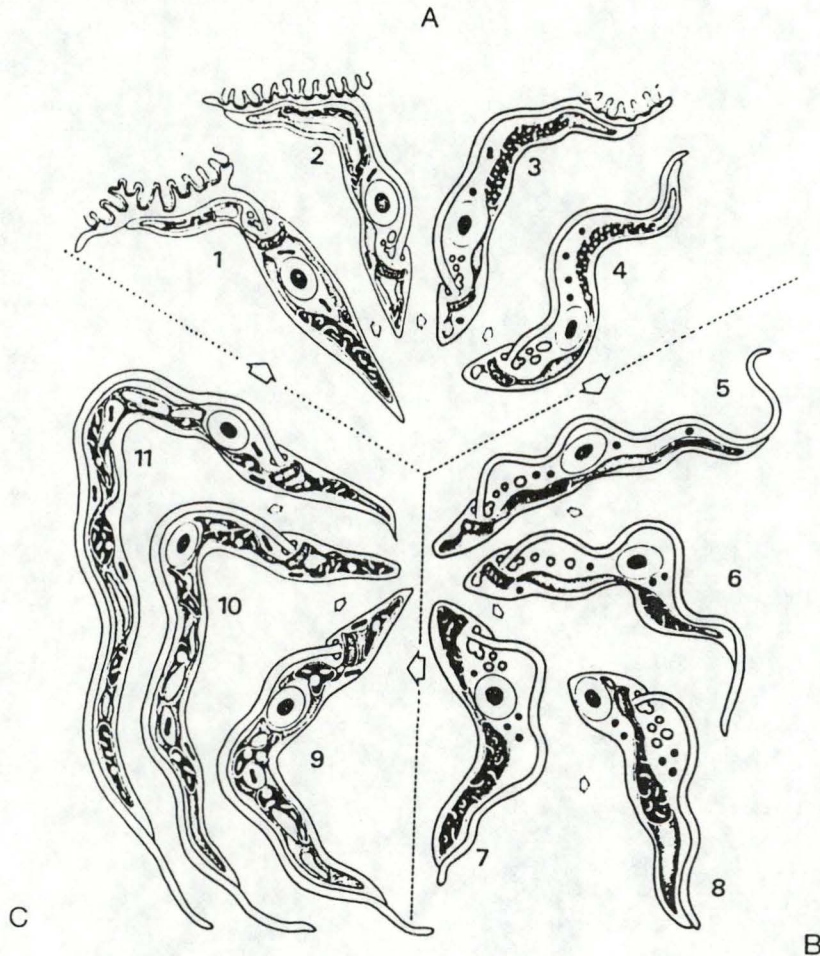


Figure 1.2: Cycle de vie de *Trypanosoma brucei*. (Vickerman, 1985). A. Développement dans les glandes salivaires de la glossine: 1. Forme épimastigote, 2. Forme prémétacyclique, 3. Forme métacyclique naissante, 4. Forme métacyclique mature. B. Développement chez le mammifère: 5. Forme trypomastigote allongée, 6. Forme trypomastigote intermédiaire, 7. Forme trypomastigote courte, 8. Forme trypomastigote postnucléaire courte. C. Développement dans l'intestin de la glossine: 9. Forme procyclique, 10. Forme procyclique établie, 11. Forme mésocyclique proventriculaire.

I.3.2.Métabolisme

I.3.2.1.Substrats énergétiques

La forme sanguine de *Trypanosoma brucei* ne contient pas de réserves d'énergie et est incapable de métaboliser les acides aminés et les lipides. Il dépend donc entièrement d'une source extérieure de sucre (glucose, fructose, mannose) ou de glycérol pour sa production d'énergie (Bowman et Flynn, 1976)

La forme insecte métabolise préférentiellement les acides aminés ou les acides gras (Opperdoes, 1987).

I.3.2.2.Le glycosome

A.Localisation de la glycolyse

Chez tous les Trypanosomatidæ, une grande partie de la glycolyse se réalise au sein d'un organite tout à fait particulier: le glycosome, alors qu' elle est située dans le cytoplasme chez tous les autres eucaryotes (Opperdoes et Borst, 1977)

B.Morphologie

Cet organite ressemble au peroxyosome et au glyoxysome. Chez la forme sanguine, il est sphérique, de diamètre moyen de $0,27\mu\text{m}$ et est entouré d' une simple membrane de 6-7 nm d'épaisseur. Il est constitué d'une matrice homogène, contient parfois un corps cristalloïde et sa densité d'équilibre dans le saccharose est de $1,23\text{ g/cm}^3$.

Chaque trypanosome possède plus ou moins 240 glycosomes, ce qui représente 4% du volume total (Opperdoes et al, 1984). Cependant, les glycosomes sont moins abondants chez les autres trypanosomatidae: la forme promastigote de *L.tropica* comprend 50 à 100 glycosomes et chez la forme amastigote de *L.mexicana*, il n'y en a que 10

C Contenu enzymatique

Le glycosome possède au moins 20 enzymes dont 7 sont impliquées dans la glycolyse: l'hexokinase (HK), la phosphoglucose isomérase (PGI), la phosphofructokinase (PFK), l'aldolase (ALDO), la triosephosphate isomérase (TIM), la glycéraldéhydephosphate déshydrogénase (GAPDH), la phosphoglycérate kinase (PGK). Le glycérol est métabolisé par la glycérol-3-phosphate déshydrogénase (GDH) et par la glycérol kinase (GK). Deux enzymes catalysent l'oxydation des acides gras (caractéristique commune avec le peroxyosome), et sont impliqués dans le sauvetage des purines, la biosynthèse des pyrimidines et des éthers-lipides (Opperdoes et al, 1984). Ces enzymes ont été identifiées chez de nombreux Trypanosomatidae (Tableau 1.1.)

D. Avantage de la compartimentation

La forme sanguine de *T.brucei* métabolise le glucose à une vitesse beaucoup plus élevée que chez les autres eucaryotes. Elle est de 0,08 μ mole.par minute par mg de protéine. Ceci s'explique par les concentrations des enzymes et de leur substrat au sein du glycosome évitant leur dilution dans le cytosol (Opperdoes, 1987)

Tableau 1.1 Contenu enzymatique du glycosome.
T.b:T.brucei, *C.l:Crithidia luciliae*, *C.f:Crithidia fasciculata*, *L.:Leishmania*, *T.c:T.cruzi*. (Opperdoes, 1990)

VOIE METABOLIQUE	ENZYMES	ORGANISMES				
Glycolyse	Hexokinase	Tb	Tc	L	C1	
	Phosphoglucose isomérase	Tb		L	C1	
	Phosphofructokinase	Tb		L	C1	
	Aldolase	Tb		L	C1	
	Triosephosphate isomérase	Tb		L	C1	
	Glycéraldéhyde-phosphate déshydrogénase	Tb		L	C1	
	Phosphoglycérate kinase	Tb		L	C1	
	Métabolisme du glycérol	Glyérol-3-phosphate déshydrogénase	Tb		L	C1
		Glycérolkinase	Tb		L	
Fixation du CO ₂		Phosphoénolpyruvate carboxylkinase	Tb	Tc	L	C1
	Malate déshydrogénase	Tb				
	Synthèse des pyrimidines	Orotate phosphoribosyl transférase	Tb	Tc	L	Cf
Orotidine-5'-phosphate décarboxylase		Tb	Tc	L	Cf	
Synthèse des éthers lipides		DHAP acyltransférase	Tb		L	
	Acyl/AlkyldHAPréductase	Tb				
	Acyl CoA réductase	Tb				
Oxydation des acides gras	Palmitoyl CoA synthétase			L		
	β-OH-butyrate CoA déshydrogénase			L		
Autres	Adénylate kinase	Tb		L		
	Catalase				C1	
	Phosphomannose isomérase	Tb				

I.3.2.3. Description du métabolisme

T. brucei change de forme et de métabolisme en fonction de l'hôte dans lequel il se trouve (voir figure 1.3.). Le sang des mammifères est riche en oxygène et en glucose. Chez la forme sanguine de *T. brucei*, la mitochondrie est réduite à un canal périphérique qui ne contient presque pas de crêtes et le cycle de Krebs est non fonctionnel. Les cytochromes sont absents. Le parasite utilise la glycolyse afin de subvenir à ses besoins énergétiques. (Opperdoes, 1987). Lors du passage à la forme insecte de *T. brucei*, la mitochondria se gonfle et des crêtes tubulaires apparaissent. Le cycle de Krebs devient fonctionnel et les cytochromes sont présents. Ce milieu est riche en acides aminés et est aérobie. Le parasite utilise encore la glycolyse pour ses besoins en ATP mais à un taux réduit et préfère la phosphorylation oxydative (Opperdoes, 1987).

A. Forme sanguine

Chez l'hôte mammifère, le parasite utilise la glycolyse aérobie ou anaérobie selon la quantité d'oxygène disponible pour subvenir à ses besoins énergétiques.

A.1. Glycolyse aérobie

La glycolyse aérobie de *T. brucei* présente plusieurs particularités par rapport à celle des eucaryotes:

-la lactate déshydrogénase est absente: la balance NADH/NAD⁺ est maintenue grâce à une navette glycérol-3-phosphate impliquant une glycérol-3-phosphate déshydrogénase glycosomiale et une glycérol-3-phosphate oxydase mitochondriale insensible au cyanure. Le NADH est donc indirectement réoxydé par l'oxygène moléculaire (Figure 1.4).

-au sein du glycosome, la production et la dégradation de l'ATP s'équilibrent, mais la métabolisation du glucose fournit du phosphoénolpyruvate dont la transformation finale, le pyruvate, seul produit final, fournit un ATP (Opperdoes et Borst, 1977; Opperdoes, 1987).

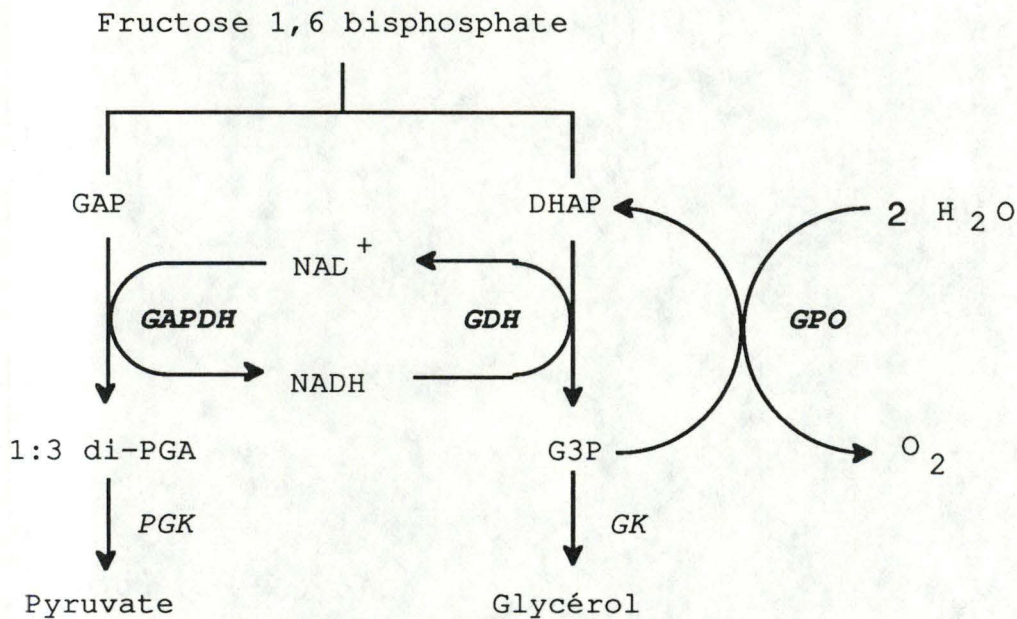
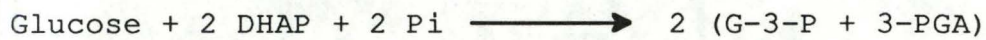


Figure 1.4: Navette de la glycérol-3-phosphate. DHAP: dihydroxyacétone phosphate, GAP: glycéraldéhyde phosphate, 1,3 di PGA: 1,3 diphosphoglycérate, G-3-P: glycérol-3-phosphate, NADH: nicotinamide adénine dinucléotide, GDH: glycérol-3-phosphate déshydrogénase glycosomiale, GK: glycérol kinase, GAPDH: glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase glycosomiale, PGK: phosphoglycérate kinase, GPO: glycérol-3-phosphate oxydase mitochondriale (Bowman et Flynn, 1976)

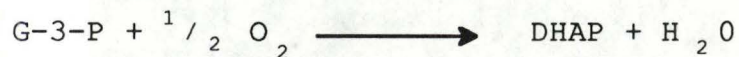
En aérobie, le glycosome catalyse donc les réactions suivantes (Opperdoes et Borst, 1977):



Le 3-PGA quitte le glycosome et est converti en pyruvate dans le cytosol avec une synthèse simultanée d'ATP



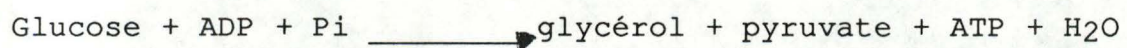
L'autre produit du métabolisme du glycosome est oxydé dans la mitochondrie:



B. Glycolyse anaérobie

Dans ce cas, la glycérol-3-phosphate oxydase mitochondriale n'est plus fonctionnelle. La réoxydation du NADH est effectuée par le biais de la glycérol-3-phosphate déshydrogénase et de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase glycosomiales. L'ATP glycosomial est maintenu par l'action de glycérol kinase. La dismutation du glucose donne deux produits finaux: le pyruvate et le glycérol.

En anaérobie, le glycosome catalyse donc la réaction suivante (Opperdoes et Borst, 1977):



B. Forme insecte

Chez l'hôte insecte *T. brucei* utilise préférentiellement la phosphorylation oxydative mais la glycolyse est encore fonctionnelle. Elle fonctionne à un taux réduit et présente d'importantes différences par rapport à la glycolyse de la forme sanguine (Opperdoes, 1987) :

-des activités très élevées de phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK) et de malate déshydrogénase (MDH) sont associées au glycosome. Ces deux enzymes fixent le CO₂.

-la plupart de la phosphoglycérate kinase (PGK) se retrouve dans le cytosol alors que dans la forme sanguine, elle est associée au glycosome.

-on ne détecte pas d'activité pyruvate kinase.

Comme dans la forme sanguine, dans le glycosome, il y a équilibre entre la quantité d'ATP produit et consommé, et entre synthèse et dégradation de NADH. La synthèse d'ATP est réalisée grâce à la fixation de CO₂ par la PEPCK et la réoxydation du NADH a lieu par l'action de la MDH.

Les produits finaux du métabolisme de cette forme insecte sont, en aérobiose, le succinate, le CO₂, l'acétate. (Cazzulo et al, 1985). En anaérobie, les produits finaux sont le succinate et l'acétate.

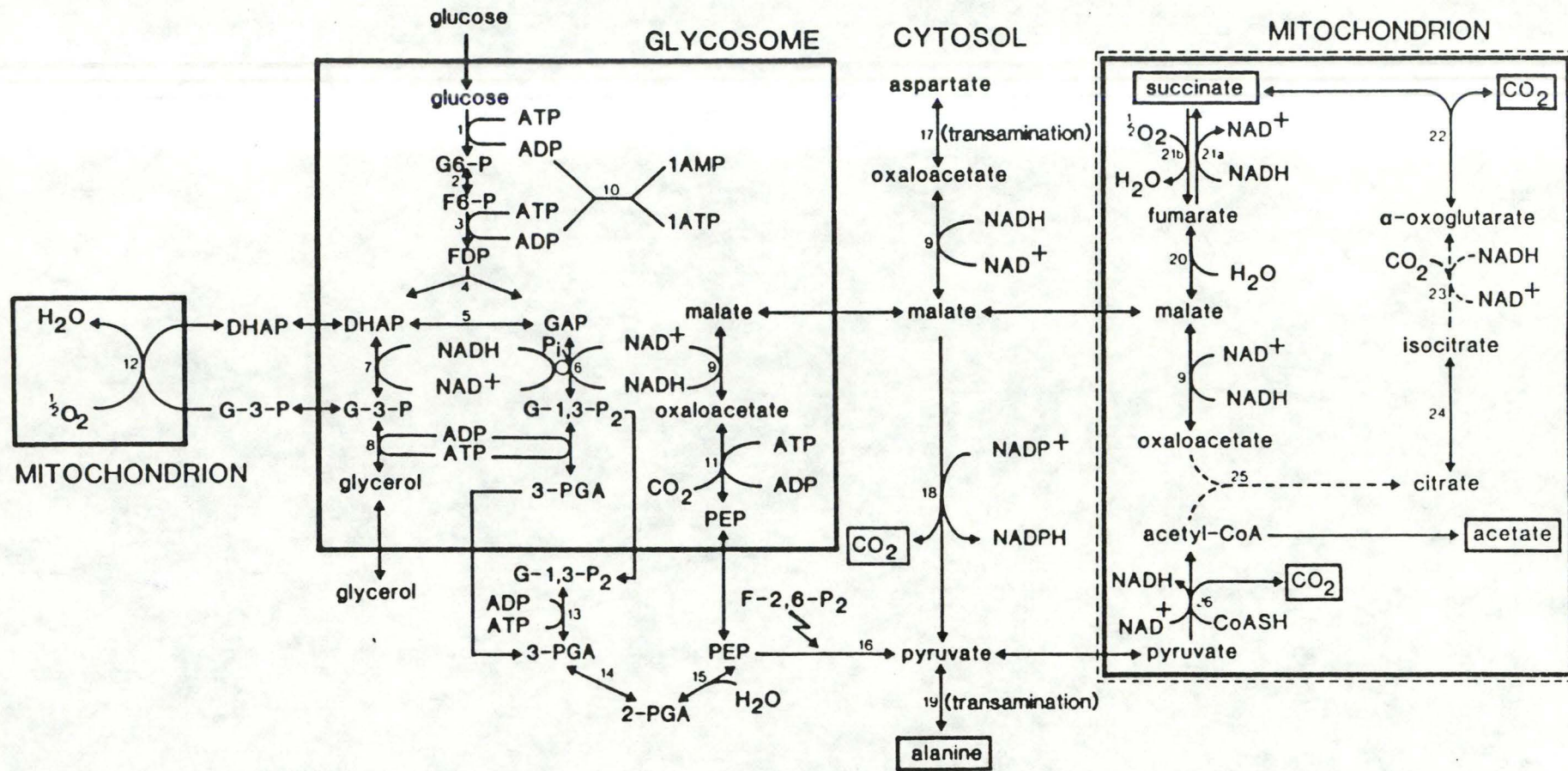


Figure 1.3 : Voies métaboliques du glucose. Les enzymes localisées dans le glycosome et dans le cytosol ont été prouvées mais la localisation des enzymes mitochondriales (à l'exception de la glycérolphosphate oxydase et la malate déshydrogénase) a été clairement démontrée. Les produits finaux du métabolisme aérobie et anaérobie sont entourés de cadre. Les lignes pointillées indiquent les enzymes dont la présence reste incertaine. 1, hexokinase; 2, phosphoglucose isomérase; 3, phosphofruktokinase; 4, aldolase; 5, triosephosphate isomérase; 6, glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase; 7, glycérol-3-phosphate déshydrogénase; 8, glycérol kinase; 9, malate déshydrogénase; 10, adénylate kinase; 11, phosphoénolpyruvate carboxykinase; 12, glycérol-3-phosphate oxydase; 13, phosphoglycérate kinase; 14, phosphoglycérate mutase; 15, énonase; 16, pyruvate kinase; 17, aspartate aminotransférase; 18, enzyme malique; 19, alaline aminotransférase; 20, fumarate hydratase; 21a, succinate déshydrogénase; 21b, succinate déshydrogénase; 22, -oxoglutarate décarboxylase; 23, isocitrate déshydrogénase; 24, aconitase; 25, citrate synthétase; 26, pyruvate déshydrogénase; 27, pyruvate déshydrogénase.

I.4. CRITHIDIA LUCILIAE

I.4.1. Présentation générale

Léger a décrit *Crithidia* en 1902 comme étant un trypanosomatidæ monogénique, parasite des insectes de l'ordre des diptères, hyménoptères, trichoptères et hémiptères. Ce parasite est asexuel, se reproduit par division binaire et existe sous trois formes:

- une forme choanomastigote (voir figure 1.6)
- amastigotes.

Ces deux formes se trouvent dans le tube digestif de l'insecte.

