



## THESIS / THÈSE

### MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

#### Caractérisation moléculaire et phylogénétique de la catalase chez *Crithidia fasciculata*

Beaujean, Anne

*Award date:*  
1994

*Awarding institution:*  
Universite 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.



FACULTES UNIVERSITAIRES N.-D. DE LA PAIX  
NAMUR  
FACULTE DES SCIENCES

---

**Caractérisation moléculaire et phylogénétique  
de la catalase chez *Crithidia fasciculata***

Mémoire présenté pour l'obtention du grade  
de Licencié en Sciences  
biologiques

Anne Beaujean  
1994

**Caractérisation moléculaire et phylogénétique  
de la catalase chez *Crithidia fasciculata*.**

BEAUJEU Anne

**Résumé**

Des expériences précédentes ( Eeckhout, 1973) ont suggéré la localisation cytosolique de la catalase chez *Crithidia luciliae* et une localisation glycosomale chez *Crithidia fasciculata* (Opperdoes et al, 1976).

Après culture de *Crithidia fasciculata* , suivie de centrifugations différentielles, effectuées sur une culture de deux jours ainsi que sur une culture de trois jours, on a localisé la catalase dans la fraction cytosolique.

Le Triton X100, utilisé dans le dosage de la catalase, s'est révélé assurer un rôle inhibiteur aux concentrations utilisées pour le test. Un nouveau test de dosage a été mis au point et l'effet de deux inhibiteurs de la catalase (cyanure et aminotriazole) a été testé grâce à cette nouvelle méthode de dosage.

Ces expériences d'inhibition, combinées à des études de stabilité de l'enzyme à différents pH, n'ont toutefois pas permis d'infirmer la localisation cytosolique de la catalase ou de révéler l'existence de cette dernière sous forme d'isoenzymes.

Nous avons criblé une banque d'ADN génomique, ainsi qu'une banque d'ADNc en utilisant comme sonde l'ADNc correspondant au gène de la catalase humaine. Des clones positifs ont été obtenus uniquement avec la banque d'ADNc. L'ADN de ces clones a été isolé. Dans des expériences de Southern blot, nous avons observé l'hybridation de deux fragments avec la sonde, l'un, existant dans tous les phages, d'une taille de 3 kb (fragment *Pst* I), l'autre d'une taille de 3.8 kb (phage 1), ou de 4.1 kb (phage 4) (fragment *Kpn* I).

Une étude phylogénétique a été réalisée en utilisant les séquences de catalase déjà décrites.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Décembre 1994

Promoteur : F.R. Opperdoes

Co-promoteur : E. Feytmans

## REMERCIEMENTS

Au terme de ce mémoire , après pratiquement un an de travail au sein de l'unité TROP:

- j'aimerais remercier vivement le Docteur Fred. R. Opperdoes d'avoir accepté d'être mon promoteur et de m'avoir accueillie dans son laboratoire. J'ai été particulièrement sensible à sa gentillesse, sa disponibilité et ses nombreux conseils quant à la rédaction et à la correction de ce mémoire. Son aide dans le domaine des comparaisons de séquences et de la phylogénie m'aura été d'un grand secours et je tiens encore une fois à lui exprimer ma très haute gratitude.
- je remercie le Docteur E. Feytmans d'avoir accepté d'être mon copromoteur ainsi que les membres du jury.
- je remercie également le docteur Paul A.M. Michels pour son aide et sa patience dans mes débuts en biologie moléculaire.
- je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à Dominique Cottem, pour son accueil et sa sympathie dans cette période d'adaptation à une nouvelle équipe de travail. Je tiens à la remercier pour son aide constante et ses nombreux conseils en enzymologie ainsi que dans le domaine des cultures de *Crithidia*.
- je remercie surtout Linda Kohl de m'avoir accordé autant de temps en biologie moléculaire malgré sa thèse. Je ne la remercierai jamais assez pour ses nombreux conseils tant sur le plan du travail que pour la rédaction du mémoire. Son aide et sa grande patience m'ont été très bénéfiques en biologie moléculaire et m'ont permis d'apprécier encore plus ce domaine de la biologie.
- je voudrais remercier également le Docteur Isabelle Coppens pour ses micrographies électroniques et Nicole pour les photographies.

- je remercie particulièrement Joris Van Roy, le Docteur Mia Callens pour leurs conseils en enzymologie et Sylvie Allert pour son aide et ses conseils en biologie moléculaire.
- un grand merci à Françoise, Jayne , Chuong-Dai , Véronique, Valérie, Isabelle, Pierre, Stéphane, Frédéric, Christiane, ... pour leur accueil et leur sympathie tant au point de vue du travail qu'en dehors (drinks, diners,...). Grâce à vous, j'ai passé une année formidable.
- je remercie mes parents pour leurs encouragements au cours de mes années universitaires , Pierre , Alain , David, et encore une fois mon père pour la dactylographie de ce mémoire.

**Un grand merci à tous !!**

TABLE  
DES MATIERES

# TABLE DES MATIERES.

## CHAPITRE I: INTRODUCTION

<b>I. LES TRYPANOSOMATIDES.....</b>	<b>1</b>
A. Généralités.....	1
B. <i>Trypanosoma brucei</i> .....	4
<b>II. GLYCOLYSE ET GLYCOSOMES.....</b>	<b>8</b>
A. Généralités.....	8
B. Glycolyse chez <i>T. brucei</i> .....	11
C. Import de protéines.....	12
<b>III. CRITHIDIA FASCICULATA.....</b>	<b>14</b>
A. Généralités.....	14
B. Morphologie.....	16
<b>IV. LA CATALASE.....</b>	<b>19</b>
A. Importance de la catalase.....	19
B. Provenance du peroxyde d'hydrogène.....	22
C. Description de la catalase.....	24
D. Cinétique.....	25
E. Action des inhibiteurs sur la catalase.....	28
E.1 Le cyanure.....	28
E.2 L'aminotriazole.....	28
F. La catalase chez <i>Crithidia fasciculata</i> .....	29
G. Catalase et Evolution.....	30
<b>BUTS DU TRAVAIL.....</b>	<b>34</b>

## CHAPITRE II: MATERIEL ET METHODES.

<b>I. PARTIE BIOCHIMIE.....</b>	<b>35</b>
<b>1. CULTURE DE CRITHIDIA FASCICULATA. ....</b>	<b>35</b>
<b>A. Conditions de croissance.....</b>	<b>35</b>
<b>B. Maintien de la culture.....</b>	<b>36</b>
B.1. Comptage des cellules et courbe de croissance.....	36
B.2. Effet de l'hémine sur la croissance de la culture et la production enzymatique.....	36
<b>2. CENTRIFUGATION DIFFERENTIELLE .....</b>	<b>37</b>
<b>A. Traitement de l'homogénat. ....</b>	<b>42</b>
<b>B. Dosage des enzymes marqueurs. ....</b>	<b>42</b>
B.1. L'hexokinase.....	43
B.2. La malate déshydrogénase.....	44
B.3. La glucose phosphate isomérase.....	45
B.4. Calcul des résultats. ....	46
<b>3. DOSAGES .....</b>	<b>46</b>
<b>A. Dosage des protéines.....</b>	<b>46</b>
<b>B. Dosage de la catalase.....</b>	<b>47</b>
B.1. Optimisation des conditions de dosage .....	48
<b>4. EFFET DU PH.....</b>	<b>50</b>
<b>5. EFFET DES INHIBITEURS.....</b>	<b>50</b>
<b>A. Le cyanure.....</b>	<b>51</b>
<b>B. L'aminotriazole. ....</b>	<b>51</b>
<b>II. PARTIE BIOLOGIE MOLECULAIRE.....</b>	<b>52</b>
<b>1. SOUCHES BACTERIENNES UTILISEES.....</b>	<b>52</b>
<b>A. Escherichia coli souche MB 406.....</b>	<b>52</b>
<b>B. Escherichia coli souche XL1- BLUE.....</b>	<b>52</b>
<b>2. MILIEUX DE CULTURE. ....</b>	<b>53</b>



A. <i>E. coli</i> souche MB 406.....	53
B. <i>Escherichia coli</i> XL1-blue contenant pCAT 11 .....	53
<b>3. PREPARATION D'UNE SONDE DE CATALASE HUMAINE.....</b>	<b>54</b>
A. Isolement de l'ADN plasmidique.....	54
B. Estimation de la quantité d'ADN. ....	55
C. Test de digérabilité de l'ADN plasmidique. ....	55
D. Isolement de l'insert (gène de la catalase humaine) de pCAT 11.....	55
E. Préparation de la sonde.....	56
E.1. Principe. ....	56
E.2. Préparation de la sonde. ....	57
<b>4. ISOLEMENT DE L'ADN GENOMIQUE DE C. FASCICULATA.....</b>	<b>58</b>
<b>5. BANQUE D'ADN DE CRITHIDIA FASCICULATA. ....</b>	<b>59</b>
A. Description. ....	59
B. Titration de la banque. ....	59
B.1. Préparation des MB 406 compétentes. ....	59
B.2. Titration de la banque. ....	60
B.3. Criblage de la banque.....	60
B.4. Traitement des membranes de Nylon.....	61
B.5. Isolement des clones recombinants.....	61
B.6. Amplification des phages. ....	62
B.7. Culture liquide des bactériophages $\lambda$ .....	62
B.8. Isolement de l'ADN de phages .....	63
<b>6. TRANSFERT SUR FILTRE ( SOUTHERN BLOT).....</b>	<b>63</b>
A. Hybridation des membranes de nylon.....	64
A.1. Préhybridation et hybridation.....	64
A.2 Mise au point des conditions d'hybridation. ....	65

## CHAPITRE III: RESULTATS.

<b>RESULTATS (PARTIE BIOCHIMIE).....</b>	<b>70</b>
<b>1. CARACTERISATION DE LA CATALASE CHEZ C. FASCICULATA.....</b>	<b>70</b>
<b>A. Courbe de croissance.....</b>	<b>70</b>
<b>B. OPTIMALISATION.....</b>	<b>72</b>
B.1 Optimalisation du dosage enzymatique.....	72
<b>2. CENTRIFUGATION DIFFERENTIELLE.....</b>	<b>78</b>
<b>A. Centrifugation différentielle après deux jours de culture.....</b>	<b>78</b>
A.1. Distribution des protéines.....	78
A.2. Distribution des enzymes marqueurs.....	78
<b>B. Centrifugation différentielle après 3 jours de culture.....</b>	<b>79</b>
B.1 Distribution des protéines.....	79
B.2 Distribution des enzymes marqueurs.....	79
<b>3. EFFET DU PH.....</b>	<b>83</b>
<b>4. EFFET DES INHIBITEURS.....</b>	<b>84</b>
<b>4.A. Effet du cyanure.....</b>	<b>84</b>
<b>4.B. Effet de l'aminotriazole.....</b>	<b>86</b>
<b>1. SONDE DE CATALASE HUMAINE.....</b>	<b>88</b>
<b>2. OPTIMALISATION DES CONDITIONS D'HYBRIDATION.....</b>	<b>89</b>
<b>2.A. L'ADN génomique de Crithidia fasciculata.....</b>	<b>89</b>
2.A.1. Isolement de l'ADN génomique chez <i>Crithidia fasciculata</i> .....	89
2.A.2. Dosage de l'ADN génomique de <i>Crithidia fasciculata</i> .....	89
2.A.3. Digestion de l'ADN génomique de <i>Crithidia fasciculata</i> .....	89
<b>2.B. Hybridation.....</b>	<b>90</b>
<b>3. CRIBLAGE DE LA BANQUE D'ADN GENOMIQUE ET D'ADN COMPLEMENTAIRE DE CRITHIDIA FASCICULATA.....</b>	<b>90</b>
<b>4. RECRIBLAGE DE LA BANQUE D'ADN COMPLEMENTAIRE.....</b>	<b>91</b>
<b>5. DIGESTION DE L'ADN DE PHAGES.....</b>	<b>92</b>

## CHAPITRE IV: DISCUSSION

*DISCUSSION*..... 103

## CHAPITRE V: CONCLUSION

*CONCLUSION*..... 108

## CHAPITRE VI: REFERENCES

*REFERENCES*..... 109

## LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine 5' diphosphate
Ala	Alanine
AMP	Adénosine 5' monophosphate
Arg	Arginine
ARN	Acide ribonucléique
ARS	Activité spécifique relative
ATP	Adénosine triphosphate
BSA	Bovine serum albumine
<i>C.fasciculata</i>	<i>Crithidia fasciculata</i>
cps	Coups par secondes
Ci	Curie
CoA	Coenzyme A
Cys	Cystéine
dATP	Désoxyadénine triphosphate
dCTP	Désoxycytosine triphosphate
dGTP	Désoxyguanine triphosphate
DHAP	Dihydroxyacétone phosphate
DOC	Acide désoxycholique
dTTP	Désoxytyrosine triphosphate
EDTA	Acide éthylènediaminetétraacétique
EGTA	Ethylène glycol-bis-( $\beta$ -amino-éthyléther)N, N' tétraaceticacid
F6P	Fructose 6 phosphate
G-3-P	Glycérol-3-phosphate
G6PDH	Glucose-6-phosphate-déshydrogénase
Gln	Glutamine
His	Histidine
Kb	Kilobase

Kda	Kilodalton
Km	Constante de Michaëlis-Menten
LB	Luria Bertani
Leu	Leucine
Lys	Lysine
MES	Morpholinoéthane sulfonic acid
MOPS	Morpholino-propane sulfonic acid
mU	milliunits
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamide adénosine dinucléotide
NADH	Nicotinamide adénosine dinucléotide sous sa forme réduite.
NADPH	Nicotinamide adénosine dinucléotide phosphate sous sa forme réduite.
pb	Paire de base
PEG	Polyéthylèneglycol
pfu	Plaque forming units
PIPES	Piperazine éthane sulfonicacid
PSG	Phosphate saline buffer
SDM	Semi-defined medium
SDS	Sodium dodécyl sulfate
SE	Sodium solution-EDTA
Ser	Sérine
SM	Suspension medium
SOD	Superoxide dismutase
SSC	Sel-citrate de Sodium
STE	Sucrose-Tris-HCl-EDTA
<i>T. brucei</i>	<i>Trypanosoma brucei</i>
TBE	Tris-borate-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEA	Triéthanolamine
TES	Tris-HCl-EDTA-SDS
VSG	Glycoprotéine variable de surface

# INTRODUCTION

# I. LES TRYPANOSOMATIDES.

## A. Généralités.

Parmi les protozoaires, nous trouvons un ensemble de parasites unicellulaires particulièrement étudiés en raison de leur pouvoir pathogène tels que:

- les Plasmodiés, responsables de la malaria (accès de fièvre revenant plus ou moins fréquemment).
- les leishmanies, responsables de leishmanioses plus ou moins prononcées (bouton d'Orient, Kala-Azar).
- le genre *Trypanosoma* responsable de la maladie du sommeil chez l'homme (*T. brucei rhodesiense*, *T. brucei gambiense*), d'une maladie similaire chez le bétail, la nagana (*T. brucei brucei*, *T. vivax*) et de la maladie de Chagas (*T. cruzi*). La classification des trypanosomatidés est illustrée à la figure 1:

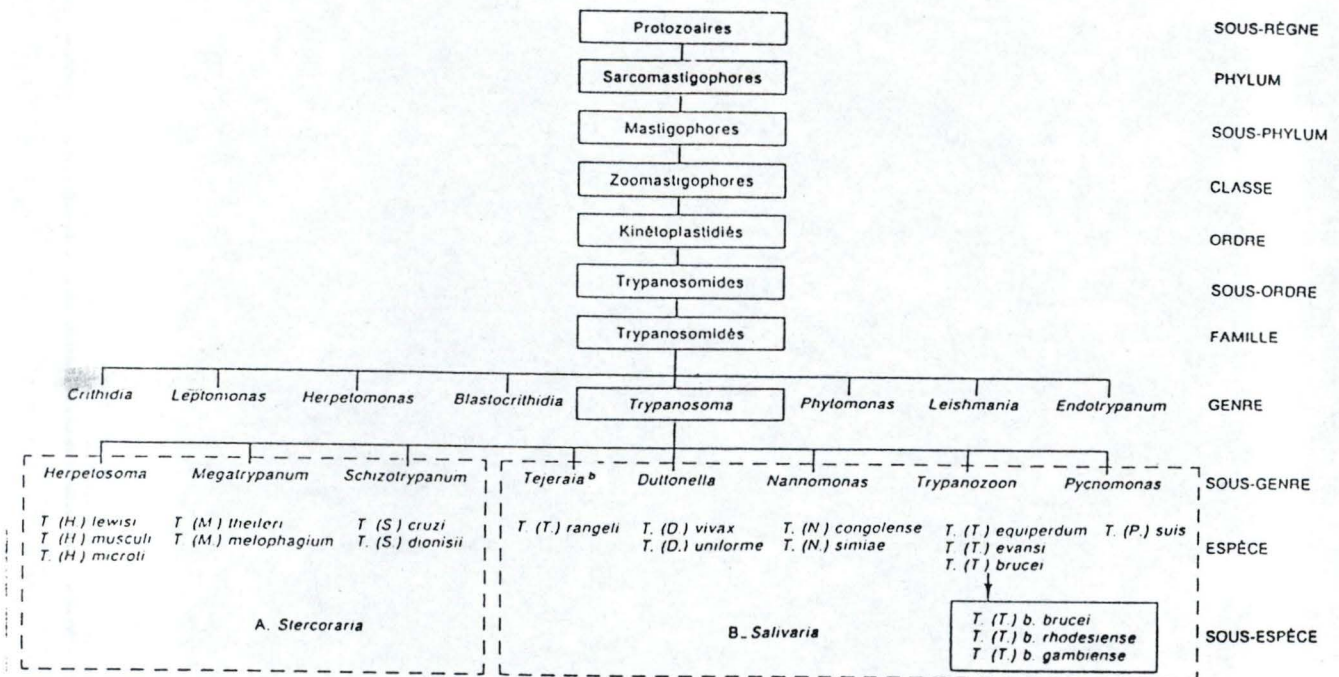


Figure 1: Classification des trypanosomatidés (Levine, 1980)

Ces trypanosomatidés appartiennent à l'ordre des kinétoplastidés et sont caractérisés par (Simpson, 1987) :

- la présence d'un kinétoplaste, organite situé à la base du flagelle et constitué par un réseau de maxicercles et de minicercles d'ADN. On trouve  $5 \times 10^3$  -  $5 \times 10^4$  minicercles et 20 à 50 maxicercles par réseau. Les maxicercles contiennent les gènes de structure mitochondriaux tandis que la fonction des minicercles, qui représentent 90 % du réseau, assureraient l'édition de certains gènes grâce à l'existence de RNAs guides codés endéans les minicercles.
- une compartimentation tout-à-fait particulière de la glycolyse au sein d'un organite de type "microbody": le glycosome ( voir chap. II ).
- un squelette constitué d'un réseau de microtubules sous la membrane plasmique et entourant entièrement la cellule sauf au niveau du flagelle et de la poche flagellaire. C'est le seul endroit par lequel le parasite a la possibilité de s'alimenter et par lequel on pourrait faire pénétrer des drogues sans être bloqué au niveau de la barrière de microtubules. Ces derniers représentent, chez les trypanosomatidés, l'équivalent du cytosquelette chez les autres cellules eucaryotes, maintenant leur forme caractéristique tout en assurant une certaine flexibilité. Des microfilaments assureraient en plus la fonction de redistribution des organites et de modulation de la forme du parasite lors des différentes phases du cycle cellulaire.
- l'addition post-transcriptionnelle d'une séquence mini-exon de 35 nucléotides à l'extrémité 5' de la plupart des ARN messagers.



- un caryotype très particulier ayant une organisation chromosomique de molécules allant de 50 à 2000 kb. Grâce à l'électrophorèse en champ pulsé, le génome du trypanosome a pu être caractérisé. Les chromosomes chez *T. brucei* peuvent être répartis en trois classes selon leur taille:
  - une centaine de mini-chromosomes de 50 kb à 150 kb.
  - cinq bandes allant de 200 kb à 600 kb ( les chromosomes intermédiaires).
  - treize bandes allant de 700 kb à 2 Mb.

## **B. *Trypanosoma brucei*.**

L'organisme le mieux étudié parmi les trypanosomatidés est *Trypanosoma brucei*.

### 1. Cycle de vie: (Vickerman, 1984).

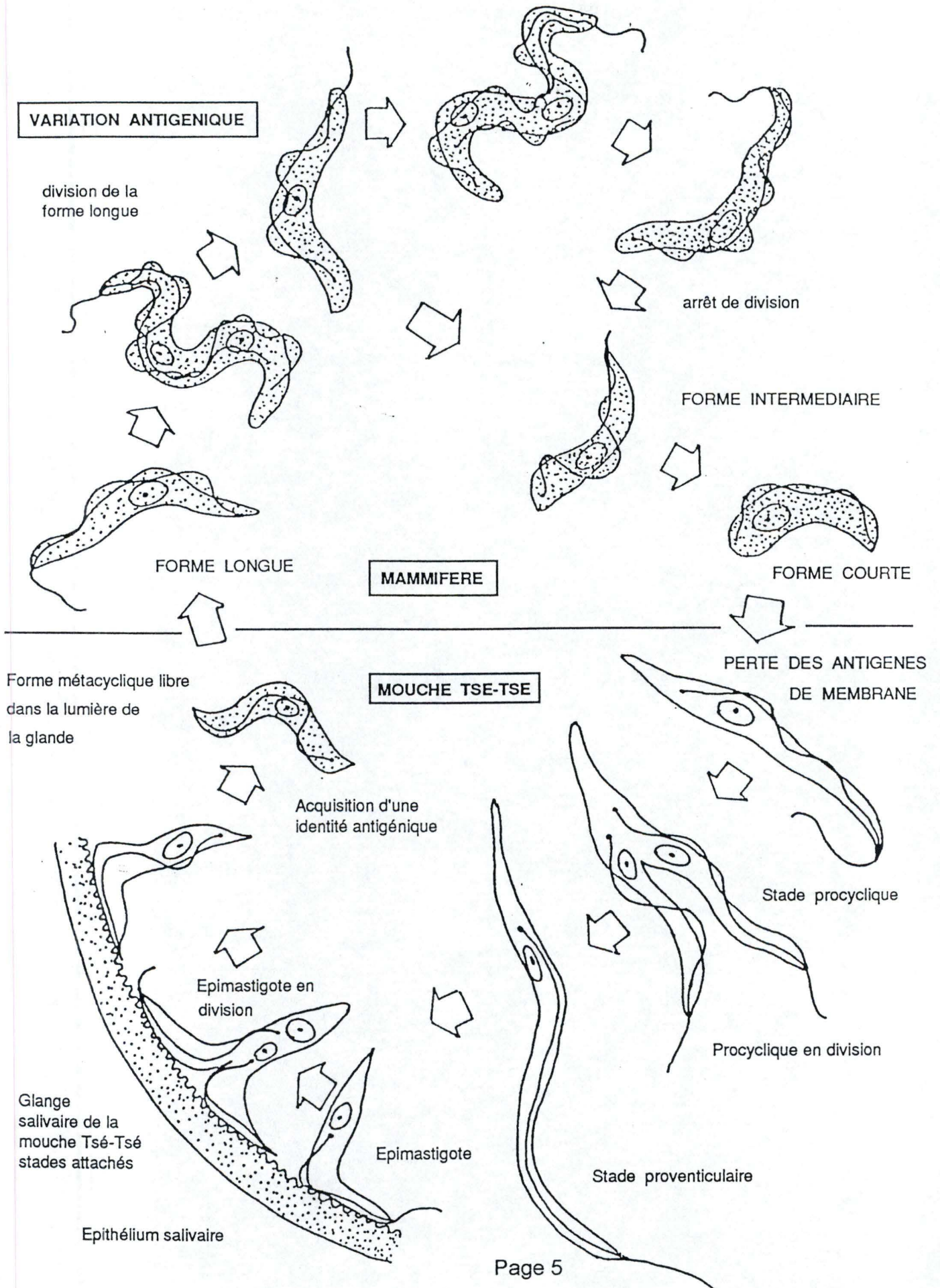
Le cycle de vie de *T. brucei* se déroule en partie dans un hôte vertébré (homme ou animal) et en partie dans un hôte invertébré: la glossine ou mouche tsé-tsé ( voir figure 2 ).

Les parasites sont transmis à l'hôte vertébré lors d'une piqûre par une mouche infectée. Ils se reproduisent dans le sang par simple fission binaire des formes longues (slender). Celles-ci se différencient ensuite en forme intermédiaire, puis en forme courte (stumpy). Cette forme courte est incapable de se diviser, mais elle peut poursuivre le cycle lorsqu'elle est ingérée par une mouche tsé-tsé lors d'un repas sanguin.

Dans l'intestin de la mouche, les formes courtes se transforment en formes procycliques. Après quelques jours, elles migrent vers les proventricules (formes proventriculaires).

De là, les parasites migrent vers les glandes salivaires, s'y transforment en épimastigotes et s'y attachent. Les épimastigotes donnent naissance aux formes métacycliques, infectieuses pour les mammifères et qui sont libérées dans le sang du mammifère lors d'un second repas sanguin. Le cycle de développement dure entre 3 et 5 semaines.

Figure 1 : Cycle de *Trypanosoma brucei* (Vickerman, 1984)



## 2. La variation antigénique (Turner, 1985)

L'une des caractéristiques majeures de *T. brucei* est sa capacité d'échapper au système immunitaire de l'hôte grâce à un mécanisme appelé la variation antigénique. Dans le sang de l'hôte, le trypanosome est recouvert par un manteau constitué d'un seul type de glycoprotéines. Cette glycoprotéine, appelée glycoprotéine variable de surface (VSG), est très immunogène et entraîne la synthèse d'anticorps par l'hôte. Ces anticorps provoquent la lyse des trypanosomes par activation du complément et entraînent la phagocytose par les macrophages. Toutefois, après 10 jours, le nombre de parasites dans le sang réaugmente. Ces nouveaux trypanosomes possèdent un manteau de glycoprotéines différent de celui des trypanosomes initiaux. Le système immunitaire se met alors à faire des anticorps contre cette nouvelle glycoprotéine. Ce cycle de recrudescence et de rémission semble pouvoir se continuer indéfiniment jusqu'à la mort de l'hôte. Chaque VSG est traduit à partir d'un gène particulier et on estime le nombre de ces gènes à au moins mille dans le génome du trypanosome.

### Structure de la glycoprotéine variable de surface (VSG, Fig. 3)

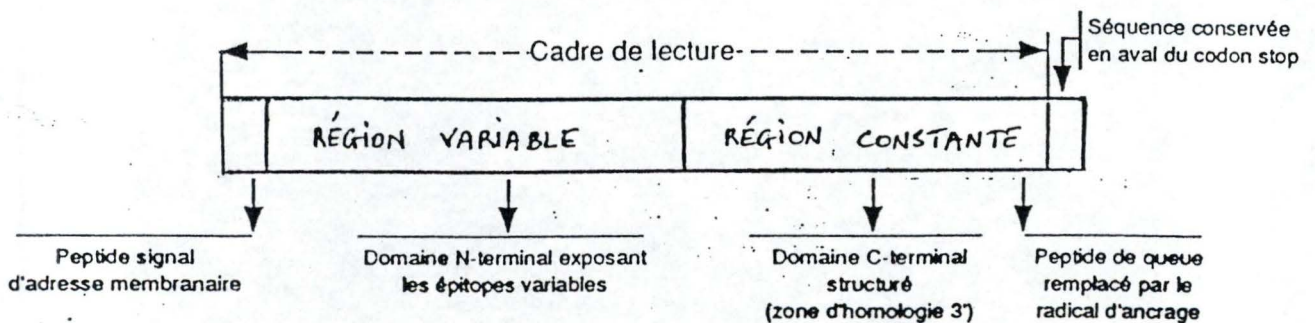
Un VSG naissant comporte plus ou moins 500 acides aminés ( Pays, 1990)

On peut distinguer quatre parties:

- une courte séquence signal, responsable de l'adressage membranaire.
- un domaine amino-terminal variable, exposant les épitopes variables et constituant le seul déterminant antigénique de la protéine.
- un domaine carboxy-terminal non variable ou région d'homologie 3'.
- une courte queue hydrophobe qui est enlevée avant que le VSG n'atteigne la surface extérieure et qui est remplacée par le radical d'ancrage.

Le VSG est attaché à la membrane via un phosphoglycolipide, chaque VSG pouvant être clivé par un enzyme qui enlève des acides gras, permettant ainsi le remplacement d'un VSG par un autre. Le manteau de chaque trypanosome est constitué d'une matrice de plus ou moins  $10^7$  molécules glycoprotéiques identiques (Lewin, 1990).

La variation antigénique empêche tout projet de vaccination contre *T. brucei*. Par contre, des interférences avec la synthèse, l'ancrage ou la libération du manteau de surface semblent une alternative de lutte.



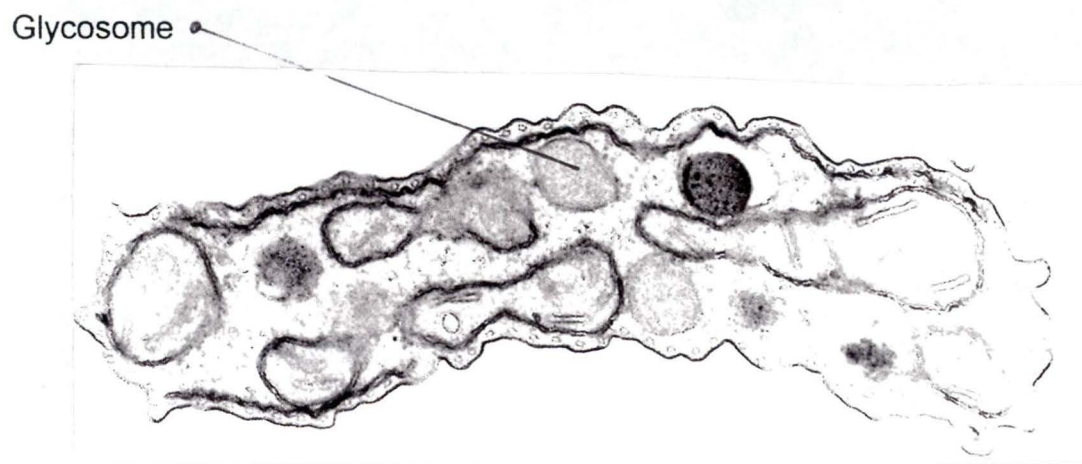
**Figure 3 : Organisation génétique et protéique d'un VSG chez *T. brucei***  
( Pays, 1990)

D'après Turner (1985), les VSG formeraient une barrière compacte et imperméable qui empêcherait l'accès des anticorps et des molécules de la voie alterne du complément.

## II. GLYCOLYSE ET GLYCOSOMES

### A. Généralités

Chez les trypanosomatidés, la majorité de la glycolyse se déroule dans un organe spécialisé: le glycosome. Cet organe a été décrit pour la première fois chez *T. brucei* par Opperdoes et Borst en 1977. On a pu détecter les glycosomes chez d'autres membres de l'ordre des *Kinetoplastida*, comme *Leishmania*, *Crithidia*, *Phytomonas* et *Trypanoplasma* (Michels & Opperdoes, 1991).



**Figure 4 : Micrographie électronique des formes choanomastigotes de *Crithidia luciliae* (agrandissement : x 35000) fournie aimablement par le Docteur I. Coppens**

Le glycosome contient les neuf enzymes impliqués dans la transformation du glucose en phosphoglycérate et (dans des conditions d'anaérobie) en glycérol. On a montré que d'autres enzymes sont aussi localisés dans cet organe (voir tableau 1).

Le glycosome (figure 4) est apparenté aux microbodies (peroxysomes, glyoxysomes) dont il partage plusieurs caractéristiques:

- sa morphologie ressemble à celle d'autres microbodies (taille homogène de 0.3  $\mu\text{m}$ , entouré d'une simple membrane, matrice dense aux électrons, corps cristalloïde).
- ni les glycosomes ni les peroxysomes ne contiennent de l'ADN. Toutes les protéines de ces organites sont donc synthétisées dans le cytosol et ensuite importées (Opperdoes et al, 1984) (voir chap. II.C).

En confinant la glycolyse dans un organite, le trypanosome augmente la concentration locale des substrats et cofacteurs et obtient ainsi un rendement maximal.

L'intérêt d'une étude du glycosome se situe à plusieurs niveaux:

- cible pour des nouvelles drogues trypanocides spécifiques ( Michels, 1988). En effet, les médicaments qu'on possède actuellement pour traiter la trypanosomiase ou la leishmaniose sont peu nombreux, peu efficaces et possèdent des effets secondaires importants.
- un modèle quant à l'import des protéines dans d'autres microbodies, tel le peroxysome par exemple (Opperdoes, 1988).
- apport évolutif ( Michels & Opperdoes, 1991): en analysant et en comparant des enzymes glycosomales (microbody) chez les eucaryotes primitifs (kinétoplastidés), on aura une idée de l'origine endosymbiotique ou autre des microbodies. Bien que l'origine endosymbiotique ne soit pas prouvée, cette hypothèse est préférée à celle des microbodies émergeant à partir d'un système de membranes internes dans la cellule eucaryotique primitive.

T.b: *Trypanosoma brucei* ; C.l: *Crithidia lucilae* ; C.f: *Crithidia fasciculata* ; L: *Leishmania* ; T. c: *Trypanosoma cruzi*

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
Glycérolkinase		Tb		L	
Fixation du CO <sub>2</sub>	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			

**Tableau 1: Enzymes localisées dans les glycosomes des trypanosomatidés**  
(Opperdoes, 1990).



## **B. Glycolyse chez *T. brucei* ( Opperdoes, 1987)**

Dans l'hôte mammifère, le trypanosome est entièrement dépendant du glucose comme source d'énergie. En effet, à ce stade, le parasite n'a pas de mitochondrie fonctionnelle et donc pas de cycle de Krebs, peu de cytochromes et pas de synthèse d'ATP couplée à la respiration.

La glycolyse chez la forme sanguine de *T. brucei* diffère de la glycolyse d'autres eucaryotes par trois points :

1. absence de lactate déshydrogénase: la réoxydation des substrats se fait donc en utilisant l'oxygène via la navette dihydroxyacétone phosphate (DHAP): glycerol 3-phosphate (G-3-P) et la G-3-P oxydase mitochondriale.
2. en aérobiose, le pyruvate est le seul produit final et est excrété dans le sang de l'hôte.
3. en anaérobiose, le glucose est converti en pyruvate et en glycérol avec synthèse nette d'ATP et réoxydation du NADH.

Dans l'insecte, c'est le métabolisme oxydatif des acides aminés par le cycle de Krebs fonctionnel et la chaîne respiratoire qui fournissent l'énergie au trypanosome.

La glycolyse est illustrée à la figure 5.

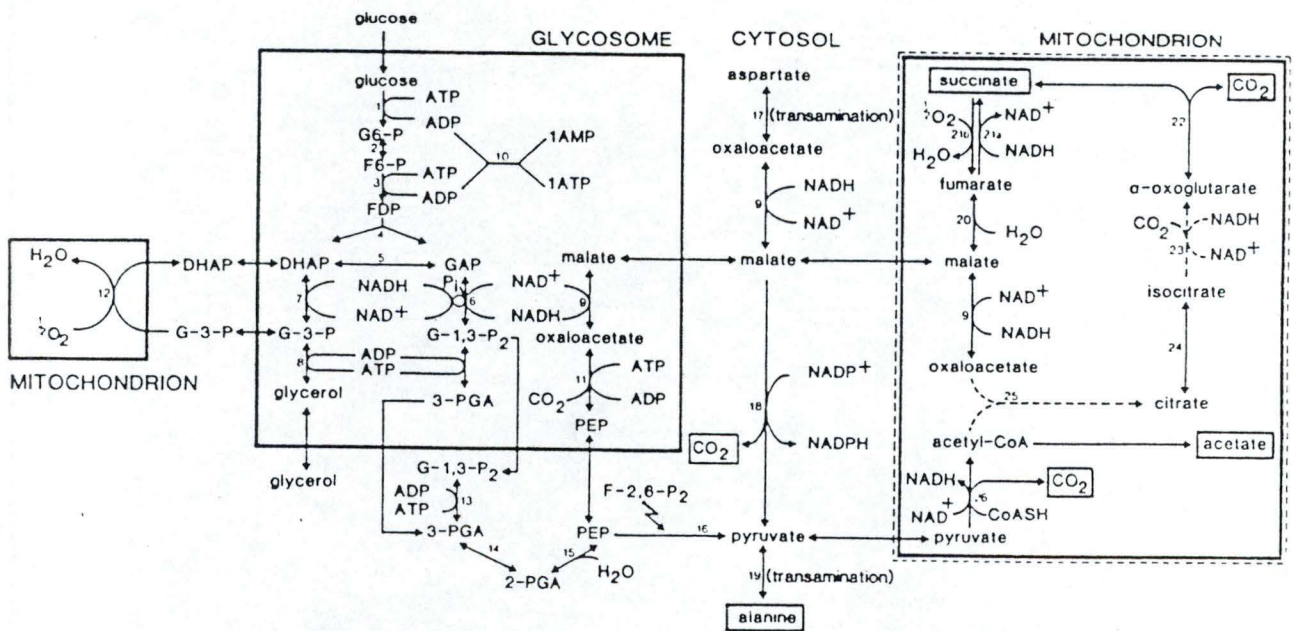


Figure 1.3 : Voies métaboliques du glucose. Les enzymes localisées dans le glycosome et dans le cytosol ont été prouvées mais la localisation des enzymes mitochondriales (à l'exception de la glycérolphosphate oxydase et la malate déshydrogénase) a été clairement démontrée. Les produits finaux du métabolisme aérobie et anaérobie sont entourés de cadre. Les lignes pointillées indiquent les enzymes dont la présence reste incertaine. 1, hexokinase; 2, phosphoglucose isomérase; 3, phosphofructokinase; 4, aldolase; 5, triosephosphate isomérase; 6, glyceraldéhyde-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, énoïase; 16, pyruvate kinase; 17, aspartate aminotransférase; 18, enzyme malique; 19, alanine 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.

