

**Identification moléculaire d'une chitinase
CHT-1, sa localisation et son rôle chez le
nématode *Caenorhabditis elegans***

Par Azzouz Fayçal

Diplômé de L 'U.S.T.H.B Alger
(Diplôme d'Etudes Supérieures en Biochimie)

**Thèse présentée à la Faculté des Sciences de l'Université de
Neuchâtel pour l'obtention du grade de docteur ès Sciences**

Neuchâtel 2001

IMPRIMATUR POUR LA THESE

**Identification moléculaire d'une chitinase CHT 1,
sa localisation et son rôle chez le nématode
*Caenorhabditis elegans***

de M. Fayçal Azzouz

UNIVERSITE DE NEUCHATEL

FACULTE DES SCIENCES

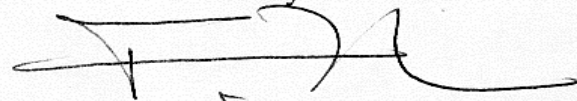
La Faculté des sciences de l'Université de
Neuchâtel sur le rapport des membres du jury,

MM. B. Betschart (directeur de thèse),
J.-M. Neuhaus et F. Müller (Fribourg)

autorise l'impression de la présente thèse.

Neuchâtel, le 30 janvier 2002

Le doyen:

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'F. Zwahlen', written over a horizontal line.

F. Zwahlen

REMERCIEMENTS

Mes remerciements s'adressent à :

- M. Bruno Betschart, professeur à l'Institut de Zoologie à l'Université de Neuchâtel pour m'avoir proposé ce sujet, pour m'avoir orienté dans la réalisation de ce travail, pour ses encouragements dans les moments difficiles et pour la confiance qu'il m'a témoigné, qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance.
- M. J.-M. Neuhaus, professeur de biochimie au laboratoire de Biochimie à l'Université de Neuchâtel pour ses précieux conseils et pour sa constante disponibilité, qu'il trouve ici l'assurance de mon profond respect et estime.
- M. Muller, professeur à l'Institut de Zoologie à l'Université de Fribourg de m'avoir fait l'honneur de participer au membre du jury, je le remercie vivement de cet honneur.

Mes remerciements profonds et sincères vont également à :

- Professeur M.P. Schürman, pour ses conseils et ses orientations satisfaisantes.
- Olivier Rais dit Pitou pour les services qu'il m'a rendu et qui m'a permis de réaliser mes expériences sur les souris.
- Nadine Paris , post-doctorante au laboratoire de Biochimie pour ses conseils et son aide dans la réalisation de certaines expériences.
- Josiane Pont pour toute l'aide dans la recherche bibliographique et Michèle Vlimant pour ses conseils et son assistance apportés dans la réalisation du travail au microscope électronique.
- M.Renaud pour m'avoir donné les moyens nécessaires et El Hadi pour sa précieuse aide, qu'ils trouvent tous deux, l'expression de ma plus profonde gratitude.
- M. Vuillemin, qui m'a toujours témoigné sa confiance en moi.
- J'adresse enfin mes remerciements les plus sincères à toutes les personnes de l'Institut de Zoologie ainsi qu'à tous mes amis :Djamel et sa femme Emmanuelle, Naceur, Férial, Steve, Mara, Lise Gern, Pierre-François, Fatima, Valérie, Fanny, Virginie...
- Pour terminer, mes remerciements les plus chaleureux vont à mes fidèles amis : Idriss, Mourad, Fouad, Mustapha, Bedji, Farid, Rachid, Mohammed, Hamid...ainsi qu' à tous ceux que je n'ai pas cité.

Abréviation

cht-1 : gène

CHT-1: protéine

AC : anticorps

DC : domaine catalytique (séquence protéique)

dc : domaine catalytique (séquence génomique)

DF : domaine de fixation (séquence protéique)

df : domaine de fixation (séquence génomique)

FC 1 : fragment catalytique 1 (séquence protéique)

fc 1 : fragment catalytique 1 (séquence génomique)

FC 2 : fragment catalytique 2 (séquence protéique)

fc 2 : fragment catalytique 2 (séquence génomique)

IPTG : Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside

SDS : Sodium dodecyl sulfate

PCR : Polymerase chain reaction

IFAT : Indirect immunofluorescence antibody test

GFP : Green fluorescent protein

SOMMAIRE

Résumé.....	P 4
-------------	-----

I . Introduction

I . 1 - Les Chitinases	P 7
I . 2 - Classification et structures des chitinases.....	P 7
I . 3 - Rôle des chitinases.....	P 15
I . 4 - Nématodes	P 17
I . 5 - Développement et morphologie des nématodes.....	P 18
I . 6 - Les chitinases chez les nématodes.....	P 23
I . 7 - Les chitinases chez <i>Caenorhabditis elegans</i>	P 25
I . 8 - But du travail.....	P 30

II - Matériel et Méthodes

II . 1 - <i>C.elegans</i> N2.....	P 32
II . 2 - Purification de l'ADN.....	P 32
II . 3 - Amplification par PCR.....	P 34
II . 4 - Clonage des différents fragments d'ADN amplifiés par PCR.....	P 36
II . 5 - Séquençage.....	P 37
II . 6 - Expression et purification des protéines de fusions.....	P 38
II . 7 - Production des anticorps.....	P 40
II . 8 - Western blot.....	P 41
II . 9 - Test d'immunofluorescence indirecte (IFAT).....	P 41
II . 10 - Immunocytochimie.....	P 42
II . 11 - Protéine de fusion verte fluorescente (GFP).....	P 43
II . 12 - Inhibition de l'expression du gène par l'interférence de l'ARN (ARN interférence).....	P 45

III – Résultats

III . 1 - Isolation du gène entier <i>cht-1</i> codant pour une chitinase chez <i>C.elegans</i>	P 47
III . 2 - Isolation des deux domaines catalytique (<i>dc</i>) et de fixation (<i>df</i>):.....	P 55
III . 3 - Expression des fragments du gène <i>cht-1</i> et purification des protéines recombinantes	P 61
III . 4 - Production des anticorps contre des peptides de la chitinase CHT-1 et caractérisation de leur spécificité.....	P 72
III . 5 - Protéine de fusion verte fluorescente (GFP).....	P 79
III . 6 - L'immunolocalisation de la chitinase CHT-1.....	P 81
III . 7 - Etude fonctionnelle de la chitinase CHT-1 par inhibition de l'expression du gène <i>cht-1</i>	P 95

IV - Discussion

IV . 1 - Caractérisation du gène <i>cht-1</i>	P 102
IV . 2 - La localisation de la chitinase CHT-1 chez <i>Caenorhabditis elegans</i>	P 105
IV . 3 - L' inhibition de l'expression du gène <i>cht-1</i>	P 111
IV . 4 - Perspectives.....	P 113

V - Bibliographie	P 115
--------------------------------	-------

Annexes	P 126
----------------------	-------

Résumé

La présence des chitinases actives chez *Caenorhabditis elegans* n'est pas connu jusqu'à ce jour. Par contre F. Aleaddine dans son travail de thèse a pu démontrer une activité chitinolytique dans tous les stades de développement de ce nématode. En plus, un plasmide YK9 contenant un gène appelé *cht* qui présente certaines caractéristiques d'enzyme chitinase a été isolé et caractérisé (J.M. Neuhaus, communication personnelle). La séquence codante du gène *cht* a été donc amplifiée à partir de l'ADN complémentaire de *C.elegans*. La partie N-terminal avec le site catalytique conservé chez toutes les chitinases de la famille 18 a été trouvé. La partie C-terminal contenant deux domaines riches en cystéines qui sont liés entre eux et au domaine N-terminal par une région riche en thréonines est aussi présente. Ce gène classé comme une enzyme chitinase de la famille 18 a été nommé *cht-1*.

Deux fragments FC 1 et DF amplifiés à partir de la séquence codante de *cht-1* furent clonés, exprimés et purifiés. Deux anticorps anti-FC 1 et anti-DF ont été obtenus par l'immunisation des souris avec les deux protéines isolées. Une réactivité de l'anticorps anti-FC 1 avec deux bandes protéiques de 45 et 60 kDa fut révélée dans les stades de développement L1, L2, L3 et L4. Par contre une seule bande protéique de 45 kDa des mêmes stades a réagi avec l'anticorps anti-DF. Ces deux anticorps n'ont pas réagi avec les protéines de stades adultes et œufs de *C.elegans*. L'immunofluorescence fut utilisée pour localiser la chitinases CHT-1. En effet, l'anticorps anti-FC 1 a révélé une fluorescence au niveau de la bouche et du pharynx de *C.elegans*, alors que l'anti-DF a démontré une importante fluorescence au niveau de la surface externe du nématode. L'immunocytochimie sur des coupes transversales du pharynx de *C.elegans* a démontré le marquage des canaux glandulaires avec l'anticorps anti-FC 1, selon Albertson et Thomason (1976) ces trois canaux pourraient avoir un rôle dans la sécrétion des enzymes de digestions qui sont synthétisées par les cellules glandulaires (bulbe terminal). Alors que l'anticorps anti-DF a révélé un marquage aux grains d'or des cellules hypodermiques de ce nématode. J. E. Sulston et G. N Cox ont prouvé l'existence de plusieurs protéines riches en cystéines chez les nématodes et parmi eux *C.elegans*. Ceci pourrait permettre des réactions croisées de l'anticorps anti-DF avec ces protéines car cet anticorps a été produit contre la protéine (DF) de CHT-1 riche en cystéine. L'étude fonctionnelle de la chitinase CHT-1 par la technique d'inhibition de l'ARN a été effectué sur deux populations de *C.elegans* nourris séparément avec des bactéries transformées. Sur l'aspect physiologique, les vers descendants n'ont subi aucune transformation détectable. Alors

que sur l'aspect moléculaire, les anticorps anti-FC 1 n'ont réagi qu'avec la protéine d'environ 60 kDa et les anticorps anti-DF n'ont pas réagi avec les protéines totales des *C.elegans* transformées. Il apparaît donc que, la protéine de 45 kDa pourrait être la chitinase CHT-1 reconnu par les anticorps anti-FC 1 et anti-DF. L'immunofluorescence réalisée avec l'anticorps anti-FC1 sur les vers transformés des deux populations a révélé l'absence de fluorescence au niveau du pharynx et sa présence au niveau de la bouche de ces nématodes. Ce résultat pourrait confirmer la synthèse de la chitinase CHT-1 par les cellules glandulaires, et sa sécrétion effectuée par les canaux glandulaires. La fluorescence détectée par l'anticorps anti-FC 1 au niveau de la bouche pourrait correspondre à une réaction croisée de ces anticorps avec la protéine de 60 kDa qui pourrait être la chitinase T13H5.3 homologue dans sa région N-terminal avec la protéine FC 1.

La présence de la chitinase CHT-1 au niveau du pharynx pourrait avoir un rôle dans la digestion totale des structures chitineuses ainsi que la digestion partielle des chitosanes et des peptidoglycanes trouvés dans les bactéries ou dans d'autres organismes digérés par ces nématodes. Pour compléter ce travail, l'activité chitinolytique de ce gène *cht-1* devrait être démontrée in-vivo et le rôle des autres chitinases connues devrait être étudié.

I - Introduction

I . 1 - Les chitinases :

Les différents organismes produisent une large variété d'enzymes hydrolytiques spécifiques aux différents substrats. Les chitinases font partie de ces enzymes qui hydrolysent la chitine au niveau de la liaison glucosidique $\beta(1-4)$ N-acétyl glucosamines. Elles sont très répandues dans la nature, on les trouve chez les bactéries, les champignons, les plantes, les invertébrés (principalement les nématodes, les insectes et les crustacés) et dans toutes les classes des vertébrés [1]. Leur rôle est différent d'une espèce à l'autre, certaines chitinases jouent un rôle dans la défense, alors que d'autres ont un rôle nutritionnel. Elles jouent aussi un rôle important dans le cycle de vie de plusieurs protozoaires et métazoaires parasites qui infectent l'homme. En effet, certaines espèces d'arthropodes hématophages tel que *Phlebotomus papatasi* se défendent contre les organismes de l'environnement grâce à leur tissu interne qui est recouvert par un matériel chitineux, ce qui constitue un obstacle contre l'invasion des parasites. Dans ces circonstances, le parasite a développé un mécanisme impliquant ces enzymes chitinolytiques pour passer à travers cette membrane chitineuse [2].

La chitine (**Fig.1**) est un poly β -1.4 acetylglucosamine (GlcNAc). C'est le deuxième polymère le plus abondant dans la nature après la cellulose et représente une portion considérable dans la biomasse [3-4]. 10^{13} kg de chitine sont synthétisés et dégradés chaque année par la biosphère [11]. La chitine est l'élément structural des parois cellulaires des champignons, des levures, des algues, des exosquelettes des crustacés et des arthropodes ainsi que les parois de nombreux invertébrés [5-6]. Les coquilles d'œufs et les cuticules d'arthropodes incluant les crustacés et les insectes, ainsi que les nématodes, les mollusques et les vers possèdent de la chitine dans leur structure [9-8]. Les plantes, les vertébrés et les procaryotes ne contiennent pas de chitine [3]. Sa fonction principale est de contribuer à la rigidité des éléments structuraux des organismes [7], elle est synthétisée par la chitine synthétase et dégradée par deux chitinases différentes; l'endochitinase et l'exochitinase [12]. La chitine est insoluble dans l'eau et dans la plupart des solvants ordinaires [10].

I . 2 - Classification et structures des chitinases:

Parmi les enzymes impliquées dans l'hydrolyse des polymères de sucre on trouve les chitinases, les chitosanases et les lysozymes. Elles sont cataloguées selon leurs séquences d'acides aminés en 50 familles de glycohydrolases[13].

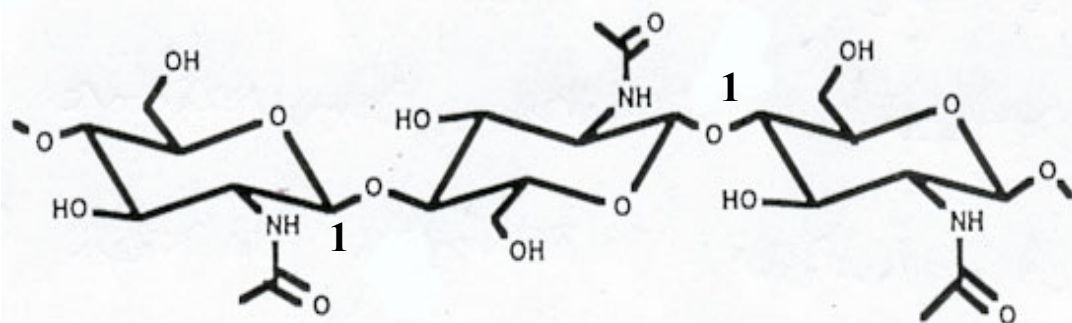


Figure 1 : Chitine: Substrat hydrolysé totalement par les chitinases au niveau des liaisons N-acetyl- glucosamine indiquées en 1 sur ce schéma [14].

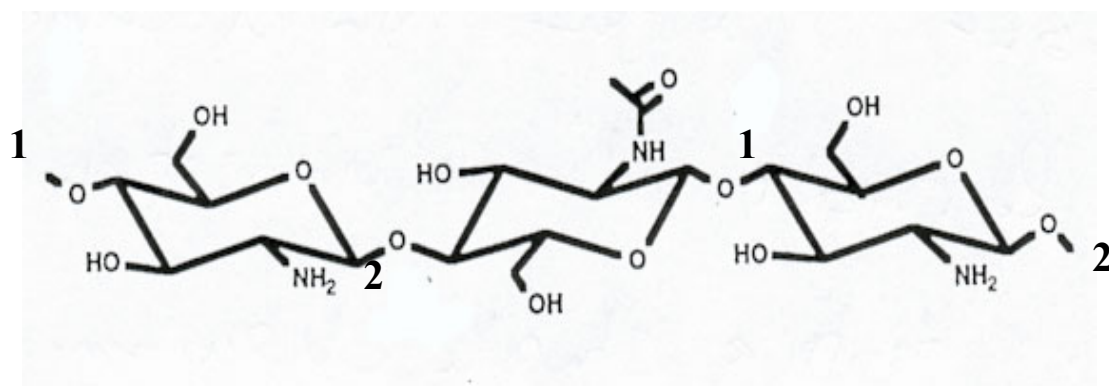
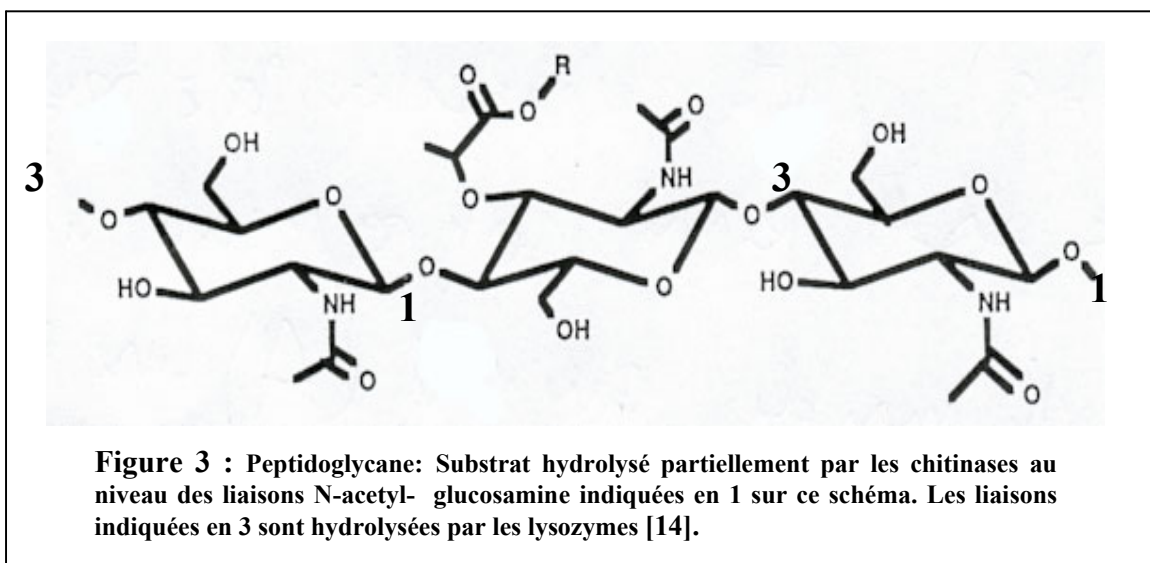


Figure 2 : Chitosane : Substrat hydrolysé partiellement par les chitinases au niveau des liaisons N-acetyl- glucosamine indiquées en 1 sur ce schéma. Les liaisons indiquées en 2 sont hydrolysées par les chitosanases [14].



Les chitinases peuvent être classées en deux catégories majeures: les endochitinases coupent la chitine au niveau des liaisons internes, ce qui donnera des polymères de GlcNAc tel que les chitotetraoses, les chitotrioses et des dimères di-acétylchitobiose. Les exochitinases coupent la chitine progressivement à partir de la première liaison glycosidique en libérant des monomères de GlcNAc [15]. D'après la similitude des séquences d'acides aminés des différentes chitinases identifiées, 5 classes de chitinases ont été proposées et regroupées dans les deux familles de glycosyle hydrolases 18 et 19 [13 - 16].

Les chitinases de la famille 18 : Les chitinases de cette famille possèdent une structure en tonneau avec 8 hélice α et 8 brins de feuillet β . Elles ont été identifiées chez les bactéries, les champignons et chez un grand nombre de plantes. La structure primaire de ces chitinases possède plusieurs motifs d'acides aminés conservés [17]. (Tableau 1)

	130	170
Chi - th	LSIGGWTYSTNF	FDGIDIDWEYPAD
Chi - aa	LSIGGWTYSTNF	FDGIDIDWEYPAD
Chi - sm	PSIGGWTLSDPF	FDGVDIDWEFPGG
Chi - ci	LSIGGWTYSPNF	FDGIDIDWEYPED

th : *Trichoderma harzianum* , *aa* : *Aphanocladium album*, *
sm : *Serratia marcescens*, *ci* : *Coccidioides immitis*

Tableau 1 : Séquences conservées chez les chitinases de la famille 18. (*) : Glu (E) 171

Dans les séquences conservées de ces chitinases se trouve le site actif dans lequel est inclus un résidu **Glu (E) 171**. Ce site est crucial dans le mécanisme catalytique des chitinases. La structure tridimensionnelle (3D) des chitinases famille 18 a été déterminée chez la bactérie *Serratia marcescens* [75] et chez une plante (l'enzyme hevamine) [18]. Les informations obtenues à partir de la structure 3D ont permis de situer le site catalytique et le mécanisme d'action de ces chitinases. En effet, les séquences les mieux conservées se présentent sous forme de deux court segments correspondants à deux brins β contenant le site catalytique [14]. Plusieurs chitinases bactériennes et d'eucaryotes de cette famille 18 possèdent un domaine riche en Ser/thr qui est attaché au domaine de fixation des chitinases [14].

Les chitinases famille 19 : Les chitinases de cette famille ont été identifiées principalement chez les plantes et quelques bactéries. Elles possèdent dans leur structure deux sites actifs incluant deux résidus **(E) Glu 67 et Glu 89** importants dans le mécanisme catalytique de ces chitinases (Tableau 2).

	60	70	80	90	100		
Chi - hv	KREVA	FLAQTSHETTGGW	ATPDGAF	AWGYCFKQ	ERGASSDYCTP	SAQWPCAPGK	
Chi - st	KREIA	AAFFAQTSHETTGGW	ASAPDGP	YAWGYCFL	RERGNPGDY	CPPSSQWPCAPGR	
Chi - at	KkEVA	AFGAQTSHETTGGW	ATPDGP	YSWGYCFKQ	EQNPASDY	CEPSATWPCASGE	
Chi - ps	KREIA	AAFLGQTSHETTGGW	PTAPDGP	YAWGYCFL	REQNP-	STYQCASSEFP	CASGK
		*		*			

hv: *Hordeum vulgare*, st: *Solanum tuberosum*, at: *Arabidopsis thaliana*, ps: *Pisum sativum*
 (*) : GLU (E) 67 et (E) 89

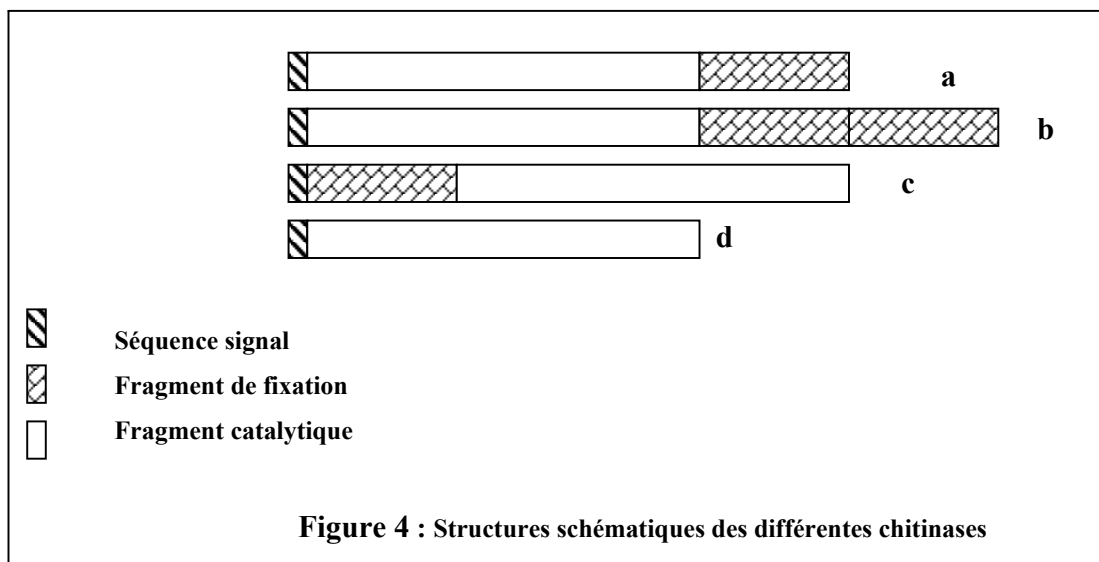
Tableau 2 : Séquences conservées chez les chitinases de la famille 19

La structure 3D d'une chitinase de l'orge de la famille 19 a été déterminée [19-20]. Elle est complètement différente de la structure 3D des chitinases famille 18 car elle est composée essentiellement d'hélices α [21]. L'analyse des protéines des chitinases de la famille 19 a démontré la présence de plusieurs résidus hydrophobes conservés. Ces résidus forment une large fontaine dans l'enzyme qui semblerait être l'endroit du site catalytique et de fixation du substrat [22].

Les chitosanases famille 46 : Les glycohydrolases famille 46 forment un petit groupe qui contient seulement des chitosanases isolées à partir des *Streptomyces* N174 [23] et de *Bacillus circulans* [24]. Les chitosanases hydrolysent la chitosane composée de 20 - 60 % de glucosamine, ce substrat ressemblant dans sa structure à la chitine (**Fig.2**). Les séquences protéiques des

chitosanases montrent la présence de groupements amines chargés et une homologie peu significative avec d'autres glycohydrolases.

La plupart des chitinases qui diffèrent dans leurs structures et qui concordent dans leurs modes d'actions possèdent un fragment catalytique et un fragment de fixation. Ce dernier est responsable de la fixation de la chitinase sur les structures chitineuses. Les deux fragments diffèrent par leurs compositions en acides aminés et par leurs longueurs (**Fig.4**), le fragment catalytique étant plus long et moins riche en cystéine que le fragment de fixation. Certaines chitinases ne possèdent pas de fragment de fixation (**d**), tandis que d'autres possèdent un (**a** et **c**) ou deux fragments de fixations (**b**) composés de plusieurs domaines riches en cystéines [25. 26. 27].



Les chitinases sont aussi classifiées selon leurs origines et leurs structures (Tableau 3). Les chitinases de classes I, II et IV sont d'origine végétale et elles regroupent les glycohydrolases de famille 19 [15].

Les chitinases de classe I sont constituées d'un domaine amino - terminal riche en cystéines qui est lié par une courte région riche en glycine/proline au domaine catalytique qui est souvent suivi d'un peptide C-terminal [28]. Dans les cellules de plantes, le peptide de ces enzymes est essentiel pour conduire les chitinases vers les vacuoles [29]. Le domaine de fixation riche en cystéines ne possède pas d'activité chitinolytique [22].

Les chitinases de classe II ont été caractérisées principalement chez les plantes dicotylédones. Ces chitinases ne possèdent pas de domaine riche en cystéines, ce qui les empêche de se fixer sur

les structures chitineuses. Elles sont sécrétées dans l'apoplaste[30]. **Les chitinases de classe III** ont été identifiées chez de nombreuses plantes et champignons [31]. Comme les chitinases de classe V, elles sont de glycosyl-hydrolases famille 18 [16-32-33]. Cette classe inclue les enzymes bifonctionnelles lysozyme/chitinase telles que celle de *Havea brasiliensis* [34]. **Les chitinases de classe IV** ont été trouvées chez la plupart des plantes et sont extracellulaires. 41 - 47 % de leur séquence du domaine catalytique est identique avec celui de la classe I. Elles possèdent une région riche en cystéine qui ressemble au domaine de fixation des chitinases de classe I. Cependant les chitinases de classe IV sont de petite taille puisqu' une partie des deux domaines qui les constituent a été supprimée [35]. **Les chitinases de classe V** ont été identifiées principalement chez les bactéries, cependant une endochitinase a été isolée à partir des plantes de tabac, qui ressemble beaucoup aux chitinases de classe V [36].

Chitinases				
Classe I	Classe II	Classe IV	Classe III	Classe V
Famille 19			Famille 18	
Plantes Bactéries			Champignons Vertébrés Invertébrés	Plantes Bactéries

Tableau 3 : Classification des chitinases

Propriétés physico-chimiques des chitinases :

Le poids moléculaire : Les chitinases trouvées chez de nombreuses plantes et algues possèdent une masse moléculaire d'environ 30 kDa. Des chitinases de 40 à 90 kDa et même d'environ 120 kDa ont été identifiées chez les mollusques, les arthropodes et chez quelques vertébrés comme les poissons, les amphibiens et les mammifères. La masse moléculaire des chitinases isolées chez les bactéries et les champignons varient de 30 à 120 kDa [37-38]. Quelques chitinases de plantes supérieures (carotte) [39], d'insectes [40] et de ver à soie [38] sont des glycoprotéines.

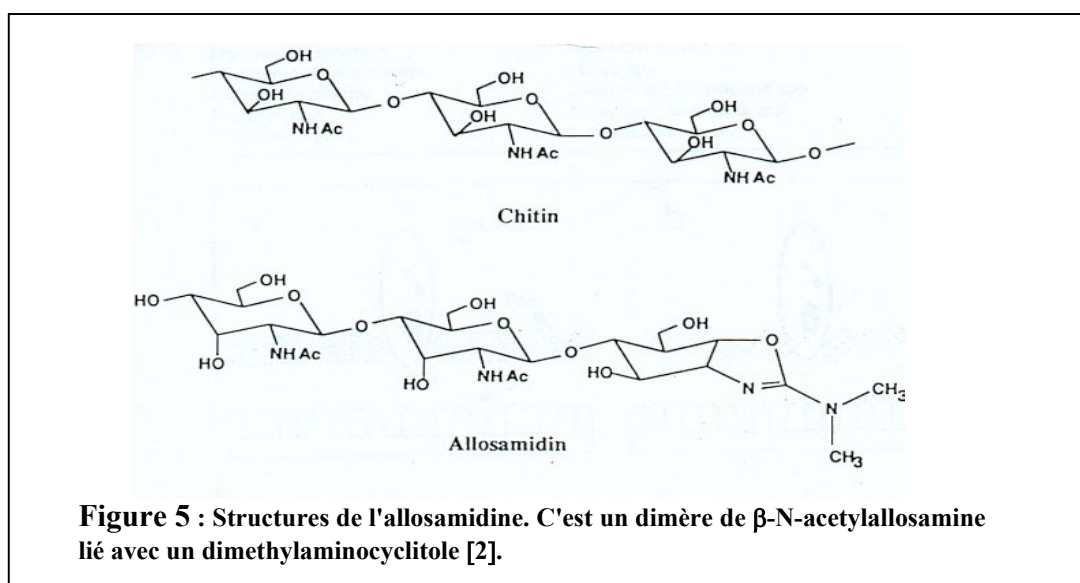
Le point isoélectrique (pI) : Les chitinases possèdent un pI de 3.0 à 10.0 chez les plantes supérieures et les algues. Chez les insectes, les crustacés, les mollusques et les poissons le pI est de 4.7 à 9.3. Chez les microorganismes, de 3.5 à 8.8. Toutefois, les chitinases acides et basiques sont présentes souvent dans le même organisme.

Activité enzymatique : Les pH optimaux des chitinases sont de 4 à 9 chez les plantes supérieures et les algues. De 4.8 à 7.5 chez les animaux et de 3.5 à 8.0 chez les microorganismes. Le pH optimal dépend du substrat utilisé (exemple de deux substrats différents: chitine glycol et *N*-acétyle chito-oligosaccharides) [41]. Ceci démontre que les chitinases de différents organismes sont actives dans les milieux acides et basiques.

La stabilité : Les chitinases de plantes classe III et ceux de *Bacillus licheniformis* résistent à une température élevée de 80° C [42-43]. D'autres chitinases identifiées chez des insectes et des vers de soie ne sont pas très stables au-dessus de 40°C car le développement de ces insectes s'effectue à 25°C [38]. En général, les chitinases d'insectes ne sont pas stables à de très hautes températures, car ces espèces utilisent généralement leurs chitinases pour hydrolyser leur propre chitine cuticulaire pendant la phase de mue, alors que les chitinases de plantes sont utilisées principalement pour dégrader des organismes pathogènes.

Inhibiteur et activateur des chitinases : Un inhibiteur compétitif a une structure similaire au substrat ou à l'état de transition. Les allosamidines et leurs dérivés inhibent les chitinases de ver de soie [44], de crevette rose [45], de microorganismes tels que *Piromyces communis*[46], *Streptomyces sp* [47] et *S. olivaceoviridis* [48]. Ils sont considérés comme les principaux inhibiteurs des chitinases d'insectes et leur structure est similaire l'état de transition de l'hydrolyse de la chitine [44] (**Fig.5**).

Récemment, des allosamidines cristallisées ont été liés à des chitinases de plantes telles que la hevamine [49]. Toutefois, les allosamidines et leurs dérivés inhibent seulement les chitinases appartenant à la famille 18 et n'inhibent pas celles de la famille 19. Les chitinases sont de manière générale inhibées par Hg^{2+} et Ag^+ . En ce qui concerne le Cu^{2+} ; il existe deux possibilité, un premier groupe de chitinase est inhibé par Cu^{2+} , alors que dans un deuxième groupe, l'activité chitinolytique est plus élevée en présence de Cu^{2+} . Ce dernier groupe a été trouvé chez les poissons [50-51] et les microorganismes tels que *Pseudomonas aeruginosa*[52].



Mécanisme d'action des chitinases: Les chitinases agissent en hydrolysant la liaison β -glycosidique entre les résidus GlcNAc. En général cette hydrolyse se déroule de l'une ou de l'autre manière, l'une avec conservation anomérique dans le produit, l'autre avec une inversion anomérique (**Fig. 6**)

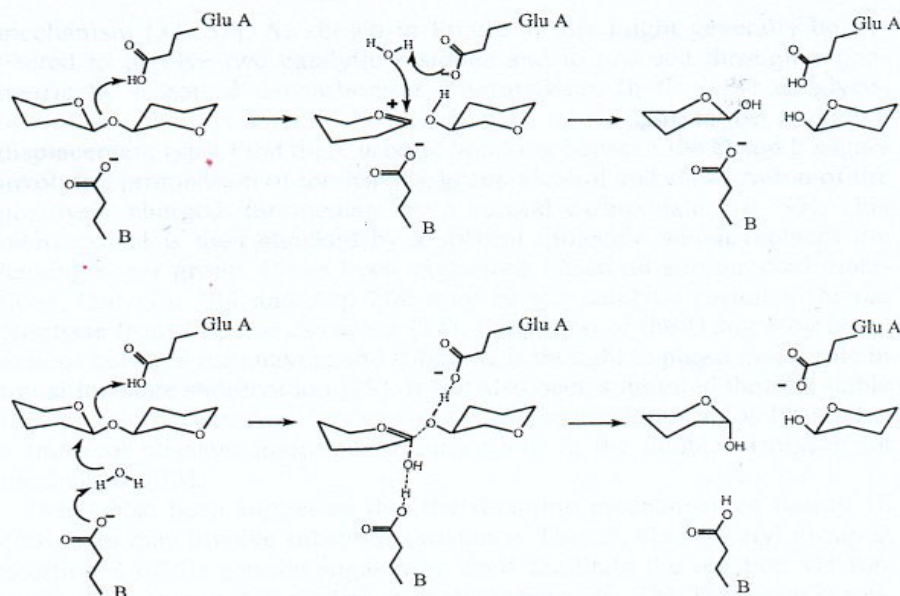


Figure 6 : Mécanismes de glycohydrolase. La réaction supérieure de cette figure correspond à un mécanisme d'hydrolyse avec conservation anomérique de la liaison glycosidique β (configuration β -anomérique). La réaction inférieure représente le mécanisme inverse, dont le produit est α -anomérique [17]. Le mécanisme de la glycohydrolase en détail est décrit dans l'article [53].

I. 3 - Rôle des chitinasés :

Les différents organismes produisent une grande variété d'enzyme qui hydrolyse des substrats spécifiques. Les chitinasés représentent une partie de ces enzymes qui jouent un rôle important dans le développement de plusieurs espèces vivantes. Chez les **bactéries**, les chitinasés sont produites généralement pour des raisons nutritionnelles et aussi pour hydrolyser les diverses structures chitineuses trouvées dans la nature[54]. Les chitinasés bactériennes appartiennent à la famille 18 des glycosyl hydrolases et le mécanisme d'hydrolyse de ces enzymes conserve la configuration anomérique β / OH [55]. Dans la structure des chitinasés bactériennes, deux résidus d'acides aminés conservés sont essentiels dans le mécanisme d'hydrolyse de la chitine, ce sont l'acide glutamique Glc et l'acide aspartique Asp [56]. Le domaine de fixation de ces enzymes serait localisé en position amino-terminale ou en position carboxy-terminale. [57] Quelques chitinasés isolées des bactéries ont une activité anti- fongique [3].

Les bactéries produisent la chitinase pour digérer principalement la chitine qui sera utilisée comme source de carbone et d'énergie [58]. Les chitinases des **champignons** ont plusieurs fonctions similaires aux chitinases bactériennes. Elles jouent un rôle nutritionnel et ont une activité dans le processus de développement des champignons, elles ont aussi un rôle morphogénique car la chitine est la majeure composante des parois cellulaires [15].

Ces chitinases jouent aussi un rôle clé dans l'activité mycoparasitaire de l'espèce *Trichoderma* contre plusieurs plantes [59-60]. Les chitinases de champignons possèdent un grand nombre d'acides aminés homologues avec ceux des chitinases de plantes classe III [31-61]. Cependant l'endochitinase de *Trichoderma harzianum* est homologue avec les chitinases bactériennes [62] et les chitinases de classe V des plantes de tabac. La plupart des chitinases de champignons possèdent un peptide signalé, certaines ont un domaine de fixation [63], alors que d'autres ne le possèdent pas [62].

La chitine est le deuxième polymère le plus abondant dans l'environnement marin. Des chitinases isolées de ces **organismes marins** sont peu homologues avec les chitinases des autres organismes. Quelques études sur le système chitinolytique de la bactérie marine *Vibrio furnissii* décrit en 1996 [64 - 65], ont démontrées que ce dernier utilise la chitine comme unique source d'azote et de carbone. Le PM de la chitinase isolée de *Vibrio furnissii* est de 36 kDa, elle a été classée comme exo-chitinase. Chez les **plantes**, les chitinases jouent un rôle important dans le mécanisme de défense contre les organismes qui contiennent de la chitine, tels que les champignons pathogènes [66]. Ces chitinases utilisent deux mécanismes hydrolytiques différents; le premier correspond à l'hydrolyse de la liaison β - 1,4 de GlcNAc en libérant des résidus de chitine avec une configuration anomérique α / OH sur le carbone C 1. Exemple la chitinase de l'haricot (plante) classe I, famille 19 de 32 kDa. Le deuxième mécanisme consiste à libérer des résidus de chitine avec une configuration anomérique β / OH comme par exemple la chitinase de concombre 27 kDa de famille 18, classe III. L'expression des chitinases chez les plantes se fait en réponse aux stimulations de l'environnement tel qu'une infection par des champignons [67], par pression osmotique [68], ou pendant les différents stades de développement, comme par exemple les fruits qui mûrissent [69-70].

Les chitinases parasitaires: Les parasites responsables de la leishmaniasis, de la malaria et de la maladie de Chagas ne contiennent pas de chitine. Cependant, ils sécrètent l'enzyme chitinase pour dégrader les structures internes de l'insecte-vecteur qui contiennent de la chitine. La chitinase chez ces parasites est produite à un stade de développement particulier, ce qui suggère

l'importance de la chitine ou de la chitinase dans le fonctionnement de ce parasite à ce stade-là [71]. Les coquilles d'œufs et les gains qui couvrent les surfaces extérieures des microfilaries contiennent de la chitine [72], cette dernière se trouve aussi dans la paroi des kystes des pathogènes intestinaux *Entamoeba* [73] et *Giardia* [74], ces parasites utilisent peut-être la chitinase pour moduler leur structure chitineuse. Le paludisme est une maladie causée par les parasites du genre *Plasmodium*, elle touche environ 2 millions de personnes dans le monde chaque année. Le parasite est transmis à l'homme par une piqûre de moustique. Chez ce vecteur, une membrane péritrophique (MP) enveloppe le repas sanguin, mais les ookinettes arrivent à s'échapper à travers cette MP en sécrétant de la chitinase [75-76]

I . 4 - Nématodes :

Les nématodes appelés aussi vers ronds sont des organismes métazoaires. Ils ont un habitat très variable, la moitié d'entre eux se trouvent à l'état libre dans l'eau douce, la mer, le sol et la matière organique en décomposition [77]. L'autre moitié vit en parasite chez les vertébrés, les invertébrés et les végétaux [78]. Les nématodes *libres* sont généralement trouvés sur le sol, par exemple, les fruits en décomposition trouvés dans les vergers peuvent contenir plusieurs milliers d'espèces. Certains nématodes vivent dans des milieux habituellement très hostiles au développement de la vie, ainsi, certaines espèces vivent dans des sources thermales où ils peuvent supporter une température atteignant 55° C exemple: *Dorylamius thermaux* [79]. Alors que d'autres se développent dans les vinaigres familiaux avec des teneurs en acide acétique pur de l'ordre de 7 %, exemple : *Anguillula aceti* [77]. Les nématodes *parasites de végétaux* causent chaque année des pertes énormes à l'agriculture. L'Anguillule du blé, *Anguina tritici* fait partie de ces nématodes, il supporte des conditions de sécheresse extrême sans mourir. Aux U.S.A, 7% de la production agricole a été détruite par les nématodes parasites [80]. Les nématodes *parasites de l'homme et de l'animal* vivent généralement dans le tube digestif, la cavité viscérale et les vaisseaux sanguins des vertébrés et des arthropodes, par exemple: *Ascaris* et *Onchocerca*. Leur cycle de vie peut être monoxène (unique hôte) ou hétéroxène (avec deux hôtes successifs)[81].

I. 5 – Développement et morphologie des nématodes :

Développement : Deux modes de développements existent chez les nématodes et les helminthes. Certaines espèces pondent des œufs dépourvus d'un embryon visible, elles sont appelées ovipares, exemple: Ascarides et Trichocéphales. Chez d'autres, l'éclosion s'effectue dans l'utérus et les embryons sont libres à la naissance. Dans ce cas, ces espèces sont appelées vivipares, exemple: Filaire de Médine et Trichine. Certains embryons possèdent à l'éclosion un éperon céphalique qui facilite leur éclosion et leur migration [82]. La plupart des nématodes parasites produisent des œufs qui seront évacués à l'extérieur de l'hôte par le rectum pour donner naissance à une larve qui va poursuivre son développement [79].

D'autres nématodes produisent des larves chez leur hôte, qui dans la plupart des cas ont besoins d'un nouvel hôte pour poursuivre leur développement en stade adulte. Chez les nématodes parasites en particulier, la larve du troisième stade est *la forme infectante* pour l'hôte définitif (HD). Cette larve peut rester très longtemps à l'état de vie latente et ne subit aucune modification dans le milieu extérieur ou chez l'hôte intermédiaire (H I) où elle vit. Arrivée chez l'hôte définitif, la larve subit encore deux mues et donnera l'animale adulte [83]. Au cours de leur développement, les nématodes subissent un certain nombre de *mues*. En effet, chaque larve subit une mue par stade de développement, la dernière mue donnera l'animale adulte.

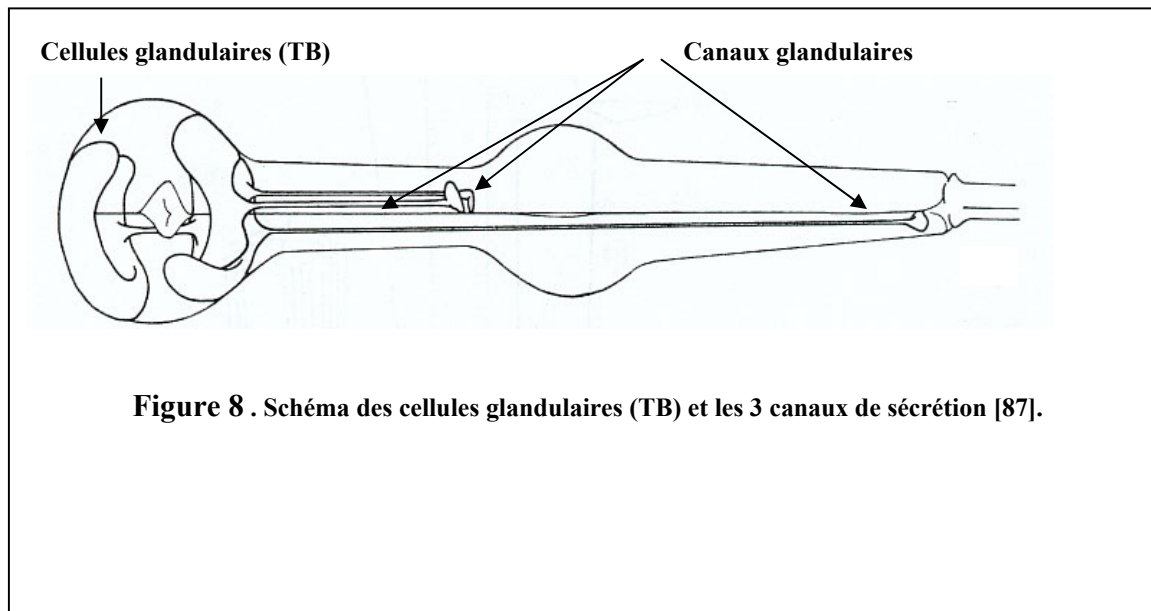
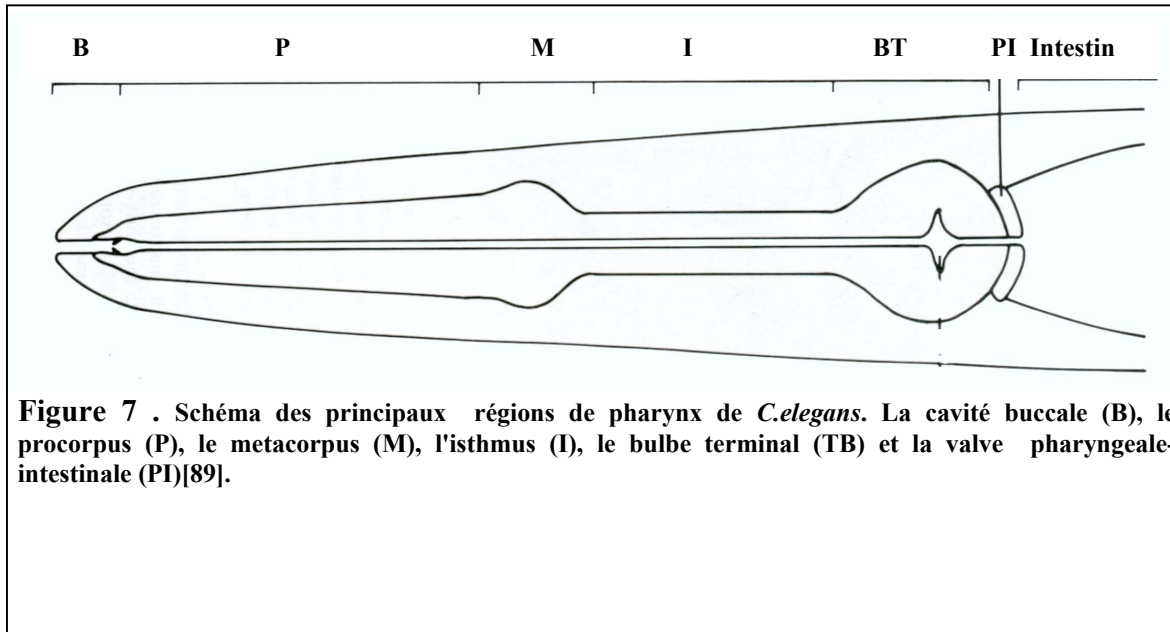
Morphologie : La morphologie des nématodes est variable, elle dépend souvent de leurs milieux de développement, soit à l'état libre, soit dans des organismes vivants sous forme parasitaire. Les nématodes ont généralement une forme longue et cylindrique, effilée aux deux extrémités du corps. Leurs taille est différente, certains sont microscopiques et mesurent environ 1 mm de long comme *Caenorhabditis elegans*, d'autres ont une taille plus importante pouvant atteindre 1.2 m de long comme le vers de Guinée *Dracunculus medinensis* [84].