-une forme libre en milieu aqueux ou dans la masse gélatineuse qui entoure les oeufs de l'insecte. (Mc Ghee et Cosgrow, 1980) (Figure 1.5)

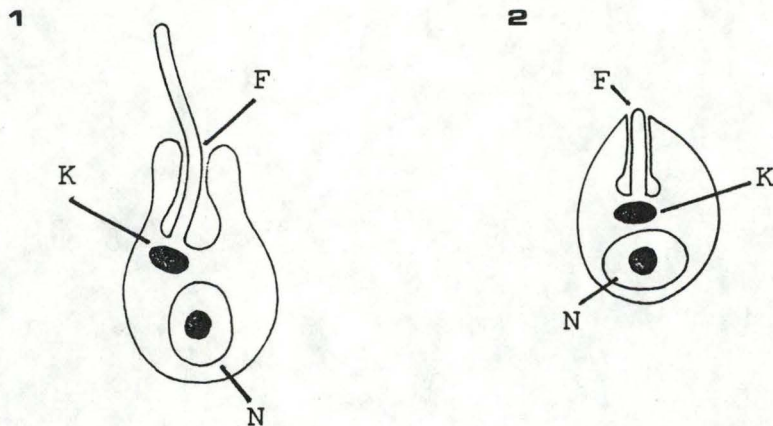


Figure.1.5: Formes choanomastigotes 1 et amastigotes 2 de *Crithidia* (Vickerman, 1976).

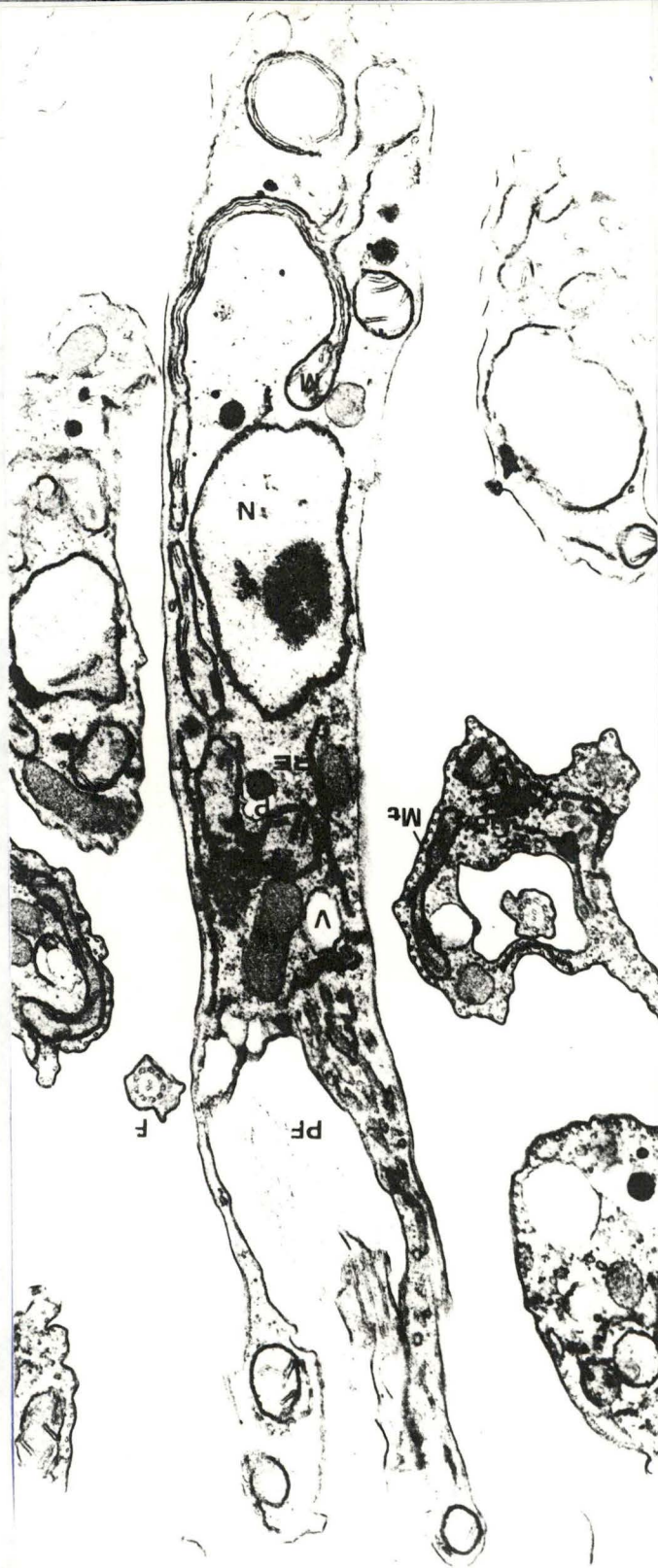


Figure 1.6: Micrographie électronique des formes choanomastigotes de *Crithidia luciliae*.

PF: poche flagellaire, M: mitochondrie, N: noyau; V: vacuole; P: granules de polyphosphate; F: flagelle; RE: réticulum endoplasmique; Mt: microtubules subpélliculaires; Go: appareil de Golgi; Nu: nucléole; G: golgi (X 25.000).

Crithidia a un hôte privilégié non exclusif. Ainsi, il peut infecter l'*Annophèle maculipennis* mais aussi d'autres culicidae. Cette propriété augmente les chances de survie du parasite. Toutefois, la transmission du parasite à la descendance de l'hôte est strictement limitée à son hôte privilégié. La spécificité d'hôte est plutôt définie comme la capacité d'être transmis à la descendance de celui-ci. (Mc Ghee et Cosgrow, 1980)

I.5.2. Intérêt de *Crithidia luciliae*

Crithidia se trouve principalement dans le tube digestif des arthropodes: il est donc susceptible d'avoir un métabolisme très similaire à celui que possède la forme insecte de *T.brucei* et d'autres trypanosomatidæ d'importance médicale, comme *T.cruzi* et *Leishmania*.

Les trypanosomatidæ inférieurs fournissent des modèles d'étude idéaux des trypanosomatidæ supérieurs pour plusieurs raisons:

-*Crithidia luciliae* a été largement utilisé dans les études expérimentales à cause de sa facilité de culture. (Mc Ghee et Cosgrow, 1980).

-ils sont non pathogènes pour l'homme.

-leur métabolisme est moins complexe que celui de *T.brucei* et servira de base à la compréhension de celui-ci.

I.4.3.Métabolisme chez *Crithidia*

I.4.3.1.Substrats énergétiques

Dans l'estomac de l'insecte, *Crithidia* vit dans un environnement pauvre en glucose mais il est capable d'utiliser les hexoses tels que le fructose, le glucose, le mannose. *Crithidia fasciculata* se distingue par son aptitude à se servir des dissacharides comme le maltose et le lactose (Newton et al, 1979).

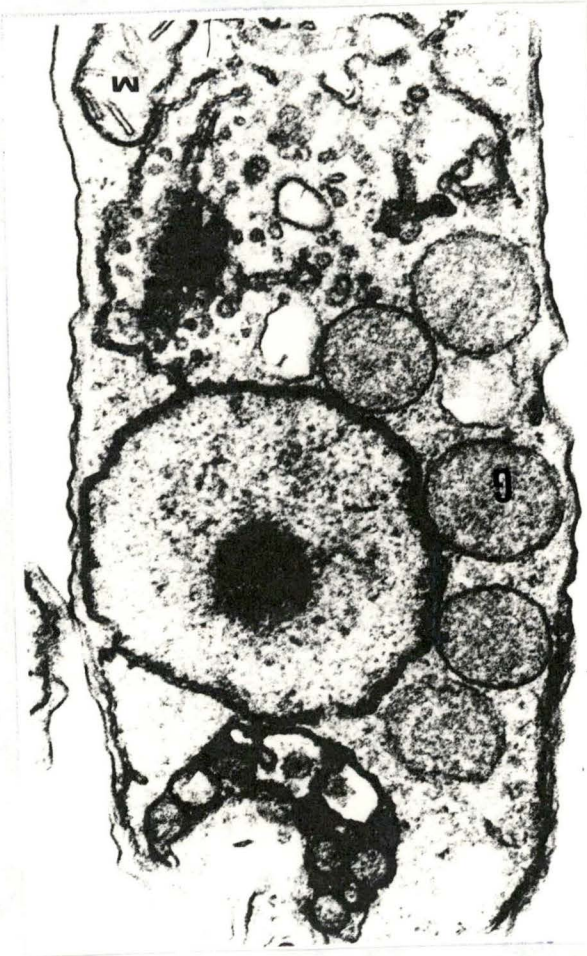
I.4.3.2.Description du métabolisme

Crithidia est localisé dans le tube digestif des insectes qui est un milieu riche en acides aminés et aérobie. Sa mitochondrie (figure 6 et 8A) est fonctionnelle (Bowman et Flynn, 1979).

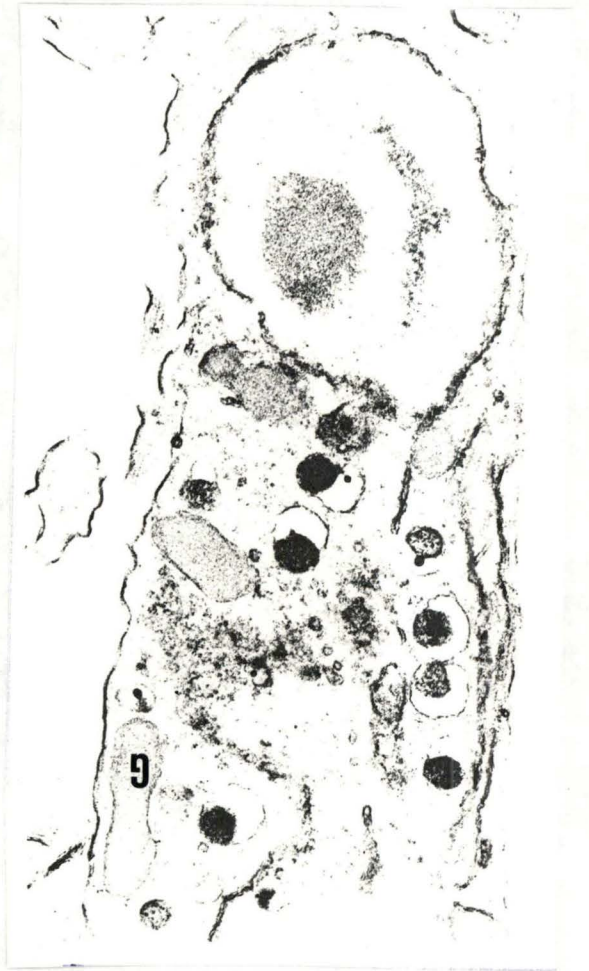
Son métabolisme est très proche de celui de la forme insecte de *T.brucei*. En effet, la phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK) est associée au glycosome, toutefois la malate déshydrogénase glycosomiale n'y a pas encore été détectée de manière indéniable (Cannata et al, 1982).

Les produits finaux du métabolisme sont le succinate, le CO₂, l'acétate. et même l'éthanol (Cazzulo et al, 1985).

Dans le glycosome de *Crithidia* (Figure 8B et 8C), l'activité catalase est présente au contraire de *T.brucei* et de *Leishmania* (Opperdoes et Borst, 1977, Muse et Roberts, 1973).



C



B

A

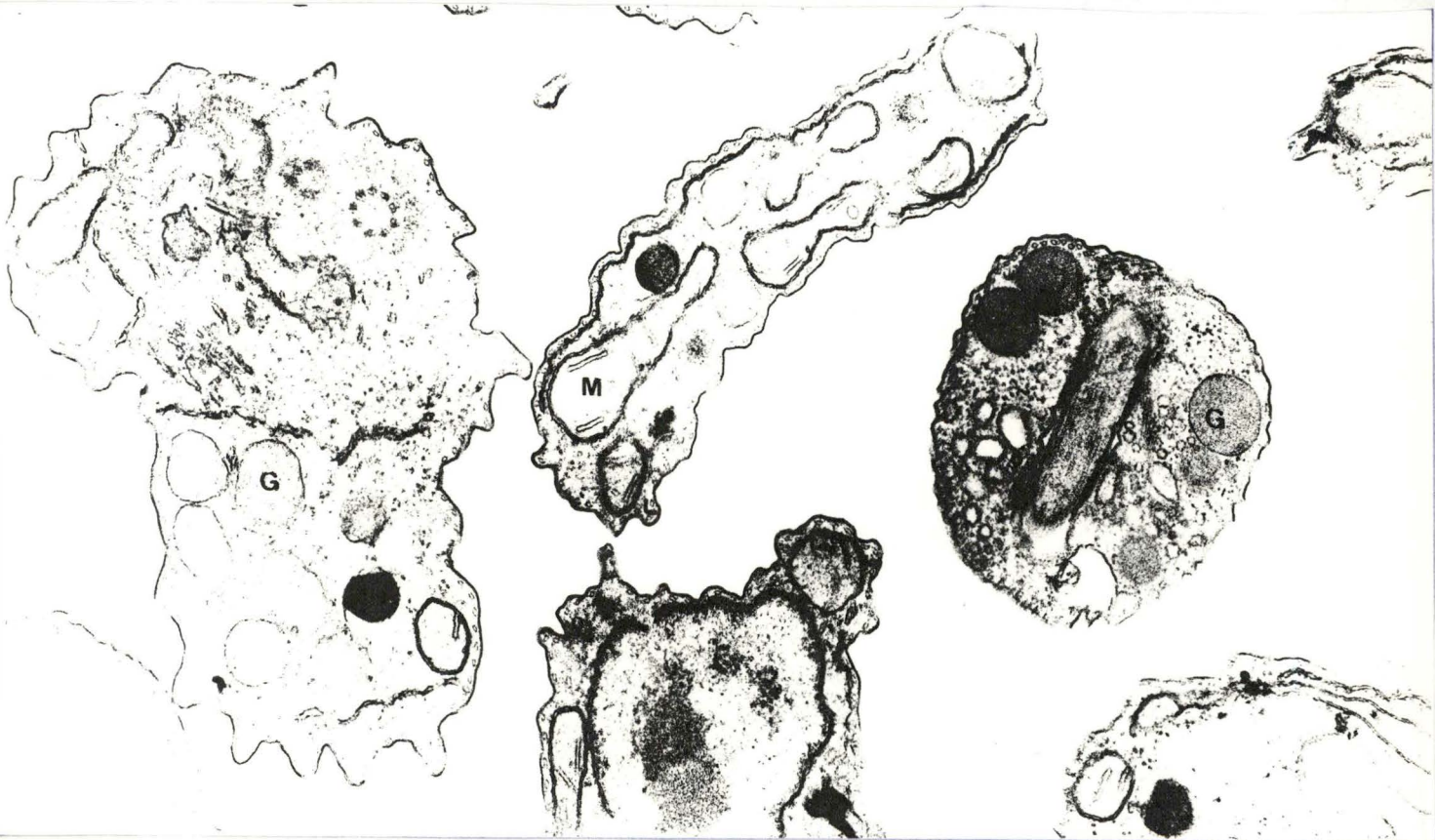


Figure 1.8. Micrographies électroniques des formes choanomagotes de *Crithidia luciliae*.

La mitochondrie (M) très développée possède de nombreuses crtes tubulaires. Les glycosomes (G) sont abondants et ont un aspect hétérogènes: ils sont soit bacilliformes, soit sphériques. (A: X 35.000; B: X 30.000; C: X 75.000).

I.5.VOIE DU METABOLISME DU GLYCEROL

Les deux enzymes étudiées, la glycérol-3-phosphate déshydrogénase et de la glycérol kinase, catalysent la voie métabolique illustrée à la figure 1.9.

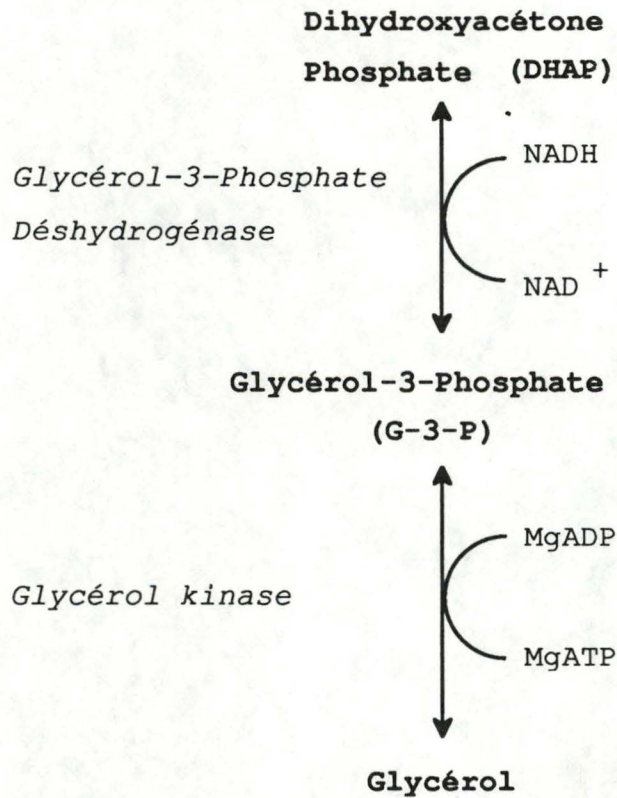


Figure 1.9: Métabolisme du glycérol

I.5.1. Caractéristiques de la glycérol-3-phosphate déshydrogénase et de la glycérol kinase chez *T.brucei*

Tableau.1.2: Caractéristiques de la glycérol-3-phosphate déshydrogénase et de la glycérol kinase chez *T.brucei*. Le poids moléculaire est exprimé en kilodaltons et l'activité enzymatique en $\mu\text{moles}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ de protéines. (Misset et al, 1986)

	GDH	GK
Poids moléculaire (sous unités)	37,2 \pm 0,7	52,7 \pm 0,4
Nombre de sous unités	2	2
Localisation	glycosome	glycosome
Activité	0,42 \pm 0,13	1,3 \pm 0,4

I.6.BUTS DU TRAVAIL

Des expériences non publiées (Oppendoes, communication personnelle) ont révélé, chez *Crithidia luciliae*, une double localisation pour deux enzymes du métabolisme du glycérol (la glycérol-3-phosphate déshydrogénase et la glycérol kinase) chez *Crithidia luciliae*. Ces enzymes ont été localisées dans le glycosome et la mitochondrie alors que chez les autres trypanosomatidæ, elles sont uniquement présentes dans le glycosome. Chez les autres eucaryotes, on les retrouve dans le cytosol. Si cette répartition est exacte, elle signifierait que chez *C.luciliae* une importante partie du métabolisme du glycérol a lieu dans la mitochondrie. Le but de ce travail est de vérifier cette double localisation et si elle s'avère juste, de la comprendre. La localisation des deux enzymes va être étudiée par centrifugations différentielle et isopycniqne en référence à des enzymes marqueurs.

Si il y a effectivement deux localisations, nous tenterons de les caractériser par une étude cinétique et par immunoempreinte.

II. MATERIELS ET METHODES

II.1. SOUS-ESPECE

La sous-espèce *Crithidia luciliae* sur laquelle nous avons travaillé a été aimablement fournie par Mr.M.Steinert (Université libre de Bruxelles).

II.2. CULTURE ET COMPTAGE DES CELLULES

La culture est aérobie et a lieu en milieu semi-défini (SDM 79) selon la méthode de Brun et Schönenberger (1979), modifiée par Steiger .Ce milieu est stérilisé sur filtre (millipore 0,22 μm) et l'aseptie est assurée par de la pénicilline 0,2%. L'hémine (2mg/ml) assure les besoins en fer des cellules et on rajoute 10% de sérum de veau foetal (inactivé à 56° C pendant 30 minutes). La température optimale de croissance de *Crithidia* (28°C) est maintenue dans un incubateur FORMA SCIENTIFIC. Deux fois par semaine, $2 \cdot 10^5$ cellules/ml sont diluées dans du milieu frais de manière à conserver les parasites en phase logarithmique de croissance. Les cellules sont fixées avec de la glutaraldéhyde (0,1%, v/v) et sont comptées dans une chambre de Pétroff-Hausser.

II.3. LAVAGES ET HOMOGENEISATION DES CELLULES

Les cellules sont lavées et précipitées dans du STE [saccharose 250 mM, tampon Tris-HCl 25 mM pH 7,2, EDTA 1 mM] à 4°C pendant 10 minutes à 1000 g.

Les parasites sont placés dans un mortier préalablement refroidi (4°C) en présence d'une quantité deux fois plus importante de grains abrasifs de carbure de silice (SiC) d'environ 300 mesh [BDH chemicals corporation England]. Ils sont écrasés avec le piston jusqu'à ce que 90% des cellules soient lysées, ce qu'on vérifie au microscope. Les grains abrasifs sont éliminés par trois lavages (3 minutes à 1000g).

II.4.CENTRIFUGATION DIFFERENTIELLE

II.4.1.Introduction

La centrifugation différentielle d'un homogénat de *Crithidia luciliae* permet d'obtenir cinq fractions enrichies chacune en un ou plusieurs types de constituants cellulaires.