Figure 5: La glycolyse chez *T. brucei*.

### C. Import de protéines.

Le glycosome ne contenant pas d'ADN, les enzymes glycosomales sont traduites au niveau de polysomes libres et ensuite importées dans l'organite.

Pour qu'une protéine soit importée dans un organite, il faut un signal topogénique. Il y a au moins trois types de signaux d'import ( de Hoop & Ab, 1992):

- un signal carboxy-terminal: ce type de signal est le plus étudié pour l'import dans les glycosomes et les peroxysomes. Une séquence signal minimale a été

déterminée pour l'import dans les peroxysomes et on a identifié la séquence consensus suivante: Ser ou Cys ou Ala -- Lys ou His ou Arg -- Leu. Ce signal est aussi reconnu comme signal d'import dans les glycosomes.

- un signal amino-terminal: quelques protéines des organites sont synthétisées en comprenant une « préséquence » amino-terminale. Cette dernière peut être clivée lors de l'import, mais elle ne l'est pas toujours. La longueur de la séquence nécessaire pour l'import est variable. On a déterminé une séquence conservée dans la majorité des signaux amino-terminaux d'import. Celle-ci est la suivante: Arg -- Leu--x--x--x--x--Gln ou His --Leu, où x est un acide aminé arbitraire.
- un signal interne: jusqu'ici, on n'a pas pu déterminer une séquence consensus interne. Toutefois, on ne peut pas exclure l'existence d'un signal interne pour l'import dans les microbodies.

### III. CRITHIDIA FASCICULATA.

#### A. Généralités ( Mc Ghee & Cosgrove, 1980)

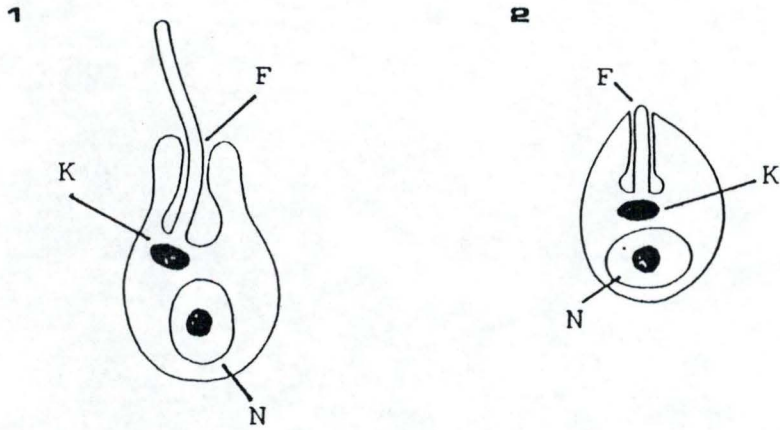
Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à un membre des trypanosomatidés moins connu: *Crithidia fasciculata*, parasite de l'insecte.

Les premières observations d'un flagellate parasite d'insecte furent réalisées par Leeuwenhoek qui mentionne des animalcules dans le sang d'un taon. En 1904, Léger publie un ensemble de descriptions de trypanosomatidés de différents diptères et introduit le nom de genre *Crithidia*.

Le cycle de *Crithidia* est très simple et n'implique qu'un seul hôte. De plus, *Crithidia* ne semble pas avoir un hôte spécifique, elle infecte les arthropodes, principalement les diptères, hémiptères, hyménoptères et lépidoptères. Ce manque de spécificité vis à vis de l'hôte augmente les chances de survie du parasite.

*Crithidia* existe sous trois formes:

- forme libre nageante, dans le milieu de vie des insectes hôtes.
- formes choanomastigotes et amastigotes, dans le tube digestif de l'hôte (figure 6).

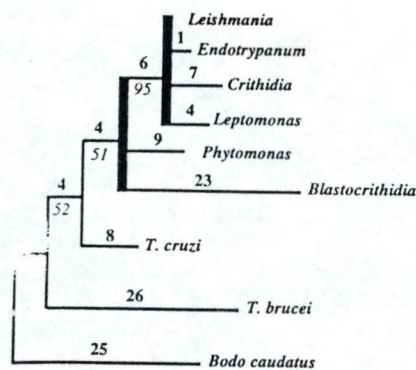


*Formes choanomastigotes 1 et amastigotes 2*

**Figure 6 : Formes choanomastigotes et amastigotes de *Crithidia***  
(Vickerman & Preston, 1976)

L'infection par *Crithidia* se fait par ingestion des parasites, qui sont excrétés dans le milieu environnant, après passage dans le tube digestif. Si le parasite n'est pas repris rapidement par un autre insecte, il meurt.

La morphologie similaire, ainsi que le manque de spécificité vis à vis de l'hôte ont longtemps empêché une classification de *Crithidia*. C'est grâce aux analyses de séquences en acides aminés que la position évolutive de *Crithidia* a été déterminée (Fernandes et al, 1993) ( voir figure 7).



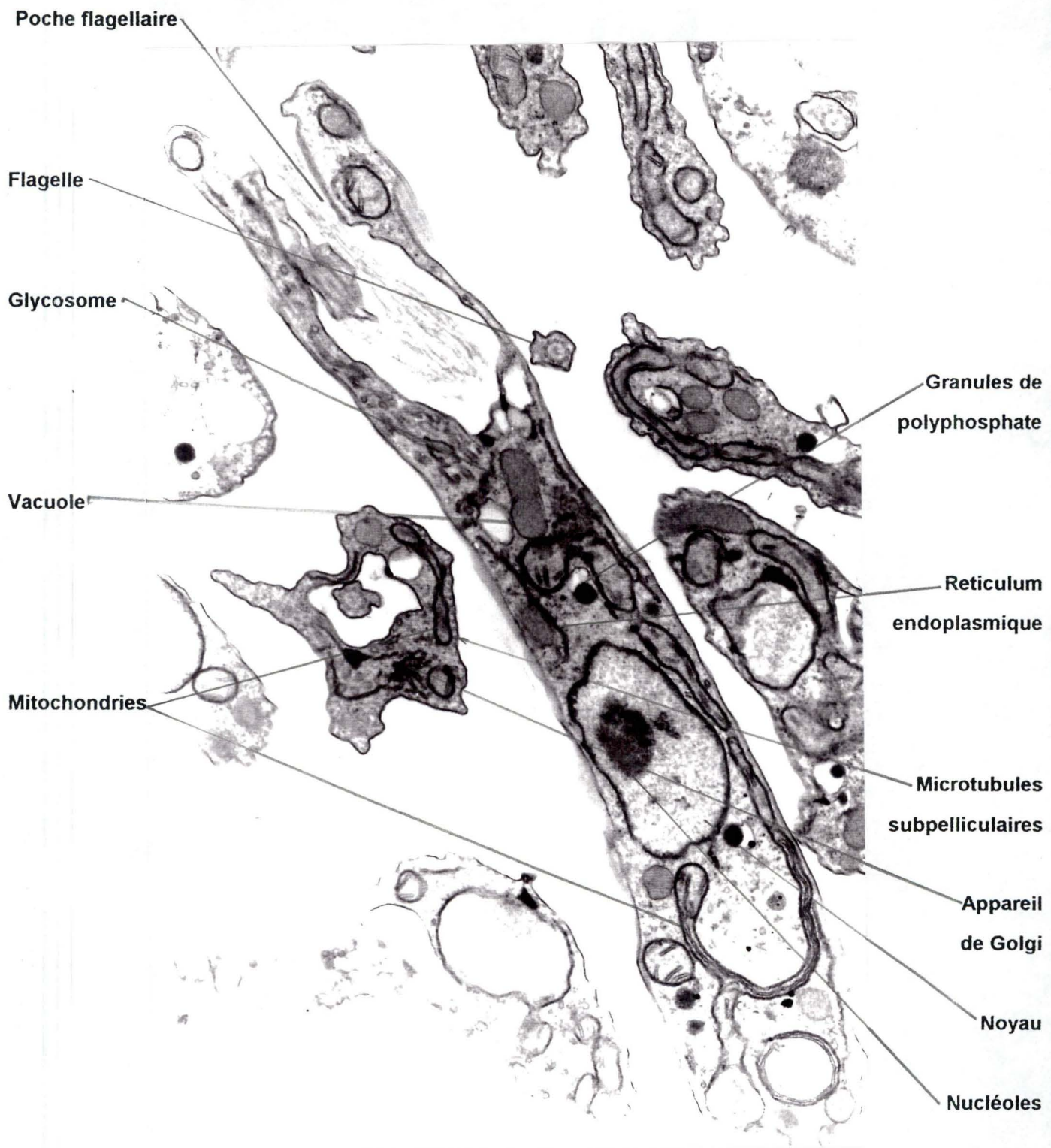
**Figure 7: Relations entre Trypanosomatidés ( Fernandez et al., 1993)**

Des études précédentes ayant trait aux relations évolutives entre les *Trypanosomatidae* se basaient sur des traits morphologiques ou sur le cycle de vie des parasites. Selon ce modèle, les genres digéniques tels *Leishmania* et *Trypanosoma* provenaient d'ancêtres monogéniques de type *Leptomonas*, mais le nombre d'origine indépendante de parasitisme digénique était estimé entre 1 et 5. On a proposé alors un modèle où les parasites digéniques proviennent de l'intrusion d'un organisme à vie libre et qui par la suite aurait donné naissance aux parasites monogéniques.

Devant ces positions ambiguës, on a alors fait appel à la biologie moléculaire. Des comparaisons de l'ARN ribosomal ( kinétoplaste) donnèrent des arbres tout-à-fait différents de ceux établis sur base de la morphologie. Dans ce genre d'arbre, *T. brucei* et *T. cruzi* divergent avant la lignée menant à *Crithidia* et à *Leishmania* qui sont très proches, *T. brucei* représentant la divergence la plus ancienne endéans les trypanosomatidés.

### **B. Morphologie ( Wallace, 1966)**

La taille de *C. fasciculata* est variable (de 4 à 385 µm), la forme est allongée, élancée et possède des extrémités pointues ou arrondies. Le noyau est central et situé au tiers du corps.



**Figure 8: Micrographie électronique des formes choanomastigotes de *Crithidia luciliae* (agrandissement : x 25000) aimablement offerte par le Docteur I. Coppens.**

*Crithidia fasciculata* montre les caractéristiques suivantes ( Vickerman & Preston, 1976) :

- *une vacuole contractile*: celle-ci est active au moins pendant la phase de dispersion en vie libre. Chez les bodonidés à vie libre, une telle vacuole jouerait un rôle de régulation osmotique en se vidant dans la poche flagellaire. Chez les trypanosomes, un tel rôle n'a toutefois pas pu être démontré.
- *une poche flagellaire*: est une invagination de la membrane cellulaire externe. Son ouverture externe est à l'extrémité antérieure du parasite.

Comme tous les kinétoplastidés, *Crithidia* possède un flagelle, permettant le déplacement du parasite par des mouvements de rotation, (Mc Ghee et Cosgrove, 1980), des glycosomes ainsi qu'un kinétoplaste. Celui-ci montre deux particularités ( Simpson, 1987): les minicercles le composant ont une taille de 2500 pb et adoptent une conformation particulière. Les maxicercles contiennent des régions activement transcrites contenant les gènes des ARN ribosomiaux, des gènes structuraux et des régions non transcrites constituées de séquences répétitives à fonction encore inconnue.

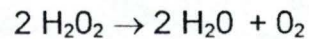
Chez *C. fasciculata*, des accumulations de polyphosphates ont été mises en évidence et sont connues sous le nom de vultine (Vickerman & Preston, 1976). Ces vacuoles servent de réserve à polyphosphates. Ces derniers s'accumulent dans des conditions où la fourniture d'ATP est supérieure à la demande. Cela explique que de tels organismes peuvent survivre dans des conditions où peu ou pas de substrats respirables sont disponibles.



## IV. LA CATALASE.

### A. Importance de la catalase.

La catalase, sujet de ce travail, est responsable de la transformation du peroxyde d'hydrogène en oxygène et en eau (Figure 9).



**Figure 9: Mécanisme d'action de la catalase** ( Darnell et al., 1989)

L'enzyme est localisée dans les microorganites, soit les peroxysomes (animaux et champignons), soit les glycosomes (trypanosomatidés) (Opperdoes, 1988).

La catalase joue un rôle très important dans la survie d'un organisme, car elle évite une accumulation du peroxyde d'hydrogène, produit secondaire du métabolisme des acides gras et des acides aminés.

Les effets de l' $\text{H}_2\text{O}_2$ , ainsi que d'autres espèces réactives de l'oxygène telles que les radicaux libres  $\text{O}_2^{\cdot -}$  et  $\text{O}^{\cdot -}$  et leurs formes protonnées  $\text{HO}_2^{\cdot -}$  et  $\text{OH}^{\cdot -}$  sont très diverses ( Sies, 1986).

- Effets sur les acides nucléiques: les dommages de l'ADN par oxydation par les radicaux libres peut entraîner la cassure du chromosome. Ceci a été observé dans le lupus erythromateux.  
Toutefois, l'oxydation des bases et la cassure de brins ne sont pas irréparables et elles peuvent être réparées enzymatiquement.
- Effets sur les acides aminés et les protéines : l'oxydation des chaînes latérales des acides aminés dans les protéines n'a pas le même effet pour tous les acides aminés. Pour certains acides aminés, l'effet est réversible tandis que pour

d'autres, le dommage peut être irréversible (clivage de l'anneau dans l'histidine ou le tryptophane).

L'oxydation d'un acide aminé peut avoir des effets désastreux, surtout si elle implique un acide aminé du site actif d'un enzyme. Dans l' $\alpha$ - antitrypsine, on a montré que c'est l'oxydation d'une méthionine du site actif en sulfoxyde de méthionine qui est responsable de la diminution de l'activité de l'enzyme.

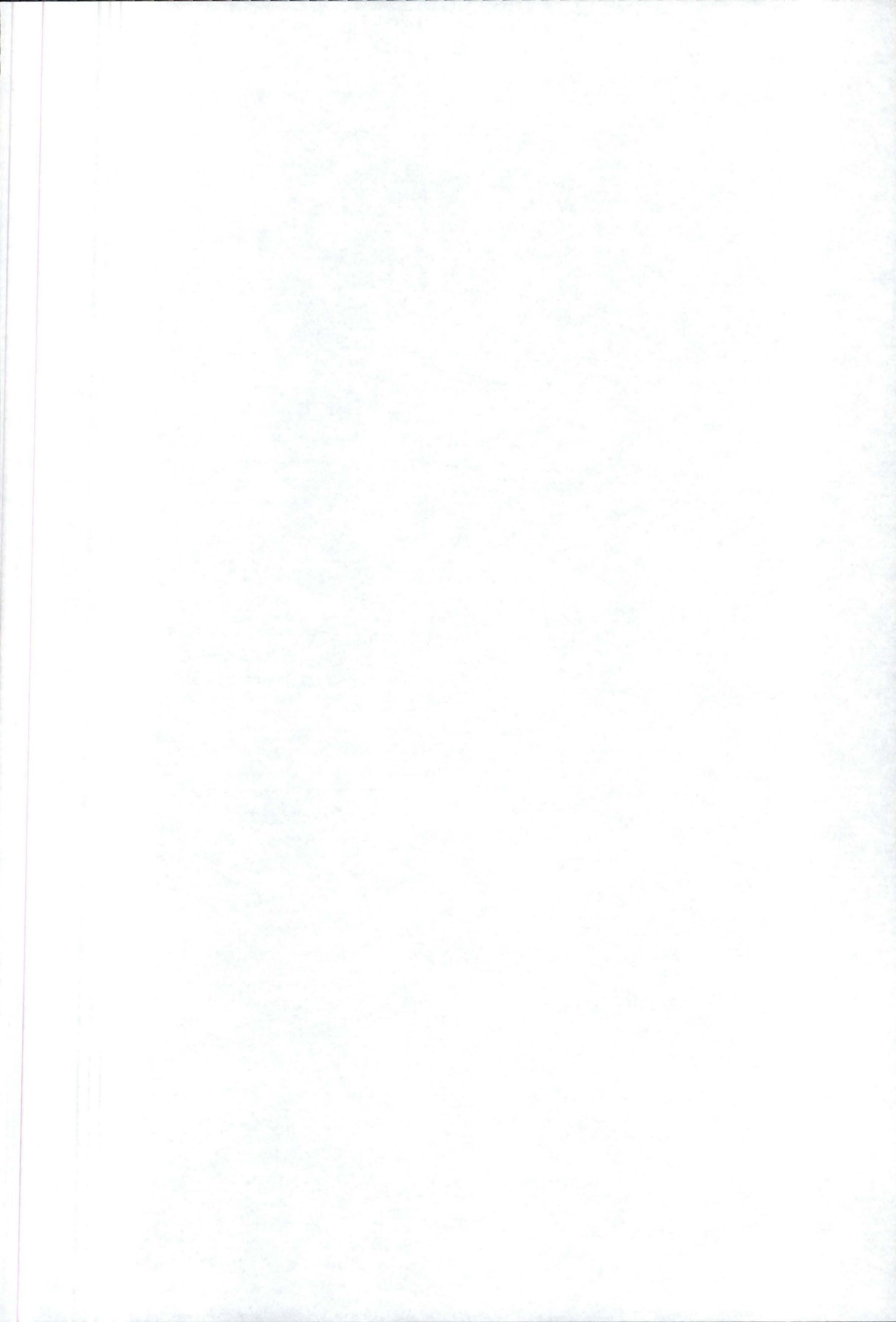
- On a aussi décrit des effets sur les sucres et les lipides, mais ces effets sont très variables et encore assez peu étudiés.

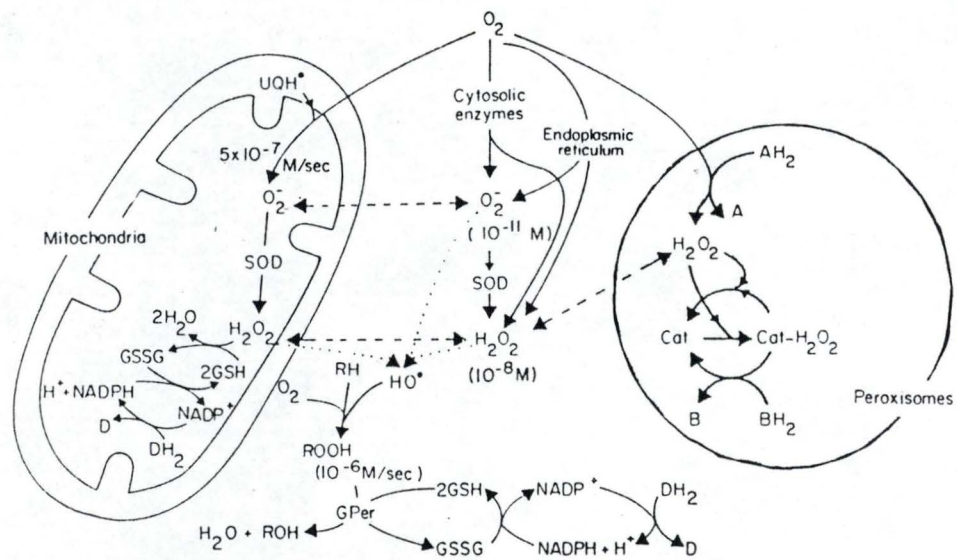
Deux autres enzymes interviennent également dans la production du peroxyde d'hydrogène (la superoxyde dismutase) ou dans sa dégradation (la glutathione peroxydase).

La figure 10 illustre le rôle des trois enzymes dans différentes localisations subcellulaires (Chance et al., 1979).

Dans le cas de concentration physiologique en  $H_2O_2$ , la catalase semble être moins importante que la glutathione peroxydase pour la dégradation du peroxyde (Ma & Eaton, 1992). C'est surtout dans le cas de concentrations élevées en  $H_2O_2$  que la catalase, avec son turn-over élevé ( $4 \times 10^7$  secondes<sup>-1</sup>), protège l'organisme de la destruction.

En plus, de nombreuses bactéries ne possèdent pas de glutathione peroxydase et sont donc dépendantes de la catalase.





UQH: radical ubiquinone; GSSG: glutathione oxydée; GSH: glutathione réduite; DH<sub>2</sub> et D: un système de réduction du NADP non spécifique; SOD: superoxyde dismutase; NADPH et NADP: nicotinamide adénine dinucléotide phosphate sous la forme réduite et oxydée respectivement; O<sub>2</sub><sup>-</sup>: anion superoxyde; OH<sup>•</sup>: radical hydroxyl; ROOH: un hydroperoxyde alkyl; Gper: glutathione peroxydase; Cat: catalase; B et BH<sub>2</sub>: donneur d'hydrogène d'une spécificité appropriée à la catalase telle que l'éthanol.

**Figure 10: Rôles de la catalase, de la glutathione peroxydase et de la superoxyde dismutase dans différentes localisations subcellulaires.**

Dans *T. brucei*, on n'a pas pu détecter l'activité de la catalase, mais on a montré la présence d'une trypanothione et de superoxyde dismutase (Oppenoes, 1994).

La catalase a été mise en évidence chez *Crithidia fasciculata* par Wertlieb et Guttman en 1963 et fut ensuite localisée dans des microorganites, différents des lysosomes et des mitochondries (Muse & Roberts, 1973).

## B. Provenance du peroxyde d'hydrogène

Métabolisme des acides gras. (Rawn, 1990).

Chez les micro-organismes eucaryotes comme chez les plantes, les peroxysomes sont le seul site de  $\beta$ -oxydation des acides gras ( Mannaerts & Van Veldhoven, 1993).

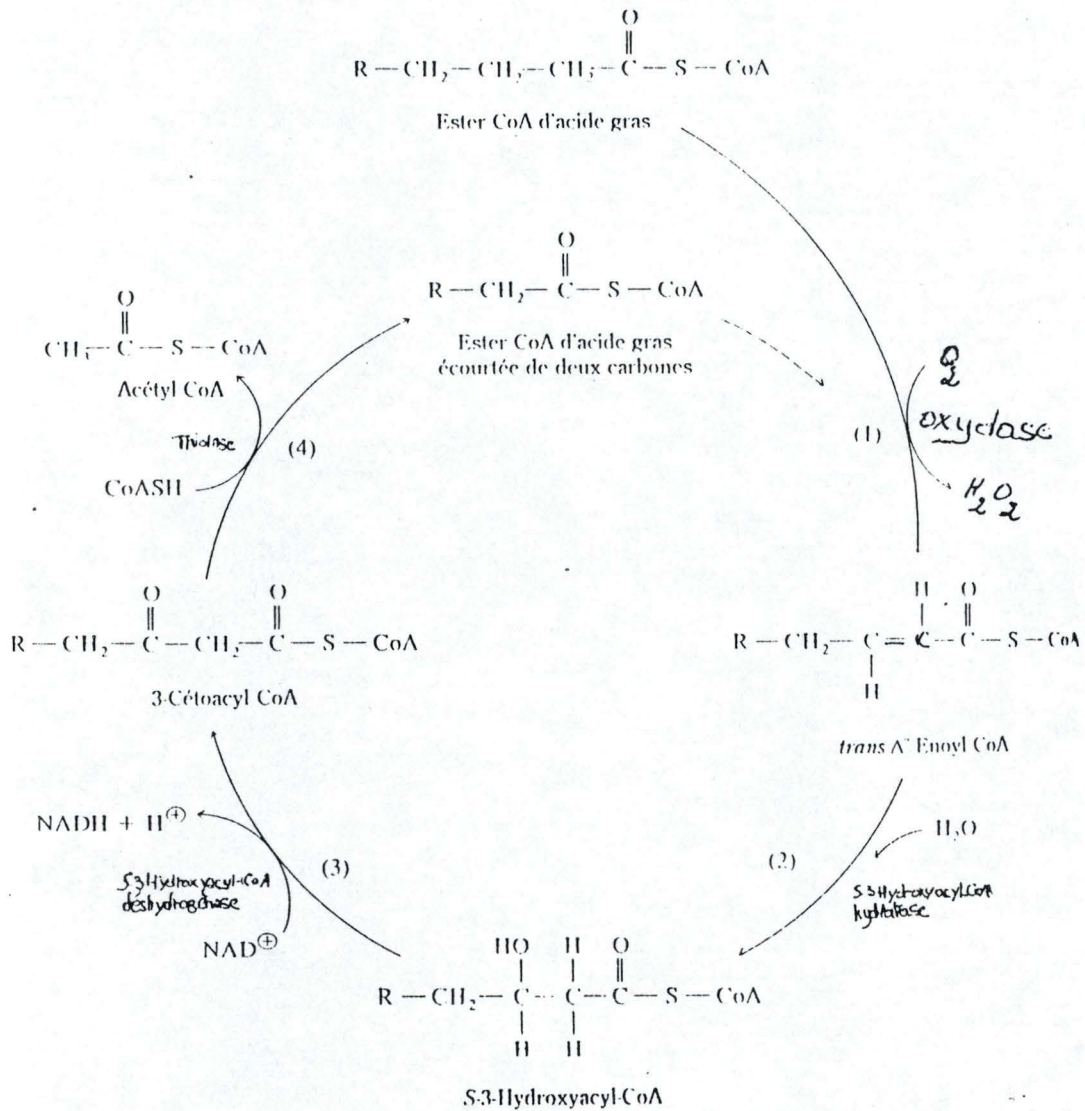
Avant toute oxydation, l'acide gras doit être activé en son ester CoA (Rawn, 1990).

Comme dans les mitochondries ( Mannaerts & Van Veldhoven, 1993; Rawn, 1990), les acyls CoA sont  $\beta$ -oxydés dans les peroxysomes, via quatre réactions consécutives (figure 11).

- Une première oxydation dans laquelle l'acyl CoA est désaturé en 2-trans-énoyl CoA par une oxydase produisant du peroxyde d'hydrogène.
- Une réaction d'hydratation dans laquelle le 2-trans-énoyl CoA est converti en L-3-hydroxyacyl CoA par une hydratase.
- Ce dernier est ensuite converti en 3-cétoacyl-CoA par une déshydrogénase.
- Finalement, un clivage thiolytique dans lequel on a la formation d'un acétyl CoA et d'un acyl CoA écourté de deux carbones par rapport à la molécule originale, et qui peut de nouveau subir un nouveau cycle.

La deuxième et troisième étapes sont catalysées par une seule enzyme multifonctionnelle qui montre une activité 2-énoyl-CoA hydratase et L-3-hydroxyacyl

CoA déshydrogénase ainsi qu'également une  $\Delta 2, \Delta 3$  énoyl CoA isomérase nécessaire à une oxydation des acides gras insaturés ( Hiltunen et al., 1993).



**Figure 11 :  $\beta$  oxydation des acides gras**

Metabolisme des acides aminés.

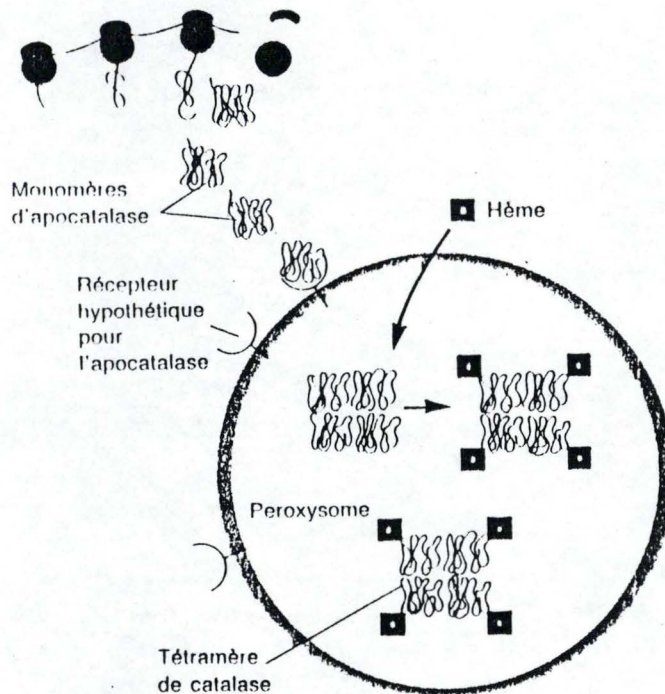
L'oxydase des acides aminés de la série D fut la première enzyme découverte dans les peroxysomes (de Duve & Baudhuin, 1966). Ils contiennent

également la D-aspartate-oxydase, qui oxyde les isomères D des acides aminés acides. Ces réactions conduisent aux cétoacides correspondants +  $\text{NH}_3$  +  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Mannaerts & Van Veldhoven, 1993).

### **C. Description de la catalase.**

La catalase est un homotétramère, avec un groupe hème attaché à chacune de ses sous-unités. Darnell (1989) a montré que la catalase est synthétisée sous forme d'apocatalase sur des polysomes libres dans le cytosol et ensuite importée dans les peroxysomes ( figure 12).

Vingt minutes après leur synthèse, les monomères d'apocatalase sont importés dans le peroxysome, probablement grâce à un récepteur. Dès le passage de la membrane du peroxysome, les sous-unités de l'homotétramère sont assemblées et un groupe hème se greffe sur chacune d'elles. A ce moment, la catalase est active. C'est l'aggrégation qui empêche l'enzyme de retraverser la membrane du micro-organite.

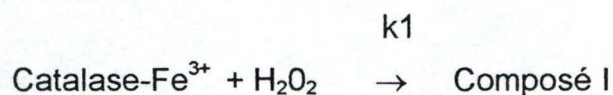


**Figure 12 : Synthèse de la catalase dans les peroxysomes**  
(Darnell et al., 1989)

**D. Cinétique** (Chance, 1979).

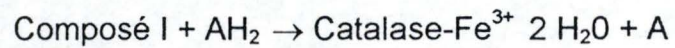
La catalase montre une activité double ( peroxydative et catalatique) avec des caractéristiques cinétiques complètement différentes.

Les deux étapes-clés représentées ci-dessous montrent la description la plus correcte de l'action de la catalase d'un point de vue cinétique dans sa fonction catalatique et peroxydative.



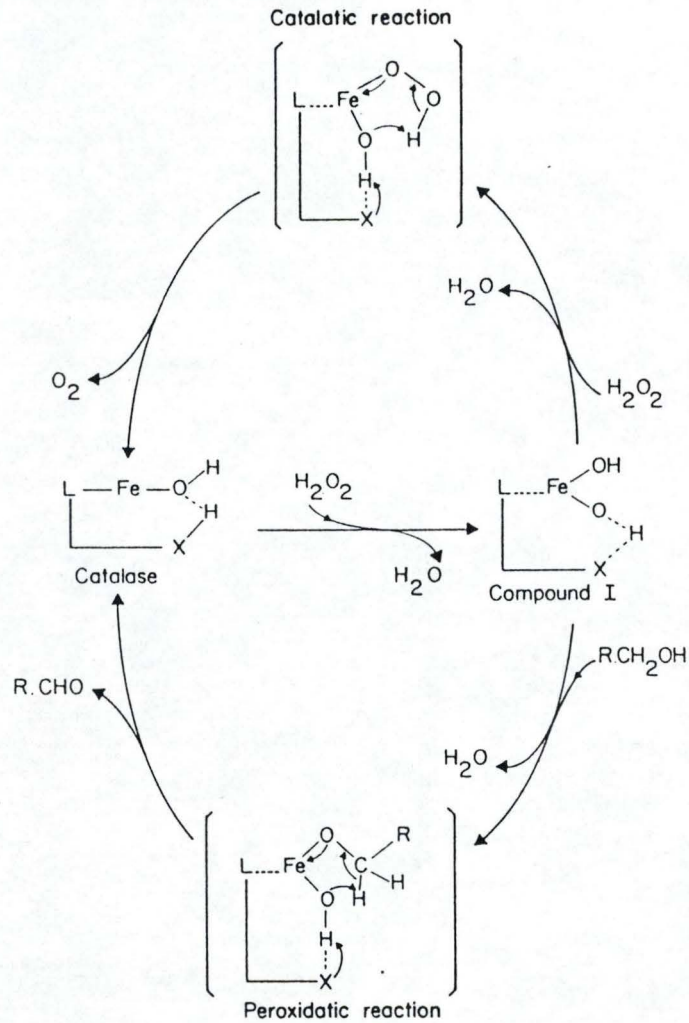


De façon générale, nous pouvons écrire:



La structure du composé I est difficile à définir car, bien que cela doit être un produit de l'oxydation de la réaction du fer et du peroxyde, les électrons du fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) ont tendance à se délocaliser en périphérie de la porphyrine et probablement vers le peroxyde.

Une vision générale de la chimie de la catalase est détaillée dans la figure 13.



**Figure 13 : Mécanisme de réaction du composé I de la catalase**  
( Chance et al., 1979)

La biochimie de cet enzyme est extraordinaire vu que le composé I sert dans les deux voies métaboliques: la réaction catalatique et la réaction peroxydative.

1. La réaction catalatique implique la liaison d'une première molécule d' $H_2O_2$  dans le site de liaison de la structure protéique de la catalase, puis la fixation d'une seconde molécule d' $H_2O_2$ . La fixation de cette dernière conduit à la formation d'une structure tertiaire qui n'a pas encore été identifiée et qui se résout pour libérer de l'oxygène et régénérer la catalase.

2. La réaction peroxydative implique la formation du composé RCHO. Si on développe les équations de cinétique enzymatique, on s'aperçoit que la réaction catalatique n'a pas de constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ), car les constantes de vitesse sont indépendantes de la concentration en  $H_2O_2$ . Alors que dans le cas d'un enzyme qui suit la loi de Michaelis-Menten, la saturation se fait pour une concentration en substrat supérieure au  $K_m$  spécifique de l'enzyme étudiée.

L'activité de l'enzyme augmente linéairement avec la concentration d' $H_2O_2$  disponible jusqu'à des valeurs très élevées, assurant ainsi le contrôle de la concentration en  $H_2O_2$  intracellulaire.

## **E. Action des inhibiteurs sur la catalase.**

### E.1 Le cyanure (Nicholls & Schonbaum, 1963 )

L'inhibition de la catalase par le cyanure est habituellement non compétitive. La nature de ce type de cinétique est due à l'impossibilité du peroxyde à saturer l'enzyme à de basses concentrations. Pour de très hautes concentrations en peroxyde, l'inhibition prend la forme d'une cinétique de type compétitive. Lorsque le cyanure est impliqué dans une réaction d'inhibition, cette dernière conduit à la formation d'un complexe réversible avec le groupe hème.

### E.2 L'aminotriazole (Nicholls & Schonbaum, 1963 ; Middelkoop et al, 1991)

Pour l'aminotriazole, l'inhibition est irréversible et impliquerait un site spécifique de la protéine différent du groupe hème. Cet inhibiteur se lie de manière covalente. De plus, il a été montré que cet inhibiteur entraîne une diminution de l'import de la catalase au niveau des peroxysomes, soit en provoquant un changement conformationnel ou en empêchant le repliement correcte de la protéine.