La cuticule : Tous les nématodes sont pourvus d'une cuticule transparente, ferme et élastique, finement striée et offrant parfois des écailles, des épines, des papilles, des tubercules ou des expansions aliformes. C'est une structure importante dans les tissus des nématodes. Elle constitue une protection très efficace contre les mécanismes de défense des hôtes, contre leurs enzymes, mais aussi contre les diverses substances toxiques utilisées comme médicaments antihelminthiques [85]. Elle est composée parfois de plusieurs couches mais souvent d'une seule couche. Son épaisseur varie selon l'espèce, de 1µm chez *Wuchereria* et *Brugia*, à 500 µm chez *Ascaris* [84]. Cette cuticule est sécrétée par une couche hypodermique (cellules hypodermiques) [86] bien visible chez les individus jeunes. Elle est faite d'une substance qui n'est pas de la

chitine, contrairement à l'opinion classique, mais une sorte de collagène, fibreux, associé à d'autres protéines telle que la kératine [82]. Au-dessous de la cuticule se trouve une couche nucléée granuleuse qui porte le nom d'hypoderme ou couche sous-cuticulaire. Cette assise s'épaissit en certains points et forme des bourrelets longitudinaux qui font des saillies à l'intérieur du corps. Juste sous la couche hypodermique se trouve la couche musculaire, d'ordinaire puissante, formée de cellules à structures très particulières dont la forme et la répartition varient selon l'espèce de nématodes [79].

La cavité : Elle est limitée par les cellules musculaires et fait référence au pseudocèle car elle est dépourvue de la couche mésothéliale. Cette cavité contient le système digestif et le système de reproduction du ver. L'espace entre les deux systèmes est rempli par une substance (lymphe) dont la quantité est contrôlée par le système excrétoire du nématode [84]. Chez les ascarides, la cavité viscérale n'est interrompue que par les prolongements cytoplasmiques des cellules musculaires, et contient un plasma peuplé de cellules amiboïdes ou sanguines. Dans ce plasma, on a révélé la présence de substances toxiques et hémolytiques pour l'hôte [82].

Le pharynx : Appelé oesophage par la plupart des nématologistes, il a une structure simple. C'est un tube particulier constitué de tissus musculaires et de régions glandulaires. Il est aussi caractérisé par la présence d'une lumière triangulaire [86]. L'anatomie du pharynx du nématode libre *C.elegans* a été étudié en détail par microscopie électronique par Albertson et Thomason (1976) [87]. Ce pharynx est une pompe musculaire qui se contracte en aspirant vers la lumière le repas bactérien qui va passer ensuite dans l'intestin du nématode (Seymour et al 1983) [88]. Le pharynx de *C.elegans* est constitué de 20 cellules musculaires, 20 neurones, 9 cellules épithéliales et 9 cellules épithéliales spécialisées (cellules marginales) arrangés dans 4 régions distinctes (**Fig.7**): le procorpus antérieur, le bulbe métacorpus, l'isthmuse cylindrique et le bulbe terminal [89]. La coupe transversale du pharynx de *C.elegans* (**Fig.9**) démontre l'existence de 3 canaux (d) des cellules glandulaires ou du bulbe terminal (TB). Selon Albertson et Thomason (1976), ces trois canaux pourraient avoir un rôle dans la sécrétion des enzymes de digestions. (**Fig.8**)



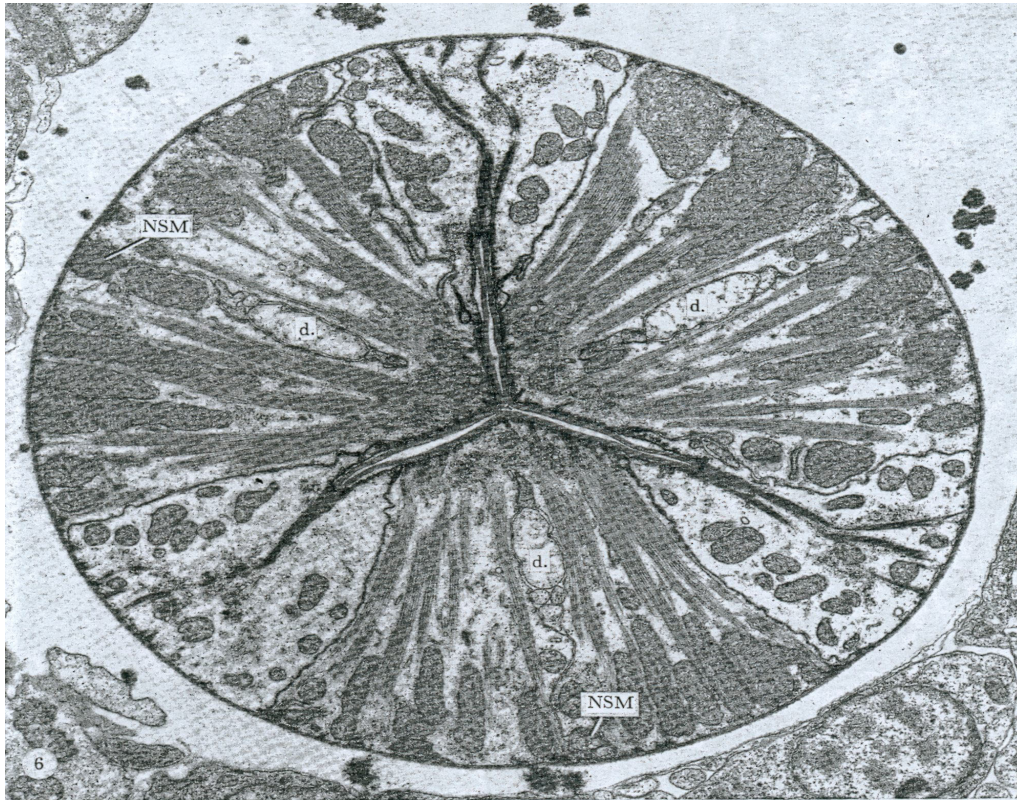


Figure 9 : Coupe transversale du pharynx de *C.elegans*. Les 3 (d) représentent les canalisations des cellules glandulaires (TB). Agrandissement x 9300 [87]

Le système digestif : Les nématodes possèdent un système digestif complet et pourvu de deux ouvertures. Ce système commence par la bouche et se termine par l'anus chez les femelles et par le cloaca chez les mâles. La bouche conduit directement au pharynx à travers la cavité buccale (B) qui peut être simple (chez la plupart des nématodes) ou complexe. La bouche et le pharynx sont constitués d'un prolongement de la cuticule qui couvre le corps des nématodes [90]. Le pharynx est un long tube triradiaire constitué principalement d'une forte musculature et de cellules glandulaire. Ces cellules sécrètent des enzymes nécessaires à la digestion et d'autres substances comme les anticoagulants [91]. Le pharynx est connecté à l'intestin qui a la forme d'un tube large (généralement droit) qui se prolonge par un rectum étroit, d'ordinaire très court, aboutissant à l'anus [79].

Le système nerveux : La structure dominante dans le système nerveux des nématodes est le nerf circum-oesophagial rond. Il est localisé dans la partie antérieure des nématodes. Il est constitué de quelques cellules (4 cellules neurales, 4 cellules gliales chez *Ascaris*) à travers lesquelles

surgit une série de nerfs antérieurs et postérieurs se rendant dans les différents appareils [88]. Le système nerveux de *C.elegans* est composé de 20 cellules, leurs structure et leurs rôles ont été identifiés par Albertson et Thomason (1976) [87].

Le système de reproduction : La plupart des nématodes se reproduisent par voie sexuée ou plus rarement sont hermaphrodiques. Les mâles sont généralement plus petits que les femelles et leur extrémité postérieure est recourbée [84]. L'environnement joue un rôle important dans la détermination des sexes chez les nématodes, ainsi sur un sol riche en eau, les femelle sont prédominantes [86]. L'appareil génital mâle est constitué d'un seul testicule et les spermatozoïdes atteignent leur complet développement après que l'accouplement les a portés dans l'utérus de la femelle. L'appareil génital femelle est constitué d'un ovaire antérieur et d'un deuxième ovaire postérieur, alors que certaine espèce de nématode ne possèdent qu'un seul ovaire. Il comprend aussi deux oviductes qui confluent en un utérus bien développé et un vagin qui se montre à l'extérieur par une vulve d'ordinaire ventrale et située au milieu du corps [86]. La fécondation est interne; le mâle dépose sa semence dans les voies génitales de la femelle. Certaines espèces sont vivipares, d'autres transportent leurs œufs et embryons attachés à leur cuticule. La plupart des œufs sont pondus librement. Il existe plusieurs stades larvaires séparés par des mues [84].

I . 6 - Les chitinases chez les nématodes :

La chitine et la chitinase jouent un rôle important dans le cycle de vie de plusieurs protozoaires et métazoaires parasitaires qui infectent l'homme. Chez quelques parasites, la chitine fait partie de la structure. Alors que chez d'autres, les parasites entrent en interaction avec des structures contenant de la chitine qu'ils rencontrent durant leurs développements [92]. Les nématodes parasites causent un certain nombre de maladie chez l'homme. Ils constituent le problème de santé majeure dans plusieurs pays tropicaux. En effet, les nématodes *Wuchereria bancrofti* et *Brugia malayi* parasitent les glandes lymphatiques et causent le lymphoedema ou l'éléphantiasis chez l'homme [71]. Plusieurs travaux de recherche ont été effectués sur les nématodes parasites dans le but de stopper leurs transmission. Une grande partie de ces recherches ont été réalisées sur les enzymes chitinolytiques de ces nématodes. Trois espèces de nématodes parasites sont connus pour causer la filariose lymphatique humaine: *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi* and *B. timori*. Les trois espèces sont transmises par des moustiques, qui avalent le premier stade larvaire du parasite (microfilaire) pendant le repas sanguin sur les hôtes infectés. Donc la transmission des filariales pourrait être interrompu par un traitement qui élimine les microfilaries de la circulation sanguine ou empêché leur développement dans l'insect-vecteur. Selon Venegas et Fuhrman, un des meilleurs antigènes caractérisés du stade microfilaire est la chitinase p70. Cette dernière est reconnue par l'anticorps monoclonal MF1 qui réagit avec la chitinase p70 et un isozyyme de 75 kDa [25]. L'expression de cette chitinase p70 coïncide avec le début de la capacité du microfilaire d'infecter son vecteur moustique. Ces chitinases sont donc intéressantes dans la compréhension de la base moléculaire des interactions parasite-vecteur [93].

Les filaires infectent leur insectes-vecteur en se retrouvant dans l'intestin. Chez ce vecteur, les microfilaries se développent et subissent plusieurs mues en passant par deux ou trois stades de développement [72]. Une interaction spécifique entre les protéases de l'intestin de moustique et une pro-enzyme chitinase a été décrite chez les plasmodiums. Dans ce cas le parasite sécrète une forme inactive de chitinase qui est activée par une trypsine dans l'intestin du moustique. La chitinase active a été impliquée comme facteur virulent, permettant au parasite (larve infectant) de percer la membrane péritrophique du moustique constituée en partie par des polymères de N-acétyl glucosamines et de s'échapper dans les glandes salivaires du moustique [93]. Lors d'un nouveau repas sanguin, le stade infectant du nématode parasite se transmet via la salive du

moustique à l'hôte. Les microfilaires dans le sang sont exposées au même environnement riche en protéase.

Yang Wu et al ont révélé la présence de deux chitinases de poids moléculaires différents chez le nématode *Acanthocheilonema viteae*. La synthèse de ces chitinases est thermosensible, elle se fait à 27°C et mais pas à 37°C. L'analyse et le séquençage du domaine catalytique de cette chitinase a révélé 69% d'homologie avec la chitinase des microfilaires de *Brugia malayi* au stade infectieux. Le domaine catalytique était identique à 67% entre les chitinases des deux espèces de nématodes *A.viteae* et *O.volvulus* au stade infectieux [94]. L'étude d'Adam sur une chitinase de 68 kDa chez ce même nématode *A viteae*, au niveau du stade L3 de leur développement, a révélé que cette chitinase est homologue à celle des microfilaires de *Brugia malayi*, des insectes, des bactéries et des *Streptomyces SP*. Selon les travaux d'Adam, la réponse immunitaire chez les rongeurs est à 90% dirigé contre la chitinase des L3 de *A.viteae* [26]. Tous les travaux effectués à ce jour sur les chitinases chez des nématodes parasites ont été réalisés dans le but de connaître le rôle de ces chitinases dans le développement et la transmission de ces nématodes. En effet, ces chitinases sont devenues la première cible des chercheurs dans le but de bloquer le développement ou la transmission des parasites utilisant la chitinase dans leurs cycles évolutifs [2].

I . 7 - Les chitinases chez *Caenorhabditis elegans*:

C.elegans (Fig.10) est un ver terrestre qui vit à l'état libre. Le ver adulte mesure 1 mm de longueur [80]. Ce nématode a un corps cylindrique effilé à la fin, transparent non segmenté. Il est très abondant dans la nature, vivant sur le sol, dans les végétations en phase de décomposition et se nourrissant de bactéries [95]. Il existe deux sexes chez *C.elegans*; des hermaphrodites (97 %) et des vers de sexe mâle (3 %). Le cycle de vie de *C.elegans* passe par 4 phases (Fig.11) pour atteindre le stade adulte, le passage d'un stade à un autre est caractérisé par des mues. La durée du cycle de vie dépend de la température du milieu, par exemple 51 heures à 25°C (Fig.12). *C.elegans* est considéré comme un modèle d'étude très intéressant depuis qu'il a été proposé par Sydney Brenner en 1962. Ce chercheur a insisté sur le séquençage du génome de ce nématode. Et il affirme " Ce séquençage n'est pas la fin du jour, c'est l'aube d'une nouvelle époque." Effectivement, le premier séquençage complet du génome d'un animal vient d'être achevé (Décembre 98), c'est celui du ver *Caenorhabditis elegans*. Ses 97 millions de paires de bases portent plus de 19 000 gènes, dont 12 000 de fonction encore inconnues [96]. Un grand nombre de gènes est conservé au cours de l'évolution et on en trouve des homologues jusque chez l'homme. Dans les laboratoires de recherches, *Caenorhabditis elegans* est élevé dans des boîtes de Pétri contenant de l'agar et des bactéries *Escherichia coli*. La durée de vie d'une génération, en passant par les 4 stades de développement, est de 3 jours à température ambiante. 1 vers hermaphrodite de *C.elegans* pond 300 œufs, et sur une boîte de Pétri on peut élever jusqu'à 10 000 nématodes [80].

Une nouvelle technique d'inhibition du gènes par de l'ARN a été découvert pour la première fois chez *C.elegans* [99]. Plusieurs scientifiques utilisent cette technique qui permet le blocage de l'expression d'un gène, pour déterminer son rôle et les conséquences de l'absence de la protéine correspondante sur le développement de l'animal. Cette technique a été utilisée pour la première fois chez *C. elegans*, elle a été aussi utilisée chez d'autres organismes (la mouche *Drosophila*, certains parasites protozoaires et chez les plantes) [100]. Selon Timmons et Fire [101] et Tabara et al [102-103], il suffit de nourrir *C. elegans* avec des bactéries transformées avec un plasmide contenant un fragment d'un gène pour causer le blocage de l'expression de ce gène dans la descendance des vers ainsi nourris.

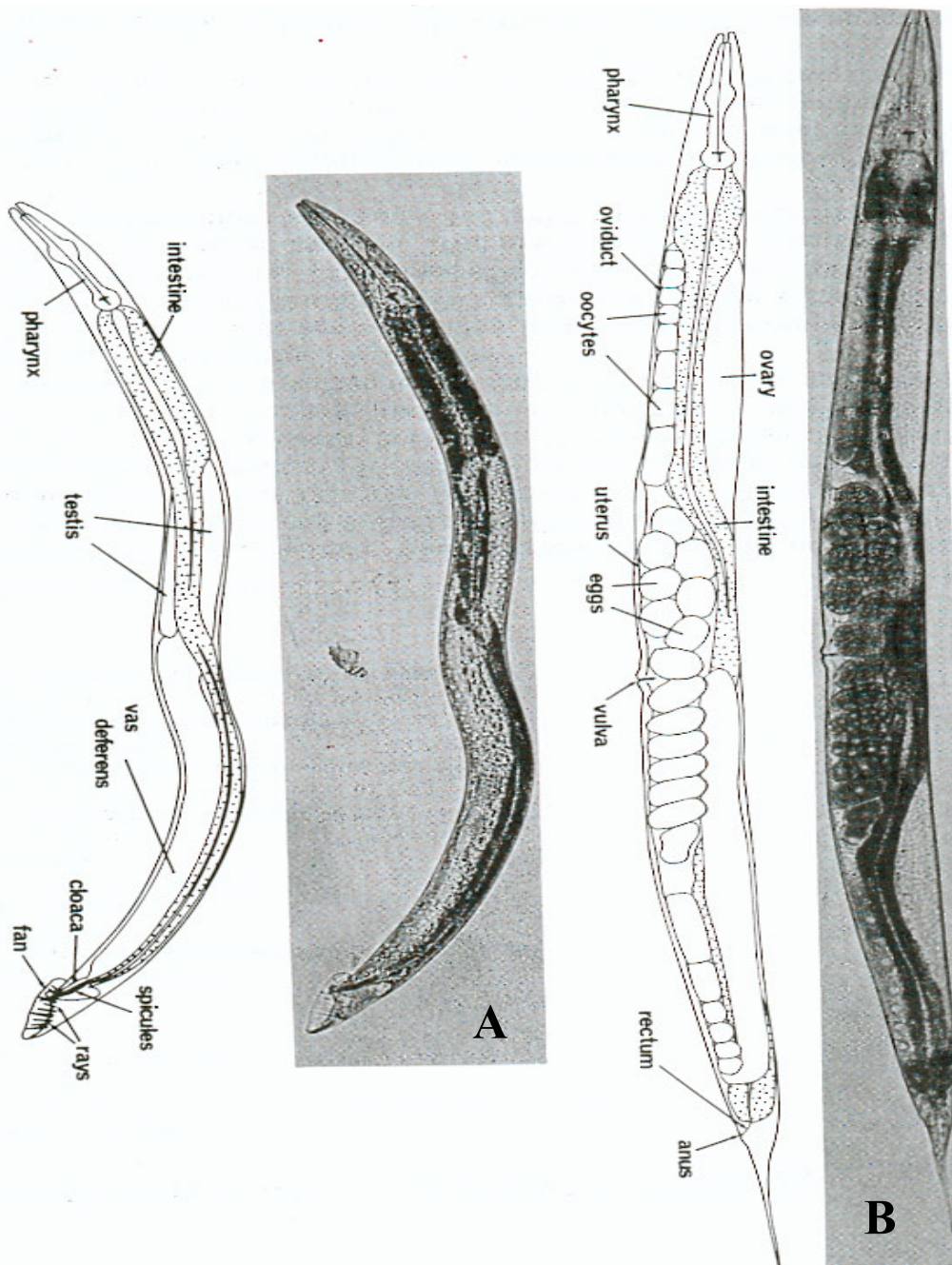


Figure 10 : Photomicrographie, représentant l'anatomie de *Caenorhabditis elegans*. *C.elegans* mâle (A), hermaphrodite (B) [89].

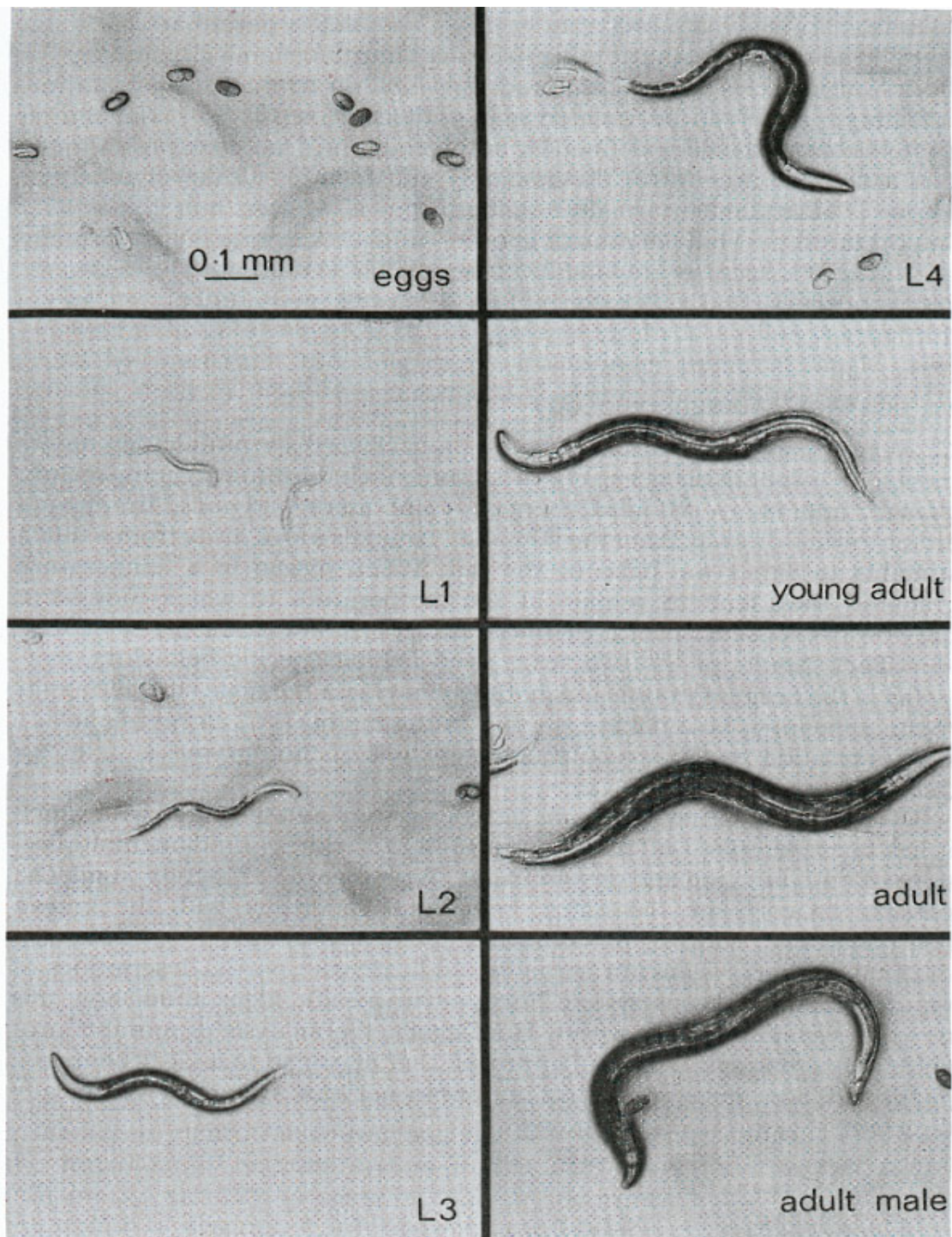


Figure 11 : Photomicrographies; œufs, larves et adultes de *C.elegans* [89].

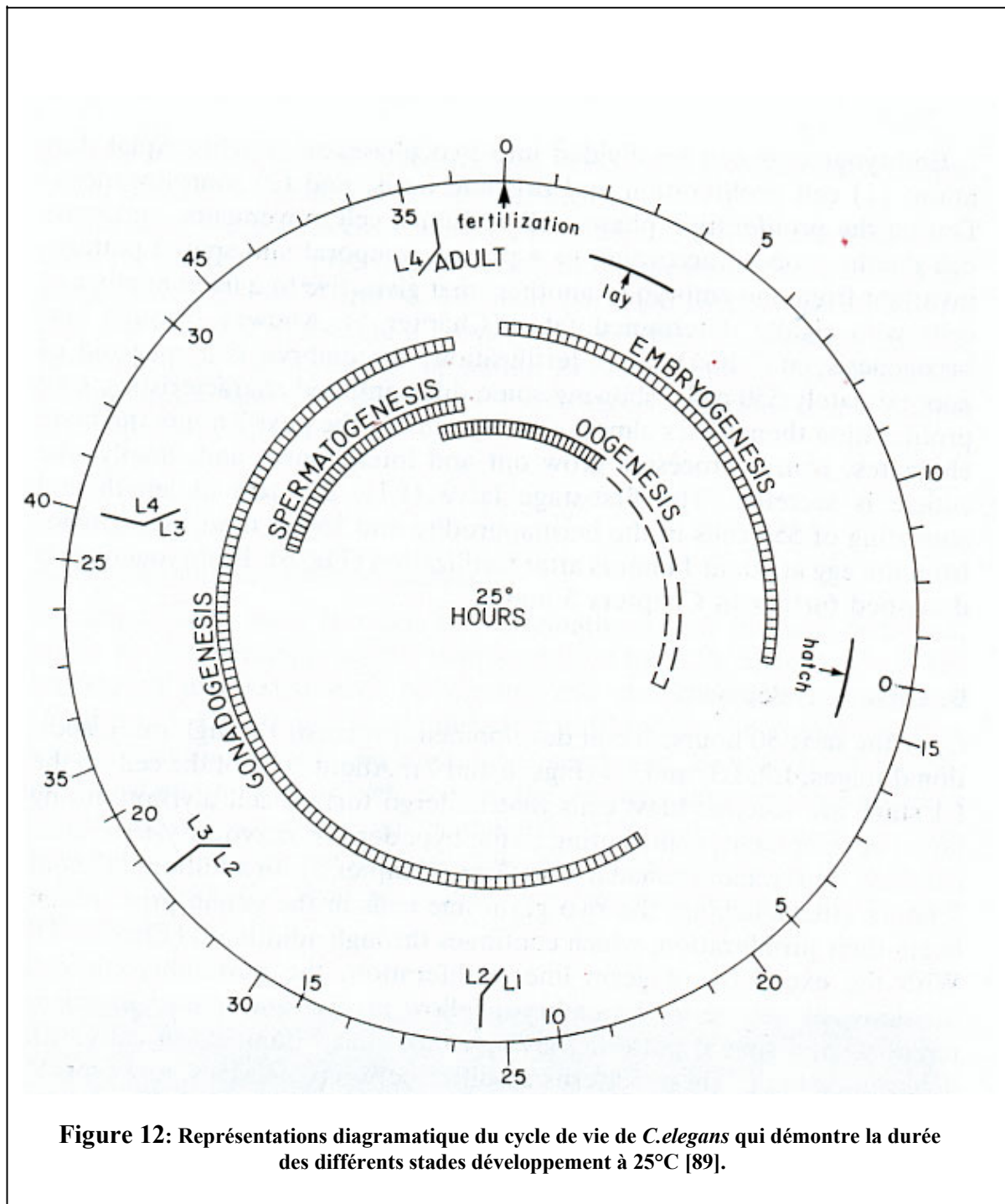


Figure 12: Représentations diagramatique du cycle de vie de *C.elegans* qui démontre la durée des différents stades développement à 25°C [89].

Jusqu'à aujourd'hui, aucun travail de recherche n'a décrit l'isolation et la caractérisation d'un gène codant pour une chitinase chez *C.elegans*. Sulston et al [97] excluent l'existence de chitinases chez ce nématode, alors qu'une activité chitinolytique a été détectée à différents stades de développement de *C.elegans* dans le travail de thèse de F. Alaeddine [98] (**Fig.13**). La première tentative d'isolation d'un gène codant pour une chitinase chez *C.elegans* a été effectuée par le Prof. J.M. Neuhaus qui a détecté parmi des séquences partielles (EST) de *C.elegans*, une séquence homologue à des gènes de chitinase de plantes. Le clone de l'ADNc correspondant étant incomplet, le bout 5' manquant a été isolé par PCR sur de l'ADN génomique de *C.elegans*, avec un primer dérivé du clone lui-même et un primer dérivé d'une autre séquence EST de *C.elegans briggsae*. Le fragment ADNc complet reconstitué a été cloné dans un vecteur de plante YK 9 et exprimé dans des protoplastes de tabac, ce qui a permis de détecter une activité chitinolytique (J.M . Neuhaus et F. Alaeddine, communication personnelle).

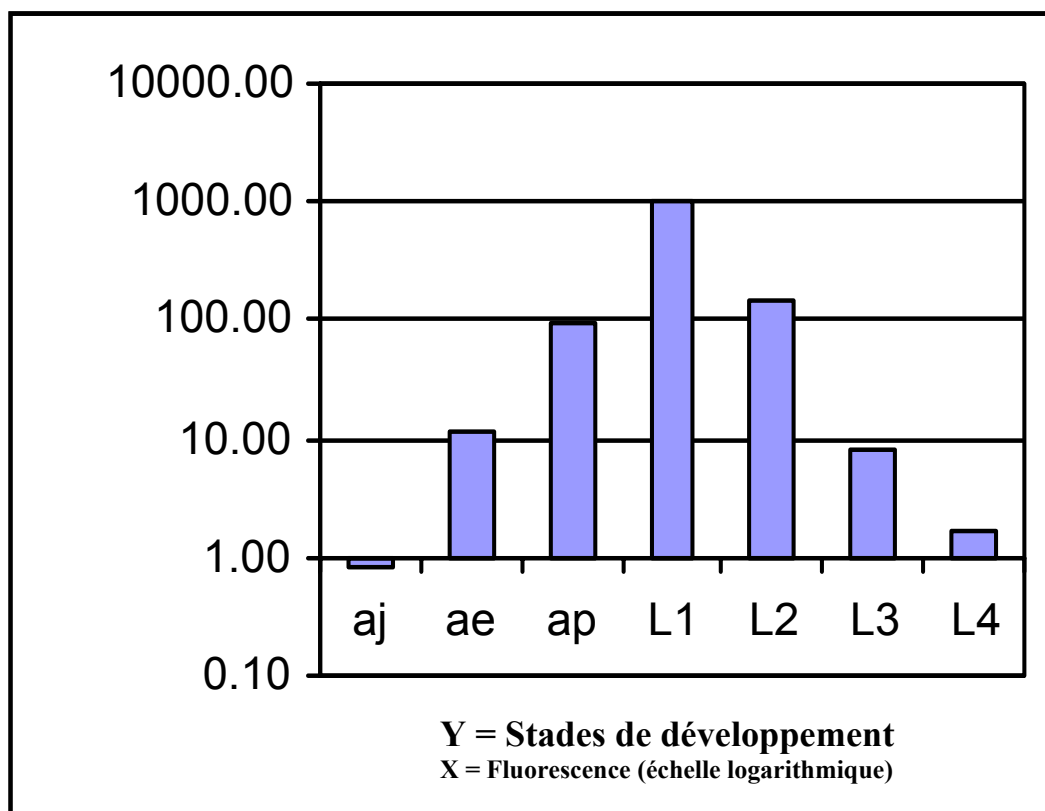


Figure 13 : Activité chitinolytique de différents stades de développement de *C.elegans* [98].

I . 8 - But du travail :

Les objectifs de ce travail ont été les suivants :

- Isolation de gène chitinase à partir du cDNA de *C.elegans*.
- Comparaison du gène isolé avec les gènes de chitinases d'autres espèces.
- Expression et purification des protéines recombinantes.
- Production d'anticorps anti-chitinases.
- Localisation de la chitinase par immunofluorescence et immunocytochimie chez *C.elegans*.
- Etude fonctionnelles de la chitinase CHT-1 en utilisant la technique d'inhibition par l'ARN.

II - Matériel et Méthodes

II . 1 - *C.elegans* N2 :

La souche N2 de *C.elegans* (reçu du Dr Bürglin, Université de Bâle) a été élevé à 25°C dans des boîtes de pétris contenant du milieu NGM agar sur lequel a été étalée une couche d'*Escherichia coli* de souche OP 50 SR (Stratagene), qui servent de nourriture pour *C.elegans* (Brenner 1974). Les vers ont été transférés sur des nouvelles boîtes de pétris tous les 3 jours, en mettant une goutte du tampon M 9 (3 g KH₂ PO₄ , 6 g Na₂HPO₄ , 5 g NaCl, H₂O 1000 ml, autoclavé puis ajouter 1 ml MgSO₄) ou H₂O contenant des vers adultes hermaphrodites [104]. Une synchronisation des différents stades de développement de *C.elegans* a été effectuée par une javellisation des stades adultes avec des œufs. Les vers ont été transférés de la boîte de pétri avec du tampon M 9 dans un tube de 50 ml. Après centrifugation à 3000 rpm (Sorval. Rotor RTH – 750) pendant 10 minutes à température ambiante, le surnageant a été éliminé, les vers ont été récupérés dans du tampon M9 ensuite centrifugés une fois à 3000 rpm (10 min) à température ambiante. Le culot de vers a été resuspendu dans H₂O stérile. Après une nouvelle centrifugation à 3000 rpm (10 min), le culot a été resuspendu dans une solution de javellisation (30 ml H₂O, 10ml Na ClO 2.5 %, 1.2 ml NaOH 10 M). Les tubes ont été bien agités, puis une goutte de cette solution a été observée au microscope pour vérifier si les œufs étaient sortis des vers. Cette javellisation ne doit pas dépasser 6 minutes car les œufs deviennent perméables et on risque de les perdre. Après centrifugation à 3000 rpm (1 min) à température ambiante, les œufs ont été rincés et récupérés dans du tampon M 9. Une goutte de ce tampon a été déposée par boîte de pétri contenant les bactéries. Les 5 stades de développement de *C.elegans* ont été prélevés séparément et stockés à – 20° C.

II . 2 - Purification de l'ADN :

2 . a - ADN complémentaire (ADNc) : La librairie d'ADNc de *C.elegans* a été préparée à partir des ARN messagers isolés d'une culture mixte comprenant tous les stades de développement de *C.elegans*. Cette librairie se trouve dans le vecteur λZAP II, elle a été reçue du Prof. Fritz Müller (Université de fribourg. Suisse).

2 . b - ADN génomique : Selon le protocole [89] modifié, les vers de *C.elegans* ont été prélevés à partir des boîtes de culture et aliquotés dans des tubes d'Eppendorf, puis stockés à –80°C. Par la suite, ces vers ont été broyés à l'aide d'un mortier stérile en ajoutant de l'azote liquide. L'homogénat a été récupéré dans 30 ml d'EDTA 100 mM pH8, 0.5 % SDS et 50µg /ml de protéinase K et 1 % de β-mercaptoéthanol. Après une incubation à 50°C pendant 2 heures, le tube

a été placé dans la glace. Un volume égal du phénol a été ajouté et la solution a été incubée à 4°C pendant 15 minutes. Après centrifugation, la phase aqueuse contenant l'ADN a été récupérée avec une pipette stérile. Une précipitation de cette ADN a été effectuée avec 2 volumes d'éthanol. Le culot d'ADN a été lavé avec de l'éthanol à 80 % froid, puis séché et resuspendu dans du TE (10 mM Tris-HCl, 0.5 mM EDTA à pH 8) .

2 . c- ADN plasmidique :

Miniprep : [105] modifié. Pour contrôler les différents fragments d'ADN amplifiés par PCR, une colonie blanche de bactéries a été prélevée avec un cure-dent stérile, puis transférée dans 2 ml du milieu de culture LB (10 g Bacto-trypton, 5 g Yeast extract, 10 NaCl / 1000 ml H₂O) + ampicilline 50 µg/ml. Cette culture a été incubée à 37°C sous agitation pendant une nuit. 1.5 ml de cette culture a été transféré dans un tube d'Eppendorf de 1.5 ml (le reste de la culture a été conservé à 4°C). Le tube de culture a été centrifugé à 12000 x g (30 sec) à température ambiante (Hettich 2029). Le surnageant a été éliminé et le culot de bactéries a été resuspendu dans 100 µl de solution I froide (Tris-HCl 25 mM pH 8, Glucose 50 mM, EDTA 10 mM pH 8). Après une incubation de 3 minutes à température ambiante, 200 µl de solution II (NaOH 0.2 N, 1 % du SDS 20 %), préparée fraîchement, ont été ajoutés. La solution a été agitée jusqu'à l'obtention d'un homogénat transparent, ensuite incubée 5 minutes dans la glace. 150 µl de la solution III froide (Potassium 3 M , Acétate 5 M, acide acétique glaciale 11.5 %) ont été ajoutés. La solution a été bien agitée, puis incubée pendant 5 minutes dans la glace. Une centrifugation à 12000 x g (5 min) à température ambiante a été effectuée et le surnageant a été récupéré, puis transféré dans un tube Eppendorf stérile. 400 µl de chloroforme ont été ajoutés et la solution a été bien agitée. Après avoir été centrifugé à 12000 x g (4 min) à température ambiante, la phase aqueuse (supérieur) a été transférée dans un nouveau tube Eppendorf. L'ADN a été précipité en ajoutant 900 µl d'éthanol absolu à température ambiante. Une centrifugation a été effectuée à 12000 x g (10 min) à température ambiante. Le surnageant a été éliminé, le culot d'ADN a été lavé avec 500 µl d'éthanol 70 % à température ambiante. Après une dernière centrifugation, le surnageant a été éliminé et le culot a été séché à l'air (15 min). Enfin, le culot a été resuspendu dans 50 µl de TE (10 mM pH 8) contenant de l'ARNase 20 µg/ml (Stratagene). L'ADN a été vérifié sur un gel d'agarose 1% ensuite conservé à – 20°C.

Maxiprep : Selon [105] modifié. Une colonie blanche de bactéries a été prélevée avec un cure-dent stérile, puis transférée dans 200 ml du milieu de culture LB contenant de l'ampicilline 50µg/ml. Cette culture a été incubée à 37°C sous agitation pendant une nuit, puis transférée dans

une bouteille à centrifuger de 250 ml. Après centrifugation à 4000 x g (10 min) à 4°C, le culot de bactéries a été resuspendu dans 8 ml de solution I froide, transféré dans un tube de 50 ml et incubé pendant 5 min à température ambiante. 16 ml de la solution II, préparée fraîchement, ont été ajoutés. Cette solution a été agitée jusqu'à l'obtention d'un homogénat transparent, ensuite elle a été incubée de 5 à 10 minutes dans la glace. 8 ml de la solution III froide ont été ajoutés, bien agités, puis incubés de 5 à 10 minutes à température ambiante. Une centrifugation à 3000 x g (20 min) à température ambiante a été effectuée et le surnageant a été récupéré, puis transféré dans un tube de 50 ml. L'ADN a été précipité en ajoutant 16 ml d'isopropanol à température ambiante. Après centrifugation à 3000 x g (20 min) à température ambiante, le culot a été séché, et resuspendus dans 500 µl de TE contenant de la ARNase 20 µg/ml (Stratagene). Cette solution a été transférée dans un tube d'Eppendorf de 1.5 ml et incubée à 37°C (30 min). 500 µl de phénol/chloroforme ont été ajoutés, le tout a été vortexé puis centrifugé à 12000 x g (2 min) à température ambiante. La phase aqueuse contenant l'ADN a été récupérée et l'ADN a été précipité en ajoutant 1 ml d'éthanol absolu à température ambiante. Une centrifugation a été effectuée à 12000 x g (5 min) à température ambiante. Le culot d'ADN a été lavé avec 1 ml d'éthanol 70 % à température ambiante. Après une dernière centrifugation, le surnageant a été éliminé, le culot a été séché, et resuspendu dans 500 µl de TE (10 mM) pH 8.

2 . d- Isolation des inserts : Après l'extraction de l'ADN plasmidique, 2 µl de cet ADN ont été digérés par deux enzymes de restrictions (QIAGEN). La réaction a été effectuée en utilisant 2 µl d'ADN, 1 µl Bgl II, 1 µl EcoR I (Boehringer Mannheim), 4 µl tampon de digestion et 12 µl H₂O pour un volume total de 20 µl. Cette solution a été incubée à 37°C pendant une nuit. Le produit de la digestion a été chargé sur gel d'électrophorèse à l'agarose 1 % coloré au bromure d'éthidium. Après migration à 90 volts pendant 30 minutes, l'ADN a été visualisé aux rayons UV (Gel Doc 1000 BIO-RAD). Un marqueur de poids moléculaire a été ajouté sur ce gel d'agarose avant la migration.

II . 3 - Amplification par PCR :

En utilisant la polymérase Bio Taq (QIAGEN) et des primers de MWG-BIOTECH GbmH (Allemagne), des réactions de PCR ont été réalisées sur un appareil MWG-BIOTECH primus, en utilisant les réactifs suivants : 1 µl d'ADNc de *C.elegans*, 2 µl dNTP (10 pmol), 2 µl tampon 10X, 2 µl primer (sens), 2 µl primer (antisens), 10µl H₂O et 1 µl Taq polymérase. Une réaction

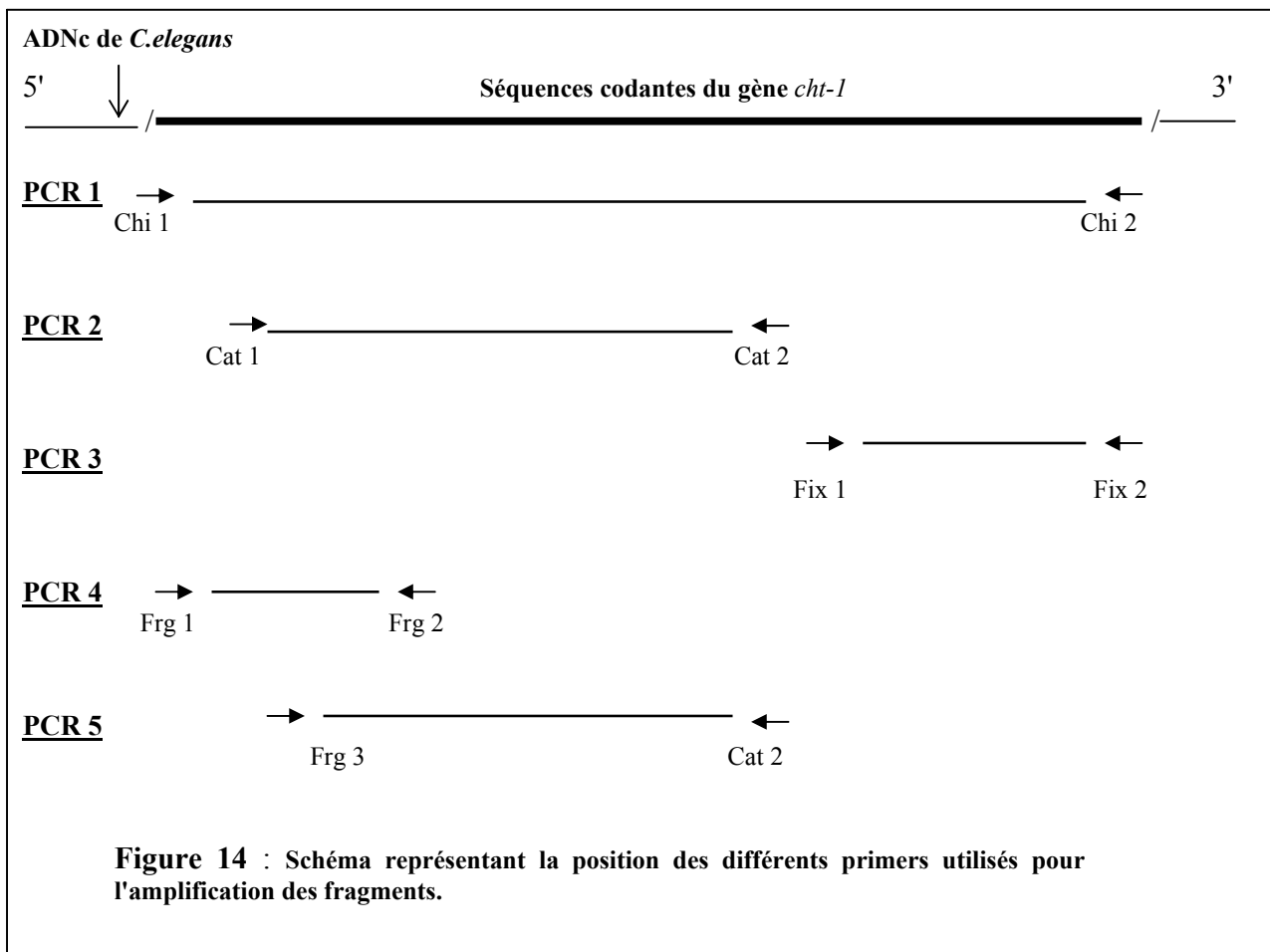
témoin a été effectuée avec les mêmes réactifs sans l'ADNc. 10 µl d'huile minérale ont été ajoutés dans chaque tube PCR afin d'éviter l'évaporation de la solution. Le programme de l'amplification a été composé d'un cycle initial de dénaturation de 3 min à 94°C, suivi de 35 cycles d'amplification (dénaturation 30 sec à 94°C, d'hybridation 30 sec à X°C (voir tableau 2) et 1min de polymérisation à 72°C). Une dernière étape d'élongation a été effectuée à 72°C (5 min).

Le produit de la réaction a été chargé sur un gel d'électrophorèse à 1% d'agarose en présence du bromure d'éthidium (5 µl / 100ml de TBE). Après migration à 90 volts (30 min), l'ADN a été visualisé aux rayons UV (Gel Doc 1000 BIO-RAD). Les séquences des primers utilisés et leur température d'hybridation sont indiquées dans le (tableau 4). La **Fig.13** démontre la position de ces différents primers sur le gène *cht-1*.

Tableau 4 : Liste des primers utilisés pour l'isolation des différents fragments .

Primers	séquences nucléotidiques	Position sur <i>cht-1</i> (ADNc, <i>C.elegans</i>)	T _{hyb} X	Nom du fragment isolé
Chi 1	5'-ATGCTATTAGGCTTCCTTCTC	1–21 (sens)	55.9°C	<i>cht-1</i>
Chi 2	5'-TTATTTTGCACATTTTGATGG	1833–1854 (antisens)	50°C	codant
Cat 1	5'- AGATCT CAATACAGACAAGGACGAGCC	190–211 (sens)	59.8°C	Domaine catalytique (<i>dc</i>)
Cat 2	5'- GAATTC <u>TCA</u> AAGCTCCTTAGCAATGACACT	1248–1269 (antisens)	55.9°C	
Fix 1	5'- AGATCT ACAGCTTCCAATACAAATGTCTG	1 419–1442 (sens)	55.3°C	Domaine de fixation (<i>df</i>)
Fix 2	5'- GAATTC TTATTTTGCACATTTTGATGGATC	1830–1854 (antisens)	54.1°C	
Frg 1	5'- AGATCT TGGACGGGTGCTACAATTAGA	58-78 (sens)	59.8°C	Fragment catalytique (<i>fc 1</i>)
Frg 2	5'- GAATTC <u>TTAG</u> TAGTTAGCCATGTCAGTTGC	550-571 (antisens)	57.8°C	
Frg 3	5'- AGATCT TGGGGATTTCGATGGTATTGAT	505-526 (sens)	55.9°C	Fragment catalytique (<i>fc 2</i>)
Cat 2	5'- GAATTC <u>TCA</u> AAGCTCCTTAGCAATGACACT	1248–1269 (antisens)	55.9°C	

Les nucléotides **en gras** sont les deux sites de restrictions Bgl II et EcoR I ajoutés au primers. Les nucléotides soulignés représentent le codon STOP. T_{hyb} : Température d'hybridation.



II . 4 - Clonage des différents fragments d'ADN amplifiés par PCR :

Le plasmide pBluescript de 2961 pb (Stratagene) utilisé dans le clonage des différents fragments amplifiés par PCR a été transformé en pBluescript + T, ceci pour permettre aux fragments amplifiés, dont les deux extrémités possèdent un A cohésif en 3', de se lier aux deux extrémités T du plasmide Bluescript-T. La préparation du vecteur pBluescript + T (D. Marchuk [104]) a été effectuée en digérant 3 µg de pBluescript ks ou sk, par l'enzyme EcoRV 1v/10v pendant une nuit. La digestion a été contrôlée par électrophorèse en mettant 100 ng du plasmide digéré et non-digéré sur un gel 1% d'agarose. Le pBluescript digéré a été précipité avec l'éthanol 100 % 2 x volume. Le culot a été lavé avec l'éthanol 70 %, et resuspendu dans 42 µl d' H₂O, 2 µl dTTP 2 mM, 5 µl tampon Taq 10X, et 1 µl de la Taq polymérase. Une incubation a été effectuée à 70°C pendant 3 heures dans un appareil de PCR (MGW-BIOTECH primus). 1 volume de phénol-chloroforme a été ajouté et la phase aqueuse a été récupérée après centrifugation. 1 volume de

chloroforme a été ajouté, suivi d'une centrifugation, la phase aqueuse a été isolée. Une dernière précipitation a été effectuée avec 2 volumes d'éthanol 100% et 1/10 volumes acétate de sodium 3M. Le culot a été lavé à l'éthanol 70 % et resuspendu dans 50 µl TE.