N- la fraction nucléaire est enrichie en noyaux mais contient aussi les cellules non brisées et des débris cellulaires,

M- la fraction à gros granules est enrichie en mitochondrie,

L- la fraction à petits granules est enrichie en lysosomes et en glycosomes,

P- la fraction microsomiale est enrichie en petits systèmes membranaires,

S-la fraction soluble contient tout ce qui n'est pas sédimentable.

Après lavage et homogénéisation, les cellules sont resuspendues dans tampon STE et soumises à la centrifugation différentielle décrite à la figure.2.1

Homogénat chargé
de grains abrasifs

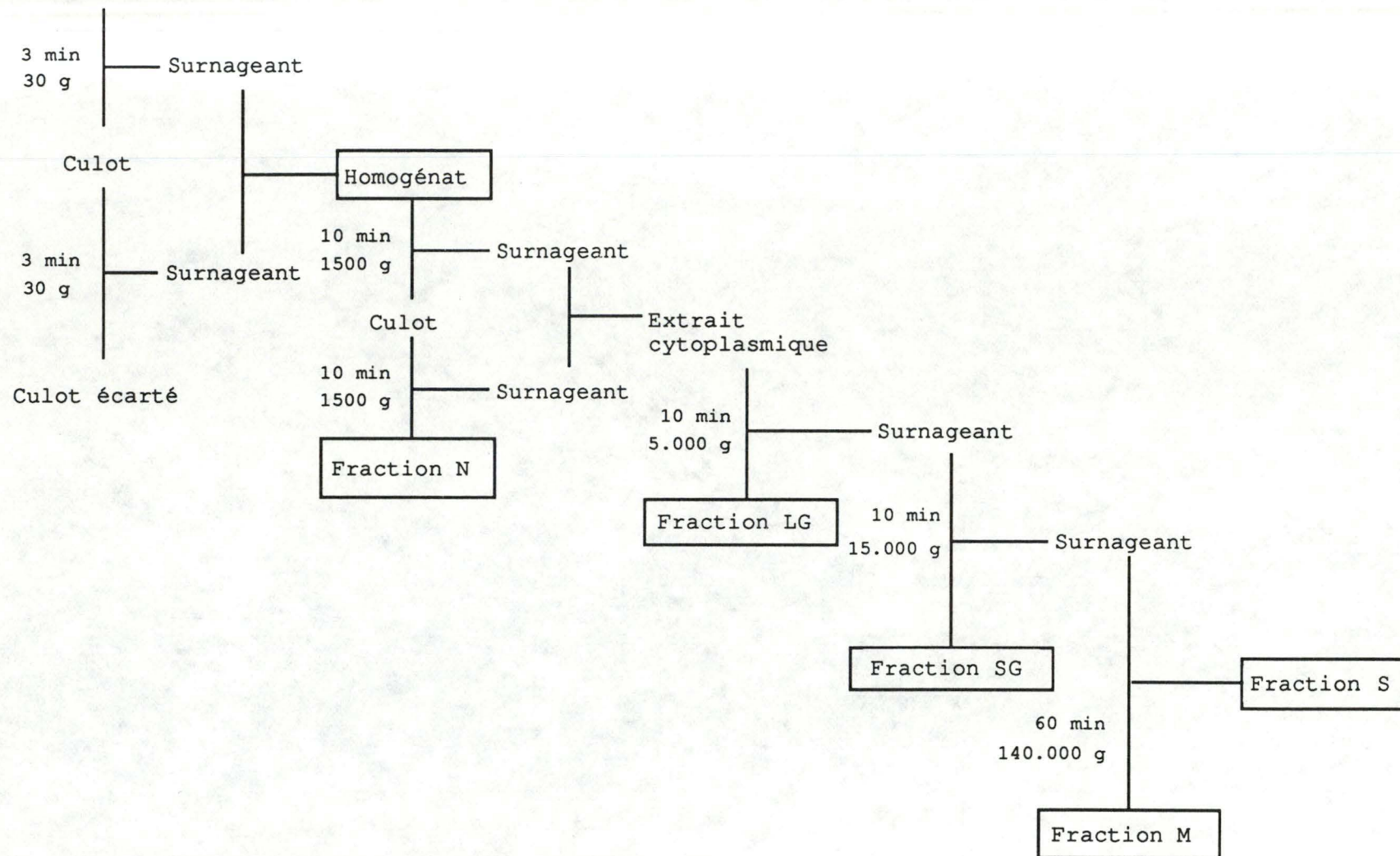


Figure 2.2: Schéma de la centrifugation différentielle

II.4.2. Présentation des résultats

En centrifugation différentielle, les résultats sont présentés sous forme d'histogramme.

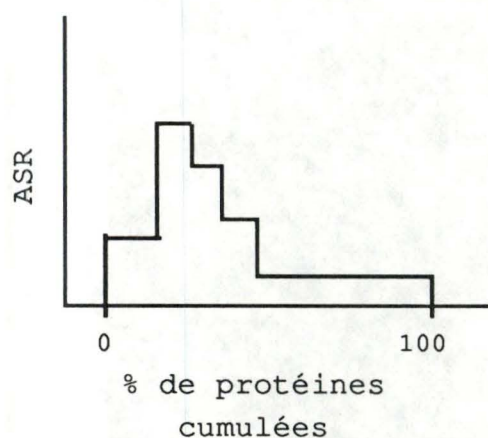


Figure 2.2: Présentation des résultats en centrifugation différentielle. L'ordonnée représente l'activité spécifique relative et l'abscisse représente le pourcentage cumulé de protéines.

L'activité spécifique relative (ASR) est calculée selon la formule suivante:

$$\text{ASR} = \frac{\frac{\text{Quantité d'enzyme dans la fraction}}{\text{Quantité totale d'enzyme dans l'homogénat}}}{\frac{\text{Quantité de protéine dans la fraction}}{\text{Quantité totale de protéine dans l'homogénat}}}$$

La quantité d'enzyme est l'activité exprimée en nmoles par min et la quantité de protéines est exprimée en mg. L'aire de chaque bloc, c'est-à-dire l' ASR multipliée par le pourcentage de protéines donne la quantité d'enzyme mesurée dans la fraction. La hauteur donne le degré de purification de l'enzyme.

La récupération (R) est une mesure de la validité du fractionnement et elle se calcule de cette façon:

$$R = \frac{N + M + L + P + S}{PN + N} \times 100 \%$$

N: activité totale dans la fraction nucléaire

M: activité totale dans la fraction à gros granules

L: activité totale dans la fraction à petits granules

P: activité totale dans la fraction microsomiale

S: activité totale dans la fraction soluble

PN: activité totale dans la fraction cytoplasmique

II.5.CENTRIFUGATION ISOPYCNIQUE

II.5.1.Principe

La centrifugation isopycni que se déroule dans un gradient de saccharose. Les organites sont centrifugés jusqu'à équilibre, c'est-à-dire jusqu'au moment où ils atteignent une zone de densité en saccharose qui est égale à leur propre densité.

II.5.2.Fabrication du gradient

Le gradient linéaire de saccharose est préparé grâce un "formeur de gradient" Beckman. Celui-ci contient deux seringues dont l'une est remplie d'une solution de saccharose 2,5 M, de Tris-HCl 25 mM pH 7,2, d'EDTA 1 mM, de densité 1,31 g/cm³, et l'autre d'une solution de Tris-HCl 25 mM pH 7,2), d'EDTA 1 mM, de densité 1 g/cm³. Le gradient se forme par l'écoulement progressif des deux solutions dans un tube de polyallomère, contenant 2 ml d'une solution de sucrose 2,7 M, 25 mM de Tris-HCl (pH 7,2), 1 mM EDTA, de densité 1,34 g/cm³. Le tube est refroidi pendant une heure à 4°C et est soudé après dépôt de l'échantillon.

II.5.3.Procédure

Après lavage et homogénéisation, le surnageant de la fraction à gros granules est déposé sur le gradient et la centrifugation isopycniqne est effectuée comme décrit à la figure 2.3

II.5.4.Traitement des fractions après centrifugation

Après centrifugation, le gradient est pompé hors du tube et 15 fractions de 3 ml.sont collectées. Chaque fraction est pesée et aliquotée en eppendorf de 1ml. L'indice de réfraction est lu sur un réfractomètre (With et Abbe) thermostatisé à 20°C. Le réfractomètre calcule aussi le pourcentage correspondant en saccharose et la densité est estimée à partir de tables expérimentales. Le volume de chaque fraction est calculé à partir de sa densité et de son poids. Les protéines sont dosées et les fractions sont stockées dans l'azote liquide.

Homogénat et
grains abrasifs
dans 5 ml de STE

1500 g,
10 minutes

Surnageant 1

Culot resuspendu
dans 3 ml de STE

1500 g,
10 minutes

Surnageant 2

Culot resuspendu
dans 2 ml de STE

1500 g,
10 minutes

Surnageant 3

Culot écarté

Surnageants
(± 10 ml)

2000g,
10 minutes

Surnageant
(± 7 ml)

Culot écarté

150 minutes,
190000 g

Surnageant:
Organites purifiés

figure II.2. centrifugation isopycnique

II.6.DOSAGES BIOCHIMIQUES

II.6.1.Dosage des protéines

Le dosage des protéines s'effectue selon la méthode de Böhlen *et al*, 1973. La mesure de la fluorimétrie nous permet de calculer une valeur de la quantité en protéines. L'étalon est le sérum albumine bovine (Sigma) de qualité V (0,1 mg/ml).

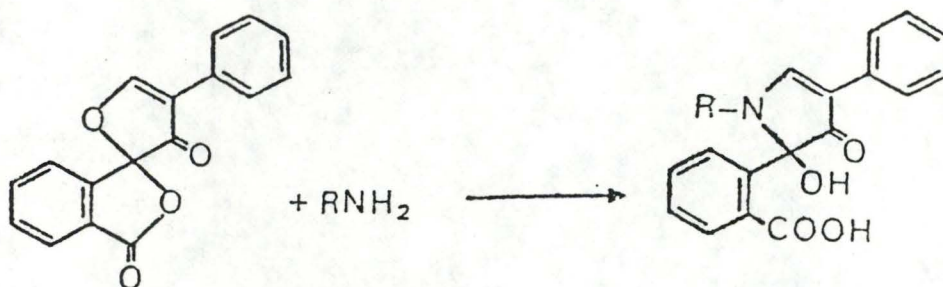


Figure 2.4 Principe du dosage des protéines

Pratiquement, les protéines sont solubilisées dans le déoxylate (1% dans 0,01 N NaOH), et diluées dans du tampon phosphate de potassium (50 mM pH8). Ensuite, la fluorescamine (150µg/500µl) est ajoutée sous agitation constante au vortex. La lecture se fait directement avec une longueur d'onde d'excitation de 398 nm et une longueur d'onde d'émission de 475 nm (spectrofluorimètre Perkin-Elmer).

II.6.1.2. Dosage des enzymes marqueurs

Plusieurs enzymes ont été utilisées afin de caractériser les fractions de la centrifugation différentielle et du gradient: ce sont les enzymes marqueurs.

Enzymes choisies

Tableau 2.1 *Enzymes marqueurs: localisation et code*

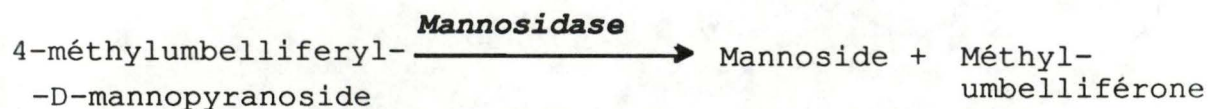
ENZYME	LOCALISATION	CODE
3'nucléotidase	membranes plasmiques	EC.3.1.3.6
Mannosidase	lysosome	EC.3.2.1.24
Pyruvate kinase	cytoplasme	EC.2.7.40
Hexokinase	glycosome	EC.2.7.1.1
Malate déshydrogénase	mitochondrie	EC.1.1.1.37

Les enzymes marqueurs sont dosées selon les méthodes publiées. Tous les dosages ont été effectués à 28°C, température de croissance optimale de *C. luciliae*. Les mesures spectrophotométriques s'effectuent pendant 3 minutes dans un volume final d'1 ml..Lors de chaque dosage, on ajoute 0,1% de Triton (concentration finale).

A. Mannosidase

Cette enzyme hydrolyse les résidus alpha-D-mannoses terminaux et non réduits en alpha-D-mannosides. L'activité enzymatique est mesurée par la libération du méthylumbelliféron fluorescent à partir du substrat 4-méthylumbelliféryl-alpha-D-mannopyranoside (M.U).

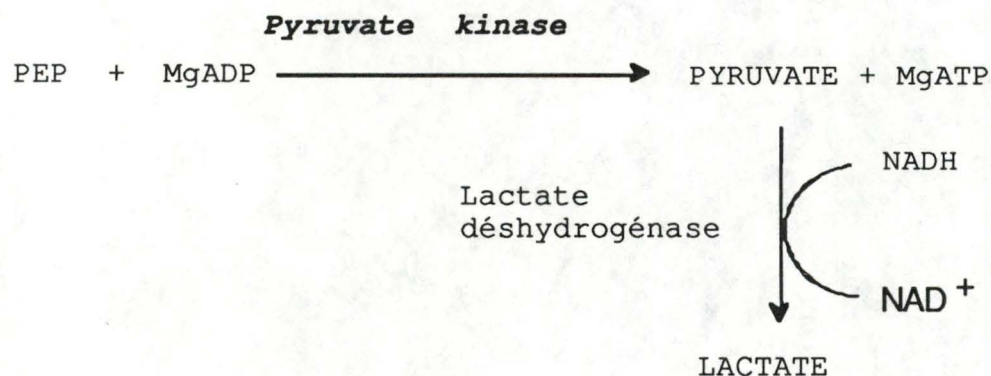
Le test est effectué en double et le blanc est soustrait dans chaque échantillon. La méthode de dosage est fluorimétrique (spectro-fluorimètre Perkin-Elmer.) Cet appareil est équipé de deux filtres de détection: un à 366 nm qui détecte le M.U conjugué, l'autre à 460 nm qui mesure le M.U anionique.



L'extrait à doser est incubé pendant 120 minutes dans du tampon citrate 0,1M (pH4,6) contenant 10 mM de 4-méthylumbelliféryl-D-mannopyranoside, 0,1% de triton-X100 et 1 mM de $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$ et la réaction est arrêtée avec 2 ml de tampon carbonate 0,5M pH 10,7.

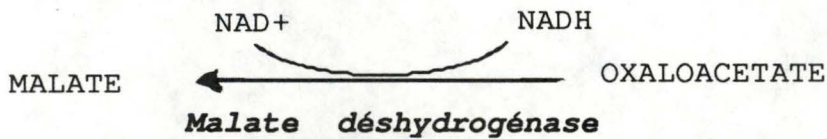
B. Pyruvate kinase

Cette enzyme a deux substrats: le phosphoénolpyruvate (PEP) et l'ATP. Le dosage s'effectue de manière indirecte: le pyruvate produit est réduit en lactate par la lactate déshydrogénase commerciale tandis que le NADH oxydé est mesuré par spectrophotométrie (340 nm).



L'échantillon est dilué dans du tampon TEA 0,05M (pH 7,2) contenant 6 mM de $MgSO_4 \cdot H_2O$, 50 mM de KCl, 2 mM d'ADP.Na₂, 0,42 mM de NADH, 2,5 mM de phosphoénolpyruvate, et de 2 mM $KHCO_3$ et 10 $\mu g/ml$ de lactate déshydrogénase (Boehringer, Allemagne).

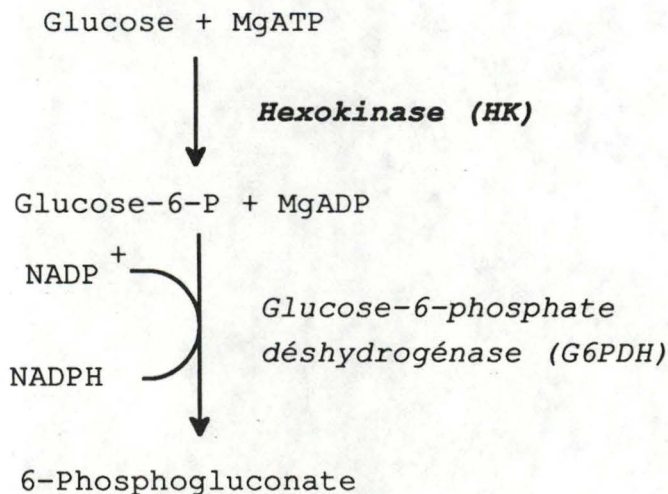
C. Malate déshydrogénase



L'extrait à doser est dilué dans un tampon Tris-HCl 0,1M (pH 8) contenant 1 mM d'oxaloacétate, 1 mM d'EGTA, 0,5 mM de NADH et du triton 0,1%. Le NADH oxydé lors de la réduction de l'oxaloacétate est mesuré à 340 nm au spectrophomètre.

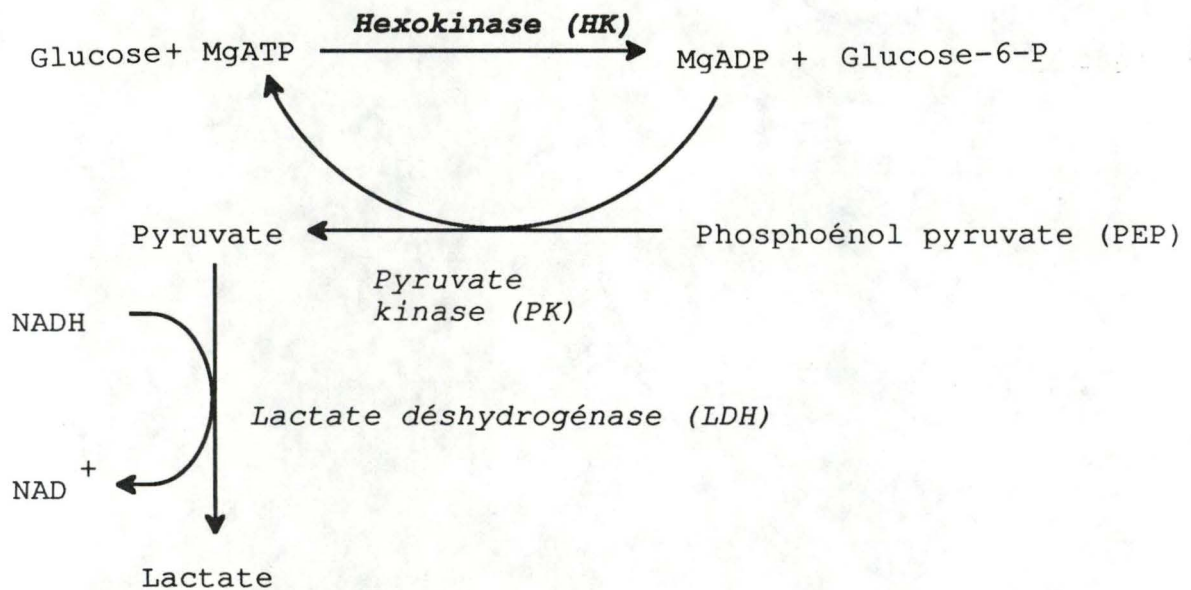
D. Hexokinase

1. La mesure est indirecte: l'activité enzymatique est détectée par la production de NADPH (340 nm au spectrophotomètre) par la glucose-6-phosphate déshydrogénase.



L'échantillon à doser est dilué dans du tampon TEA 0,1M (pH 7,6) contenant 10mM de glucose, 10mM de MgCl₂·6H₂O, 0,66 mM d'ATP et de NaHCO₃, 0,64 mM de NADP et 10µg de G6PDH (Boehringer) par ml.

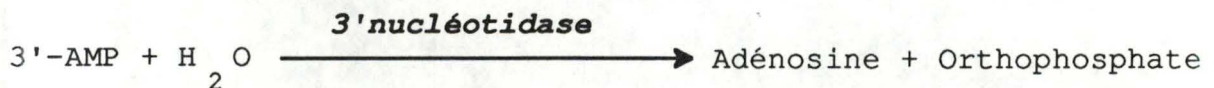
2. Lors des corrections, on a utilisé un autre test pour doser l'hexokinase.



L'extrait à doser est dilué dans du tampon TEA 0,1M pH 7,6 contenant 10 mM de glucose, 2,2mM de phosphoenolpyruvate, 2,5 mM de MgSO₄·7H₂O, 10mM de KCl, 2,5mM d'ATP, 0,42mM de NADH, 50µg/ml de lactate déshydrogénase et 10µg de lactate déshydrogénase..