## F. La catalase chez *Crithidia fasciculata*.

C'est l'étude des inhibiteurs qui a permis la mise en évidence d'un bon nombre de mécanismes biochimiques pouvant conduire à l'établissement de drogues trypanocides. Des expériences de ce genre ont notamment été réalisées sur *Crithidia fasciculata* et *Leptomonas seymouri*. On y a mis en évidence l'effet des naphthoquinones. Il a été montré chez *C. fasciculata*, que les quinones entraînent la libération de  $H_2O_2$  et de  $O_2^{\cdot -}$  ces derniers étant le résultat d'un cycle redox des quinones qui implique une phase réductive, anaérobie pendant laquelle il y a une production de quinols et une phase aérobie au cours de laquelle les quinols sont oxydés et la production des peroxydes se produit. Cela montre de nouveau l'effet toxique des naphthoquinones via la production de peroxydes, la catalase ou d'autres scavengers ne parvenant pas à empêcher cette toxicité (Molina Portela et al, 1991).

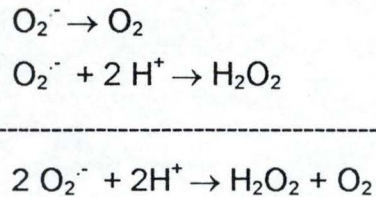
L'action peu protectrice de la catalase chez les cellules isolées de *E. coli* se retrouve également chez *C. fasciculata* puisque des cellules traitées à l'antimycine subissent une génération d' $O_2^{\cdot -}$  et de peroxyde d'hydrogène plus importants malgré la présence de la catalase. Chez les trypanosomes, on a montré que le métabolisme de  $H_2O_2$  n'était pas affecté par l'azide de sodium: la catalase et les peroxydases ne sont pas importantes dans le métabolisme de  $H_2O_2$ . C'est la superoxyde dismutase qui intervient ici.

Par contre, les trypanosomes sont sensibles au N-éthylmaleimide en majeure partie impliquant un mécanisme faisant intervenir une trypanothione (Penketh et al, 1987). Cette dernière est en fait une glutathione à cofacteur (spermidine) qui a été détectée chez beaucoup de trypanosomatidés et qui remplacerait le système glutathione-péroxydase-glutathione réductase des autres cellules eucaryotes (Docampo, 1990).

Chez *C. fasciculata*, on découvre également la présence d'une superoxyde dismutase comme chez les Trypanosomes et les *Leishmania*. C'est une superoxyde dismutase à fer (SOD) car, si on emploie un chélateur du fer (N1-N6-bis-1-6-

diaminohexane), on inhibe complètement cet enzyme. Cette inhibition est dépendante de la présence d'oxygène (Docampo, 1990).

Rappelons en effet que la SOD agit de concert avec la catalase puisqu'elle va, via la réaction de dismutation, donner lieu à la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, bien moins toxique que les autres radicaux intermédiaires:



Chez les organismes pluricellulaires et notamment chez l'homme, la SOD est particulièrement intéressante car elle est utilisée comme agent antiinflammatoire combattant les nécroses dans le cas de pancréatites ou de lésions intestinales dans lesquelles les stress oxydatifs ont été impliqués (Sies, 1986).

### G. Catalase et Evolution

Selon plusieurs auteurs, il a été montré que les microbodies auraient été acquis par les cellules eucaryotes à partir d'un endosymbionte procaryote probablement une posibactérie (de Duve, 1982) qui serait entré dans la cellule eucaryote par phagocytose et qui aurait éventuellement perdu sa paroi cellulaire et son ADN et serait devenu de la sorte un organe (Cavalier-Smith, 1989).

Ces microbodies de tous les règnes sont caractérisés par la présence de catalase A. Cette dernière permet la dégradation du peroxyde d'hydrogène produit (1) par la cellule elle-même dans des réactions spécifiques à l'organe, (2) par la réaction de l'oxygène moléculaire sur certains métabolites cellulaires.

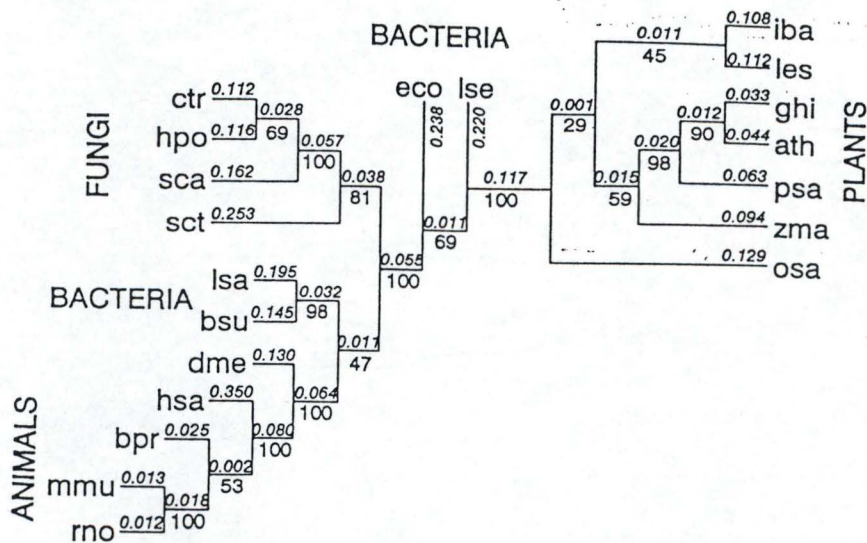
Si l'on remonte le cours du temps, ce sont les Archaezoa (Entamoeba, Giardia) qui sont les cellules eucaryotes les plus primitives connues.

Ces dernières se caractérisent par le fait qu'elles n'ont pas d'organites subcellulaires telles des mitochondries, plastes et des peroxysomes. De plus, ces organismes sont anaérobies et n'ont absolument pas besoin d'un enzyme tel que la catalase. Néanmoins, on connaît des bactéries qui contiennent de la catalase mais cette dernière n'est pas homologue à la catalase A et ne peut donc faire l'objet d'une étude phylogénétique.

Mais d'autres organismes possèdent une catalase homologue de la catalase A, ce sont quelques posibactéries aérobies telles que *Lactobacillus*, *Listéria* et *Mycoplasma* (base de données SwissProt).

Comme l'acquisition des peroxysomes par les cellules eucaryotes et l'apparition de la catalase dans le superrègne semble coïncider dans l'évolution, il est possible que l'enzyme ait été présente dans l'endosymbionte qui devait évoluer plus tard en organe alors que son gène était transféré dans le noyau eucaryote.

Une analyse phylogénétique (figure 14) réalisée sur 20 séquences (Von ossowski, 1993) montre clairement qu'au moins un événement de transfert horizontal du gène a dû se produire durant l'évolution.



**Figure 14: analyse phylogénétique réalisée sur 20 séquences de catalase (Neighbor-joining)**

En effet, les catalases glyoxysomales des plantes d'une part et les catalases peroxysomales des autres cellules eucaryotes d'autre part sont séparées par les catalases des posibactéries. Ceci peut s'expliquer suivant trois scénarii:

- la catalase A était déjà présente dans les premiers Archaezoa et c'est la raison pour laquelle on la retrouve chez les champignons et les eucaryotes supérieurs. La catalase chez les plantes aurait été acquise grâce à un endosymbionte: soit celui-ci serait devenu le chloroplaste avec un transfert de la catalase vers un microbody, soit l'endosymbionte aurait évolué jusqu'à devenir le peroxysome / glyoxysome de la plante.
- la catalase de la plante est l'enzyme original eucaryotique et la catalase proxysomale a pénétré la plante avec le précurseur de la mitochondrie et fût ensuite transféré vers le peroxysome.
- au départ, il n'y avait pas de catalase chez les Archaezoa et la catalase peroxysomale et glyoxysomale ont été acquises par deux événements: l'endosymbiose et le transfert de gènes.

Ces trois hypothèses sont aussi valables les unes que les autres et ne permettent pas d'inférer sur l'origine de la catalase dans les microbodies.

Parmi ces derniers, on trouve les glycosomes présents uniquement chez les Kinetoplastida. Comme ces derniers apparaissent dans la lignée eucaryote bien avant la séparation des champignons, des animaux et des plantes et également avant l'acquisition des chloroplastes par les cellules eucaryotes, ces organites, grâce à leurs séquences de catalase, nous permettraient de cibler avec plus de précision l'origine réelle de la catalase et peut-être en même temps de trouver l'origine de l'organite (glycosome) lui-même.

Si ces hypothèses sont fiables, il y aurait une relation entre la catalase de l'endosymbionte et celle de *Crithidia fasciculata*.



## BUTS DU TRAVAIL.

Des travaux antérieurs ont montré la présence de la catalase chez certains trypanosomatidés comme *Crithidia luciliae* ( Eeckhout, 1973) et *Crithidia fasciculata* (Opperdoes et al, 1976).

Chez *Crithidia fasciculata*, la catalase a été localisée dans les glycosomes. On se propose de vérifier que l'enzyme se trouve sous forme d'isoenzyme à double localisation ou sous une forme unique glycosomale ou sous forme unique cytosolique. Quelques paramètres pouvant influencer la cinétique enzymatique de la catalase seront testés ainsi que l'influence d'inhibiteurs.

Le gène codant pour la catalase sera ensuite cloné et séquencé.

Avec les résultats du séquençage, un arbre phylogénétique sera construit et la position évolutive du parasite sera déterminée.

L'intérêt de travailler avec ce parasite est qu'il est un des rares trypanosomatidés à posséder de la catalase contrairement à *Leishmania* et à *Trypanosoma*.

En plus, *Crithidia* offre plusieurs avantages:

- facilité de culture (Mc Ghee & Cosgrove, 1980).
- *Crithidia* est non pathogène pour l'homme.

Son métabolisme est plus simple que celui de *Trypanosoma* et pourra servir de base à la compréhension de celui-ci.

MATERIELS  
ET  
METHODES

# I. PARTIE BIOCHIMIE.

## 1. CULTURE DE *CRITHIDIA FASCICULATA*.

### A. Conditions de croissance.

La souche de *Crithidia fasciculata* (souche stock conservée dans l'azote liquide) est décongelée puis mise en culture dans 10 x le volume de milieu semi-défini (SDM 79). La culture se fait à 28° C en anaérobiose (Brun et Schönenberger, 1979 modifié par Steiger et al, 1980).

	Ingredients	per 10L gram
	Dulbecco's modified Eagle medium powder (Gibco 074-01600)	70
	Medium 199 (Gibco 071-01200)	20
	Glucose (anhydrous)	10
	HEPES . Na salt (Sigma H 3375)	87,4
	MOPS Na salt (Sigma M 1254)	55,3
	NaHCO <sub>3</sub>	20
1	L-Alanine (Merck 1007)	2
2	L-Arginine HCL (Sigma A 5131)	1
3	L-Methionine (Sigma M 9625)	0,7
4	L-Phenylalanin (Sigma P 2126)	0,8
5	L-Proline (Sigma P 0380)	6
6	L-Serine (Sigma S 4500)	0,6
7	Taurine (Sigma T 0625)	1,6
8	L-Threonine (Sigma T 8625)	3,5
9	L-Tyrosine (Sigma T 3754)	1
10	Adenosine (Sigma A 9251)	0,1
11	Guanosine (Sigma G 6752)	0,1
12	D(+) Glucosamine HCL (Sigma G 4875)	0,5
13	Folic acid (Sigma F 7876)	40 mg
14	p-Aminobenzoic acid (Sigma A 0254)	20 mg
15	Biotin (Merck 24514)	2 mg
	MEM amino acid soln. 50X (Gibco 113)	80 ml
	MEM non essent. amino acids 100X (Gibco 114)	60 ml

Le milieu est stérilisé par filtration (Millipore 0.2µm). On y ajoute 10% (v/v) de sérum foetal de veau. Ce dernier est inactivé à 50°C pendant 30 minutes. On ajoute ensuite 2 ml/litre de solution stock d'hémine (2.5 mg/ml).

L'hémine contribue aux besoins en fer des microorganismes puisque ceux-ci en sont déficients (Vickerman & Preston, 1976).

## **B. Maintien de la culture.**

Deux fois par semaine,  $2 \times 10^5$  cellules par ml sont diluées dans du milieu frais de manière à conserver les parasites en phase logarithmique de croissance.

### B.1. Comptage des cellules et courbe de croissance.

Les cellules sont diluées dans du milieu de culture et le comptage se fait dans une chambre de Petroff-Hausser. Pour la courbe de croissance, les cellules sont comptées pendant deux semaines tous les jours à la même heure.

### B.2. Effet de l'hémine sur la croissance de la culture et la production enzymatique.

Deux cultures sont réalisées en parallèle dans le milieu SDM 79 avec 10% de sérum foetal de veau, l'une avec d'hémine (5 mg/l), l'autre sans hémine. On étudie ainsi l'effet de l'absence d'hémine sur la croissance et l'activité enzymatique.

Les cultures se font pendant 5 jours et un aliquot de chaque culture est prélevé tous les jours afin de doser la quantité de protéines et l'activité de la catalase.

En effet, après cinq jours, on est dans la phase stationnaire de la culture, précédant la phase de dégénérescence: il n'est donc d'aucun intérêt de mesurer les protéines au delà de cinq jours. Les différents aliquots sont centrifugés dix minutes à 1500 g à 4°C (Beckman), puis lavés dans du 2 X PSG ( Phosphate Saline Buffer :  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  anhydrous 84.3g / litre ;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  4.3 g / litre ; NaCl

26.6 g/ litre ; glucose 10 g / litre ) puis resuspendus dans un ml de PSG et conservés à 4°C pour des dosages ultérieurs.

## 2. CENTRIFUGATION DIFFERENTIELLE ( STEIGER ET AL., 1980).

Cette technique permet la séparation des particules grâce aux différences de sédimentation; c'est la taille des molécules qui influence la sédimentation (Wattiaux, 1994). Cette centrifugation se différencie de la centrifugation isopycnique par le fait que les particules ont des vitesses de sédimentation qui diffèrent de plus de 50 fois: on obtient un culot et un surnageant (Cassier & Fritsch, 1992). La figure 16 montre un schéma de la centrifugation différentielle.

En fait, deux fractionnements sont réalisés pour cette étude de *C. fasciculata*: un premier sur une culture de 2 jours (phase logarithmique de croissance) et un deuxième sur une culture de 3 jours (phase tardive de croissance).

La première étape consiste à séparer les cellules du milieu de culture: les cellules sont centrifugées à 1500g à 4°C pendant 15 minutes dans la centrifugeuse Beckman modèle TJ-6, puis le culot est resuspendu dans 25 ml de tampon STE (250 mM en sucrose, 25 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM en EDTA) et recentrifugé à 1500 g pendant 15 minutes. On lave les cellules 2 x avec du tampon STE. Le culot obtenu est recueilli et placé dans un mortier préalablement refroidi. On y ajoute 1.5g de poudre de carborundum ( BDH Chemicals, GB) de plus ou moins 300 mesh (SiC).

On mélange le tout avec le pilon préalablement refroidi. Les cellules sont ainsi écrasées et libèrent leur contenu. On observe une goutte de ce mélange sous le microscope pour vérifier l'avancement de l'homogénéisation et on continue l'homogénéisation jusqu'à avoir plus de 90% de cellules homogénéisées.

La "pâte" d'homogénéisation est resuspendue dans 5ml de STE et centrifugée à 4° C dans la centrifugeuse Sorvall RC-5B pendant 3 minutes à 30 g. Le surnageant est gardé. On resuspend le culot dans 3 ml de STE et on centrifuge pendant 3 minutes à 30 g. Le surnageant obtenu est ajouté au premier. On resuspend le culot dans 2 ml de STE et on centrifuge de nouveau pendant 3 minutes à 30 g. Le surnageant est ajouté aux deux premiers et le volume est ajusté à 10 ml. On garde 2 ml (= homogénat) et on continue la centrifugation avec 8ml.

Les 8 ml de surnageant sont centrifugés pendant 10 minutes à 1500 g. Le surnageant est gardé. Le culot est lavé dans 2 ml de STE et centrifugé de nouveau à 1500 g. Le 2<sup>ième</sup> surnageant est ajouté au 1<sup>er</sup>. Le culot est resuspendu dans 2ml de STE et centrifugé à 1500 g. Les surnageants sont combinés et le volume est porté à 12 ml. On en garde 2 ml (= extrait cellulaire) et on continue avec 10 ml. Ces derniers seront utilisés pour obtenir la fraction à gros granules (fraction LG).

Le culot de la centrifugation précédente est resuspendu dans du tampon STE et transféré ensuite dans un homogénéisateur du type mécanique (Potter). Après homogénéisation, le volume est porté à 10 ml (= fraction nucléaire).

Les 10 ml de la fraction de l'extrait cellulaire sont centrifugés pendant 10 min à 5000 g. Le surnageant est gardé et constitue la fraction à gros granules (fraction LG). Le culot est resuspendu dans 2 ml de tampon STE et homogénéisé dans un Potter. On porte le volume à 5 ml.

On centrifuge ces 5 ml pendant 10 min à 15000 g. Le surnageant constitue la fraction à petits granules (fraction SG) et le culot est resuspendu dans 5 ml de STE. Ces 5 ml sont transférés dans un Potter.

Après homogénéisation, on centrifuge ces 5 ml pendant 1 heure à 140000 g dans la Beckman LS-50. Le surnageant est gardé et constitue la fraction microsomiale (fraction P) et le culot est resuspendu dans 2 ml de tampon STE puis le volume est porté à 5 ml. Ces 5 ml sont placés dans un Potter.

Après homogénéisation, le volume est ajusté à 10 ml avec du tampon STE (fraction cytosolique ou fraction S).

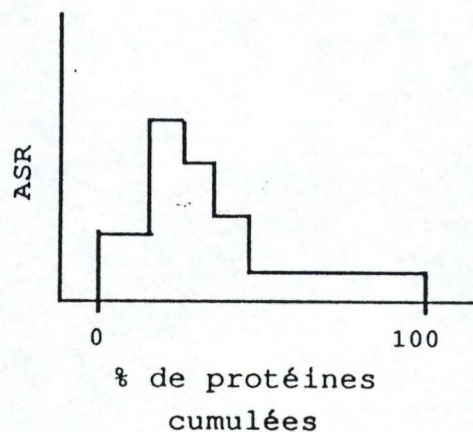
Remarque:

Le milieu dans lequel les resuspensions se font est très important puisqu'il doit conserver au mieux les structures à séparer. Le milieu répondant au mieux aux exigences des structures cellulaires et subcellulaires est le saccharose (ou sucrose): c'est un disaccharide de glucose-fructose d'un poids moléculaire faible (340 kDa) soluble dans l'eau distillée (Wattiaux, 1994).

On choisira donc une solution isotonique en sucrose ( 250mM).

Présentation des résultats:

En centrifugation différentielle, les résultats sont présentés sous forme d'histogramme (figure 15): en abscisse, on met les pourcentages cumulés de protéines dans chaque fraction, et en ordonnée on trouve l'activité spécifique relative (ARS). Cette dernière s'exprime comme le quotient du pourcentage de l'activité dans chaque fraction sur le pourcentage de protéines dans chaque fraction.



**Figure 15 : Représentation des résultats**

1. La hauteur du rectangle donne une idée de la proportion de l'organite isolé par rapport aux organites de départ. Cela donne une idée du degré de purification de l'enzyme dans la fraction considérée.

2. La surface du rectangle représente le pourcentage d'activité dans la fraction (Wattiaux, 1994). Une mesure de la validité du fractionnement est donnée par la récupération. Cette dernière s'exprime de la façon suivante:

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

R: récupération.

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.



Homogénat chargé  
de grains abrasifs

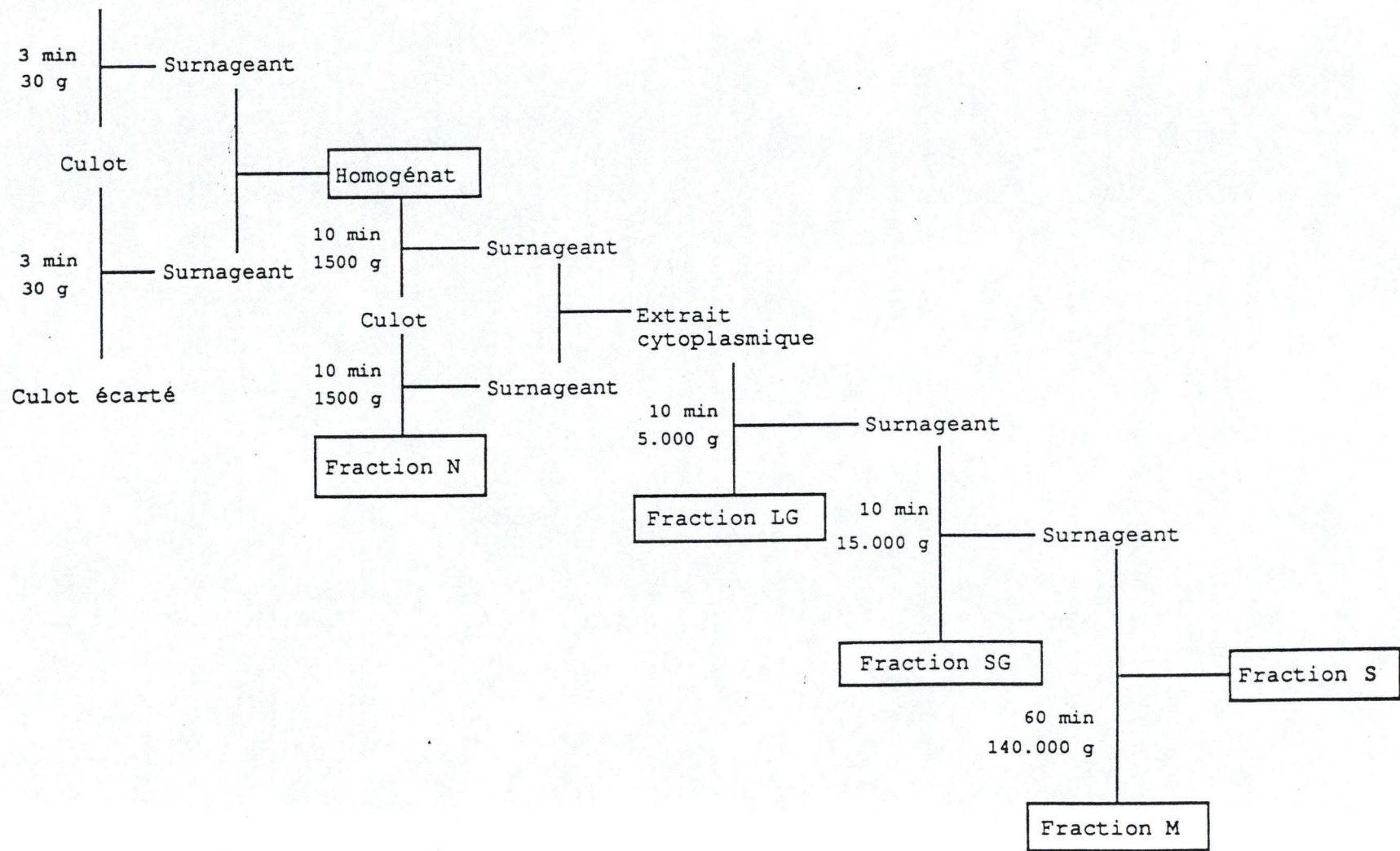


Figure 16: Centrifugation différentielle.

## A. Traitement de l'homogénat.

L'homogénat obtenu lors du fractionnement différentiel (homogénat frais: 10 ml) est soumis à une congélation-décongélation. Dans un ml d'homogénat, on mesure l'activité de la catalase.

L'homogénat est congelé dans de l'azote liquide ( $- 275^{\circ} \text{C}$ ) pendant 5 minutes, il est directement décongelé dans un bain-marie à  $37^{\circ} \text{C}$  pendant 5 minutes. Ce traitement (congélation-décongélation) est réalisé 5 fois de suite.

## B. Dosage des enzymes marqueurs.

Les enzymes marqueurs sont des enzymes qui ont une localisation unique connue, soit dans un organite (glycosome, mitochondries), soit dans le cytosol.

La localisation de l'hexokinase et de la glucosephosphate isomérase a été déterminée pour *Crithidia luciliae* (Opperdoes, 1990) et on suppose que c'est la même localisation pour *Crithidia fasciculata*.

### *Enzymes choisies.*

<b>Enzyme</b>	<b>Localisation</b>	<b>Code</b>
Hexokinase	Glycosome	EC 2.7.1.1
Malate déshydrogénase	Mitochondrie	EC 1.1.1.37
Glucose phosphate isomérase	Glycosome	EC 5.3.1.9

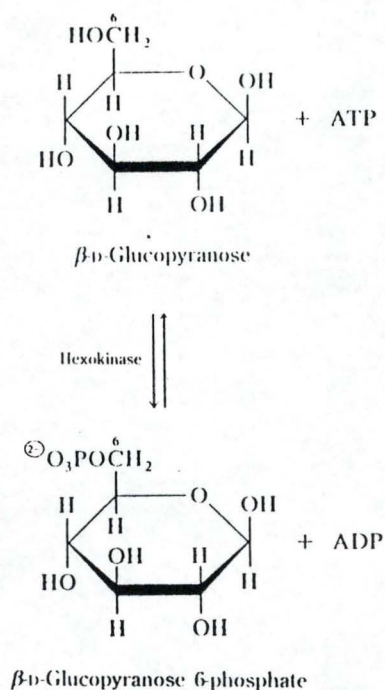
L'activité enzymatique est proportionnelle à la variation de NADH ou de NADPH, utilisés comme cofacteurs. L'augmentation ou la diminution de la concentration en NADH ou en NADPH est mesurée à 340 nm. ( Beckman DU-7 spectrophotomètre).

Tous les tests sont effectués en double à 25° C. A chaque fois, un "blanc cellules" ( cellules + tampon STE) est réalisé et sa valeur est soustraite à la valeur de l'échantillon.

Les substrats, enzymes et coenzymes proviennent de Boehringer-Mannheim, Allemagne.

### B.1. L'hexokinase ( Misset, 1984).

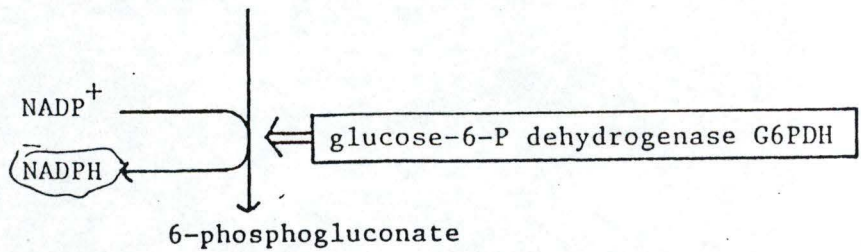
Cet enzyme transforme le glucose en glucose-6-phosphate (figure 17).



**Figure 17: Conversion du glucose en glucose-6-phosphate (Rawn, 1990)**

Le dosage de cet enzyme se fait indirectement par la mesure de l'absorbance de NADPH libérée lors de la transformation du glucose (glucopyranose-6-phosphate) en 6-phosphogluconate par la glucose-6-phosphate-déshydrogénase (G6PDH).

Principe :  $\text{glucose} + \text{MgATP} \xrightarrow{\text{HK}} \text{glucose-6-P} + \text{Mg ADP}$

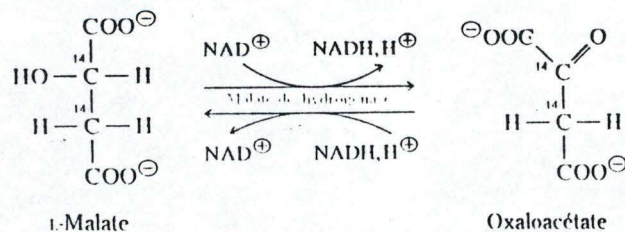


Les mesures sont réalisées dans un volume final de 1 ml dans des cuvettes en plastic au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 340 nm (visible).

L'échantillon à doser est dilué dans du tampon STE (pH 7.4) contenant 10mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 mM de D-glucose; 0.66 mM d'ATP; 0.64 mM de NaHCO<sub>3</sub>, 1 µl de G6PDH et 0.1% de Triton X100.

## B.2. La malate déshydrogénase

Elle catalyse la dernière réaction du cycle de Krebs en oxydant le malate en oxaloacétate avec réduction simultanée du NAD<sup>+</sup> (figure 18).



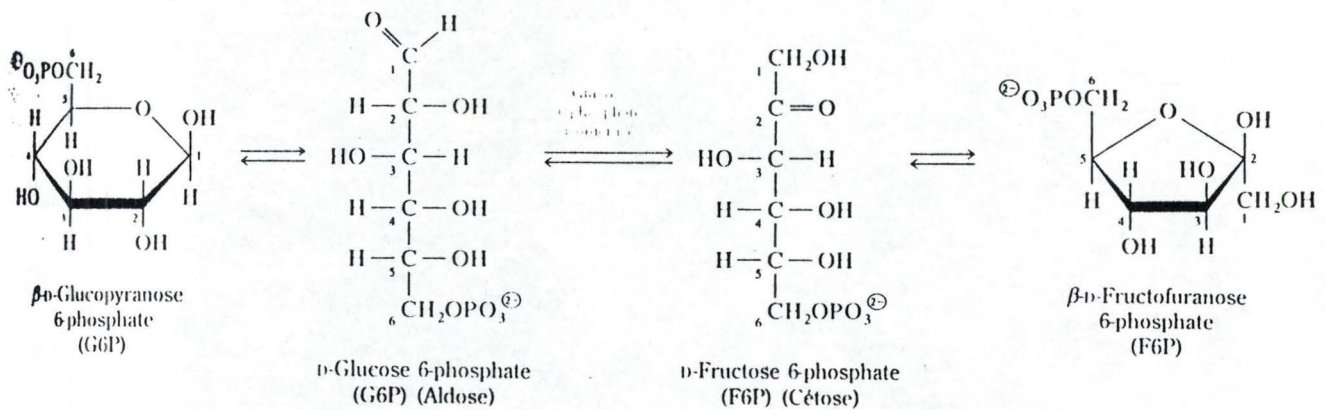
**Figure 18: Oxydation du malate en oxaloacétate (Rawn, 1990)**

Les échantillons sont dilués dans du tampon STE pH 7.4 contenant 10 mM en NADH (Sigma GB), oxaloacétate 100 mM (pH 8) ;100 mM en EGTA (Ethylèneglycol-bis-(β-amino-éthyl éther) N,N'-tetraacetic acid; Sigma,GB) et 0.1 % de Triton X100.

Le dosage s'effectue en mesurant le NADH oxydé.

### B.3. La glucose phosphate isomérase ( Misset, 1984).

La glucose-6-phosphate isomérase opère la transformation du glucose-6-phosphate en fructose-6-phosphate (F6P) (figure 19).



**Figure 19: Conversion du glucose-6-phosphate en fructose-6-phosphate.**

(Rawn, 1990)

Le dosage de l'enzyme se fait par la mesure de l'absorbance du NADPH.

Les échantillons sont dilués dans du tampon STE (pH 7.4) contenant 7 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1.3 mM de fructose-6-phosphate , 0.4 mM de NADP, 1 µl de G6PDH et 0.1 % de Triton X100.

#### B.4. Calcul des résultats.

Activité spécifique (mU/mg) =  $A \times 1000 / 0.025 \times 6.22 \times \text{mg de protéines.}$

Dans cette équation:      A est l'absorbance par minutes, mesurée à 340 nm.  
0.025 est la quantité d'échantillon (25  $\mu\text{l}$ )  
1000 est le facteur d'amplification au niveau du spectrophotomètre.  
6.22 est le coefficient d'extinction micromolaire.

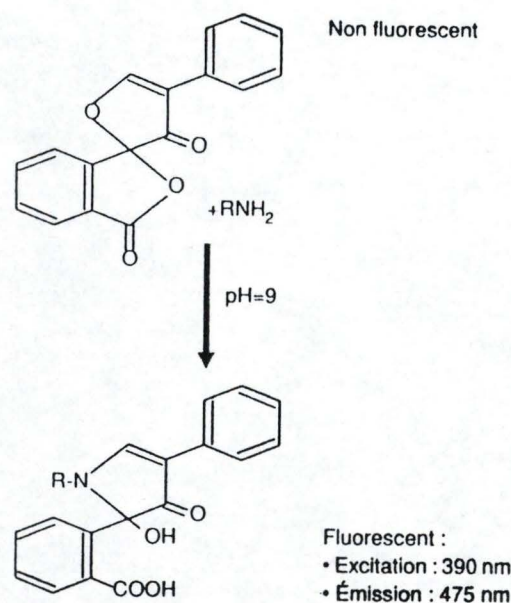
*Remarque:* dans le cas du dosage dans la catalase, le calcul des résultats est identique sauf que le coefficient d'extinction micromolaire est de 43.6 au lieu de 6.22, car l'on mesure l'absorbance de l' $\text{H}_2\text{O}_2$ .

### **3. DOSAGES**

#### **A. Dosage des protéines.**

Les protéines sont dosées selon la méthode de dosage à la fluorescamine (Udenfriend et al, 1972)

La fluorescamine (Sigma, GB) se fixe sur les amines primaires comme les acides aminés, les peptides et les protéines. A l'état libre, elle n'est pas fluorescente. A pH 8-9, on obtient très rapidement un produit de couplage fluorescent entre l'amine primaire et la fluorescamine (figure 20).



**Figure 20: Principe du dosage à la fluorescamine.**

La fluorescamine est mise en solution dans l'acétone (15-30 mg/100ml) et stockée à l'abri de la lumière. La sérum albumine bovine ( BSA; Sigma,GB) est utilisée comme étalon (100 µg/ml). Pour chaque test, un blanc "eau", ainsi qu'un blanc "tampon" ( on utilise le tampon dans lequel se trouve l'échantillon) sont réalisés. On ajoute partout 50 µl d'acide désoxycholique (DOC; détergent) ainsi que 1.25 ml de tampon phosphate pH 8.0. La fluorescamine est ajoutée sous agitation constante (vortex) et la fluorescence est mesurée à une longueur d'onde de 475 nm, consécutive à une excitation à 398 nm.

### **B. Dosage de la catalase**

On se base sur la propriété de l'enzyme qui est de dégrader le substrat H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en eau et en oxygène et on mesure la dégradation de l'eau oxygénée qui absorbe à 240nm. La variation d'absorbance est proportionnelle la quantité d'enzyme.

Les mesures de l'activité de la catalase se font soit dans le tampon Tris-HCl pH 7.4 (Trizma-base; Sigma, GB), soit dans le tampon STE (25 mM Tris-HCl pH

7.4; 250 mM en sucrose, 1 mM en EDTA ) (voir optimisation des conditions de dosage de la catalase).

Protocole:

Dans des cuvettes de quartz, on place 20  $\mu$ l de l'échantillon dans 875  $\mu$ l de tampon Tris-HCl (pH 7.4) et on ajoute 0.01% de Triton X100. Ce dernier est un détergent qui détruit les membranes des organites et libère les enzymes comme la catalase. La mesure se fait à 240 nm sur un spectro-photomètre Beckman (Kinetics DU-7) avec un facteur d'amplification de 1000.

On effectue plusieurs blancs:

- un blanc "cellules" contenant l'échantillon, le tampon et le triton.
- un blanc "tampon" contenant le tampon seul.

La mesure se fait pendant deux minutes. Ensuite, on ajoute 100  $\mu$ l d' $H_2O_2$  et on fait une deuxième mesure pendant 2 minutes. Le blanc cellules, contenant maintenant  $H_2O_2$ , est devenu le "test" et le blanc "tampon" est devenu le "blanc  $H_2O_2$ ".

Remarques :

1. Le "blanc  $H_2O_2$  " est indispensable car on a remarqué que l'eau oxygénée se dégradait au cours du temps à l'air libre.
2. On ne travaille qu'une cuvette à la fois car la réaction est tellement rapide qu'un dégagement d'oxygène se produit avant que la mesure ne soit terminée. Ce dégagement d'oxygène perturbe le rayon lors de la lecture.

#### B.1. Optimisation des conditions de dosage



a) Etude de la zone de linéarité de la réaction en fonction de la concentration protéique:

Afin de travailler dans des conditions optimales, il convient de se situer dans des concentrations protéiques où l'activité se comporte de manière linéaire. On mesure l'activité enzymatique de la catalase en variant la concentration en protéines cellulaires tout en maintenant les autres paramètres constants. On travaille sur l'homogénat dilué 100 fois. Le tampon utilisé est le STE.

b) Etude des différents facteurs pouvant influencer la mesure de l'activité

b.1. Influence du Triton X100

Les tests sont effectués en double dans le tampon Tris-HCl (pH 7.4). La mesure se fait en absence et en présence de 0.1 % de Triton X 100.