Ligation : Les différents fragments d'ADN ont été clonés dans le pBluescript -T en prenant 2µl de l'ADN purifié, 1 µl du pBluescript -T, 2 µl du tampon ligase 5x , 1 µl enzyme ligase T4 (Qiagen), et 4 µl d' H₂O pour un volume total de 10 µl. Le tout a été incubé à 14°C pendant une nuit. Une ligation témoin a été effectuée sans l'addition du fragment d'ADN amplifié.

Transformation cellulaire : Les plasmides avec l'insert obtenus après ligation ont été introduits dans les cellules compétentes *E. coli* XL 1 Blue BL/21 en prenant 100 µl de cellules compétentes et 5 µl de la ligation. Après incubation dans la glace pendant 45 min, les tubes ont été incubés une deuxième fois à 42°C pendant 2 minutes (choc thermique). Ces cellules ont été étalées sur des boîtes de pétris contenant le milieu de culture LB + ampicilline, 40 µl X-gal, et de 4 à 10 µl d'IPTG. Ces boîtes ont été incubées à 37°C pendant une nuit. Les colonies blanches ont été prélevées et l'ADN plasmidique a été purifié.

II . 5 - Séquençage :

Les fragments insérés dans le pBluescript ont été séquencés dans les deux sens avec l'utilisation de deux primers M 13 universel et M13 reverse (Tableau 5), qui se trouvent sur le plasmide pBluescript de deux côtés de l'insert . Ces primers sont marqués à l'IRD 800 (MWG-BIOTECH Europe). La réaction du séquençage par PCR a été effectuée avec le Kit (Amersham). L'appareil LI-COR DNA Sequencer 4000 (MWG-BIOTECH Europe) a été utilisé pour la migration des échantillons et la lecture des séquences d'ADN. Les différents fragments séquencés ont été comparés par alignement en utilisant le programme Clustal X1.64.

Tableau 5 : Les deux primers marqués à l' IRD 800 utilisés dans le séquençage.

M 13 universel	5' - IDR 800-GTAAAACGACGGCCAGT
M13 reverse	5' - IDR 800-AACAGCTATGACCATG

II . 6 - Expression et purification des protéines de fusions : Selon [107] modifié.

L'expression des inserts a été réalisée avec le plasmide pGEX2T (Pharmacia, Suède). Une digestion enzymatique par Bgl II et EcoR I des deux plasmides pBluescript - *dc* et pBluescript - *df* a été effectuée pour l'isolation des deux domaines *dc* et *df*. Ces domaines ont été clonés séparément dans le plasmide d'expression pGex-2T au niveau des sites de restriction BamH I et EcoR I. Une transformation cellulaire a été effectuée avec des bactéries *E. coli* XL Blue 1 BL/21. Des colonies de bactéries transformées ont été prélevées, inoculées dans des tubes à essais stériles contenant 2 ml de LB/ ampicilline et incubées à 37°C sous agitation pendant une nuit. Une mini extraction d'ADN a été effectuée, et les plasmides obtenus ont été digérés par des enzymes de restrictions pour vérifier la présence du *dc* et du *df* dans les plasmides. 500 µl des deux plasmides (pGEX 2T – *dc*) et de (pGEX 2T – *df*) ont été stockées à – 20°C.

L'expression des deux inserts a été effectuée à partir d'une culture fraîche. 3 ml du milieu LB/ampicilline ont été inoculés avec une colonie transformée, prélevée avec un cure-dent stérile. Cette culture a été incubée à 37°C pendant une nuit sous agitation. 20 ml du milieu LB/ampicilline ont été inoculés avec 400 µl de la culture incubée toute la nuit, et incubées à 37°C sous agitation (3 heures). L'incubation a été arrêtée lorsque la $DO_{600\text{ nm}} \geq 0.5 \leq 0.7$ (spectrophotomètre UVIKON 810). Cette culture a été induite avec 0.1 mM d'IPTG. Après 2 heures d'incubation à 37°C sous agitation, 1 ml de cette culture a été centrifugé à 12000 x g (2 min) (Hettich 2029). Le culot a été resuspendu dans du tampon de charge (2 x SDS) préparé selon (Current Protocols in Molecular Biology) [149]. La vérification de l'expression de la protéine de fusion a été effectuée sur un gel SDS-PAGE de 12 % (8 x 5 cm).

La purification des protéines de fusions a été effectuée dans un premier temps selon [149], en soniquant (Vibro Cell. Banbury, CT. USA) les cellules induites à une amplitude de 50 % (3 min). L'homogénat a été centrifugé à 5000 x g (5 min). Le surnageant a été transféré dans 50 % de glutathion-agarose (Sigma). Après centrifugation à 500 x g pendant 10 sec, le surnageant a été éliminé. Le culot a été lavé avec 100µl de PBS et l'élution de la protéine de fusion a été effectuée avec le glutathion réduit. Les fractions protéiques ont été analysées sur un gel SDS-PAGE.

Isolation et purification des corps d'inclusion : Selon [108]. Pour la purification des protéines insolubles, exprimées sous forme de corps d'inclusion, les cellules induites ont été incubées pendant 15 minutes à 25°C en présence de 1mg/ml de lysozyme. Ensuite, la solution a été congelée à –20°C. Après décongélation, 10 µg/ml de DNase, 10 µg/ml d'ARNase ou Benzoase 25 µg/ml, et du MgCl₂ 10 mM ont été ajoutés. Le tout a été incubé à 37°C pendant 1 heure, puis

centrifugé à (13 000 rpm , SS 34) (10 min) à 4°C. Le surnageant a été éliminé, le culot a été lavé 4 fois avec 30 ml (Tris-Cl 50 mM pH 7.3, Urée 1 M, EDTA 10 mM) et agité (10 min). Après centrifugation à (13 000 rpm , SS 34) (10 min), le culot a été lavé 2 fois avec 30 ml H₂O froide. Une dernière centrifugation a été effectuée à 11000 rpm (15 min) le surnageant a été éliminé et les corps d'inclusions ont été lavés et stockés à -20°C .

Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) [109] :

Trois concentrations de polyacrylamide ont été utilisées dans les gels de séparation, 10 %, 12 % et 15 %. Les plaques de verres de deux dimensions ont été utilisées pour préparer ces gels, 5 x 8 cm (mini-gels) et 20 x 20 cm (grands gels). Le gel de séparation a été constitué de Tris-HCl 1.5 M pH 8.8, 30 % acrylamide 0.8 % bisacrylamide, 10 % SDS, 10 % persulfate d'ammonium, de 2 à 5 µl de TEMED et de l'H₂O. Le gel de concentration a été composé de 30 % acrylamide 0.8 % bisacrylamide, Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, 10 % SDS, H₂O, 10 % persulfate d'ammonium, et du TEMED. Le tampon de charge (2 x SDS) a été préparé selon [149]. Le marqueur de poids moléculaires (BIO-RAD) utilisé est composé des protéines suivantes : inhibiteur de trypsine du soja (21.5 kDa), anhydrase carbonique (31 kDa), ovalbumine (45 kDa), albumine du serun bovin (66.2 kDa), phosphorylase (97 kDa), β-galactosidase (116.26 kDa) et myosine (200 kDa). Un second marqueur de poids moléculaires (BRL) a aussi été utilisé dans cette technique. Les différents échantillons ont été bouillis pendant 5 minutes dans le tampon de charge, puis chargé sur le gel avec une micro-pipette "Eppendorf" . La migration des protéines a été effectuée dans un appareil d'électrophorèse (BIO-RAD) à 150 volts fixe, (avec ampérage variable) pendant 60 minutes pour deux mini-gels et à 40 mA fixe (avec voltage variable) pendant 5 heures pour deux grands gels .

Après migration, les gels ont été incubés dans une solution de fixation (625 ml isopropanol, 250 ml acide acétique, complétés à 2500 ml avec l'H₂O pure) pendant 30 minutes à température ambiante, puis colorés pendant 2 heures (2.5g Coomassie Blue R 250, 50 % méthanol, 10 % acide acétique, et 40 % H₂O pure) et à la fin, les gels ont été incubés dans une solution de décoloration (5 % méthanol, 7 % acide acétique, et 88 % H₂O pure) sous faible agitation pendant 1 heures à température ambiante.

Purification des protéines de fusions par électro-élution :

Une bande de gel contenant la protéine recherchée a été découpée et déposée dans la gouttière de l'appareil S & S BIOTRAP BT 1000 avec deux membranes BT 1 (imperméable) et BT 2 (0.8 μm). Les protéines de fusions ont été isolées après leur migration pendant 16 heures à 100 Volts du gel vers le compartiment d'accumulation [110].

Après cette purification, les protéines de fusion isolées ont été incubées avec la thrombine à 22°C pendant 16 heures, puis chargées sur un gel SDS-PAGE de 12 %. Les bandes protéiques séparées de la GST ont été découpées et déposées dans la gouttière de l'appareil S & S BIOTRAP BT 1000 avec les membranes BT 1 et BT 2. Après migration dans le compartiment d'accumulation, les protéines purifiées ont été précipitées avec de l'acétone absolu (5 X le volume). Le culot a été resuspendu dans du PBS et stocké à -20°C .

Dosage des protéines :

La méthode de Bradford (BIO-RAD) [109] basée sur le changement de coloration du bleu de Coomassie G 250 lors de sa fixation sur les protéines a été utilisée. Les échantillons de protéines ont été repris à raison de 10 μl d'échantillon pour 5 ml du réactif de Bradford. Une courbe étalon a été réalisée avec de l'albumine de sérum bovin (BSA) à une concentration de 2 mg/ml. L'absorption a été lue à une longueur d'onde de 595 nm sur un spectrophotomètre de type UVIKON 810.

II . 7 - Production des anticorps :

Pour l'obtention des anticorps, deux souris femelles Balb/C (élevage local, Institut de Zoologie) et deux autres femelles C57/ bl (IFFA CREDO) ont été utilisées. Les deux souris Balb/C ont été immunisées avec la protéine DC pour l'obtention des anticorps anti-DC, alors que les deux autres souris C57/bl ont été utilisées pour l'obtention des anticorps anti-DF. Environ 250 μl de sang ont été prélevés par ponction rétro-orbitale des souris avant la première injection des protéines DC et DF (jour 0). Chaque souris a reçu 3 injections de 100 μg de protéine purifiée dans 50 % V/V de PBS / adjuvant de Freund incomplet. Les 3 injections ont été effectuées dans un intervalle de deux semaines entre deux injections. Environ 300 μl de sang ont été prélevés avant la deuxième et la troisième injection, un dernier prélèvement sanguin a été effectué 8 jours après la dernière injection de protéines. Tout le sang prélevé a été centrifugé à 3000 rpm (15 min) (Hettich EBA 12) et les sérums obtenus ont été aliquotés et stockés à -70°C .

II . 8 - Western blot :

Les western blots effectués dans ce travail ont été réalisés sur la base du protocole modifié d'après Towbin [112], Kyhse-Anderson [113] et des documents BIO-RAD [114]. 25 µg de protéines ont été déposées par puits. Ces protéines ont été séparées par migration sur gels d'électrophorèse (SDS-PAGE) selon Laemmli [109]. Le transfert sur filtre de nitrocellulose (Schleicher & Schuell) a été effectué par électrotransfert en utilisant l'appareil de transfert (TRANS.BLOT.SD BIO-RAD) (Voltage maximum, courant 3 mA / cm² pour les grands gels et 5.5 mA / cm² pour les petits gels). Les sites non spécifiques de la nitrocellulose ont été saturés pendant 45 minutes avec du tampon TBS (Tris 20 mM, NaCl 500 mM) -lait 5 %. Après rinçage, les filtres de nitrocelluloses ont été incubés pendant une nuit avec le sérum dilué à 1:100 dans du tampon 1 % TBS-lait. Trois rinçages au 0.05 % TBS-Tween ont été effectués, suivi d'une incubation pendant 2 heures des filtres avec l'anticorps secondaire de lapin dirigé contre les IgG de souris, marqué à la peroxydase (*Nordic Immunological Laboratory*) et dilué à 1:1000 dans du tampon TBS-lait 1 % . La révélation a été réalisée par une solution composée de 100 ml de TBS, 20 ml 4-Chloro-1-naphtol (60 mg/ 20 ml de méthanol, protégée de la lumière), et 60 µl 30 % H₂O₂ froid.

II . 9 – Test d'immunofluorescence indirecte (IFAT) :

Fixation et perméabilisation de C.elegans [115] : Les *C.elegans* ont été récoltés dans du tampon M 9 et laissés pendant 2 heures à température ambiante. Après deux lavages, les vers ont été centrifugés à faible vitesse et le surnageant a été éliminé. Ces vers ont été fixés dans une solution de 5 ml composée de (0.05 g paraformaldehyde, KCl 80 mM, NaCl 20 mM, EGTA 2mM, spermidine HCl 0.5 mM, spermine 0.2 mM, 0.5 % BME, PIPES 15 mM pH 7.4) et 3 ml d'heptane. Après incubation pendant 10 minutes dans la glace, cette solution de fixation contenant les vers a été agitée pendant 10 minutes, puis congelée immédiatement dans de l'azote liquide. Après décongélation, les vers ont été incubés pendant 1 heure à température ambiante, ensuite centrifugés à faible vitesse. Le culot de vers a été lavé une fois avec le tampon Tris-Triton (Tris Cl 100 mM pH 7.4, 1% Triton X-100 et EDTA 1mM), puis incubé dans un tampon (Tris-Triton, 1% BME) à 37°C sous agitation pendant 2 heures. Après cette étape, une centrifugation à 1000 rpm pendant 1 minute a été effectuée et le culot a été lavé avec le tampon (tri-oxyde borique) (BO₃) 1X (BO₃ 100 X pH 9.2 : H₃BO₃ 1 M, NaOH 0.5 M). Une incubation des vers dans le tampon (BO₃, DTT 10 mM) à 37°C pendant 15 minutes sous agitation a été réalisée et

après un lavage avec le tampon BO_3 , les vers ont été incubés dans du tampon (BO_3 , 1 % H_2O_2) pendant 1 heure à température ambiante sous faible agitation. après centrifugation, les vers ont été lavés pendant 15 minutes avec le tampon BO_3 .

Une préincubation des vers a été effectuée dans le tampon A (1 % BSA, PBS 1X, 0.5 % Triton X-100, 0.05 % Na Azide, EDTA 1 mM) pendant quelques heures à température ambiante, suivie d'une incubation dans le tampon A contenant l'anticorps primaire, pendant 24 heures à température ambiante sous faible agitation. Après lavage des vers dans le tampon B (0.1 % BSA, PBS 1X, 0.5 % Triton X-100, 0.05 % Na Azide, EDTA 1 mM), les vers ont été incubés dans le tampon A contenant l'anticorps secondaire anti - IgG de souris produit chez la chèvre et marqué à la fluorescéine (Sigma). La dilution de cette anticorps secondaire a été de 1:200 et l'incubation des vers a été de 24 heures à température ambiante sous faible agitation. A la fin, les vers ont été lavés 8 fois avec le tampon B pendant 24 heures, ensuite stockés dans du tampon B.

Un support de montage a été préparé en mettant une goutte de la solution (Tris Cl 50 mM pH 9.5, MgCl 5 mM et 2% agarose) sur une lame. 5 μl de la solution NPG (2mg n-propyl gallate dans 70 μl de glycérol à 65°C, 30 μl Tris Cl 100 mM pH 9.5, 0.2 μl DAPI 1 mg/ml, et un volume équivalent de vers) ont été déposés sur cette lame et couvert d'une lamelle. L'observation a été effectuée avec le microscope à fluorescence Olympus BH-2 et les photos ont été réalisées avec un microscope confocal LEICA Tcs 4D.

II . 10 - Immunocytochimie :

Protocoles modifiés d'après [87. 116. 117]. Les vers ont été fixés au glutaraldehyde 0.5 % dans du PBS 0.1 M pH 7.2 à 4°C pendant une nuit. Les aldéhydes ont été bloqués pendant 45 minutes avec du chlorure d'ammonium NH_4Cl 50 mM. Un lavage des vers fixés a été effectué avec du PBS froid. Une goutte de vers fixés a été étalée sur une boîte de pétri contenant une couche très fine d'agarose 1 %. Une seconde couche d'agarose a été ajoutée sur les vers (sandwich: agar / vers / agar). Des blocs d'agarose contenant 5 à 10 vers ont été coupés et déshydratés dans l'alcool à raison de 10 minutes dans des concentration croissantes (15, 30, 50, 70, 90 et 100%). Une inclusion des blocs d'agarose contenant les vers déshydratés a été effectuée dans des capsules de gélatine contenant une solution de polymérisation LR White résine (Plano – Allemagne). Ces capsules ont été incubées à 50°C pendant 48 heures. Des coupes transversales ont été réalisés à l'aide d'un Ultracut (E), Reichert-Jung équipé d'un couteau de diamant. Les coupes de couleurs grises ou argentées d'environ 50 nm d'épaisseur ont été prélevées sur des grilles de Nickel

recouvertes d'une pellicule de Formvar 1.5 % / chloroforme (Bal-Tc). Ces grilles contenant les coupes ont été incubées pendant 2 heures dans la solution TBS / BSA 1% contenant l'anticorps primaire dilué à 1: 10. Les coupes de vers ont été lavées avec du TBS / BSA 0.1 % deux fois 5 minutes. L'incubation de ces coupes pendant 1 heure avec l'anticorps secondaire a été effectuée dans une solution de TBS / BSA 1% contenant l'anticorps anti-IgG de souris produit chez la chèvre et marqué à l'or (Sigma) dilué à 1:30.

Les coupes ont été contrastées avec de l'acide tannique 1 mg/ml pendant 5 minutes, une solution d'uranyle d'acétate (saturées à 50 % avec l'éthanol) pendant 15 minutes, puis 3 minutes au citrate de plomb selon Reynolds [118]. Les coupes ont été observées au microscope électronique à transmission (TEM) Philips CM 100, à une tension d'accélération de 60 kV. Les photographies ont été prises avec un film Kodak de 35 mm.

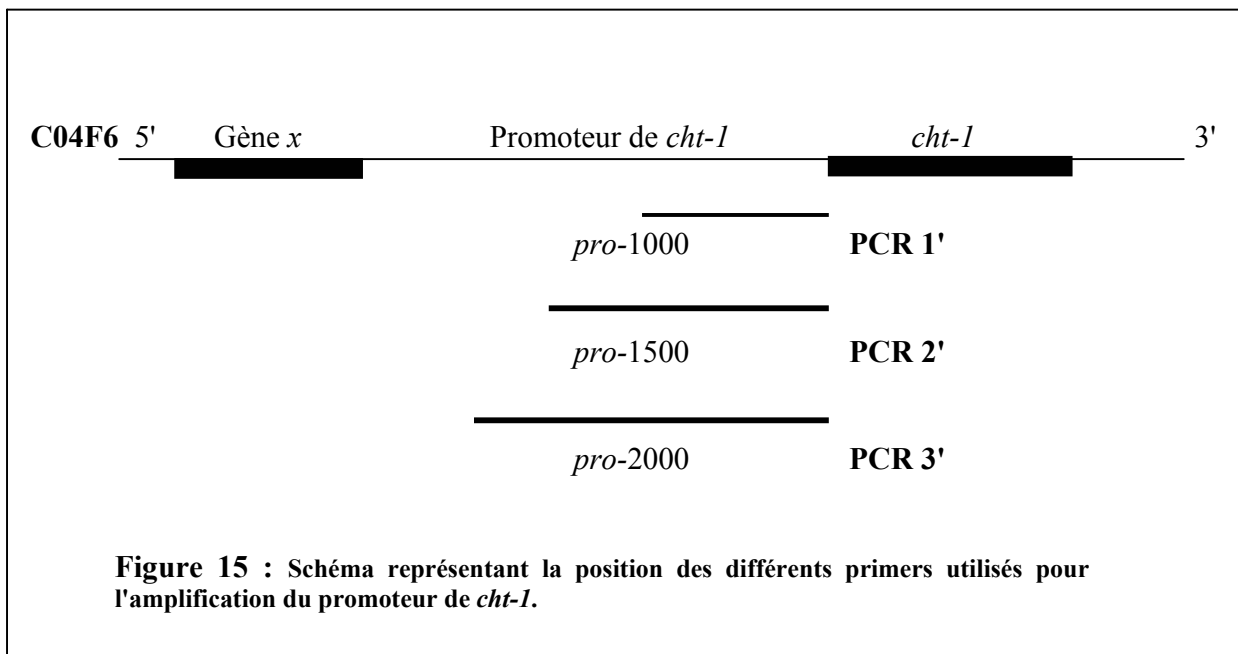
II . 11 - Protéine de fusion verte fluorescente (GFP)

Selon [119], 3 réactions PCR ont été effectuées sur le cosmide C04F6 [120] pour l'isolation de trois fragments (promoteur de *cht-1*): *Pro-1000*, *Pro-1500* et *Pro-2000* pb, en utilisant 4 primers (tableau 6) (**Fig.14**). Après séquençage (II.5), ces fragments ont été clonés séparément au niveau des sites de restrictions BamH I et Hind III du plasmide pPD 96 contenant le gène codant pour la GFP. 50 ng/μl du plasmide (pPD 96 – *Pro*) ont été injectés aux nématodes *C.elegans* (stade adulte jeune contenant de 5 à 10 œufs) avec une aiguille très fine au niveau des gonades. Pour détecter les vers transformés, 200 ng/μl du plasmide pRF 4 ont été injectés avec le pPD 96 – *Pro*. Ce plasmide pRF 4 est responsable de la forme "Roller" des vers transformés. Avant l'injection, les vers ont été fixés dans une goutte de l'huile (Halo Carbone) sur une lame stérile contenant une couche d'agar 2 %. Une fois injectés, les vers ont été remis sur une nouvelle boîte de pétri contenant un milieu de culture stérile. Une goutte du tampon M9 a été mise sur le ver pour l'hydrater. 5 jours après l'injection, les vers descendant ont été observés au microscope. Les vers transformés, sous forme rouler " Roller" ont été analysés au microscope à fluorescence Olympus BH-2 et au confocal LEICA Tcs 4D.

Tableau 6 : Liste des primers utilisés pour l'isolation des différents fragments Pro.

Primers	séquences nucléotidiques	Position sur C04F6	T _{hyb}	Nom du fragment isolé
pr 1	5'- GGATCCTTTATT CAGAAATACGTTACCA	3244-3266 (antisens)	62.4°C	<i>Pro - 2000</i>
pr 2	5'- AAGCTTACTTCCGTTTTAAACACGGT	5215-5234 (sens)	60.1°C	
pr 1	5'- GGATCCTTTATT CAGAAATACGTTACCA	3244-3266 (antisens)	62.4°C	<i>Pro - 1000</i>
pr 3	5'- AAGCTTTGGCTTCTTGT CAGTAAGAA	4111-4130 (sens)	60.1°C	
pr 1	5'- GGATCCTTTATT CAGAAATACGTTACCA	3244-3266 (antisens)	62.4°C	<i>Pro - 1500</i>
pr 4	5'- AAGCTTCACTGGTTTTCGATTCCATT	4679-4698 (sens)	60.1°C	

Les nucléotides **en gras** sont les deux sites de restrictions BamH I et Hind III ajoutés au primers. T_{hyb} : Température d'hybridation.



II . 12 – Inhibition de l'expression du gène par l'interférence de l'ARN (ARN interférence) :

Les deux fragments *fc 1* et *df* isolés préalablement (voire II. 3. 4. 5) ont été insérés séparément dans le plasmide pPD.129.36 [121]. Ce plasmide contient deux promoteurs T7 responsables de l'expression dans les deux sens du gène inséré. Les deux plasmides PD.129.36 – *fc 1* et PD.129.36 – *df* ont été introduits dans les bactéries *E. coli* BL21/DE3 [122] (voire transformation cellulaire II.4). Deux populations de *C. elegans* ont été nourries avec ces bactéries transformées. La première population de vers a été nourrie avec des bactéries transformées avec pPD.129.36–*fc1* et la deuxième population a été nourrie avec des bactéries transformées avec pPD.129.36–*df*. Les 4, 8 et 12^{ème} générations mixtes de chaque population ont été prélevées et stockées à – 20°C. Des tests d'immunoblots et d'immunofluorescence ont été effectués sur ces vers transformés de générations différentes.

III – RESULTATS

III . 1 - Isolation du gène entier *cht-1* codant pour une chitinase chez *C.elegans*:

Sur la base de la séquence du cosmide C04F6.3 (Waterston, R. Cambridge CB10 IRQ, England) [120] constitué de 25083 pb, un gène de 2218 pb a été identifié comme homologue de la séquence de *cht* identifiée par J.M. Neuhaus. 1854 pb se trouvent dans la région codante, interrompue par 3 introns de 355 - 410, 1714 - 1848 et de 1964 - 2136. L'alignement de la séquence *cht* avec le cosmide C04F6.3 a révélé une homologie totale et l'absence sur le *cht* d'un fragment du côté 5' constitué de 198 pb codantes. A partir du cosmide C04F6.3, les séquences nucléotidiques manquantes ont été identifiées et le gène *cht-1* a été complété. En utilisant de l'ADN complémentaire de *C.elegans* et les deux primers Chi 1 et Chi 2, la séquence codante du gène *cht-1* a été amplifiée par PCR, ensuite clonée et séquencée dans le pBluescript-T. Le résultat du séquençage a révélé la séquence codante complète de *cht-1*, composée de 1854 pb codant pour 617 acides aminés (**Fig. 16**). Deux types d'acides aminés sont dominants dans cette séquence protéique, des acides aminés aliphatiques (Ala 10.5% et Gly 8.1%) et des acides aminés hydroxylés (Thr 11.5% et Ser 8.1%). Le pourcentage des autres acides aminés varie entre 0.5% et 5%. Le point isoélectrique de la protéine CHT-1 était de pI 8.01.

L'analyse de la protéine CHT-1 par le programme DNA strider (1.0.1) a permis de déterminer les régions hydrophiles et hydrophobes de cette séquence (**Fig.17 a**). Cette analyse a démontré un équilibre entre les acides aminés hydrophiles et hydrophobes. Le peptide signal de cette séquence a été localisé dans la région N-terminale, composé de 19 acides aminés (**Fig. 17 b**). Deux régions riches en cystéines et deux autres régions riches en thréonine ont été révélées dans la partie C-terminal de la séquence CHT-1. L'alignement du domaine N-terminal de la séquence CHT-1 avec d'autres séquences de chitinases identifiées chez de nombreuses espèces a révélé une homologie au niveau d'une séquence très conservée correspondant au site catalytique DIDWEYP (**Fig.18**). Chez les chitinases de la famille 18, ce site catalytique est essentiel pour le mécanisme d'action de ces enzymes. L'alignement de CHT-1 avec des séquences de chitinases identifiées chez des nématodes parasites a démontré une plus forte homologie. La séquence CHT-1 est homologue à 38,8 % avec une séquence de chitinase identifiée chez *Acanthocheilonema viteae* [26], à 38.9 % avec deux chitinases isolées chez *Brugia malayi* et *Brugia pahangi* [25] à 39 % avec la chitinase de *Wuchereria bancrofti*, et à 38.3 % avec autres chitinase identifiés chez *Onchocerca volvulus* [94].

La recherche de similarité de la séquence CHT-1 effectuée sur le génome de *C.elegans* a révélé une homologie (12%) de la région N-terminale de cette séquence avec une séquence appelée

T13H5.3 (**Fig.19**). La séquence du site catalytique qui caractérise les chitinases famille 18 est la plus conservé entre les deux séquences, par contre les domaines de fixations sont différents. T13H5.3 est composée de 3 domaines riches en cystéines.

Le domaine C-terminal de CHT-1 est constitué de deux régions riches en thréonines et de deux autres régions contenant chacune 6 cystéines. Chez les chitinases, de telles régions riches en cystéines constituent des domaines de fixations sur les structures chitineuses. Chez les chitinases identifiées chez les nématodes parasites, le domaine de fixation contient généralement de 5 à 6 cystéines. L'alignement du domaine C-terminal de CHT-1 avec les domaines de fixations de ces chitinases a révélé une homologie de deux régions contenant 5 et 6 cystéines (**Fig.20 a**). Chez les chitinases identifiées chez invertébrés, le même nombres de cystéines est présent dans leurs domaines de fixations. Par contre chez les chitinases de plantes, le domaine de fixations contient 8 cystéines (**Fig.20 b**).

Cette première réaction de PCR a permis l'amplification et l'isolation de la totalité de la séquence codante de CHT-1 à partir du ADNc de *C.elegans*. Cette séquence a été analysée, le codon d'initiation Met et le codon stop ont été identifiés. L'alignement de cette séquence CHT-1 avec des séquences de chitinases identifiées chez d'autres espèces a révélé une homologie de séquences au niveau du domaine N-terminal (présence du site catalytique) et la présence dans le domaine C-terminal de deux régions riches en cystéines qui correspondent chez les chitinases aux domaines de fixation de ces enzymes sur les structures chitineuses. Quatre autres réactions PCR ont été effectuées par la suite, dans le but d'isoler des fragments de CHT-1 correspondant aux domaines catalytiques et de fixation, ceci en utilisant les primers spécifiques décrits au chapitre matériel et méthodes.

5' 3'

Chi 1

1 - ATGCTATTAGGCAAATTCCTTCTCGTGGCAAGTTTCATATTGCCAATTGCATACACATGG - 60
 - M L L G K F L L V A S F I L P I A Y T W

Frg 1

61 - ACGGGTGTACAATTAGAAACCATCCGGCGGATGTTGTGCTGCACGAAACAAAATCACT - 120
 - T G A T I R N▲H P A D V V A A R N K I T

121 - TCACGATCAGTGGCGAGATCCGAGCCAACCAATAGCTACATCAGACCGTGTACTTCCACC - 180
 - S R S V A R S E P T N S Y I R P C Y F T

Cat 1

181 - AACTGGGCTCAATACAGACAAGGACGAGCCAAGTTTGTGCCAGAGGATTACACTCCAGGA - 240
 - N W A Q Y R▲Q G R A K F V P E D Y T P G

241 - CTCTGCACGCATATTCTCTTTGCATTCCGGATGGATGAACGCTGACTACACCGTTCCAGCA - 300
 - L C T H I L F A F G W M N A D Y T V R A

301 - TATGATCCAGCAGACTGCCAAATGATTGGGCTGGAGAAGGAATGTACAGAAGAGTTAAC - 360
 - Y D P A D L P N D W A G E G M Y R R V N

361 - AAGCTGAAAGTCACTGACACCCAACCTCAAGACCCCTTCTCTCGTTCGGAGGATGGAGTTTT - 420
 - K L K V T D T Q L K T L L S F G G W S F

421 - GGAACGCACTTTCCAAGGAATGGCTGCCAGTTCTGCGTCTAGAAAAGTTTTTATCGAC - 480
 - G T A L F Q G M A A S S A S R K V F I D

Frg 3

481 - TCTGCTATCACTTTCGTTTCGCACTTGGGGATTTCGATGGTATTGATATCGACTGGGAGTAC - 540
 - S A I T F V R T W G F D G I D I D W E Y

Frg 2

541 - CCTTCTGGAGCAACTGCATGGCTAACTACGTTGCCCTCGTGAAGGAGTGAAGGCTGCT - 600
 - P S G A T D M A N Y V A L V K E L K A A

601 - TGTGAGTCGGAAGCCGGAAGCACTGGAAAGGATCGTCTTCTTGTAAACCCGCGTGTCCGCC - 660
 - C E S E A G S T G K D R L L V T A A V A

661 - GCAGGACCAGCCACAATCGATGCTGGGTATGATATTCCAAACTTGGACCCGAACCTTTGAC - 720
 - A G P A T I D A G Y D I P N L A P N F D

721 - TTTATTCTTCTCATGATTACGATTTCTTCGAGCATGGGCTTCTTGTGGATTC AAC - 780
 - F I L L M S Y D F F G A W A S L V G F N

781 - TCTCCACTCTATGCTACGACCCGAGCTCCCAGCTGAATGGAATGGATGGAACGTTGATTCA - 840
 - S P L Y A T T E L P A E W N G W N V D S

841 - TCTGCTAGATACTGGAACCAGAAGGGTATGCCAAAAGAGAGATCATCGTCGGAATGCCA - 900
 - S A R Y W N Q K G M P K E K I I V G M P

901 - ACATATGGACGAGGATGGACTTTGAACAATGCCAGTGC AATTAATCCAGAACCAAGCGGA - 960
 - T Y G R G W T L N N A S A I N P G T S G

961 - TCCCAGCTAAGATCACTCAATATGTTCAAGAAGCCGAGTTGGAGCCTACTTCGAGTTC - 1020
 - S P A K I T Q Y V Q E A G V G A Y F E F

1021 - TGGCAGATGCTCGCCAATGGAGCCACCAGATATTGGGATAGCCAGTCTCAAGTTCCATAT - 1080
 - C E M L A N G A T R Y W D S Q S Q V P Y

1081 - CTCGTACAAGGAAATCAATGGTGGTTCGTACGATGATGAAGAGTCGTTTGCACAACAGATG - 1140
 - L V Q G N Q W W S Y D D E E S F A N K M

1141 - GCATACGTTAAGAGAGAAGGTTACGGAGGAGCTTTGTATGGACTCTTGATTTTGACGAT - 1200
 - A Y V K R E G Y G G A F V W T L D F D D

1201 - TTTCAATGCTGGATGCAGCAACTCTAATGGTTCAGCTTTACCCACTCATCAGTGTATTGCT - 1260
 - F N A G C S N S N G Q L Y P L I S V I A

Cat 2

1261 - AAGGAGCTTGGAGGAGTTATCATTTCCAAAGAAAGGTGGCGTCACTGCTCCAACCACT - 1320
 - K E L G G V I I P K K G G V T T A P T T

1321 - GTAGCAACTACGGTCACTGACGACCCCTCCAATGACTTCAGCAGTAACCACTACTACT - 1380
 - V A T T V T T G R P P M T S A V T T T T

Fix 1

1381 - GCCGCTACCACAACACTACAACAGTGCAGCTACTACAACCACAGCTTCCAATACAAATGTC - 1440
 - A A T T T T T R A A T T T T A S N T N V

1441 - TGTCTGGAAAAATCGGATGGATTTTATCCAAACAGCAACAACTGCGGACTTTTCGTTCTT - 1500
 - C S G K S D G F Y P N S N N C G L F V L

1501 - TGTCTGAGCTCAAAATCATAACAGCATGTCGTGCCATCAGGACTTCAATACTCTGCTTCC - 1560
 - C L S▲S K S Y S M S C P S G L Q Y S A S

1561 - CTGAAATACTGTACCCTTCCACTGCTTCTGGATGTTCTGTGACCACTACTAGAGCTCCA - 1620
 - L K Y C T T S T A S G C S V T T T R A P

1621 - ACTACGACAACAAAATCTGCGCAACTGTCACCACAACACTACAAGAGCACCAACCAACTACT - 1680
 - T T T T K S A P T V T T T T R A P T T T

1681 - ACACCGGCTTCAAGTGTACCAAGGATGGATTTCTCGGAGTTCAGGATGATGCTCAAG - 1740
 - T P A F K C T K D G F F G V P S D C L K

1741 - TTTATCCGCTGTGTAATGGTATTTTCATACAACCTTTGAGTGCCCCAACGGTTTGTAGCTTC - 1800
 - F I R C V N G I S Y N F E C P N G L S F

Fix 2

1801 - CACGCTGACACAATGATGTGTGATCGTCCAGATCCATCAAAATGTGCAAAATAA - 1854
 - H A D T M M C D R P D P S K C A K * Chi 2

Figure 16 : Séquence codante du gène *cht-1*, composée de 1854 pb codantes et 617 ac.am. Les séquences (en souligner) représentent les différents primers. Les acides nucléiques (encadrés) : codon Met et codant Stop. (▲) : Intron

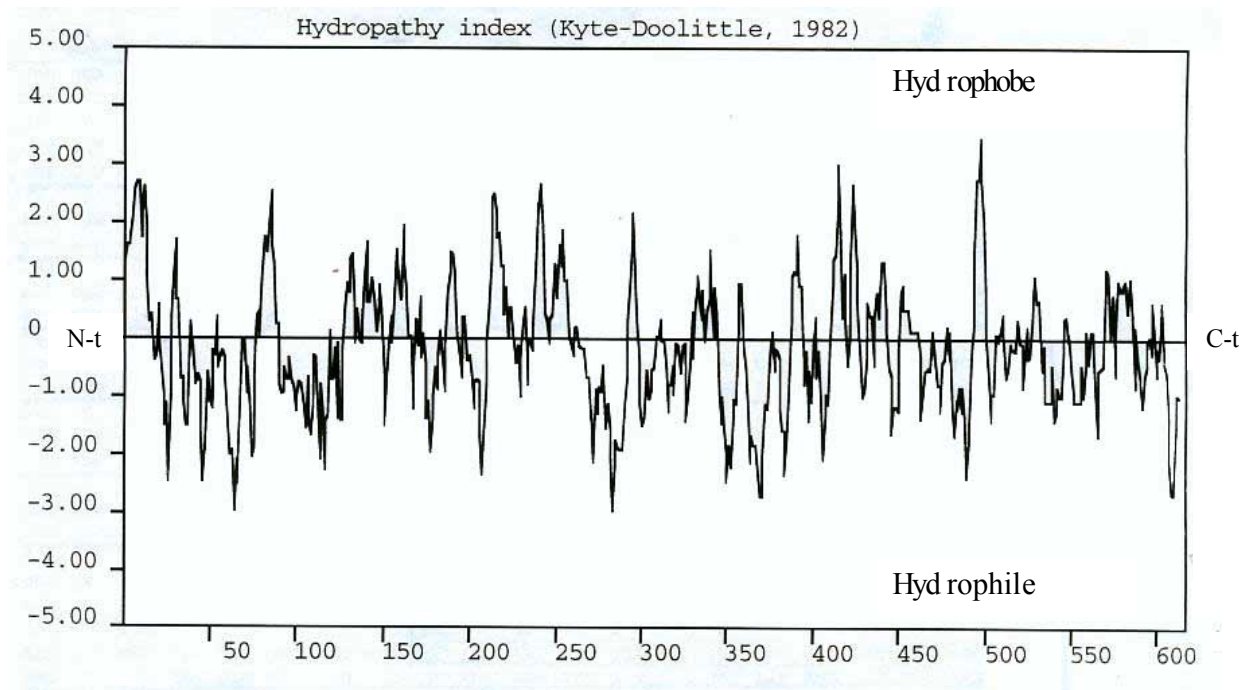


Figure (a) .

```

1 - MLLGKFLLLVA SFILPIAYTW TGATIRNHPA DVVAARNKIT SRSVARSEPT NSYIRPCYFT - 60
61 - NWAQYRQGRA KFPEDYTPG LCTHILFAFG WMNADYTVRA YDPADLPNDW AGEGRMYRRVN - 120
121 - KLKVTDTQLK TLLSFGGWSF GTALFQGMMA SSASRKVFID SAITFVRTWG FDGIDIDWEY - 180
181 - PSGATDMANY VALVKELKAA CESEAGSTGK DRLLVTAAVA AGPATIDAGY DIPNLAPNFD - 240
241 - FILLMSYDFE GAWASLVGFN SPLYATTELP AEWNGWNVDS SARYWNQKGM PKEKIIVGMP - 300
301 - TYGRGWLNN ASAINPGTSG SPAKITQYVQ EAGVGAYFEF CEMLANGATR YWDSQSQVPY - 360
361 - LVQGNQWWSY DDEESFANKM AYVKREGYGG AFVWTLDFDD FNAGCSNSNG QLYPLISVIA - 420
421 - KELGGVIIPK KGGVTTAPTT VATTVTTGRP PMTSAVTTTT AATTTTTTRAA TTTTASNTNV - 480
481 - CSGKSDGFYP NSNNCGLFVL CLSSKSYSMS CPSGLQYSAS LKYCTTSTAS GCSVTTTTRAP - 540
541 - TTTTKSAPTV TTTTRAPTTT TPAFKCTKDG FFGVPSDCLK FIRCVNGISY NFECPNGLSF - 600
601 - HADTMMCDRP DPSKCAK - 617

```

Figure (b)

Figure 17: (a) . Profil de la polarité des acides aminés du CHT-1. La partie N-terminale de cette séquence (N-t) est hydrophobe. Elle constitue le peptide signal de CHT-1. (b) : Séquence (acides aminés) du polypeptide CHT-1 . Le peptide signal (encadré) est composé de 19 acides aminés. Les deux régions riches en thréonine sont soulignées. Les deux régions riches en cystéine sont en gras.

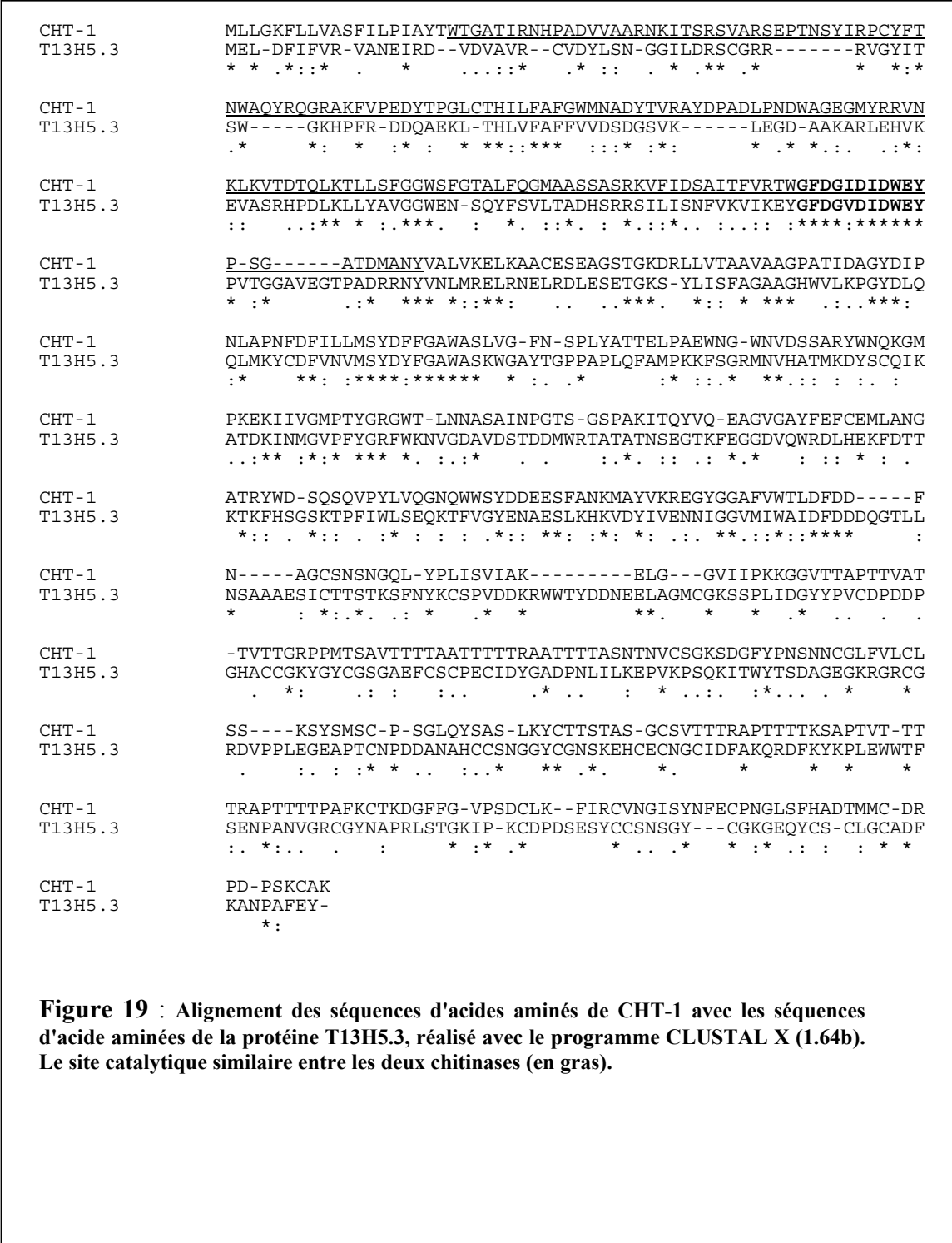
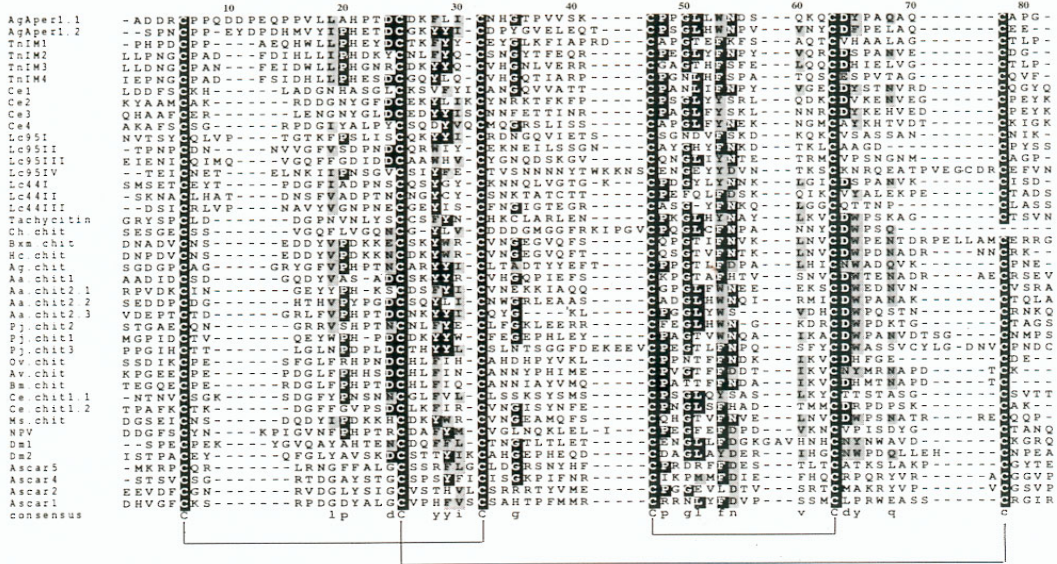


Figure 19 : Alignement des séquences d'acides aminés de CHT-1 avec les séquences d'acide aminées de la protéine T13H5.3, réalisé avec le programme CLUSTAL X (1.64b). Le site catalytique similaire entre les deux chitinases (en gras).

1	Caenorha-elegans	CHT-1	CSGKSDGFFYPNSNNCGLVILCLSSKSYSMSCPSPGLQYSASLKYCTTSTASGCSVTTTRAPTTTTTKSAPTIVTTTTTRAPTTTT
2	Caenorha-elegans	CHT-1	KC--TKDGGFFGVPSDDCLKFIRCVNGISYNFECPNGLSFHADTMWCDRDPDPSKCAK
3	Acanthoch-Viteae	38.2%	EEC-PE-DGLFPHSDCHLFINCANNYPHIMECPVG-TFFDDTIVCNRRNAPDTC--
3	Acanthoch-Viteae	38.1%	EEC-PE-DGLFPHSDCHLFINCANNYPHIMECPVG-TFFDDTIVCNRRNAPDTC--
4	Onchocera-Volvulus	42.2%	KC-PESFGLFRHPNDCHLFIHCADHPYVKLCPPNTFFNDKIKVC-----
5	Wuchere Bancrofti	39.7%	C-PEPFGVLPFPPTDCHLFIHCADHPYVKLCPPNTFFNDKIKVC-----
5	Brugia Malayi	39.3%	EC-PERDGLFPPPTDCHLFIHCADHPYVKLCPPNTFFNDKIKVC-----
6	Brugia pahangi	38.2%	EC-PERDGLFPPPTDCHLFIHCADHPYVKLCPPNTFFNDKIKVC-----
7	Brugia pahangi	38.2%	EC-PERDGLFPPPTDCHLFIHCADHPYVKLCPPNTFFNDKIKVC-----

Figure 20 a : Alignement des acides aminés de la région C-terminale de CHT-1 composée de deux domaines riches en cystéine avec les différents séquences C-terminales des chitinases identifiées chez des nématodes parasites.