E.3'nucléotidase

Le substrat est l'adénosine 3'-monophosphate



La réaction est arrêtée par l'addition de 200 μ l d'acide trichloroacétique 12,5%. Les tubes sont gardés sur glace pendant au moins 30 minutes et ensuite centrifugés 1 minute à 10.000 g. A 250 μ l de surnageant, on ajoute 1,9 ml d'H₂O, 0,25 ml de molybdate d'ammonium 2,5%. et 0,1 ml du chromogène, l'acide aminonaphtosulfonique. Après 10 minutes, la lecture se fait à 660 nm au colorimètre VITA (selon Fiske et Subbarow)

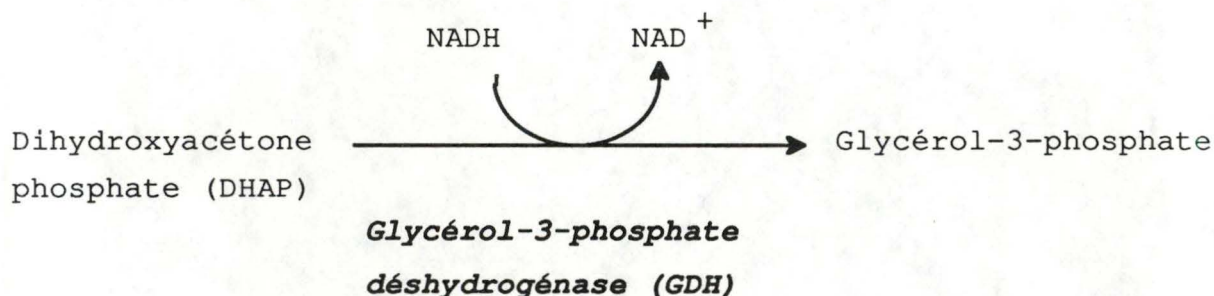
F.Catalase

Les dosages s'effectuent à 240 nm dans des cuvettes de quartz. L'extrait à doser est dilué dans du tampon Tris-HCl 0,438M (pH 7,4) contenant 0,1% de triton X-100. Une première lecture est faite pendant deux minutes. Le substrat, l'H₂O₂, est ajouté (10mM) .On effectue alors une seconde lecture.pendant 2 minutes.

II.6.3.Dosage de la glycérol-3-phosphate déshydrogénase

A.Optimalisation des conditions de dosage.

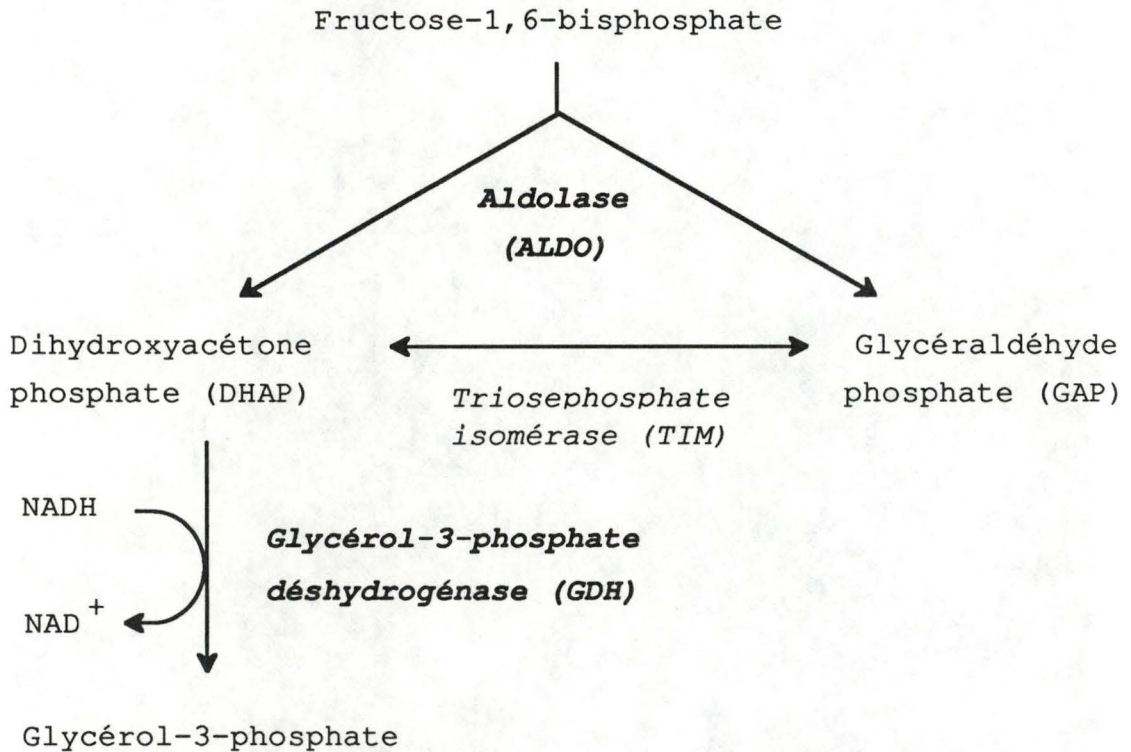
Le dosage de la glycérol-3-phosphate déshydrogénase a été effectué à 340 nm sur UVIKON-KONTRON selon la méthode et les conditions suivantes:



L'échantillon à doser est incubé dans du tampon MES 0,05M (pH 6,5) contenant 2mM DHAP, 1mM DTT, 250mM NaCl, 50 μ m NADH, et 0,1M du tampon adéquat.(voir II.7)

B. Dosage en centrifugations

Lors de ce dosage, on mesure l'oxydation du NADH au spectrophotomètre à 340 nm.



L'échantillon est incubé dans du tampon TEA 0,1M (pH 7,6) contenant 1 mM de fructose-1,6-biphosphate, 0,42 mM de NADH et de NaHCO₃, 1 mM d'EDTA, 10µg/ml d'aldolase (Boehringer) et 1µg/ml de triosephosphate isomérase (Boehringer).

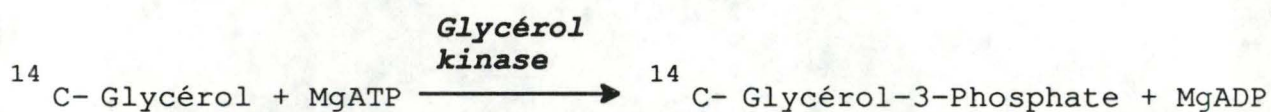
II.6.4. Dosage de la glycéról kinase

Le dosage de cette enzyme a été effectué par deux méthodes différentes: un dosage radioactif et un dosage spectrophotométrique.

A Optimisation des conditions de dosage et centrifugation différentielle

Le dosage de la glycérol kinase a été effectué selon la méthode radiométrique de Fairlamb adaptée par North et Newton (1973).

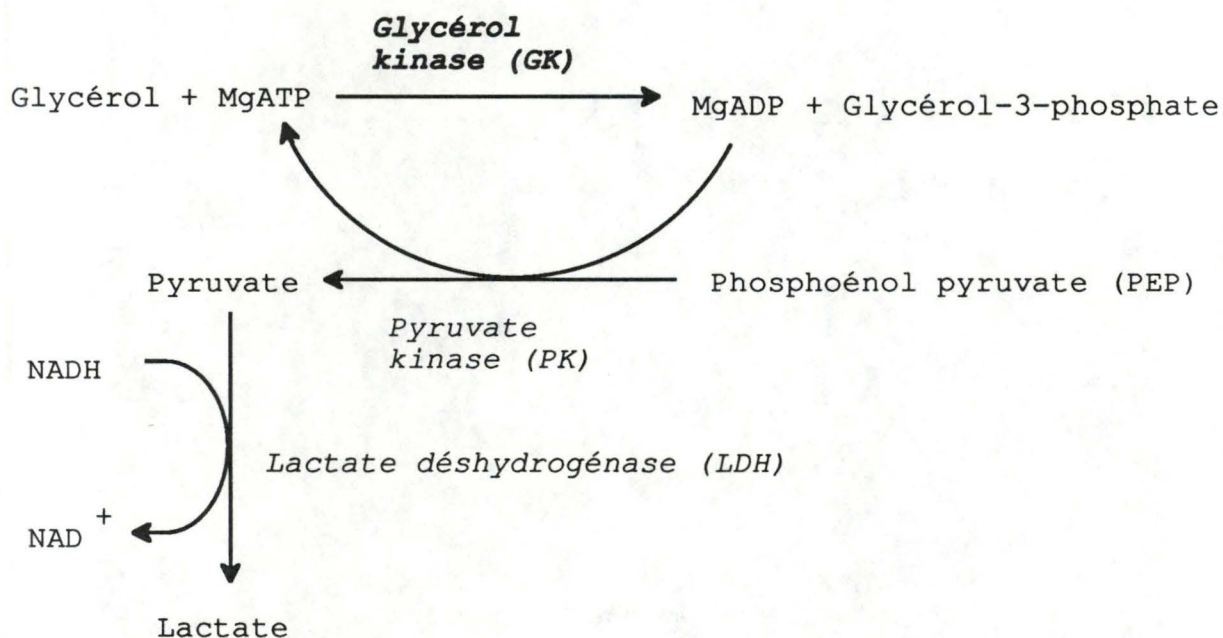
20 μ l de glycérol 15 mM (marqué au ^{14}C (140-180 mCi/mmol dans éthanol CFB 174 AMERSHAM, GB) est incubé à 28°C en présence des différents tampons (cfr II.7), d'EDTA- Na_2 (1mM), MgSO_4 (1 mM), NaF (22 mM), d'ATP (3,3 mM), de DTT (1mM) et de protéines cellulaires pendant 1 heure au cours de laquelle a lieu la réaction enzymatique suivante:



La réaction est arrêtée avec 120 μ l d' éthanol absolu. On prélève 20 μ l de chaque tube et on le dépose sur des disques en papier DEAE [Grade-DE-81]. Après séchage, les disques sont lavés successivement dans un bain de glycérol 4% et deux bains d' H_2O filtrée. Seul le ^{14}C glycérol-3-phosphate reste fixé au filtre. Ceux-ci sont submergés dans du liquide scintillant (OptiPhase 'Hisafe' II de LKB SCINTILLATION PRODUCTS, England) et la radioactivité proportionnelle à la quantité de ^{14}C -glycérol-3-P est mesurée grâce à un LIQUID SCINTILLATION COUNTER WALLAC 1410 (PHARMACIA). Les standards contiennent 150 nanomoles de ^{14}C -glycérol/20 μ l

B. Dosage en gradient

Le dosage est une mesure spectrophotométrique de l'oxydation du NADH (340 nm).



L'extrait à doser est incubé dans du tampon TEA 0,1 M (pH 7,6) contenant 5 mM de glycérol, 2,5 mM de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 10 mM de KCL, 2,5 mM d'ATP, 2,2mM de phosphoénol pyruvate, 0,42 mM de NADH et $NaHCO_3$, 10 μ g de lactate déshydrogénase et de pyruvate kinase (Boehringer).

II.6.1.5. Dosage de l'alcool déshydrogénase

Cette enzyme a été dosée dans le but de tester la présence de bactéries dans le gradient. La cuvette (1ml) contient de l'éthanol 25%, 820 μ l de tampon pyrophosphate de sodium 0,1M (pH9), 10 μ l de glutathion (30mg/ml), 70 μ l de NADH (20mg/ml) et 10 μ l d'hypochloride de semicarbazide (25mg/ml) pH 6,5. et 50 μ l d'échantillon dilué dans le triton 0,1%.

II.7.OPTIMALISATION DES CONDITIONS DE DOSAGE DE GLYCEROL-3-PHOSPHATE DESHYDROGENASE ET LA GLYCEROL KINASE

II.7.1.Recherche d'un pH optimal

L'activité de ces deux enzymes a été testée avec deux tampons de pH différents et de force ionique constante (0,1). La zone de pH comprise entre 5 et 7 est couverte par le tampon 2-(N -morphilo) éthane sulfonique (MES) (0,05 M) tandis que la zone basique pH 7 à 8,8 a été testée avec le tampon triéthanolamine (TEA) 0.1 M. Les tests ont été effectués avec 100 µg de protéines cellulaires par ml de test pour les dosages de la glycérol-3-phosphate déshydrogénase et avec 50 µg pour la glycérol kinase. Les substrats sont utilisés en concentration optimales: 7,5 mM pour le ¹⁴C glycérol et 2 mM pour le dihydroxyacétone phosphate. Les dosages de ces deux enzymes sont décrits en II.6.3 et II.6.4.

II.7.2..Etude de la linéarité

L'activité enzymatique des deux enzymes (GDH et GK) a été testée avec différentes concentrations de protéines cellulaires afin d'établir la linéarité de la réaction en fonction des protéines cellulaires (pour les conditions de dosage voir II.6.2.). Le pH est optimal et les cofacteurs sont utilisés en concentration saturante. Les dosages sont décrits en II.6.1.3. et en II.6.1.4.

II.7.3.Etude cinétique

Une étude cinétique a été réalisée sur la glycérol-3-phosphate déshydrogénase provenant de cellules entières. La concentration en dihydroxyacétone phosphate varie tandis que tous les autres paramètres sont utilisés dans des conditions optimales. Le dosage est décrit en II.1.3.6. Une autre étude cinétique a été réalisée sur l'hexokinase: seule la concentration en glucose varie et les autres paramètres sont utilisés en conditions optimales. Le dosage est décrit en II.6.1.2.D

II.8.GEL D'ELECTROPHORESE EN SDS-POLYACRYLAMIDE

II.8.1. Principe

Cette technique permet de séparer les protéines en fonction de leur poids moléculaire et d'estimer celui-ci.

Le dodécyl sulfate de sodium est un détergent qui déroule la protéine et se lie fortement aux résidus hydrophobes par sa chaîne hydrophobe. Chaque molécule de détergent porte une charge négative. Il suffit de 0,1% de dodécyl sulfate de sodium pour saturer les chaînes polypeptidiques avec approximativement une molécule de détergent pour deux résidus. Les protéines sont toutes chargées négativement et leur séparation dépend de leur taille. Le poids moléculaire des échantillons est estimé par comparaison à des polypeptides de poids moléculaire connu (Pharmacia: 8µg de chaque protéine/8µl): 94 000 daltons pour la phosphorylase b, 67 000 pour la sérum albumine bovine, 43 000 pour l'ovoalbumine, 30000 pour l'inhibiteur de la trypsine de soja et 14 400 pour l'alpha-lactalbumine.

II.8.2. Constitution du gel

Le gel de polyacrylamide est formé d'un gel de séparation et d'un gel de concentration

A. Gel de séparation

Ce gel est un gradient formé grâce à deux solutions d'acrylamide de concentrations différentes. Le gradient est fabriqué au moyen d'un formeur de gradient (Biorad modèle 385) contenant deux compartiments: l'un est rempli d'une solution d'acrylamide 15%/0,8% bisacrylamide (p/v), et de saccharose 4mM, l'autre d'une solution d'acrylamide 10%/0,8% bisacrylamide (p/v), chacun contenant le tampon du gel de séparation Tris-HCl pH 8,8, 375 mM.

A chaque solution, on ajoute 6 μ l de TEMED et 25 μ l de d'ammonium persulfate 10% (p/v) afin de provoquer la polymérisation de l'acrylamide (trois heures) Le gel est de taille 14 cm x 18 cm et d'épaisseur 0,7mm.

B. Gel de concentration

Le gel est constitué d' acrylamide 4%/0,8% bisacrylamide, de tampon Tris-HCl 0,125 M (pH 6,8), de 6 μ l de TEMED et de 25 μ l de persulfate d'ammonium .Ce gel se polymérise en une heure.

II.8.3. Préparation des échantillons

Les échantillons de 10 à 150 μ g sont bouillis une minute et demi à 100°C en présence de SDS 5%, de betamercaphtoéthanol 25%, de glycérol 50%, de bleu de bromophénol 0,025%. Ils sont alors rapidement chargés dans les puits du gel de concentration et la cassette contenant le gel est placée dans une cuve à électrophorèse (PHARMACIA GE-4, Suède) contenant 5 litres de tampon (50 mM Tris, 385 mM glycine, 0,1% SDS, pH 8,3). La migration a lieu durant toute une nuit sous voltage constant (100 volts).

II.9. IMMUNOEMPREINTE

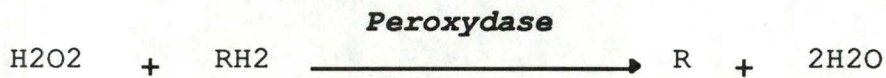
Avant le transfert, les membranes (Nitrocellulose Hybond-C, Amersham, ou PVDF Immobilon-P, Millipore) sont trempées quelques secondes dans des bains successifs de méthanol et d'H₂O et pendant 20 minutes dans un tampon contenant 25 mM de Tris-base (pH8,3), de 192 mM de glycine et de 20% de méthanol. Le pourcentage de rétention des protéines en fonction du type de membrane et de la solution de saturation est présenté dans le tableau 2.2. Le transfert a lieu pendant toute une nuit sous courant constant (250 milliampères).et s'effectue dans le tampon décrit ci-dessus.

Tableau 2.1: Rétention des protéines absorbées après exposition aux solutions de saturation: comparaison de l'immobilon PVDF transfert membrane et de la nitrocellulose. D'après Pluskal *et al*, 1986

		% de rétention des protéines après exposition aux solutions de saturation			
Type de membrane	mem- Capacité de liaison de protéines	Temps (h)	Lait en poudre 5%	BSA 5%	PBS
Membrane de transfert immobilon PVDF	190,4	1	84,6	95	99,1
		22	73,6	90,5	94,0
Nitrocellulose	251,7	1	58,2	74,5	97,2
		22	37,4	54,1	91,0

Après le transfert, les membranes sont lavées trois fois 10 minutes dans du tampon PBS-Tween'20 0,05% (v/v) (NaCl 137 mM, KCl 3 mM, Na₂HPO₄·2H₂O 6,5 mM, KH₂PO₄ 1 mM). La saturation des sites s'effectue pendant 30 minutes dans la sérum albumine bovine (BSA) 5% dilué dans le PBS-Tween. Ensuite a lieu l'incubation de l'antisérum (1/500) dans la solution de saturation. Les membranes sont lavées 3 fois 10 minutes dans PBS-Tween'20. Suit alors l'incubation de la protéine A-peroxidase pendant une heure. Les membranes sont lavées dans les mêmes conditions que précédemment.

L'activité peroxydase est révélée par un colorant spécifique (RH₂). Nous en avons utilisé deux.



Tout d'abord, le 4-chloro-1-naphthol (60mg/200ml) dissout dans de l'éthanol 10%, dans du tampon PBS 90% et de l'H₂O₂ 0,03%. La révélation s'effectue en 30 minutes.

Ensuite, nous avons employé une solution (63 ml) contenant 0,25ml de tétraméthylbenzidine (1mM dans l'acétone), 12,5 ml de dioctyl sodium sulphosuccinate (4mM dans l'éthanol), 50 ml de CH₃COOH (50 mM pH5,4) et 25ml d'H₂O₂ (30%). Après la coloration, les membranes doivent être transférées dans une solution de post-coloration contenant 13,5 ml de dioctyl sodium sulphosuccinate dans de dissout dans 50 ml d'H₂O afin de stopper la réaction.

III. RESULTATS

III.1. OPTIMALISATION DES CONDITIONS DE DOSAGE

Le métabolisme de *C.luciliae* est moins bien connu que celui de *T.brucei*. Avant tout essai de localisation, il faut d'abord optimiser les conditions de dosage des enzymes.

III.1.1. Recherche du pH optimal

L'activité des deux enzymes (GDH et GK) a été mesurée à différents pH: dans le tampon MES (0,05 M) pour les pH 5,4 à 7 et dans le tampon TEA (0,1 M) pour les pH 7 à 8,7 (figures 3.1 et 3.2). Lors de ces dosages, les substrats et cofacteurs ont été utilisés en conditions saturantes et la concentration en protéines cellulaires a été choisie de manière à se trouver dans la zone linéaire de la réaction.

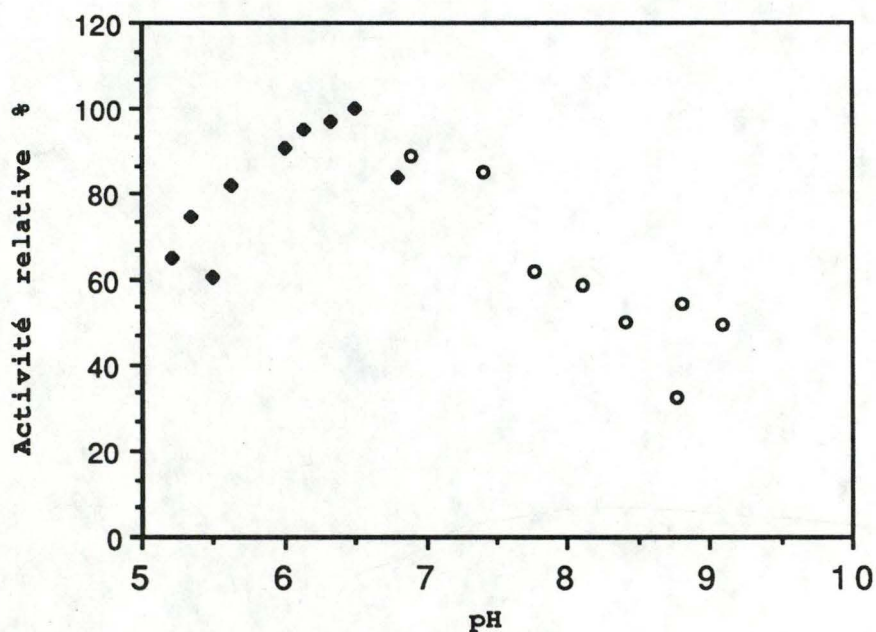


Fig.3.1: Activité de la glycérol-3-phosphate déshydrogénase en fonction du pH. Chaque point représente la moyenne de deux expériences, avec au moins % de variation. (◆) tampon MES; (○) tampon TEA.