L'influence du Triton est déterminée plus précisément par la réalisation d'une courbe d'inhibition. L'activité résiduelle de la catalase est mesurée pour des concentrations de Triton X100 entre 0 % et 0.4 %.

b.2. Influence de la concentration en EDTA

On teste différentes concentrations en EDTA sur l'homogénat de *Crithidia*. Les concentrations d'EDTA testées sont 1 mM, 2 mM, 5 mM et 10 mM.

b.3. Influence de la concentration en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

On détermine les concentrations en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( substrat) susceptibles de donner une certaine linéarité lors de la mesure de l'activité de la catalase. On teste différentes concentrations en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur l'homogénat. L'activité spécifique de la catalase se mesure pour des concentrations de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entre 0 mM et 80 mM.

#### 4. EFFET DU PH.

Afin de déterminer l'activité spécifique de l'enzyme en fonction du pH pour montrer l'existence de la catalase sous forme d'isoenzyme ou non, on mesure l'activité dans des tampons de pH différents.

Cette expérience est réalisée sur l'homogénat après congélation-décongélation 5 fois. Les tampons utilisés sont les suivants:

- 0.1 M Tampon MES (2-[N- Morpholino] éthane sulfonic acid ; Sigma, GB ) de pH 7.2
- 0.05 M Tampon MES de pH 7.0.
- 1 M tampon phosphate pH 6.4.
- 0.1 M tampon phosphate pH 6.6; 6.9; 7.6 et 8.2.
- 0.05 M tampon PIPES (Pipérazine-N-N'-bis [2-éthane-sulfonic acid ] ; Sigma,GB ) pH 7.5.
- 0.1 M tampon TEA ( Triéthanolamine, Sigma, GB ) de pH 8.0.

Les échantillons sont dilués dans le tampon de pH test (blanc) et le test est réalisé en ajoutant 100 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.2M) dans un volume total de 1 ml. L'absorbance de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est mesuré au spectrophotomètre à 240 nm (UV). Les résultats sont portés en graphique où l'activité spécifique est portée en ordonnée et les pH mesurés en abscisse.

#### 5. EFFET DES INHIBITEURS

On teste l'effet de 2 inhibiteurs (le cyanure et l'aminotriazole) sur l'activité de la catalase de l'homogénat de *Crithidia fasciculata*.

## **A. Le cyanure.**

Le cyanure ( cyanure de sodium, Merck, Allemagne) est mis en solution dans du STE (pH 7.4). On utilise deux solutions stock ( 100 mM et 10 mM).

On réalise d'abord un test d'inhibition totale avec 100 µl de cyanure 100 mM. Puis on réalise une courbe d'inhibition, avec des concentrations de cyanure de 0 mM à 2 mM.

### Remarque :

Le STE est un tampon efficace à pH neutre, ce qui évite le danger d'avoir un pH acide et donc le dégagement de fumées toxiques. En plus, c'est dans ce tampon que la catalase est stable et qu'on mesure son activité.

## **B. L'aminotriazole.**

L'aminotriazole (Sigma, GB) est un inhibiteur irréversible. Dans une première étape, on teste les temps d'incubation et les concentrations à adopter afin d'avoir une inhibition totale. Ensuite, on réalise une courbe d'inhibition ( 0 à 0.5 mM).

Les échantillons sont dilués dans du tampon STE (pH 7.4) auquel on ajoute de l'aminotriazole à différentes concentrations. Ceci constitue le blanc. Ensuite, on réalise le test en ajoutant 100 µl d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.2M). Ceci constitue le test auquel la valeur du blanc respectif sera retirée.

## II. PARTIE BIOLOGIE MOLECULAIRE.

### 1. SOUCHES BACTERIENNES UTILISEES.

#### A. *Escherichia coli* souche MB 406.

Utilisation: Titration et propagation de la banque d'ADN complémentaire et d'ADN génomique de *Crithidia fasciculata*.

Caractéristiques (Promega notes, 1987): Sup E, rec B21, rec C22, sbc B15, hf 1A, hfl 1B, hsd R-.

Ces bactéries (rec<sup>-</sup>) sont déficientes en exonucléase I et V, lesquelles peuvent interférer avec la réplication de séquences palindromiques, fréquentes dans l'ADN des eucaryotes.

#### B. *Escherichia coli* souche XL1- BLUE

Utilisation : propagation de l'ADN plasmidique recombinant pCAT 11.

Caractéristiques (Stratagene catalogue, 1994) : *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*, *supE44*, *relA1*, *lac* [ F' *proAB*, *lacI<sup>q</sup>* ZΔM15, *Tn10* ( *tet<sup>r</sup>* ) ].

Nous avons reçu le plasmide, qui a été fourni généreusement par le Docteur P. Lazarow, Mount Sinai School of Medicine, New-York. Des cellules compétentes XL1-Blue (Stratagene) ont été transformées avec le plasmide pCAT 11 ( voir figure 34 de la partie résultats).

## 2. MILIEUX DE CULTURE.

**A. *E. coli* souche MB 406** ( Maniatis et al., 1982 et Promega, 1987).

a) croissance en milieu liquide:

On fait pousser les cellules dans du milieu LB (Luria Bertani: 1% (p/v) bactotryptone; 0.5% (p/v) d'extrait de levure; 1% (p/v) NaCl ). On ajoute 0.4% (p/v) de maltose. Après autoclavage, on ajoute 10 mM MgSO<sub>4</sub>.

Le maltose induit l'expression de l'opéron lactose, contenant le gène *lamb* codant pour le récepteur  $\lambda$ . Cela permet l'infection par le bactériophage.

Les ions Mg<sup>2+</sup> sont nécessaires à la stabilisation des particules du bactériophage  $\lambda$ .

b) croissance sur milieu solide:

- LB agar : LB + MgSO<sub>4</sub> + 1.5 % (p/v) bacto-agar
- LB top-agar: LB + MgSO<sub>4</sub> + 0.8 % (p/v) bacto-agar.
- LB top-agarose: LB + MgSO<sub>4</sub> + 0.6 % (p/v) d'agarose. Ce milieu contient de l'agarose et se détache plus facilement du milieu LB sur lequel il est coulé. Il est utilisé pour récupérer les bactériophages.

Les cellules sont incubées à l'étuve à 37°C pendant toute une nuit.

### **B. *Escherichia coli* XL1-blue contenant pCAT 11**

On part d'une culture bactérienne congelée à - 80° C dans 30 % glycérol. Cette préparation a été faite au laboratoire.

Les bactéries sont remises en culture dans 50 ml de LB ( Luria Bertani : 1 % (p/v) bactotryptone ; 0.5 % ( p/v) extrait de levure ; 1 % (p/v) NaCl ) , additionné de 100 µg/ml d'ampicilline.

La croissance se fait à 37° C pendant la nuit sous agitation.

### 3. PREPARATION D'UNE SONDE DE CATALASE HUMAINE.

#### A. Isolement de l'ADN plasmidique (Qiagen, 1990).

L'ADN plasmidique est isolé suivant la méthode Qiagen (maxi préparation: Qiagen, 1990).

La culture est centrifugée (centrifugeuse Beckman ) à 900 g à 20°C pendant 10 minutes. Le culot est alors resuspendu dans 10 ml du tampon P1 (50mM Tris - HCl (pH8.0) ; 10 mM EDTA; 100 µg RNase A). On ajoute 10 ml de tampon P2 (200 mM NaOH; 1% SDS). Le pH élevé provoque la dénaturation de l'ADN bactérien. L'ADN plasmidique, super-enroulé, est plus résistant aux effets du pH élevé. Après une incubation de 5 minutes sur glace, on ajoute 10 ml de tampon P3 (2.55 M acétate de potassium glacé, pH 4.8 ), on incube 30 minutes sur glace. A ce pH, les protéines et l'ADN génomique précipitent alors que l'ADN plasmidique se renature facilement. La solution est centrifugée à 10000 g à 4° C pendant 30 minutes (Sorvall Sc-5b). Le surnageant est filtré sur de la laine de verre stérile.

L'ADN plasmidique est ensuite purifié sur une colonne Qiagen 100.

Le gel est équilibré avec 2 ml de solution QB (50 mM MOPS (pH 7.0) ; 750 mM NaCl; 15 % éthanol). Ensuite, on ajoute la solution contenant l'ADN. A ce pH, l'ADN, chargé négativement, s'accroche à la colonne chargée positivement. Elle est ensuite lavée avec 4 ml de solution QC (50 mM MOPS (pH 7.0) ; 1M NaCl, 15% éthanol). L'ADN reste accroché à la colonne, tandis que les contaminants passent. L'ADN est élué par 2 ml de solution QF (50 mM MOPS (pH 8.0) ; 1.2 M NaCl; 15% éthanol). Le sel entre en compétition avec l'ADN qui se décroche et se retrouve dans les tubes. L'ADN est précipité avec 0.5 volume d'isopropanol. Après une incubation de 30 minutes à - 80°C, la solution est centrifugée à 4°C pendant 30 minutes à 9700 g (Sorvall SC-5b). Le culot est lavé à l'éthanol 70%, séché et resuspendu dans 1 ml d'eau bidistillée.

## **B. Estimation de la quantité d'ADN.**

La quantité d'ADN isolé est estimée par migration sur un gel d'agarose (0.7 %). La migration se fait dans le tampon TBE ( 10mM EDTA (pH 8.0) ; 445 mM Tris; 445mM acide borique). On ajoute du bromure d'éthidium ( 0.5 µg / ml ). Celui-ci s'intercale entre les doubles brins de l'ADN et permet la visualisation de l'ADN sous lumière ultraviolette.

Avant de mettre l'échantillon sur gel , on ajoute 4 µl d'orange G ( 50 % tampon TE ( 1 mM EDTA (pH 8.0) ; 10 mM Tris ) , 50 % glycérol, quelques grains d'orange G ( BDH Chemicals , GB). L'orange G permet de suivre la migration et empêche l'échantillon de sortir du puits, en le rendant plus lourd.

La migration se fait à 100 Volt pendant approximativement une heure.

## **C. Test de digérabilité de l'ADN plasmidique.**

L'ADN plasmidique isolé est digéré par l'enzyme de restriction *Pst*I dans les conditions conseillées par le fournisseur ( Boehringer, Allemagne)

La digestion est incubée pendant 2 heures à 37°C. Ensuite, on effectue la migration sur gel d'agarose. A côté de la digestion, on place un marqueur de taille ( phage λ digéré par *Hind*III, fragments de taille connue).

## **D. Isolement de l'insert (gène de la catalase humaine) de pCAT 11.**

Afin d'isoler le gène codant pour la catalase du plasmide recombinant pCAT 11, on digère une grande quantité d'ADN (200µg) par *Pst*I. Après avoir vérifié que la digestion était complète, on fait migrer la totalité de la digestion sur gel. On isole la bande correspondant à l'insert (2100 bp) et on extrait l'ADN suivant le protocole Qiaex (1990).

Par 100 mg de gel, on ajoute 300 µl de tampon QX1 (0.5M Tris-HCl (pH7.5) ; 3M NaI; 4 M NaCl ; 0.1 % de sulfite de sodium). On ajoute ensuite 10 µl de suspension de Qiaex. On solubilise l'agarose en incubant à 50°C pendant 10 minutes (on vortexe régulièrement pour garder le Qiaex en suspension).

Après centrifugation pendant 30 secondes à 12000 g, l'ADN fixé au Qiaex se trouve dans le culot et le surnageant est éliminé. On lave alors le Qiaex deux fois avec 500 µl de tampon QX 2 (8M NaClO<sub>4</sub>) ensuite deux fois avec 500 µl de tampon QX 3 (1 mM EDTA (pH 7.5) ; 70 % éthanol; 100 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl).

Le culot est séché à l'air libre pendant 15 minutes.

L'ADN est alors élué du Qiaex avec 20 µl d'H<sub>2</sub>O. On resuspend et on incube 5 minutes à température ambiante. On centrifuge alors 30 secondes et on transfère le surnageant contenant l'ADN dans un nouveau tube. On vérifie ensuite la quantité et la pureté du fragment sur gel d'agarose.

## **E. Préparation de la sonde (Rigby et al., 1977).**

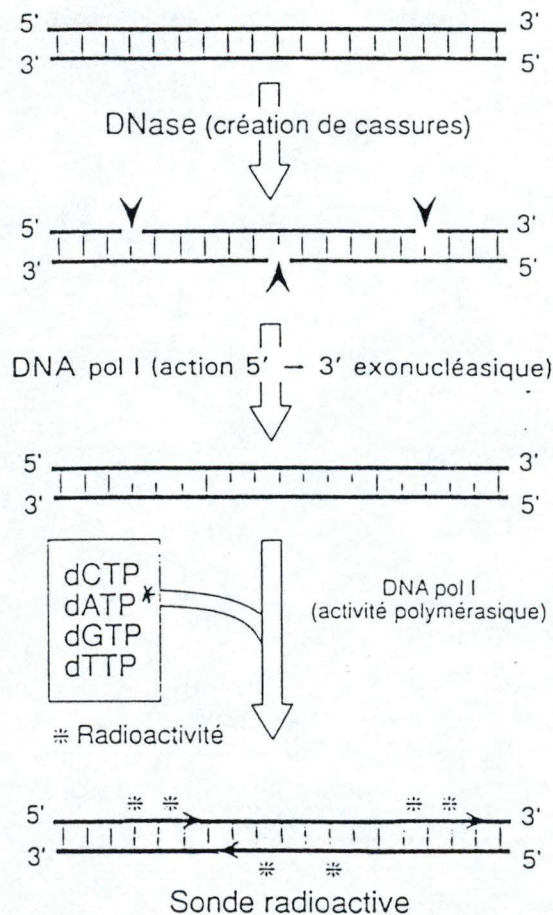
### E.1. Principe.

La méthode de coupure-substitution (nick translation) permet de créer des « trous » (nicks) dans l'ADN. Ces coupures créent des extrémités 3'-OH libres et des extrémités 5' phosphate libres. Au niveau de ces coupures, le DNA-polymérase I de *E. coli* (Biolabs) assure:

- l'hydrolyse de l'ADN par son action exonucléase 5'→3': elle agrandit les trous.
- la synthèse de l'ADN par son activité polymérase (3' → 5').

Si l'un des nucléosides triphosphate fournis à la polymérase I est radioactif, on obtient de l'ADN double brin uniformément marqué.





**Figure 21: Marquage d'ADN par la technique de coupure-substitution**  
( Rigby *et al.*, 1977)

### E.2. Préparation de la sonde.

On utilise environ 100 ng d'ADN (insert CAT 11). La réaction se fait dans le tampon de réaction (0.05 M Tris HCl (pH 7.8); 5 mM MgCl<sub>2</sub> ; 10 mM β-mercapto-éthanol), en présence de 0.01 mM de dCTP, de dTTP et de dGTP. On ajoute ensuite 1 µl de DNase (diluée 4900 fois dans du tampon Tris-HCl 10 mM pH 7.5); 1 µl de DNA polymérase I (10 U/µl) et on ajuste le volume à 18 µl avec de l'eau distillée.

On ajoute 2  $\mu$ l de  $\alpha$ -<sup>32</sup>P -dATP(3000 ci/mmmole) (New England Nuclear-Dupont, USA) et on incube pendant 2 heures à 14°C.

La réaction est arrêtée par 100  $\mu$ l de TES (10 mM Tris-HCl (pH 8.0); 10 mM EDTA; 0.1 % SDS).

Les nucléotides non incorporés sont séparés de la sonde par une chromatographie de type gel-filtration (Sephadex G-50, Pharmacia) équilibrée avec du TES ( méthode " Spun- column" : Maniatis et al, 1982).

#### **4. ISOLEMENT DE L'ADN GENOMIQUE DE *C. FASCICULATA*.**

Après culture à 28°C pendant 4 jours dans du milieu SDM complet en présence d'hémine, les cellules sont séparées du milieu de culture et lysées.

- Lyse cellulaire

Les cultures sont centrifugées pendant 15 minutes à 2000 g (Beckman modèle TJ-6) et ensuite resuspendues dans 5 ml de tampon SE froid (100 mM EDTA; 100 mM NaCl; 10 mM Tris pH 7.8). Après le transfert dans un erlen de 100 ml , on provoque la lyse en ajoutant 1% de Sartosyl (détergent) en agitant doucement. Immédiatement après la lyse, on ajoute de la protéinase K (50  $\mu$ g / ml) et on incube la nuit à 37°C.

- Isolement de l'ADN

La suspension d'ADN est extraite au phénol (on ajoute un volume égal de phénol:chloroforme: isoamylalcool ( 50:49:1)) et on agite doucement. On centrifuge alors à 2000 g pendant 10 minutes (Beckman TJ-6). A la phase aqueuse, on ajoute 3 ml de tampon SE et on recentrifuge: les deux phases aqueuses sont combinées. On réalise alors une précipitation à l'isopropanol et on lave avec de l'éthanol 70 %. Après séchage, l'ADN est resuspendu dans 2 ml de tampon TE (Tris 10 mM; 0.1 mM EDTA ). On ajoute de la RNase (20  $\mu$ g/ml) et on incube pendant 30 minutes à 37°C. Après avoir ajouté la protéinase K (50  $\mu$ g/ ml) et 0.1% SDS, on incube de

nouveau 30 minutes à 37°C. Les protéines détruites et dénaturées sont éliminées lors d'une seconde extraction au phénol. L'ADN est lavé à l'éthanol 70% puis redissout dans 1 ml de tampon TE (Tris 10 mM, 0.1 mM EDTA ) additionné de 200 mM en NaCl.

- Dosage de l'ADN génomique

L'ADN est dosé par une mesure spectrophotométrique. La lecture se fait à 280 nm dans l'UV dans des cuvettes en plastic. On réalise le test sur des dilutions 10 x, 20 x, 50 x et 100 x. On se base sur le fait que l'on a une absorbance de 1 pour 50 µg d'ADN par ml.

## **5. BANQUE D'ADN DE *CRITHIDIA FASCICULATA*.**

### **A. Description.**

On travaille avec deux banques : une banque d'ADN complémentaire et une banque d'ADN génomique provenant toutes les deux de Utrecht (Pays-Bas).

La banque d'ADN complémentaire a été préparée selon le protocole de Stratagene avec le vecteur  $\lambda$  ZAP II (Stratagene, 1994, USA).

La banque d'ADN génomique a été préparée selon le protocole de B. Swinkels (1988).

### **B. Titration de la banque.**

#### B.1. Préparation des MB 406 compétentes.

50 ml de LB amélioré ( LB + 10mM MgSO<sub>4</sub> + 0.4 % en maltose ) sont inoculées avec 1 ml de MB 406. Lorsque la culture est en phase logarithmique (densité optique de 0.6 mesurée à 600 nm), elle est refroidie sur glace pendant 10

minutes. Ensuite, les cellules sont recueillies par centrifugation (1300 g pendant 15 minutes). Le culot est ensuite resuspendu dans 15 ml de 10 mM MgSO<sub>4</sub> préalablement refroidi sur glace. Ces cellules sont utilisées pour la titration de la banque et pour l'amplification des phages.

### B.2. Titration de la banque.

Pour la titration de la banque, on choisit trois dilutions (10 x ; 330 x ; 10990 x). Celles-ci sont effectuées dans du tampon SM (100 mM NaCl; 1mM MgSO<sub>4</sub> ; 50mM Tris base; 0.0001% gélatine).

100 µl de phages dilués sont mélangées avec 100 µl de cellules MB 406 compétentes et incubés 30 minutes à 37 °C. Ensuite, les cellules infectées sont mélangées avec 4 ml de top-agar et coulées sur une boîte de Pétri (90 mm) sur du LB-Agar solidifié. Après une incubation d'une nuit à 37°C, on compte le nombre de plages de lyse et on calcule le titre de la banque: le nombre de plages de lyse ( pfu:"plaque forming units") par ml de suspension diluée.

### B.3. Criblage de la banque.

Connaissant le titre de la banque, on adapte les dilutions afin d'avoir entre 1500 et 2000 plages de lyse par boîte de Pétri. On mélange 200µl de solution de phages diluée avec 200 µl de cellules MB 406 compétentes. Après incubation de 30 minutes à 37°C, on mélange les cellules infectées avec 12 ml de top-agar et on étale sur des boîtes de Petri avec du LB-agar. L'incubation s'effectue la nuit à 37°C.

Les empreintes sont réalisées selon le protocole de Amersham (1985). On transfère les phages qui se trouvent au niveau des plages de lyse sur des membranes de nylon (Hybond N, Amersham International PLC,GB).

Les boîtes sont placées une heure à 4 °C afin de durcir le top-agar. Ensuite, on place la membrane sur le top-agar et on marque la membrane à l'aide d'une aiguille stérile. On effectue deux répliquats par boîte: le filtre est laissé 2 minutes sur

le top-agar, puis le double est laissé 2 minutes 30. Le double évite le risque de repiquer par la suite des faux positifs. Ensuite, les membranes sont traitées de la façon suivante.

#### B.4. Traitement des membranes de Nylon.

Les membranes de nylon sont placées pendant 5 minutes sur un papier-filtre Whatman 3MM, imprégné d'une solution dénaturante (0.5 M NaOH; 1.5M NaCl).

On les transfère alors dans un bain de neutralisation sur un papier Whatman 3 MM durant 5 minutes ( 0.5 M Tris- HCl (pH 7.0) ; 1.5 M NaCl ). Ensuite elles sont lavées dans une solution de 2 x SSC ( Sodium Salt Citrate: 0.3 M NaCl , 0.03M NO<sub>3</sub> citrate ); 0.1 % en SDS ( Sodium Dodecyl Sulfate) ; et rincées dans une solution de 2 x SSC afin de se débarrasser du SDS.

Les membranes sont ensuite séchées sur un papier-filtre et l'ADN est fixé de manière covalente aux membranes en les exposant 3 minutes sous lumière ultraviolette. Elles sont prêtes pour être hybridées avec une sonde radioactive (voir chapitre 6.A.)

#### B.5. Isolement des clones recombinants.

Les clones positifs sont isolés avec un tips coupé stérile. On prélève une carotte d'agarose contenant la plage de lyse positive et on la transfère dans eppendorf contenant 500 µl de SM. On vortexe 30 secondes et on incube à température ambiante pendant une heure. Ensuite, on centrifuge 15 minutes à 12000 g dans la microcentrifugeuse afin d'éliminer l'agarose. Le surnageant est conservé et constitue la suspension de phages. On la conserve à 4°C en ayant eu soin d'ajouter 25 µl de chloroforme.

La suspension de phages est à nouveau titrée et on adapte les dilutions de façon à avoir entre 100 et 500 plages de lyse par boîte de Pétri. On réalise un deuxième criblage (rescreening) en double selon le même procédé que précédemment ( voir chapitre B.3).

## B.6. Amplification des phages.

On titre la suspension de phages du recriblage et on calcule le volume à utiliser pour atteindre la confluence des plages de lyse (environ 5000 pfu pour une boîte de diamètre de 150 mm). Cette fois-ci, on utilise du top-agarose 0.6% au lieu du top-agar pour étaler les cellules infectées. Après une incubation d'une nuit, le top-agarose est raclé à l'aide d'une lame porte-objet stérile et transféré dans un tube falcon de 50 ml.

On y ajoute 5 ml de tampon SM stérile et 0.1 ml de chloroforme. On incube alors 15 minutes à 37°C sous agitation constante. On centrifuge ensuite 20 minutes à 2000 g à 4°C dans la Beckman modèle TJ-6. Le surnageant est prélevé et placé dans des tubes Falcon de 15 ml résistant au chloroforme. Cette suspension de phages amplifiée est recentrifugée à 2000 g à 4°C pendant 10 minutes afin d'éviter une contamination par le chloroforme. Cette amplification est ensuite titrée et est utilisée pour faire la culture liquide des phages.

## B.7. Culture liquide des bactériophages $\lambda$ (Amersham, 1986 modifié).

Dans un erlen stérile de 100 ml, on mélange 2 ml de suspension de phages amplifiés et dilués afin d'obtenir entre  $8 \times 10^6$  et  $8 \times 10^7$  phages avec deux ml de cellules MB 406 ( $1.5 \times 10^9$  cellules) compétentes. Le rapport idéal de cellules compétentes et de phages pour une infection maximale se situe entre 1/20 et 1/200.

L'infection se fait pendant 20 minutes à température ambiante. Ensuite, on ajoute 20 ml de milieu LB et 5 mM  $\text{CaCl}_2$ . On incube pendant au moins pendant 4 heures et demie à 37°C sous agitation constante. La culture doit être claire et de fins débris de cellules lysées doivent être visibles.

On ajoute alors 0.4 ml de chloroforme, 100  $\mu\text{l}$  de tampon L1 (100mM Tris-HCl pH 7.5, 300 mM NaCl, RNase A (20 mg/ml), DNase I (6 mg/ml) ) et on incube dans l'agitateur à 37°C pendant 30 minutes. Les cellules encore vivantes sont lysées par le chloroforme.

Le lysat est transféré dans des tubes Corex et centrifugé pendant 10 minutes à 8000 g à 4 °C.

Le surnageant est mis de côté et le culot est éliminé.

#### B.8. Isolement de l'ADN de phages ( Amersham 1986, modifié).

Au surnageant, on ajoute un volume identique d'une solution de 20 % de polyéthylène glycol (PEG 6000); 2 M NaCl. Après une incubation d'une nuit à 4 °C, on centrifuge à 6000 g pendant 20 minutes à 4°C. Le surnageant est éliminé par retournement. Le culot est resuspendu dans 4.5 ml de milieu LB puis on y ajoute 4.5 ml de DEAE-cellulose équilibré dans du milieu LB. On mélange par inversion des tubes 20 x à 30 x. On centrifuge ensuite 10 minutes à 6000 g à 4°C.

On récupère 5 ml de surnageant et on ajoute 25 µl de protéinase K (0.1mg/ml)(Boehringer, Mannheim, Allemagne) et 215 µl de SDS 10%. On mélange et on incube 15 minutes à température ambiante.

Ensuite, on ajoute 870 µl d'acétate de potassium 3M à pH 4.8. On incube pendant 20 minutes à 88°C puis on refroidit ensuite 10 minutes sur glace. On centrifuge 10 minutes à 6000 g à 4°C et on lave le culot à l'éthanol 70 %. Le culot est séché et resuspendu dans 200 µl de TE.

## **6. TRANSFERT SUR FILTRE ( SOUTHERN BLOT)**

La technique de transfert d'ADN par capillarité a été décrite par Southern en 1975. Les molécules d'ADN sont emmenées avec le flux de tampon et immobilisées sur la membrane. Cette méthode a été modifiée par Smith et Summers (1980).

Après migration, le gel est photographié sous lumière ultra-violette. Ensuite, il est traité de la façon suivante: dépurination pendant 30 minutes dans une solution de 0.25 N HCl (dégradation des purines ce qui entraîne une réduction de la taille des fragments et facilite le transfert), puis dénaturation dans un bain de 0.5 M NaOH-1.5 N NaCl 45 minutes et enfin neutralisation (0.02 N NaOH pH 8.0 ; 1 M acétate d'ammonium ) pendant une heure.

L'ADN est ensuite transféré sur une membrane de nylon (Hybond N , Amersham International PLC, GB). Le phénomène de capillarité est créé par

plusieurs couches de papier. On améliore le transfert en déposant un poids sur le montage. Le transfert se fait pendant deux heures. Ensuite, la membrane est rincée dans du 2x SSC, séchée sur papier filtre et l'ADN est fixé de manière covalente sur la membrane en l'exposant trois minutes au UV.

La membrane est prête pour l'hybridation.

## **A. Hybridation des membranes de nylon.**

### A.1. Préhybridation et hybridation.

La préhybridation évite une hybridation aspécifique. Pour cela, on incube la membrane dans un bain d'Hybrid-Mix (10% Dextran sulfate; 50 µg/ml d'ADN de sperme de hareng; 3 X SSC (0.45 M NaCl; 0.045 NO<sub>3</sub> citrate) ; 5 X solution Denhardt (0.1% Ficoll; 0.1% BSA); 0.1% polyvinyl pyrrolidone); 0.1% SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) à 58°C pendant 1 à 2 heures.

### Utilisation d'ADN compétitif

On ajoute de l'ADN compétitif afin d'éviter toute réaction aspécifique entre le vecteur et l'ADN sur la membrane.

En effet, une petite quantité de vecteur pBSK<sup>+</sup> est présente dans la sonde radioactive. 10 µg de pTZ 18R sont digérés avec de la DNase I (diluée 50 X) en présence de tampon polymérase I. On incube 2 minutes à 37°C puis on ajoute 2 µl de EDTA 0.5 M pour arrêter la réaction.

### Hybridation

L'ADN compétitif, ainsi que la sonde sont dénaturés à 100°C pendant 5 minutes et ajoutés dans le milieu de préhybridation. L'incubation se fait la nuit à 58°C sous agitation constante.



## A.2 Mise au point des conditions d'hybridation.

### **A.2.1. Digestion de l'ADN génomique.**

10 µg d'ADN sont digérés avec les enzymes de restriction : *Eco RI* , *Pst I* et *Hinc II*.

Chaque digestion est réalisée en triple afin de tester 3 conditions de lavage (concentrations en sel différentes) après blot et hybridation des membranes de nylon.

Ces digestions sont placées sur un gel d'agarose à 0.7% et la migration se fait pendant la nuit à 40 Volts.

### **A.2.2. Lavages et autoradiographie.**

Les membranes sont lavées à 58°C dans des solutions dont la concentration en sel décroît. On commence par trois bains successifs de 20 minutes de 5 X SSC 0.1% SDS, puis on a testé trois conditions de lavage différentes.

- Trois bains successifs de 5 X SSC; 0.1% en SDS.
- Trois bains successifs en 3 X SSC; 0.1 % SDS.
- Une fois 3X SSC plus deux fois 1 X SSC; 0.1 % SDS.

Les bains éliminent les hybrides aspécifiques. Après les lavages, les membranes sont rincées dans du 2 X SSC afin d'éliminer les traces de SDS, puis séchées sur filtre et disposées sur support de carton pour l'autoradiographie (hyperfilms MP; Amersham International PLC,GB).

Les films sont exposés à -80° C. La durée d'exposition est déterminée d'après l'intensité du signal mesuré au compteur Geiger et varie de 2 jours à une semaine.

### III. Partie Phylogénie.

En utilisant le "Client" "World Wide Web Mosaic" sur l'ordinateur Silicon Graphics IRIS/Indigo, nous avons eu accès à la base de données de domaines protéiques (Prodom).

La base de données Prodom permet le regroupement "intelligent" de différentes familles de protéines. Elle a été construite en rassemblant toutes les séquences protéiques complètes de la base de données SwissProt grâce à l'algorithme de groupement Domainer (Sonnhammer E.L.L et Kahn D., 1994). Cet algorithme a été appliqué à des données présentant une homologie par paire, générées en comparant toutes les séquences les unes par rapport aux autres, en utilisant l'algorithme Blast P (Altshul S.F., 1990).

Dans la base de données Prodom, les arrangements modulaires de protéines ont été pris en compte, et chaque fois que des limites de domaine ont été détectées, les séquences ont été coupées pour produire des familles homogènes de domaines.

Les familles de domaines produites par Domainer sont stockées en tant qu'alignements multiples et en tant que séquences consensus dans la base de données de domaines protéiques disponibles via le World Wide Web à l'adresse URL suivante: <http://www.sanger.ac.uk/~esr/prodom.html>.

En utilisant le mot "catalase" comme mot-clé, le nombre de domaines protéiques 357 a été sélectionné: il est constitué de l'alignement des 450 premiers acides aminés amino-terminaux de 29 séquences de catalase. Les séquences alignées ont été reformatées en séquences individuelles dans le format Pearson, et en utilisant le programme ReadSeq développé par Don Gilbert à l'Université d'Indiana, USA, toutes les séquences ont été rassemblées en un fichier et ensuite converties en un seul fichier d'alignement multiple MSF (Multiple Sequence File) dans le format GCG (Genetic Computer Group).

L'alignement multiple résultant du format MSF fut analysé et des corrections mineures à l'alignement furent réalisées manuellement. Toutes les régions d'ambiguïté d'alignement ou les régions contenant des insertions et des délétions (indels) furent enlevées de l'alignement et le fichier d'alignement multiple de séquences, après ces manipulations, fut alors converti en un fichier d'entrée séquentiel de type Phylip en utilisant le programme ReadSeq. Le fichier au format Phylip fut alors soumis au logiciel Felsenstein-Phylip afin de réaliser un certain nombre d'analyses phylogénétiques.

On chercha dans la banque de données SwissProt, remise à jour hebdomadairement, la présence de séquences additionnelles de catalase non encore incluses dans la banque de données protéique. La base de données protéique SwissProt est disponible sur le réseau belge EMB (BEN) à la VUB/ULB à Bruxelles. L'ordinateur BEN et la base de données SwissProt furent accédées via Internet. Un certain nombre de séquences, non encore incluses dans la base de données de domaines protéiques, furent découvertes.

Cependant, une analyse approfondie de ces séquences révéla qu'il s'agissait soit de séquences incomplètes (fragments), soit de séquences non homologues. Ces séquences ne furent donc pas incluses dans les analyses phylogénétiques.

Arbres phylogénétiques.

Méthode de distance.

La construction d'un arbre phylogénétique en utilisant la méthode des distances fut réalisée avec le programme ReadSeq, SEQBOOT, PROTDIST, FITCH ou NEIGHBOR et Consens de la version 3.5.1.c du logiciel Phylip sur une station de travail SILICON GRAPHICS IRIS/Indigo. Le shell script écrit pour l'Indigo tient compte du formatage propre des fichiers d'entrée et de sortie et du traitement

des fichiers d'entrée par leurs programmes respectifs du logiciel Phylip. L'analyse se fit par les étapes suivantes:

Les alignements multiples de séquences protéiques furent convertis dans le format d'entrée approprié au logiciel Phylip (Felsenstein-Phylip version 3.5), en utilisant le programme ReadSeq de Don Gilbert (1993). Le nombre de substitutions entre les séquences en acides aminés fut mesuré en utilisant le programme ProtDIST (logiciel Phylip), en corrigeant les substitutions multiples en utilisant  $d = -\ln(1 - K) \cdot L$  (Kimura, 1983) où K est le rapport de différences entre les acides aminés et L est la distance homologue (i.e. le nombre de résidus qui n'ont pas subi de délétion simultanée dans les 2 séquences) dans chaque paire de séquences comparées. Les positions dans lesquelles les gaps sont présents dans n'importe quelle séquence alignée furent exclus de l'analyse.

En se basant sur la matrice de distance, un arbre phylogénétique put être construit par la méthode de neighbor-joining (Saitou et Nei, 1987), présente dans le programme NEIGHBOR (logiciel Phylip). Pour mettre en évidence la fiabilité de l'arbre, la méthode en bootstrap (Efron, 1982 et Felsenstein, 1985) fut appliquée. A partir d'un ensemble original de séquences, 100 réplicats bootstrap furent obtenus pour la construction de matrices de distance et d'arbres phylogénétiques.

Le programme Consens (logiciel Phylip) fut utilisé pour obtenir un arbre consensus ainsi que les niveaux de confiance pour les groupes monophylétiques.

#### Méthode de "Parsimony"

Le fichier d'alignement multiple de séquences reformaté pour la version 3.5 du logiciel Felsenstein-Phylip fut analysé par le programme de "parsimony" appelé Protpars.

Une analyse en bootstrap de 100 réplicats de l'alignement multiple fut réalisée, ce qui résulta en un total de 259 arbres différents. Un arbre consensus fut

construit en utilisant le programme Consens du logiciel Phylip. On réalisa alors une analyse via les matrices de distance et le neighbor-joining.

# RESULTATS

## RESULTATS (PARTIE BIOCHIMIE)

### 1. CARACTERISATION DE LA CATALASE CHEZ *C. FASCICULATA*.

Comme il a été montré précédemment (Muse & Roberts, 1973), la catalase chez *Crithidia fasciculata* serait localisée dans des organites différents des peroxyosomes et des mitochondries.

On se propose de vérifier la localisation de la catalase chez *Crithidia fasciculata* en réalisant une centrifugation différentielle, en testant la sensibilité de l'enzyme à deux inhibiteurs et en réalisant une courbe de pH.