A



B

T13H5.3 AGMCGKSSPLIDGYYPV-CDDDDPGHACCGKYGYCGSGAEFCSS-CPE--CIDYGADPNLILKEPVKPSQKITWYTS
T13H5.3 RGRGCRDVPPLLEGEAPT-CNPDDANAHCCSNGGYCGNSKEHCE--CNG--CIDFAKQRDFKYKPLEWWTFSNPAN
T13H5.3 VGRCGYNAPRLSTGKIPKCDPDESYS-CCSNNGYCGKGEQYCS--CLG--CADFKANPAFEY
Nt.chi -EQCGKQAGGAR-----CPSGM----CCSNFGWCGNTQDYCGPGKCQS-QCPSPG
Os.chit -EQCGSQAGGAL-----CPNCL----CCSQYGWCGSTSA YCGSG-CQS-QCSGSC
Zm.chit EQCGSQAGGAL-----CPNCL----CCSQFGWCGS-SDYCGSG-CQS-QCSAAC
WGA1 QRCGEQSGSME-----CPNNL----CCSQYGYCGMGGDYCGKG-CQNGACWT--
WGA2 KRCGSQAGGQT-----CPNNH----CCSQYGHCGFGAEYCGAG-CQGGPCRADI
WGA3 -KCGSQAGGQL-----CPNNL----CCSQWGYCGLGSEFCGEG-CQNGACSTDK
WGA4 -PCGKDAGGRV-----CTNNY----CCSKWGS CGIGPGYCGAG-CQSGGCDGVF

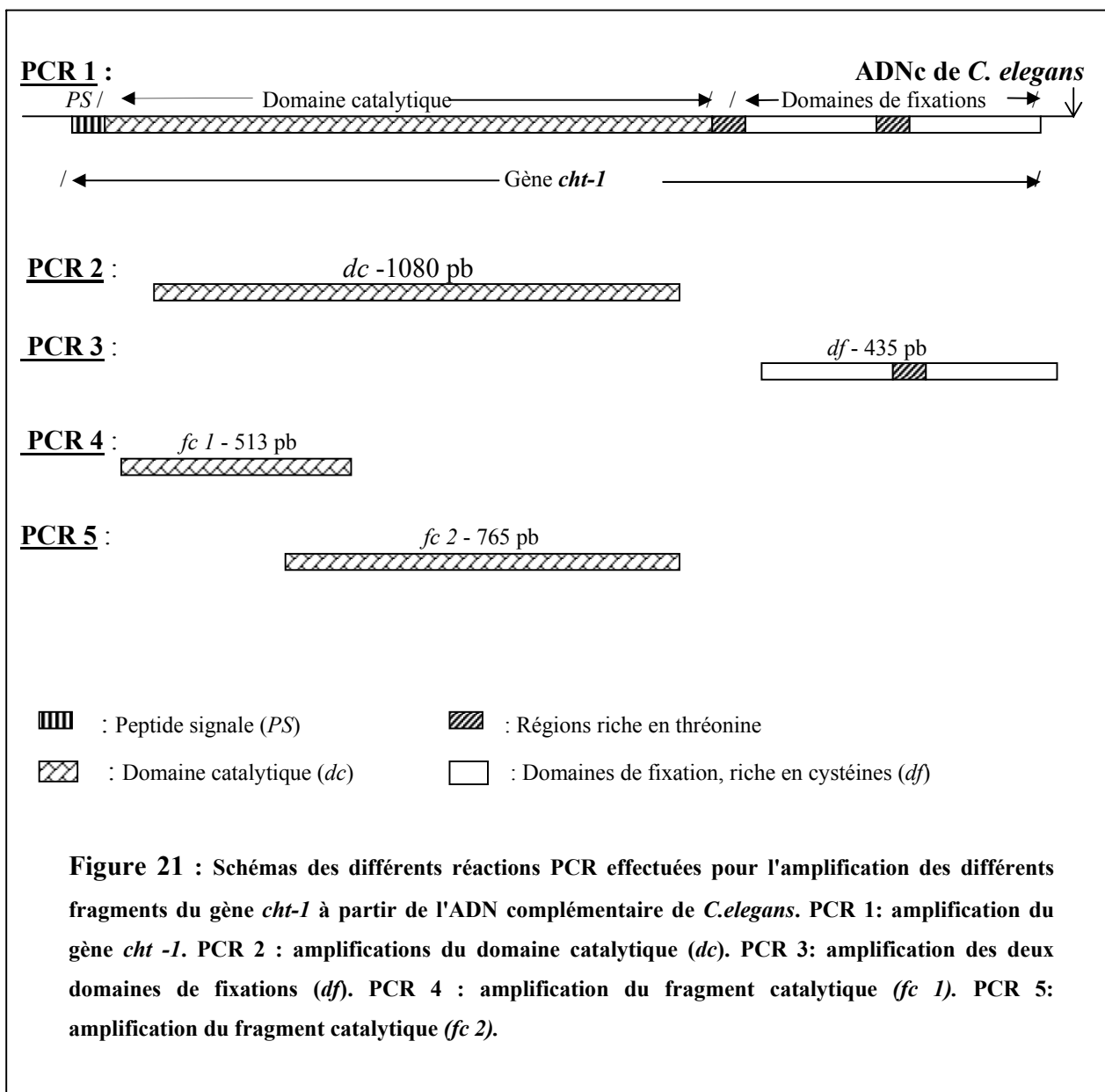
Figure 20 b : (A) Domaines de fixation des chitines d'invertébrés constitués généralement de 6 acides aminés cystéines. (B) Domaines de fixation des chitines des plantes composés de 8 cystéines conservées. Ces domaines se trouvent aussi dans les structures des chitinases de plantes et dans des lectines/agglutinines. Un gène *t13h5.3* de *C.elegans* possède trois domaines composées de 8 cystéines[124] modifier.

III . 2 - Isolation des deux domaines catalytique (*dc*) et de fixation (*df*):

En utilisant les primers Cat 1 et Cat 2 (**Fig. 16** et **21**), la réaction PCR a permis d'amplifier et d'isoler la séquence codant une partie N-terminale de la protéine CHT-1 appelée domaine catalytique (*dc*), soit environ 1100 pb (**Fig. 22**). Ce domaine fut cloné dans le plasmide pBluescript-T pour le séquençage. La composition de ce domaine amplifié correctement a été de 1080 pb. En utilisant deux autres primers Fix 1 et Fix 2 (**Fig.16** et **21**), la réaction PCR a permis l'isolation de la séquence codant une région C-terminale de la protéine CHT-1 appelée domaine de fixation (*df*), soit 450 pb (**Fig. 22**). Le séquençage de ce domaine (*df*) cloné dans le pBluescript-T a confirmé sa séquence de 435 pb codant pour deux régions riches en cystéines séparées par une région riche en thréonine.

Deux autres réactions PCR furent réalisées après avoir constaté des difficultés dans l'expression du domaine catalytique complet (*dc*). En effet, en utilisant les primers Frg 1 et Frg 2 (**Fig.16** et **21**), un fragment plus court appelé (*fc 1*) d'environ 500 pb fut isolé et cloné dans le plasmide pBluescript-T pour le séquençage. La **Fig.23** montre la migration de la bande amplifiée (*fc 1*) à environ 700 pb, mais le séquençage de ce fragment a révélé qu'il n'a que 513 pb. La bande d'environ 100 pb (**Fig. 23**) n'a pas été analysée.

Pour compléter la préparation du fragment catalytique, une dernière réaction d'amplification a été effectuée en utilisant les primers Frg 3 et Cat 2 (**Fig.16** et **21**). La migration du produit de l'amplification sur un gel d'agarose a montré une bande d'environ 1000 pb (**Fig. 24**). Le séquençage de ce fragment cloné dans le pBluescript-T a révélé sa séquence de 765 pb. Ce fragment a été nommé *fc 2*. Certaines réactions de PCR n'ont pas amplifié les fragments du gène *cht-1*. Dans ces circonstances, les conditions de la réaction de PCR ont été changées en diminuant de 2 à 5°C la température d'hybridation ou en ajoutant du MgCl₂. Les ADN plasmidiques (pBluescript-insert) obtenus par miniprep à partir des colonies bactériennes blanches ont été digérés par les enzymes de restrictions dans le but de vérifier la présence de l'insert. Certains ADN plasmidiques ne contenaient pas d'insert et ceci malgré leur isolation à partir des colonies blanches (**Fig. 25**). L'alignement des séquences amplifiées a démontré que certaines séquences ont présenté un nucléotide modifié. Ces clones ont été éliminés et ceux qui présentaient une séquence correcte et similaire correspondant à la séquence originale ont été stockés.



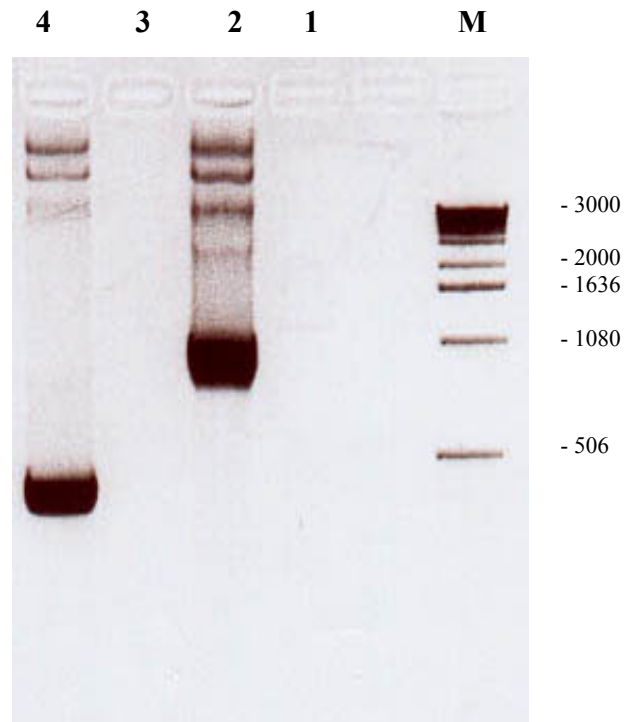


Figure 22 : Amplification par PCR du domaine catalytique (*dc*) 1080 pb et du domaine de fixation (*df*) 435 pb à partir de l'ADNc de *C.elegans*. puit M : marqueurs de poids moléculaires en paire de base . Puit 1 : contrôle négatif. Puit 2: amplification du domaine catalytique (*dc*) en utilisant les deux primers Cat 1 et Cat 2. Puit 3 : contrôle négatif. Ligne 4: amplification du domaine de fixation (*df*) en utilisant les deux primers Fix 1 et Fix 2. Photo inversée.

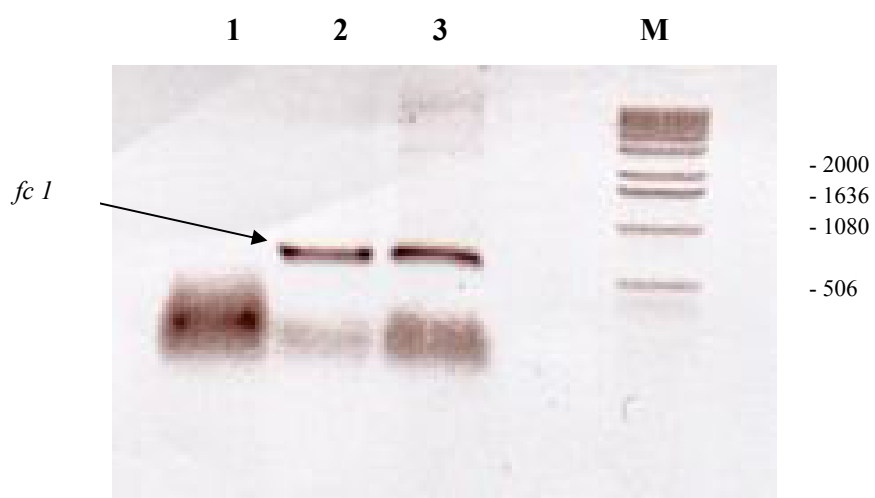


Figure 23 : Amplification par PCR du fragment catalytique (*fc I*) de 513 pb à partir de l'ADNc de *C.elegans*. Puit 1 : contrôle négatif. Puits 2 et 3 : amplification du fragment catalytique (*fc I*) en utilisant les deux primers Cat 1 et Cat 2. Puit M : marqueurs de poids moléculaires en paire de base.

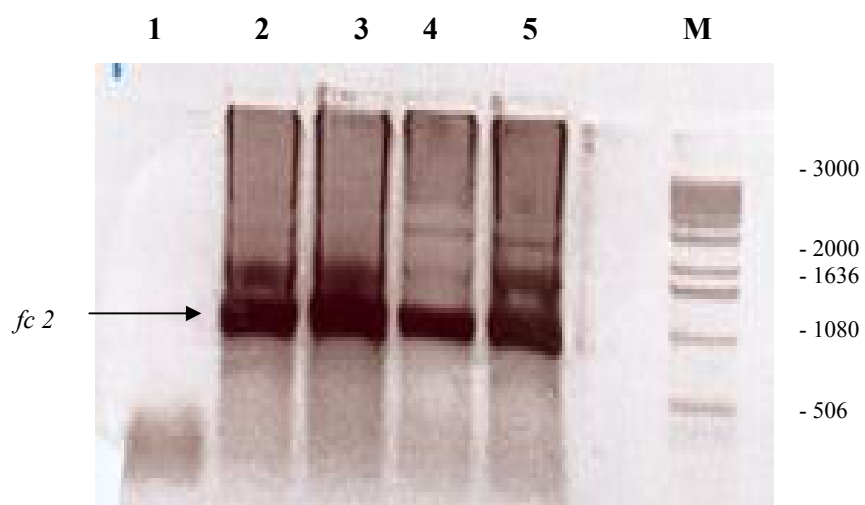


Figure 24 : Amplification par PCR du fragment catalytique (*fc2*) de 765 pb à partir de l'ADNc de *C.elegans*. Puit 1 : contrôle négatif. Puits 2 et 3: amplification du fragment catalytique (*fc 2*) réalisée avec 2 µl d'ADNc. Puits 4 et 5: amplifications du fragment catalytique (*fc 2*) réalisées avec 1 µl d'ADNc Puit M : marqueurs de poids moléculaires en paire de base.

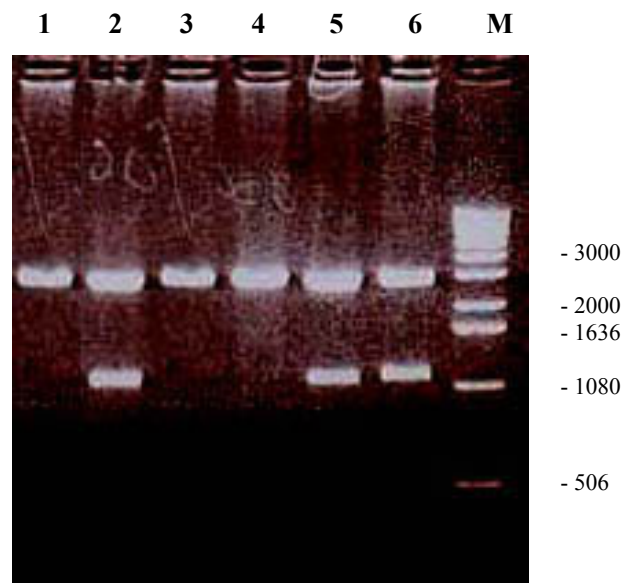


Figure 25 : Digestions enzymatiques par EcoR I et BgI II des différents plasmides (pBluescript - *dc*), obtenues par minipreps à partir des colonies (blanches) bactériennes transformées. Puit 1 : contrôle négatif. Puits 2, 3, 4, 5 et 6 : (pBluescript - *dc*) digérés par EcoR I et BgI II. Ligne M : marqueurs de poids moléculaires en paire de base.

III . 3 - Expression des fragments du gène *cht-1* et purification des protéines

recombinantes :

L'expression du gène *cechi 1* en deux fragments DC et DF séparés a été effectuée avec le plasmide pGEX-2T. L'induction à l'IPTG des cellules transformées avec le plasmide (pGEX 2T-*dc*) a révélé dans le profil protéique (**Fig. 26**) une bande d'environ 50 kDa qui représente la protéine de fusion GST-DC. Cette bande est absente dans le profil protéique des cellules transformées et non induites. Une autre bande protéique d'environ 40 kDa qui représente la protéine de fusion GST-DF a été révélée dans le profil protéique (**Fig. 27**) des cellules bactériennes transformées avec le plasmide (pGEX 2T-*df*) et induites à l'IPTG. Cette bande est absente sur le profil protéique des cellules non induites (contrôle). Des billes de glutathion-agarose spécifiques ont été utilisées pour purifier les deux protéines de fusions GST-DC et GST-DF. Mais les deux protéines de fusions n'ont pas pu être récupérées. Une purification des corps d'inclusions (protéines insolubles) a donc été envisagée mais également sans succès. Les deux protéines de fusions ont été finalement purifiées par une électro-élution, suivies par une digestion avec la thrombine dans le but d'éliminer la GST et d'obtenir les deux protéines DC et DF pures.

La protéine de fusion GST-DC n'a pas été digérée malgré plusieurs améliorations dans les conditions de la digestion et ceci en présence de la thrombine (37 kDa) et de la protéine de fusion GST-DC (50 kDa) (**Fig. 28**). Par contre, la digestion de la protéine de fusion GST-DF avec la thrombine fut positive, (**Fig.29**) avec une bande de 28 kDa qui correspond à la GST et une bande protéique d'environ 20 kDa qui représente la protéine DF séparée de la GST. Une autre bande protéique non identifiée d'environ 26 kDa a été trouvée. La bande d'environ 50 kDa représente la protéine de fusion GST-DF purifiée et non digérée.

Pour exprimer et purifier le domaine catalytique DC, ce dernier fut cloné dans le pGEX-2T sous forme de deux fragments *fc1* et *fc 2* en prenant l'ADN correspondant. L'induction des cellules transformées avec le plasmide (pGEX 2T-*fc 1*) a donné un profil protéique avec une bande induite d'environ 42 kDa (**Fig. 30**) qui représente la protéine de fusion GST-FC1. Le contrôle non induit fut négatif.

L'induction des cellules transformées avec le plasmide (pGEX-2T-*fc 2*) a présenté une grande bande protéique d'environ 50 kDa qui correspond à la protéine de fusion GST-FC 2 (**Fig. 31**). Deux autres bandes protéiques d'environ 40 et 42 kDa non identifiées ont été révélées sur ce même profil. Le contrôle non induit était négatif. Des cellules transformées avec le plasmide

pGEX-2T sans insert ont présenté après induction une bande protéique d'environ 28 kDa qui correspond à la GST. Les cellules transformées et non induites (contrôle négatif) n'ont pas présenté cette bande protéique. Les deux protéines de fusion GST-FC1 (42 kDa) et GST-FC 2 (50 kDa) obtenu après induction (**Fig. 32**) ont été purifiées par électro-élution à partir des gels de SDS-PAGE.

La digestion de la protéine de fusions GST-FC 1 par la thrombine fut partielle. La GST (28 kDa), la protéine FC 1 (21.5 kDa), la thrombine (37 kDa) et la protéine de fusion GST-FC 1 purifiée (42 kDa) ont été identifiés (**Fig. 33**), ceci démontre que la digestion a réussi. Par contre, la digestion de la protéine de fusion GST-FC 2 avec la thrombine fut négative (**Fig. 34**), malgré la présence de la GST-FC 2 (50 kDa) et de la thrombine (37 kDa).

Des gels préparatifs pour isoler les bandes protéiques FC 1 et DF ont été utilisés, suivis par une électro-élution et un dosage des protéines. La protéine DC a ainsi été préparée dans une quantité de 0.30 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ pour un volume total de 1 ml et la protéine DF a été préparée dans une quantité de 0.47 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ pour un volume total de 1.2 ml.

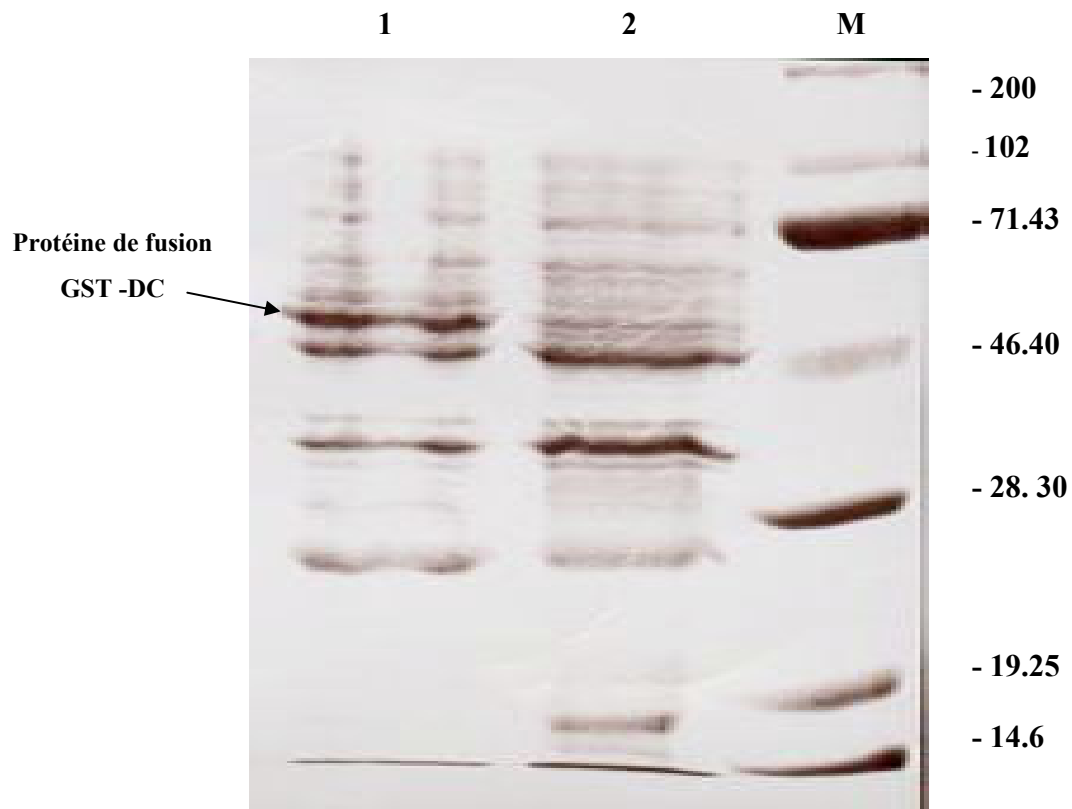


Figure 26 : Profil des protéines bactériennes sur un gel (SDS – PAGE) de 12 % (5 x 8) cm. Puit 1 : protéines des cellules bactériennes transformées avec (pGEX- 2T- *dc*) avec induction à l'IPTG. Puit 2 : contrôle, sans induction. Puit M : Marqueur de poids moléculaires en kDa (BRL)

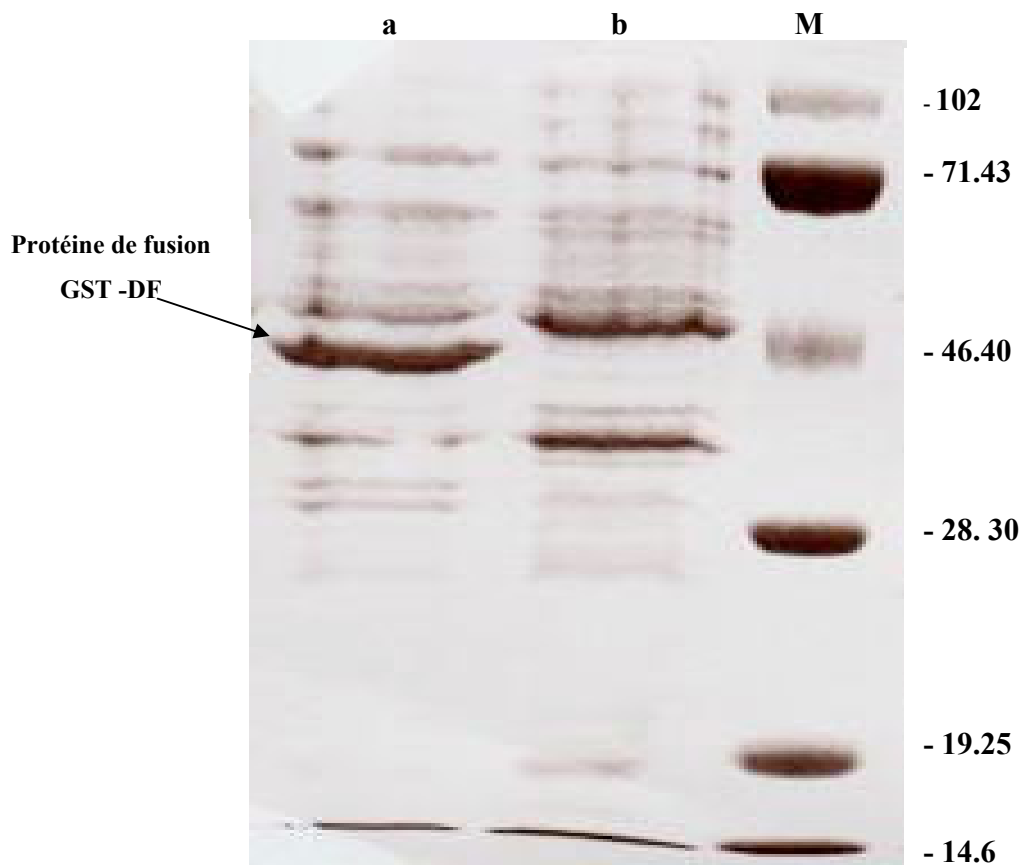


Figure 27 : Profil des protéines bactériennes sur un gel (SDS – PAGE) de 12 % (5 x 8) cm. Puit (a) : protéines des cellules bactériennes transformées avec (pGEX 2T- *df*) avec induction à l'IPTG. Puit (b) : contrôle, sans induction. Puit M: Marqueur de poids moléculaires en kDa (BRL)

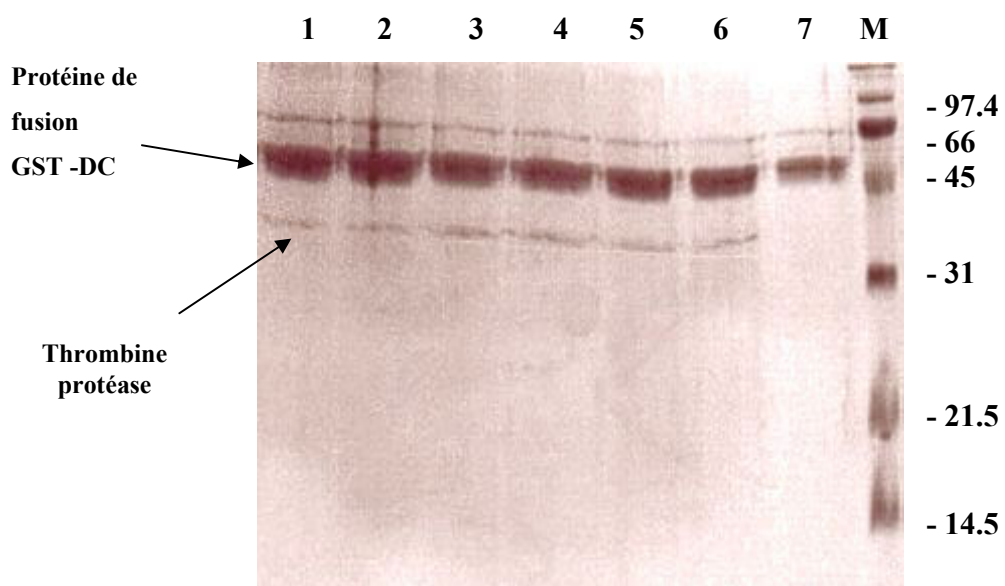


Figure 28 : Profil de la protéine de fusion (GST – DC) purifiée et sa digestion avec la thrombine [150]. Photo d'un gel (SDS –PAGE) 12 % (5 x 8) cm. Puits 1, 2, 3, 4, 5 et 6 : protéine de fusion (GST – DC) après incubation avec la thrombine. Puit 7 : contrôle (GST – DC) purifiée non digérée. Puit M : Marqueur de poids moléculaires en kDa (BIO-RAD)

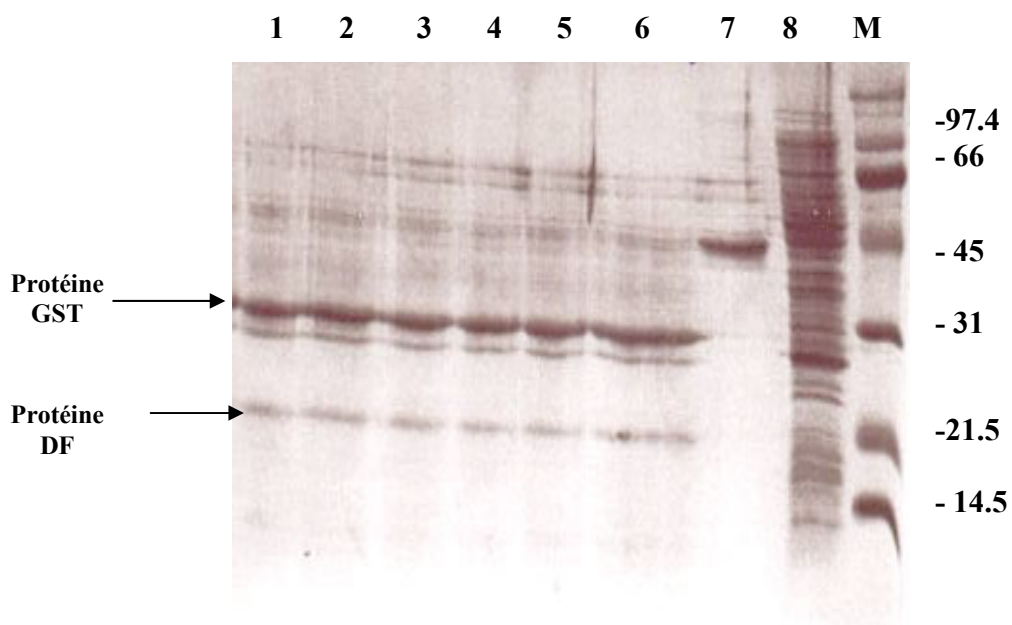


Figure 29 : Profil de la protéine de fusion (GST – DF) purifiée et sa digestion avec la thrombine. Photo d'un gel (SDS –PAGE) 12 % (5 x 8) cm. Puits 1, 2, 3, 4, 5 et 6 : protéines de fusion (GST – DF) après incubation avec la thrombine protéase. Puit 7 : contrôle (GST – DF) purifiée non digérée. Ligne 8 : protéines des cellules bactériennes transformées avec (pGEX 2T- *df*) sans induction à l'IPTG. Puit M : Marqueur de poids moléculaires en kDa (BIO-RAD)

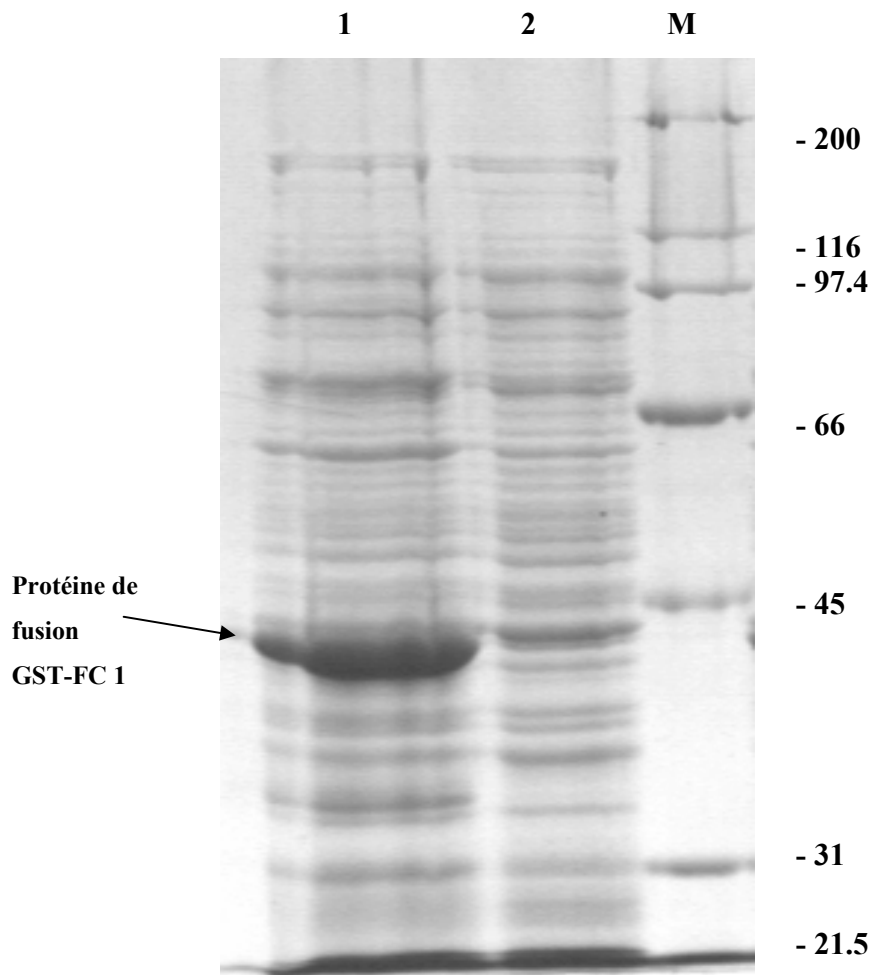


Figure 30 : Profil des protéines bactériennes sur un gel (SDS – PAGE) de 12 % (5 x 8) cm. Puit 1 : protéines des cellules bactériennes transformées avec (pGEX 2T- *fc 1*), avec induction à l'IPTG. Puit 2 : contrôle négatif, sans induction. Puit M : Marqueur de poids moléculaires en kDa (BIO-RAD)

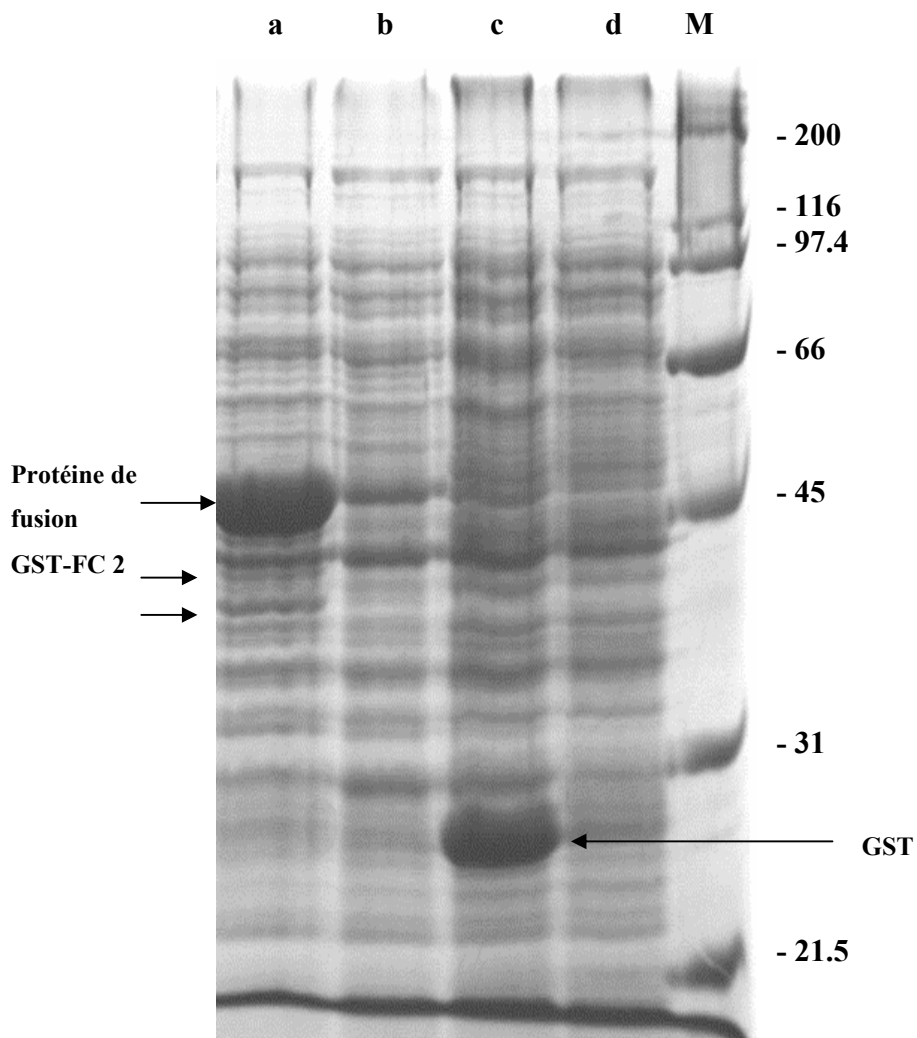


Figure 31 : Profil des protéines bactériennes sur un gel (SDS – PAGE) de 12 % (5 x 8) cm. Puit (a) : protéines des cellules bactériennes transformées avec (pGEX 2T-*fc 2*), avec induction à l'IPTG. Puit (b) : contrôle négatif, sans induction. Puit (c) : protéines des cellules bactériennes transformées avec pGEX 2T (sans insert) avec induction à l'IPTG (témoin) Puit (d) : protéines des cellules bactériennes transformées avec pGex 2T (sans insert) sans induction à l'IPTG (témoin) Puit M : Marqueur de poids moléculaires en kDa (BIO-RAD)

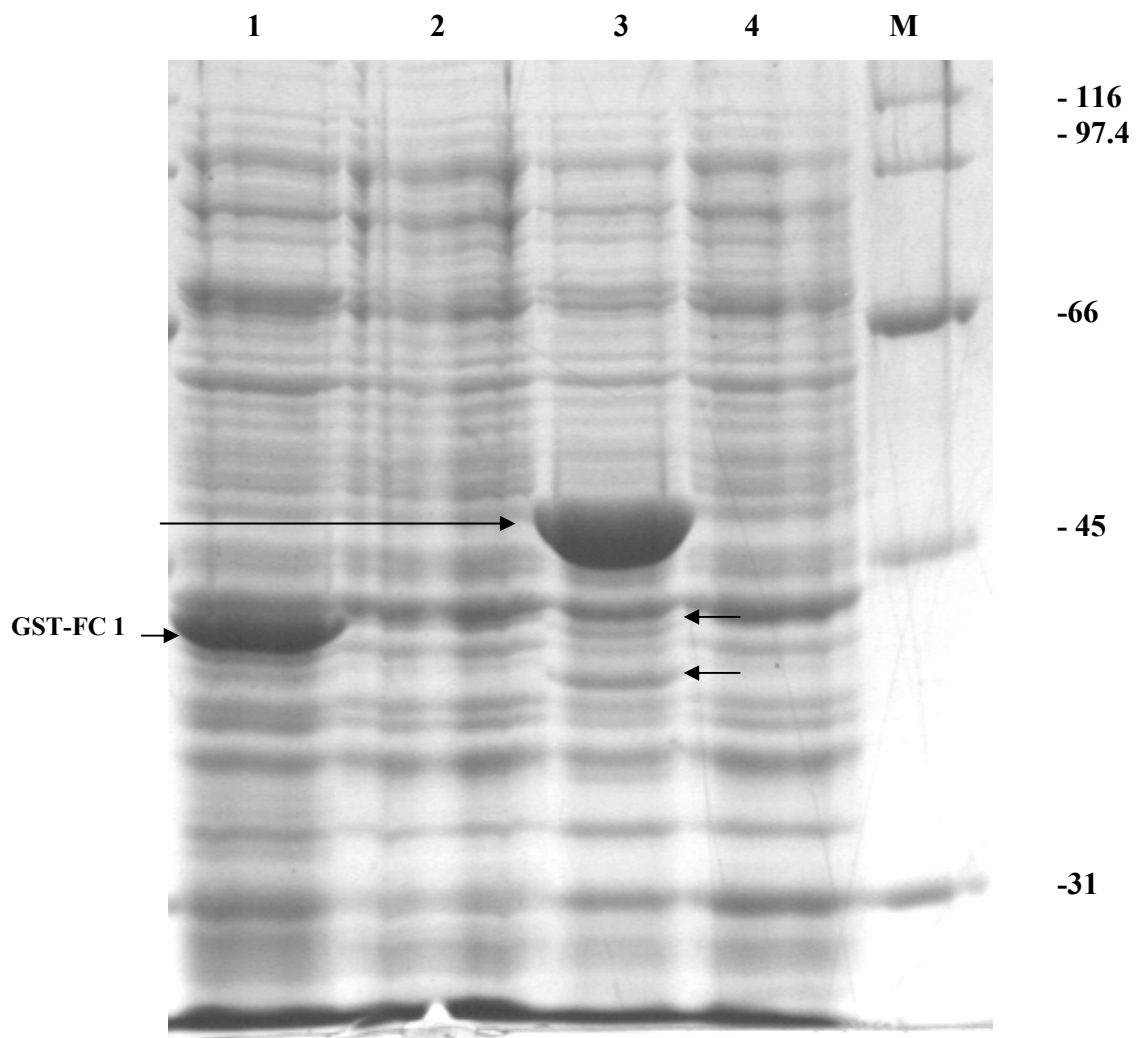


Figure 32 : Profil des protéines bactériennes sur un gel (SDS – PAGE) de 10 % (5 x 8) cm. Puit 1 : protéines des cellules bactériennes transformées avec (pGEX 2T- *fc 1*) avec induction à l'IPTG. Puit 2 : contrôle négatif, sans induction de (pGEX 2T- *fc 1*). Puit 3: protéines des cellules bactériennes transformées avec (pGEX 2T-*fc 2*), avec induction à l'IPTG. Puit 4 : contrôle négatif, sans induction. Puit M : Marqueur de poids moléculaires en kDa (BIO-RAD).

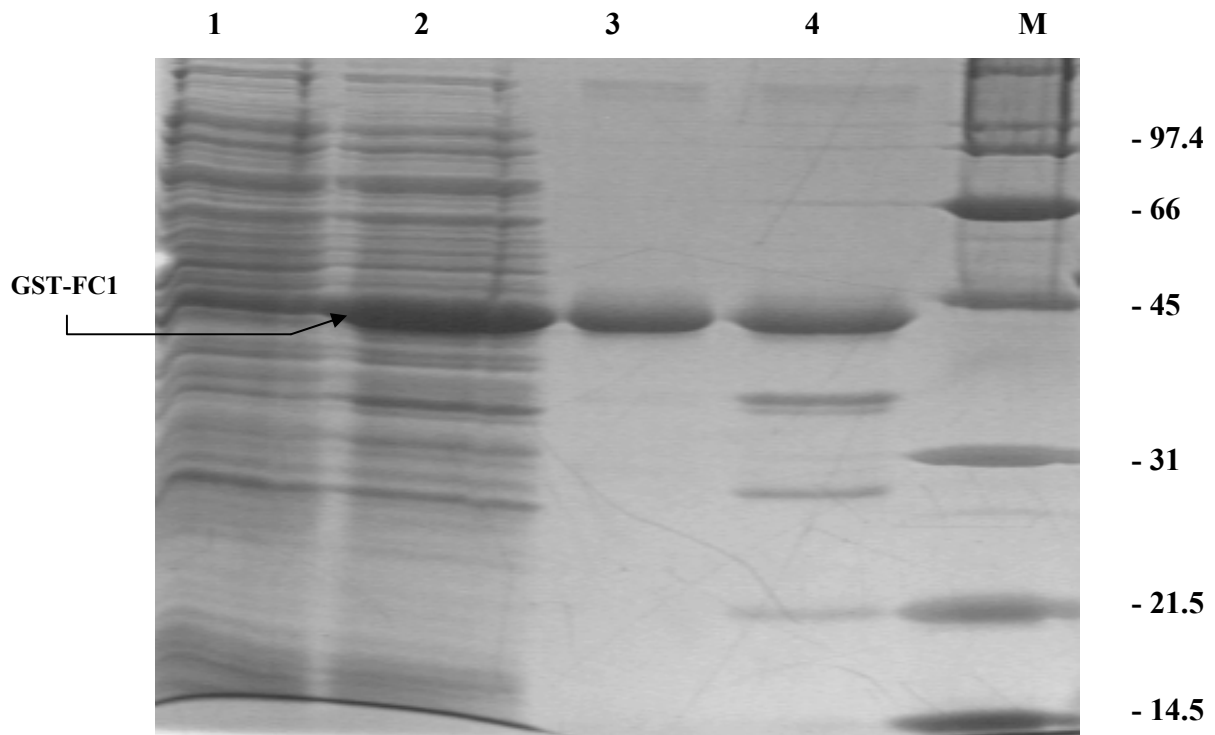


Figure 33 : Profil protéique de l'expression, la purification et la digestion de la protéine de fusion (GST – FC 1) sur un gel (SDS – PAGE) de 12 % (5x8) cm. Puit 1: protéines des cellules bactériennes transformées avec (pGEX 2T- *fc 1*), sans induction à l'IPTG (contrôle). Puit 2: protéines des cellules bactériennes transformées avec (pGEX 2T-*fc 1*), avec induction à l'IPTG. Puit 3 : protéine de fusion (GST – FC 1) purifiée (42 kDa) non digérée. Puit 4 : protéine de fusion (GST – FC 1) digérée partiellement avec la thrombine protéase : thrombine (37 kDa), GST (28 kDa) et la protéine FC 1 (21.5 kDa). Puit M : Marqueur de poids moléculaires en kDa (BIO-RAD).

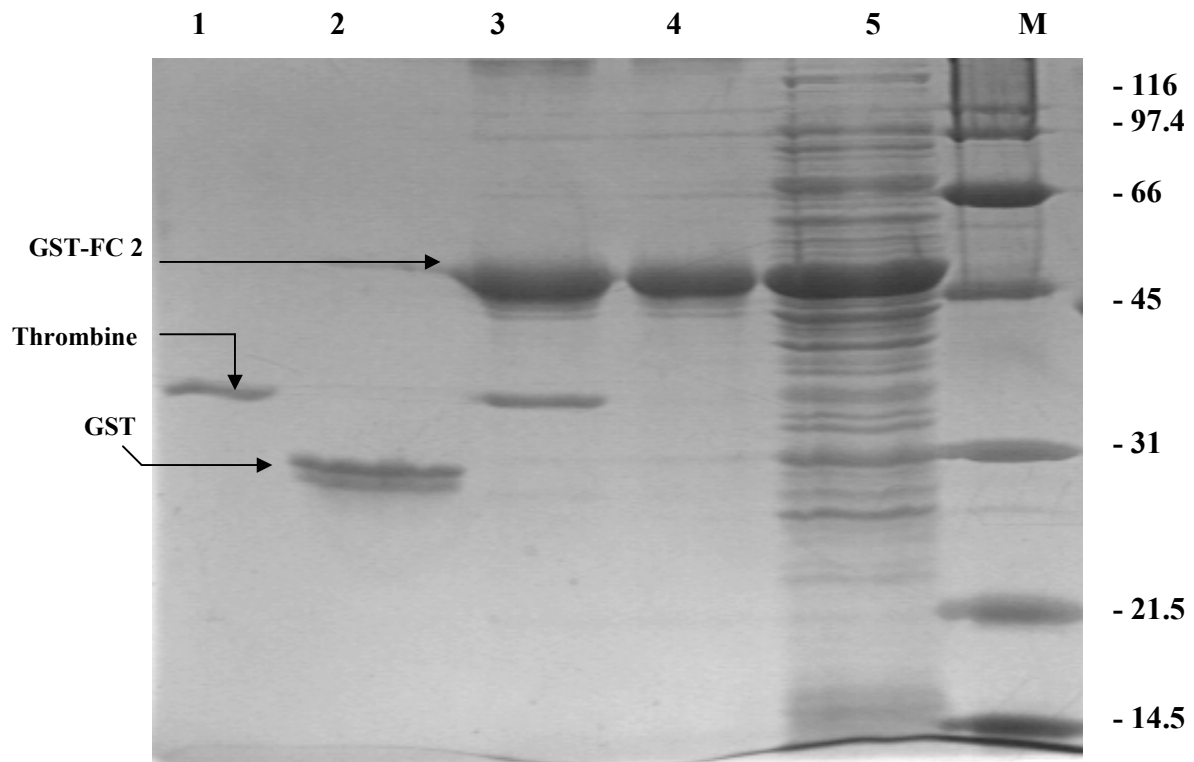


Figure 34 : Profil protéique de l'expression, la purification et la digestion de la protéine de fusion (GST – FC 2) sur un gel (SDS – PAGE) de 12 % (5 x 8) cm. Puit 1: thrombine (37 kDa). Puit 2 : protéine GST (28 kDa). Puit 3 : protéine de fusion (GST – FC 2) incubée avec la thrombine protéase. Puit 4 : protéine de fusion (GST – FC 2) purifiée (50 kDa) non digérée (contrôle). Puit 5 : protéines des cellules bactériennes transformées avec (pGeEX2T- *fc 2*), avec induction à l'IPTG. Puit M : Marqueur de poids moléculaires en kDa (BIO-RAD).