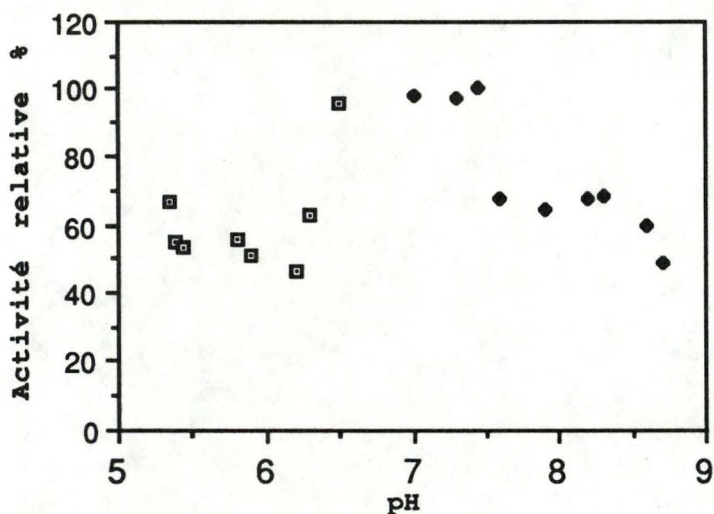


Figure 3.2: Activité de la de la glycérol kinase en fonction du pH. (□) tampon MES; (●) tampon TEA.

L'activité optimale de la GDH se situe à un pH de 6,5 tandis que celle de la GK s'étend sur une gamme de pH de 6,5 à 7,5.

III.1.2. Etude de la zone de linéarité de la réaction en fonction de la concentration protéique

Afin de travailler dans des conditions optimales lors d'un dosage enzymatique, il convient de se situer dans des concentrations protéiques où l'activité se comporte de manière linéaire (figures 3.4 et 3.3). On mesure l'activité enzymatique en variant la concentration en protéines cellulaires tout en maintenant les autres paramètres constants. Les substrats et cofacteurs sont utilisés en concentration saturante et le pH est optimal.

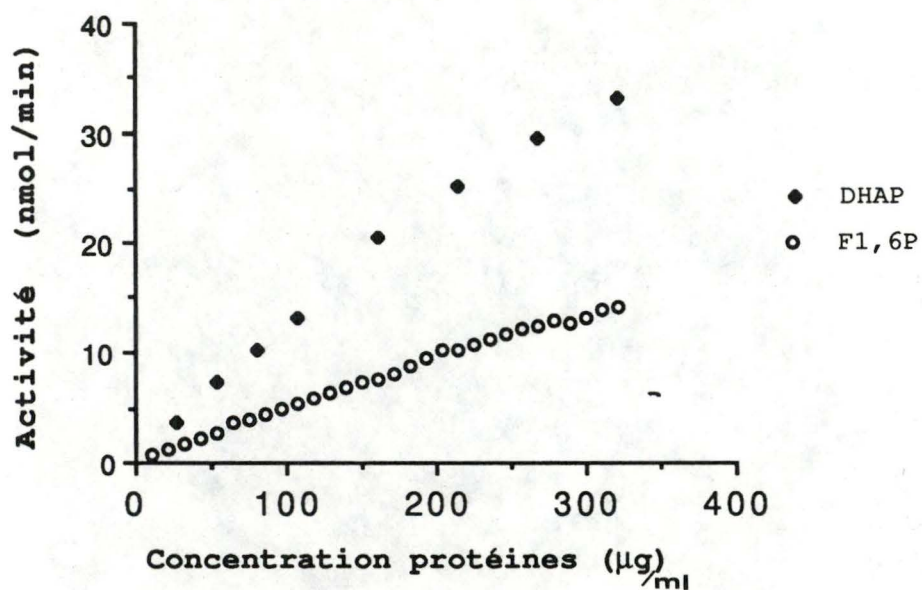


Figure 3.3 : Linéarité de l'activité enzymatique de la glycérol-3-phosphate déshydrogénase en fonction de la concentration en protéines. Cette activité est mesurée en présence de dihydroxyacétone phosphate (2 mM) ou en présence de fructose-1,6-biphosphate (1 mM) couplé à l'aldolase.

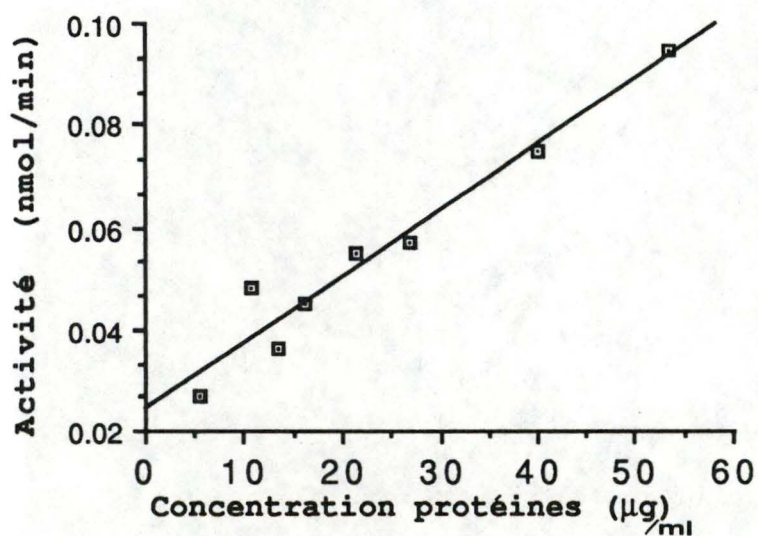


Figure 3.4: Linéarité de l'activité enzymatique de la glycérol kinase en fonction de la concentration en protéines. L'activité a été mesurée en présence d'une concentration saturante en glycérol (,7,5mM).

L'activité enzymatique de la glycéról-3-phosphate déshydrogénase est linéaire jusque 150 μg de protéines cellulaires par ml de test dans les deux conditions expérimentales..

L'activité enzymatique de la glycéról kinase est linéaire jusque 60 μg de protéines cellulaires par ml de test.

III.1.3. ETUDE CINETIQUE

III.1.3.1. Glycéról-3-phosphate déshydrogénase

L'activité enzymatique a été mesurée avec différentes concentrations en substrat, le dihydroxyacétone phosphate (0,25 mM, 0,5mM, 0,75 mM, 1mM, 1,5 mM et 2mM. Le pH est optimal (tampon MES 0,05 M pH 6,5) et les mesures ont été faites en présence de 130 μg de protéines cellulaires par test (figure 3.5).

Le K_m obtenu est de $0,784 \pm 0,146$ mM, avec une V_{max} de $9,580 \pm 0,849$ nmoles.par min.

III.1.3.2. Glycéról kinase

Faute d'une sensibilité suffisante du dosage de l'activité de la GK, nous n'avons pas pu déterminer les paramètres cinétiques de la réaction.

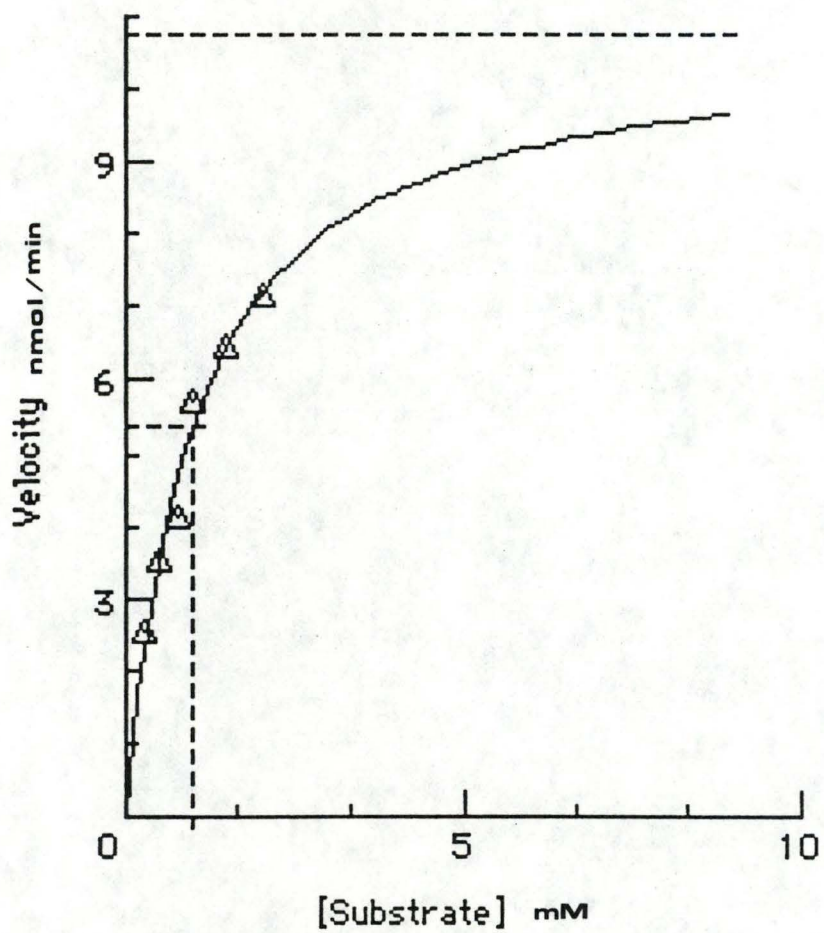


Figure 3.5: Cinétique enzymatique de la glycéról-3-phosphate déshydrogénase.

III.2.CENTRIFUGATION DIFFERENTIELLE

III.2 1.Distribution des protéines

Les protéines se retrouvent essentiellement dans les fractions soluble et nucléaire (37% et 34,5%). Elles se distribuent ensuite dans les fractions à gros granules et microsomiale avec le même pourcentage (13%). C'est dans la fraction à petits granules qu'elles ont le plus faible pourcentage(4%). Cette distribution correspond bien aux résultats attendus .

III.2.2 Distribution des enzymes marqueurs

L'activité spécifique relative (ASR) est une mesure de purification de l'enzyme et elle permet de trouver la localisation d'une enzyme après centrifugation différentielle (figure 3.6).

La pyruvate kinase, une enzyme présente dans le cytosol des autres Trypanosomatidae, est essentiellement localisée dans la fraction contenant les enzymes solubles de la cellule (ASR=1,74). La mannosidase, marqueur des lysosomes chez *T.brucei*, est localisée dans la fraction à petits granules (ASR=2,26) et la malate déshydrogénase dans la fraction à gros granules (ASR=1,60).

La 3'-nucléotidase semble se trouver dans la fraction à petits granules avec une ASR de 3,116. Cependant, elle est un marqueur des membranes plasmiques et celles-ci sédimentent plutôt dans la fraction microsomiale. Cette dernière contient les petits systèmes membranaires comme le réticulum endoplasmique, l'appareil de golgi, et les vésicules membranaires.

L'hexokinase chevauche trois fractions avec une ASR plus ou moins identique: fraction nucléaire: 1,83, fraction à gros granules: 1,99 et fraction à petits granules: 1,77. Toutefois, chez *T.brucei* l'hexokinase est uniquement localisée dans le glycosome. Des études complémentaires sont requises pour expliquer ce résultat surprenant.

III.2.3 Distribution des enzymes étudiées

III.2.3.1. Glycérol-3-phosphate déshydrogénase

Le pH est optimal (tampon MES 0,05 M pH 6,5) et le test est effectué avec 150 µg de protéines cellulaires par ml de test. L'ASR la plus élevée pour la GDH se retrouve dans la fraction à gros granules(1,922).

III.2.3.2 Glycérol kinase

La localisation de la GK dans le fractionnement a été étudiée par dosage radioactif. L'activité spécifique relative de la GK chez *C.luciliae* est très faible (0,94 nanomoles.par min par mg de protéines) par rapport à celle des autres trypanosomatidae (forme sanguine *T.brucei* :1,3 µmoles par min par mg de protéines). Sa détection demande donc une méthode de dosage sensible. Nous avons voulu vérifier que seule la GK est mesurée par cette méthode. L'activité enzymatique de la GK a été mesurée en absence d'ATP et l'activité n'est plus que de 13%.

Le test a été effectué à pH optimal avec 50 µg de protéines dans 120 µl. Selon le profil de distribution, la GK est localisée dans la fraction à petits granules avec une ASR de 3,02.

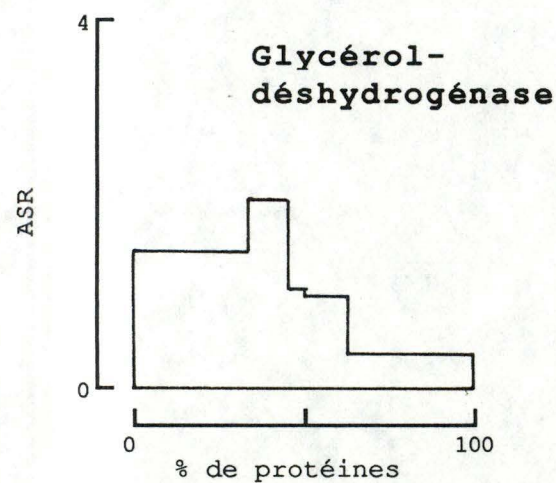
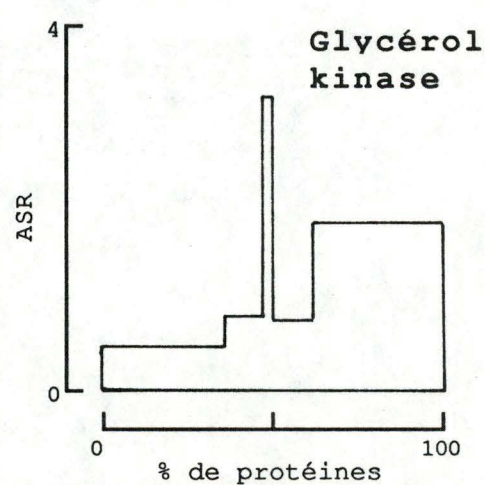
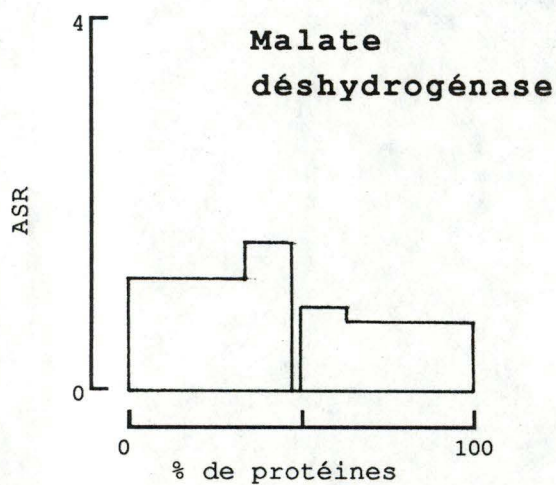
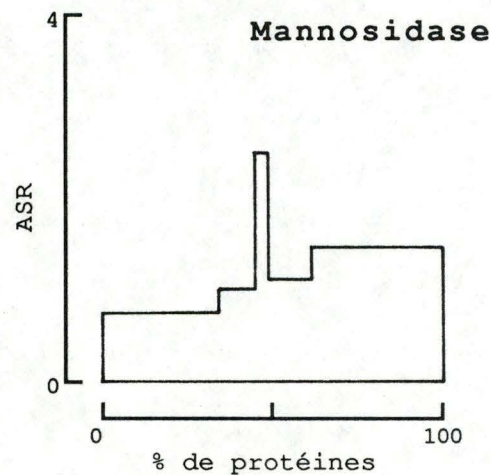
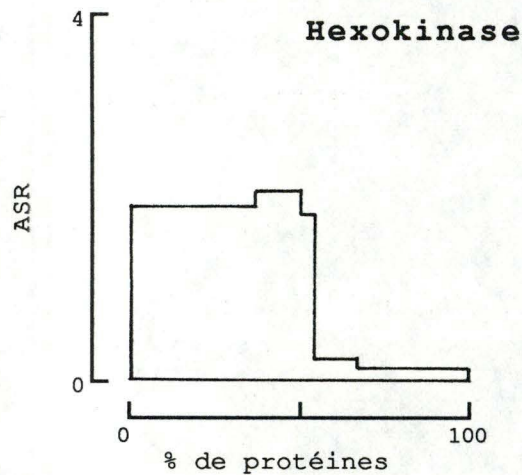
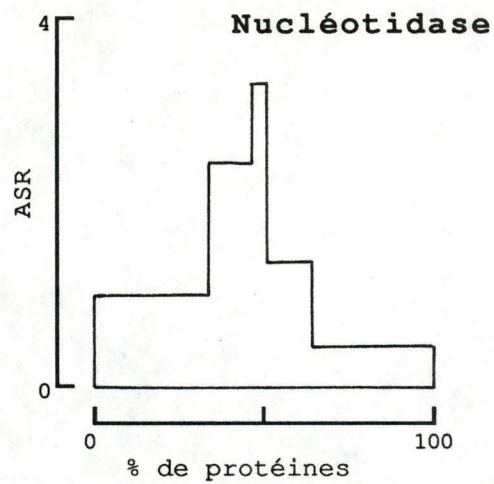
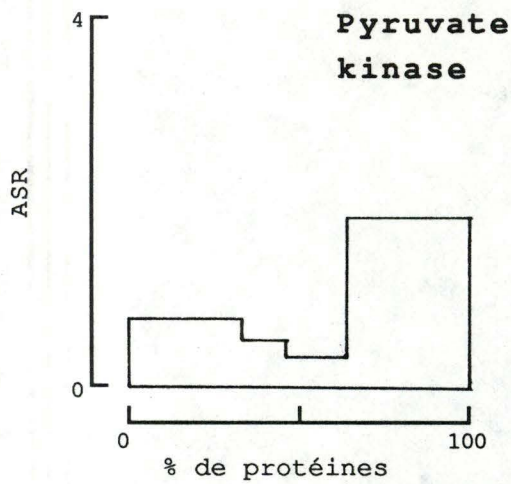


Fig.3.6 : Distribution des enzymes de *C.luciliae* dans les fractions obtenues après centrifugation différentielle.

Les fractions sont dessignées dans l'ordre de leur purification, de gauche à droite: fraction nucléaire (N) fraction à gros granules (M), fraction à petits granules (L), fraction microsomiale (P), fraction soluble (S). L'ordonnée représente l'ASR et l'abscisse le pourcentage cumulé des protéines.

Tableau 3.1: Résultats de la centrifugation différentielle.

ENZYMES	ACTIVITE SPECIFIQUE mU/mg	% D'ACTIVITE ACTIVITE SPECIFIQUE RELATIVE (ASR)					% DE RECUPERATION
				N	LG	SG	
Protéines		34,5	12,17	3,35	13,06	36,8	75%
Pyruvate kinase	190,07	25,059	5,758	1,019	3,16	64,2	84,5%
		0,726	0,473	0,304	0,3032	1,7445	
3'nucléotidase	91,914	32,233	27,83	10,44	16,284	13,205	109%
		0,93428	2,2867	3,1164	1,2468	0,3588	
Mannosidase	1,149 10 ⁻³	23,785	10,577	7,575	12,005	46,055	87,26%
		0,689	0,869	2,261	0,920	1,251	
Malate déshydrogénase	3832	42,127	19,442	/	11,892	26,53	96,45%
		1,221	1,597	/	0,910	0,720	
Hexokinase	227,1	63,23	24,26	5,93	2,41	4,14	81,6%
		1,83	1,99	1,77	0,1845	0,1125	
Glycérol-3- phosphate déshydrogénase	47,18	49,8	23,4	3,43	12,36	0,4469	102,9%
		1,44	1,922	1,0238	0,946	0,296	
Glycérol kinase	0,93	14,4	8,4	10,12	7,46	59,36	89,3%
		0,417	0,69	3,02	1,7506	1,613	

Chez la plupart des cellules eucaryotes, les deux enzymes sont localisées dans le cytoplasme tandis que chez les *T.brucei* et chez *Leishmania*, elles sont localisées dans le glycosome. Nous allons procéder à des expériences complémentaires afin de déterminer la véritable localisation de GDH et de GK.