Afin de travailler dans des conditions optimales (quantités d'enzyme suffisantes), on va réaliser une courbe de croissance et un dosage enzymatique de la catalase au cours de cette croissance afin de travailler avec des cellules qui seront dans leur optimum de production de catalase.

#### A. Courbe de croissance.

Des expériences précédentes (Eeckhout, 1973) ont proposé que la catalase serait une réserve d'hème pour d'autres enzymes assurant la division cellulaire tels les cytochromes par exemple lorsque l'hémine fait défaut dans le milieu.

Nous nous proposons de vérifier ce qu'il en est en réalisant une culture de *Crithidia fasciculata* dans un milieu sans hémine et dans un milieu avec hémine.

La croissance, ainsi que l'activité de la catalase ont été mesurées pendant cinq jours en présence de (Fig. 22.a) et en absence d'hémine (Fig. 22.b).

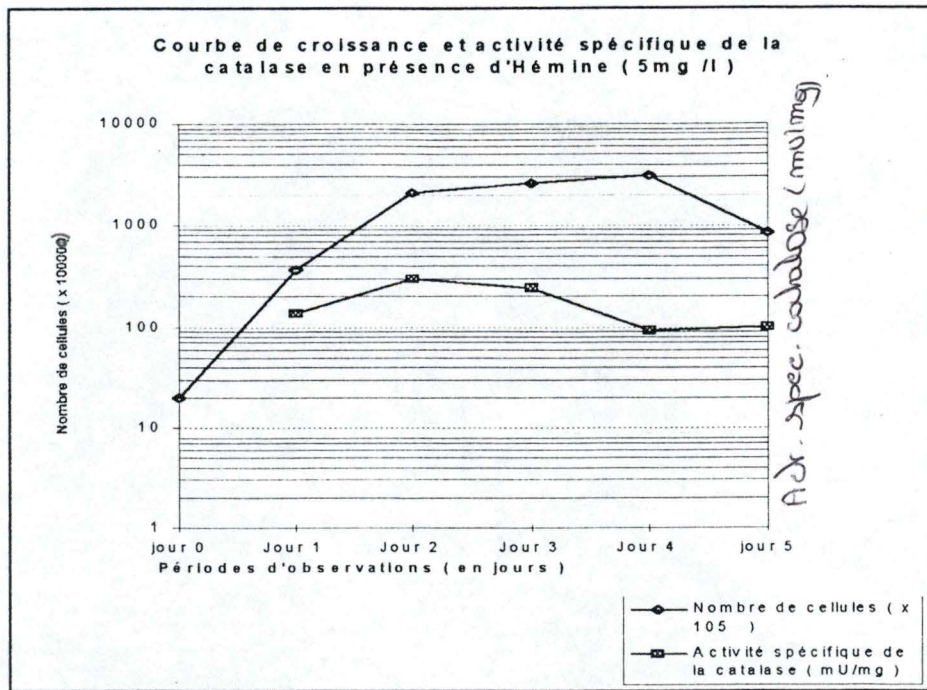


Figure 22.a

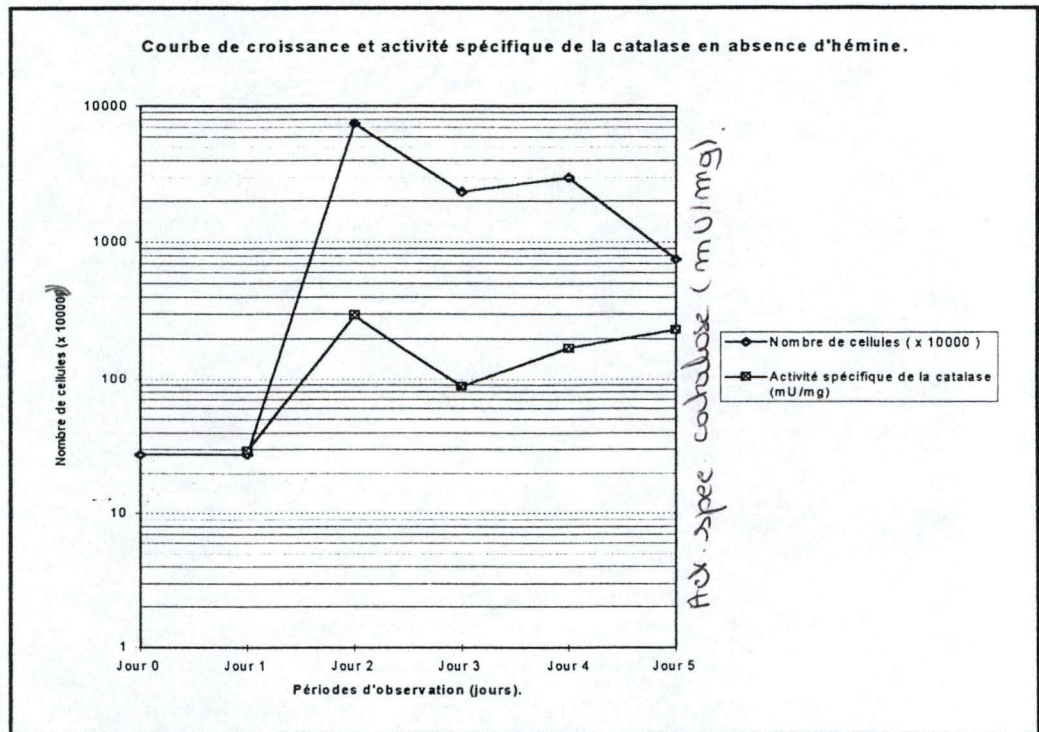


Figure 22.b



A.1 Courbe de croissance et activité spécifique de la catalase en présence d'hémine:

En présence d'hémine, la courbe de croissance atteint un maximum après 4 jours de croissance. A ce moment, on observe une diminution de l'activité spécifique de la catalase. Le maximum d'activité est observé après deux jours de culture: lorsqu'on effectuera la centrifugation, on la réalisera sur une culture de 2 jours lorsque l'activité de la catalase est maximale.

A.2 Courbe de croissance et activité spécifique de la catalase en absence d'hémine:

En absence d'hémine, la courbe de croissance atteint un maximum après deux jours de culture. Ensuite, on remarque une décroissance importante du nombre de cellules (2/3 du matériel cellulaire). Le maximum d'activité de la catalase est situé après 2 jours de culture.

Nous réaliserons donc nos études ultérieures sur des cellules provenant d'une culture de deux jours en présence d'hémine.

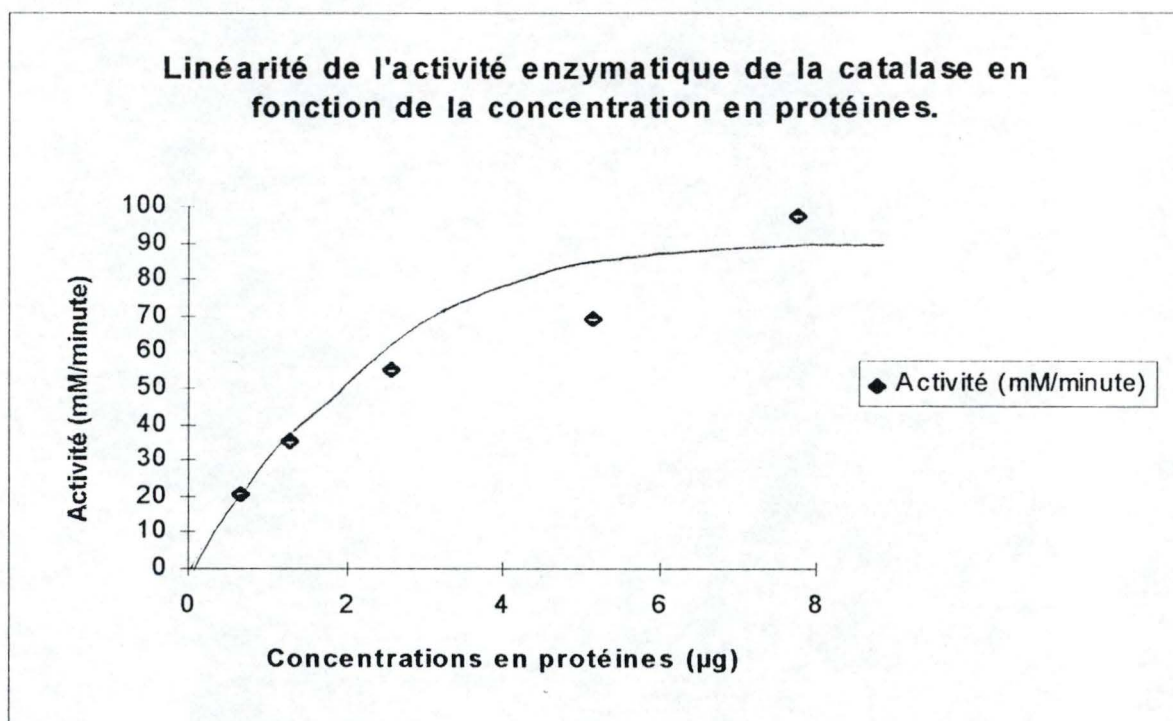
## **B. OPTIMALISATION.**

### B.1 Optimalisation du dosage enzymatique.

B.1.a 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 (Fig. 23). On mesure l'activité enzymatique (catalase) en variant la concentration en protéines cellulaires tout en maintenant les autres paramètres constants (température, concentration en  $H_2O_2$ , tampon).



**Figure 23.**

L'activité enzymatique de la catalase est linéaire jusqu'à 2,5  $\mu g$  de protéines par millilitre de test.

Nous veillerons donc à travailler dans cette zone de concentration.

B.1.b Etude des différents facteurs influençant la mesure de l'activité de la catalase.

Le test de dosage de la catalase ayant été développé pour l'étude de *Trypanosoma brucei*, il convient d'optimiser le test afin d'augmenter la précision du dosage dans les différentes fractions obtenues après centrifugation différentielle notamment.

### B.1.b.1 Influence du Triton.

On a effectué la mesure en absence de Triton (100% d'activité) et en présence de 0,4% de Triton X 100 (100% d'inhibition).

L'effet du Triton a été examiné plus précisément pour différentes concentrations de cet inhibiteur (Fig 24).

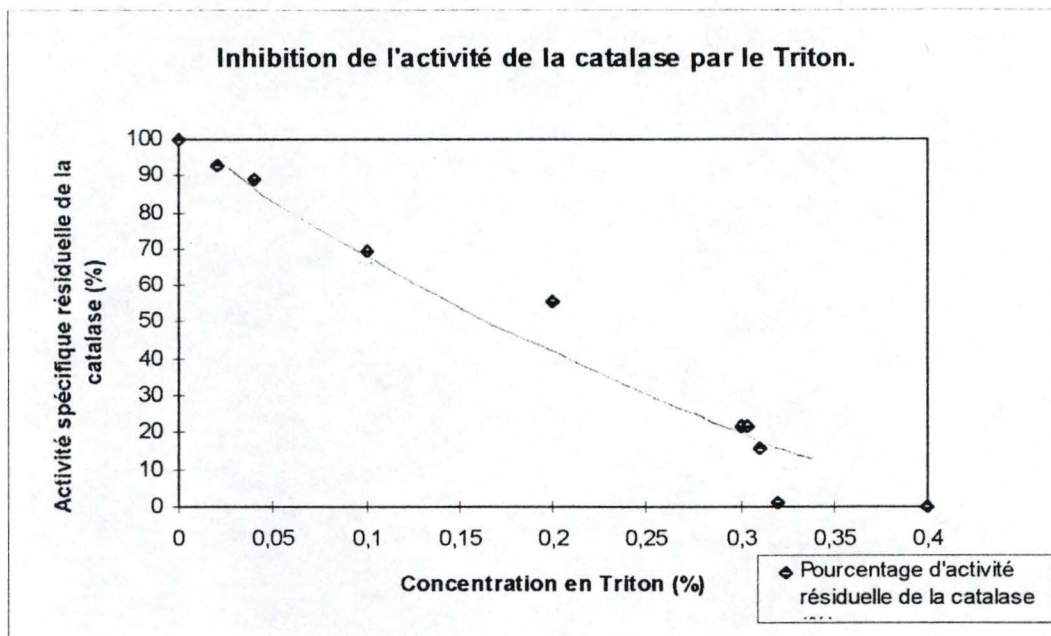
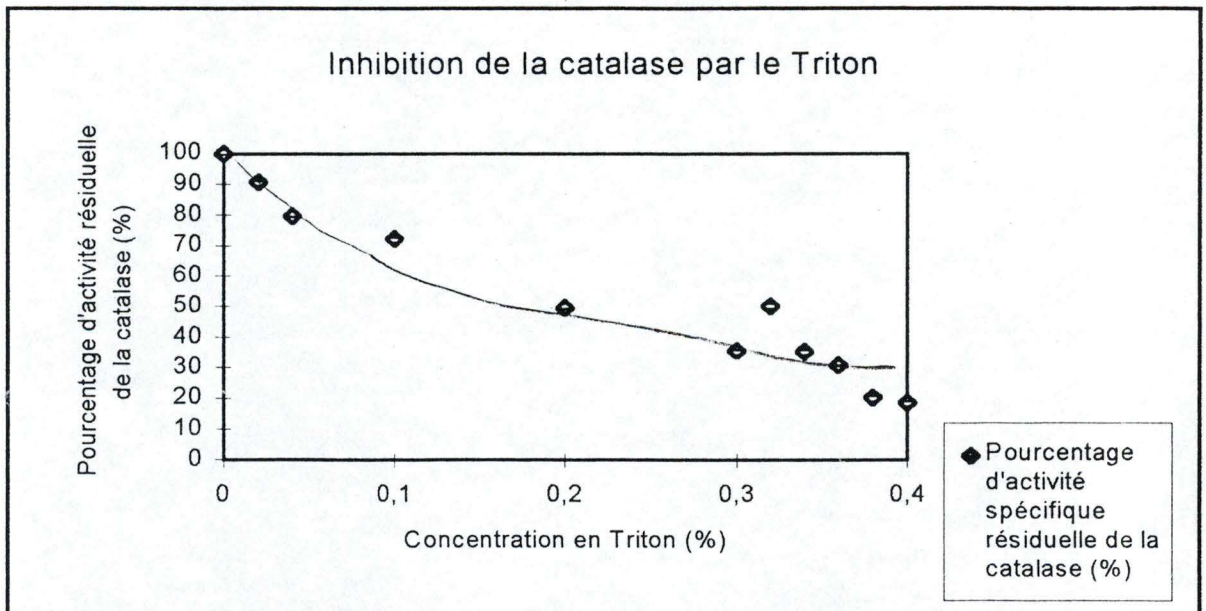


Figure 24.

Dans les conditions définies dans le test, le Triton X100 était utilisé avec une concentration de 0.1%. Or, d'après nos résultats, nous remarquons qu'à cette concentration, le Triton a déjà inhibé 30% de l'activité spécifique de la catalase.

Cette expérience a aussi été réalisée pour une culture de 3 jours et a montré des résultats similaires à la culture de 2 jours (fig. 25).



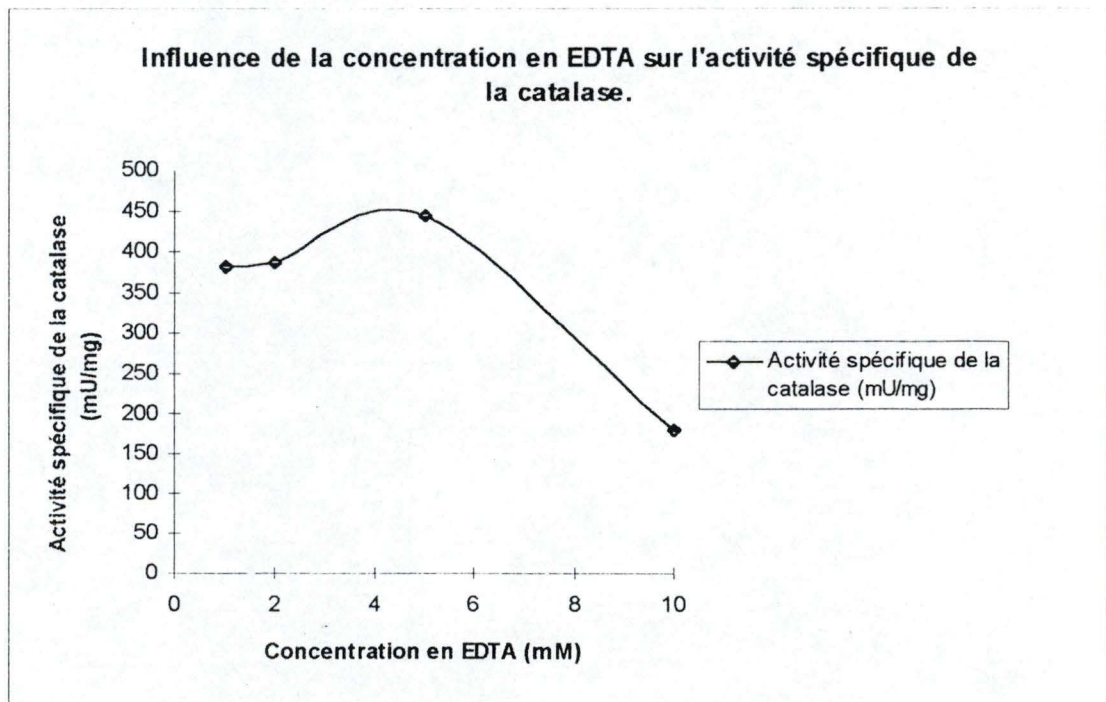
**Figure 25.**

Après trois jours de culture, la sensibilité de la catalase au Triton reste la même et ne semble pas avoir été modifiée au cours du vieillissement cellulaire.

Nous éliminerons donc le Triton du test et nous utiliserons un autre moyen pour détruire les organites (congélation-décongélation).

#### *B.1.b.2 Influence de la concentration en EDTA.*

L'activité spécifique de la catalase a été mesurée pour différentes concentrations en EDTA (fig. 26).



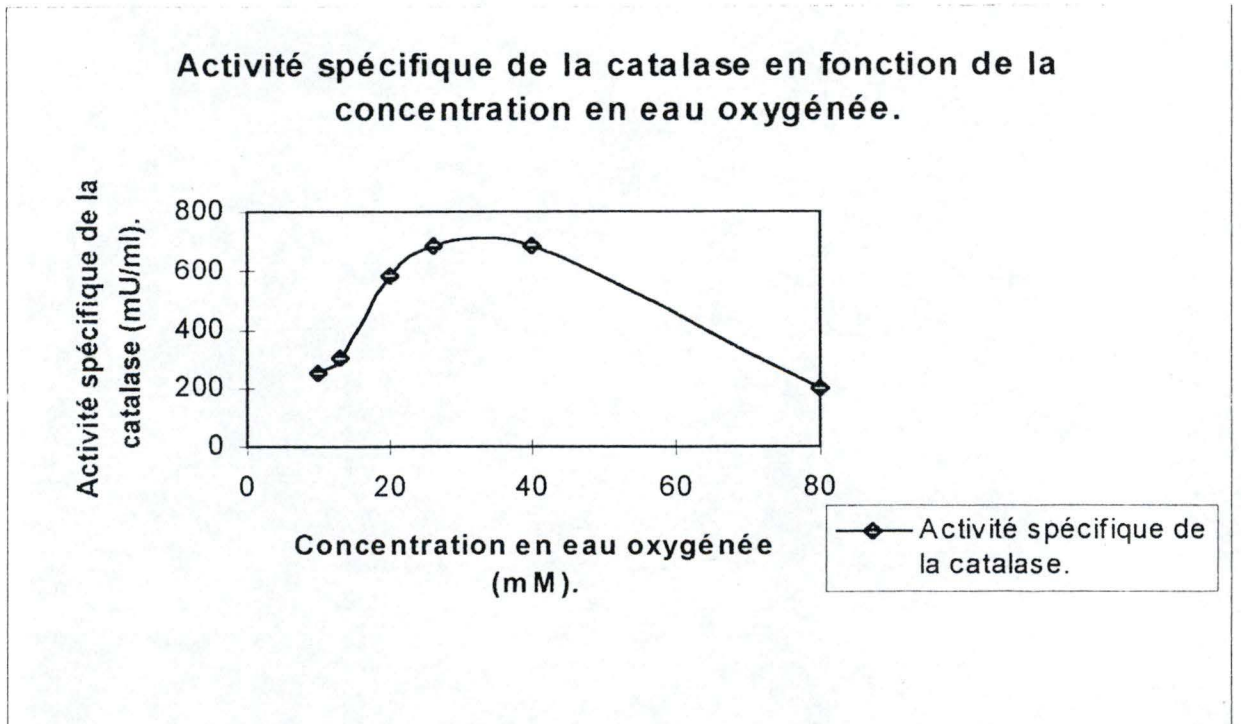
**Figure 26.**

L'utilisation de l'EDTA cause d'abord une augmentation de l'activité de la catalase, mais au delà d'un certain seuil (5 mM), il assure un rôle inhibiteur.

Connaissant le pouvoir chélateur de l'EDTA, nous pouvons conclure de cette expérience qu'au delà d'une concentration de 5 mM en EDTA, tous les ions fer nécessaires à l'activité de la catalase (hème) ont été bloqués, ce qui se traduit par une diminution conséquente de l'activité (diminution de moitié).

#### *B.1.b.3 Influence de la concentration en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.*

L'activité spécifique de la catalase a été mesurée en fonction de différentes concentrations en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (fig. 27).



**Figure 27.**

L'optimum d'activité de la catalase se situe entre 20mM et 30 mM en eau oxygénée. Dès lors, nous travaillerons avec une concentration en eau oxygénée 20 mM.

Nous remarquons que pour des concentrations inférieures à 20 mM, le peroxyde d'hydrogène assure un rôle activateur, probablement dû à une meilleure occupation des sites catalytiques de l'enzyme. Au delà de cette concentration, le peroxyde d'hydrogène assure un rôle inhibiteur probablement suite à l'oxydation de groupements sulfhydryles de certains acides aminés de la protéine. Cela déstabiliserait donc la structure protéique de la catalase et l'inhiberait.

## 2. CENTRIFUGATION DIFFERENTIELLE

### A. Centrifugation différentielle après deux jours de culture

Afin de localiser la catalase, on réalise une centrifugation différentielle: elle va permettre de séparer les organites suivant leur taille. Après obtention des différentes fractions, on réalisera le dosage des protéines, de trois enzymes marqueurs et de la catalase.

#### A.1. Distribution des protéines.

Les protéines se trouvaient surtout dans les fractions solubles (47,36% ) et nucléaires (34,42%) et en plus faible quantité dans la fraction microsomale (7.25%) et dans les fractions à gros granules (5.18%) et à petit granules (5.79%).

#### A.2. Distribution des enzymes marqueurs.

Ce sont les enzymes dont on connaît la localisation et dont on va se servir pour observer leur comportement au cours de la centrifugation différentielle. Si l'enzyme que l'on cherche à localiser montre un comportement identique par rapport à l'enzyme marqueur au cours de la centrifugation différentielle, cet enzyme aura probablement la même localisation subcellulaire que l'enzyme marqueur.

##### a. L'hexokinase.

L'hexokinase a été localisée de façon majoritaire dans la fraction à gros granules. Il a été montré chez *T. brucei* et chez *C. luciliae* que la localisation de l'hexokinase est essentiellement glycosomale (Opperdoes, 1990).

##### b. La malate déshydrogénase.

Cet enzyme marqueur des mitochondries et des glycosomes chez certains trypanosomatidés a été localisé principalement dans la fraction à petits granules et la fraction nucléaire.

c. La glucosephosphate isomérase.

Cet enzyme marqueur des glycosomes chez *T. brucei* et *C. luciliae* (Oppendoes, 1990) s'est retrouvé essentiellement dans la fraction à gros granules et dans la fraction nucléaire.

d. La catalase.

La catalase a été dosée dans des conditions optimales (tampon STE (pH 7.4); eau oxygénée 0.2 M) et on l'a localisée majoritairement.

## **B. Centrifugation différentielle après 3 jours de culture**

### B.1 Distribution des protéines.

Comme dans le cas du premier fractionnement, les protéines sont trouvées essentiellement dans les fractions solubles (47.75%) et nucléaires (37.55%), distribuées plus ou moins équitablement dans la fraction à gros granules (5.34%) et dans la fraction microsomale (6.58%) alors qu'elles ne se trouvaient qu'en moindre quantité dans la fraction à petits granules (2.78%).

### B.2 Distribution des enzymes marqueurs.

a. L'hexokinase.

Elle a été localisée majoritairement dans la fraction à gros granules. Ce résultat est identique à celui obtenu dans le fractionnement après deux jours de culture.



b. La malate déshydrogénase.

Cet enzyme a été localisée majoritairement dans la fraction microsomale et nucléaire.

c. La glucosephosphate isomérase.

Cet enzyme marqueur du glycosome s'est retrouvé majoritairement dans les fractions cytosolique et à gros granules.

d. La catalase.

Comme dans le cas du premier fractionnement, les conditions optimum sont utilisées. La catalase se trouve principalement sous forme soluble. On ne trouve pas de contamination de la fraction à gros granules comme c'était le cas dans le fractionnement après deux jours de culture.

**Fractionnement de *Crithidia fasciculata* par centrifugation différentielle après deux jours de culture.**

Distribution dans les fractions (%)

Enzyme	N	LG	SG	P	S	Récupération (%)
Protéine	34.4	5.2	5.8	7.3	47.3	111.4
Catalase	36	2.6	1.2	2.4	57.1	101.5
Hexokinase	66	10.6	6.8	3.6	5.1	96.6
Malate déshydrogénase	53.5	3.7	11.2	5.8	25.9	104.7
Glucose-phosphate isomérase	40.9	9.5	4.2	0.6	44.9	106.8

**Fractionnement de *Crithidia fasciculata* par centrifugation différentielle après trois jours de culture.**

Distribution dans les fractions (%)

Enzyme	N	LG	SG	P	S	Récupération (%)
Protéine	37.6	5.3	2.8	6.6	47.7	95.4
Catalase	5.0	0	0.7	2.0	92.3	69.4
Hexokinase	68.8	17.6	2.3	0.6	10.8	67.7
Malate déshydrogénase	65.8	3.2	1.3	8.0	21.7	97.1
Glucose-phosphate isomérase	24.6	5.2	1.1	3.2	66.0	90.9

**Activités spécifiques des enzymes de *Crithidia fasciculata* après deux et trois jours de croissance.**

Activité spécifique (en U/mg de protéines)

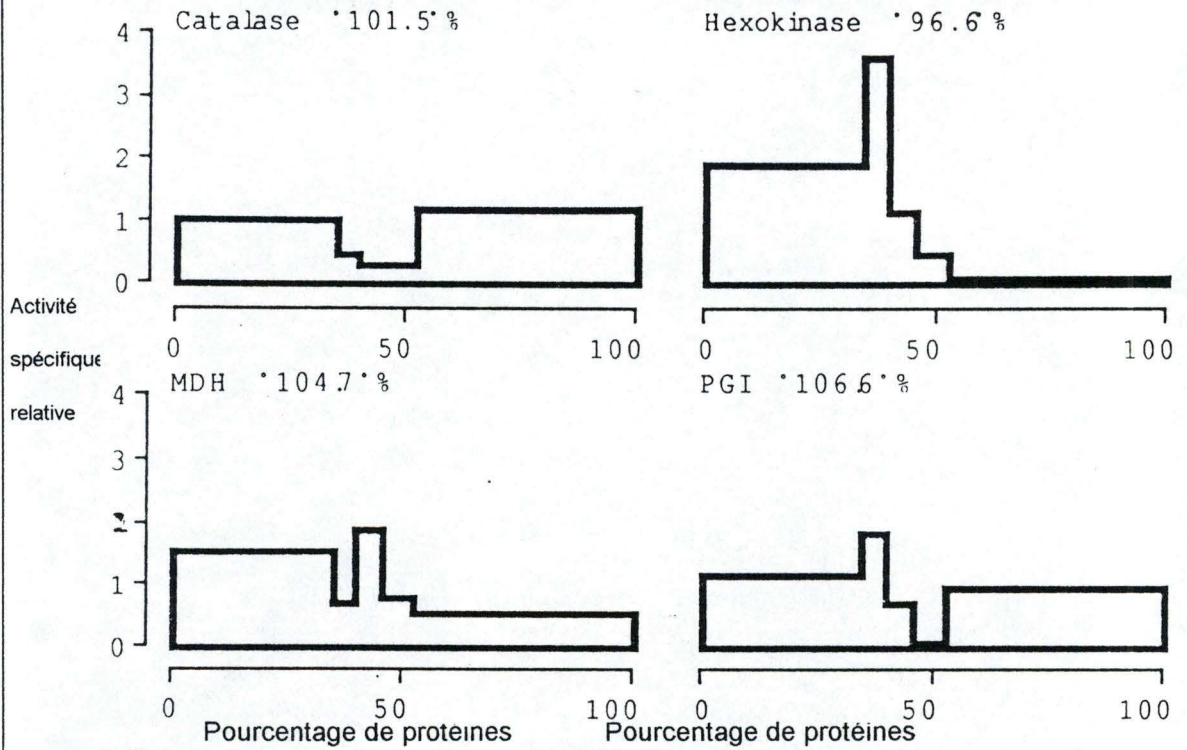
Enzyme	2 jours	3 jours
Catalase	0.968	0.436
Hexokinase	0.21	0.212
Malate déshydrogénase	0.474	1.183
Glucose-phosphate isomérase	1.381	1.307

Au cours du temps, on observe une diminution de la catalase. Ce résultat confirme donc les résultats observés à la figure 22.b.

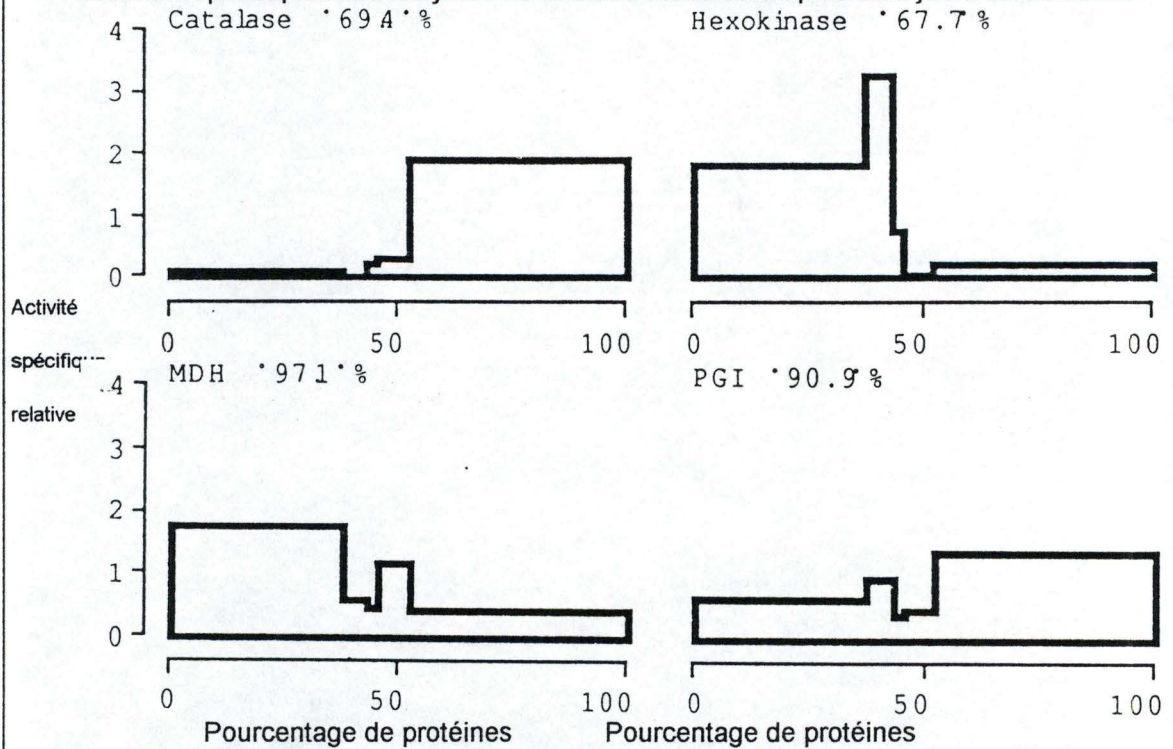
Nous remarquons que l'activité de l'hexokinase reste constante comme c'est le cas pour la glucose-phosphate isomérase.

Par contre, on remarque une augmentation de l'activité de la malate déshydrogénase.

Activités spécifiques des enzymes de *Crithidia fasciculata* après deux jours de croissance



Activités spécifiques des enzymes de *Crithidia fasciculata* après trois jours de croissance



### 3. EFFET DU PH.

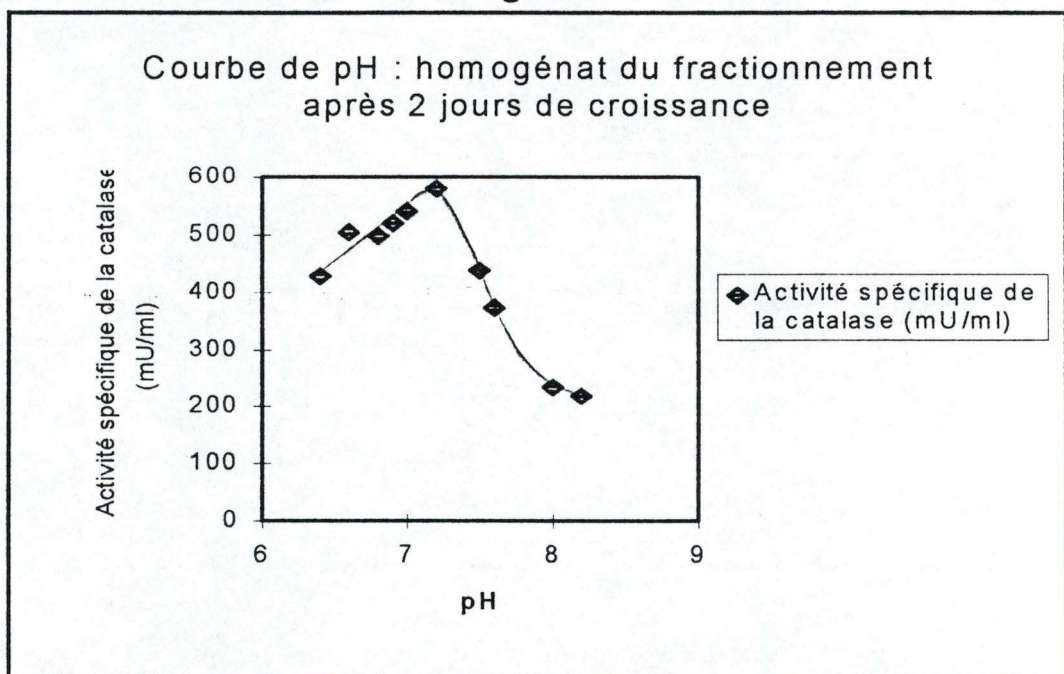
Afin de mettre en évidence l'existence de la catalase sous forme d'isoenzyme, on réalise une courbe de pH.

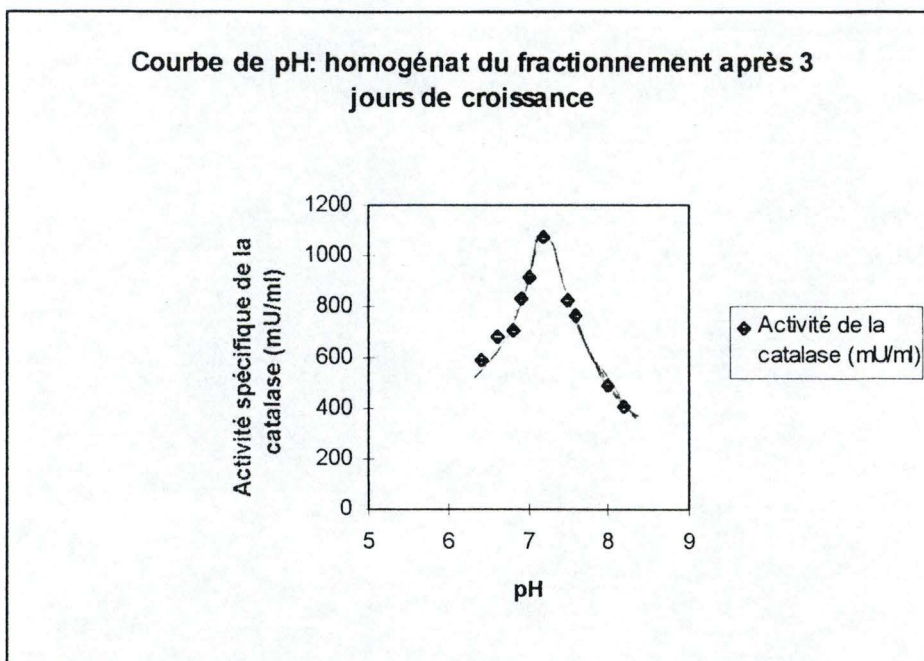
Si la catalase existait sous forme d'isoenzyme, on trouverait probablement une courbe de pH présentant plusieurs pics. En effet, le pH dans les organites et dans le cytosol étant différent, le pH optimum de fonctionnalité de l'enzyme devrait être différent également, bien qu'un enzyme existant sous une localisation unique puisse avoir plusieurs optimum d'activité.