III . 4 - Production des anticorps contre des peptides de la chitinase CHT-1 et caractérisation de leur spécificité :

L'immunisation des souris Balb/C avec 4 x 50 µg d'antigène (protéine DF) n'a pas donné des anticorps anti-DF spécifiques. L'immunisation des souris (C 57/bl) avec 3 x 100 µg du même antigène a permis la détection des anticorps à partir du 28^{ème} jour après la première injection (**Fig.35**). Les westerns blots effectués avec les sérums de la 3, 4 et de la 5^{ème} semaine après la première injection démontrent une forte réaction avec un antigène d'environ 42 kDa, ce qui correspond à la masse moléculaire de la protéine de fusion GST-DF. Deux autres antigènes d'environ 30 et 35 kDa ont réagi aussi avec cet anticorps, ces dernière pourraient correspondre à des réactions avec la protéine GST (28 kDa) et la GST liée à un fragment DF (35 kDa). Le sérum du 35^{ème} jour a réagi avec la protéine DF purifiée (20 kDa). Par contre aucune réaction n'a été observée avec le sérum natif (0 jour) sur la protéine de fusion GST-DF. 700 µl de sérum contenant les anticorps anti-DF ont été récoltés.

L'antigène anti-FC 1 a été utilisé pour l'immunisation des souris Balb/C. Les westerns blots réalisés ont démontré la présence des anticorps anti-FC 1 à partir du 28^{ème} jour après la première injection (**Fig.36**). Les séras prélevés la 4 et la 5^{ème} semaine ont démontré une forte réaction avec la protéine FC 1 purifiée, par contre, aucune réaction n'a été observée avec le sérum natif sur la même protéine FC 1. 850 µl de sérum contenant les anticorps anti-FC 1 ont été récoltés et stockés a - 20°C.

Les anticorps produits contre les fragments FC 1 et DF ont réagi avec les antigènes des stades larvaires de *C.elegans*, mais pas avec les protéines des œufs ni des adultes. L'anticorps anti-FC 1 a reconnu deux bandes protéiques d'environ 45 et 60 kDa (**Fig.37**), alors que l'anticorps anti-DF a réagi avec une seule bande de 45 kDa (**Fig.38**). Vu que la bande protéique de 45 kDa a réagi avec les deux anticorps anti – FC 1 et anti – DF, un test immunoblot a été effectué sur un seul gel de polyacrylamide. Le profil protéique (**Fig.39**) a démontré que l'extrait des œufs ne contient pas de protéine visible, alors que le profil des stades larvaires démontre des caractéristiques qui sont différentes de ceux des stades adultes. Le test immunoblot (**Fig.40**) a présenté les mêmes résultats obtenus précédemment, et confirme l'identité de la taille de la bande 45 kDa reconnus par les deux anticorps.

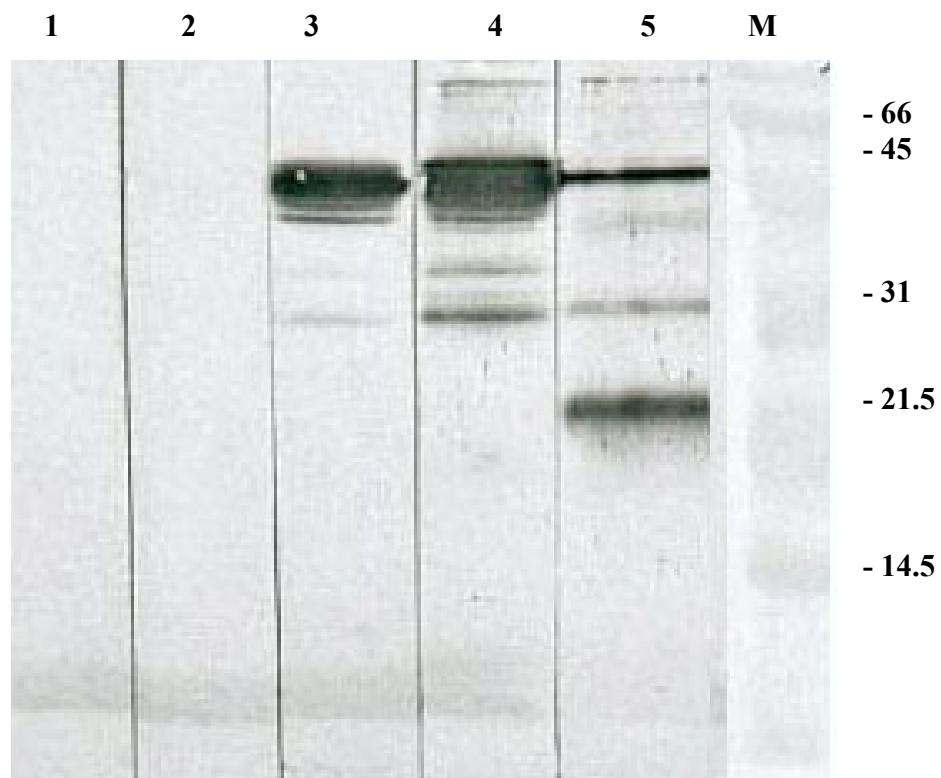


Figure 35 : Immunoblot sur un gel de 12 % en utilisant les serums de souris C57 immunisés avec l'antigène DF. Lignes (1-4) : protéine de fusion (GST-DF). Ligne 5 : protéine DF purifiée. Contrôle avec le sérum de souris non immunisée (1), serum récolté le 21 (2), le 28 (3) et le 35^{ème} (4 et 5) jour après la première immunisation. Ligne M : Marqueur de poids moléculaires en kDa (BIO-RAD).

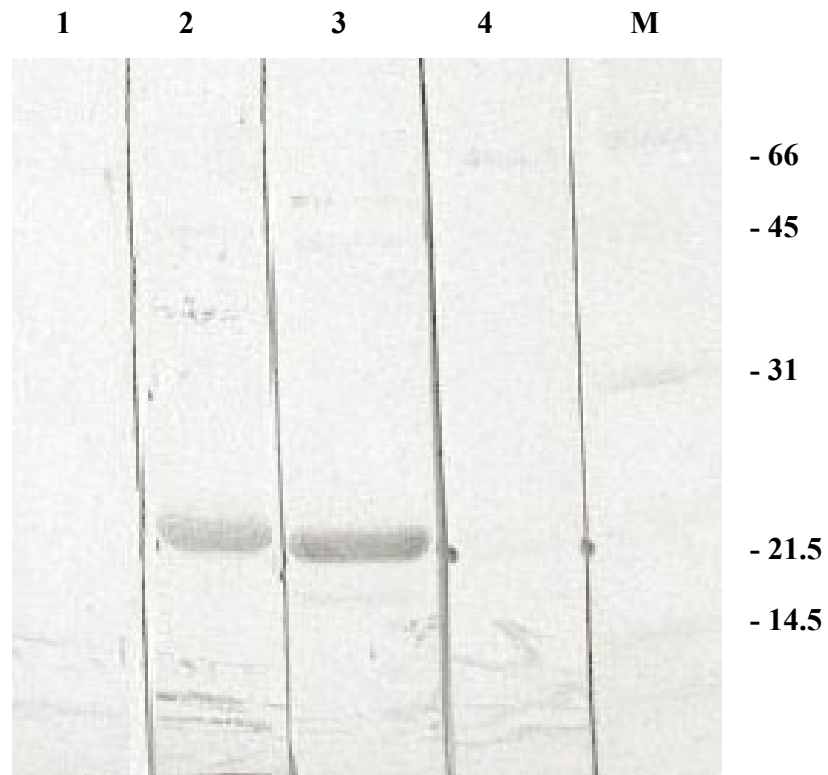


Figure 36 : Immunoblot sur un gel de 12 % en utilisant les serums de souris Balb/C immunisés avec l'antigène FC 1 purifié. Lignes (1 - 4) : protéine FC 1 purifiée. Sérum récolté le 21 (1), le 28 (2) et le 34^{ème} (3) jour. Contrôle avec le sérum de souris non immunisée (4). Ligne M : Marqueur de poids moléculaires en kDa (BIO-RAD).

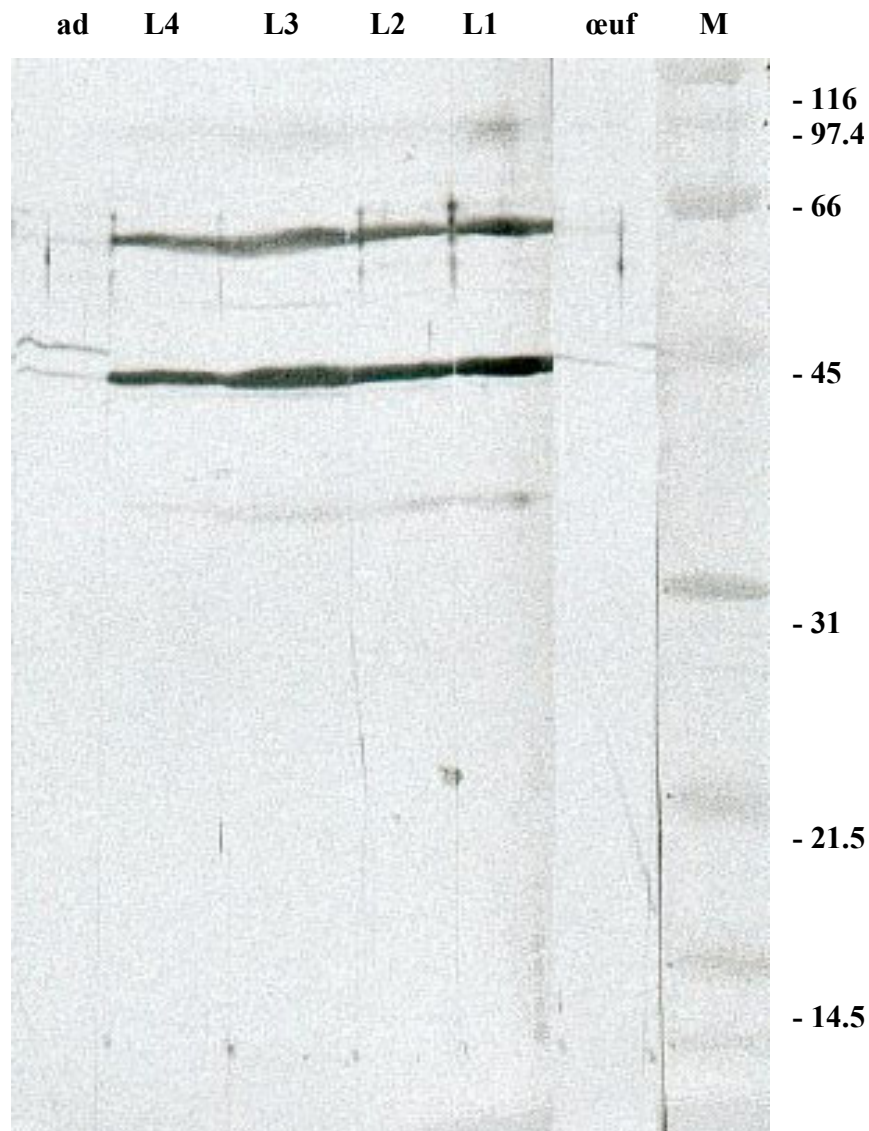


Figure 37 : Immunoblot sur un gel de 12 % en utilisant les anticorps anti - FC 1 contre les protéines des différents stades de développement de *C.elegans*. Lignes (L1 - L4) : réaction positive des anticorps anti-FC 1 avec deux bandes protéiques de 45 et 60 kDa présentes dans les stades de développement (L1 - L4) de *C. elegans*.. Ligne (œuf) : réaction négative des Ac anti - FC 1 avec les protéines du stade œufs de *C.elegans*. Ligne (ad) : réaction négative des Ac anti - FC 1 avec les protéines du stade adulte. Ligne M : Marqueur de poids moléculaires en kDa (BIO-RAD).

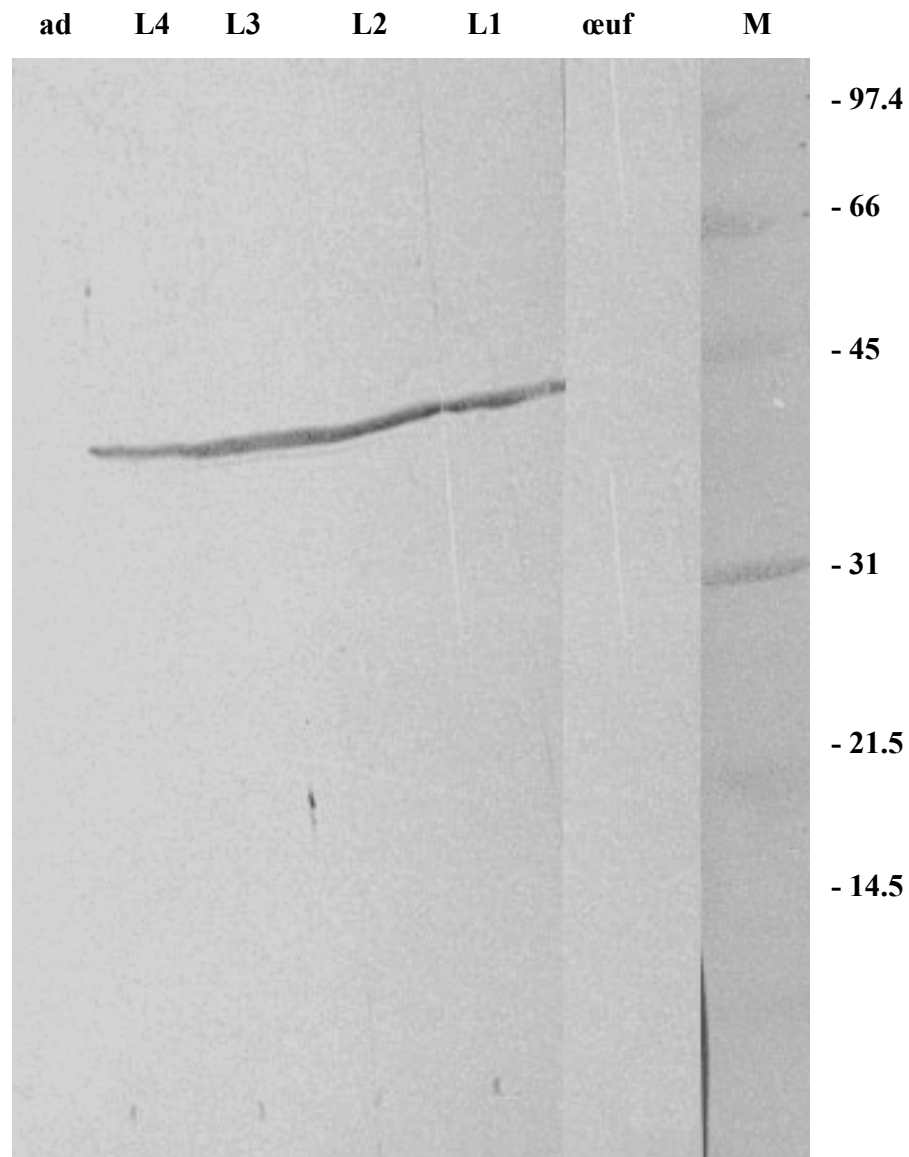


Figure 38 : Immunoblot sur un gel de 12 % en utilisant les anticorps anti - DF contre les protéines des différents stades de développement de *C.elegans*. Lignes (L1 - L4) : réaction positive des anticorps anti-DF avec une bande protéique de 45 kDa présente dans les stades de développement (L1 - L4) de *C. elegans*.. Ligne (œuf) : réaction négative des Ac anti - DF avec les protéines du stade œufs de *C.elegans*. Ligne (ad) : réaction négative des Ac anti - DF avec les protéines du stade adulte. Ligne M : Marqueur de poids moléculaires en kDa (BIO-RAD).

Figure 39 : Profil protéique des différents stades de développement de *C.elegans* sur un gel (SDS – PAGE) de 12 % (20 x 20) cm. Ligne M : Marqueur de poids moléculaires en kDa (BIO-RAD). Lignes (œuf, L1, L2, L3, L4 et adulte) : Protéines des différents stades de développement de *C.elegans*

Figure 40 : Immunoblot sur un gel (SDS-PAGE) 12 % (20 x 20) cm. Ligne M : Marqueur de poids moléculaires en kDa (BIO-RAD). Lignes (L1- L4) : réaction positive des Ac anti – DF avec une protéine de 45 kDa présente dans les stades de développement (L1 - L4 de *C.elegans*. Ligne (ad) : réaction négative des Ac anti – DF avec les protéines du stade adulte de *C.elegans*. Ligne (œuf) : réaction négative des Ac anti – DF avec les protéines du stade œufs de *C.elegans*. Lignes (L1' - L4') : réaction positive des Ac anti – FC 1 avec deux protéines de 45 et 60 kDa présentes dans les stades de développement (L1' - L4') de *C.elegans*. Ligne (ad') : réaction négative des Ac anti – FC 1 avec les protéines du stade adulte de *C.elegans*. Ligne (œuf') : réaction négative des Ac anti – FC 1 avec les protéines du stade œufs de *C.elegans*.

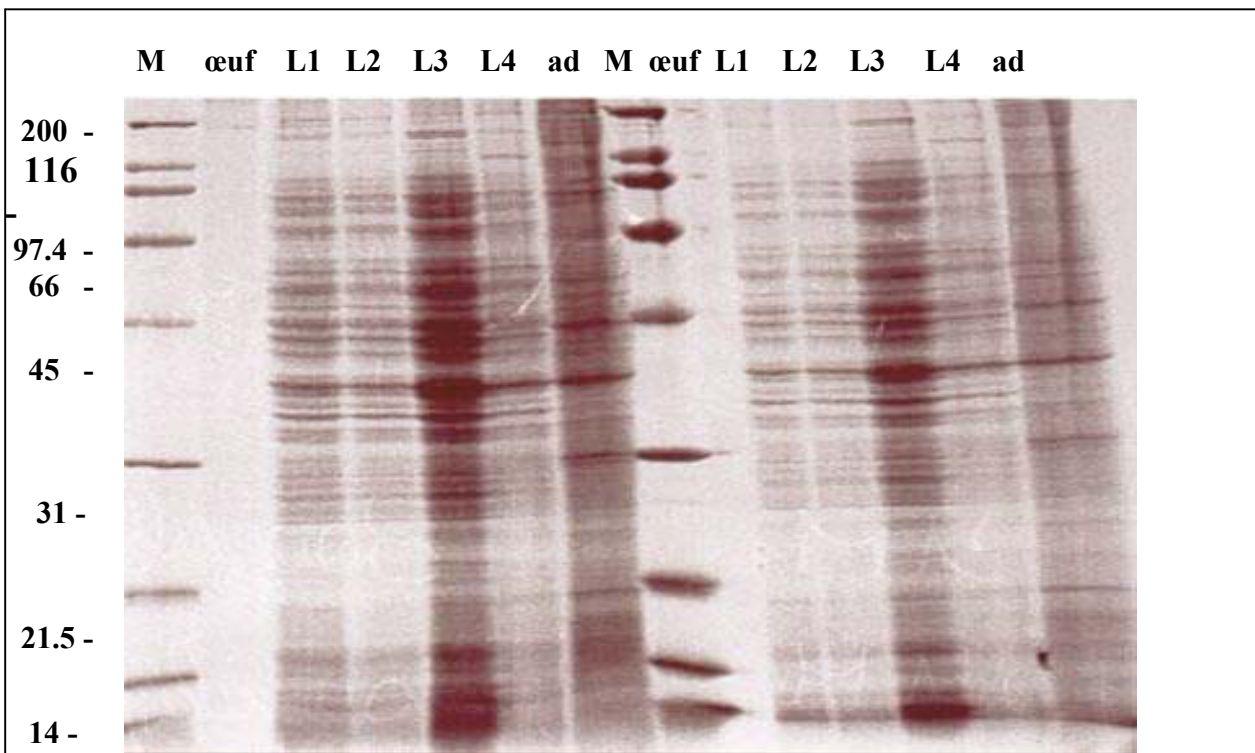


Figure 39.

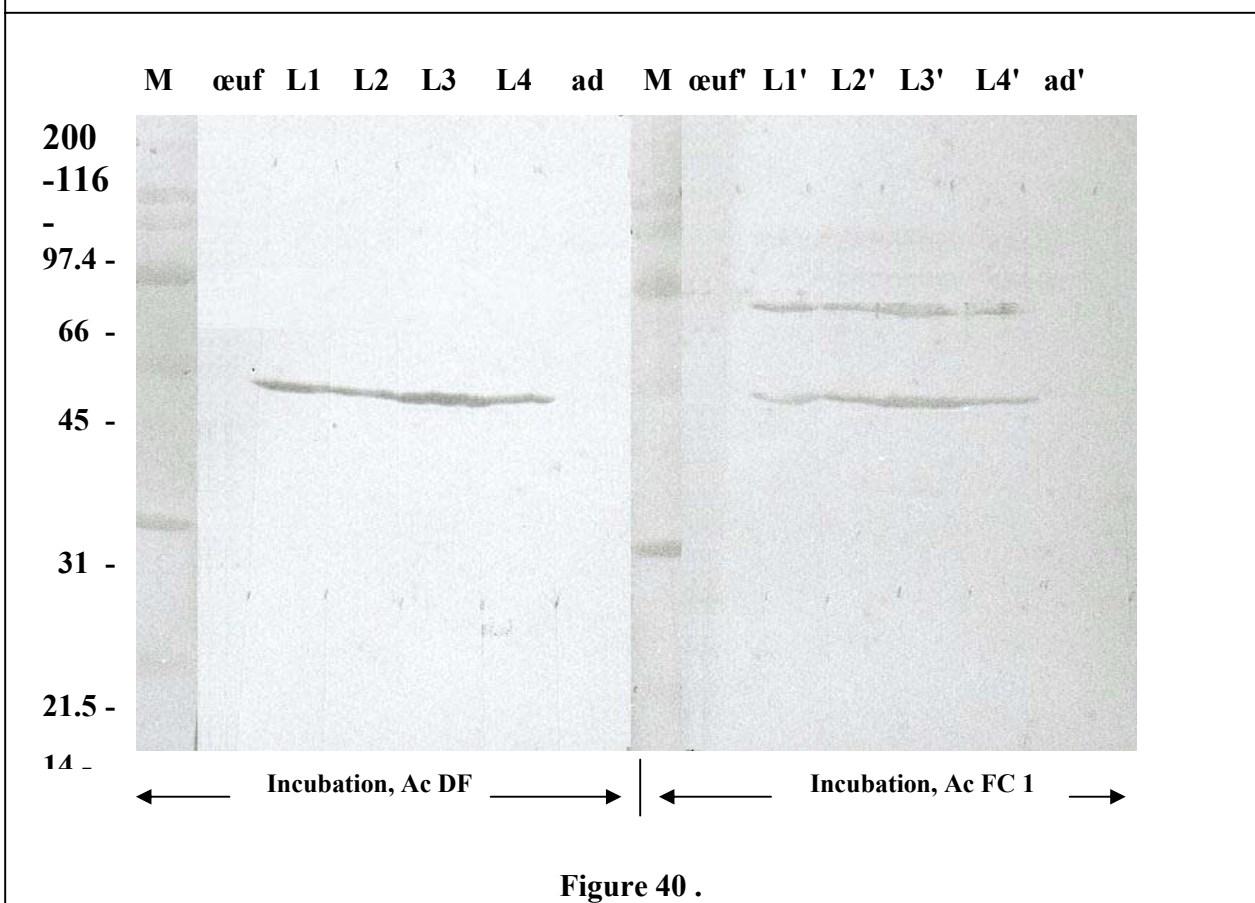


Figure 40 .

III . 5 - Protéine de fusion verte fluorescente (GFP) :

La localisation de la chitinase CHT-1 chez *C. elegans* a été effectuée par l'utilisation de la protéine GFP (green fluorescence protéine). Les vers transformés roller ont été prélevés et visualisés au microscope. Une autofluorescence a été observée au niveau de la région antérieure des vers vivants *non transformés* (contrôle) (**Fig.41**), les vers transformés roller ont présenté la même fluorescence au microscope confocal.

Plusieurs travaux de recherches ont utilisé la GFP pour la localisation de plusieurs protéines chez *C.elegans* par exemple, le travail d'Hodgkin et Herman qui ont ainsi localisé un gène de développement chez *C.elegans* [135]. Dans le cadre de cette thèse, cette méthode alternative de localisation de CHT-1 a été effectuée avec un plasmide spécifique contenant la GFP sous contrôle du promoteur de *cht-1*. Le résultat a été négatif, car parmi les 250 vers injectés un seul a donné une descendance mutée (roller). La visualisation des vers roller (transformés) et des vers (non transformés) vivants a révélé la présence d'une autofluorescence même chez les nématodes non transformés. Ceci a rendu difficile la distinction entre l'autofluorescence des vers et la fluorescence de la GFP.

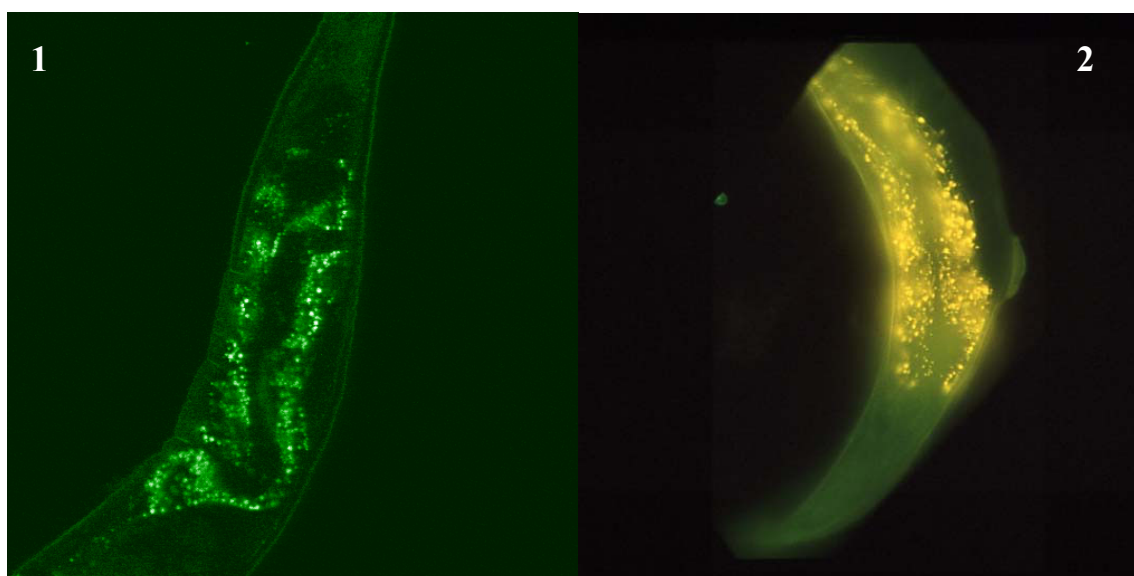


Figure 41 : Analyse de *C.elegans* pour détecter le promoteur CHT-1-GFP. Photo 1 (microscope confocal): *C.elegans* transformé (Roller) fluorescent au niveau de la région antérieure du nématode. photo 2 (microscope à fluorescence) : témoin négatif, autofluorescence de la région antérieure de *C.elegans* non transformé. Agrandissement X 100.

III . 6 - L'immunolocalisation de la chitinase CHT-1 :

Pour la localisation par immunofluorescence de la chitinase CHT-1, les anticorps anti-FC 1 et anti-DF ont été utilisés. En effet, l'incubation des vers perméabilisés et fixés avec les anticorps anti-FC 1 et l'anticorps secondaire a révélé une fluorescence au niveau de la bouche et du pharynx des stades L1 - L4 de *C.elegans* (**Fig.42** et **43**). Cette fluorescence était absente au niveau des stades adultes et des œufs. Le sérum des souris non immunisées n'a pas démontré de fluorescence au niveau du pharynx (contrôle) (**Fig.44**). L'anticorps anti-DF a démontré une autre localisation de l'antigène. En effet, la fluorescence a été observée au niveau des structures externes des vers, au niveau de la bouche et une faible fluorescence au niveau du pharynx de *C.elegans* (**Fig.45**). Le sérum des souris non immunisées (avec la protéine DF) n'a pas démontré de fluorescence sur les vers perméabilisés et fixés (contrôle négatif) (**Fig.46**).

Il a été constaté que les deux anticorps anti-FC 1 et anti-DF ont révélé avec ce test d'immunofluorescence trois endroits possibles de la localisation de la chitinase CHT-1; au niveau de la bouche, de la surface externe du vers ou au niveau du pharynx.

Des coupes transversales du pharynx de *C.elegans* colorées au Bleu de Toluidine 1 % (augmentation du contraste) démontrent les tailles des vers des différents stades de développement (**Fig.47**). L'immunocytochimie sur ces différentes coupes a été effectuée avec l'anticorps primaire et un anticorps secondaire anti-IgG de souris produit dans des chèvres et marqués à l'or. L'incubation d'une coupe transversale avec l'anticorps anti-FC 1 a démontré le pharynx constitué de tissus musculaires, de la lumière triangulaire et des trois canaux des cellules glandulaires (d_1 , d_2 et d_3) (**Fig.48**). L'agrandissement de cette coupe a révélé la présence d'un marquage au niveau des structures d_1 , d_2 et d_3 (**Fig.49**). Ce marquage ne se trouve pas sur les autres structures du pharynx ; la lumière et le tissu musculaire. Les coupes transversales (du même pharynx) incubées avec le sérum des souris non immunisées (contrôles) n'ont pas démontré de marquage sur les structures du pharynx (**Fig.50**).

D'autres coupes transversales ont été incubées avec les anticorps anti-DF. Malgré la destruction partielle des structures du vers par les solutions de perméabilisation et de fixation (**Fig.51**), l'agrandissement de cette coupe a révélé un marquage des cellules hypodermiques (**Fig.52**) et un faible marquage des canaux des cellules glandulaires (**Fig.53**). Des coupes du pharynx (contrôles) ont été incubées avec le sérum des souris non immunisées, aucun marquage n'a été révélé sur les structures de la coupe (**Fig.54**).

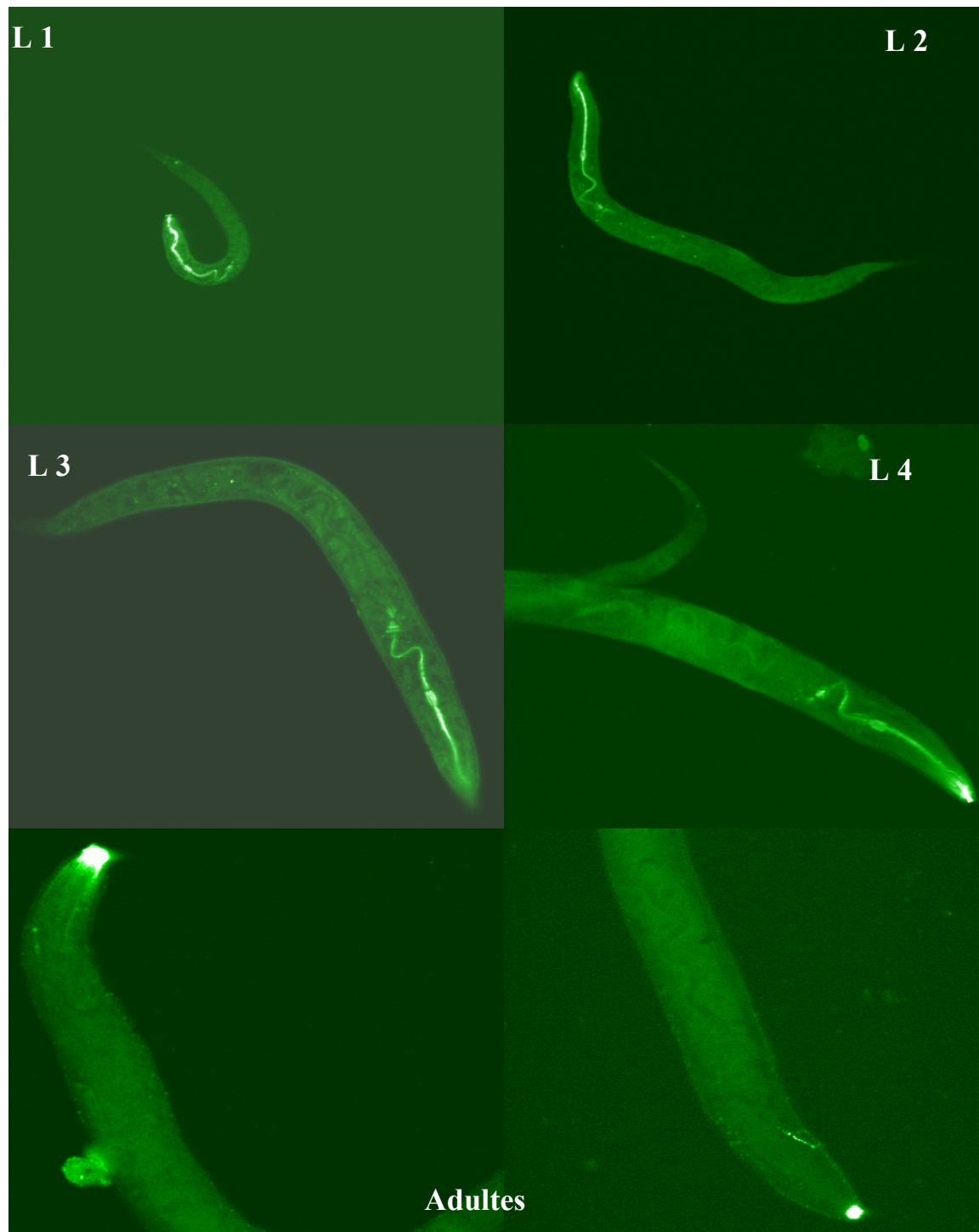


Figure 42 : Microscopie confocal des différents stades de développement de *C.elegans* incubés avec l'anticorps anti -FC 1. Présence de la fluorescence au niveau du pharynx des stades (L1 - L4). Le stade adulte ne présente pas de fluorescence au niveau du pharynx. Agrandissement X 40.

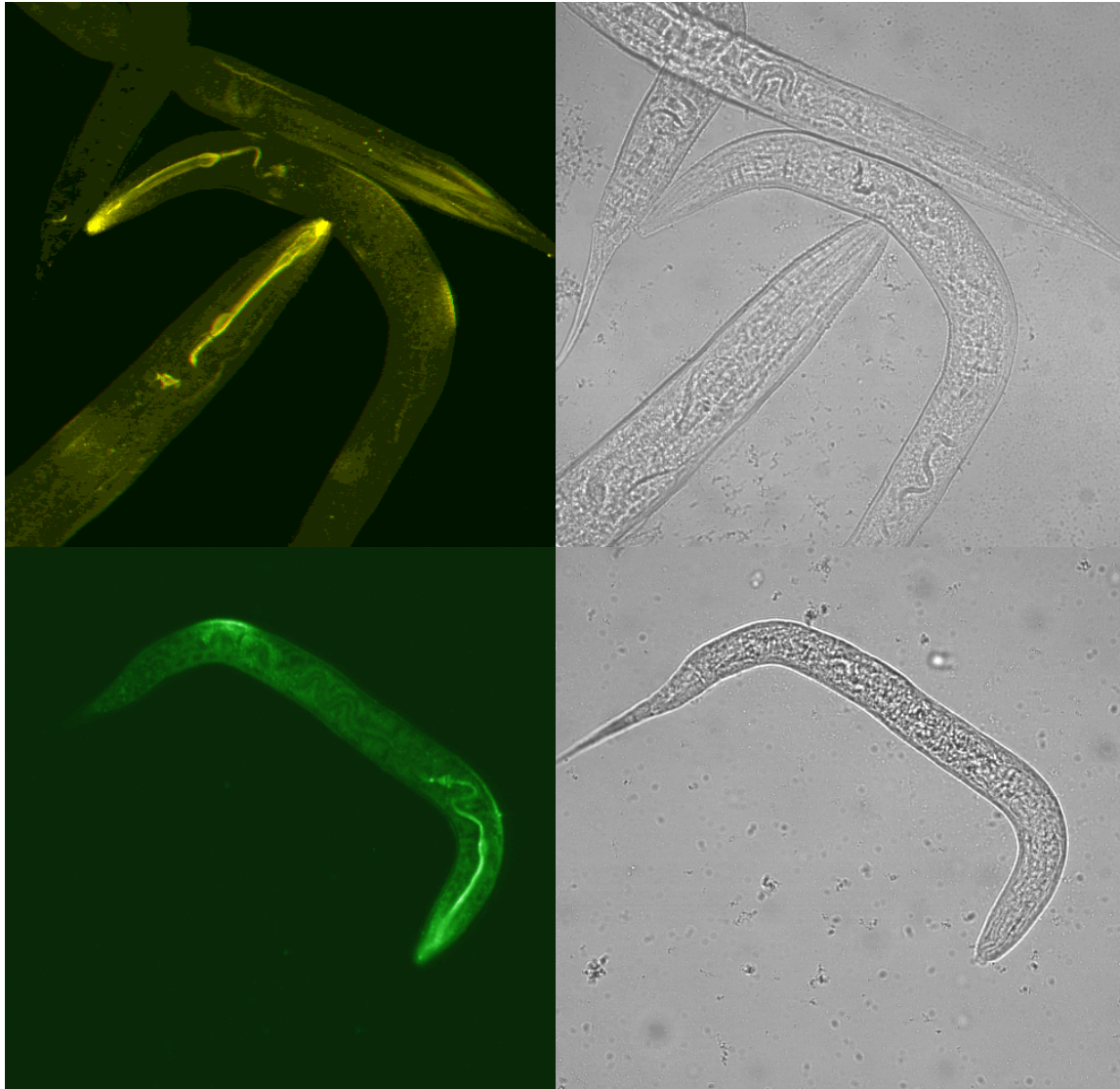


Figure 43 : Microscopie confocal de quelques stades de développement de *C.elegans* incubés avec l'anticorps anti-FC 1. Présence de la fluorescence au niveau du pharynx et de la bouche. Agrandissement X 40.



Figure 44 : Microscopie confocale, contrôle négatif. Différents stades de développement de *C.elegans* incubés avec le sérum des souris non immunisées. Agrandissement X 40.

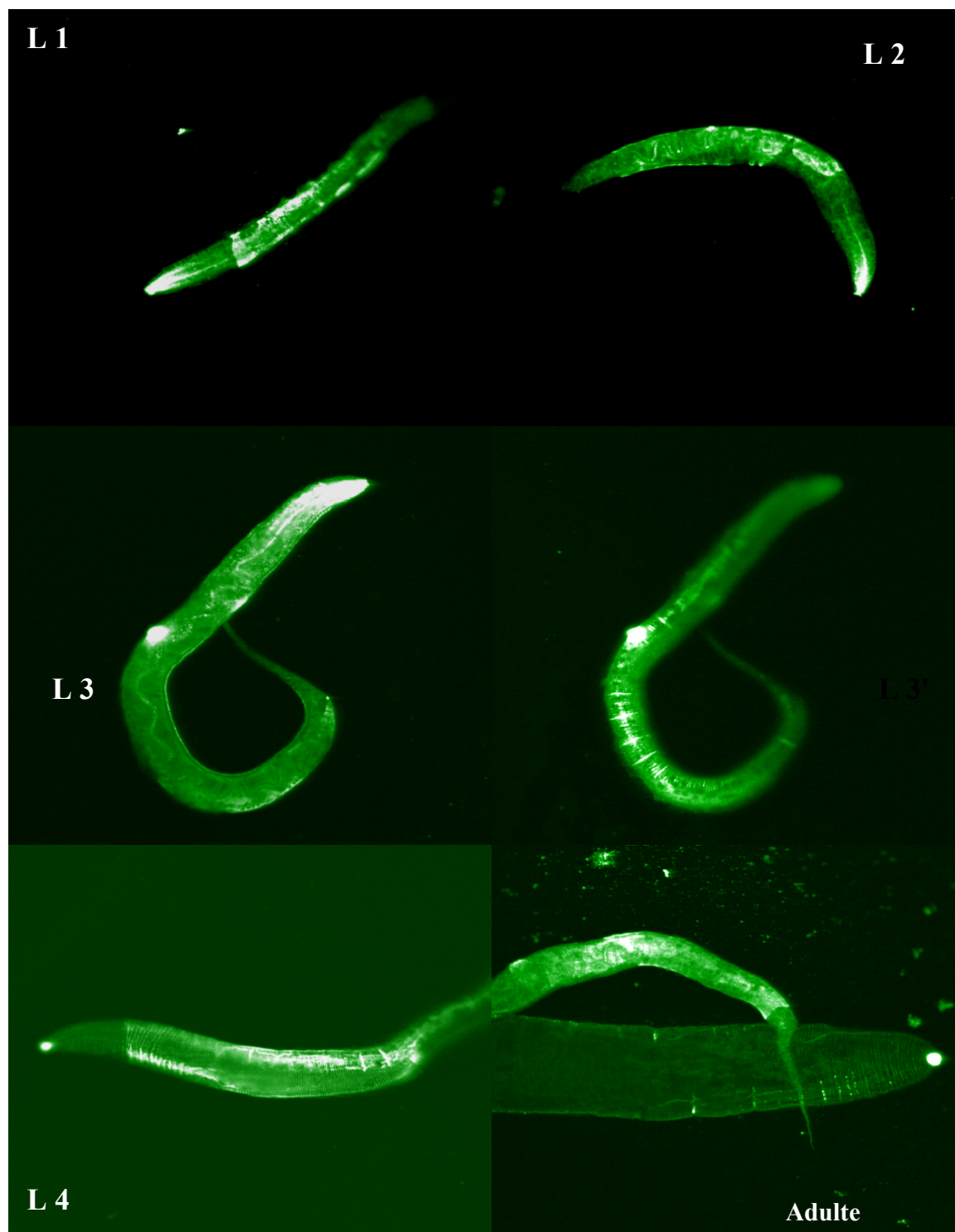


Figure 45 : Microscopie confocal des différents stades de développement de *C.elegans* incubés avec l'anticorps anti-DF. Présence de la fluorescence au niveau de la surface externe, et de la bouche des stades (L1 - L4). Le stade adulte ne présente pas cette fluorescence. L3 : photo de la surface antérieure du nématode. L3' : photo de la surface postérieure du nématode *C.elegans*. Agrandissement X 40.

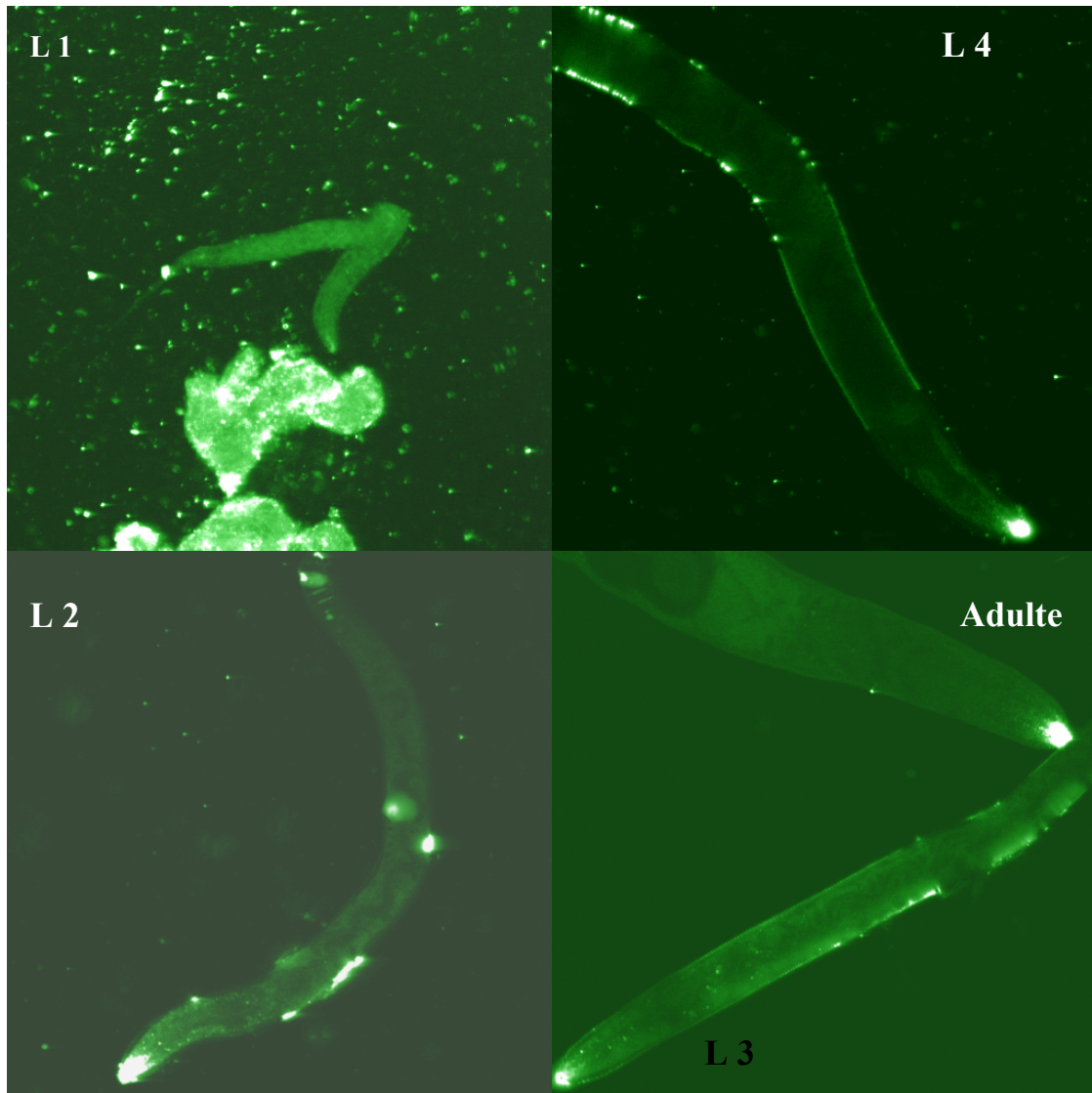


Figure 46 : Microscopie confocal, contrôle négatif. Différents stades de développement de *C.elegans* incubés avec le sérum des souris non immunisées. Agrandissement X 40.