III.3. CENTRIFUGATION ISOPYCNIQUE

Seul le surnageant de la fraction à gros granules a été soumis à la centrifugation isopycnique, car dans les zones à plus haute densité, l'extrait cytoplasmique total provoque des agrégations de membranes plasmiques attachées à des microtubules sous-pélliculaires. Il suffit de centrifuger une fois la fraction à 4000 tpm dans une sorvall RC-5B (rotor SS34) pendant 10 minutes et d'écarter le culot afin de résoudre ce problème. Toutefois une grande partie des mitochondries est écartée et donc la quantité de matériel particulaire est sous-estimée par rapport au matériel soluble. Les résultats sont présentés sous forme d'histogrammes (figure 3.7) et de tableau 3.1.

III.3.1 Distribution des protéines

80% des protéines déposées sur le gradient se retrouvent dans la fraction soluble. Le reste représente le matériel particulaire présent dans le surnageant de la fraction à gros granules avec un pic de $1,17 \text{ g.cm}^{-3}$ correspondant à la densité des mitochondries. En effet, le matériel déposé sur le gradient est différent du matériel utilisé en centrifugation différentielle. Le matériel déposé sur le gradient est le surnageant de la fraction à gros granules: une grande partie des mitochondries a été écartée, les noyaux sont absents et par conséquent le matériel soluble est surestimé par rapport à la centrifugation différentielle où l'homogénat entier est utilisé.

III.3.2 Distribution des enzymes marqueurs

La PK se retrouve dans la fraction représentant le matériel soluble de la cellule et sa distribution correspond à celle de *T.brucei*.

La MDH a une distribution bimodale avec une localisation majeure dans la région du gradient représentant une activité soluble et une partie mineure à une densité de $1,18\text{gcm}^{-3}$ typique pour les mitochondries. Dans le fractionnement par centrifugation différentielle, cette enzyme est localisée dans la fractions à gros granules. La différence peut s'expliquer, comme pour la distribution des protéines, par la surestimation du matériel soluble.

La mannosidase suit une distribution unimodale. Cette enzyme s'équilibre à une densité de $1,12\text{g.cm}^{-3}$, ce qui représente le matériel soluble de la cellule. Chez *T.brucei* par contre, cette enzyme est un marqueur lysosomal. Le pourcentage de recouvrement dans le gradient est 246,4% et l'activité spécifique de l'enzyme est à la limite de détection enzymatique, nous ne pouvons tirer aucune conclusion de cette observation. Faute de temps, nous n'avons pas pu préciser.

La 3'-nucléotidase présente une distribution étalée entre les densités de $1,15$ à $1,26\text{g.cm}^{-3}$. Cette densité correspond à la présence de membranes plasmiques.

L'HK présente un seul pic à une densité de $1,18\text{g.cm}^{-3}$, correspondant à une densité mitochondriale alors que chez *T.brucei*, cette enzyme est un marqueur glycosomial ($1,23\text{gcm}^{-3}$). Afin de voir si cette enzyme est réellement mitochondriale et si on n'a pas mesuré des activités artéfactuelles dues à d'autres activités enzymatiques contaminant les fractions dosées, nous avons procédé à des tests complémentaires.

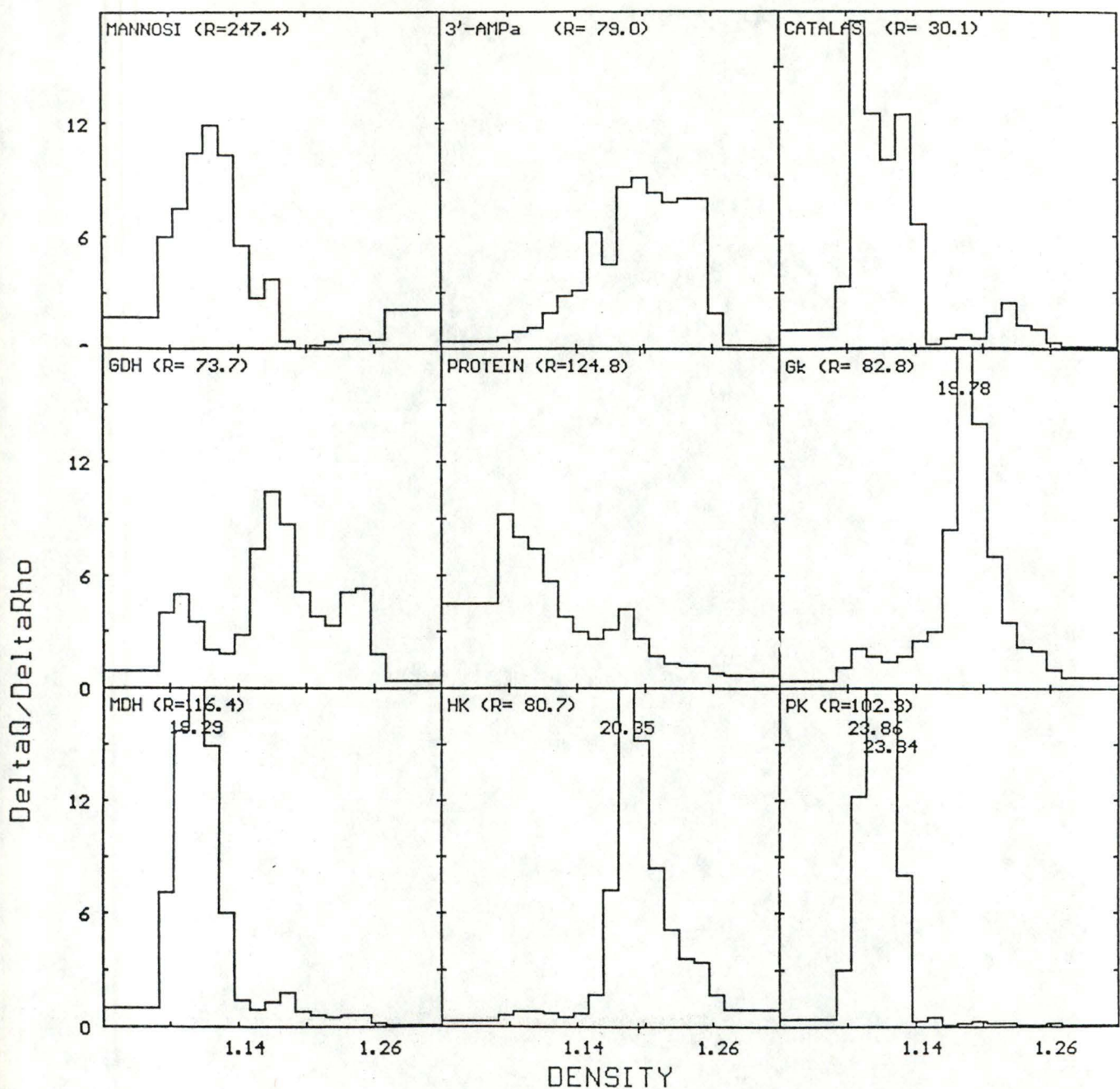


Figure 3.7: *Distribution des constituants du surnageant de la fraction à gros granules provenant de l'homogénat de C.luciliae après centrifugation isopycnique dans un gradient linéaire de saccharose.*

L'échelle de densité, divisée en 15 fractions normalisées d'égale valeur, s'étend de $1,07\text{gcm}^{-3}$ à $1,27\text{gcm}^{-3}$. L'ordonnée représente la fréquence, $(\Delta Q / \sum Q \Delta Q)$, ou ΔQ est la quantité de constituant présent dans une fraction, et $\sum Q$ la somme des quantités trouvées dans toutes les fractions. La surface de chaque section de l'histogramme est équivalente à la quantité fractionnelle du constituant présent dans chaque fraction normalisée. Les distributions sont délimitées de chaque côté par des zones représentant les densités s'étendant de $1,05$ à $1,07\text{gcm}^{-3}$ et de $1,27$ à $1,30\text{gcm}^{-3}$; ils réfèrent au matériel se trouvant en-dessous et au-dessus des limites du gradient linéaire.

Comme dans la littérature, nous avons aussi trouvé une activité catalase dans les glycosomes de *C.luciliae* alors que cette enzyme est absente chez *T.brucei* (Oppendoes, 1987)

III.3.3 Distribution des enzymes étudiées

La distribution de la GDH présente trois pics: un pic majeur à $1,16 \text{ g.cm}^{-3}$ et deux pics mineurs. L'un se trouve en $1,23 \text{ g.cm}^{-3}$ et l'autre se trouve dans la partie soluble du profil. Des tests supplémentaires vont être effectués de façon à déterminer la réelle distribution de GDH.

La distribution de la GK est unimodale avec un pic à $1,18 \text{ g.cm}^{-3}$. Lors du dosage, on mesure l'oxydation du NADH. La réaction est complexe et beaucoup d'enzymes interviennent. Différents contrôles sont nécessaires afin d'éliminer les interférences dues aux autres enzymes.

III.4.DISTRIBUTION DES ENZYMES APRES CORRECTION

Suite aux expériences de localisation, l'activité mitochondriale de *C.luciliae* s'est révélée plus élevée que celle de *T.brucei*. Pour vérifier, des contrôles beaucoup plus stricts se sont avérés nécessaires pour les dosages de trois enzymes: la glycérol kinase (GK), la glycérol-3-phosphate déshydrogénase (GDH) et l'hexokinase (HK). La distribution des enzymes après correction se trouve à la figure 3.8.

III.4.1.Glycérol-3-phosphate déshydrogénase.

Si le fructose-1,6-biphosphate est absent, l'aldolase ne peut le convertir en dihydroxyacétone phosphate. Dès lors, la GDH est privée d'un de ses substrats et ne peut oxyder le NADH. Le spectrophotomètre ne devrait détecter aucune activité or l'activité du blanc (le test sans le fructose) n'est pas nulle. Une NADH oxydase endogène serait responsable de cette activité.

La soustraction de ce blanc donne une distribution différente de celle observée chez *T.brucei brucei*, à la fois glycosomiale et mitochondriale. Ces résultats correspondent à ceux obtenus précédemment par Opperdoes et al (non publié).

III.4.2 Glycérol kinase.

Afin d'éliminer l'interférence d'autres enzymes, les tests sont effectués avec ou sans substrat (glycérol ou ATP).

Le premier contrôle a été réalisé sans glycérol. Dans ces conditions, la glycérol kinase ne peut fonctionner car un de ses substrats est absent et le MgATP n'est dès lors pas métabolisé en MgADP. Celui-ci étant absent, on ne devrait détecter aucune activité NADH. Pourtant, l'activité enzymatique dans ce contrôle n'est pas nulle. Ceci s'explique par l'action d'une ATPase endogène qui fournit l'ADP nécessaire à la continuité de la réaction.

Le second contrôle a été effectué sans MgATP. Dans ce cas, il ne peut pas y avoir interférence d'une ATPase endogène, pourtant du NADH est formé. Cette activité doit être attribuée à une NADH oxydase.

Les tests ont permis de détecter la présence d'enzymes mitochondriales qui interféreraient dans la mesure de l'activité de la GK. Il s'agit d'une ATPase et d'une NADH oxydase. Même après soustraction de ces blancs, l'hexokinase conserve sa distribution mitochondriale.

III.4.3 Hexokinase

L'activité enzymatique a été mesurée d'abord en absence d'un de ses substrats (glucose ou ATP) et ensuite en

présence de ce substrat. De cette manière, on peut détecter les activités enzymatiques autres que celle de l'HK.

La première correction a été effectuée en mesurant l'activité enzymatique sans glucose. Dans ce cas, l'hexokinase ne peut catalyser aucune réaction parce qu'un de ses substrats est absent. Cependant, nous détectons une activité enzymatique dans ce blanc. Celle-ci correspond à l'activité d'une ATPase endogène.

La deuxième correction a été réalisée sans ATP. De cette façon, il n'y a qu'une très faible activité que l'on déduit de l'activité mesurée en présence d'ATP. De cette manière, on a pu mettre en évidence la distribution de l'ATPase mitochondriale.

Après ces tests, la distribution de l'HK est bimodale: elle se trouve dans les mitochondries et dans les glycosomes. et l'on a mis en évidence la distribution de l'ATPase.

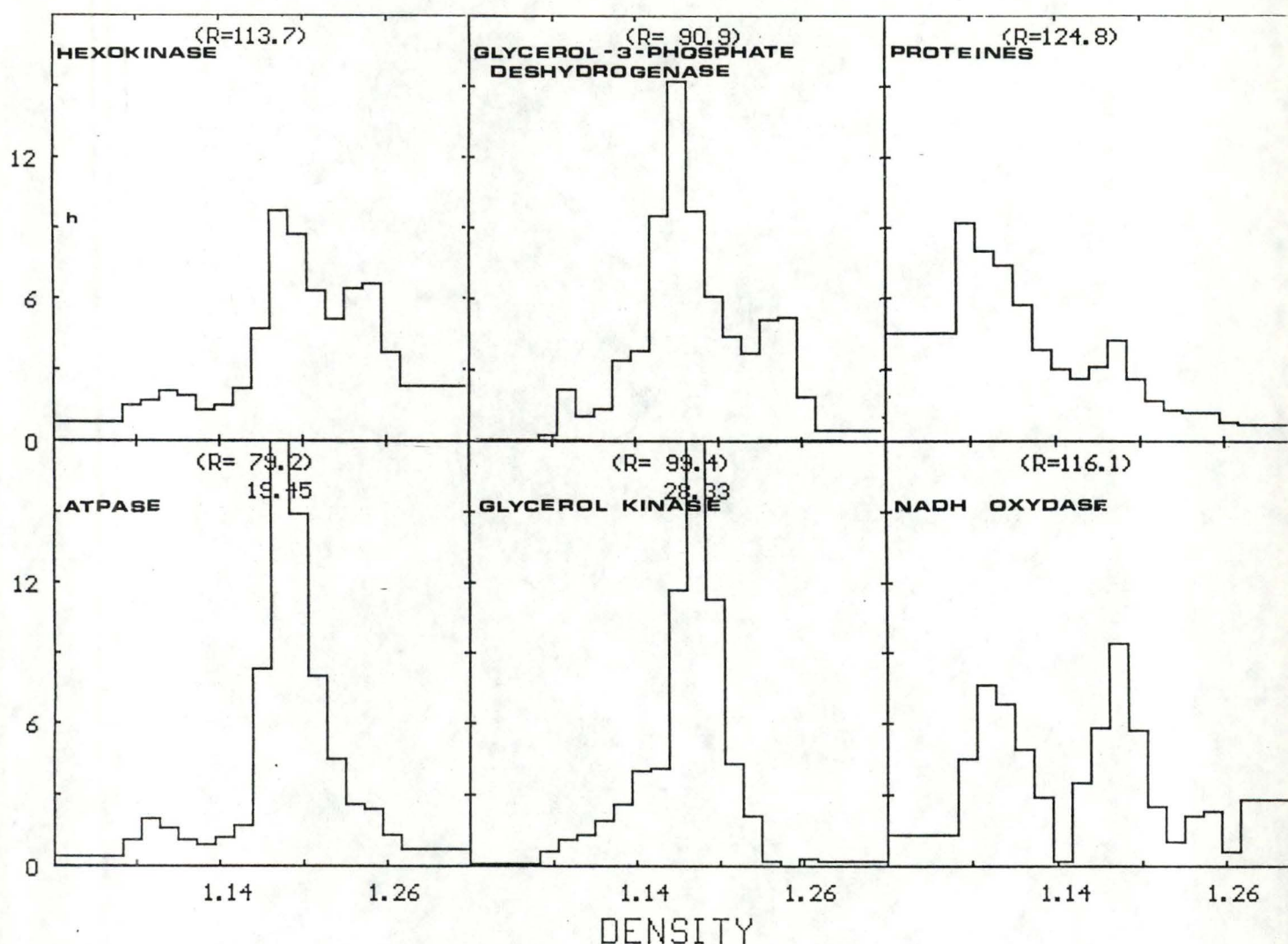


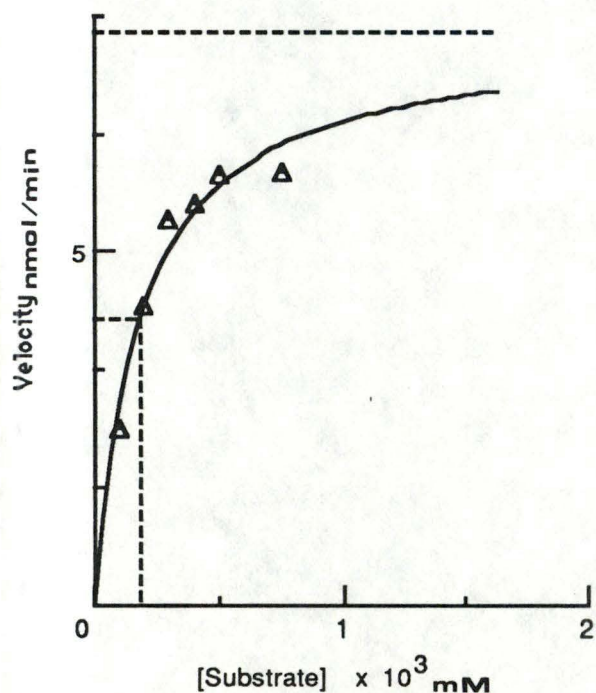
Figure 3.8: Distribution des constituants du surnageant de la fraction à gros granules provenant de l'homogénat de *C. luciliae* après centrifugation isopycniqne dans un gradient linéaire de saccharose.

L'échelle de densité, divisée en 15 fractions normalisées d'égale valeur, s'étend de $1,07\text{gcm}^{-3}$ à $1,27\text{gcm}^{-3}$. L'ordonnée représente la fréquence, $(\Delta Q / \sum Q \Delta Q)$, ou ΔQ est la quantité de constituant présent dans une fraction, et $\sum Q$ la somme des quantités trouvées dans toutes les fractions. La surface de chaque section de l'histogramme est équivalente à la quantité fractionnelle du constituant présent dans chaque fraction normalisée. Les distributions sont délimitées de chaque côté par des zones représentant les densités s'étendant de $1,05$ à $1,07\text{gcm}^{-3}$ et de $1,27$ à $1,30\text{gcm}^{-3}$; ils réfèrent au matériel se trouvant en-dessous et au-dessus des limites du gradient linéaire.

III.5. ETUDE CINÉTIQUE DE L'HEXOKINASE APRES LOCALISATION

L'hexokinase semble être localisée dans la mitochondrie et dans le glycosome. Afin de comprendre cette double localisation, nous avons étudié les propriétés cinétiques de l'enzyme et tester son comportement vis-à-vis de l'antisérum dirigé contre l'HK de *T.brucei*.

Les tests ont été effectués avec différentes concentrations de glucose, en maintenant constants les autres paramètres. Les mesures sur l'hexokinase mitochondriale ont utilisé 30 μg de protéines par test et celles sur l'hexokinase glycosomiale ont été effectuées sur 16,3 μg de protéines. (figure 3.8).



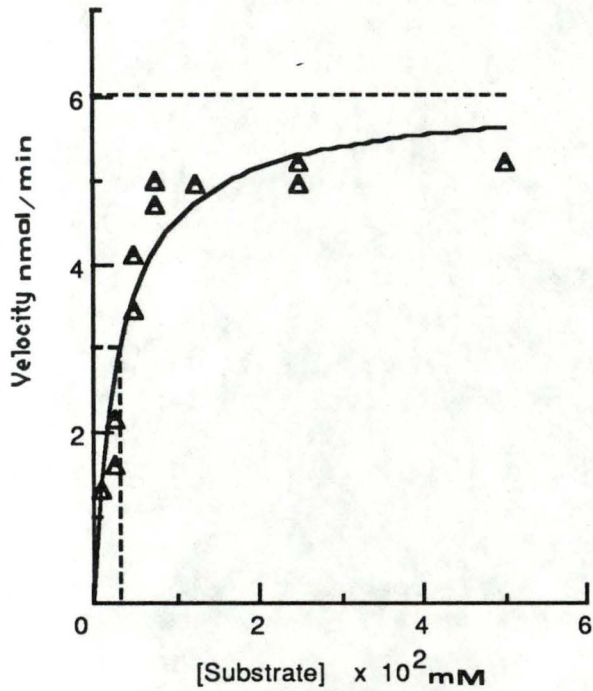


Figure 3.8: Cinétique enzymatique des hexokinases mitochondriale et glycosomiale. Le premier graphe correspond à l'enzyme mitochondriale et le second à l'enzyme glycosomiale.