L'activité de la catalase a été mesurée dans des tampons de différents pH (voir Matériel et Méthodes). Lors de ce dosage, les autres conditions ont été optimisées (travail une cuvette à la fois), une concentration en  $H_2O_2$  de 0.2 M, mesure sur 2 minutes, concentration en protéines choisie de manière à se trouver dans la zone linéaire de la réaction).

L'étude de l'effet du pH a été réalisée sur l'homogénat du fractionnement après deux jours de croissance (fig. 28), et sur l'homogénat du fractionnement après trois jours de culture (fig. 29).

Figure 28.





**Figure 29**

L'activité optimale de la catalase a été située à un pH de 7.2, et ce pour les deux homogénats.

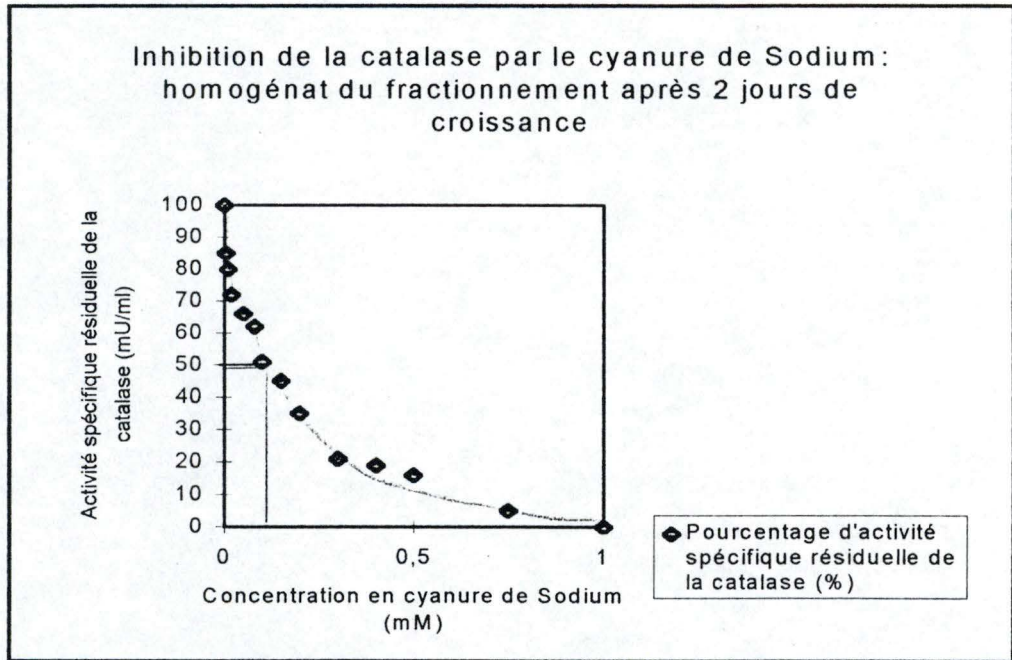
Nous ne pouvons conclure, au vu des résultats, à l'existence de la catalase sous forme d'isoenzyme.

#### **4. EFFET DES INHIBITEURS.**

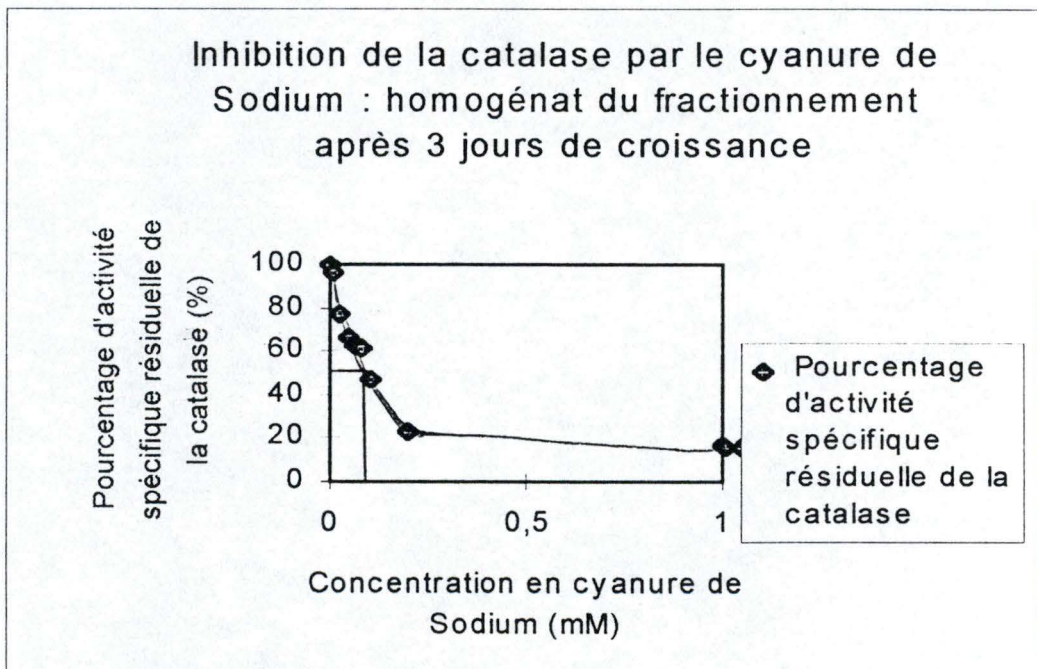
Afin de confirmer les résultats précédents quant à la localisation cytosolique de la catalase ou afin de vérifier sa sensibilité au cours du temps, nous allons tester l'effet de deux inhibiteurs (aminotriazole et cyanure) sur le fractionnement différentiel réalisé après deux jours et après trois jours de croissance.

##### **4.A. Effet du cyanure.**

L'effet du cyanure (inhibition totale à 10 mM) et l'inhibition en fonction de différentes concentrations a été réalisé sur l'homogénat du fractionnement après deux jours (fig. 30) et après trois jours de croissance (fig. 31).



**Figure 30.**



**Figure 31.**

On ne remarque pas de différence de sensibilité de la catalase entre les deux homogénats. L'inhibition de 50% de l'activité ( $I_{50}$ ) s'observe dans les deux cas pour une concentration de 0.1 mM. On ne peut donc conclure à l'existence de la catalase sous forme d'isoenzyme ou à une sensibilité différente au cours du temps.

#### 4.B. Effet de l'aminotriazole.

Une courbe d'inhibition est réalisée sur l'homogénat après deux jours de croissance (fig. 32) et après trois jours de croissance (fig. 33).

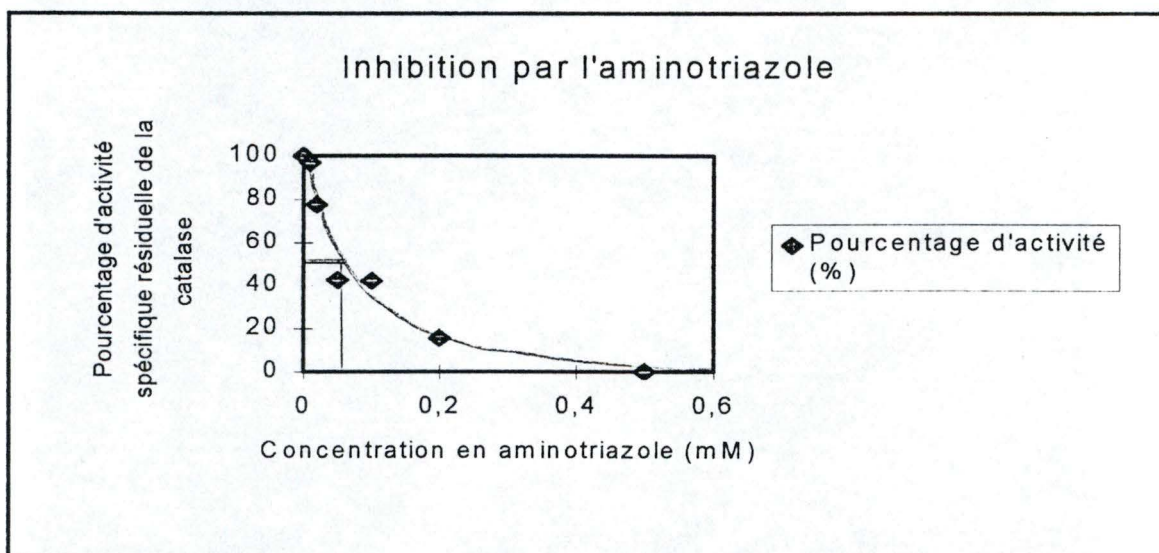
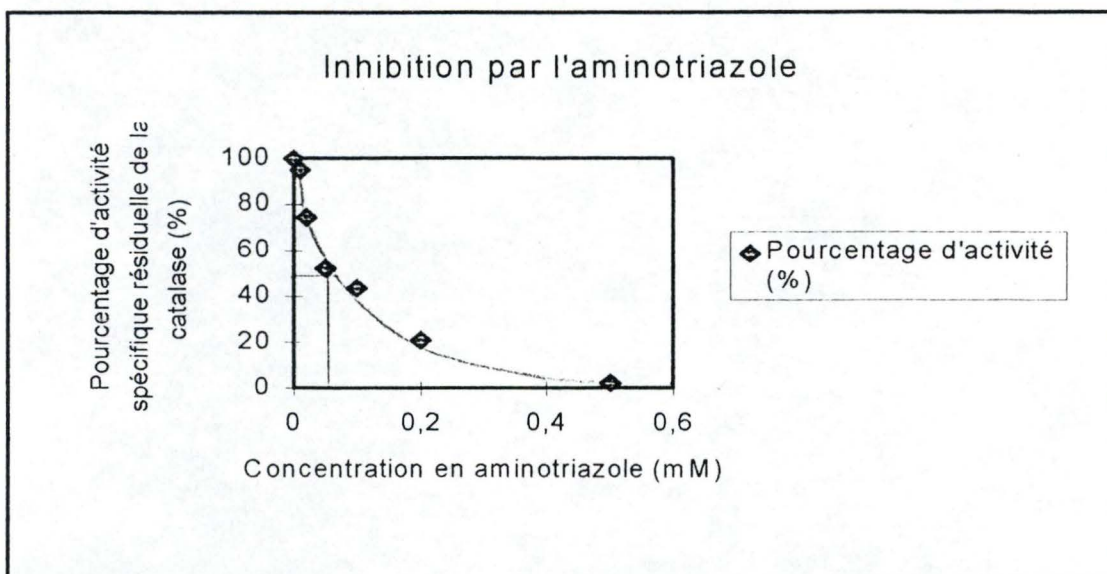


Figure 32.

On observe un  $I_{50}$  de 0.05 mM en aminotriazole pour un temps d'incubation de 15 minutes.



**Figure 33.**

On observe un  $I_{50}$  de 0.05 mM en aminotriazole pour un temps d'incubation de 15 minutes.

Ces résultats sont similaires à ceux obtenus dans le cas d'une culture de deux jours.

Ces expériences révèlent deux choses:

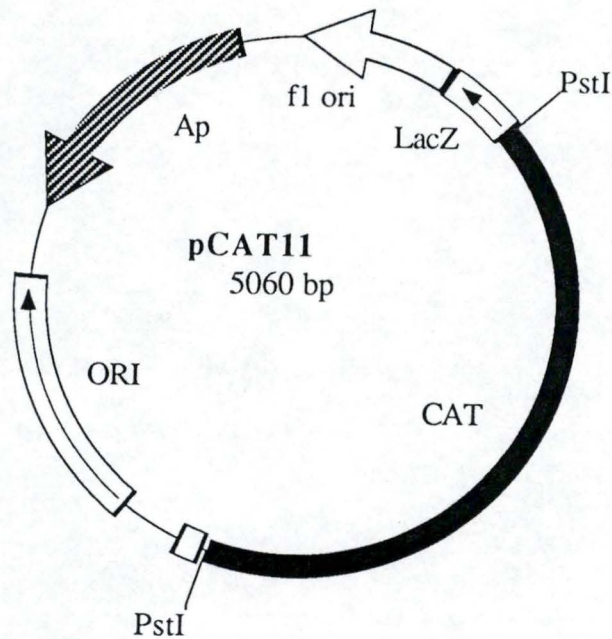
- l'existence de la catalase sous forme d'isoenzyme n'a pu être montrée.
- la sensibilité de la catalase au cours du temps n'est pas modifiée.

Or, on a montré que l'activité de la catalase au cours du temps était modifiée (diminution). Cette diminution serait donc due à une réduction de la quantité de la protéine, mais pas à une diminution de sa "qualité", les courbes d'inhibition ne montrant pas de différence au cours du temps.



## 1. SONDE DE CATALASE HUMAINE.

Pour le clonage du gène de la catalase de *Crithidia fasciculata*, on a utilisé une sonde contenant l'ADN complémentaire de la catalase humaine (Quan F. et al., 1986). Celle-ci provient du plasmide pCAT 11 (+) (fig. 34).



**Figure 34: seuls les sites de restriction *Pst*I du MCS ont été indiqués.**

Le fragment contenant l'ADN complémentaire de la catalase a été libéré par digestion avec l'enzyme *Pst*I. Deux fragments ont été obtenus: un fragment de 2961 pb correspondant au plasmide et un fragment de 2100 pb correspondant à l'insert contenant l'ADN complémentaire de la catalase humaine.

Pour l'isolement de l'ADN complémentaire correspondant au gène de la catalase humaine, 200 µg d'ADN du plasmide pCAT 11 ont été digérés par *Pst*I et la bande de 2100 pb a été isolée. On a utilisé 100 ng d'ADN pour la sonde.

## 2. OPTIMALISATION DES CONDITIONS D'HYBRIDATION.

### 2.A. L'ADN génomique de *Crithidia fasciculata*.

#### 2.A.1. Isolement de l'ADN génomique chez *Crithidia fasciculata*.

L'ADN génomique a été isolé à partir d'une culture de 1 litre ( $2 \times 10^9$  cellules) de *Crithidia fasciculata* cultivée à 28°C pendant deux jours.

#### 2.A.2. Dosage de l'ADN génomique de *Crithidia fasciculata*.

En se basant sur le fait que l'on mesure une absorbance de 1 pour 50 µg d'ADN, on a déterminé la quantité l'ADN génomique isolé.

Absorbance	Absorbance
Dilution 20 X: 0.2631 → non dilué :	5.262
Dilution 50 X: 0.1229 → non dilué:	6.145 ⇒ moyenne des mesures = 5.7035

$5.7035 \times 50 = 285.2$  µg d'ADN génomique/ml. On a obtenu 200 µl, correspondant à 5.704 µg d'ADN génomique.

#### 2.A.3. Digestion de l'ADN génomique de *Crithidia fasciculata*.

10 µg d'ADN génomique ont été digérés par différents enzymes de restriction. On a choisi des enzymes qui coupent fréquemment (*Bam* HI, *Pst*I, *Eco* RI). Cette expérience a été réalisée en triple afin de tester trois conditions de lavage.

## **2.B. Hybridation.**

L'hybridation a été réalisée à 58°C et on a testé trois conditions de lavage (voir matériel et méthodes).

Les conditions dans lesquelles on a observé une hybridation spécifique ont été utilisées pour le criblage de la banque. L'hybridation s'est faite à 58°C, les lavages ont été faits de la sorte: 6 bains de 20 minutes de 6 x SSC; 0.1% SDS et 3 bains de 20 minutes de 5 x SSC; 0.1% SDS.

Ces conditions non strictes ont été utilisées pour toutes les hybridations (screening et Southern Blot).

## **3. CRIBLAGE DE LA BANQUE D'ADN GENOMIQUE ET D'ADN COMPLEMENTAIRE DE *CRITHIDIA FASCICULATA*.**

Les deux banques ont été étalées et titrées, comme décrit dans Matériel et Méthodes. Les résultats de la titration de la banque d'ADN complémentaire sont illustrés à la figure 35.

Après étalement des deux banques et titration, on a réalisé des empreintes en double pour les deux banques et on a hybridé celles-ci avec la sonde de catalase humaine suivant les conditions optimales déterminées précédemment.

Nom de la suspension de phage	Titre (pfu/ml)
C1	34600
C2	83300
C3	155300
C4	287800
C5	112600
C6	29000

**Figure 35: Titre de la banque d'ADN complémentaire**

Pour la banque d'ADN génomique, aucun clone n'a pu être détecté, même après une exposition prolongée (8 jours).

Pour la banque d'ADN complémentaire, 4 clones positifs ont été détectés, dont 3 étaient en double. Le dernier n'était pas double mais donnait un signal assez fort. Etant donné qu'il y avait peu de clones, on les a utilisés tous. On a donc continué les expériences uniquement avec la banque d'ADN complémentaire.

#### **4. RECRIBLAGE DE LA BANQUE D'ADN COMPLEMENTAIRE.**

Les clones positifs ont été repiqués et la suspension de phages a été retirée puis diluée de façon à avoir entre 200 et 300 plages de lyse par boîte. On a réalisé deux empreintes. Après lavage, les filtres ont été hybridés avec une sonde de pCAT 11 (31169 cps), séchés et soumis à l'autoradiographie.

On a repiqué un clone positif bien isolé par boîte. Les suspensions de phages de ce rescreening ont été titrées et amplifiées en culture liquide. Cette amplification a été titrée (figure 36).

Nom de l'amplification de phages.	Titre. (pfu/ml)
Amplification 1	1888 x 10 <sup>6</sup>
Amplification 2	5000 x 10 <sup>7</sup>
Amplification 3	1200 x 10 <sup>6</sup>
Amplification 4	1088 x 10 <sup>6</sup>
Amplification 6	896 x 10 <sup>6</sup>

**Figure 36: Titre de l'amplification de phages.**

L'ADN de ces phages a été ensuite purifié.

## 5. DIGESTION DE L'ADN DE PHAGES.

La quantité d'ADN obtenu a été estimée par migration sur gel d'agarose.

1-2 µg d'ADN de phages ont été digérés par différents enzymes de restriction. On a choisi des enzymes qui coupent fréquemment (*Bam* HI, *Eco* RI, *Kpn*I, *Pst* I, *Sac*I et *Sal*I ).

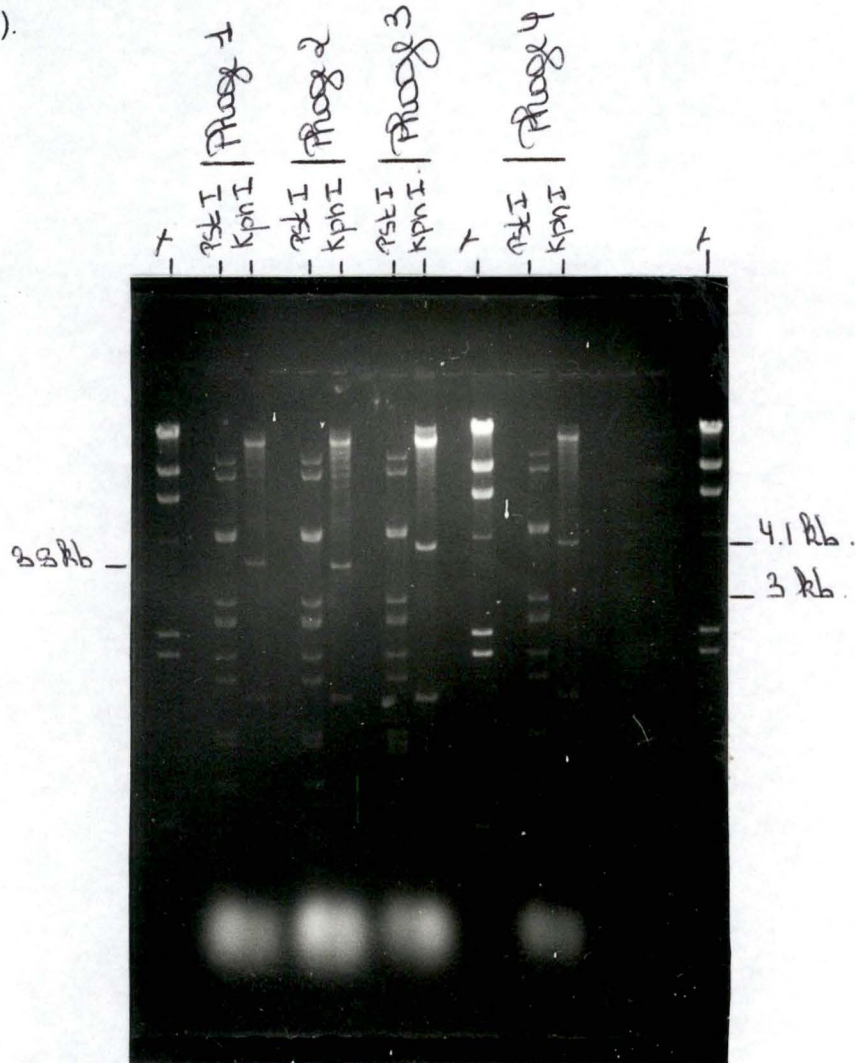
Après migration sur gel d'agarose, on a remarqué que pour les digestions par *Bam* HI, *Eco* RI, *Sac*I et *Sal*I, l'ADN des phages a été dégradé. On a réalisé quand même le transfert sur filtre et l'hybridation avec la sonde de catalase afin d'avoir des résultats pour les enzymes *Kpn*I et *Pst*I. Après lavages et autoradiographie, on a détecté plusieurs bandes positives dans les digestions par *Kpn* I et *Pst* I (voir blot et tableau).

Phages	<i>Pst</i> I	<i>Kpn</i> I
page 1.	3 kb	3.8 kb
Phage 4.	3 kb	4.1 kb

Les figures 37 et 38 montrent l'ADN de phages 1 à 4 digéré par *Kpn* I et *Pst* I ainsi que les bandes qui ont hybridé avec la sonde.

Les résultats pour les phages 2 et 3 étaient très faibles, mais montraient néanmoins une bande pour *Pst*I d'environ 3 kb pour la digestion par *Kpn*I, le signal était trop faible que pour voir l'hybridation ( voir figure 38).

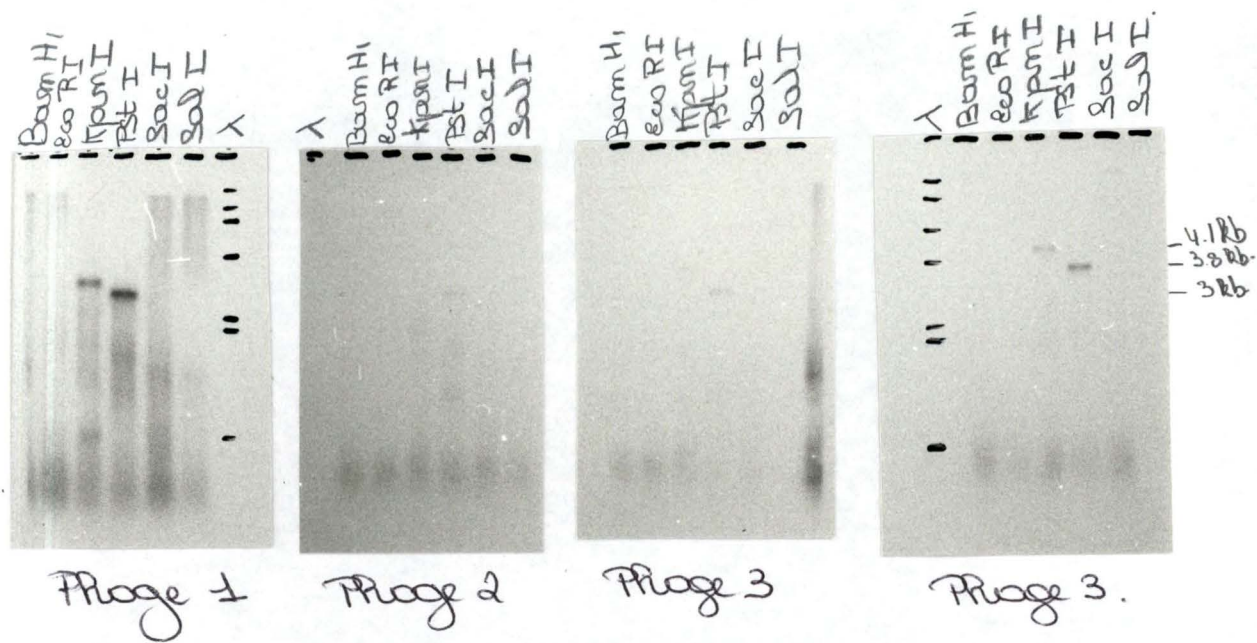
On a réisolé de l'ADN de phages pour les 4 clones et on l'a digéré par *Kpn*I et *Pst*I (Figure 37).



**Figure 37: Digestion de l'ADN de phage par *Pst*I et *Kpn*I.**

On a observé que tous les phages montrent le même profil pour la digestion par *Pst*I, tandis que le profil est différent pour les digestions par *Kpn*I.

Sur la figure 38, on a indiqué la taille des fragments hybridant avec la sonde CAT11.



**Figure 38: Autoradiographie  
des digestions d'ADN de phages en présence de la sonde CAT11.**

Par manque de temps, nous avons du arrêter le travail à ce moment.

## RESULTATS (Phylogénie).

Phylogénèse :

Il est clair que toutes les catalases incluses dans l'alignement montré dans la figure 39 sont des protéines homologues. Les figures 40.a et 40.b montrent les identités de pairage entre les séquences, qui sont de l'ordre de 40 % ou plus élevées. La seule exception est la catalase de *Penicillium janthinellum* (CATA\_PENJA). Une liste des espèces et leurs abréviations en SwissProt sont illustrées à la figure 39.

```
bca_strve: STREPTOMYCES VENEZUELAE.
cat1_goshi: GOSSYPIUM HIRSUTUM (UPLAND COTTON).
cat1_lyces: LYCOPERSICON ESCULENTUM (TOMATO).
cat1_maize: ZEA MAYS (MAIZE).
cat2_goshi: GOSSYPIUM HIRSUTUM (UPLAND COTTON).
cat2_maize: ZEA MAYS (MAIZE).
cat3_ecoli: ESCHERICHIA COLI.
cat3_maize: ZEA MAYS (MAIZE).
cat_bacfi: BACILLUS FIRMUS.
cata_arath: ARABIDOPSIS THALIANA (MOUSE-EAR CRESS).
cata_bacst: BACILLUS STEAROTHERMOPHILUS.
cata_bovin: BOS TAURUS (BOVINE).
cata_cantr: CANDIDA TROPICALIS (YEAST).
cata_drome: DROSOPHILA MELANOGASTER (FRUIT FLY).
cata_ecoli: ESCHERICHIA COLI.
cata_hanpo: HANSENULA POLYMORPHA (YEAST).
cata_human: HOMO SAPIENS (HUMAN).
cata_ipoba: IPOMOEA BATATAS (SWEET POTATO) (BATATE).
cata_lacsk: LACTOBACILLUS SAKAI.
cata_lisse: LISTERIA SEELIGERI.
cata_miclu: MICROCOCCUS LUTEUS (MICROCOCCUS LYSODEIKTICUS).
cata_micly: MICROCOCCUS LYSODEIKTICUS.
cata_mouse: MUS MUSCULUS (MOUSE).
cata_orysa: ORYZA SATIVA (RICE).
cata_pea: PISUM SATIVUM (GARDEN PEA).
cata_penja: PENICILLIUM JANTHINELLUM (PENICILLIUM VITALE).
cata_phaau: PHASEOLUS AUREUS (MUNG BEAN) (VIGNA RADIATA).
cata_rat: RATTUS NORVEGICUS (RAT).
cata_ricco: RICINUS COMMUNIS (CASTOR BEAN).
cata_salty: SALMONELLA TYPHIMURIUM.
cata_soybn: GLYCINE MAX (SOYBEAN).
cata_yeast: SACCHAROMYCES CEREVISIAE (BAKER'S YEAST).
cate_ecoli: ESCHERICHIA COLI.
catt_yeast: SACCHAROMYCES CEREVISIAE (BAKER'S YEAST).
catv_bacsu: BACILLUS SUBTILIS.
```

**Figure 39: espèces et leurs abréviations en SwissProt**



Figure 40.a: pourcentage d'identité entre les séquences.

	STRVE	GOSHI	1LYCES	1MAIZE	2GOSHI	2MAIZE	3MAIZE	AARATH	ABOVIN	ACANTR	ADROME	AHANPO	AHUMAN	AIPOBA	ALACSK	ALISSE	AMICLU
STRVE	100.0	45.3	45.3	45.3	46.5	47.4	46.4	46.5	58.1	54.7	53.8	52.6	57.3	44.2	56.4	49.4	51.3
GOSHI	45.3	100.0	80.5	87.2	92.7	83.6	72.0	91.6	50.9	45.9	47.7	44.5	48.8	78.2	45.1	53.8	46.6
1LYCES	45.3	80.5	100.0	78.8	79.9	77.2	70.6	80.2	52.0	44.8	47.4	44.2	50.0	77.9	45.3	52.3	45.2
1MAIZE	45.3	87.2	78.8	100.0	85.8	81.3	71.7	86.9	50.9	47.1	48.8	45.9	49.7	77.0	45.9	52.9	46.4
2GOSHI	46.5	92.7	79.9	85.8	100.0	86.8	72.3	92.2	52.3	46.8	49.4	46.2	50.0	79.9	46.2	54.7	47.5
2MAIZE	47.4	83.6	77.2	81.3	86.8	100.0	74.6	82.5	53.8	46.8	49.7	47.1	52.0	76.6	45.9	54.4	46.3
3MAIZE	46.4	72.0	70.6	71.7	72.3	74.6	100.0	72.0	51.6	43.1	47.5	43.1	50.7	71.1	44.0	48.4	46.5
AARATH	46.5	91.6	80.2	86.9	92.2	82.5	72.0	100.0	52.6	46.8	49.1	45.3	50.6	79.4	46.2	54.4	46.4
ABOVIN	58.1	50.9	52.0	50.9	52.3	53.8	51.6	52.6	100.0	57.4	72.1	57.8	93.9	52.0	57.6	48.3	50.7
ACANTR	54.7	45.9	44.8	47.1	46.8	46.8	43.1	46.8	57.4	100.0	59.9	74.7	57.1	45.6	50.0	44.2	47.5
ADROME	53.8	47.7	47.4	48.8	49.4	49.7	47.5	49.1	72.1	59.9	100.0	59.1	73.0	48.3	54.1	44.8	47.8
AHANPO	52.6	44.5	44.2	45.9	46.2	47.1	43.1	45.3	57.8	74.7	59.1	100.0	59.0	45.6	48.5	46.5	46.6
AHUMAN	57.3	48.8	50.0	49.7	50.0	52.0	50.7	50.6	93.9	57.1	73.0	59.0	100.0	50.9	56.9	47.6	49.6
AIPOBA	44.2	78.2	77.9	77.0	79.9	76.6	71.1	79.4	52.0	45.6	48.3	45.6	50.9	100.0	43.6	49.7	44.6
ALACSK	56.4	45.1	45.3	45.9	46.2	45.9	44.0	46.2	57.6	50.0	54.1	48.5	56.9	43.6	100.0	47.9	49.0
ALISSE	49.4	53.8	52.3	52.9	54.7	54.4	48.4	54.4	48.3	44.2	44.8	46.5	47.6	49.7	47.9	100.0	44.3
AMICLU	51.3	46.6	45.2	46.4	47.5	46.3	46.5	46.4	50.7	47.5	47.8	46.6	49.6	44.6	49.0	44.3	100.0
AMOUSE	58.7	49.4	49.7	50.3	50.9	52.0	49.9	50.6	94.5	57.4	71.5	59.0	93.0	51.5	56.3	48.7	49.3
AORYSA	45.6	77.9	75.0	78.8	77.9	79.8	83.7	77.6	52.3	44.5	47.4	43.9	50.4	76.5	44.5	50.4	46.6
APEA	45.3	87.8	78.8	85.5	88.1	80.7	70.8	87.8	52.0	47.1	48.5	45.1	49.9	79.1	45.9	52.1	47.5
APENJA	30.5	28.4	30.1	27.7	28.4	29.3	27.1	28.1	40.8	29.5	32.2	29.5	38.7	28.1	28.4	26.0	27.1
APHAU	45.9	91.3	79.4	85.8	89.5	82.5	70.8	88.7	52.0	46.2	48.3	45.1	50.1	78.8	45.6	52.4	46.9
ARAT	59.0	50.0	50.6	50.3	51.2	51.8	50.1	51.5	94.2	57.7	71.5	59.3	93.0	51.2	56.9	48.7	49.9
ASOYBN	45.6	89.5	79.7	86.0	91.0	86.0	73.5	90.1	52.9	47.4	49.4	45.9	49.9	80.5	47.3	54.1	46.1
AYEAST	50.3	42.9	42.3	43.5	44.1	43.5	40.1	43.8	55.0	71.3	54.0	64.6	54.2	42.6	48.1	41.3	45.4
EECOLI	48.3	50.6	51.2	51.2	50.6	50.6	48.1	51.2	49.1	45.1	44.8	46.8	47.6	50.6	46.8	51.3	44.6
TYEAST	42.5	37.2	36.6	37.2	38.4	38.4	36.7	37.5	42.2	50.9	45.0	48.8	43.1	36.9	41.9	39.4	41.4
VBACSU	65.1	48.5	49.4	50.6	50.3	50.6	49.3	49.7	64.2	51.2	59.3	52.0	63.9	50.3	63.9	55.2	56.3
BACFI	48.0	50.6	50.3	51.5	50.9	50.9	49.9	50.6	48.0	44.5	44.2	46.8	47.0	50.6	46.5	53.0	45.5

Figure 40.b: pourcentage d'identité entre les séquences.

	AMOUSE	AORYSA	APEA	APENJA	APHAU	ARAT	ASOYBN	AYEAST	EECOLI	TYEAST	VBACSU	BACFI
STRVE	58.7	45.6	45.3	30.5	45.9	59.0	45.6	50.3	48.3	42.5	65.1	48.0
GOSHI	49.4	77.9	87.8	28.4	91.3	50.0	89.5	42.9	50.6	37.2	48.5	50.6
1LYCES	49.7	75.0	78.8	30.1	79.4	50.6	79.7	42.3	51.2	36.6	49.4	50.3
1MAIZE	50.3	78.8	85.5	27.7	85.8	50.3	86.0	43.5	51.2	37.2	50.6	51.5
2GOSHI	50.9	77.9	88.1	28.4	89.5	51.2	91.0	44.1	50.6	38.4	50.3	50.9
2MAIZE	52.0	79.8	80.7	29.3	82.5	51.8	86.0	43.5	50.6	38.4	50.6	50.9
3MAIZE	49.9	83.7	70.8	27.1	70.8	50.1	73.5	40.1	48.1	36.7	49.3	49.9
AARATH	50.6	77.6	87.8	28.1	88.7	51.5	90.1	43.8	51.2	37.5	49.7	50.6
ABOVIN	94.5	52.3	52.0	40.8	52.0	94.2	52.9	55.0	49.1	42.2	64.2	48.0
ACANTR	57.4	44.5	47.1	29.5	46.2	57.7	47.4	71.3	45.1	50.9	51.2	44.5
ADROME	71.5	47.4	48.5	32.2	48.3	71.5	49.4	54.0	44.8	45.0	59.3	44.2
AHANPO	59.0	43.9	45.1	29.5	45.1	59.3	45.9	64.6	46.8	48.8	52.0	46.8
AHUMAN	93.0	50.4	49.9	38.7	50.1	93.0	49.9	54.2	47.6	43.1	63.9	47.0
AIPOBA	51.5	76.5	79.1	28.1	78.8	51.2	80.5	42.6	50.6	36.9	50.3	50.6
ALACSK	56.3	44.5	45.9	28.4	45.6	56.9	47.3	48.1	46.8	41.9	63.9	46.5
ALISSE	48.7	50.4	52.1	26.0	52.4	48.7	54.1	41.3	51.3	39.4	55.2	53.0
AMICLU	49.3	46.6	47.5	27.1	46.9	49.9	46.1	45.4	44.6	41.4	56.3	45.5
AMOUSE	100.0	50.1	50.4	38.4	50.1	97.5	51.3	55.0	48.7	42.5	64.8	47.6
AORYSA	50.1	100.0	76.1	27.4	77.5	50.1	78.3	41.5	49.6	38.1	50.1	51.8
APEA	50.4	76.1	100.0	27.7	91.0	50.1	89.0	43.0	47.9	37.5	49.3	49.0
APENJA	38.4	27.4	27.7	100.0	27.7	38.4	28.4	29.0	31.2	21.6	30.1	30.8
APHAU	50.1	77.5	91.0	27.7	100.0	50.1	90.7	43.3	50.1	37.5	50.7	49.3
ARAT	97.5	50.1	50.1	38.4	50.1	100.0	50.4	55.3	48.7	42.5	64.5	47.3
ASOYBN	51.3	78.3	89.0	28.4	90.7	50.4	100.0	44.1	51.3	38.1	50.4	50.1
AYEAST	55.0	41.5	43.0	29.0	43.3	55.3	44.1	100.0	43.6	45.2	51.3	42.4
EECOLI	48.7	49.6	47.9	31.2	50.1	48.7	51.3	43.6	100.0	38.0	51.8	72.2
TYEAST	42.5	38.1	37.5	21.6	37.5	42.5	38.1	45.2	38.0	100.0	42.8	39.6
VBACSU	64.8	50.1	49.3	30.1	50.7	64.5	50.4	51.3	51.8	42.8	100.0	52.1
BACFI	47.6	51.8	49.0	30.8	49.3	47.3	50.1	42.4	72.2	39.6	52.1	100.0

De façon remarquable, l'identité de cet enzyme fongique avec les autres catalases fongiques, comme celles de levure, *Candida* et *Hansenula*, avec les plantes et avec les autres catalases procaryotiques est inférieure à 30%. Par contre, l'identité est beaucoup plus élevée avec les séquences animales.