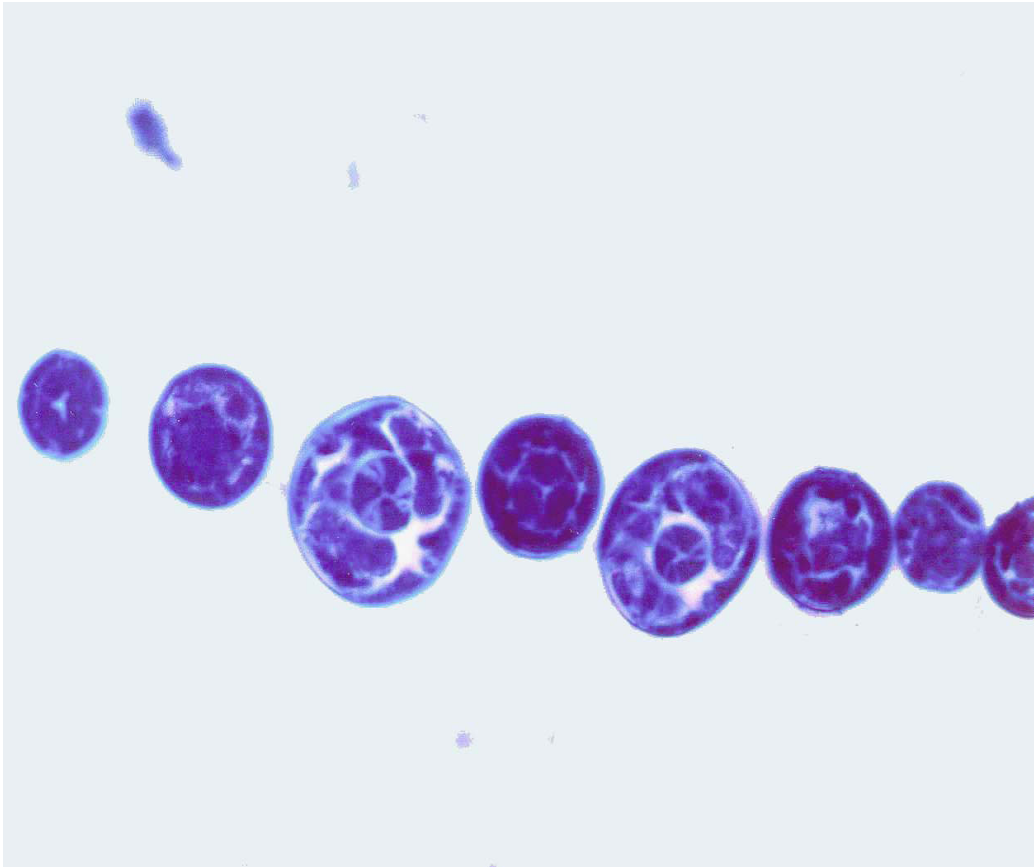


Figure 47 : Coupes transversales de différents stades de développement de *C.elegans* fixés dans la résine LR White et colorées au Bleu de Toluidine 1%. Photo réalisé au microscope Olympus BX 50. Agrandissement X 100

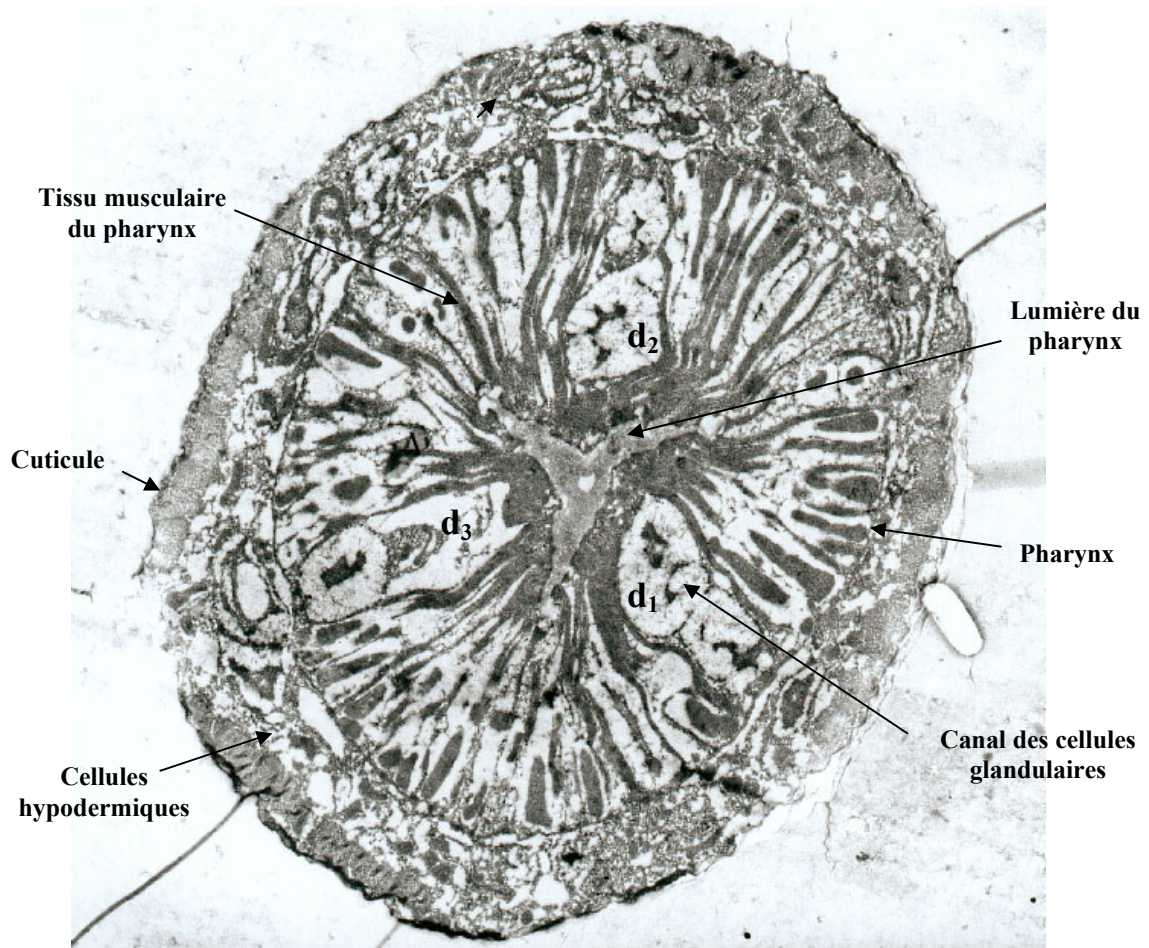


Figure 48 : Coupe transversale du pharynx de *C.elegans*, stade L3, incubée avec l'anticorps anti-FC 1. d₁, d₂ et d₃ : représentent les canaux des cellules glandulaires. Agrandissement X 8970. Echelle : 1µm = 0.89 cm.

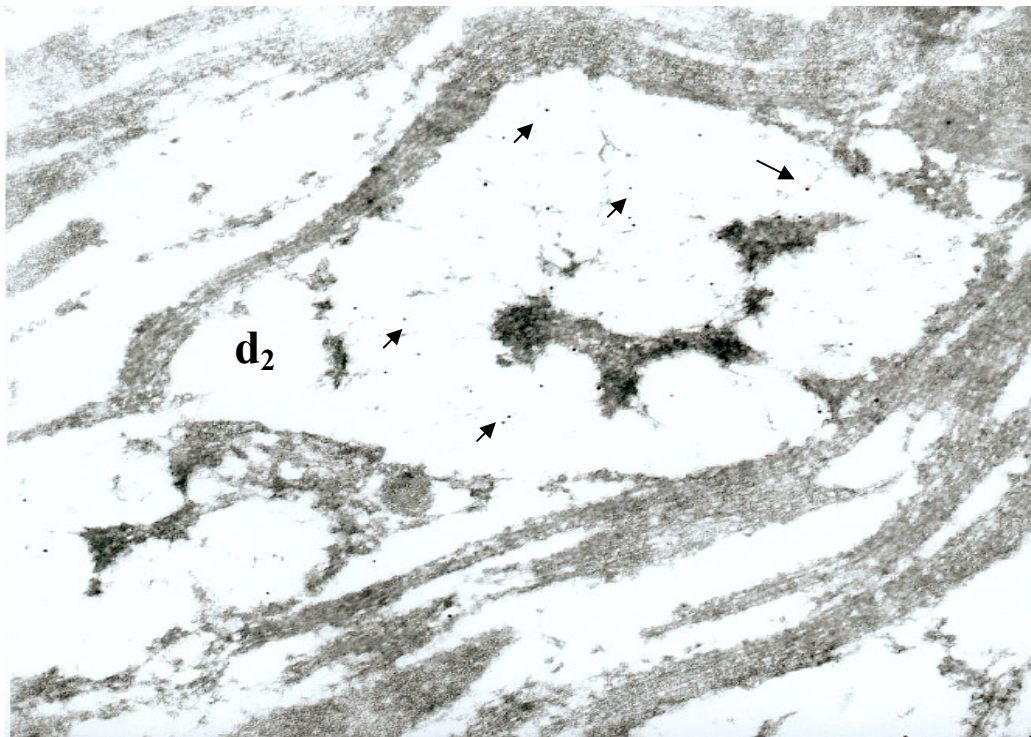
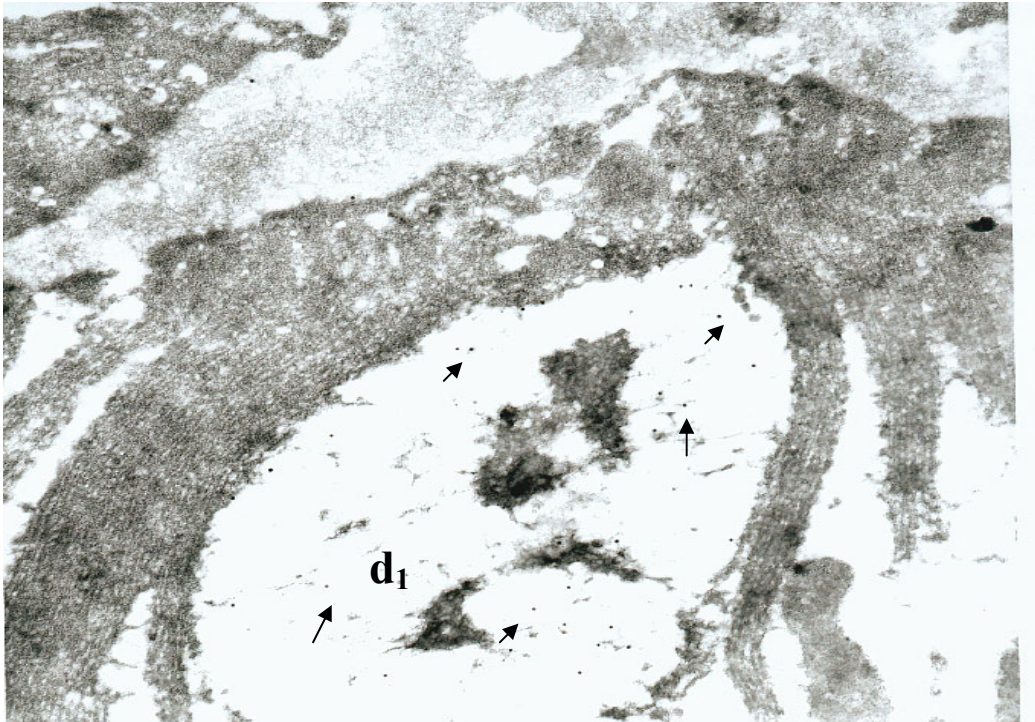


Figure 49 : Coupes transversales du pharynx de *C.elegans* stade L3. Flèches indiquent la présence des grains d'or au niveau de d₁; et d₂ canaux des cellules glandulaires. Agrandissement X 52900. Echelle: 1 μ m = 5.290 cm.

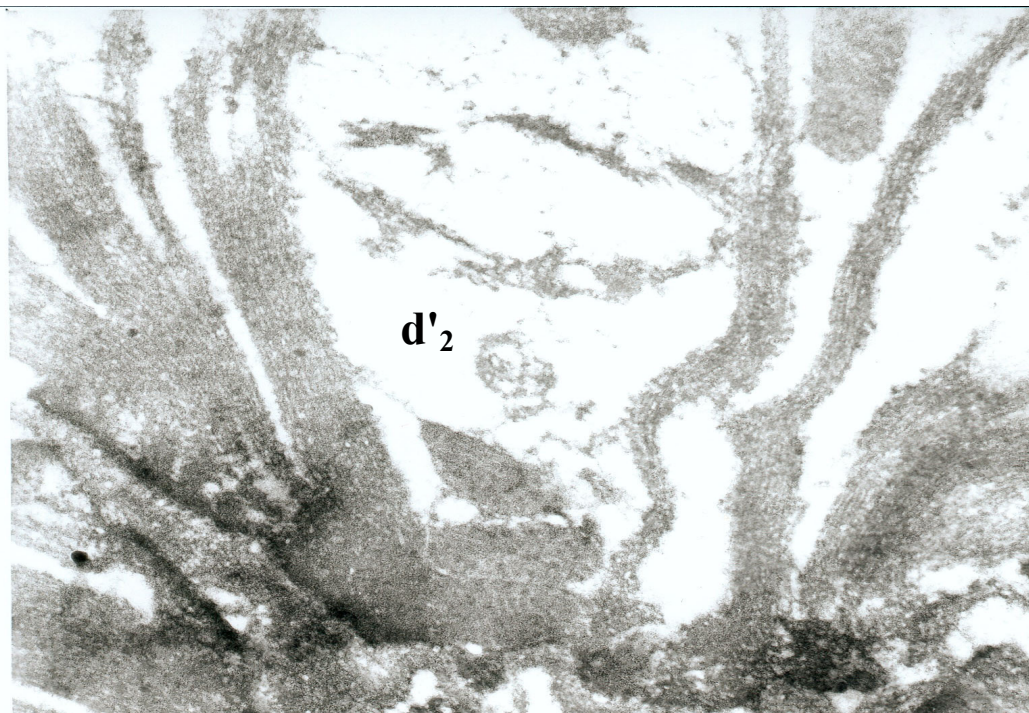
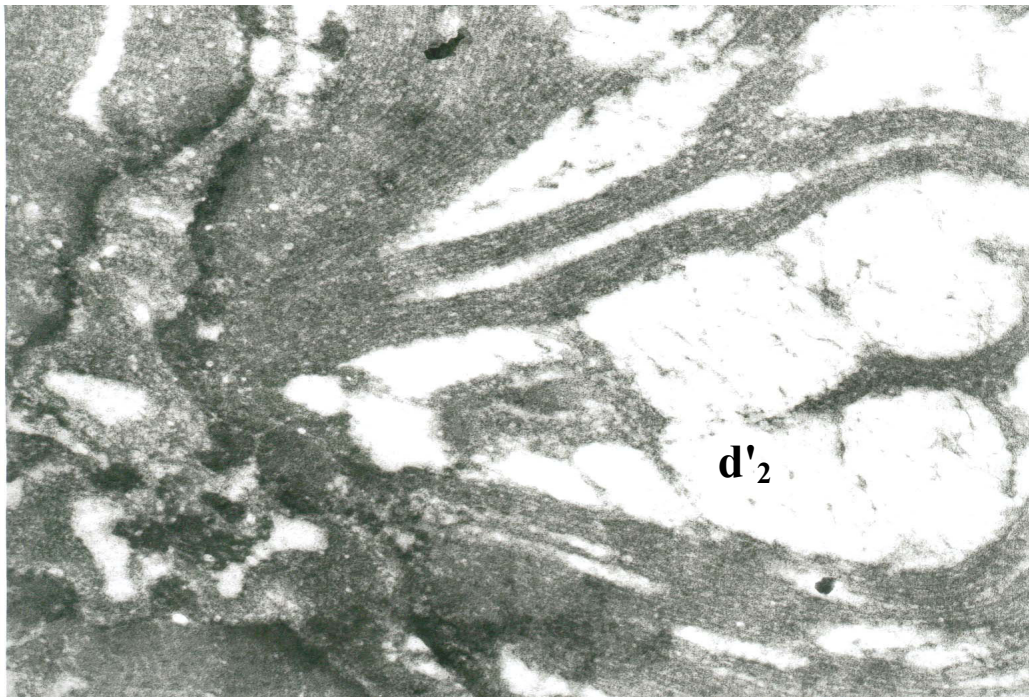


Figure 50 : Coupes transversales du pharynx de *C.elegans* stade L3. Sur cette coupe (contrôle), le marquage sur la structure d'1 et d'2, (canaux des cellules glandulaires) est absent. Agrandissement X 52900. Echelle: 1 μ m = 5.290 cm.

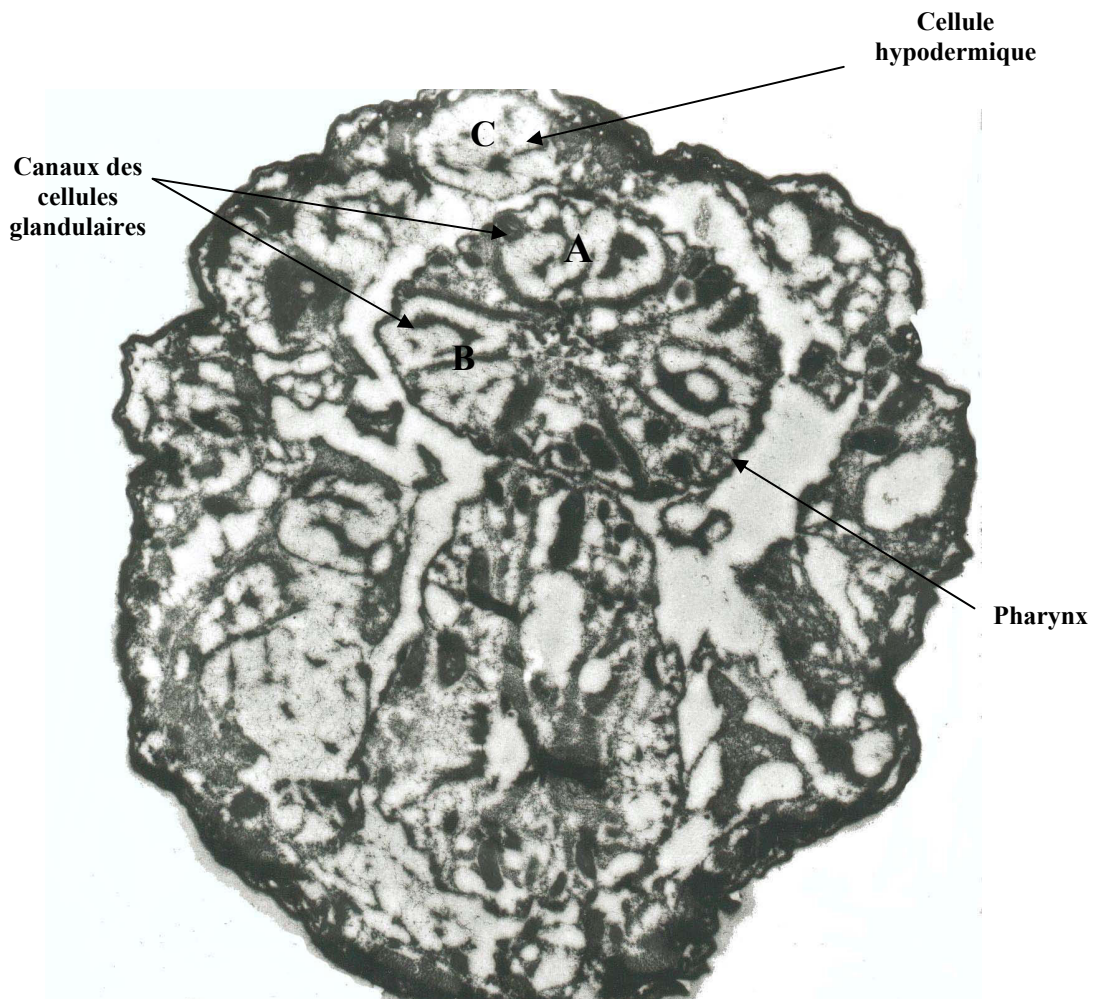


Figure 51 : Coupe transversale du pharynx de *C.elegans*, incubée avec l'anticorps anti-DF. Agrandissement X 11925 Echelle : 1 μm = 1.19 cm.

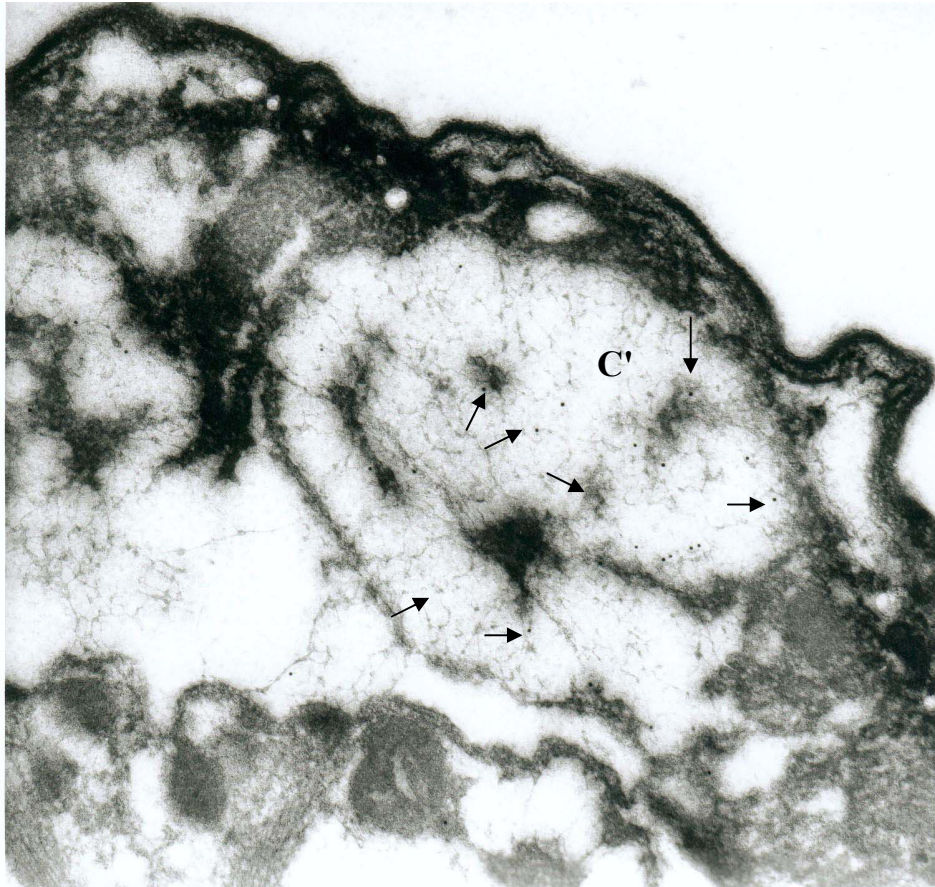


Figure 52 : Coupe transversale du pharynx de *C.elegans* incubée avec l'anticorps anti-DF. Flèches indiquent la présence des grains d'or au niveau de C' : cellule hypodermique. Agrandissement X 51200. Echelle: 1 μm = 5.12 cm.

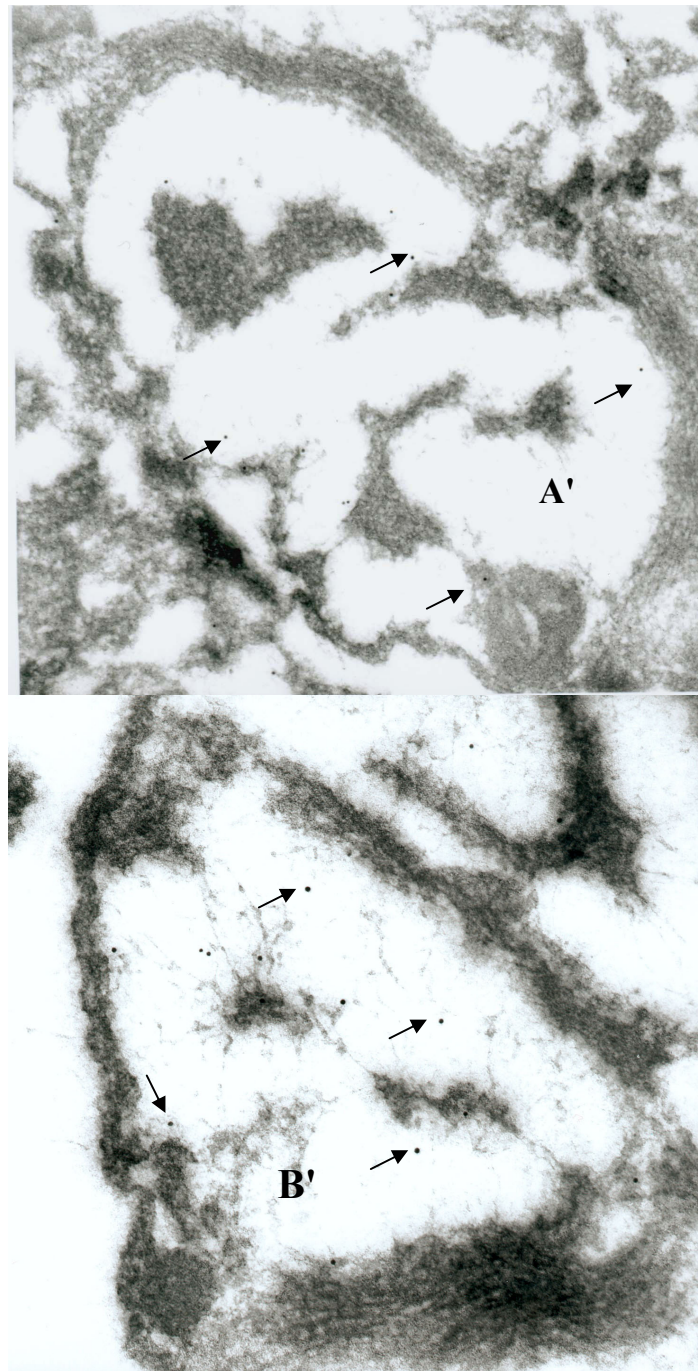


Figure 53 : Coupe transversale du pharynx de *C.elegans* incubée avec l'anticorps anti-DF. Flèches indiquent la présence des grains d'or au niveau de A' et B' : canaux des cellules glandulaires. Agrandissement X 51000. Echelle:1 μ m = 5.1 cm

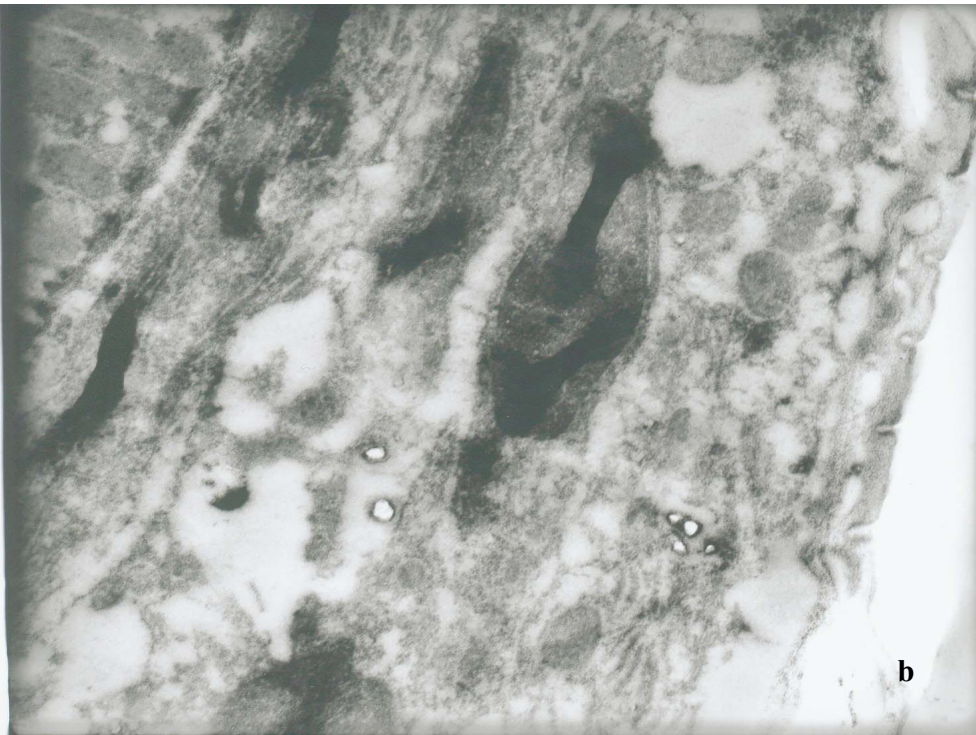


Figure 54 : Coupes transversales du pharynx de *C.elegans*, absence du marquage sur les cellules hypodermique (contrôle). Photo (a) stade L3 agrandissement X 15300. Echelle: 1 μm = 1.53 cm. Photo (b) agrandissement X 76500. Echelle: 1 μm = 7.6 cm.

III . 7 - Etude fonctionnelle de la chitinase CHT-1 par inhibition de l'expression du gène *cht-1* :

Les *C.elegans*, nourris avec des *E.colis transformées* avec le plasmide pPD129.36 dans lequel a été inséré le fragment codant pour le FC 1, ont donné plusieurs générations. Ces vers ont été normaux sans aucune différence visible avec les vers non transformés. Le même résultat fut obtenu avec des *C.elegans* nourris avec des *E.colis* transformées avec le plasmide pPD129.36 dans lequel a été inséré le fragment DF.

L'analyse des protéines totales de ces vers transformés, sur un gel de polyacrylamide a démontré sur le profil protéique l'absence d'une bande d'environ 45 kDa chez les vers nourris avec des bactéries transformées. Cette bande est présente dans le profil protéique d'une génération mixte de *C.elegans* nourri avec des bactéries non transformées (contrôle) (**Fig.55**).

L'immunoblot réalisé avec les anticorps anti-FC 1 sur les protéines de la 4, 8 et 12^{ème} génération mixte de *C.elegans* transformées avec le pPD129.36-*fc* 1, a révélé une réactivité avec une bande protéique d'environ 60 kDa (**Fig.56**). Les protéines (génération mixte de *C.elegans* nourris avec des bactéries non transformées) ont réagi avec deux bandes protéiques d'environ 45 et 60 kDa (contrôles).

L'anticorps anti-DF n'a pas réagi avec les protéines de la 4, 8 et 12^{ème} génération mixte de *C.elegans* transformées avec le pPD129.36 - *df*. Alors que dans les protéines contrôles (génération mixte de *C.elegans* non transformée) ils ont réagi avec une bande protéique d'environ 45 kDa (**Fig.56**).

L'anticorps anti-FC 1 et l'anticorps secondaire anti - IgG de souris marqué à la fluorescéine ont été incubés avec une population de *C.elegans* non transformée. Une fluorescence au niveau du pharynx a été observée (**Fig.57**, 1 et 2) (contrôle). Les *C.elegans* incubés avec le sérum des souris non immunisées n'ont pas révélé de fluorescence (**Fig.57**, 3 et 4). Dans les mêmes conditions de perméabilisation, les *C.elegans* nourries avec *E.coli* contenant le plasmide pPD129.36 - *fc* 1 ont été incubés avec l'anticorps anti-FC 1 et l'anticorps secondaire. Ces vers ont démontré une présence de la fluorescence au niveau de la bouche mais pas au niveau du pharynx (**Fig.58**).

Le même résultat a été obtenu avec les vers nourris avec *E.coli* contenant le plasmide pPD129.36 - *df* et incubés avec l'anticorps anti-FC 1 (**Fig.59**).

Figure 55 : Profils protéiques des *C.elegans* nourries avec des bactéries *E.colis* contenant le plasmide pPD129.36 – insert, sur un gel (SDS – PAGE de 12 % 5 x 8 cm). Lignes 1 et 5 : profils protéiques de populations mixtes de *C.elegans* de la 4^{ème} génération, lignes 2 et 6: 8^{ème} génération, lignes 3 et 7: 12^{ème} génération. Bactéries avec insert *df* lignes 1 - 3, bactéries avec insert *fc1* lignes (5 – 7). Ligne 4 : Contrôle négatif (profil protéique des *C.elegans* nourries avec des bactéries *E.colis* sans plasmide). Ligne M : Marqueur de poids moléculaires en kDa (BIO-RAD).

Figure 56 : Immunoblot sur des protéines totales de *C.elegans* nourris avec des bactéries transformées. Ligne (a) : Contrôle positif avec des Ac anti – DF sur une population mixte de *C.elegans* non transformé. Absence de la réaction des anticorps anti – DF avec les protéines totales de la 4^{ème} génération (b), de la 8^{ème} génération (c) et de la 12^{ème} génération (d) de *C.elegans* nourris avec des bactéries *E.colis* contenant le plasmide pPD129.36 – *df*. Réaction positive des Ac anti – FC 1 avec deux bandes de protéines à 45 et 60 kDa présentes dans une population mixte de *C.elegans* non transformé (e) (contrôle positive). Réaction positive des anticorps anti – FC 1 avec une bande protéique de 60 kDa présentes dans les protéines totales prélevés de la 4^{ème} génération (f), de la 8^{ème} génération (g) et de la 12^{ème} génération (h) d'une population mixte de *C.elegans* nourris avec des bactéries *E.colie* contenant le plasmide pPD129.36 – *fc 1*. Ligne M : Marqueur de poids moléculaires en kDa (BIO-RAD).

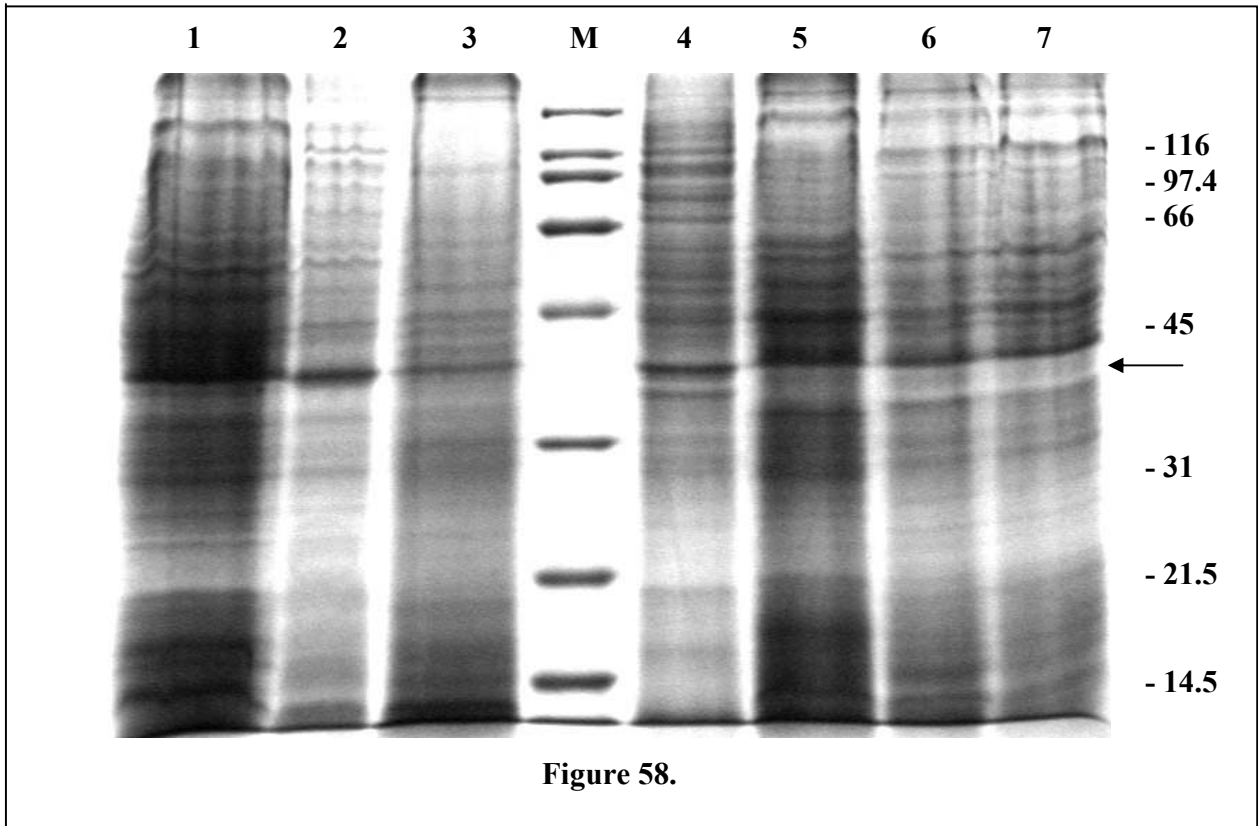


Figure 58.

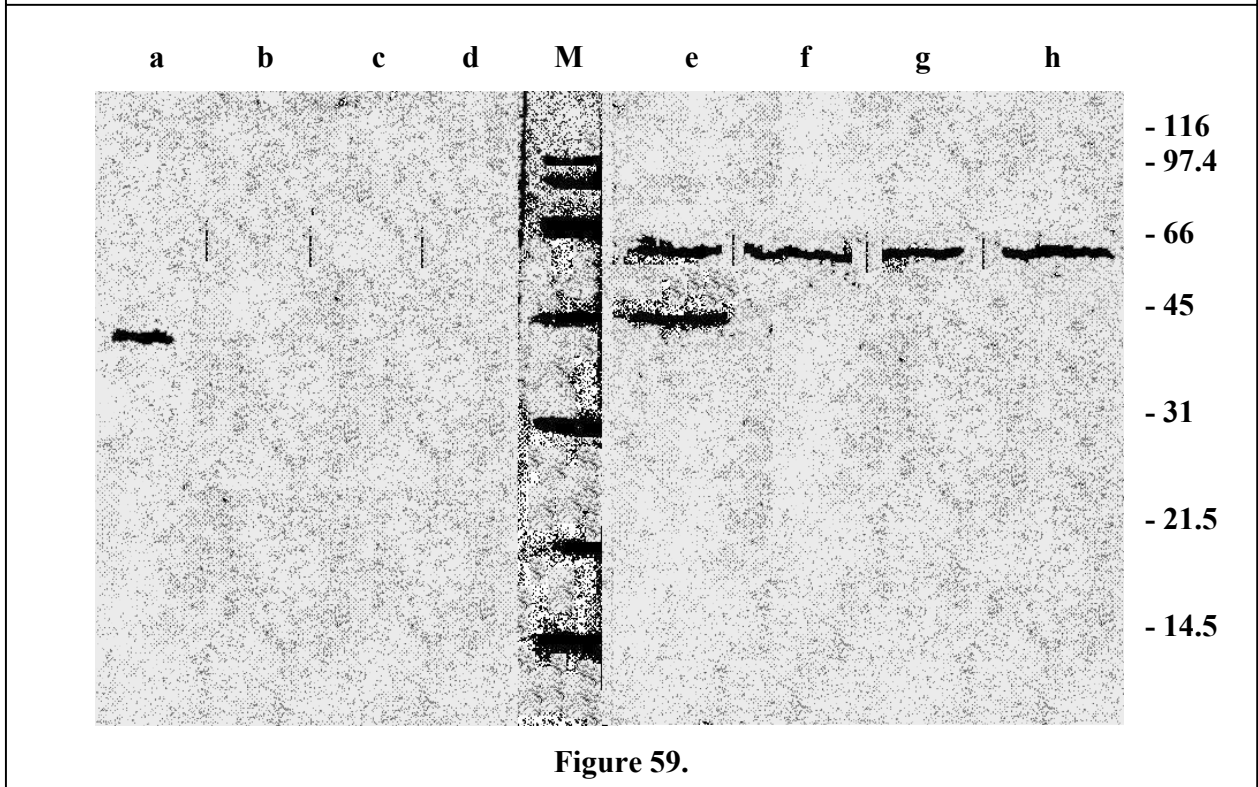


Figure 59.

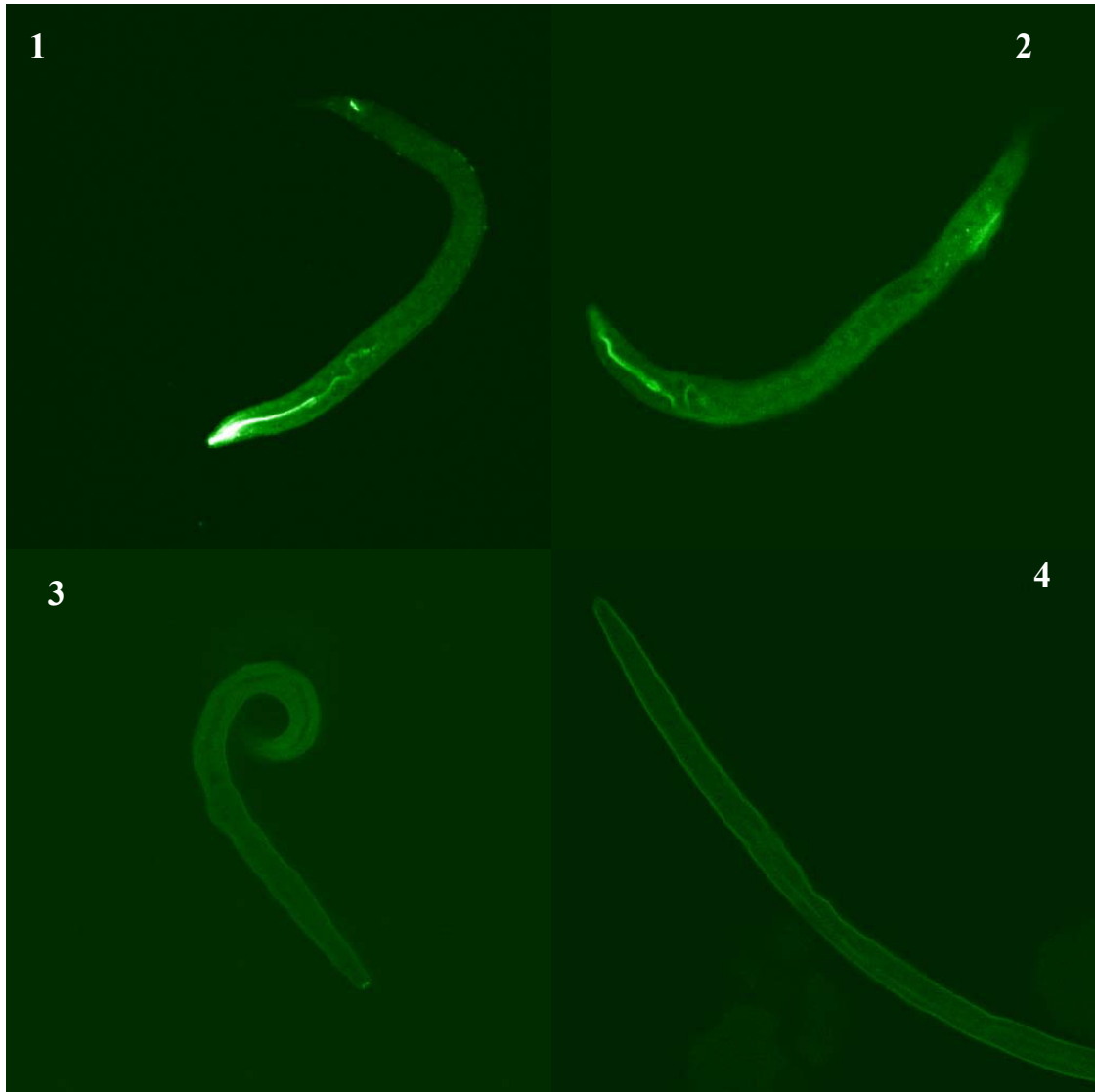


Figure 57 : Microscopie confocal . Photo (1 et 2) : Présence de la fluorescence au niveau du pharynx de *C.elegans* non transformé incubés avec l'anticorps anti-FC 1. Photo (3 et 4): Contrôle négatif, *C.elegans* incubés avec le sérum de souris non immunisées (0 jour). Agrandissement X 40.

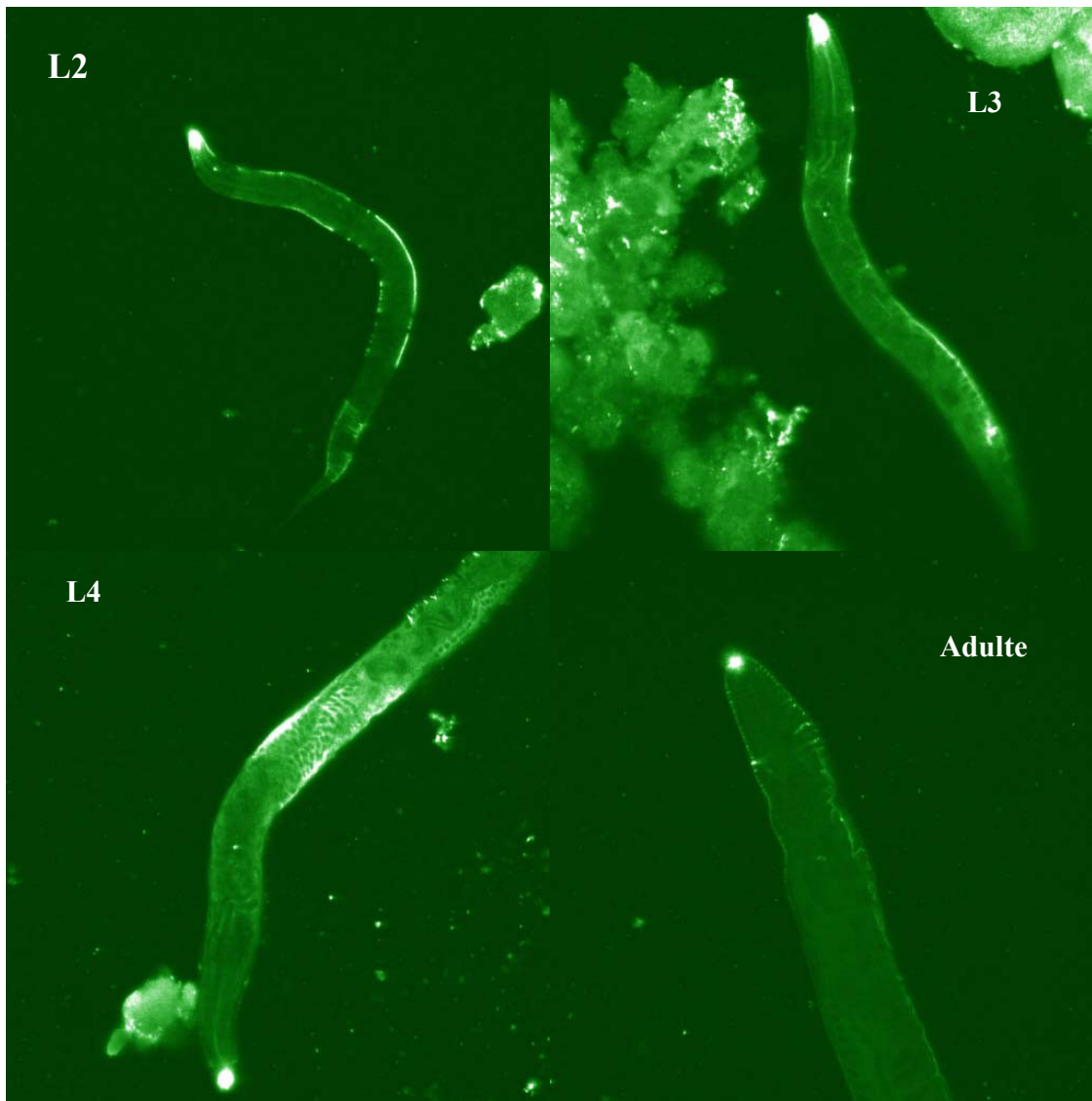


Figure 58 : Microscopie confocale. Population mixte de *C.elegans* nourrie avec des bactéries contenant le plasmide pPD 129.36 – *fc* 1 et incubée avec l'anticorps anti-FC1. Agrandissement X 40.