Tableau 3.9: Cinétiques enzymatiques des hexokinases mitochondriale et glycosomiale. Km et Vmax des deux enzymes

	HK glycosomiale	HK mitochondriale
Km (μM)	$34,7 \pm 2,44$	221 ± 38
Vmax (nmoles.min ⁻¹)	5,94	8,71

Les deux hexokinases ont des Km très différents signifiant qu'elles sont des isoenzymes ou qu'il s'agit d'une seule enzyme dans un environnement ou une conformation différente comme déjà mentionné pour l'HK cytosolique et mitochondriale chez les mammifères.

III.6. IMMUNOEMPREINTE

Au moyen des centrifugations différentielle et isopycnique, l'hexokinase a été localisée dans la mitochondrie et dans le glycosome. Ce type d'approche n'a pas été possible pour la GDH car nous obtenions des activités enzymatiques trop basses. Afin d'obtenir de plus amples informations sur l'hexokinase et la glycérol-3-phosphate déshydrogénase, les enzymes vont être étudiées par immunoempreinte.

III.6.1 Choix du matériel

Lors des premières expériences, la membrane de transfert des protéines était la nitrocellulose et la solution de saturation des sites aspécifiques était du lait en poudre. La méthode donne de bons résultats pour l'HK mais elle n'est pas assez sensible pour la GDH. Pour cette raison, on a préféré utiliser le PVDF à la place de la nitrocellulose et le sérum albumine bovine (5%) à la place du lait en poudre. Le substrat initial de la peroxydase (le 4-chloro-1-naphtol) a été remplacé par le tétraméthylbenzidine pour augmenter la sensibilité de la méthode.

III.7.2 Immunoempreinte

Nous avons travaillé avec des antiséra polyclonaux monospécifiques provenant de l'immunisation de lapins avec respectivement de l'hexokinase et de la glycérol-3-phosphate déshydrogénase de *Trypanosoma brucei*. La concentration en protéines chargée sur le gel pour les glycosomes ultrapurifiés de *T. brucei* est de 15 μ g dans 30 μ l, pour les glycosomes ultrapurifiés de *C. luciliae* 20 μ g dans 30 μ l et pour les cellules entières de *C. luciliae* 100 μ g dans 30 μ l.

Lors d'une expérience antérieure non montrée, nous avons constaté que l'hexokinase des glycosomes et des mitochondries de *C.luciliae* provenant d'un gradient effectué plusieurs mois auparavant a un poids moléculaire inférieur à celui de l'hexokinase de glycosomes ultrapurifiés de *T.brucei*. Ceci pourrait être dû à une dégradation des fractions au cours du temps..

III.6.2.1 Expériences sur matériel frais

A. Hexokinase

Nous avons réalisé une immunoempreinte en faisant réagir l'antisérum sur des glycosomes ultrapurifiés de la forme sanguine de *T.brucei*, sur des cellules entières fraîches de la forme culture de *T.brucei* et de *C.luciliae*. L'hexokinase semble avoir le même poids moléculaire (52 kilodaltons) dans les trois cas. (Figure 3.9.b)

B. Glycérol-3-phosphate déshydrogénase

On ne détecte aucun signal en utilisant une membrane de nitrocellulose et du lait en poudre 5% comme solution de saturation

Au vu de l'insensibilité de cette méthode pour la GDH, nous avons travaillé dans des conditions plus sensibles: en employant une membrane de PVDF et une solution de BSA 5 % pour la saturation. Des cellules entières de *C.luciliae* et des glycosomes ultrapurifiés de *T.brucei* ont été mis en présence de l'antisérum anti-GDH (1/500). La glycérol-3-phosphate déshydrogénase de *C.luciliae* (40 kilodaltons) semble avoir un poids moléculaire supérieur à celui de l'enzyme de *T.brucei* (38 kilodaltons) (Figure 3.10.B).

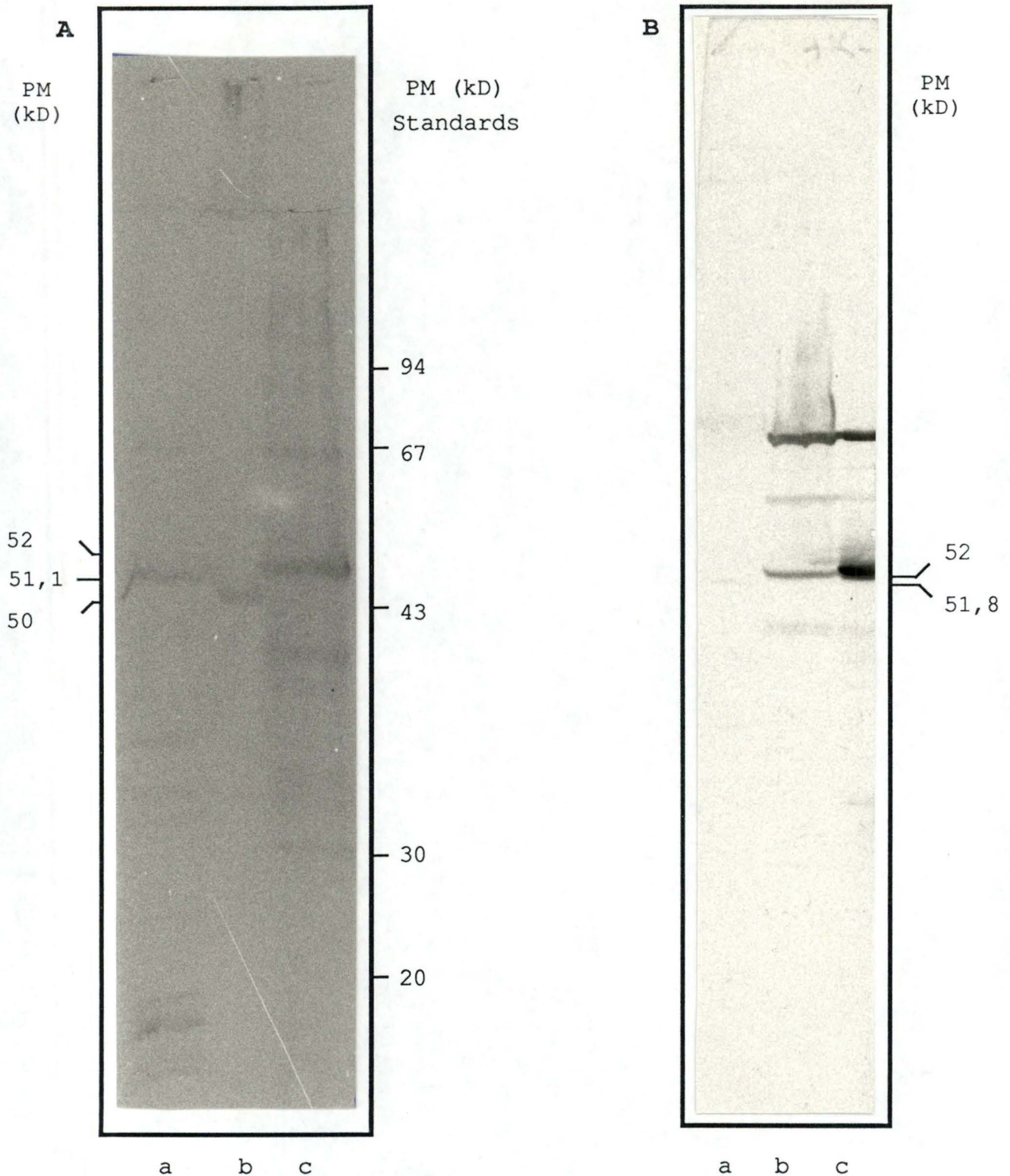


Figure 3.9: Comparaison de cellules entières et d'UPG pour HK. Après migration électrophorétique, les protéines ont été transférées sur nitrocellulose. Les membranes ont été incubées avec l'antisérum anti-HK.

Panneau A:

- Piste a: cellules entières de *C.luciliae* (148 µg)
- Piste b: glycosomes ultrapurifiés de *C.luciliae* (23 µg)
- Piste c: glycosomes ultrapurifiés de la forme sanguine de *T.brucei* (23 µg)

Panneau B:

- Piste a: cellules entières de *C.luciliae* (150 µg)
- Piste b: cellules entières de la forme de culture de *T.brucei* (100 µg)
- Piste c: glycosomes ultrapurifiés de la forme sanguine de *T.brucei* (15 µg)

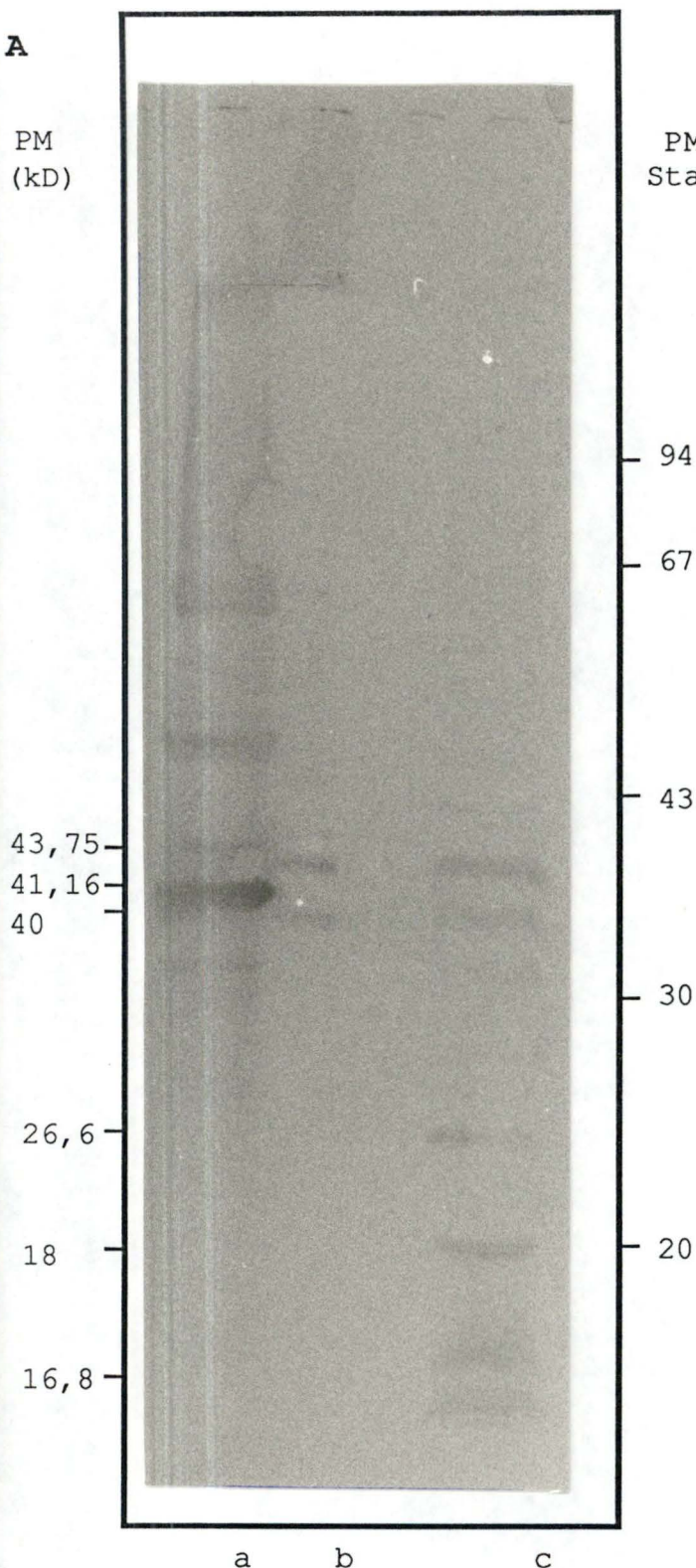
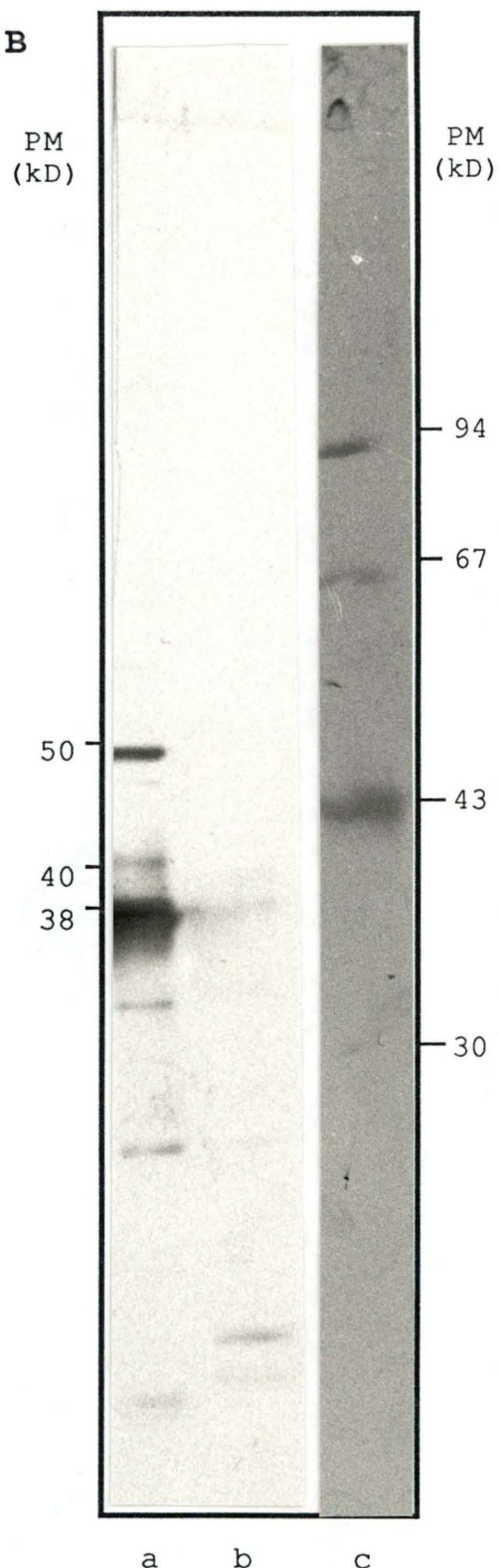
A**B**

Figure 3.10: Comparaison d'UPG et de cellules entières pour GDH
Après migration électrophorétique, les protéines ont été transférées sur Immobilon-PVDF. Les membranes ont été incubées avec:
Panneau A: antisérum anti-GDH (1/500)
Piste a: glycosomes ultrapurifiés de *T.brucei* (24 μ g)
Piste b: glycosomes ultrapurifiés de *C.luciliae* (23 μ g)
Piste c: cellules entières de *C.luciliae* (148 μ g)

Panneau B: antisérum anti-GDH (1/500)
Piste a: glycosomes ultrapurifiés de *T.brucei* (15 μ g)
Piste b: cellules entières de *C.luciliae* (85 μ g)

Les poids moléculaires de référence ont été colorés au bleu de Coomassie et sont présentés à la piste c (B).

III.6.2.3. Comparaison des enzymes mitochondriales et glycosomiales

Lors de l'expérience suivante, des cellules entières de *C.fasciculata* et des glycosomes ultrapurifiés de *T.brucei* (forme sanguine) mais aussi de *C.fasciculata*. ont été mis en présence des antiséra polyclonaux utilisés précédemment, afin de voir s'il y a une différence de poids moléculaire entre les deux localisations (GDH et HK) glycosomiales et mitochondriales (HK:figure 3.9.A et GDH:figure 3.10.A)

A.Hexokinase

L'hexokinase des glycosomes ultrapurifiés de *C.luciliae* (50 kilodaltons) a un poids moléculaire inférieur au poids moléculaire de l'hexokinase des cellules entières de *C.luciliae* (51,1 kilodaltons) et des glycosomes ultrapurifiés de *T.brucei* (52 kilodaltons). Cette expérience suggère qu'il y aurait dégradation au cours du temps de l'hexokinase de *C.luciliae*

B.Glycérol-3-phosphate déshydrogénase

La glycérol-3-phosphate déshydrogénase des cellules entières et des glycosomes ultrapurifiés de *C.luciliae* (43,75 kilodaltons) semble avoir un poids moléculaire supérieur à celui de la glycérol-3-phosphate déshydrogénase de *T.brucei* (40 kilodaltons).

III.6.2.4 Etude de la dégradation

Pour tester l'hypothèse de dégradation de GDH, des cellules entières de *C.luciliae* sont laissées pendant des temps différents (30 minutes, 3 heures, 7 heures et 24 heures) dans la glace (Figure 3.11). Les glycosomes ultrapurifiés de *T.brucei* ont servi d'exemples (Misset et al, 1986) .

Après 3 heures, l'hexokinase de *C.luciliae* montre deux produits de dégradation (respectivement 45 et 32 kilodaltons). Après 7 heures, ces deux produits sont toujours présents plus un troisième (22 kilodaltons) et après 24 heures, ces trois produits sont à nouveau présents (figure 3.11).

III.7. Confirmation des résultats

On a réalisé une dernière expérience avec du matériel frais pour certifier ces résultats (Figure 3.12). On a utilisé des glycosomes et des mitochondries de *C.luciliae* provenant d'un gradient frais, et on a testé en parallèle les mêmes organites provenant d'un vieux gradient. Des glycosomes ultrapurifiés de *T.brucei* ont servi de référence.

A. Hexokinase

L'hexokinase des glycosomes et des mitochondries de *C.luciliae* provenant du gradient frais a non seulement le même poids moléculaire mais elle a aussi le même poids moléculaire que celui des glycosomes ultrapurifiés *T.brucei* (50 kilodaltons). L'hexokinase provenant du vieux matériel montre effectivement une dégradation (48 kilodaltons).

B. Glycérol-3-phosphate déshydrogénase

La glycérol-3-phosphate déshydrogénase de *C.luciliae* semble avoir un poids moléculaire supérieur (42 kilodaltons) à celui de l'enzyme de *T.brucei* (39 kilodaltons).

PM
(kD)

PM (kD)
Standards

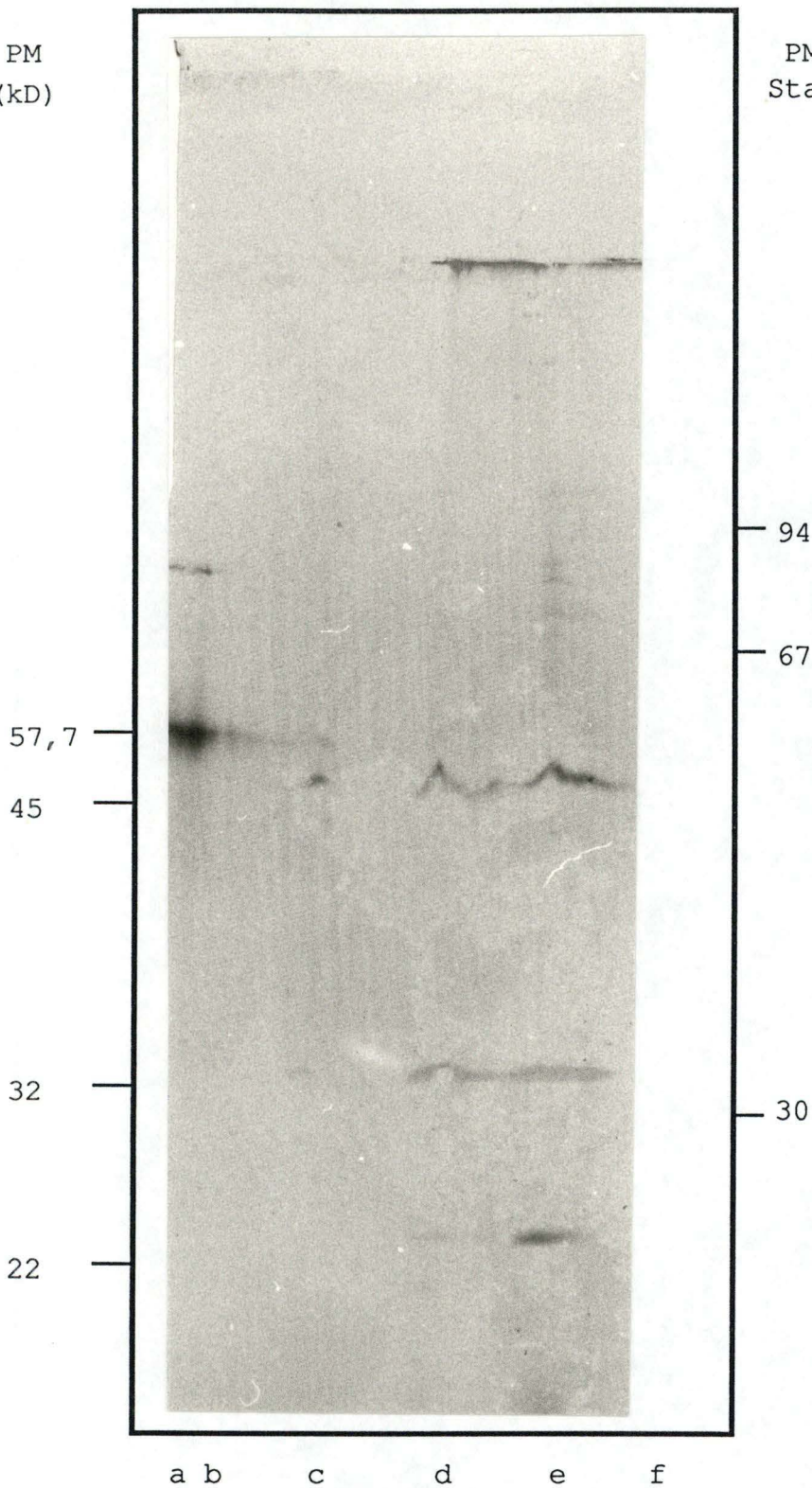


Figure 3.11: Expérience de dégradation de l'hexokinase

100 µg de cellules ont été incubés sur glace pendant des temps variables: 30 minutes (piste b); 3 heures (piste c); 7 heures (piste d) et 24 heures (pistee e). Après migration électrophorétique les protéines ont été transférées sur Immobilon-PVDF. Les membranes ont été incubées avec l'anticorps anti-HK. L'anticorps est révéle grâce au système protéine A-peroxydase, elle-même réagissant avec son substrat spécifique, le TMB-DONS. La piste a montre les glycosomes ultrapurifiés de *T.brucei* (forme sanguine, 150 µg de protéines).