Pour faire de l'inférence sur les relations phylogénétiques, seules les parties où l'alignement est non-ambigu ou ne contenant pas d'insertions ou de délétions (indels) importantes furent incluses dans l'analyse.

Un trait plein dans les données reprises sur les 5 pages ci-après montre quelle partie de l'alignement fut comprise dans les analyses finales. Différentes méthodes d'inférence concernant la phylogénie furent appliquées à cet ensemble de données.

Celles-ci furent: la méthode de la matrice de distance, la méthode de neighbor-joining (Nei) et la méthode de parcimonie maximale.

CATA_HUMAN	VLTTGAGNPV	GDKLNVITVG	PRGPLLVQDV	VFTDEMAHFD	RERIPERVVH
CATA_BOVIN	.....	.DKLNSLTVG	PRGPLLVQDV	VFTDEMAHFD	RERIPERVVH
CATA_MOUSE	VLTTGGGNPI	GDKLNIMTAG	SRGPLLVQDV	VFTDEMAHFD	RERIPERVVH
CATA_RAT	VLTTGGGNPI	GDKLNIMTAG	PRGPLLVQDV	VFTDEMAHFD	RERIPERVVH
CATA_DROME	.....	.IKDASQTVG	PRGPILLQDV	NFLDEMASHFD	RERIPERVVH
CATT_YEAST	.....	.HPYASQYSR	PDGPILLQDF	HLENIASFDF	RERVPERVVH
CATA_YEAST	VVTNSTGNPI	NEPFVTQIRG	EHGPLLLQDY	NLIDSLAHFN	RENIPQRNPH
CATA_HANPO	.....	.DSTGYKYAP	PIGPLLLQDF	KLIDTLSHFD	RERIPERVVH
CATA_CANTR	.....	.EPFATQRVG	QHGPLLLQDF	NLIDSLAHFD	RERIPERVVH
CATA_PENJA	.....	.ESESSLTDG	DAGALLQDI	SEWDEVFRFD	RLEAVERAAH
CAT1_GOSHI	.....	.NNNSLTVG	PRGQYLEDY	HLVEKLANFD	RERIPERVVH
CAT2_GOSHI	.....	.NNNSLTVG	ARGPILLEDY	HLVEKLANFD	RERIPERVVH
CATA_ARATH	.....	.NNNSMTVG	PRGLILEDY	HLVEKLANFD	RERIPERVVH
CATA_SOYBN	FWTTNSGAPI	WNNNSLTVG	SRGPILLEDY	HLVEKLANFD	RERIPERVVH
CATA_PEA	FWTTNSGAPV	WNNNSLTVG	SRGPILLEDY	HLVEKLAQFD	RERIPERVVH
CATA_PHAUU	FWTTNSGAPV	WNNNSLTVG	TRGPILLEDY	HLVEKLANFD	RERIPERVVH
CAT1_MAIZE	.....	.NNNSLTVG	QRGPILLEDY	HLIEKLAQFD	RERIPERVVH
CAT3_MAIZE	.....	.NDNEALTVG	PRGPILLEDY	HLIEKVAHFD	RERIPERVVH
CAT2_MAIZE	.....	.NNDSSLTVG	ARGPILLEDY	HCEKLANFDR	ERIPERVVHA
CATA_ORYSA	TTTTNAGAPV	WNDNEALTVG	PRGPILLEDY	HLIEKVAHFA	RERIPERVVH
CATA_IPOBA	.....	.NNTCALTVG	SRGPILLEDY	HLVEKIQNFT	RERIPERVVH
CAT1_LYCES	.....	.NNVSSLTVG	PRGPILLEDY	YLIEKLAFTD	REKIPERVVH
CATA_LISSE	NLTTNQGVPI	GDNQNSMTAG	LKGPLLEDY	VLEKLAHFD	RERVPERVVH
CATE_ECOLI	ALTTNQGVRI	ADDQNSLRAG	SRGPLLEDY	ILREKITHFD	HERIPERIVH
CAT_BACFI	KLTTNQGLKV	SEDEFSLKAG	ERGPTLMEDF	HFREKMTHTD	HERIPERIVH
CATV_BACSU	KLTTNSGAPV	GDNQNSMTAG	SRGPLLIQDV	HLEKLAHFN	RERVPERVVH
CATA_LACSK	QLTTNEGQPV	ADNQHSQTAA	NAAPSLIQDY	QLEKLAHFN	RERIPERVVH
CATA_MICLU	.....	.SDRESLTVG	SEGPVLHDV	HLETHQHFD	RMNIPERRPH
BCA_STRVE	.....	.DNQNSSETAG	VGGPVLVQDQ	LLEKLAHFN	RERIPERVVH

CATA_HUMAN	AKGAGAFGYF	EVTHDITKYS	KAKVFEHIGK	KTPIAVRFST	VAGESGSADT
CATA_BOVIN	AKGAGAFGYF	EVTHDITRYS	KAKVFEHIGK	RTPIAVRFST	VAGESGSADT
CATA_MOUSE	AKGAGAFGYF	EVTHDITRYS	KAKVFEHIGK	RTPIAVRFST	VAGESGSADT
CATA_RAT	AKGAGAFGYF	EVTHDITRYS	KAKVFEHIGK	RTPIAVRFST	VAGESGSADT
CATA_DROME	AKGAGAFGYF	EVTHDITQYC	AAKIFDKVKK	RTPLAVRFST	VGGESGSADT
CATT_YEAST	AKGGGCRLEF	ELTDSLSDIT	YAAPYQNVGY	KCPGLVRFST	VGGESGTPDT
CATA_YEAST	AHGSGAFGYF	EVTDDITDIC	GSAMFSKIGK	RTKCLTRFST	VGGDKGSADT
CATA_HANPO	AKGAGAYGVF	EVTDDITDVC	SAKFLDTV GK	KTRIFTRFST	VGGDKGSADT
CATA_CANTR	AKGSGAYGVF	EVTDDITDVC	AAKFLDTV GK	KTRIFTRFST	VGGELGSADT
CATA_PENJA	AAAAAFAFGAF	VARGDWTASA	AA..AFQAAG	KQIAFMAAFS	TVAGAKGSAT
CAT1_GOSHI	ARGASAKGFF	DVTHDISHLT	CADFLRAPGV	QTPVIVRFST	VIHERGSPET
CAT2_GOSHI	ARGASAKGFF	EVTHDISQLT	CADFLRAPGV	QTPVIVRFST	VIHERGSPET
CATA_ARATH	ARGASAKGFF	EVTHDISNLT	CADFLRAPGV	QTPVIVRFST	VIHARGSPET
CATA_SOYBN	ARGASAKGFF	EVTHDISHLT	CADFLRAPGV	QTPVIVRFST	VIHERGSPET
CATA_PEA	ARGASAKGFF	EVTHDISHLT	CADFLRAPGV	QTPVIVRFST	VIHERGSPET
CATA_PHAUU	ARGASAKGFF	EVTHDVSHLT	CADFLRAPGV	QTPVIVRFST	VIHERGSPET
CAT1_MAIZE	ARGASAKGFF	EVTHDVSHLT	CADFLRAPGV	QTPVIVRFST	VVHERGSPET
CAT3_MAIZE	ARGASAKGFF	ESTHDVTSLT	CADFLRAPGV	RTPVIVRFSQ	VIPEPGSGRT
CAT2_MAIZE	RGASAKGFFE	VTHDITHLTC	AD.FLRAPGV	QTPVIVRFST	VIHERGSPET
CATA_ORYSA	ARGASAKGFF	ECTHDVTDIT	CADFLRSPGA	QTPVIVRFST	VIHERGSPET
CATA_IPOBA	ARGASAKGFF	EVTHDITHLT	CADFLRAPGV	QTPVIVRFST	VIHERGSPET
CAT1_LYCES	ARGASAKGFF	EVTHDISHLT	CADFLRAPGA	QTPVICRFST	VVHERGSPES
CATA_LISSE	ARGAGAHGKF	VTKKSMKKYT	KAQFLQEEGT	ETEVARFST	VIHQHSPET
CATE_ECOLI	ARGSAAHGYF	QPYKLSLSDIT	KADFLSDPNK	ITPVVRFST	VQGGAGSADT
CAT_BACFI	ARGFAAHGEF	QVYDSMKEFT	KAKFLQDPSV	KTPVIVRFST	VAGSKGSAET
CATV_BACSU	AKGAGAHGYF	EVTNDVTKYT	KAFLSEV GK	RTPLFIRFST	VAGELGSADT
CATA_LACSK	AKGAGRKYF	KVTKDMSAYT	KAAVFSGV GK	KTPLITRFSQ	VAGEAGYPTD
CATA_MICLU	AKGSGAFGVF	EVTEDVSSYT	KA.LVFEPGV	ETEVLRFST	VAGENGSPDT
BCA_STRVE	ARGAGAYGTF	TLTRDVSRT	RAAFLSEV GK	RTETFLRFST	VAGSLGAADA

CATA_HUMAN	VRDPRGFAVK	FYTEDGNWDL	VGNNTPIFFI	RDPII.....	.....
CATA_BOVIN	VRDPRGFAVK	FYTEDGNWDL	VGNNTPIFFI	RDALL.....	.....
CATA_MOUSE	VRDPRGFAVK	FYTEDGNWDL	VGNNTPIFFI	RDAIL.....	.....
CATA_RAT	VRDPRGFAVK	FYTEDGNWDL	VGNNTPIFFI	RDAML.....	.....
CATA_DROME	ARDPRGFAVK	FYTEDGVWDL	VGNNTPVFFI	RDPII.....	.....
CATT_YEAST	ARDPRGVSFK	FYTEWGNHDW	VFNNTPVFFL	RDAIK.....	.....
CATA_YEAST	VRDPRGFATK	FYTEEGNLDW	VYNNTPVFFI	RDPSK.....	.....
CATA_HANPO	ARDPRGFATK	FYTEDGNLDL	VYNNTPIFFI	RDPIK.....	.....
CATA_CANTR	ARDPRGFATK	FYTEEGNLDL	VYNNTPVFFI	RDPSK.....	.....
CATA_PENJA	VRDADAFAAK	FASAAALQEL	VGNNSPISFF	IFDLL.....	.....
CAT1_GOSHI	LRDPRGFAVK	FYTREGNFDL	VGNNFPVFFI	RDGMK.....	.....
CAT2_GOSHI	LRDPRGFAVK	FYTREGNFDL	VGNNFPVFFI	RDGMK.....	.....
CATA_ARATH	LRDPRGFAVK	FYTREGNFDL	VGNNFPVFFI	RDGMK.....	.....
CATA_SOYBN	LRDPRGFAVK	FYTREGNFDL	VGNNFPVFFV	RDGLK.....	.....
CATA_PEA	LRDPRGFAVK	FYTREGNYDL	VGNNFPVFFV	HDGMN.....	.....
CATA_PHAUU	LRDPRGFAVK	FYTREGNFDL	VGNNLPVFFV	RDGMK.....	.....
CAT1_MAIZE	LRDPRGFAVK	FYTREGNFDL	VGNNMPVFFI	RDGMKFPDMV	HAFKPNPKTN
CAT3_MAIZE	IRDARGFAVK	FYTREGNWDL	LGNNFPVFFI	RDGIK.....	.....
CAT2_MAIZE	LRDPRGFAVK	FYTREGNWDL	VGNNFPVFFI	RDGIK.....	.....
CATA_ORYSA	IRDPRGFAVK	FYTREGNWDL	LGNNFPVFFI	RDGIK.....	.....
CATA_IPOBA	IRDPRGFAVK	MYTRGGNWDL	VGNNFPVFFI	RDGTQ.....	.....
CAT1_LYCES	LRDIRGFAVK	FYTREGNFDL	VGNNVPVFFN	RDAKS.....	.....
CATA_LISSE	LRDPRGFSVK	FYTEEGNYDF	VGNNLPVFFI	RDAIK.....	.....
CATE_ECOLI	VRDIRGFATK	FYTEEGIFDL	VGNNTPIFFI	QDAHK.....	.....
CAT_BACFI	VRDARGFATK	FYTEEGNYDL	VGNNIPVFFI	QDAIK.....	.....
CATV_BACSU	VRDPRGFAVK	FYTEEGNYDI	VGNNTPVFFI	RDAIK.....	.....
CATA_LACSK	YRDVRGFAVK	FYTEEGNYDI	VGNNTPVFFV	NDPLK.....	.....
CATA_MICLU	WRDTRGFALR	FYTSEGNYDL	VGNNTPIFFL	RDPMK.....	.....
BCA_STRVE	VRDPRGWALK	FYTEEGNYDL	VGNNTPVFFI	KDAIK.....	.....

CATA_HUMAN	.....WDF	WSLRPESLHQ	VSFLFSDRGI	PDGHRHMNGY	GSHTFKLVNA
CATA_BOVIN	.....WDF	WSLRPESLHQ	VSFLFSDRGI	PDGHRHMDGY	GSHTFKLVNA
CATA_MOUSE	.....WDF	WSLRPESLHQ	VSFLFSDRGI	PDGHRHMNGY	GSHTFKLVNA
CATA_RAT	.....WDF	WSLCPESLHQ	VTFLFSDRGI	PDGHRHMNGY	GSHTFKLVNA
CATA_DROME	.....WDF	LTLRPESAHQ	VCILFSDRGT	PDGYCHMNGY	GSHTFKLVNA
CATT_YEAST	.....WDY	LTLNPESIHQ	ITYMFGDRGT	PASWASMNAY	SGHSFIMVNK
CATA_YEAST	.....	..NQVAIHQ	VMILFSDRGT	PANYRSMHGY	SGHTYKWSNK
CATA_HANPO	.....WDY	LTANDESLHQ	VMYLFSDRGT	PASYRTMNGY	SGHTYKWSNK
CATA_CANTR	.....WDY	LTTNEESVHQ	VMVLFSDRGT	PASYREMNGY	SGHTYKWSNK
CATA_PENJA	.....ESL	FVRLPESLHQ	SFFALAGFAA	VAHRHMNGY	GSHTFKLVNA
CAT1_GOSHI	.....LDF	FSHHPESLHM	FTFLFDDLVG	PQDYRHMEGS	GVNTYTLINK
CAT2_GOSHI	.....LDF	FSHHPESLHM	FTFLFDDIGV	PQDYRHMDGS	GVHTYTLINK
CATA_ARATH	.....LDF	FSHHPESLHM	FTFLFDDIGI	PQDYRHMDGS	GVNTYMLINK
CATA_SOYBN	.....LDF	FSHHPESLHM	FSFLFDDVGI	PQDYRHMDGF	GVNTYTLINK
CATA_PEA	.....LDF	FYNFPESLHM	FSFLFDDVGV	PQDYRHMDGF	GVNTYTLINK
CATA_PHAUU	.....LDF	FSHFPESLHM	FSFLFDDLVG	PQDYRHMDGF	GVNTYTLINK
CAT1_MAIZE	LQENWRIVDF	FSHHPESLHM	FTFLFDDVGI	PLNYRHMEGF	GVNTYSLINR
CAT3_MAIZE	.....FDF	LSHLPESLHT	FFFLFDHVG	PSDYRHMEGF	GVNTYTFVSA
CAT2_MAIZE	.....LDF	FSHHPESLHM	FSFLFDDVGI	PADYRHMDGS	GVHTYTLVSR
CATA_ORYSA	.....FDF	LSHHPESLHT	FFFLFDDVGI	PTDYRHMDGF	GVNTYTFVTR
CATA_IPOBA	.....LDY	LSHLPESLNT	FAWFYDDVGI	PTDYRHMEGF	GVHTFTMINK
CAT1_LYCES	.....LDF	FSFLPESLHT	FAFFYDDVCL	PTDYRHMEGF	GVHAYQLINK
CATA_LISSE	.....WDF	FSLTPEATTM	ITYLFSDEGT	PASYREIRGS	SVHAFKLINE
CATE_ECOLI	.....WDY	VSLQPETLHN	VMWAMSDRGI	PRSYRTMEGF	GIHTFRLINA
CAT_BACFI	.....WDF	IANNQESAHM	VMWAMSDRSI	PRSFRRMEGF	GVHTFRFVNE
CATV_BACSU	.....WDF	WLSLSPESLHQ	VTILMSDRGI	PATLRHMHG	GSHTFKWTNA
CATA_LACSK	.....WDF	WLSLSPESVHQ	VTILMSDRGI	PASYRMMHG	GSHTFKWVNA
CATA_MICLU	.....WDF	WTNNPESAHQ	VTYLMGPRGL	PRTWREMDGY	GSHTYLWVNA
BCA_STRVE	.....WDF	WGLSPESTHQ	VTWLFQDRGI	PASYRHMNGY	GSHTYQWNE

CATA_HUMAN	NGEAVYCKFH	YKTDQGIKNL	SVEDAARLSQ	EDPDYGIRDL	FNAIATGKYP
CATA_BOVIN	DGEAVYCKFH	YKTDQGIKNL	SVEDAARLAH	EDPDYGLRDL	FNAIATGNYP
CATA_MOUSE	DGEAVYCKFH	YKTDQGIKNL	PVGEAGRLAQ	EDPDYGLRDL	FNAIANGNYP
CATA_RAT	NGEAVYCKFH	YKTDQGIKNL	PVEEAGRLAQ	EDPDYGLRDL	FNAIASGNYP
CATA_DRÖME	KGEPYAKFH	FKTDQGIKNL	DVKTADQLAS	TDPDYSIRDL	YNRIKTKCFP
CATT_YEAST	EGKDTYVQFH	VLSDTGFETL	TGDKAAELSG	SHPDYNQAKL	FTQLQNGEKP
CATA_YEAST	NGDWHYVQVH	IKTDQGIKNL	TIEEATKIAG	SNPDYCCQDL	FEAIQNGNYP
CATA_HANPO	KGWVYVQVH	FIANQGVHNL	LDEEAGRLAG	EDPDHSTRDL	WEAIEKGDYP
CATA_CANTR	KGWVYVQVH	FISDQGIKTL	TNEEAGSLAG	SNPDYAQEDL	FKNIAAGNYP
CATA_PENJA	DGSVYCSKFW	YKADQQAEE	VWKDAEEVAA	EDVDYFRDLN	FQAEAAGRYP
CAT1_GOSHI	AGKAHYVKFH	WKPTCGVKCL	LEDEAIKVG	ANSHATQDL	YDSIAAGNYP
CAT2_GOSHI	AGKSHYVKFH	WKPTCGVKS	LEDEAIRVG	ANSHATQDL	YDSIAAGNYP
CATA_ARATH	AGKAHYVKFH	WKPTCGVKS	LEDEAIRLGG	TNHSATQDL	YDSIAAGNYP
CATA_SOYBN	AGKALYVKFH	WKTTSGEKSL	LDDEAIRVGG	SNHSATQDL	YDSIAAGNYP
CATA_PEA	AGKSVYVKFH	WKPTCGVKCL	LEEEAIQVGG	SNHSATKDL	YDSIAAGNYP
CATA_PHAUU	AGKAVYVKFH	WKTTSGVKCL	LEEEAIKVG	ANSHATQDL	HDSIAAGNYP
CAT1_MAIZE	DGKPHLVKFH	WKPTCGVKCL	LDNEAVTVGG	TCHSHATKDL	YDSIAAGNYP
CAT3_MAIZE	AGKAQYVKFH	WKPTCGERSI	LTDEEARVGG	RNHSHTQDLY	DSIAAEGSFP
CAT2_MAIZE	AGTVTYVKFH	WRPTCGVRS	MDDEAVRCGA	NHSATKDLT	DAIAAGNFPE
CATA_ORYSA	DAKARYVKFH	WKPTCGVSL	MDDEATLVGG	KNHSATQDL	YDSIAAGNYP
CATA_IPOBA	EGKANYVKFH	WKPTCGVKCL	LEEEAIRIGG	ENSHATQDL	YESIAAGNYP
CAT1_LYCES	EGKAHYVKFH	WKPTCGVKCM	SEEEAIRVGG	TNHSATKDL	YDSIAAGNYP
CATA_LISSE	EGKTVYVKLR	WVPKAGIVNL	STDQAAQIQ	KEFNHASRDL	YEAIENGDYP
CATE_ECOLI	EGKATFVRFH	WKPLAGKASL	VWDEAQKLTG	RDPDFHRRRL	WEAIEAGDFF
CAT_BACFI	EGKAHFVKFH	WKPVLGIHSL	VWDEAQKIAG	KDPDFHRRDL	WESIENGDYP
CATV_BACSU	EPEGVWIKYH	FKTEQGVKNL	DVNTAAKIAG	ENPDYHTEDL	FNAIENGDYP
CATA_LACSK	QGEQFVVFH	FKTNQGIHNL	SNELADELAG	KDLDYLQNDL	FDAIETGDYP
CATA_MICLU	EGAKHWVKYH	FISQEGVHNL	SNDEATQIAG	ENADFHRQDL	FEVIKGVFF
BCA_STRVE	AGEVFWVKYH	FKTDQGIKNL	TQDEANRLAG	EDPDHQDRDL	REAIERGDFP

CATA_HUMAN	SWTFYIQVMT	FNQAEFFPFN	PFDLTKVWPH	KDYPLIPVGK	LVLNRPVNY
CATA_BOVIN	SWTLYIQVMT	FSEAEIFPFN	PFDLTKVWPH	GDYPLIPVGK	LVLNRPVNY
CATA_MOUSE	SWTFYIQVMT	FKEAEFFPFN	PFDLTKVWPH	KDYPLIPVGK	LVLNKNPVNY
CATA_RAT	SWTFYIQVMT	FKEAEFFPFN	PFDLTKVWPH	KDYPLIPVGK	LVLNRPANY
CATA_DRÖME	SWTMYIQVMT	YEQAQKFKYN	PFDVTKVWSQ	KEYPLIPVGK	MVLDRNPKNY
CATT_YEAST	KFNVCYQVMT	PEQATKFRYS	VNDLTKIWP	KEFPLRKFGT	ITLTENVVNY
CATA_YEAST	SWTVYIQVMT	ERDAKLPFS	VFDLTKVWP	QGFPLRRVGR	IVLNENPLNF
CATA_HANPO	SWECYIQVMT	LEQSKLPFS	VFDLTKVWP	KDFPLRHFGR	FTLNENPKNY
CATA_CANTR	SWTCYIQVMT	EAQAKEAEFS	VFDLTKVWP	GKYPMRRFGK	FTLNENPKNY
CATA_PENJA	LWELASQVMT	FSDFEIDPFN	ENIPTKVVR	ESVPLIVDAE	LLLNRNPLNM
CAT1_GOSHI	EWKLFIQID	PDHEDKDFD	PLDVTKTWPE	DILPLQPVGR	LVLNKNIDNF
CAT2_GOSHI	EWKLFIQIMD	PLHEDRFDFD	PLDVTKTWPE	DIFPLQPMGR	MVLNKNIDNF
CATA_ARATH	EWKLFIQIID	PAEDKDFDFD	PLDVTKTWPE	DILPLQPVGR	MVLNKNIDNF
CATA_SOYBN	EWKLYIQTLD	PENEDRLDFD	PLDVTKTWPE	DVLPLQPVGR	MVLNKNIDNF
CATA_PEA	EWKLYIQTID	PAHEDRFEFD	PLDVTKTWPE	DIPLQPVGR	MVLNKNIDNF
CATA_PHAUU	EWKLFIQTID	PEHEDKDFDFD	PLDVTKTWPE	DIPLQPVGR	LVLNKNIDNF
CAT1_MAIZE	EWKLYIQTID	LDHEDKDFDFD	PLDVTKTWPE	DIPLQPVGR	MVLNKNVDNF
CAT3_MAIZE	EWTLYVQVMD	PAQQEQYDFD	PLDDTKTWPE	DLLPLRPVGR	LVLDRNVDF
CAT2_MAIZE	WTLYIQVMD	EMEDRLDDLD	PLDVTKTWPE	DTFPLQPVGR	LVLNKNIDNF
CATA_ORYSA	EWKLFVQVID	PEEEERFDFD	PLDDTKTWPE	DEVPLRPVGR	LVLNKNVDNF
CATA_IPOBA	EWKLYIQVMD	PDHEDRFDFD	PLDTTKIWPE	ELIPLQPVGR	MVLNKNIDNF
CAT1_LYCES	EWKLFIQTMD	PEDVDKDFDFD	PLDVTKTWPE	DLLPLIPVGR	LVLNKNIDNF
CATA_LISSE	EWDLVQVLD	PKDLNDFDN	PLDATKDFE	DVFPYEHVGT	MTLNRPDNI
CATE_ECOLI	EYELGFQLIP	EEDEFKDFDFD	LLDPTKLIPE	ELVPVQVGR	MVLNRPDNF
CAT_BACFI	EYELGVQLIS	EEDEFNFDFD	VLDPTKIWPE	EEVPVKIIGK	MTLNRPVDF
CATV_BACSU	AWKLYVQIMP	LEDANTYRFD	PFDVTKVWSQ	KDYPLIEVGR	MVLDRNPENY
CATA_LACSK	SWTVAVQLVL	MKMAELSPK	IFDVTKVISQ	KDYPLIEIGQ	MVLDRNPENN
CATA_MICLU	KWNLVQVQIMP	YSQKTYRFD	PFDLTKTISQ	ANYPRIKVG	NTLNRPKNF
BCA_STRVE	TWTVQVQIMP	AADAAGYRFD	PFDLTKVWPH	EDYPPVEIGT	LVLNRPENI

CATA_HUMAN	FAEVEQIAFD	PSNMPPGIEA	SPDKMLQGRL	FAYPDTHRHR	LG.PNYLHIP
CATA_BOVIN	FAEVEQLAFD	PSNMPPGIEP	SPDKMLQGRL	FAYPDTHRHR	LG.PNYLQIP
CATA_MOUSE	FAEVEQMAFD	PSNMPPGIEP	SPDKMLQGRL	FAYPDTHRHR	LG.PNYLQIP
CATA_RAT	FAEVEQMAFD	PSNMPPGIEP	SPDKMLQGRL	FAYPDTHRHR	LG.PNYLQIP
CATA_DROME	FAEVEQIAFS	PAHLVPGVEP	SPDKMLHGRL	FSYSDTHRHR	LG.PNYLQIP
CATT_YEAST	FQEIEQVAFS	PTNTCIPGIK	PSNDSVLQAR	LFSYPTDQRH	RLGANYQQLP
CATA_YEAST	FAQVEQAFA	PSTTVPYQEA	SADPVLQARL	FSYADAHRYR	LG.PNFHQIP
CATA_HANPO	YAETEQAIFS	PSHTVPGMEP	SNDPVLQSRL	FSYPDTHRHR	LG.PNYHQIP
CATA_CANTR	FAEVEQAAFS	PAHTVPHMEP	SADPVLQSRL	FSYADTHRHR	LG.TNYTQIP
CATA_PENJA	FAEVEQVFMD	VAAASKGADE	VEDPLIQ...	.....	.....
CAT1_GOSHI	FAENEQLAFC	PAIVVPGIYY	SDDKLLQTRI	FSYSDTQRHR	LG.QTYLQLP
CAT2_GOSHI	FAENEQLAFC	PSLIVPGIYY	SDDKLLQTRI	FSYSDTQRHR	LG.PNYLQLP
CATA_ARATH	FAENEQLAFC	PAIVVPGIHY	SDDKLLQTRV	FSYADTQRHR	LG.PNYLQLP
CATA_SOYBN	FAENEQLAFC	PAIVVPGVYY	SDDKLLQTRV	FSYADTQRHR	LG.PNYLQLP
CATA_PEA	FAENEQLAFC	PAIMLPGIYY	SDDKMLQTRV	FSYADSQRHR	LG.PNYLQLP
CATA_PHAUU	FAENEQLAFC	PAIVVPGVYY	SDDKMLQTRI	FSYADSQRHR	LG.PNYLLL
CAT1_MAIZE	FAENEQAIFC	PAISVPAIHY	SDDKLLQTRI	FSYADTQRHR	LG.PNYMLP
CAT3_MAIZE	LNENEQLAFG	PGLVVPGIYY	SDDKMLQCRV	FAYADTQRYR	LG.PNYMLP
CAT2_MAIZE	FAENEQLAFC	PGLIVPGIYY	SDDKLLQTRI	FSYSDTQRHR	LG.PNYLLL
CATA_ORYSA	FNENEQLAFG	PGLVVPGIYY	SDDKMLQCRV	FAYADTQRYR	LG.PNYMLP
CATA_IPOBA	FAENEMLAM	PAHIVPGIYF	SDDKMLQARV	FAYADTHRHR	LG.PNYMLP
CAT1_LYCES	FAENEQLAFN	PGHIVPGIYY	SEDKLLQTRI	FAYADTQRHR	IG.PNYMQLP
CATA_LISSE	FAETESVGFN	PGLVVPGLDF	SEDKLLQTRI	FSYSDTQRHR	VG.PNYLQLP
CATE_ECOLI	FAENEQAFAH	PGHIVPGLDF	TNDPLLQGR	FSYTDQISR	LGGPNFHEIP
CAT_BACFI	FAETEQAFAH	PGHVVPGLDF	TNDPLLQGR	FSYTDQLIR	LGGPNFHELP
CATV_BACSU	FAEVEQATFS	PGLVVPGLDF	SPDKMLQGRL	FAYHDAHRYR	VG.ANHQALP
CATA_LACSK	FEDIQELAFS	PANLVPGIEA	SPDKMLQGRL	FGYKDAERYR	LG.ANYEQLP
CATA_MICLU	FAEIESAAFS	PSNTVPGIGL	SPDRMLLGRA	FAYHDAQLYR	VG.AHVNQLP
BCA_STRVE	FAEVEQSIFS	PAHFVPGIGP	SPDKMLQGRL	FAYGDAHRYR	VG.INADHLP

CATA_HUMAN	VNCPYRARVA	NYQRDG.PMC	MQDNQGGAPN	YYPNSFGAPE	QQPSALEHSI
CATA_BOVIN	VNCPYRARVA	NYQRDG.PMC	MMDNQGGAPN	YYPNSFSAPE	HQPSALEHRT
CATA_MOUSE	VNCPYRARVA	NYQRDG.PMC	MHDNQGGAPN	YYPNSFSAPE	QORSALEHSV
CATA_RAT	VNCPYRARVA	NYQRDG.PMC	MHDNQGGAPN	YYPNSFSAPE	QQG.....
CATA_DROME	VNCP.YKVKI	ENFQRDGMN	VTDNQDGMN	YFPNSFNGPQ	ECP.....
CATT_YEAST	VNRP.....	.....	.....	.....	.....
CATA_YEAST	VNCP.YASKF	FNPAIRDGPM	NVNGNFGSEP	.....	.....
CATA_HANPO	VNCP.LKSGS	FNPINRDGPM	CVDGNLGGTP	.....	.....
CATA_CANTR	VNCPVTGAVF	NPHMRD.GAM	NVNGNLGNHP	.....	.....
CATA_PENJA	.....	.....	.....	.....	.....
CAT1_GOSHI	ANAP.KCAHH	NNHHEG.FMN	FMHRDEEINY	.FPSRYDPVR	HAEMFPIPPA
CAT2_GOSHI	ANAP.KCAHH	NNHHEG.FMN	FMHRDEEVNY	.FPSRYDPVR	HAEKHIPST
CATA_ARATH	VNAP.KCAHH	NNHHEG.FMN	FMHRDEEVNY	FPSRYDQVRH	AEKY.PTPPA
CATA_SOYBN	ANAP.KCAHH	NNHHDG.FMN	FMHRDEEVNY	FPSRYDPVRH	AEKV.PVPPR
CATA_PEA	VNAP.KWSSH	NNHHEG.FMN	AIHRDEEVNY	FPSRHDVVRH	AERV.PIPTT
CATA_PHAUU	ANAP.KSAHH	NNHHEG.FMN	FIHRDEEVNY	FPSRYDPVRH	AEKF.PIPPA
CAT1_MAIZE	VNAP.KCAHH	NNHHDG.FMN	FMHRDEEVNY	.FPSRDFPAR	HAEKVIPPR
CAT3_MAIZE	VNAP.RCGTH	NNHYDG.AMN	LMHRDEEVDY	...HARRCGR	AAPT.PLPPR
CAT2_MAIZE	ANAP.KCAHH	NNHYDG.SMN	FMHRHEEVDY	FPSRYDAVRN	APRY.PIPTA
CATA_ORYSA	VNAP.KCAHH	NNHYDG.AMN	FMHRDEEVDY	YPSRHAPLRH	APPT.PITPR
CATA_IPOBA	VNAP.KCAHH	NNSYDG.YMN	FVHRDEEVDY	FPSKFDNTRN	AERFPT.PLR
CAT1_LYCES	VNAP.KCGHH	NNHRDG.AMN	MTHRDEEVDY	.LPSRDFPCR	PAEQYIPSC
CATA_LISSE	INSP.KTPVD	NNQRDG.QMP	FKQQTSSINY	EPNSYDTEPK	ENPA.....
CATE_ECOLI	INRP.TCPYH	NFQRDG.MHR	MGIDTNPANY	.....	.....
CAT_BACFI	INRP.VCPFH	NNQRDG.YGR	QTINKGQVSY	.....	.....
CATV_BACSU	INRA.RNKVN	NYQRDG.QMR	FDDNNGGSVY	YEPNSFGGPK	ESPEDKQAA
CATA_LACSK	VNRP.KVPVH	NYERDG.AMA	QNQATGVNYE	.....	.....
CATA_MICLU	VNSP.DDATH	NYAFEG.EMW	EDHTGNRSTY	VPNSDGNSWS	NEVGPT....
BCA_STRVE	VNRP.HATEA	RTHSRD.GFL	YDGRHKGAKN	YEPNSFGGPV	QTDRL....