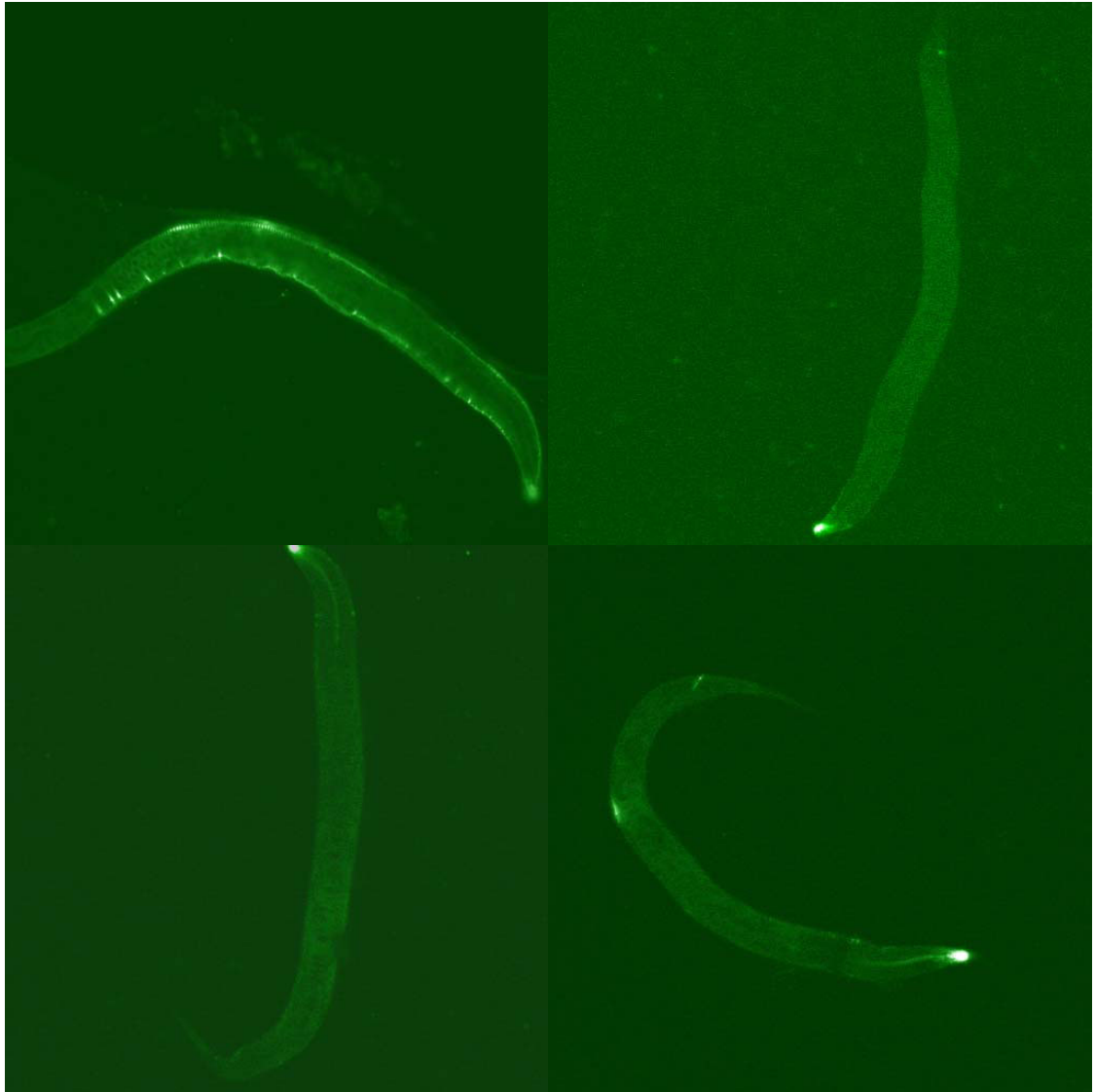


Figure 59 : Microscopie confocale. Population mixte de *C.elegans* nourrie avec des bactéries contenant le plasmide pPD 129.36 – *df* et incubée avec l'anticorps anti-FC1. Agrandissement X 40.

IV - Discussion

IV . 1 - Caractérisation du gène *cht-1*.

Plusieurs gènes codants pour des chitinases ont été isolés et caractérisés chez les nématodes parasites [93. 9 . 25 . 26], mais aucun gène de chitinase n'a été isolé chez le nématode libre *Caenorhabditis elegans*. M. Blaxter a exclu en 1996 l'existence des chitinases fonctionnelles chez ce nématode [123]. Toutefois, une activité chitinolytique a été démontrée dans différents stades de développement de ce nématode [98]. Ce résultat a permis d'envisager l'isolation et la caractérisation d'un ou plusieurs gènes codants pour des chitinases actives chez *C.elegans*. En effet, un gène nommé *cht* a été isolé à partir d'un EST et de l'ADN génomique de *C.elegans* (J.M. Neuhaus, communication personnelle). Certaines séquences conservées caractérisant les gènes codants pour des chitinases ont permis l'identification potentielle de 36 gènes en se basant sur le génome entier de *C.elegans* (voir annexe, *Caenorhabditis elegans* www Serveur).

Le primer 5' (séquence d'une partie de la chitinase de *C.Briggsae*) a permis l'isolation du gène *cht-1*. La comparaison de la séquence du primer 5' avec le gène *cht-1* a révélé une homologie de 72 %, ceci démontre que la sélection ciblée d'une séquence conservée pour l'utilisation comme primer est cruciale pour l'isolation d'un gène homologue d'une autre espèce.

La structure de la protéine CHT-1 est caractérisée par la présence d'une séquence de peptide signal dans la région N-terminale, suivie par un domaine dans lequel est présente une séquence très conservée DIDWEYP correspondant au site catalytique. L'acide aminé **Glu (E)** est crucial dans l'activité catalytique des chitinases de la famille 18 [17]. L'Asp (**D**) est aussi parfois trouvé dans ce site, contribue aux activités catalytiques de certaines chitinases identifiées chez les plantes et les bactéries. Ce site catalytique conservé dans la séquence N-terminal de CHT-1 correspond au domaine catalytique des chitinases de la famille 18.

La partie C-terminal de CHT-1 est caractérisée par la présence de deux régions contenant plusieurs acides aminés cystéines et deux autres régions riches en acides aminés thréonines. Des séquences similaires ont été identifiées chez plusieurs espèces d'invertébrés [124]. Les deux régions riches en cystéines de CHT-1 contiennent 6 acides aminés cystéines, ces régions pourraient correspondre à deux domaines de fixation de chitinase sur les structures chitineuses.

Trois protéines riches en acides aminés cystéines ont été décrites chez *Caenorhabditis elegans* [125], une comparaison de ces séquences avec la séquence du domaine C-terminal de CHT-1 n'a pas démontré de similarité entre les séquences.

Le domaine riche en cystéine a été identifié pour la première fois au niveau de la membrane péritrophique [126]. Dans des études sur l'évolution de la protéine de fixation des chitinases trouvées chez les invertébrés, on a constaté une grande similarité entre ce domaine et une protéine de la membrane (matrice) péritrophique [124]. Ce même domaine riche en cystéine a été trouvé chez de nombreuses chitinases des invertébrés, chez des protéines des membranes péritrophiques et aussi chez quelques autres types de protéines [124].

Les séquences des domaines de fixation des chitinases de plantes et ceux des invertébrés ne révèlent pas une grande similarité, cependant ces deux domaines sont riches en cystéines et possèdent plusieurs résidus aromatiques conservés [125]. Chez les plantes, les cystéines jouent un rôle dans le maintien de la structure tertiaire de la protéine pour permettre aux acides aminés aromatiques d'interagir avec les saccharides [127]. Le mécanisme de la fixation de ces protéines sur la chitine et leur structure tertiaire a été déterminé chez la lectine de blé (WGA) [127 - 128]. Cette structure est stabilisée par 4 liens de cystéines (pont disulfure) conservée chez toutes les plantes qui possèdent ces protéines. Trois de ces 4 liens constituent une niche compacte à l'intérieur de ces structures [127 - 128]. Il est probable que ces cystéines jouent un rôle similaire chez les chitinases d'invertébrés. Généralement ces domaines contiennent de 6 cystéines qui forment entre eux des ponts disulfures conservés, alors que chez les plantes, ces mêmes domaines contiennent 8 acides aminés cystéines [124].

Les différentes chitinases identifiées chez les nématodes parasites [93. 94 . 25 . 26] ont un seul domaine de fixation contenant 4 à 6 cystéines, par contre le gène *cht-1* a été constitué de deux domaines de fixations avec 6 cystéines conservées dans chaque domaine. Ces deux domaines et le domaine catalytique se trouvent associés au domaine N-terminal par une région riche en thréonine. Cette structure est similaire à celle des chitinases de plantes où le domaine de fixation est séparé du domaine catalytique par une région riche en glycine, proline et thréonine [14].

En conclusion, l'analyse du gène *cht-1* et sa comparaison avec des gènes chitinases identifiés chez d'autres espèces animales et végétales ont permis de révéler plusieurs régions similaires entre ce gène et ceux des autres chitinases. Le domaine N-terminal de CHT-1 contient les résidus catalytiques, très conservés chez les chitinases de la famille 18. Le domaine C-terminal a deux régions riches en cystéines, identifiées généralement comme des domaines de fixations. Sur la base de ces deux importantes caractéristiques révélées, le *cht-1* peut être identifié comme une chitinase de la famille 18.

La première caractérisation d'un gène codant pour une chitinase chez le nématode *Caenorhabditis elegans* contredit l'hypothèse de M. Blaxter sur l'absence des chitinases chez ce nématode libre. Selon plusieurs travaux, [75. 76. 66] les chitinases des parasites jouent un rôle important dans leur cycle de développement et dans leur transmission du vecteur à l'hôte. *Caenorhabditis elegans* est un nématode libre, la présence d'un gène de chitinase chez ce vers devrait avoir un autre rôle que celui des chitinases des nématodes parasites. La détermination de l'endroit de l'expression et de la sécrétion de CHT-1 pourrait nous révéler le rôle de cette chitinase chez *C.elegans*.

IV . 2 - La localisation de la chitinase CHT-1 chez *Caenorhabditis elegans* :

L'expression de la chitinase CHT-1 sous forme de deux fragments DC et DF a été réalisée. Cette stratégie d'expression fut choisie pour obtenir des anticorps spécifiques contre le site catalytique. Avec la séparation des deux fragments, la production des anticorps spécifiques a permis d'éviter des réactions croisées, ceci est dû à la présence des régions riches en cystéines dans les structures d'autres protéines identifiées par Sulston et Cox chez *C.elegans* [125 - 129].

Pour l'expression des deux domaines DC et DF, le plasmide pGEX a été utilisé, ce qui a permis l'obtention de deux protéines de fusion GST-DC et GST-DF. La purification des deux protéines de fusion par le glutathion-agarose a été négative car les deux protéines GST-DC et GST-DF n'étaient pas solubles. L'isolation des corps d'inclusion (protéines insolubles) a été effectuée, mais d'autres protéines non solubles étaient présentes ensemble avec les protéines de fusions. Donc, les deux domaines DC et DF ont été clonés dans le plasmide pET2a dans le but d'exprimer ces deux domaines sous forme de simples protéines [131-108]. L'expression des deux protéines DC et DF fut négative après induction à l'IPTG. Ceci est probablement dû à la souche de bactéries *E.coli* XL Blue1 BL/21 utilisées dans la transformation cellulaire. Cette dernière n'était peut-être pas compatible pour l'expression du plasmide pET 2a, car la souche BL 21 (DE3) est la plus utilisée pour l'expression des gènes clonés dans le pET.

Des chitinases des microfilaires de *Brugia malayi* ont été exprimées avec le plasmide pET 22b dans des bactéries BL 21 (DE3), ensuite purifiées sur une colonne (His – Bind) [94]. Deux autres chitinases d'*Acanthocheilonema viteae* et de *Onchocerca volvulus* furent purifiées par électrophorèse à deux dimensions [26], alors qu'une chitinase isolée de bactérie *Vibrio* sp a été exprimée dans le vecteur pET 12a et purifiée sur une colonne échangeuse d'anions [152]. Ainsi, l'expression et la purification des chitinases ne doivent pas s'effectuer avec un plasmide d'expression spécifique ni avec une méthode de purification unique, mais chaque gène chitinase possède ces caractéristiques qui jouent un rôle crucial dans le choix du plasmide d'expression et la méthode de purification.

L'électroélution a été la seule technique qui a permis de purifier les deux protéines de fusion GST-DC et GST-DF. Cette technique est longue et coûteuse, mais permet quand même l'isolation des protéines, elle a été utilisée avec succès par Grueter [132] et Hirschy [133] dans leur travail de recherche.

Afin d'éliminer la GST et d'obtenir les deux protéines DC et DF pures, une digestion enzymatique par la thrombine a permis d'isoler et de purifier par électroélution la protéine DF

d'environ 17kDa. La digestion de la protéine de fusion GST-DC n'a pas réussi malgré de nombreux essais et les changements effectués dans les conditions de la digestion (augmentation de la concentration de la thrombine et le prolongement du temps d'incubation). L'absence de la digestion pourrait être dû à la configuration tridimensionnelle de la GST-DC qui rend le site de coupure inaccessible à la thrombine (P. Schürmann. communication personnelle) [131].

Ainsi, la protéine DC nécessaire pour la production des anticorps anti-DC n'a pas été purifiée. Toutefois, l'utilisation de cette protéine de fusion GST-DC pour l'obtention des anticorps n'a pas été réalisée afin éviter la production d'anticorps préférentiels contre la GST. Cette dernière a un pouvoir antigénique très élevé. Ainsi, le DC fut cloné et exprimé dans le pGEX sous forme de deux fragments, le FC 1 (environ la taille du DF) et le FC 2 plus long. La digestion de la GST-FC 1 avec la thrombine a permis de séparer la protéine FC 1 de la GST, alors que la digestion de la GST-FC 2 dans les mêmes conditions n'a pas fonctionné. Ce dernier résultat pourrait confirmer que la configuration 3D de la protéine de fusion rend le site de digestion inaccessible pour la thrombine.

Deux anticorps anti-FC 1 et anti-DF ont été produits chez deux souches de souris différentes, car lors de la première immunisation avec la protéine DF, la souche Balb/C n'avait pas produit d'anticorps anti-DF. L'augmentation de la quantité de protéines injectées à la souche C57 a été probablement le facteur déterminant pour la production des anticorps anti-DF. Ceci a été confirmé avec la production des anticorps anti-FC 1 chez les souris Balb/C en utilisant la même quantité (3 x 100 µg) de protéines injectées.

L'anticorps anti-FC 1 a réagi avec deux bandes protéiques d'environ 45 et 60 kDa au niveau de tous les stades larvaires de *C.elegans* (L1-L4), alors que l'anticorps anti-DF a reconnu une seule bande protéique d'environ 45 kDa au niveau des mêmes stades (L1-L4). Ces résultats d'immunoblot pourraient confirmer une réaction de ces deux anticorps avec une chitinase présente au niveau des stades larvaires de *C.elegans*. L'absence de réactivité de ces anticorps avec les protéines des œufs pourrait être dû à la faible concentration des protéines chargées sur le gel SDS-PAGE. Par contre, que les deux anticorps n'aient pas réagi avec les protéines du stade adulte est probablement dû à l'absence de ces deux protéines chez les *C.elegans* de ce stade.

Selon la séquence de CHT-1, composée de 617 acides aminés, la masse moléculaire théorique devrait être environ 60 kDa. Mais la réaction des anticorps anti-FC 1 avec les deux antigènes d'environ 45 et de 60 kDa ne nous permet pas d'identifier la chitinase CHT-1.

S. Kuzhandhaivel et al, (2001) dans leur travail sur l'isolation et la purification des chitinases de la bactérie *Streptomyces peucetius*, ont démontré que cette chitinase purifiée a donné la masse moléculaire de 42 kDa sur un gel SDS-PAGE alors que sa masse théorique était de 68 kDa [134]. L'alignement de la séquence N- terminale de cette bande de 42 kDa de *S. peucetius* avec l'extrémité NH₂ du domaine catalytique 68 kDa a démontré l'absence d'une partie due à une protéolyse de maturation.

Cette possibilité de maturation pourrait s'appliquer à la chitinase CHT-1. Pour le confirmer, il faudrait purifier la protéine de 45 kDa et déterminer sa séquence protéique. Une deuxième hypothèse serait qu'une grande partie des deux domaines de fixation a été éliminée de la protéine CHT-1, ce qui donnerait à la chitinase CHT-1 une masse moléculaire d'environ 45 kDa.

Si la protéine de 45 kDa reconnue par les deux anticorps, représente la chitinase CHT-1, alors quelle serait la protéine de 60 kDa qui a réagi avec les AC anti-FC 1? Une recherche de similarité du fragment FC 1 sur la banque d'ADN du génome de *C.elegans* a révélé quelques séquences homologues avec la séquence du fragment FC 1. Une séquence N-terminal de la protéine T13H5.3 a été la plus homologue avec le fragment FC 1, en plus elle est supposée être une chitinase de la famille 18 et contient le site catalytique très conservé. La séquence de T13H5.3 est composée de 628 acides aminés ce qui lui donnerait une masse moléculaire théorique d'environ 62 kDa. Son site catalytique bien conservé pourrait expliquer une réaction croisée avec les anticorps anti-FC1. Mais pour confirmer cette hypothèse, il faudrait isoler la partie N-terminal de la protéine T13H5.3, l'exprimer, la purifier et faire réagir la protéine recombinante avec les anticorps anti-FC 1.

La bande protéique d'environ 60 kDa révélée par les anticorps anti-FC 1, pourrait venir d'une réaction croisée de ces anticorps avec les épitopes de la chitinase T13H5.3. Si le gène *t13H5.3* code pour une protéine chitinase, on constate que la sécrétion de cette enzyme s'effectue dans les mêmes stades de développement que la chitinase CHT-1. L'analyse de ces résultats et de l'activité chitinolytique obtenus dans tous les stades de développement de *C. elegans* par F. Alaeddine [98] démontre que l'activité chitinolytique observée aux stades adultes et œufs n'était pas due aux protéines codés par *cht-1*. Il existe probablement au moins un troisième gène responsable de l'activité chitinolytique révélée aux stades de développement adulte et œufs de *C.elegans*.

Avec les deux anticorps, l'immunofluorescence fut utilisée pour la localisation de la chitinase CHT-1 chez *C.elegans*. Selon le protocole [115], les vers *C.elegans* doivent être fortement dénaturés et perméabilisés (par incubation avec BME, DTT et BO3). Vu que les deux anticorps

anti-DF et anti-FC 1 ont été produit à partir des protéines DF et FC 1 dénaturées, il y avait une forte chance de localiser les épitopes. En effet, l'anticorps anti-FC 1 a révélé une forte fluorescence au niveau de la bouche et du pharynx. Cette localisation pourrait correspondre à l'endroit de la sécrétion de la chitinase CHT-1 et / ou de T13H5.3.

D'autres part l'anticorps anti-DF a révélé une fluorescence au niveau de la bouche, de la surface externe du vers et une faible fluorescence au niveau du pharynx. Cette différence dans la localisation de CHT-1 chez *C.elegans* par les deux anticorps était prévisible, c'est pourquoi le gène *cht-1* fut cloné en deux domaines DC et DF pour éviter l'obtention des anticorps anti-CHT-1 qui ne réagissent qu'avec les épitopes du domaine de fixation riche en cystéine. Dans ce cas, la réaction des anticorps anti-CHT-1 avec les protéines de *C.elegans* ne pourrait pas confirmer la localisation de CHT-1, car des réactions croisées des ces anticorps avec d'autres protéines riches en cystéine seraient possibles.

J. Sulston a identifié trois protéines riches en cystéines chez *C.elegans* [125]. Cox G. N a aussi révélé que les collagènes de la cuticule de *C.elegans* sont riches en cystéines qui sont conservées dans la structure des collagènes de nombreux nématodes [129]. S. Marti [136] et D. Fujimoto et al [137] ont démontré aussi la présence de nombreuses cystéines dans la structure de la cuticline d'*Ascaris suum* et qui sont aussi conservées chez plusieurs nématodes. A partir de ces travaux, il n'est pas confirmé que la réaction révélée par les anticorps anti-DF représente la localisation du domaine de fixation de la chitinase CHT-1, car des réactions croisées de ces anticorps avec les différentes protéines riches en cystéines identifiées chez *C.elegans* seraient possibles.

Bien que les deux anticorps utilisés en immunofluorescence n'aient pas réagi de la même manière avec les *C. elegans*, il est suggéré que la localisation de CHT-1 serait au niveau de la bouche ou du pharynx. Cette chitinase CHT-1 pourrait avoir un rôle dans la dégradation des structures chitineuses et des protéoglycanes qui passent par la bouche et le pharynx du nématode avant d'atteindre l'intestin.

Le pharynx de *C.elegans* est composé parmi d'autres structures d'un tube particulier constitué de tissus musculaires et de régions glandulaires [87]. La fluorescence révélée par l'anticorps anti-FC 1 n'a pas permis d'identifier avec précision l'endroit cellulaire de cette chitinase CHT-1. Pour localiser la structure où se trouve cette protéine, la technique d'immunocytochimie sur des coupes transversales du pharynx de *C.elegans* a été utilisée. En effet, plusieurs travaux sur les nématodes ont utilisé l'immunocytochimie comme technique de localisation des protéines. N. Birger et al ont étudié l'ultrastructure de la cuticule du pharynx du nématode parasite *Oesophagostomum*

dentatum (strongylida) sur des coupes transversales et longitudinales du pharynx de ce nématode [116]. Ce groupe de chercheur a aussi utilisé un marquage avec des lectines pour localiser la chitine dans la cuticule du pharynx. E. Kiefer et al ont appliqué l'immunocytochimie pour la localisation des protéines cuticulaires du nématode parasite *Dipetalonema viteae* (Filarioidea) en utilisant des anticorps anti- cuticulaires produits chez des souris [117]. L'immunocytochimie a été effectuée sur des coupes transversales du pharynx de *C.elegans* dans le but de localiser l'endroit exact de la chitinase CHT-1. Lors des premiers essais, le marquage avec l'anticorps anti-FC 1 fut négatif, non spécifique ou absent et la fixation des vers fut moyenne. Le même résultat fut obtenu avec l'anticorps anti-DF. Ces deux résultats peuvent être expliqués par le fait que les vers n'ont pas été dénaturés alors que les deux anticorps anti-FC 1 et anti-DF ont été produits contre des protéines FC 1 et DF dénaturées. Un autre marquage a été effectué sur des coupes de *C.elegans* dénaturés de la même manière que ceux qui ont été utilisés en immunofluorescence. Le marquage a été aussi négatif. Selon M. Vlimant (communication personnelle) [138], les épitopes de la chitinase CHT-1 pourraient être modifiés par la solution de fixation (0.5 % glutaraldehyde) ce qui pourrait empêcher les deux anticorps de se fixer. A partir de cette hypothèse, un marquage a été effectué sur des coupes de *C.elegans* dénaturées mais pas fixés au glutaraldehyde 0.5%. Les résultats révélés furent positifs car les anticorps anti-FC 1 ont été localisés au niveau des trois canaux glandulaires du pharynx (**Fig. 10 et 11**). Par contre l'anticorps anti-DF a révélé un fort marquage au niveau des cellules hypodermiques et un faible marquage au niveau des cellules intermusculaires du pharynx.

Les résultats obtenus par l'immunocytochimie sont en accord avec ceux de l'analyse par immunofluorescence. De ce fait, l'anticorps anti-DF a réagi avec une ou plusieurs protéines riches en cystéines qui sont probablement localisées dans les cellules hypodermiques, alors que la présence du marquage au niveau des canaux glandulaires révélée avec l'anticorps anti-FC1 pourrait correspondre à la chitinase CHT-1 et / ou à la protéine T13H5.3. Selon Albertson et Thomson, les canaux glandulaires conduisent des enzymes digestives du bulbe terminal (TB) au pharynx et débouchent sur des ouvertures au niveau de la bouche et de la lumière du pharynx via la couche cuticulaire [87]. Ces glandes sont considérés comme responsables de la sécrétion d'enzymes, qui jouent un rôle dans le processus de la digestion [97]. Le test d'immunocytochimie a révélé l'endroit exact de la chitinases CHT-1 et / ou celui de la chitinase T13H5.3.

La localisation de ces chitinases dans les canaux glandulaires pourrait suggérer que l'enzyme est synthétisée dans les cellules glandulaires, sécrétée et transportée au pharynx. Ce résultat est très

important car il a permis pour la première fois de révéler la présence de chitinase (s) au niveau du pharynx de *C.elegans*. Cette chitinase pourrait avoir un rôle dans le processus de digestion chez ce nématode qui se nourrit des bactéries et probablement d'autres aliments composés de structures chitineuses trouvées dans la nature. L'activité chitinolytique doit encore être démontrée pour confirmer cette hypothèse.

IV . 3 - L'inhibition de l'expression du gène *cht-1* :

La localisation de la chitinase CHT-1 a permis de faire d'autres études pour connaître son rôle chez *Caenorhabditis elegans*. En effet, la technique d'inhibition de l'expression du gène *cht-1* par interférence de l'ARN a été utilisée. Les vers élevés en présence des bactéries avec le plasmide spécifique ont démontré un comportement normal, par contre les réactions des deux anticorps anti-FC 1 et anti-DF avec la protéine de 45 kDa étaient absentes, alors que la protéine 65 kDa a encore réagi avec l'anticorps anti-FC 1. Ce résultat peut indiquer que l'expression de la protéine de 45 kDa a été supprimée chez les vers transformés. En effet, le gel SDS-PAGE (**Fig.58**) a confirmé l'absence de cette protéine. Ceci confirme l'hypothèse que c'est bien la même protéine de 45 kDa qui a réagi avec les deux anticorps anti-FC 1 et anti-DF . En plus, l'expression du gène *cht-1* a été bloquée dans les deux populations de *C.elegans* nourris séparément avec les bactéries transformées avec le plasmide spécifique contenant l'insert FC 1 ou DF. Ces résultats confirment l'utilité de la technique ARNi décrite par L. Timmons et A. Fire [101].

L'absence de fluorescence dans les tests IFAT effectués avec l'anticorps anti-FC 1 sur les deux populations mixtes de *C.elegans* transformées a confirmé l'absence de l'antigène au niveau du pharynx des deux populations. Ce résultat est très important et complémentaire aux résultats obtenus précédemment, car il confirme que la fluorescence du pharynx et le marquage des canaux glandulaires sont le résultat de la réaction des anticorps anti-FC 1 avec la chitinase CHT-1 et non pas avec la chitinase T13H5.3. Grâce à cette dernière technique, la localisation de la chitinase CHT-1 a été confirmée, cette enzyme est synthétisée par le bulbe terminal (cellules glandulaires) et sécrétée dans la lumière du pharynx via les canaux glandulaires. La fluorescence observée au niveau de la bouche de *C.elegans* pourrait correspondre à une réaction croisée des anticorps anti-FC 1 avec le site catalytique conservé de la chitinase T13H5.3.

Les vers des différentes populations de *C.elegans* n'ont pas exprimé le gène *cht-1*, ceci est probablement dû à l'alimentation continue des vers avec des bactéries transformées. Ces *C.elegans* ont poursuivi leur développement sans aucune modification physiologique détectable, ce qui démontre que cette chitinase CHT-1 n'est pas essentielle dans le développement de ce nématode.

Enfin, cette technique de nourrir les *C.elegans* avec des bactéries transformées est plus efficace que l'injection des plasmides dans les gonades de vers, car les pertes ont été nulles avec cette méthode, alors que l'injection des plasmides s'est avérée une méthode coûteuse, longue et a provoqué des pertes de vers injectés.

En conclusion, la chitinase CHT-1 présente au niveau du pharynx de *C.elegans* pourrait avoir un rôle dans la digestion des structures chitineuses avalées par ce nématode dans la nature. La chitinase pourrait aussi intervenir dans la digestion partielle des protéoglycanes des bactéries qui servent de nourriture pour ce nématode au laboratoire. Enfin, cette enzyme pourrait jouer un rôle dans la dégradation partielle des chitosanes et des peptidoglycanes trouvés dans les organismes sur lesquels *C.elegans* se nourrit.

Pour la première fois une chitinase a été identifiée chez le nématode libre *Caenorhabditis elegans*. L'isolation et la localisation de cette chitinase CHT-1 ont été effectuées et son rôle potentiel dans le cycle de vie de ce nématode a été déterminé. La seule chose qui restera à réaliser pour compléter ce travail sera de tester l'activité chytinolytique de ce gène *cechi 1*. Au début de ce travail, il a été suggéré que l'activité chytinolytique révélée par F. Alaeddine [98] dans tous les stades de développement de *C. elegans* dépendait du gène *cht-1*. Toutefois au long de ce travail, il a été démontré l'existence d'autres gènes chitinases chez ce nématode qui peuvent être à la base des activités chitinolytiques décrites.

IV . 4 - Perspectives :

Vu le rôle joué par les chitinases dans le cycle de développement des parasites tel que *Entamoeba histolytica* [73 -139], *Plasmodium* [75 - 76] et *Leishmania* [66 - 140] ainsi que leurs rôles dans la transmission des nématodes parasites comme *B. malayi*, *W. bancrofti* et *Onchocerca volvulus* [72], les chitinases sont considérées comme la première cible pour bloquer la transmission des parasites. De nombreux gènes codant pour des chitinases ont été identifiés et caractérisés chez certains de ces parasites. Les stades larvaires de plusieurs filaires utilisent les chitinases dans leur développement, ce qui facilite leur transmission du vecteur à l'hôte définitif qui est généralement l'homme et l'animal. Mais des questions se posent : comment arrêter le cycle de développement des parasites qui utilisent les chitinases ? Faut-il développer un médicament ou un vaccin? Le traitement se fera-t-il sur l'homme, l'animal, sur les vecteurs ou sur les parasites? C'est autour de ces questions que se déroulent la plupart des recherches sur les chitinases chez les parasites.

Yao-Lung Tsai et al ont démontré que le blocage de la sécrétion d'une chitinase chez les ookinetes de *Plasmodium falciparum* provoque une diminution importante dans le passage des parasites via la membrane peritrophique du vecteur [141]. Cela peut diminuer le taux de transmission de ce parasite du vecteur à l'hôte. Cependant, un problème se pose chez l'homme, car récemment des études ont démontré que des chitinases humaines ont des fonctions dans la défense immunitaire [142-143]. Selon Escott GM et Aerts JMFG, certaines chitinases de l'homme jouent un rôle dans la défense contre les champignons pathogènes [144 - 145]. La fonction exacte de toutes les chitinases de l'homme n'est pas encore claire. En plus, quelques chitinases des parasites possèdent un domaine catalytique similaire à celui des chitinases humaines. Ceci pourrait conduire à des réactions croisées des anticorps lors d'une vaccination [144]. La capacité antigénique des chitinases sécrétées par des nématodes parasites a été démontrée par plusieurs travaux de recherches [2. 26. 147. 148]. Ceci laisse la voie ouverte à une éventuelle vaccination sans que des réactions croisées avec les chitinases de l'homme sont à craindre .

De ces différents résultats, il a été constaté que beaucoup de travail reste à faire sur les chitinases chez les parasites. *Caenorhabditis elegans* présente plusieurs adaptations liées au parasitisme, il est considéré comme un excellent modèle d'étude pour les nématodes parasites avec lesquels il partage plusieurs gènes homologues. Dans ce travail, un première gène codant pour une chitinase a été identifié chez ce nématode libre, et classé dans la famille 18. Parmi les 36 gènes supposés

chitinases (annexe), 4 gènes possèdent des caractéristiques des chitinases de la famille 19 !!!.

L'isolation et l'étude de ces 4 gènes pourrait confirmer pour la première fois la présence des chitinases de la famille 19 chez un animal. L'isolation et la caractérisation de ces 36 gènes ainsi que leur localisation pourrait révéler le rôle de chaque gène chez *C.elegans*. Dans ce travail, une stratégie a été développée, qui pourrait être suivie et améliorée dans l'étude des autres gènes supposés chitinases. Une analyse du rôle de ces chitinases et les conséquences de leur blocage sur le développement de ce nématode pourrait apporter d'autres informations importantes sur les chitinases chez les nématodes en général et spécifiquement leurs rôles chez les nématodes parasites.

V - Bibliographie

- 1 - **Perrakis, A., Tews, I., Dauter, Z., Oppenheim, A.B., Chet, I., Wilson, K.S. and Vorgias, E.C.**(1994): Crystal structure of a bacterial chitinase at 2.3 Å resolution. *Structure* **2**. NO 12:1169 – 1180.
- 2 - **Shahabuddin, M., Kaslow, D.** (1993): Chitinase: a Novel Target for Blocking Parasite Transmission? *Parasitology Today* **9**:no. 7. 252 – 255.
- 3 - **Cohen-Kupiec, R and Chet, I.**(1998): The molecular biology of chitin digestion. *Curr Opin biotechnol* **9** : 270 – 277.
- 4 - **Wagner, G.P.** (1994): Evolution and multi-functionality of the chitin system *Molecular Ecology and Evolution: Approches and Application*. 559 – 577.
- 5 - **Wirth, S. J and Wolf, G.A.** (1990): Dye-labelled substrates for the assay detection of chitinase and lysosyme activity *Journal of Microbiol Methods* **12**: 197 – 205
- 6 - **Tsigo, I and Bouriotis, V.** (1995): Purification and characterization of chitin deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum*. *The Journal of Biol Chemistry*. Vol.270, No. **44**: 26286 – 26291.
- 7 - **Cohen, E.** (1993): Chitin Synthesis and Degradation as Targets for Pesticide Action. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **22**: 245 – 261
- 8 - **Sampson, M.N and Gooday, G.W.**(1998): Involvement of chitinases of *Bacillus thuringiensis* during pathogenesis in insects. *Microbiology* **144**: 2189 – 2194.
- 9 - **Zeltins, A and Schrepf, H.** (1995): Visualisation of α-Chitin with a specific Chitin-Binding Protein (CHB1) from *Streptomyces olivaceoviridis*. *Analytical Biochemistry* **213**: 287 – 294
- 10 - **Tsujibo, H., Endo, H., Minoura, K., Miyamoto, K and Inamori, Y.**(1993): Cloning and sequence analysis of the gene encoding a thermostable chitinase from *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520. *Gene* **134**: 113 – 117
- 11 - **Muzzarelli, R. A.**(1999): Native, industrial and fossil chitins. *Chitin and chitinases* **87**: 1 – 6 Ed. by p. jollès and R. A. A. Muzzarelli
- 12 - **Palli, S.R., Retnakaran, A.** (1999): Molecular and biochemical aspects of chitin synthesis inhibition. *Chitin and chitinases* **87**: 85 – 98. Ed. by p. jollès and R. A. A. Muzzarelli
- 13 - **Henrissat, B and Bairoch, A.** (1993): New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similaritis. *Biochem J* **293**: 781 – 788.
- 14 - **Neuhaus, J-M.**(1999): Pathogenesis-Related Proteins in Plants..edited by: Datta, S.K. Subbaratnam Muthukrishnan. *Plant Chitinases* (PR-3,PR-4, PR-8, PR-11)

- 15 - **Sahai, A.S and Manocha, M.S.**(1993): Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host-parasite interaction. *FEMS Microbiol Rev* **11**: 317 – 338
- 16 - **Henrissat, B.**(1991): Classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem* **280**: 309 – 316.
- 17 - **Robertus, J.D., Monzingo, A.F.**(1999):The structure and action of chitinases. *Chitin and chitinases* . **87** : 125 – 135. Ed. by p. Jollès and R. A. A. Muzzarelli.
- 18 - **Terwissacha van Scheltinga, AC., Hennig, M., Dijkstra, BW.** (1996) : The 1.8 Å resolution structure of hevamine, a plant chitinase/lysosyme and analysis of the conserved sequence and : structure motifs of glycosyl hydrolase family 18. *J Mol Biol* **262** : 243 – 257
- 19 - **Hart, P.J., Monzingo, AF., Ready, MP., Ernst, SR., Robertus, JD.** (1993) : Crystal structure of an endochitinase from *Hordeum vulgare* L.seeds. *J Mol Biol* **229** : 189 – 193
- 20 - **Hart, P.J., Pfluger, HD., Monzingo, AF., Hollis, T., Robertus, JD.** (1995) : The refined crystal structure of an endochitinase from *Hordeum vulgare* L.seeds at 1.8 Å. *J Mol Biol* **248** : 402 – 413.
- 21 - **Henrissat, B.** (1999) : Classification of chitinases modules. *Chitin and chitinases* . **87** : 137 –156. Ed. by p. Jollès and R. A. A. Muzzarelli.
- 22 - **Iseli, B., Boller, T . Neuhaus, J-M.**(1993): The N-terminal cycteine-rich domaine of totobacco class I chitinase is essential for chitin binding but not for catalytic or antifungal activity. *Plant Physiol* **103**: 221 – 226.
- 23 - **Masson, J.Y., Denis, F., Brzezinski, R.**(1994): Primary sequence of the chitosanases from *streptomyces sp.* strain N 174 and comparison with other endoglycosidases. *Gene* **140**: 103 –107.
- 24 - **Ando, A.,Noguchi, K. Yanagi, M., Shinoyama, H.,Kagawa, Y., Hirata, H.,Yabuki, M. and Fujii,T.**(1992): Primary structure of chitosanase produced by *Bacillus circulans*. MH-K. *J Gen Appl Microbiol* **38**: 135 – 144.
- 25 - **Venegas, A., Goldstein, J.C., Beauregard, K., Oles, A., Abdulhayoglu, N., Fuhrman, A.** (1996): Expression of recombinant microfilarial chitinase and analysis of domain function. *Molecular and Biochemical Parasitology* **78**: 149 – 159.
- 26 - **Adam, R., Kaltmann, B., Rudin, W., Freidrich, T., and Lucius, R.** (1996) : Identification of Chitinase as the Immunodominant Filarial Antigen Recognized by sera of Vaccinated Rodents. *The Journal of Biological Chemistry* **271**. N0 3, 1441 – 1447.
- 27 - **De la Vega, H., Specht, CA., Semino, CE., Robbins, PW., Eichinger, D., Caplivski, D., Ghosh, S., Samuelson, J.** (1997): Cloning and expression of chitinases of *Entamoeba*. *Mol Biochem Parasitol* **85**: 139 - 147.

- 28 - **Perraki, A., Wilson, K.S., Chet, I., Oppenheim, A. B and Vorigiase, C.E.**(1993): Phylogenetic relationships of chitinases. in *Chitin Enzymology*. Edited by Muzzarelli R.A.A. Ancona: European Chitin Society; 217 – 232.
- 29 - **Neuhaus, J-M., Sticher, L., Meins, F.Jr., Boller, T.** (1991): A short C-terminal sequence is necessary and sufficient for the targeting of chitinases to the plant vacuole. *Proceedings of the National Academy of Science, USA*. **88**: 10362 – 10366.
- 30 - **Shinshi , H., Neuhaus, J-M., Ryals, J., Meins, F.**(1990): Structure of a tobacco endochitinase gene : evidence that different chitinase genes can arise by transposition of sequence encoding a cysteine-rich domain. *Plant Mol Biol* **14**: 357 – 368.
- 31 - **Hamel, F., Boivin, R., Temblay, C., Bellemare, G.**(1997):-Structure and evolutionary relationships among chitinases of flowering plants. *J Mol Evol* **44**: 614 – 624
- 32 - **Henrissat, B., Bairoch, A.** (1993): New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem* **293**: 781 – 788
- 33 -**Meins, F.Jr., Neuhaus, J-M., Sperisen, C., Ryals, J.** (1992): The primary structure of plant pathogenesis- related glucanohydrolases and their genes. 245 – 282. In *Genes Involved in Plant Defence*. Edited by Boller, T. Meins, F.Jr. New York: Springer Verlag..
- 34 - **Jekel, PA., Hartmann, JBH., Beintema, JJ**: (1991) The primary structure of hevamine, an enzyme with lysozyme/ chitinase activity from *Havea brasiliensis* latex. *Eur J Biochem* **200**: 123 – 130.
- 35 - **Colling, DB., Kragh, KM., Mikkelsen, JD., Nielsen, KK., Rasmussen, Vad K.**(1993): Plant chitinases. *Plant J* **3**: 31 – 40.
- 36 - **Melchers, LS., Apotheker-de Groot, M., van der Knaap, JA., Ponstein, AS., Sela- buurlage, MB., Bol, JF., Cornelissen BJC., van den Elzen, PJM.,Linthorst, HJM.**(1994): A new class of tobacco chitinases homologous to bacterial exo-chitinases displays antifungal activity. *Plant J* **5**: 569 – 580.
- 37 - **Humphreys, AM., Gooday, G.**(1984): Properties of chitinase avctivities from *Mucor mucedo*: evidence for a membrane-bound zymogenic form. *J Gen Microbiol* **130**, 1359 – 1366
- 38 - **Koga, D., Sasaki, Y., Uchiumi, Y., Hirai, N., Arakane, Y., Nagamatsu, Y.** (1997):Purification and characterization of *Bombyx mori* chitinases.*Insect Biochem Mol Biol* **27** : 759 – 767.
- 39- **De Jong, AJ., Cordewener, J., LO Schiavo, F., Terzi, M., Vandekerckhove, J., Van Kammen, A., De Vries, SC.**(1992): A carrot somatic embryo mutant is rescued by chitinase. *Plant Cell* **4** : 425 – 433
- 40 - **Koga, D., Jilka, J.,Kramer, KJ.**(1983): Insect endochitinases: glycoproteins from moulting fluid, integument and pupal haemolymph of *Manduca sexta* L. *Insect Biochem* **59**: 2162 – 2164.

- 41- **Koga, D., Mitsutomi, M., Kono, M., and Matsumiya, M.**(1999): Biochemistry of chitinases. *Chitin and chitinases* . **87**:111 – 123. Ed. by p. Jollès and R. A. A. Muzzarelli.
- 42 - **Koga, D.** (1996): Comparative biochemistry of insect and plant chitinases. In: Muzzarelli, R.A.A. ed . *Chitin enzymology 2* . Atec, Grottammare, K. 85 –94.
- 43 – **Takayangi, T., Ajisaka, K., Takiguchi, Y., Shimahara, K.** (1991): Isolation and characterization of thermostable chitinases from *Bacillus licheniformis* X-7u. *Biochim Biophys Acta* **1078** : 404 – 410.
- 44 - **Koga, D., Isogai, A., Sakuda, S., Matsumoto, S., Suzuki, A., Kimura, S., Ide, A.** (1987): Specific inhibition of *Bombyx mori* chitinase by allosamidin. *Agric Biol Chem* **51**: 471 – 476.
- 45 - **Koga, D., Mizuki, K., Ide, A., Kono, M., Mtsui, T., Shimizu, C.** (1990): Kinetics of a chitinase from a prawn, *Penaeus japonicus*. *Agric Biol Chem* **54** :2505 - 2512.
- 46 - **Sakurada, M., Morgavi, DP., Komatani, K., Tomita, Y., Onodera, R.** (1996): Purification and characteristics of cytosolic chitinase from *Piromyces communis* OTSI. *FEMS Microbiol Lett* **137**: 75 – 78.
- 47 - **Wang, Q., Zhou Z-Y, Sakuda, S., Yamada, Y.**(1993): Purification of allosamidin-sensitive and insensitive chitinases produced by allosamidin-producing *Streptomyces*. *Biosci Biotech Biochem* **57**: 467 – 470.
- 48- **Romaguera, A., Tschech, A., Bender, S., Plattner, HJ., Diekmann, H.** (1993): Protoplast formation by a mycelase from *Streptomyces olivaceoviridis* and purification of chitinases. *Enzyme Microb Technol* **15**: 412 – 417.
- 49 - **Terwisscha Van Scheltinga, AC., Armand, S., Kalk, KH., Isogai, A., Henrissat, B., Dijkstra, BW.**(1995): Stereochemistry of chitin hydrolysis by a plant chitinase/lysozyme and x-ray structure of a complex with allosamidin: evidence for substrate assisted catalysis. *Biochemistry* **34**: 15619 – 15623
- 50- **Kono, M., Matsui, T., Shimizu, C., Koga, D.** (1990): Purification and some properties of chitinase from the stomach of Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Agric Biol Chem* **54**: 973 – 978.
- 51- **Matsumiya, M., Mochizuki, A.** (1995): Purification and some properties of chitinase from the stomach of common mackerel *Scorpaenopsis japonicus*. *Bull Coll Agr Vet Med, Nihon Univ* **52**: 131 – 136.
- 52 **Wang, S-L., Chang, W-T.** (1997): Purification and characterization of two bifunctional chitinases/lysozymes extracellularly produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 in a shrimp and crab shell powder medium. *Appl Environ Microbiol* **63**: 380 – 386.
- 53- **Sinnott, ML.** (1990): Catalytic mechanisms of enzymic glycosyl transfer. *Chem Rev* **90**: 1171 - 1202.

- 54 - **Arnold, K., Venegas, A., Houseweart, C. Fuhrman, JA.** (1996): Discrete transcripts encode multiple chitinase isoforms in brugian microfilariae. *Mol Biochem Parasitol* **80**: 149 - 158.
- 55 - **Fredman, DO., Nutman, TB., Ottesen, EA.** (1989): Protective immunity in bancroftian filariasis. *J Clin Invest* **83**: 14 - 22.
- 56 - **Adam, R., Kaltmann, B., Rudin, W., Friedrich, T., Marti, T., Lucius, R.** (1996): Identification of chitinase as the immunodominant filarial antigen recognized by sera of vaccinated rodents. *J Biol Chem* **271**: 1441 – 1447.
- 57 - **Villagomez-Castro, JC., Calvo-Mendez, C., Lopez-Romero, E.** (1992): Chitinase activity in encysting *Entamoeba invadens* and its inhibition by allosamidin. *Mol Biochem Parasitol* **52**: 53 – 63
- 58 - **Perrakis, A., Wilson, K.S., Chet, I., Oppenheim, A.B., and Vorgias, C.E.** (1993): Phylogenetic relationships of chitinases. R.A.A. Muzzarelli, ed., Chitin enzymology. *Eur. Chitin Soc.*, Ancona.
- 59 - **Elad, Y., Chet, I., Henis, Y.** (1982): Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. *Can J Microbiol* **28**: 719 – 725.
- 60 - **Haran, S., Schickler, H., Chet, I.** (1996): Molecular mechanisms of lytic enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. *Microbiol* **142**: 2321 – 2331.
- 61 - **Limn, MC., Lora, JM., Garcia, I., de la Cruz, J., Llobell, A., Bentez, T., Pintor-Toro, JA.** (1995): Primary structure and expression pattern of the 33-kDa chitinase gene from the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum*. *Curr Genet* **28**: 478 – 483.
- 62 - **Hayes, CK., Klemsdal, S., Lorito, M., Di Pietro, A., Peterbauer, C., Nakas, JP., Tronsmo, A., Harman, GE.** (1994) Isolation and sequence of an endochitinase-encoding gene from a cDNA library of *Trichoderma harzianum*. *Gene* **138**: 143 – 148.
- 63 - **Kuranda, MJ., Robbin, PW.** (1991): Chitinase is required for cell separation during the growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **266**: 19758 – 19767.
- 64 - **Keyhani, NO., Roseman, S.** (1996): The chitin catabolic cascade in the marine bacterium *Vibrio furnissii*. Molecular cloning, isolation, and characterization of a periplasmic chitodextrinase. *J Biochem* **271**: 33414 – 33424
- 65 - **Chitlaru, E., Roseman, S.** (1996): Molecular cloning and characterization of a novel β -N-acetyl-D-glucosaminidase from *Vibrio furnissii*. *J Biol Chem* **271**: 33433 – 33439.
- 66 - **Schlein, Y., Jacobson, RL., Shlomai, J.** (1991): Chitinase secreted by *Leishmania* functions in sandfly vector. *Proc R Soc London Ser B: Biol Sci* **245**: 121 - 126.

- 67 - **Welburn, SC., Arnold, K., Maudlin, I., Gooday, DC.** (1993) *Rickettsia*-like organisms and chitinase production in relation to transmission of trypanosomes by tsetse flies. *Parasitology* **107**: 141 - 145.
- 68 - **Welburn, SC., Maudlin, I., Molyneux, DH.** (1994): Midgut lectin activity and sugar specificity in teneral and fed tsetse. *Med Vet Entomol* **8**: 81 -87.
- 69 - **Canals, M., Wadee, A., Lamontagne, L., Piessens, WF.** (1984): A monoclonal antibody to surface antigens on microfilariae of *Brugia malayi* reduces microfilaremia in infected jirds. *Am J Trop Med Hyg* **33**: 420 - 424.
- 70 - **Fuhrman, JA., Piessens, WF.** (1989): A stage-specific calcium-binding protein from microfilariae of *Brugia malayi* (Filariidae). *Mol Biochem Parasitol* **35**: 249 - 257.
- 71 - **Shahabuddin, M., Kaslow, D.** (1994): *Plasmodium*: parasite chitinase and its role in malaria transmission. *Exp Parasitol* **79**: 85 – 88.
- 72 - **Shahabuddin, M and Vinetz, J.M.** (1999): Chitinases of human parasites and their implication as antiparasitic targets. *Chitin and chitinases* **87**: 223 – 234. Ed. by p. Jollès and R. A. A. Muzzarelli
- 73 - **Das, S., Gilliin, FD.** (1991): Chitin synthase in encysting *Entamoeba invadens*. *Biochem J* **280** : 641 – 647.
- 74 - **Ward, HD., Alroy, J., Lev, BI., Keusch, GT., Pereira, ME.** (1985): Identification of chitin as a structural component of *Giardia cysts*. *Infect Immun* **49**: 629 – 634.
- 75 - **Shahabuddin, M., Toyoshima, T., Aikawa, M., Kaslow, D.** (1994): Transmission - blocking activity of a chitinase inhibitor and activation of malarial parasite chitinase by mosquito protease. *Proceedings of the National Academy of Science, USA* **90**: 4266 - 4270.
- 76 - **Shahabuddin, M., Kaidoh, T., Aikawa, M., Kaslow, DC.** (1995): *Plasmodium gallinaceum*: mosquito peritrophic matrix and the parasite-vector compatibility. *Exp Parasitol* **81**: 386 - 393.
- 77 - **Maissiat, J., Baehr, J.C., Picaud, J.L.** (1998): Biologie animal, Invertébrés. 2^{ème} édition, Liège.
- 78 - **E G Cox, F., Kreier, J.P., Wakelin, D.** (1998): Parasitology. Microbiology and Microbial Infections.
- 79 - **Brumpt, E.** (1927) : Précis de parasitologie. Masson & Cie éditeurs, Paris.
- 80 - **Englund, P.T and Sher, A.** (1988): The Biology of Parasitism. MBL lectures in Biology, volume 9.
- 81 - **Tran Ba Loc, P.** (1971): Cours de parasitologie. Delachaux et Niestlé éditeur, Paris VII.