Les poids moléculaires de référence ont été colorés au bleu de Coomassie et sont présentés à la piste f.

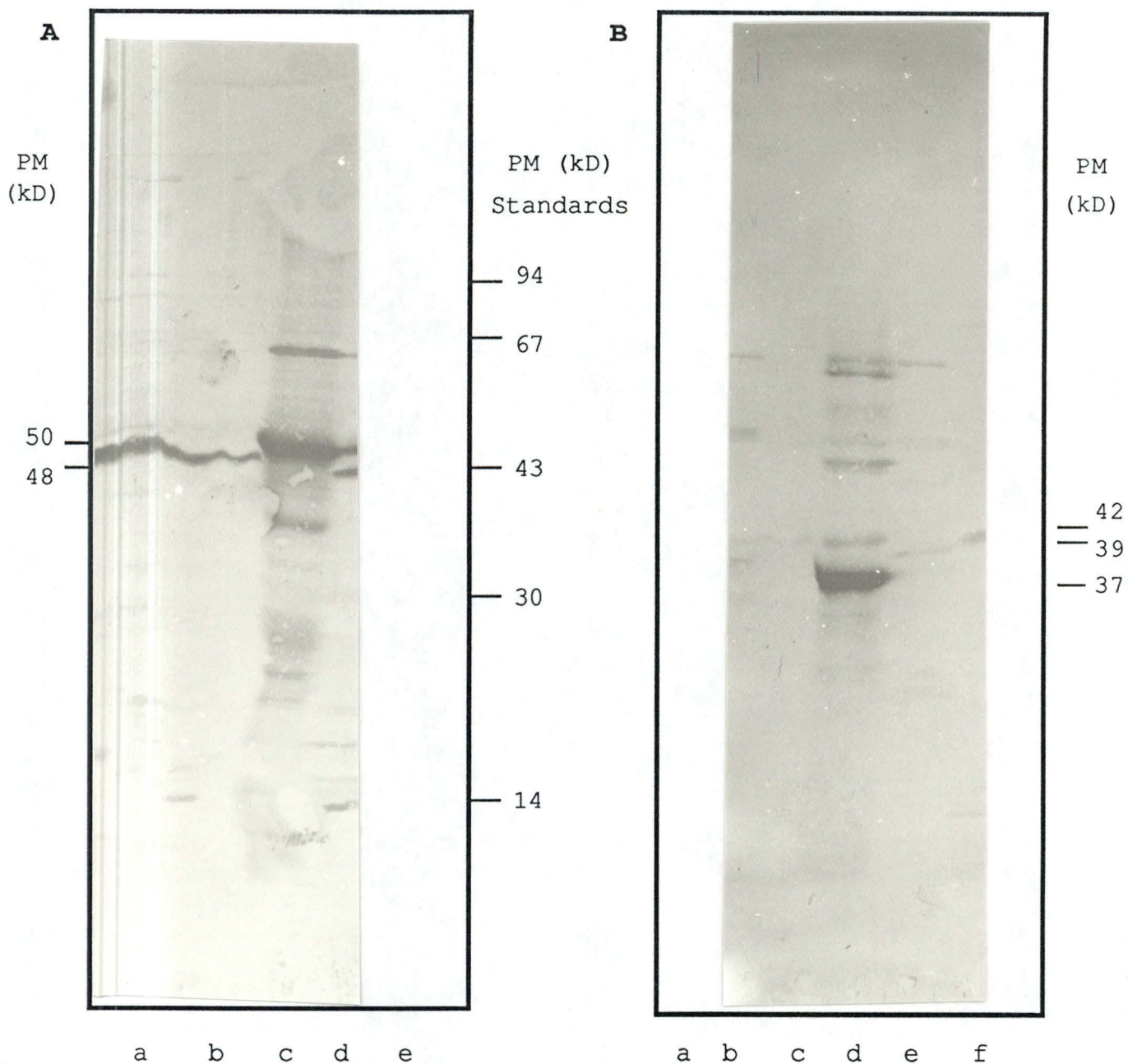


Figure 3.12: Comparaison de gradients pour HK et GDH
Après migration électrophorétique, les protéines ont été transférées sur Immobilon-PVDF. Les membranes ont été incubées avec:

Panneau A: antisérum anti-HK

Les pistes a et b contiennent respectivement les glycosomes et les mitochondries de *C.luciliae*, provenant d'un gradient préparé le jour précédant l'expérience d'immunoempreinte. Dans la piste c il y a des glycosomes ultrapurifiés de la forme sanguine de *T.brucei*. La piste d, contient les mitochondries de *C.luciliae*, provenant d'un gradient préparé 3 mois plus tôt.

Panneau B: antisérum anti-GDH

Les pistes a et b contiennent respectivement les mitochondries et les glycosomes de *C.luciliae*, provenant d'un gradient préparé 3 mois avant l'expérience d'immunoempreinte. Dans la piste c il y a des glycosomes ultrapurifiés de la forme sanguine de *T.brucei*. Les pistes d et e contiennent respectivement les glycosomes et les mitochondries de *C.luciliae*, provenant d'un gradient préparé le jour précédant l'expérience d'immunoempreinte.

Les poids moléculaires de référence ont été colorés au bleu de Coomassie et sont présentés aux pistes e (A) et f (B).

IV. DISCUSSION

Nos expériences de fractionnement subcellulaire de *C. luciliae*, parasite d'insecte ont confirmé la présence de petits organites, ressemblant aux microcorpuscules. La situation observée est très semblable à celle rencontrée chez les autres Trypanosomatidæ. Chez *T. cruzi*, chez les trypanosomes africains et chez toutes les espèces de leishmanies testées, ces organites, de morphologie semblable aux peroxysomes des eucaryotes ne possèdent pas de catalase. Ils ont été appelés glycosomes à cause de la présence d'enzymes glycolytiques. (Opperdoes et Borst, 1977; Opperdoes, 1987).

Chez *C. luciliae*, les glycosomes ont une densité similaire à celle décrite pour les autres trypanosomatidæ (1,23 gcm⁻³ en gradient saccharose) et nos résultats ont montré qu'ils contiennent les enzymes glycolytiques suivantes: l'hexokinase et la glycérol-3-phosphate déshydrogénase.

Contrairement aux autres Trypanosomatidæ, la catalase est présente dans les glycosomes de *C. luciliae* (Muse et Roberts, 1973; Opperdoes et al, 1977) et nous l'avons également démontré. Cette présence suggère que ces petits organites appartiennent à la famille des microcorpuscules tout comme le peroxysomes décrit chez les eucaryotes supérieurs mais aussi chez les levures, les champignons et le glyoxysomes des plantes (Kindl et Lazarow, 1978).

Les enzymes principales décrites dans ce mémoire sont l'HK, la GDH et la GK.

HK a été choisi car elle est toujours associée exclusivement au glycosome chez les autres trypanosomatidæ (Opperdoes et Borst, 1977). Nous avons supposé que l'HK servirait aussi de marqueur spécifique pour le glycosome chez *Crithidia*.

GDH et GK ont été sélectionnés pour notre étude parce que ces deux enzymes sont impliquées dans le métabolisme du glycérol et parce que des expériences non publiées (Opperdoes et al) suggéraient que ces enzymes étaient associées à d'autres organites cellulaires que le glycosome.

IV.1.L'hexokinase

A notre surprise, la distribution de l'activité de l'HK mesurée dans le gradient de saccharose est la suivante: la majorité de l'activité de l'HK s'équilibre à une densité de 1,18gcm⁻³, typique de la localisation mitochondriale (cfr ATPase et la NADH oxydase) même après correction des activités interférantes telles que la NADH oxydase et l'ATPase. Néanmoins, un pourcentage significatif de l'activité totale corrigée s'équilibre à une densité de 1,23gcm⁻³, typique du glycosome. Nous l'avons utilisé comme marqueur de cet organite.

Une double localisation de l'hexokinase a aussi été observée chez d'autres organismes que les trypanosomatidæ. Dans les cellules des mammifères et chez *Tetrahymena*, on a décrit une localisation mitochondriale et cytosolique (Bessman et al, 1978). Dans tous les cas, la même enzyme est présente en forme soluble dans le cytosol ou est liée à la membrane mitochondriale selon l'état métabolique de la cellule. Pour comprendre la double localisation de l'HK chez *Crithidia*, nous l'avons analysée en fonction de ses propriétés cinétiques et de sa réaction à l'antisérum dirigé contre l'HK de *T.brucei*.

Selon leurs propriétés cinétiques, les deux isoenzymes sont significativement différentes. L'enzyme glycosomiale (K_m mM) a une affinité beaucoup plus grande pour le glucose que l'enzyme mitochondriale (K_m mM). Toutefois, ces valeurs ne permettent pas de choisir entre les deux hypothèses possibles. On peut imaginer qu'en se liant à la membrane mitochondriale, l'HK change de conformation et donc d'affinité pour le glucose. Cette explication démontrerait que les deux enzymes localisées différemment sont reconnues par le même antisérum de la même façon et ont la même masse moléculaire (51,7 kilodaltons). Les deux enzymes, qu'elles soient différentes ou non, sont homologues à l'enzyme de *T.brucei* non seulement parce qu'elles ont une réaction immunologique croisée mais aussi parce qu'elles ont la même masse moléculaire que l'enzyme du trypanosome. Elles doivent donc être apparentées dans l'évolution.

IV.2. La glycérol-3-phosphate déshydrogénase

La GDH de *C.luciliae* a également montré clairement une distribution bimodale avec des activités associées à la mitochondrie et au glycosome.

La fonction de l'enzyme glycosomiale chez *C.luciliae* est très probablement fort semblable à celle de la forme sanguine des trypanosomes africains où elle est impliquée dans l'oxydation du NADH produit dans le glycosome (Opperdoes et al). Le glycérol-3-phosphate produit lors de cette réaction est ensuite réoxydé en DHAP par l'action d'une FAD-GDH présente sur la face externe de la membrane interne de la mitochondrie.

La fonction de l'activité mitochondriale n'est pas claire et jusqu'à présent; on n'a jamais trouvé de GDH à cofacteur NADH associée à la mitochondrie.

En comparant les enzymes de *C.luciliae* et de *T.brucei*, on constate une relation évidente entre les activités des deux organismes. Les trois enzymes sont reconnues par le même antisérum. Les enzymes de *C.luciliae* ont une taille un peu plus grande que celle de la protéine homologue de *T.brucei*.

IV.3.La glycérol kinase

Contrairement à *T.brucei* où l'activité de la glycérol kinase est extrêmement élevée (1,3 unités par mg de protéines cellulaires; Misset et al, 1986), l'activité de cette enzyme chez *C.luciliae*, mesurée par méthode radioactive et spectrophotométrique, est au moins 1000 fois inférieure, à la limite de détection de nos dosages. En la comparant à l'activité de l'HK, on peut conclure que la GK ne joue aucun rôle significatif dans la glycolyse anaérobie. Ceci confirme que chez *C.fasciculata*, on n'a jamais trouvé de glycérol comme produit final de la glycolyse aérobie ou anaérobie (Hammond et Bowman, 1980). Il est donc très probable que le NADH produit dans le glycosome est réoxydé indirectement en aérobie par la chaîne respiratoire mitochondriale qui est très active et en anaérobie par un mécanisme similaire à celui de la forme insecte de *T.brucei* impliquant une malate déshydrogénase glycosomiale (Cannata et al, 1982) ou une navette impliquant une enzyme à cofacteur NAD.

Il est donc douteux que la GK ait une activité glycosomiale. Toute l'activité détectée provient probablement de la mitochondrie. La fonction métabolique de cette basse activité mitochondriale de GK reste peu claire. Peut-être, joue-t-il un rôle dans la formation du glycérol-phosphate nécessaire à l'incorporation dans les phospholipides mitochondriaux ou d'autres constituants mitochondriaux.

V. CONCLUSION

En conclusion, on peut dire que *T.brucei* et *C.luciliae* se ressemblent parce qu'ils possèdent tous deux des glycosomes contenant un nombre d'enzymes glycolytiques. mais ils ont aussi des différences significatives. Au contraire de *T.brucei*, les glycosomes de *C.luciliae* ont de la catalase. Par contre, la glycérol kinase y est 1000 fois moins active que chez *T.brucei*. L'observation la plus frappante est que deux enzymes qui sont uniquement associées au glycosome chez *T.brucei* sont aussi associées à la mitochondrie chez *C.luciliae*.

BIBLIOGRAPHIE

BESSMAN, S.P, BORREBAEK, .B., GEIGER, P.J., BEN-OR, S.(1978)
Mitochondrial créatine kinase and hexokinase: two exemples
of compartimentation predicted by the hexokinase
mitochondrial binding theory of insulin action

BEAUFAY, H. AND AMAR-COSTESECC, A. (1976)
in Methods in Membrane biology (Korn, E.D., ed.) vol.6,
pp.1-100, Plenum Press, New York

BLUM, J.J (1978)
Influence of metabolic compartimentation on the quantitative
analysis of intermediary metabolism.

BÖHLEN, P., STEIN, S., DAIRMAN, W. AND UDENFRIEND, S. (1973)
Fluorometric assay of proteins in the nanogram range.
Arch. Biochem. Biophys. 155: 213-220.

BOWMAN, I.B.R. AND FLYNN, I.W. (1976)
Oxydative metabolism of trypanosomes. In: Biology of
Kinetoplastida, (Lumsden, W.H.R. and Evans, D.A. eds.),
Vol.1, pp. 435-476, Academic Press, New York.

BRUN, R. AND SCHÖENENBERGER, M. (1979).
Cultivation and *in vitro* cloning of procyclic culture forms
of *Trypanosoma brucei* in a semi-defined medium.
Acta Trop. 36: 289-292.

BURNETTE, W.N. (1980)

"Western blotting ": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A.

Anal.Biochem. 112: 195-203.

CANNATA, J.J.B., VALLE, E., DOCAMPO, R., CAZZULO, J.J.
(1982)

Subcellular localisation of phosphoenol pyruvate carboxykinase in the trypanosomatids *Trypanosoma cruzi* and in *Crithidia fasciculata*..

Mol.Biochem.Parasitol. 6:151-160.

CAZZULO, J.J., CAZZULO, B.M.F., ENGEL J.C., CANNATA, J.J.B.
(1985)

End products and enzyme levels of aerobic glucose fermentation in trypanosomatids.

Mol.and Biochem. Parasitol., 16: 329-343.

HAMMOND, D.J., BOWMAN, I.B.R. (1980)

Studies on glycerol kinase and its role in ATP synthesis in *Trypanosoma brucei*.

Mol.Biochem.Parasitol. 2: 77-91.

HART, D.T., MISSET, O., EDWARDS, S.W. AND OPPERDOES, F.R.
(1984)

A comparison of the glycosomes (microbodies) isolated from *Trypanosoma brucei* bloodstream form and cultured procyclic trypomastigotes.

Mol.and Biochem. Parasitol. 12: 25-35.

HOEIJMAKERS, J.H.J, SCHOUTSEN, B., BORST, P (1982)
Kinetoplast DNA in the insect trypanosomes *Crithidia luciliae* and *Crithidia fasciculata*. : sequence evolution and transcription of the maxicircle.
Plasmid 7: 199-209.

KINDL, H, LAZAROW, P.B.
Peroxisomes et Glycosomes
Annals of the new york academic of science, 386

KLEIN, R.A., AND MILLER, P.G.G. (1981)
Alternate metabolic pathways in protozoan energy metabolism.
Parasitology 82: 1-30.

KRAKOW, J.L. AND WANG, C.C (1990)
Purification and characterization of glycerol kinase from *Trypanosoma brucei*.
Mol. and Biochem. Parasitol. 43: 17-26.

LAEMMLI, U.K (1970)
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature, 227: 680-685

MC GHEE, R.B. AND COSGROVE, W.B. (1980)
Biology and physiology of the lower Trypanosomatidae.
Microbiol. Rev. 44: 140-173.

MISSET, O., BOS, O.J.M. AND OPPERDOES, F.R. (1986)
Glycolytic enzymes of *Trypanosoma brucei*: simultaneous
purification, intraglycosomal concentrations and physical
properties.
Eur.J. Biochem. 157: 441-453.

MUSE, K.E., ROBERTS, J.F. (1973)
Microbodies in *Crithidia fasciculata*
Protoplasma 78: 343-348.

MOLYNEUX, D.H., ASHORD, R.W. (1983)
The biology of *Trypanosoma* and *Leishmania*, parasites of man
and domestic animals.
Taylor and Francis

NEWTON, B.A. (1979)
Biochemical approaches to the taxonomy of Kinetoplastid
flagellates. In: Biology of Kinetoplastida, (Lumsden, W.H.R.
and Evans, D.A. eds.), Vol.1, pp. 405-434, Academic Press,
New York.

OPPERDOES, F., BAUDHUIN, P, COPPENS, I, DE ROE, C,
EDWARDS, S.W. et al. (1984)
Purification, morphometric analysis and characterisation of
the glycosomes (microbodies) of the protozoan
hemoflagellate.
J. Cell. Biol. 98: 1178-1184.

OPPERDOES, F.R., BORST, P., BAKKER, S. AND LEENE, W. (1976)
Localisation of glycerol-3-phosphate oxydase in the
mitochondrion and particulate NAD⁺ linked glycerol-3-
phosphate dehydrogenase in the microbodies of the
bloodstream form of the *Trypanosoma brucei* .Eur. J. Biochem.
76, 29-39.

OPPERDOES, F.R., BORST, P. (1977)
Localisation of nine glycolytic enzymes in a microbody like
organelle in *Trypanosoma brucei* :the glycosome.
FEBS Lett. 80: 360-364.

OPPERDOES, F.R. AND STEIGER, R.F. (1981).
Localisation of hydrolyses in cultured procyclics of
Trypanosoma brucei
Mol.Biochem.Parasitol. 4: 311-323.

OPPERDOES, F.R. (1987)
Compartmentation of carbohydrate métabolism in Trypanosomes
Ann.Rev.Microbiology 41: 127-151.

OPPERDOES, F.R. (1990)
The glycosome of trypanosomes and *Leishmanis*
Biochemical Society.Transactions, 18:729-732

PLUSKAL, M.G., PRZEKOP, M.B., KAVONIAN, M.R., VECOLI, CH.,
AND HICKS, D.A. (1986)

Immobilon PVDF transfer membrane: a new membrane substrate
for western blotting of proteins.

Biofeature 4: 272-283. 3?

STEIGER, R.F., OPPERDOES, F.R. AND BONTEMPS, J. (1980)

Subcellular fractionation of *Trypanosoma brucei* bloodstream
forms with special reference to hydrolases.

Eur.J.Biochem. 105: 163-175

VICKERMAN, K., PRESTON, T.M. (1976)

Comparative cell biology of the kinetoplastid
flagellates. In: Biology of Kinetoplastida, (Lumsden, W.H.R.
and Evans, D.A. eds.), Vol.1, pp. 35-130, Academic Press,
New York.

VISSER, N., OPPERDOES, F.R. AND BORST, P. (1981)

Subcellular compartmentation of glycolytic intermediates in
Trypanosoma brucei.

Eur.J.Biochem. 118: 521-526.

WALLACE F.G. (1979)

Biology of the Kinetoplastida of Arthropods.

In: Biology of Kinetoplastida, (Lumsden, W.H.R. and Evans,
D.A. eds.), Vol.2, pp. 212-240, Academic Press, New York.