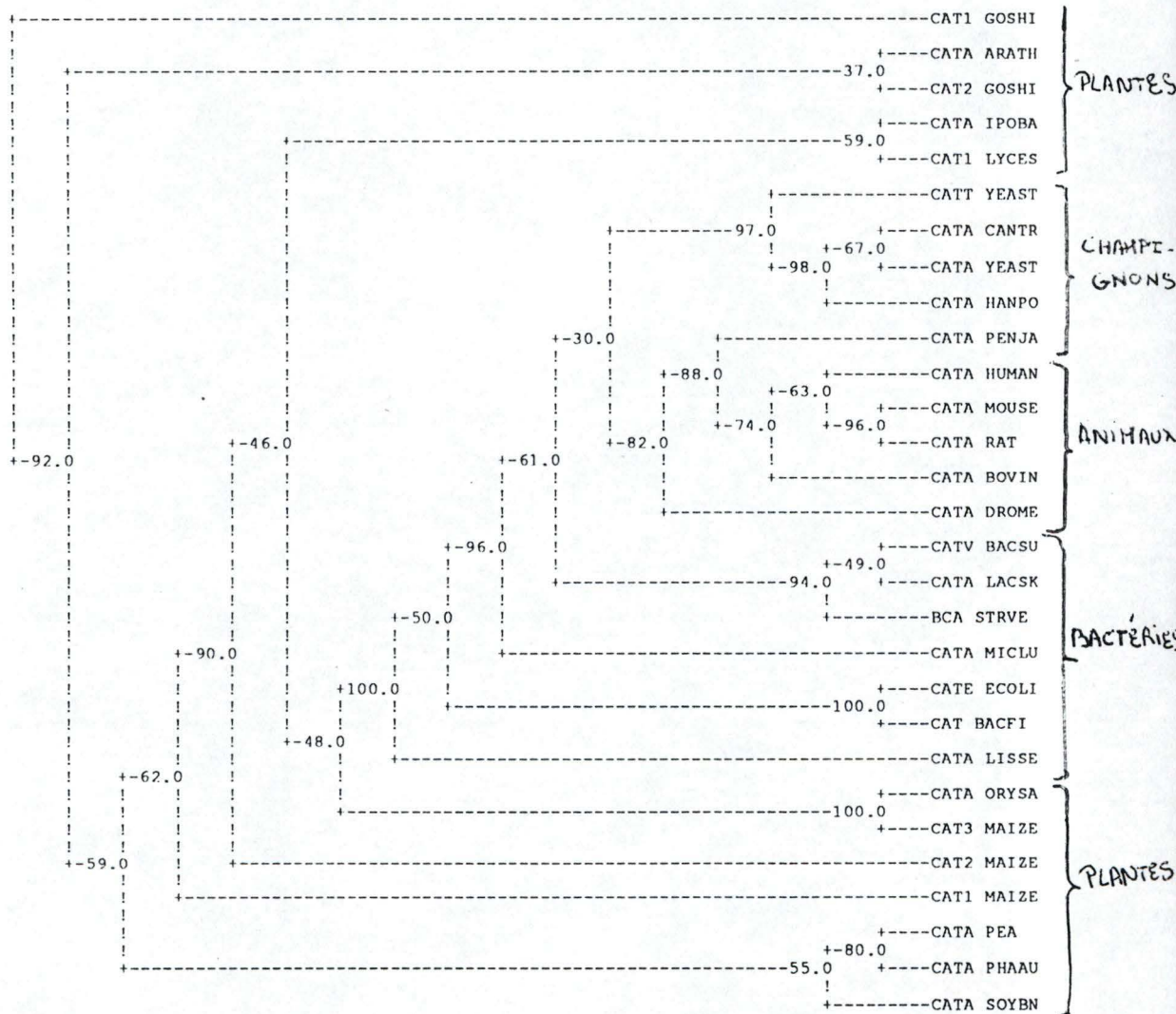
CATA_HUMAN	QYSGEVRRFN	TANDDNVTQV	RAFYVNVLNE	EQRKRLCENI	AGHLKDAQIF
CATA_BOVIN	HFSGDVQRFN	SANDDNVTQV	RTFYLKVLNE	EQRKRLCENI	AGHLKDAQLF
CATA_MOUSE	QCAVDVKRFN	SANEDNVTQV	RTFYTKVLNE	EERKRLCENI	AGHLKDAQLF
CATA_RAT	.....	...DNVTQV	RTFYTKVLNE	EERKRLCENI	ANHLKDAQLF
CATA_DROME	.....	...DNFGQV	TDFWVHVLDK	CAKKRLVQNI	AGHLSNASQF
CATT_YEAST	.....	.....	.....	.....	.....
CATA_YEAST	.....	.....	.....	.....	.....
CATA_HANPO	.....	.....	.....	.....	.....
CATA_CANTR	.....	.....	.....	.....	.....
CATA_PENJA	.....	.....	.....	.....	.....
CAT1_GOSHI	VCTGRREKCI	IEKENNFKQP	GERYRSAAD	RQERFI....	.....
CAT2_GOSHI	VLSGKREKCI	IGKENNFKQP	GERYRSFSAD	RQERFI....	.....
CATA_ARATH	VCSGKREKCI	IEKENNFKQP	GERYRTFTPE	RQERFI....	.....
CATA_SOYBN	ILGGKREKCM	IEKENNFKQP	GERYRSWPSD	RQERFV....	.....
CATA_PEA	HLSARREKCN	IPKQNHFKQA	GERYRTWAPD	RQERFL....	.....
CATA_PHAUU	VFSGRREKIA	IEKENNFKQA	GERFRSWAPD	RQDRFI....	.....
CAT1_MAIZE	VLTRCREKCI	IQKENNFKQA	GERYRSFDPA	RQDRFI....	.....
CAT3_MAIZE	PVAGRREKAT	IRKPNDFKQP	GERYRSWDAD	RQDRFV....	.....
CAT2_MAIZE	HIAGRREKTV	ISKENNFKQP	GERYRAMDPA	RQERFI....	.....
CATA_ORYSA	PVVGRRQKAT	IHKQNDFKQP	GERYRSWAPD	RQERFI....	.....
CATA_IPOBA	IVTGQRDKCV	IEKENNFKQP	GDRYRSWAPD	RQDRFI....	.....
CAT1_LYCES	VLNGRRTNCV	IPKENNFKQA	GERYRSWEPD	RQDRFI....	.....
CATA_LISSE	.....	...PNNFGH	AKEVWKRYSD	AERAALVKNI	VDDWEGVRED
CATE_ECOLI	.....	.....	.....	.....	.....
CAT_BACFI	.....	.....	.....	.....	.....
CATV_BACSU	PVQGIADSVS	YDHYDHYTQA	GDLYRLMSED	ERTRLVENIV	NAMKPVEKEE
CATA_LACSK	.....	...DYYSAA	GKLYRLLSAD	EQTRLIENIR	MNLGQVTKPE
CATA_MICLU	.....	...NNFGEA	GTLTREVFSN	EERNNFVQTV	AGALKGVRSN
BCA_STRVE	.....	...DDFTQA	GDLYRLMSED	EKGRLIDNLS	GFIKAVSRDD

CATA_HUMAN	IQKKAVKNFT	EVHPDYGSHI			
CATA_BOVIN	IQKKAVKNFS	DVHPEYGSRI			
CATA_MOUSE	IQKKAVKNFT	DVHPDYGARI			
CATA_RAT	IQRKAVKNFT	DVHPDYGARV			
CATA_DROME	LQERAVKNFT	QVHADFGRML			
CATT_YEAST	.....	.....			
CATA_YEAST	.....	.....			
CATA_HANPO	.....	.....			
CATA_CANTR	.....	.....			
CATA_PENJA	.....	.....			
CAT1_GOSHI	.....	.....			
CAT2_GOSHI	.....	.....			
CATA_ARATH	.....	.....			
CATA_SOYBN	.....	.....			
CATA_PEA	.....	.....			
CATA_PHAUU	.....	.....			
CAT1_MAIZE	.....	.....			
CAT3_MAIZE	.....	.....			
CAT2_MAIZE	.....	.....			
CATA_ORYSA	.....	.....			
CATA_IPOBA	.....	.....			
CAT1_LYCES	.....	.....			
CATA_LISSE	IKIRNLRNFY	QVEPEFAERV			
CATE_ECOLI	.....	.....			
CAT_BACFI	.....	.....			
CATV_BACSU	IKLRQIEHFY	KADPEYGKRV			
CATA_LACSK	IQIREVKQFY	QADPEYGRRV			
CATA_MICLU	VEAEAFVYWK	LVNATNGERI			
BCA_STRVE	IAERAIGNFR	RADEDFGKRL			



## Méthode de "neighbor-joining"

Les matrices de distances sont utilisées pour construire un arbre phylogénétique (méthode du neighbor-joining) (figure 41).



**Figure 41: méthode de neighbor-joining**

Arbre consensus: le numéro indiqué aux embranchements indique le nombre de fois que les groupements situés à droite de l'embranchement considéré ont été trouvés. Ce nombre est exprimé en pourcents.

Cette figure nous montre clairement que les règnes importants tels que les animaux, les plantes, les champignons et les eubactéries tombent dans des groupes différents. De façon intéressante, comme nous l'avons mentionné ci-dessus, la catalase de *Penicillium* est la seule exception et se regroupe avec les animaux plutôt qu'avec les champignons. De plus, également très intéressant, nous remarquons que toutes les catalases animales ou fongiques se regroupent ensemble et sont séparées des catalases de plantes par un groupe contenant les catalases procaryotiques.

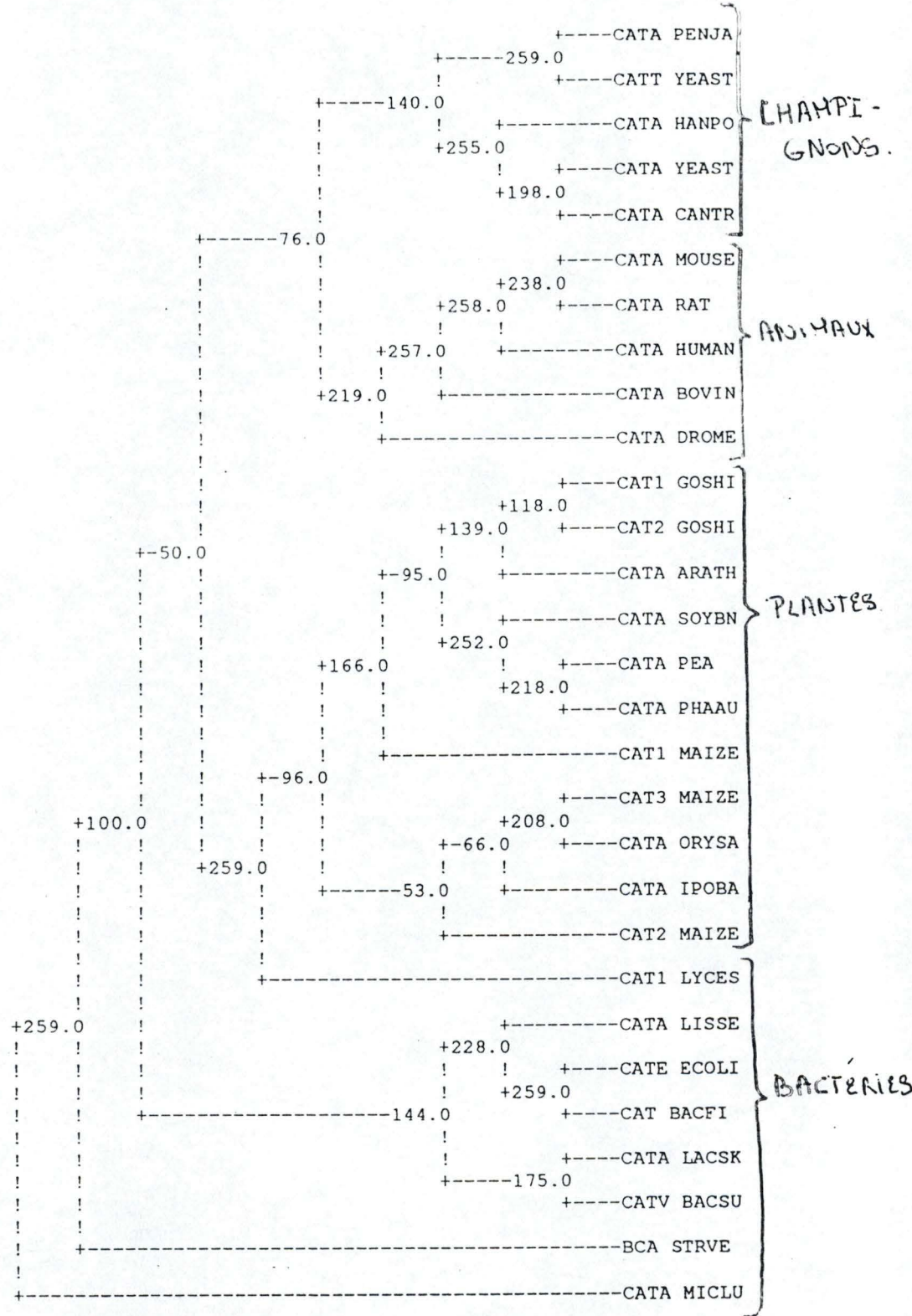
L'alignement multiple en format MSF fut d'abord converti en un format séquentiel Phylip, puis tous les points (".") dans le fichier MSF furent traduits en ("-"). Le fichier fut alors traité par le programme SEQBOOT, qui crée 100 alignements de séquences échantillonnées au hasard. Chacun de ces alignements est alors soumis au programme PROTDIST, qui calcule toutes les distances entre les séquences alignées par paire, après correction pour les mutations inverses, en tant que valeurs PAM et ce en utilisant la formule de Kimura plutôt que la matrice PAM afin d'augmenter la vitesse de traitement.

Cent matrices de distance résultant des calculs sont utilisées pour la construction d'un arbre phylogénétique en utilisant la méthode du neighbor-joining. Les cent arbres ainsi obtenus furent alors soumis au programme consensus pour construire l'arbre le plus probable des 100 obtenus précédemment.

#### Méthode de "parsimony :

De plus, directement à partir des séquences protéiques alignées, une analyse de parcimonie maximum, effectuée en utilisant le programme PROTPARS (logiciel Phylip) fut réalisée. Une discussion sur la fiabilité des méthodes de reconstruction des différents arbres peut être trouvée dans Hasegawa et Fujiwara, 1993. Toutes les analyses phylogénétiques furent réalisées sur un ordinateur R4000 SILICON GRAPHICS Indigo.

Quand une analyse de "parsimony" protéique est réalisée sur les 29 séquences alignées, un **résultat frappant et différent** est obtenu (figure 42).



Arbre consensus: le numéro indiqué aux embranchements indique le nombre de fois que les groupements situés à droite de l'embranchement considéré ont été trouvés. Ce nombre est exprimé par rapport à 259.

Figure 42: arbre consensus réalisé après une analyse en bootstrap de 100 répliqués qui conduisirent à 259 arbres en utilisant la méthode de "parsimony" des séquences de catalase alignées.

Le *Penicillium* se regroupe alors avec les autres catalases fongiques comme on pouvait s'y attendre dû au fait que le *Penicillium* appartient au règne des champignons. Le fait que *Penicillium* se regroupe avec les levures est bien marqué et se réalise avec 100 % des arbres ( 259 sur 259).

Contrairement aux résultats obtenus avec la méthode de distance, cette méthode montre que toutes les catalases eucaryotiques contenant les animaux, les plantes et les champignons forment un seul groupe alors que les procaryotes forment un autre groupe unique ( bien que ce ne soit que 50 sur 259).

# DISCUSSION

## DISCUSSION

On a étudié le parasite d'insecte *Crithidia fasciculata*, car ce Kinétoplastida présente la particularité unique de contenir de la catalase contrairement à *Trypanosoma* et *Leishmania*.

*Crithidia fasciculata* offre en plus de sa facilité de culture un enzyme (la catalase) hautement conservée, ce qui explique le fait que l'on trouve des clones positifs malgré le caractère hétérologue de la sonde utilisée dans le criblage de la banque notamment.

Rappelons que les clones positifs obtenus lors du criblage des deux banques n'ont été identifiés que pour la banque d'ADN complémentaire de *Crithidia fasciculata*. Nous pouvons expliquer ceci par le fait que c'est de l'ADN complémentaire. Celui-ci est réalisé à partir d'un ensemble d'ARN messagers épissés (ne contenant donc que les régions codantes): la banque d'ADN complémentaire est donc "enrichie" en gènes alors que la banque génomique contient un tas de régions non codantes telles que les régions intergéniques par exemple.

Remarque: les introns dans la banque de *Crithidia fasciculata* ne sont pas à mentionner dans les régions non codantes car les introns sont inexistantes chez les trypanosomatidés.

Nous pouvons donc expliquer l'absence de clones positifs lors du criblage de la banque d'ADN génomique de *Crithidia fasciculata* par le fait que nous avons affaire à une banque où les chances de "trouver le gène" sont plus faibles et que nous avons affaire en plus à une sonde hétérologue.

Ces deux points combinés diminuent fortement les chances d'avoir une hybridation avec la banque d'ADN génomique par rapport à la banque d'ADN complémentaire.

Ces clones positifs repiqués ont alors été digérés par différents enzymes de restriction afin de les cloner. Avant le clonage, les fragments obtenus par digestion avec ces différents enzymes ont été de nouveau hybridés avec la sonde.

On a alors remarqué la digestion complète des bandes dans le cas de digestion par *Bam*HI, *Eco*RI, *Sac* I et *Sal* I. Ce fait étrange s'explique probablement par le fait que les tampons spécifiques pour chaque enzyme de restriction ont des compositions différentes.

Dans le cas de *Pst* I et de *Kpn* I, les concentrations en sel, etc sont inadéquates pour l'activation des DNAses qui seraient restées dans la préparation de l'ADN (protéines contaminantes).

Néanmoins, le fait de trouver des bandes hybridant pour les digestions par *Pst* I et *Kpn* I est fort encourageant.

Dans des travaux futurs (le mémoire sera continué au printemps), il restera à isoler les fragments ayant donné un résultat positif à l'hybridation et à les séquencer.

Ces bandes seront alors insérées dans des vecteurs pour le clonage dans les sites de restriction *Pst* I et *Kpn* I. Le séquençage se fera alors à partir de primers complémentaires d'une région du plasmide de part et d'autre de l'insert.

Le gène de la catalase mesurant 2.1 kb et les digestions positives mesurant 3 kb, 4.1 kb et 3.8 kb, il est évident qu'une partie importante de ces fragments n'est pas le gène. Après un premier séquençage et un alignement de séquences, il restera à réaliser une exonucléase 3' si les résultats de comparaison de séquence ont donné des résultats négatifs.

Cet enzyme permet la digestion du plasmide dans la direction 3'. On obtient donc des inserts raccourcis. On est donc plus en avant dans la bande ayant hybridé. On reclone et on reséquence.

Une fois le gène de catalase trouvé, on réalisera une comparaison de séquence et on créera un arbre phylogénétique.

L'intérêt de cette séquence est que l'on va apporter une information concernant les trypanosomatidés, présentant l'avantage d'être apparus très tôt dans l'évolution avant la séparation des animaux, plantes et champignons.

Les résultats observés dans le cas des deux études phylogénétique ("parsimony" et "neighbor-joining") sont assez frappants. Dans le cas de la méthode de neighbor-joining, la catalase de *Penicillium janthinellum* est regroupée avec les animaux alors qu'il a été démontré que ce dernier était un champignon. Par contre, dans le cas de la construction d'un arbre phylogénétique par la méthode de "parsimony", la catalase de *Penicillium janthinellum* est clairement regroupée avec les champignons.

Quelle méthode est la plus fiable?

Si l'on regarde le tableau des pourcentages d'identité, le *Penicillium janthinellum* présente un pourcentage d'identité assez faible avec les catalases des autres organismes. Vu ce faible pourcentage, il se pourrait que l'enzyme identifiée comme étant une catalase n'en soit pas une. Dès lors, la méthode regroupant le *Penicillium janthinellum* avec les autres champignons semble plus fiable (méthode de "Parsimony").

Grâce à un arbre construit avec cette méthode et impliquant la catalase de trypanosomatidés, on aura ainsi une idée sur l'acquisition de la catalase par les animaux supérieurs, pouvant ainsi résoudre le problème de sa localisation.



Plusieurs auteurs ont décrit une catalase glycosomale et cytosolique chez *Crithidia fasciculata* (Eeckhout, 1972; Muse & Roberts, 1973).

Nos résultats concernant la courbe de croissance en absence et en présence d'hémine confirment les données de Lwoff (Lwoff, 1940).

Cet auteur montra en effet que l'hémine est totalement nécessaire aux flagellés d'insecte, aussi bien qu'aux trypanosomes qui ont perdu le pouvoir de synthèse à force de vivre dans un environnement riche en hème (sang de l'hôte). L'hémine est donc indispensable à la croissance cellulaire. Ceci s'observe dans la figure 22.b où après deux jours, la croissance est à son maximum. La mort des cellules survient plus rapidement qu'en présence d'hémine où la croissance maximum des cellules s'observe après quatre jours. En effet, l'hémine fait partie de la catalase (Eeckhout, 1972).

Ces résultats ne confirment qu'en partie l'effet de l'hémine sur la croissance des parasites: en effet, dans le milieu de culture, nous avons ajouté du sérum foetal de veau qui contient du fer, de la transférine et de nombreux autres facteurs de croissance. Les conditions du milieu ne sont pas assez strictes que pour tester la dépendance des parasites vis-à-vis de l'hémine. On ne peut donc pas attribuer la totale dépendance des parasites à cette dernière puisque ce sont peut-être des éléments du sérum qui deviennent en quantité limitante au cours de la croissance si le milieu n'est pas renouvelé.

Ceci s'ajoutant à l'absence d'hémine entraîne donc une décroissance plus rapide de la courbe comme on peut l'observer à la figure 23.b.

Nos expériences, notamment après deux jours de croissance montrent une diminution de l'activité de la catalase alors que la croissance reprend (figure 23.b): ceci viendrait confirmer l'hypothèse de Y. Eeckhout (1972) sur le rôle de la catalase comme stock d'hémine qui serait utilisée dans la synthèse d'autres hémoprotéines telles les cytochromes nécessaires à la division cellulaire.

Au cours du vieillissement (culture de deux jours, culture de trois jours), nous observons une diminution de l'activité de la catalase, ce qui confirme les résultats d'Eeckhout (1972). Néanmoins, nos expériences ne nous permettent pas de dire si c'est la diminution de l'activité de la catalase (faute d'hémine) au cours du temps qui entraîne le vieillissement des cellules ou si ce sont les cellules qui, vieillissantes (pour des raisons de dysfonctionnement métabolique) ont des difficultés dans la synthèse de cet enzyme. Néanmoins, le fait d'utiliser la catalase comme stock d'hémine pour favoriser la synthèse d'autres enzymes par rapport à la catalase tendrait à prouver une utilité secondaire de cette dernière chez *Crithidia fasciculata*.

Par nos expériences de fractionnement, on n'a pas d'évidence d'une catalase peroxysomale mais essentiellement cytosolique.

Les effets des inhibiteurs ont été étudiés mais aucune différence de sensibilité de la catalase au cours du vieillissement cellulaire (du moins sur un jour) ni l'existence de la catalase sous forme d'isoenzymes n'ont pu être montrés, ce qui confirme les résultats du fractionnement où 90% de l'activité de la catalase se localise dans la fraction soluble, bien qu'une composante peroxysomale puisse exister, vu la difficulté d'obtenir des cellules aux organites intacts.

Néanmoins, nous avons mis en évidence l'action inhibitrice du Triton X100, auparavant utilisé dans le dosage de la catalase.

Cet inhibiteur (détergent) ne pourrait-il agir en déstabilisant la structure quaternaire (tétramérique) de la catalase en exposant les sites hydrophobes de la protéine à la phase aqueuse ?

# CONCLUSION

## CONCLUSION.

De cette étude, il s'est révélé que la catalase chez *Crithidia fasciculata* était cytosolique, comme c'était le cas chez *Crithidia luciliae* ( Eeckhout, 1973).

La mise au point des conditions de dosage nous a permis de définir un nouveau test de dosage où:

- la concentration en eau oxygénée est doublée (20 mM).
- le pH est de 7.4.
- le Triton X100 est absent.
- la concentration en EDTA est faible.
- la manipulation est très rapide.

Par manque de temps, aucune séquence de catalase n'a pu être obtenue et ajoutée à l'analyse phylogénétique.

Néanmoins, le fait d'avoir trouvé des bandes hybridant (digestion par *Pst* I et *Kpn* I) avec la sonde d'ADN complémentaire du gène codant pour la catalase de *Crithidia fasciculata* nous donne de bonnes indications quant à la présence du gène de la catalase.

Même sans cette séquence, nous avons quand même réalisé une analyse phylogénétique sur 29 séquences au lieu de 20 (Von Ossowski, 1993).

Cela fut très utile car nous avons réalisé que les interprétations sont très difficiles, car fortement dépendantes du programme employé et que l'utilisation de l'un ou de l'autre était à discuter.

# BIBLIOGRAPHIE

## REFERENCES.

Amersham (1985)

Membrane transfer and detection methods

Colony/plaque blotting, 18-19

Amersham International PLC, London, GB.

Amersham (1986)

cDNA cloning system lambda gt 10

Amersham International PLC; London; GB.

Brun R. & Schönenberger M (1979)

Cultivation and *in vitro* cloning of procyclic forms of *Trypanosoma brucei* in a semi-defined medium.

Acta Trop. **36**, 289-292.

Cassier L. & Fritsch A. (1992)

L'ultracentrifugation analytique.

Le technoscope de biofutur **108**,1-8.

Cavalier-Smith T. (1990)

Symbiotic origin of peroxysomes.

Endocytobiology IV.

Nardon P., Grenier M. & Margulis L., Eds. 612p

Chance B., Sies H. & Boveris A. (1979)

Hydroperoxydes metabolism in mammalian organs.

Physiol. Rev. **59**, 3, 527-589.

Darnell J., Lodish H. & Baltimore D. (1989)

La cellule: biologie moléculaire.

Edition Décarie-Vigot, p 1-1189.

de Duve C. & Baudhuin P. (1966)

Physiol. rev., **46**, 323-357.

de Duve Ch. (1982)

Ann. N.Y. Acad. Sci. **386**, 1-4.

de Hoop M.J. & Ab G. (1992)

Import of proteins into peroxysomes and other microbodies.

Biochem. J. **286**, 657-669.

Docampo R. (1990)

Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs.

Chem. Biol. Interact. **73**, 1, 1-27.

Eeckhout Y. (1972)

Studies on acid hydrolases and on catalase of the trypanosomatid *Crithidia luciliae*.  
in Comparative biochemistry of parasites

Van den Bossche H. Eds. pp 297-315, Academic Press NY.

Efron B. (1982)

The jack-knife, the bootstrap and other resampling plans.

Society for Industrial and Applied Mathematics, Philadelphia.

Felsenstein J. (1984)

Distance methods for inferring phylogenies: a justification.

Evolution **39**, 16-24.

Felsenstein J. (1985)

Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap.

*Evolution* **39**, 783-791.

Felsenstein J. (1993)

PHYLIP manual, version 3.5

Fernandes A.P., Nelson K. & Beverley S.M. (1993)

Evolution of nuclear ribosomal RNAs in kinetoplastid protozoa: perspectives on the age and origins of parasitism.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**, 11608-11612.

Fitch M.W. & Margoliash E. (1967)

The construction of phylogenetic trees.

*Science* **155**, 279-284.

Fothergill-Gilmore L.A. & Michels P.A.M. (1993)

Evolution of glycolysis.

*Prog. Biophys. Mol. Biol.* **59**, 105-235.

Gilbert D.G. (1993)

Hasegawa M. & Fujiwara M. (1993)

Relative efficiencies of the maximum likelihood, maximum parsimony, and neighbor-joining methods for estimating protein phylogeny.

*Molecular Phylogenetics and Evolution* **2**, 1-5.

Hiltunen J.K., Filppula S.A., Häyrynen H.M., Koivuranta K.T., Hakkola E.H. (1993)

Peroxisomal beta-oxidation of polyunsaturated fatty acids.

*Biochimie* **75**, 175-182.



Kimura M. (1983)

The neutral theory of molecular evolution.

Cambridge University Press, Cambridge.

Léger L. (1904)

Sur un nouveau flagellé parasite des tabanidés.

Comptes rendus des séances de la Société de Biologie **56**, 615-617

Levine N.D. (1980)

A newly revised classification of the *Protozoa*.

J. Protozool. **27**, 1, 37-58.

Lewin B. (1990)

Genes IV

Oxford University Press; Oxford, New-York, Tokyo, Melbourne

Cell Press, Cambridge.

Lwoff M. 1940

Recherche sur le pouvoir de synthèse des flagellés trypanosomidés.

Monographie de l'Institut Pasteur, 213 pp. Masson, Paris.

Ma M. & Eaton J.W. (1992)

Multicellular oxydant defense in unicellular organisms.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **89**, 7924-7928.

Maniatis T., Fritsch E.F. & Sambrook J. (1982)

Molecular cloning. A laboratory manual.

Cold Spring Harbor Laboratory; New York; USA; **520** pp

Mannaerts G.P. & Van Veldhoven P.P. (1993)

Metabolic Pathways in mammalian Peroxisomes.

Biochimie **75**, 147-158.

Mc Ghee R.B. & Cosgrove W.B. ( 1980 )

Biology and physiology of the lower *Trypanosomatidae*.

Microbiol. Rev. **4**, 1, 140-173.

Michels P.A.M. & Opperdoes F.R. (1991)

The evolutionary origin of glycosomes.

Parasitol. today **7**, 5, 105-109.

Michels P.A.M. (1988)

Compartmentation of glycolysis in trypanosomes: a potential target for new trypanocidal drugs.

Biol. of the Cell. **64**, 157-164.

Middelkoop E., Strijland A. & Tager J.M. (1991)

Does Aminotriazole inhibit import of catalase into peroxysomes by retarding unfolding?

FEBS, **279**, 79-82.

Misset O. & Opperdoes F.R. (1984)

Simultaneous purification of hexokinase-class I fructobiphosphate aldolase, triose phosphate isomerase and phosphoglucose isomerase from *Trypanosoma brucei*.

Eur. J. Biochem., **144**, 475-483

Molina Portela M.P., de Pahn E.M., Galeffi C., Stoppani A.O. (1991)

Effect of lipophilic ortho-naphto-quinones on the growth of and production of peroxydes by *Leptomonas seymouri* and *Crithidia fasciculata*.

Rev. Argent. Microbiol **23**, 1, 1-14.

Muse K.E. & Roberts J. F. (1973)

Microbodies in *Crithidia fasciculata*.

Protoplasma **78**, 343-348.

Nichols S.P. & Schonbaum G.R. (1963)

The Enzymes. **8** part B, 201-204

Second edition.

Opperdoes F.R. (1994)

Cours de parasitologie.

Opperdoes F.R., 1990

The glycosomes of trypanosomes and leishmania.

Biochemical Society Transactions, **18**, 729-732.

Opperdoes F.R., Baudhuin P., Coppens I, De Roe C., Edwards C.W., Weijers P.J.  
& Misset O. (1984)

Purification, morphometric analysis and characterization of the glycosomes  
(microbodies) of the protozoan hemoflagellates *Trypanosoma brucei*.

J. Cell. Biol. **98**, 1178-1184.

Opperdoes F.R. & Borst P. (1977)

Localisation of nine glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in  
*Trypanosoma brucei*: the glycosome.

FEBS Letters **80**, 360-364.

Opperdoes F.R. (1985)

Biochemical peculiarities of trypanosomes, african and south american.

Br. Med. Bull. **41**, 130-136.

Opperdoes F.R. (1987)

Compartmentation of carbohydrate Metabolism in Trypanosomes.

Ann. Rev. Microbiol. **41**, 127-151.

Opperdoes F.R. (1988)

Glycosomes may provide clues to the import of peroxysomal proteins.

T.I.B.S. **13**, 7, 255-260.

Pays E. (1990)

L'expression des gènes d'antigène variable chez les trypanosomes africains.

Médecine / Sciences **6**, 510-516.

Penketh P.G., Kennedy W.P., Patton C.L. & Sartorelli A.C. (1987)

Trypanosomatid hydrogen peroxyde metabolism.

FEBS Letters **221**, 2, 427-431.

Promega notes (1987)

Use of a recombinant-deficient *E. coli* strain for more complete genomic libraries

Promega notes **11**; Promega; Madison, WI, USA

Qiagen protocole (1990)

Plasmid midi and maxi preparations.

The Qiagenologist: application protocols, 13

Qiagen protocole (1990)

Qiaex agarose gel extraction protocol.

The Qiagenologist: application protocols, 46-47

Quan F., Korneluk R.G., Tropak M.B. & Gravell R.A. (1986)

Isolation and characterisation of the human catalase gene

Nucl. Ac. Res. **14**, 5321-5335.

Rawn J.D. (1990)

Traité de Biochimie.

Eds De Boeck Université, p 1-1146.

- Rigby P.W.J., Dieckmann M., Rhodes C. & Berg P. (1977)  
Labelling desoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I.  
J. Mol. Biol., **113**, 237-251.
- Saitou N.M. & Nei M. (1987)  
The neighbor-joining methods: a new method for reconstructing phylogenetic trees.  
J. Mol. Evol. **4**, 406-426.
- Sies H. (1986)  
Biochemistry of oxydative stress.  
Angew. Chem. Int. Ed. Engl. **25**, 1058-1071.
- Simpson L. ( 1987)  
The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa:  
Genomic organisation, transcription, replication and evolution.  
Ann. Rev. Microbiol. **41**, 363-382.
- Smith G.E. & Summers M.D (1980)  
The bidirectional transfer of DNA and RNA to nitrocellulose or biazobenzoyloxymethyl-paper.  
Anal. Biochem. **109**, 123-129.
- Southern E.M. (1975)  
Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis.  
J. Mol. Biol. **98**, 503-517.
- Steiger R. F., Opperdoes F.R. & Bontemps J. (1980)  
Subcellular fractionation of *Trypanosoma brucei* bloodstream forms with special reference to hydrolases.  
Eur. J. Biochem., **105**, 163-175.

- Rigby P.W.J., Dieckmann M., Rhodes C. & Berg P. (1977)  
Labelling desoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I.  
J. Mol. Biol., **113**, 237-251.
- Saitou N.M. & Nei M. (1987)  
The neighbor-joining methods: a new method for reconstructing phylogenetic trees.  
J. Mol. Evol. **4**, 406-426.
- Sies H. (1986)  
Biochemistry of oxydative stress.  
Angew. Chem. Int. Ed. Engl. **25**, 1058-1071.
- Simpson L. ( 1987)  
The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa:  
Genomic organisation, transcription, replication and evolution.  
Ann. Rev. Microbiol. **41**, 363-382.
- Smith G.E. & Summers M.D (1980)  
The bidirectional transfer of DNA and RNA to nitrocellulose or biazobenzoyloxymethyl-paper.  
Anal. Biochem. **109**, 123-129.
- Southern E.M. (1975)  
Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis.  
J. Mol. Biol. **98**, 503-517.
- Steiger R. F., Opperdoes F.R. & Bontemps J. (1980)  
Subcellular fractionation of *Trypanosoma brucei* bloodstream forms with special reference to hydrolases.  
Eur. J. Biochem., **105**, 163-175.

Stratagene catalogue (1994)  
Competent cells and packaging extracts.  
Cloning Systems, 59.

Stratagene catalogue (1994)  
Library products and services.  
Cloning systems, 145-159.

Swinkels B., Evers R. & Borst P. (1988)  
The topogenic signal of the glycosomal (microbody) phosphoglucokinase of  
*Crithidia fasciculata* resides in a carboxy-terminal extension.  
EMBO J, **7**, n° 4 , 1159-1165.

Turner M.J. (1985)  
The biochemistry of the surface antigens of the african trypanosome.  
Brit. Med. Bul. **41**, 2, 137-143.

Udenfriend S., Stein S., Böhlen P., Dourman W., Leimgruber W. & Weigele M.  
(1972)  
Fluorescamine: a reagent for essay of amino acids, peptides, proteins and primary  
amines in the picomole range.  
Science **178**, 871-872.

Vickerman K. & Preston T.M. ( 1976)  
Comparative cell biology of the kinetoplastid flagellates.  
In: Lumsden W.H.R & Evans D.A.  
Biology of *Kinetoplastida*, **1**, 35-130, Academic Press, NY.

Vickerman K. (1984)

Trypanosome survival mechanisms. Biological basis of trypanosome antigenic variation

In: Molecular Parasitology, pp 3-18

J. Thomas August eds, Academic Press; Baltimore, MD, USA.

Von Ossowski I., Hausner G. & Loewen P.C., (1993)

Molecular evolutionary analysis based on the amino acid sequence of catalase.

J. Mol. Evol. **37**, 71-76.

Wallace F.G. ( 1966)

The trypanozomatid parasites of insects and arachnids.

Exp. Parasitol., **18**, 124 -193.

Wattiaux R. (1994)

Cours de biochimie des structures subcellulaires.

Wertlieb & Guttman (1963).

Catalase in insect trypanosomatids.

J. Protozool. **10**, 109-112.