- 82- **Grassé, P.P., Doumenc, D.** (1998): Zoologie, Invertébrés. 6^{ème} édition, Paris.
- 83 - **Smith, J.D.** (1994): Animal parasitology. Third Edition. Cambridge.
- 84 - **Gutierrez, Y.** (2000): Diagnostic Pathology of Parasitic Infections. Second edition, New York, Oxford.
- 85 - **Nozais, J.P., Datry, A. Danis, M.** (1996): Traité de parasitologie médicale. Edition Pradel, Paris.
- 86 - **Meglitsch, P.A., Schram, F.R.** (1991) : Invertebrate Zoology. Third Edition
- 87 - **Albertson, D.G., and Thomson, J.N.**(1976) : The pharynx of *Caenorhabditis elegans*. B. Biological Sciences. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* Volume **275** . Pages 1 – 213. Number 936.
- 88 – **Seymour, M.K., K.A. Wright, and C.C. Doncaster.** (1983) : The action of the anterior feeding apparatus of *Caenorhabditis elegans* (Nematoda :Rhabditida). *J. Zool. Soc. Lond.* **201** : 527 – 539.
- 89 - **Wood, W.B.** (1988): The nematode *Caenorhabditis elegans*. Gold Spring Harbor Laboratory.
- 90 - **Bush, A.O., Fernandez, J.C., Esch, G.W and Seed, J.R.** (2001) : Parasitism . Cambridge
- 91 - **Pritchard, D.** (1995) : The survival strategies of hook-worms.*Parasitology Today.* **11**: 255 - 259.
- 92 - **Shahabuddin, M. and Vinetz, J.M.**(1999): Chitinases of human parasites and their implications as antiparasitic targets. *Chitin and chitinases* . **87** : 223 – 234.. Ed. by p. Jollès and R. A. A. Muzzarelli.
- 93 -**Fuhrman, J.A., Lane, WS., Smith, RF., Piessens, WF., Peler, FB.** (1992): Transmission-blocking recognize microfilarial chitinase in brugian lymphatic filariasis. *Proceedings of the National Academy of Science, USA* **89** : 1548 – 1552.
- 94 - **Yang, Wu., Adam, R., Williams, S.A., Bianco, A.E.** (1996): Chitinase gene expressed by infective larve of the filarial nematodes, *Acanthocheilonema viteae* and *Onchocerca volvulus*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **75**: 207 – 219.
- 95 - **Winxon, J.**(2000). *Caenorhabditis elegans*. *Yeast* **17**: 37 – 42
- 96 - **Jonathan, H.H., Robert, H., Barbara, R., Jasny, J.K.**(1998) : *C.elegans*: Sequence to Biology. *Science* **282**: 2011 – 2046.
- 97 - **Sulston, J. E.** (1976) :Post embryonic development in ventral cord of *Caenorhabditis elegans*. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* B **275** : 287 – 297.

- 98 - **Ferial, Alaeddine.** (2000) : Etude moléculaires de la surface des nématodes. Travail de Thèse. Université de Neuchâtel, Institut de Zoologie, Département de Parasitologie.
- 99 - **Fire, A. et al .** (1998) : Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391** : 806 – 811.
- 100 - **Sharp, P.A.** (1999) : RNAi and double-strand RNA. *Gene Dev.* **13** : 139 – 141.
- 101 - **Timmons, L and Fire, A.** (1998) : Specific interference by ingested dsRNA. *Nature*, **395**. 29 octobre. 854.
- 102 - **Tabara, H., Grishok, A & Mello, C.C.** (1998) : RNAi in *C. elegans* : soaking in the genome sequence. *Science* **282** : 430 – 431.
- 103 - **Tabara, H et al.** (1999) : The red-1 gene, RNA interference, and transposon silencing in *C.elegans*. *Cell.* **99** : 123 – 132.
- 104 - **Vancoppenolle, B., Claeys, M., Borgonie, G., Tytgat, T., and Coomans, A.** (2000): Evolution of Fixation Methods for Ultrastructural Study of *Caenorhabditis elegans* Embryos. Microscopy research and technique. **49**: 212 – 216.
- 105 - **Maniatis, T., Sambrook, J., Fritsch, E, F** (1989) : Molecular cloning. A Laboratory Manual. Second Edition
- 106 - **Marchuk , D., Drumm, M., Saulino, A., Collins, F.S.** (1991) : Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products. *Nucl Acids Res.* **19** : 1154.
- 107 - **Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E et al.** (1994) : *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & sons Inc.
- 108- **Balmer, Yves.** (2001) : Etudes de la regulation de la Fructose-1,6-Biophosphatase par la Thioredoxine F à l'aide d'approches moléculaires. Travail de Thèse. Institut de Biochimie. Université de Neuchâtel.
- 109 - **Laemmli, U.K.** (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. *Nature* **227**: 680 – 685
- 110 - **Schleicher & Schuell.**(1998): Electroelution of Proteins from SDS-PAGE Gels.<http://www.s-and-s.com/electro.htm>
- 111 - **Bradford, M.M.** (1976): A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of proteins utilising principe of protein – dye binding. *Anal. Bioch* **72**: 248 – 251
- 112 - **Towbin, H., Staehelin, T and Gordon, J.** (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : Procedure and some applications.*Proceedings of the National Academy of Sciences.* USA **76**: 4350 - 4355

113 - **Kyhse-Andersen, J.** (1984): *Biochem. Biophys. Methods* **10**: 203 - 209

114- **Documentation Bio-Rad.** The Bio-Rad Immun-Blot .

115 - **Mike, F.**(1990): RUVKUN Antibody Staining Protocol revised.http://www.dartmouth.edu/artsci/bio/ambros/protocols/MGH_protocols/X0001_antibody_staining_pr.html

116 - **Birger, N., José, B., Werner, P.** (1997) : Ultrastructure of the Pharyngeal Cuticle and Lectin Labelling with Wheat Germ Agglutinin-gold Conjugate Indicating Chitin in the Pharyngeal Cuticle of *Oesophagostomum dentatum* (Strongylida, Nematoda). *Acta Zoologica*. Vol. **78**, No. 3 : 205 – 213.

117 - **Kiefer, E., Rudin, W., Betschart, B., Weiss, N., Hecker, H.** (1986) : Demonstration of anti-cuticular antibodies by immuno-electron microscopy in sera of mice immunized with cuticular extracts and isolated cuticles of adult *Dipetalonema viteae* (Filarioidea). *Acta Tropica* **43**. 99 – 112.

118- **Geyer, L.** (1973):Ultrahistochemie. Ed. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena.

119 - **pPD 96** :Alexandro, P. Post doc., Institut de Zoologie. Université de Fribourg.

120 - **Waterston,R.** The sequence of *C. elegans* cosmid C04F6. Submitted (10-DEC-1995). Sanger Centre, Hinxton Hall. Cambridge CB10 IRQ, England
e-mail: rw@nematode.wustl.edu and jes@sanger.ac.uk

121 - **pPD.129.36** : Institut de Zoologie. Université de Fribourg.

122 - **E. coli BI21/DE3** : Laboratoire de Biochimie.Université de Neuchâtel.

123 - **Blaxter, M.** (1996) : Protein Motifs in Filarial Chitinases . *Parasitology Today*, Vol. 12, no. 1

124- **Shen, Z., Jacobs-Lorena, M.** (1999) : Evolution of Chitin-Binding Proteins in Invertebrates. *J Mol Evol* **48** : 341 – 347

125 - **Sulston, J.** (1992) : *C.elegans* genome sequencing project : a beginning. *Nature* **356**, 37 – 41

126 - **Elvin, CM., Vuocolo, T., Pearson, RD., East, I., Riding, GA., Eisemann, C H and Tellam, RL.** (1996) : Characterization of a major peritrophic membrane protein, peritrophin-44, from the larvae of *Lucilia cuprina*. cDNA and deduced amino acid sequences. *J Biol Chem* **271** : 8925 – 8935.

127 - **Wright, HT., Sandrasegaram, G., Wright, CS.** (1991) : Evolution of family of N-acetylglucosamine binding proteins containing the disulfide-rich domain of wheat germ agglutinin. *J Mol Evol* **33** : 283 – 294.

- 128 - **Wright, CS** . (1987) : The crystal structure of wheat germ agglutinin at 2.2A resolution. *J Mol Biol* **111** : 439 – 457.
- 129 - **Cox, G.N.** (1992) : Molecular and Biochemical Aspects of Nematode Collagens. *J.Parasitology.*, **78** (1) : 1 – 15.
- 130 - **Smith, D.B. and Johnson, K.S.** (1988) : Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathion S-transferase. *Gene* **67** : 31 – 40.
- 131 - **Schürman, M.P.** Professeur de Biochimie. Laboratoire de Biochimie. Université de Neuchâtel.
- 132 - **Eric, Grueter** . (2000) : Analysis of Histone H1 Gene and Gene Products in *Trypanosoma brucei*. Travail de Thèse. Université de Neuchâtel, Institut de Zoologie, Département de Parasitologie.
- 133 – **Hirschy, Alain.** (1989) : Reconnaissance de l'Histone H 1 de *Trypanosoma brucei brucei* par la production d'anticorps polyclonaux : quelques essais. Travail de Diplôme. Institut de Zoologie, Département de Parasitologie.
- 134 - **Kuzhandhaivel, S., Vetrivel, S.K., Pandian, U.C., and Kuppamuthu, D.** (2001) : Purification, cloning, and DNA sequence analysis of a chitinase from an overproducing mutant of *Streptomyces peuceitius* defective in daunorubicin biosynthesis. *Can. J. Microbiol.* **47** : 179 - 187
- 135 - **Jonathan, H., Robert, K.H.** (1998) : Changing styles in *C. elegans* genetics. *TIG*. Septembre. Vol. **14**, No. 9. 351 – 357.
- 136 – **Marti, S.**(1991) : Biochemische und immunologische Charakterisierung von Cuticlin, einem Strukturprotein aus der Kutikula von *Ascaris suum*. Thesis, Basel.
- 137 - **Fujimoto, D and Kanaya, S.** (1973) : Cuticlin : A noncollagen structural protein from *Ascaris* cuticle. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* **157** : 1 - 6
- 138 - **Vlimant, M** . Institut de physiologie animale. Université de Neuchâtel.
- 139- **Valdes, J., Lopez-Romero, E., Orozco, E.** (1990): Antigens specific to pre-cysts and *in vivo* chitin synthetase activity in *Entamoeba invadens*. *Arch Invest Med* **21**: 223 -227.
- 140 - **Schlein, Y., Jacobson, RL., Messer, G.** (1992): *Leishmania* infections damage the feeding mechanism of the sandfly vector and impede parasite transmission by site. *Proceedings of the National Academy of Science, USA* **89**: 9944 - 9948.
- 141 - **Yao-Lung, T., Rhian E, H., Rebecca C, L., David A, F., and Joseph M, V.** June (2001) : Disruption of *Plasmodium falciparum* Chitinase Markedly Impairs Parasite Invasion of Mosquito Midgut. *Infection and Immunity*, Vol. **69**, NO. 6 : 4048 – 4054,

- 142- **Renkema, GH., Boot, RG., Au, FL., Donker-Koopman, WE., Strijland, A., Muijsers, AO., Hrebicek, M., Aerts, JMFG.** (1998) : Chitotriosidase, a chitinase, and the 39-kDa human cartilage glycoprotein, a chitin-binding lectin, are homologues of family 18 glycosyl hydrolases secreted by human macrophages. *Eur J Biochem* **251** (1-2) : 504 – 509.
- 143 - **Boot, RG., Renkema, GH., Strijland, A., Van Zonneveld, AJ., Aerts, JMFG.** (1995) : Cloning of a cDNA encoding chitotriosidase, a human chitinase produced by macrophages. *J Biol Chem.* **270** (44) : 26252 – 26256.
- 144 - **Escott, GM., Walters, MS., Ingham, E., Adam, DJ.** (1996) : Expression of chitinase activity during monocyte differentiation. In : Muzzarelli RAA, editor. *Chitin Enzymology*, Vol. 2. Grottammare: Eur. Chitin Soc. : 11 – 16.
- 145 - **Aert, JMIFG., Boot, RG., Renkema, GH., et al.** (1996) : Chitotriosidase : a human macrophage chitinase that is a marker for Gaucher disease manifestation. In : Muzzarelli RAA, editor. *Chitin Enzymology*, Vol. 2 . Atec Edizion-Grottammare: 3 – 10.
- 146 - **Vinetz, JM., Kaslow, DC.** (1998) : *Plasmodium gallinaceum* : use of antisera to degenerate synthetic peptides derived from the active site of protozoal chitinases to characterize an ookinete-specific chitinase. *Exp parasitol* **90** : 199 – 202.
- 147 - **Shahabuddin, M.** (1995) : Chitinase as a Vaccin. *Parasitology Today*, vol. **11**, no. 2 : 46 – 47.
- 148 - **Harrison, R.A., Wu, Y., Egerton, G., Bianco, A.E.** (1999) : DNA immunisation with *Onchocerca volvulus* chitinase induces partial protection against challenge infection with L3 larvae in mice. *Vaccine* **12** (18) : 647 – 655.
- 149 – **Perrakis, A., Wilson, S.K., Chet, I., B Oppenheim, A., and E, Vorgias. C.** (1993) : Phylogenetic relationships of chitinases. R. A. A. Muzzarelli, ed., *Chitin enzymology*. Eur. Chitin Soc., Ancona.
- 150 - **Thrombine protéase.** Pharmacia Biotech. product number : 27 - 0846
- 151 - **Current Protocols in Molecular Biology.** (1987-1994): Edited by : Frederick, M.A., Roger. B., Robert, E.K., David, D.M., Seidman, J.G., Smith, J., Kevin, S. *Harvard Medical School*
- 152 - **Bendt, A., Hüller, H., Kammel, U.** (2001) : Cloning, expression, and characterization of a chitinase gene from the Antarctic psychrotolerant bacterium *Vibrio* sp. Strain Fi :7. *Extremophiles* **5** : 119 - 126

Annexes

Séquences d'acides aminés des 36 gènes chitinasés potentiels identifiés sur le génome de *C.elegans*.

CEM 176

MSKASDDFLLYKLNLYYETGAERFSPLTRKVFKCAVVI IAVLMICGLIAFGITEIYCRLEFPVTDNLVNLNESPCKPVC
KRRI VGYFSEIESTEISKSQIDKLTHAVFAFVRIKYDGTLLQFDNSKADLRFSILKDKTRGSNVEMMVSIGGGYENAHY
FASALSDSQKKNFIDSILAFLVEHRIDGVDFFCNGQQFKTSLIMLHLSNHVDFFNVSMDYAGPWPNQWGVPTGPSS
PMFYNI GARKNFYVDWMTMKHYTCKLKQPSMLNMV I PFSARIWNNVQEAIDNRTEVFRNAELKNNMAEGRTQISRWTAE
HEGLELSPSSWDNLTMTPTYILDLDLAKAFTLTFEDKRSIKIKTDYAKKMDLGGVWVLSVDMDDRLNSLLSDVFSKEFCST
GSGNKIKYSC

CeR09D1 1

MSTSSDDVSLFYDVKKASEDVRSLKQILKHFLIIYTVLIACGVFAYAITSLFLHLNHNPTTLDKAMPTEHPDCNKRII
GYSENETTDITKRQLSQLTHAIFAFIKLQPDGTLQFQSGSAKQRFLLIKTNAESSTLKVMI SIGGMDINSDFSLVIS
DEKRRSLIESIVSFLTEHQIDGVDIFWKWSSSRDKFNFSVFMRLREKLDKQLKSYIVSILLPPAGVDI WEMGYDLD
EIIDHIDFMNVYSMDYSGPWNKWTPTGPSAPMNYNIGPRKHFTVDWMTKYYACKTRQPNKFNIVIPFYARIWRSVG
EAITLKTVEVFRNAKLINGKADGDPYISRLSVKQKGIELFPYSWDNATKSSYIWKPKKFTLTFENERSIEKKLQYVNE
MNLGGVWIWSVDMDDRINTLLDAVSSDKFCSSSSANSINFKF

CeR09D1 2

MISVFKKLSRHNNENFTPTFKKYCKYLWTICLLLAFCGIVAYGLTFLIFRYYGNQDFIEHQEILYQLSTVKPDPIN
TKNRDYKRI VGYYYRNGNDSIMMGQLAKLTHAVFAFLELHPDGTIHFESRKAKESFLYLRLKASILKFDKIMFSIG
GPANTQFFSPIIQNEEMKRKFIDSIIYFLKQYKLDGVDLFWKWSSSGDKFTYSSFLQELKHKLRSHRQNYIISIVLPP
AGVDTWELGYDLEEIMEHVDFMNVYSMDYSGPWNQWGTPTGPSAPLAFNIGPRKNFNVDWMTKYYCKTQQPGKFN
VI PFYARYWNNVQEAVDPRTEVFRNAEIRNNRADGVPYMDRSSADYKMASWDNLTSTPYIWKPDERRFFTFENQKSI
IKTRYAIDMNLGGVWIWSVDMGDHGNVLLSAVASQEFLLTSKNNGKNKYK

CeR09D1 3

MSLNYSLLDKFHSYYERRAHNNELTTKLKRVVIIISGIFLFCGIVSYALTTFVHFYKEDKFSKNEVGLDPI CKRRI
VGYSEYDSTDISKNQLAKLTHAVFAFVDIKYDGTLLQFKNLITEQKFFSLKSKARSLHSLNKLKMF SIGGDENSDFSS
ALANTQMKSTLITSI IAFIHSHMIDGVDLHKKWPTSRDKSNYATLIREIREKVDLDAKIIISITIPVGVSDWESGF
DLDAIQKHVDFINVHSMYAKPLPNQWGTPTGPSASMNFI GLRQHYNVWMTMKHYTCCLKKPSMINLVI PFYVRMVK
NVQKAIDNRTEVFRNVELKDNEVEGRSLSRYTVEHEDEMELSPESWDNATQTPYVLDLKTTRFFTYENEKSIKVLDY
VNKMDLGGVWIWSVDMDDRLNTLLSFVFPNELCSSYSENGIKYSC

CeR09D1 4

MCSVLYRIPSI SLVETVVLKIFPASSTRFKKLT TTTINPATSATTGNTSSATSTTKSPKIATKTPFCKKRIVGFFTD
QSTEITVDQLSKLTHAVFAFAKMDYLRSLILRKS PRFEELKRVAATSNSGVKIMISIGGDENSQYFSSVLSDITMCKL
FIESIIAFIHTNSIDGMDIHKKWVPETKEDVYVSFLRNLHKALQRELEGLRDPLTSLVVVPHYINHREAGYSIPDILK
YVDFVNVFTMDYYGPSDGTGPLSPLYSGHLDDKLNADADENSEESAYMSRKTVAKEKIRLTLPSWDTLTETSSMYN
NSTKTFLAFETEKSIIAKIEYVMNKNLGGVWIWSVDMDDERYHSLSTIPSKKFCADNKNDDKYGCRQNVL

CeR09D1 5

MAAKHEYNKLSLVHLPRYVIHFIDYQKLAELRKEVHSEKRIPSILTRTIAVLV FALLALVSI GSEGPQLRNSRDLT
KSPCKRIVGYSEWEGTEITRSQLGKLTHAVFAFIHMDSEGKLQFKTNQKERFEKLTAVKNANSDTKVMI SIGGDH
NSENFGSVLSDSEKSMFIDSIA RFI RQHKIHGVDIYWKWLGNSETEHHDFPSFLKDLKEKLTVRDDSIISIVAPQA
KMDRRHDGYKDFDFMEYIDFVNVFSMDYYPWPNQWGTPTGPSAPLYGGIGVKKHFNVDSTMKYTCMTEDPSKFN
MVI PFYVRLWKNVKEPISSGTEVFRADLKNAAVGNYSMSRWTVDHEGWELTPALWDDVTKTPYVWVQETGNFLT
FENKSI EAKLAYAIEHNLGGVWIHLVDKDNENEELLRAVASKKFCASESENKVTYDC

CeR09D1 6

MNVIAFSCRKDSGOEPSQSRWRPYLKYYIIIVAVFLIVVAIATVTIVLIANRVDGSANTSTVPNVSSTVAKSTITTRAP
PVCNKRIIGYYFATQTSVITRDQVSKLTHAVFAFVNMTSDGHLQIDGDLAKNRFTNLEIAKQQTTPQVKVMISIGGND
NSNNFKPGLSSPDRKKLFINSTVSVFLQTYDIDGVDLYWKWPBKTSKDIYSQFINDLRYSLQRQKRYNIMSIVLPPPDM
GANYEAGIDIENIFDNVDFLNIFTMGYFGPWQNDAGMITGAASQLFNGVNGVPGRKTYNIIHSTERYVCKTGQSDKYN
IAIPFYTMLWKHVKGPNPPNIEIYRNATFQGGVVGETSMSRKLVEEGYDFSNPTYNPEIRAAFKYNATTETFLTFE
TNDTIAAKIDYVKDRILGGVWIWAVDMDDDSNLLNLVKFTGYCTVGNLTLINC

CeR09D1 7

MLMYFLPICDNRVVGYFSSNQNSTITTEDQVSKLTHAVFAFVNMTQGGNLNINRQRFSLTKIAKQQTTPVKVMISIG
GDDNSNNFYKVLNSPNRRKVFNLNATTSFLQIYDIDGDLFWKWPBGASKTLYTKFISDLRHNQQKNKNIILSIVLPP
PDLENGYEAGINITSVNNDVDFLNIFTMGYFGPWPNPKGMITGATSQLFYGVNGVLRNRYNIHHSVQSYVCKTDQSN
KYNIAIPFYTMLWKHVQGPINPPNIEIYRNATFNGTVFGEANMSRKLVEEGYDLSPHTFNSEIRAAFKYNATTETFL
TFETNDTIAAKIDYVKDRILGGVWIWGVDMDDNSNLLSLVKFTEYCDSGNSTIYKC

CeR09D1 8

MSEEDGEICDKKVIKGYFSESHTSEITINHISKLTHAVFAFVIMKSDGTVMFRDKLAQERFLKIRDIANQASPKLKMLI
SIGGPANSDFLPISSPDRKKIFINSIVSFLKKYDIDGVDLFWKWPREDKYYYSRIFISMLKERFQMEEKNYILSII
IPPCGFGWNNKFDIENIVAVADFNIYSMDYYGPWKNPYGNPTGPISPIYNGAQGREAYNVHSSALTYSCVKQSKK
FNIVIPFFARLWKNVEKPIQHPGREVYRNVLVHGSVAVGESFMSRKSVELEKGYKLSYSYDELSRSAFIYNSTTKEYL
TFETEKSIEAKVNYVKDRALAGVWIWVVDLDEENSLINAVNFTGLCSSGDTLKFDCHEKKSFAYL

CeR09D1 9

MSNQESIELESFIDGRTEQNRSETKSTSRNVSKIITITIVIILLIIFTLGGIRVATGMFVPEKISSTPAPASANQRI
SACNKRVIKGYYSATETSEITSSQIFKLTHAVFAFVYMTSEGILTFIDQYEMDRFSKLEKVVVRNGKYKVKLLFSIGGKD
NSRNFSTVISSEKRIQTFIKSILDFLKDHNLDGVDLFWKWPKEEKEKMKYSKFIQRLKKEEGWERAYDFKQLVQDVDFV
NIYSMDYYGPWPDLAGDITGSPAPIFGCPWKKGAYNVHHSAKIYSCRKSKSKFNIAIPFYATLWENVYEPFSPGR
DVFRYVASNNGMTIGQRYMNRISVKQGGFQLERYSYDELTKGSFIYNSTTVRYLTFETERSIREKTGYVKDGMGGVW
IWSVDMDDSESNSQLNAITFKGRCAVERKSKHDC

CeR09D1 10

MSLREHAPRISKNFLNVSGTPTVTSISSTVAASTYPATPGCNKRIIGYYFATQTSVITSDQVSNLTHAVFAFVNITSD
GQLQIDGDLAKNRFTNLEIAKQQTTPQVKVMISIGGNDNSNNFKPVLSSPDRKKLFINSTVSVFLQTYDIDGV

CeR09D1 11

MAKQDNKNEIVAPSIHGKLDRLWRIYLYKIVIAIVLLVVLGNTIMTIIILVNDVNETGSTPTVTSISSTVAASTYP
ATPGCNKRIIGYYFATQTSVITRDQVSKLTHAVFAFVNMTSDGHLQIDGDLAKNRFTNLEIAKQQTTPQVKVMISIGG
NDNSNNFKPVLSSPDRKKLFINSTVSVFLQTYDIDGVDLYWKWPBKTSKDIYSQFINDLRYSLQRQKRYNIMSIVLPPP
DMGANYEAGIDIENIFDNVDFLNIFTMGYFGPWQNDAGMITGAASQLFNGVNGVPGRKTYNIIHSTERYVCKTGQSDK
YNIAIPFYTMLWKHVKGPNPPNIEIYRNATFQGGVVGETSMSRKLVEEGYDFSNPTYNPEIRAAFKYNATTETFLT
FETNDTIAAKIDYVKDRILGGVWIWAVDMDDDSNLLNLVKFTGYCTVGNLTLINC

CeR09D1 12

MTNIKSEQKESEELVLPNDRPQYEQRVTKQPTSGKYIIITITLISIIIVGFGLGLCAQIYFQAESDVLPICDKRIIGY
YSGSGTSNITSTQLSNLTHTVFAFVYMTDPDGTLLFNNQIEKNRFLKLEKVVVRNGNSKIKLMFSIGGKDNSKYFSSVIP
SEERIQTFIESILEFLEAYDLGVDLFWKWPPEEYRDAYFAFINQLRKTFEAKKKYIILSIVI PPPTLDGWGKKRLNK
IIESVDFINAYSTDYYPADNLSDDIAGPSAPIYFGAQGKSERNVHHTARNYSCLTKQASKFNIVIPFYATLWENVY
ETVLDSKRGVYRHPVAPFYGRTVGKTYLSRLAVKQEGFQVESYSYDPAPRAAFS YNRITIGIYLTTFETKESIRAKIDYVK
DRILGGVWIFSVDMDETNSQLKAVSFDGFCITIGNSKYECV"

CeC25A8

MSIRVSIKKYFLLNIGLIVLIIVKGSKLQKTRLSPNLLQNIITTC'HLVYGSIPIDRDTGYPQYSVSDVESGYDIDNIR
TFMRLRKYHPNAKLLMGVVRTKPFEDAATSVKVANGLRSHVKSkrFDGLFVTFNGIHLEYRASTSFLETISKDKKMSL
TFGVTGRRVFAFDALRRLQEINDLVEYIYLDMGELPSNEELARVTHINPLFYNGSIPFEETIQGTVEELSKEGILPSR
IVVGLTAGWKFEIKETQDPLKISHGQYAENNGKRVSQDACRARGAVIYDWQTMNEITVYRQTMMSVNLPTIKAMGE
KMKWILGQKFAGIGISHALFDDPRGDCGTDPLPAHRLVMELIRNTIPANPAKCTRLCYLDPEEVEETFPIDNLKSDYC
SHIVVPYFALDLSDKMIEEDKAEDLVKKIDDWRSKIIEVAPRLILSVGSKQASTIWQFLLGNDFHRKELAEGLVKAIN
STNADGLEISWTSQPMVSDFDKKNLKSFINDIVAADTAKMVEIVVATSQQSAYSDFYDYEHLNKTASLIVLHSHRLHS
DSLPTGHPSPLRATSSMTNQKMSWESLLSHWVEKRVLPskLVLSASTLSMQSLADVRSSAATPFGQSAFVMSLRS
KKGDIHSQQEICESLKSgtGVTHWVDGAEPYLRryDQMVAYENTRSahiKAVWASMEGVGGLALHNMHQDDPSAVCD
NRTAFPIlnALSRAQVCQTCkLQHDFKkCEQHDFVvScNFELKRSTPvFKTDIVPYERCTEVVVEQATLTLGGNVNFN
DVQQEQVVKNLTSLSKMKVCKGMVLSLSCGDSEKYLNSILGDNMTFAIGNVMNIMEKFSHYTQKPSTYYSVSLLNRLS
HIALRMTDKHSVDLPFFFNHTKPEFPSTEKfVNIWKNVGLKPKDLVLELSPFGWQTGKKVGEKkKMTQGVNcVtAGNR
AVYEHdyETLTGMtkHENGtINMPMIEdFRYKIGYIQRQLGGIALNVNGDDYTGICGRGSFPILKsvYSSHKCR

CeK08F9

MTHFNpyGpDPTNSDVFDPYDSTPYVpDAYNPDTFDpYNNIGSALNYFPVRSRPEPISISTVIDNEYRRPYVSIQNC
SDLCGQIIMGCSVLLFLFVLIIFGIYSLVSHSGHVQSTNAVKILEYTFFGIFQSNiAPDQCDKQLIGYYNGIEGRNILE
NQFHNLTHAVFTSEFVNENGSFENSHKEQEFLECRKkLGEsNSTAKIMIAMGFNKGsCKIDCITSFIEKYQVDGVELH
WNHNEHFLSQLETTRNlKNRLKKISNSKLLGVSASSNWSRVTELDQVLEVADFEFDDYNDILLNSVKPCNNTKAKYNF
SLNFDFVNSFHsvKHK

CeT13H5

MELDFIFVRVANEIRDVDVAVRCVDYLSNGGILDRSCGRRRVGYITSWGKHPFRDDQAEKLTHLVFAFFVVDSDGSVK
LEGDAAKARLEHVKEVASRHPDLKLLYAVGGWENSQYFsvLTADHSRRSILISNFVKVIKEYGFDGVDIDWEYPVTGG
AVEGTPADRRNYVNLmRELrNELRDLESETGKSyLISFAGAAGHWVLKPGYDLQQLMKYCDfVNVMSYDYFGAWASKW
GAYTGPPAPLQFAMPKKFSGRMNvHATMKDYSCIKATDKINMGVpFYGRFWKNVGDVAVDSTDDMWRtATATNSEGtK
FEGGDVQWRDLHEKFDTTKTKFHSGSKTPFIWlSEQKTFVGYENAESLKHkVDYIVENNIgGVMiWAIDFDDDQGTLL
NSAAAESICTTSTKSFNYKCSpVDDKRWwTYDDNEELAGMCGKSSPLIDGYYpVCDPDDPGHACCGKYGYCGSGAEFC
SCPECIDYGADPNLILKEPvKPSQKITWYTSdAGEGKRGRcGRDVPpLEGEAPTcNPDDANAHCCSNGGYCGNSKEHC
ECNGCIDFAKQRDFKYKPLEWwTFSENpANvGRcGYNApRLSTGKIpkCDPDSesyCCSNGYCGKGEQYCSCLGCAD
FKANPAFEY

CeT19H5 1

MTSVKDQEVMLLISDRLLQGGKYNFKNI FRKDDRDfKTRKVIIVLVIcLIFIITDLFIIRSHLHQISSRNQDTSNIS
SALLNKQGVTFVKGMSsLKYKIFAFaQLNTNGSLQFESAI SKQKFLNLNRKSKHINNNVNRILSIGGTNYSEKLSIMLQD
LKKTRRFIMSIIRFLKDNELDGVELLWNRNTEETLYCELLQHLKMGLEKQEKQYSISLRVPQTGIGKWHIGCELEDQE
NADSNLISMAEYENQLFGSGGVIRISEAFNTAWEMKYHACNSNQSSKFNlVlPTIEQTEQIDMQYVWNPEKKEIQRF
NSSTKTEYTKLQMGGSVSIWSRDMDYHNNIQLDSYFFERICSQELGK

CeT19H5 2

MSTPKNYIKISIDEKNDRRDNVTANENCSRNRIKKGIFVLIGICVVFafANNAMGHpAKENDESSEIPIPIENDIAS
TQIIPtVPLLTdSSGSEKPPDKVTFVLFAADRIGFDGSVEVDHSSRTfSKLKEKSKIESSHFkKLLSIGGRSNTQFLP
LVIADPRRKRFFKSIISILEEYQLDGVDLLWkAKNSNTKKCSRFLCELKQKLKERKKNYVLSVQILPDEPSSWELF
NPANGSPLNIQVEDCNTGPDTEVVEPSDSELESTENNSKkLTVDIFKFCYITSDGNLQFEDEIAMKkLFLKkLKEQARSE
NLKLELIFKIDGRtNTFLfSSVILAHDKKRKFINSVISFLKEYRLGNSDLIWKSTRSSFRVEYFRFLDEFKSEIKERK
RNYILSKVVRPPLGfSL

CeT19H5 3

MGTS PVKIMISIGGKENSQNFSPVIESEYRRQIFINSILTFLKENDLDGIDLFWWEPCSTYKSVYLHFICELKQQLQT
KDKDYILSIVVPPPEVGGWIDGFDMMNIVQIVDFINVFLDYYGPTQNDFGKITGPTAPMFGVPGRETFNVDHTSKV
LSCE TMQSNKFNIAIPFYTTLWENVQGPIDKIEIFRNVNKVHGKIVGQSHMSRMIVQQKGFVLT PYSFDNATRNAFIY
NSSTKIYLT FETDQSIVAKIEYVSEHLLGGICIWTVDKDDEGNSQLNAISFDGLCTTGNVPKTLIDSILAF LDMYDLD
GVDLFWKWPDKQDRENYSSFIHHLRKKLNFKRDAYILSIVVPLNVERLKYAIDIKNITNNVDFVNI FSDYYPQDN
ITGPTAPIYDGAEEKKYNVHHSVRKYFCRMKEANKLNIAIPFYATLWENVQGPVKPPGKGVFRNAKPFNEIMSETSY
LSRLDVKQLGFELDKFSYDSSRGAFLYNSTTKTYLTFENEKTIGKKINYVKDRLLGGVWIWLMDDDEFNTPVCEK
RVIGYYAGTEKSQITIEEVSELTHAVFAFVYMATDGTLMFSNQAQRNRF LKLELTKNENSTVKMMF SIGGKDNSQNF
SPVTASPRKKSFINAILELLEKYDLGDVDFWRWPKSDDKDEYAVFLRELLKQLKARRKDYILSVVAPLDINRWDS
KFDIKKI I KHADFISIYGLAKNTTDES EPMFASAWGAASSMLELPGIQQL
TCSNILLTRSL

CeT19H5 4

MTNIKSEQKESSEELVLPNDRPQYEQRVTKQPTSGKYIIITITLISIIIVGFGLGLCAQIYFQAESDVLPICDKRIIGY
YSGSGTSNITSTQLSNLHTVFAFVYMTDPDGTLLFNNQIEKNRFLKLKEVVRNGNSKIKLMFSIGGKDNSKYFSSVIP
SEERIQT FIESILEFLEAYDLGDVDFWKWPEEEYRDYAFINQLRKTFEAKKYYILSIVIPPTLDGWGKKRLNK
IIESVDFINAYSTDYTPADNLSDDIAGPSAPIYFGAQKSERNVHHTARNYSCLTKQASKFNIVIPFYATLWENVY
ETVLD SKRGVYRHVAPFYGRVTGKTYLSRLAVKQEGFQVESYSYDPAPRAAFSYNRTIGIYLT FETKESIRAKIDYVK
DRILGGVWIFSVDMDDDETNSQLKAVSFDGFGCTIGNGSKYECV

CeC45E5 1

MRTIENSNSIVKMMISIGGCDYSTNFTSVVSNQTI RRVFIESI IALLIEHNLGDVDFWRWVPAALQSEFCSFLKELK
NELMNQEKQYILSVGAPPAGIENLEDGYDIEEII ERVDFVNVYSMNYAAPNSQWGTPTGSPAPLYGGLDARRNFNVD
YTIKSYIRNIRRPEKFNLAIPFSVRLWRNVEDAIQPGIEVFRNVTLQDDRAIGEASKANYVKSKNLGGVWIWMEHDD
DNDTLIEAVSSQFGTPCDEQIPFEVIASANNL

CeC45E5 2

MSNNETEPDVIKRIIGYYIQKESSEISTVGLSRLTHAVFGSLRVQLNGTFEIGNAFSKRKFKNWQRAVKNSSSNVKS
MISIGRWDSVTQLSSVLLNVKSRMFIESIVDFLKEHQLDGIDLFWRWVPLAVQSEFCLFLEEVKIEFLNQE KQYILSI
TAPVGIENYEDGYDIEEII ERVDFVNVYSMNYAAPNSQWGTPTGSPAPLYGGLDARRKFSDYTMKYIIRYTRKPE
KFNLIIPFYVRHRWRNVENAIKPGIEVFRNVTLQNNGAIGEVYMSRWTAESDGIELSNPSWDDTTKTLYIWKPETKTFI
TFETEKSIEAKANYVKS MNLGGVWIWLMENDDQDNSMIEAVSGQFGNPSDDQSQYEHVSDKRIIGFYTEDATTEITAS
ELSKLTHAVFGFLYLKTNFTDILNDRGKGRFKNLRLIKYENLNVKMMF SIGGWADSTNFRSVVADV
KIKRFEILNYF

CeZK938

MLTHI IYLF AIPKNGSLTFGDESSLRKF EQMKNEARKASSTLKMISIGGQYSSGEFSGLVSNETS RNLFVDSITTFV
RNYDIDGIEIFWTWPKESDENNYLKF IQDLRYAFTELQKLNKEDFV ISLVISRNVNPLYGGGTRNVDEIMKNYICK
TGQPSDENFSPPAFCGKRIVGYFAEFENTALTRKQLRMLTHIVFLFAFPKNGTITFGGESSQKFEEMRRNVRKASS
TLKVMISIGGQYNSGEFSGLVSNETS RNLFVNSIATFVRDYDIDGVDIFWTWPKHSDENNYLMFIRELRYAFTELQK
LNKRETFV ISLVISRNVNHL SKLVEFSNFVDFINIYSFN SYLYQVGPDSPLYGGGSRNVDEIMKYIICKTGQPSKFN
IVSFHATYWE GAELPLRDDSDDIFKDQNSAKGGFAVRWRELLQQKWDMSNIKFHNLTKTSYMWIPGPPTRFMTLEDEK
SLREKNRYVADHNI GGITMWTIDQDDGDHTLLKVVSSAELCTGDRRNEIKYKCD

CeC08H9 1

MNPADLNSTSVPLLRNQNTIQKNNRQWKNFIKHCYILITILVLSAPIAFSLSKLIMVARHKSPTVSNLIRVFI PSSKK
LKTTEKNLPTTKQLFKYSTETIFPPAALCGKRIVGYFAEFENTALTRKQLQMLTHI IYLF AIPKNGNMTFGGERSR
KFEEMKNEARKANSTLKMISIGGQSNRSRSLVSNETS RNLFVNSIVS FVQKYDIDGIEIFWTWPKYEDANNYLIF
IQELRYAFIE LQKLNKEDYVISIIVNCDYNQLSNLMGFSKVFDFN IYSIHYQSRQVGPSSPLYGGGSRNIDETMK
YYICRTGQPSKFNMMVLFHGTFWKGAELPLRNDSDIFKDQNSAKGGFAVRWRELLQQKWDMSNIKFHNLTKTSYMWI
PGSSFLFTLEDEQSLRVKNRYVADHNI GGITMWTIDQDDGDHTLLKVVSSAELCTGDEKNTIKFKCE "

CeC08H9 2

MNPVPSNSTNAPLLENQQITRRISCLIQWKHLIKPCLILIAILVFSAPVAYSLSSELIMVARHKSETVSNLIKIFIPSS
KKLSTTTKTNSPPKHLIQESHQTI SPPAAFCGKRIVGYFAEFENAGLSRKQLHMLTHI IYLFARPTNGVITLDGEQTR
RKFEEMKSKAREASSTLKVMISVGGHDYKEYSRLVSNETS RNVFVKSIVSFFKKNIDGIEIFWTRPKYEDIKSYSS
FIQELRSAFTELQKRWRNKNEYI IISLIVPKEKHWSFDLKD FSKFVDFFNISTQFREKQVGPDSPLYGGEGRNIDETM
KYYICKTGQPSKFNIMVSFHGTFWEGAELPLRDYSDDIWKEKNVARGPFAVRWRHLRQRNWNLTDIKFHNLTKTSYIW
IPGPPTWFLTLEDEKSLREKNRYVADHNIGGITMWTIDQDDDDHTLLKVVSSAELCTGDEKNTIKYTCE

CeC08H9 3

MNRADLNSTSIPLLRIONITRKTNRFAQWKNLINPCLILIAILVISAPVAFSLSELIMVARHKSETVSNLINMLIPSS
QTSRRTMKTNNSPTTKLVQKSNEKVSPPAASCGRIVGYFAEFENSPLSKKQLQMLTHI IYLFaipKNGSLTFRDESS
RRKFVAMKNEARKESSTLKVMISIGGQYSSGEGFSLVSKETS RNLF TNSIVS FVQNYDIDGVDI FWTWPKYSDENNYL
MFIRELRYAFTELQKKNLRKETFVIVSLVSRNVNHL SNLVEFSNFVDFLNI YLFNSFLNQIGPDSPLYGGGSRIVDEN
MKYYICKSGQPSKFNIIVSFHATYWNGAELPLRDDSDDIWKDNNSGRLP IALPRRQLRQYNWNLTDIKFHNLTKTSYI
WIPGPPTRFMTLEEERSLREKNRYVADHNIGGITMWTIDQDDDDHTLLKVVSSAELCTGDEKNTIKYKCE

CeC08H9 4

MNSLNTTYNPLLKYHKLKSLKTRALTQGENIVKPCVILVAI ILISTPFVVFVSKLI IILACCKCQTVSTSNALMLNNT
TSQHALKSNETI SPPAALCGKRIVGYFAEFENSGLTRRHLQMVTHI IYLFARPTNGVMTLDGERTRRKFQEMRSKARE
VSSTVKVMISVGGHDHSGAFSAIMSNEASRSVFIKSIVS FVKNEIDGIEIFWVWPKHrdvNnysIFIQDLRNEFTel
QKRTRNKNEYI IISLLVPPKKSYSWFD FEDFLKFVDFFNISTQFREKQVGPDSPLYGGEGRNIDETMKYYTCKTGQPSK
FNIFVVSFHGTFWKDAELPLRND FDDIFKDKNLTKGAFVWRWRELLQKWNLEDIKFHNLTKTSYIWIIPGPPTWFLTLE
DKRSLREKTKYVADYNIIGGITMWTIDQDDDDHTLLKVVSSAELCTGKEKNEINYKCD

CeC08H9 5

MNVLNSTSPLLQNRNITPKTSCLTQWKHLVKPCFILIAILVFSAPVAYSLSSELIMIARHKSPTVSNLIKIVILSSKKS
RTMIKTKSSSTATKYVGLPPLLDAPNSNEALSPPAALCGKRIVGYFAEFENSGLTRRQLQMLTHI IYLFaipRNGVITI
VDDRSLRKFEMKSNAREASSTLKIMISIGGHYNSRSFSGLVFNETSRTVFNVSIVS FVEKYDIDGIEIMFVWMPRYRD
KNNYLMFIQELRYAFTELQNKLNKREDFVIVSLVASSNLNLLFNLVEFLNSVDFFGIYLFNSYSYQVGPDSPLYGGGSR
NVDEIMKYYICKTGQPSKFNIIISFHATYWEGTDLPLRDDSNDIWKNESGRLAVALRWRELPHHKWNLENIKFHNLTK
TSYIWIIPGPPTRFMTLEDEQSLREKNRYVADHNIGGITMWTIDQDDDDHTLLKVVSSAELCTGEEKNTIKYNCH

CeC08H9 6

MPSENITPRVNDLLENRDNRNRNGNALSTKTITYSISILVVILIMAIPIAYTLSEIVMYAYRNNETASKYIGIINS
INVRALHAPKKAEDVDQPPSAKCNKRIVGYT DWEPRKISAKQLQKLTHLIFTNVPMNSSGHVFFENLAQRRRFLEIN
RKAQLMNVKVMFSIGGHKNAEHYSTVADSTKRSVFI DSIVSFIKSNNASGVDLFWEPNISEMNDFITTIKELRKKL
AALTKAQPKTRYLLSII VPPSSPDLEYL RMDGLLHYVDFLNVLT YGYAPWSGVNGKFVGPNAPLYGGNRENVDET
MQYLICKTRTPSKLNMAISFYGRYWENVNDNVPDEMFK EADLINGKAQGMFVAVKNLAGRWDKSEALWHEETQIPYI
WNSEERKFVVFENERSLQAKMDYAADHNIGGVYI WALGADDNNDTLLNVVSSADLCEGGSGNTLISLCG

CeC08H9 7

MPKTYKLAIIIFVLLFVFGIVSFLVSSLFCYFYDFSNSVQSPSVLHRKRIIGYVSSDEGSEITIKOLEKLTHVIFAFI
LVHKDGTIKFKYGTGDGFFDMKRKSMELNRGLKVMVSI GGYESSPLFSDVLVKKKKLIASIALLVKKFDLDGVDIFW
NWPSITDQSNYLIFIRELRKKLTLNKDENGSRNEYVISVIAPSSSSHSEYPYKWTILENVDFINVI TFEYFYEANKI
GPHSPLYGGSFGNVDDTLKYLICRTRTPNKLNMVVSFNGIYWGNTTLPFDDKGVWIPDDSAQGPYSYGWKQFARMSHG
FDQNDFEWNEETRTPYIWKADTQQFLT FENEKSLTEKMNYAVAHNIGGVAMYTIDDDDEENTLLNVVVVTLNPLSKKSG
GETKYNCTR

CeC08H9 8

MISDITVKWKFYCKIFLLITLVLITCAMVAYGLSKINYEYSSKLMANFKCQKRVAAYS AKFLSNHQLKKLTHFI FTSI
SIFPNGTIKWPNCENFESYARKAKMDNPNL KIMVEINGKFFSVLAEDEKKNSFIKSIS SFVVDHKFDGVDIFWSPED
EDTFHLFIKEFREKLEKHMII SIAIPRLAQQLLEGFNLKLLMNHIDFLNVLSINYYEPLPGNGANIGPISPLYGGQRGN
VDGTLKYLTCITKRPSILNMGVTFGTGIFWNGVKDGLNEQDDIWKVAQNENGP GKSIGWRKFIKDRRNTIPQWHDSSKS
SYAWDPKSKIFLAFENEKSLSEKVIYVRNKNIIGGLVIWNVDQDDNDNSLLNALTSMDMCARGSGGTMKYRCSNSNLLM
KRIQ

Chitinases famille 19 ?

CeT26F2 = CeR10D12

MSAQFVAFLLI AFNLSLPANAFNGANASVGLFGNASSCPKAAKFGKGGPKSCTIPSDPNNKPASQLESWFTREMFEDL
FPFANLWGWGPSSCW PYSYDAFKIASRYFPEFGTSLNVNNTVYTADENKKRD LAAFFAHAIQETGENNNYLYTALPDQE
ASNCFYRGGFYNWFE GGPSSNFLNPETPGHSP TDGNSCTSAGRYCSASDQITFFYPCSNSTISNPAAPYKGCYFGRGG
IQISYNYGQFQDWL KSVNITVDLLKEPNLVMTKMDPPLAIMASLW FYMTPQPPK PAMHDILMGNWNWSGAQNSAAGY
DGP I FGPTSLI INNECSGEDSKNPGGPGESRRIKAFKWFNGYFGSPVGP EHTLSCGKMPVKLN AIPHYQSYQPDWSSS
WKP ERCDCAPASYGGLV VYFDPNYYPASFVAQN DLNRKKCIETVYANPSMYFMDKKN SLC LNY

CeT05H4

MAEQRANKTSRCSISSVLFRAHSPLSSASAFNPCFVRSGLSASFPKSDSLCTLT DASFNPMQLL FLLLFTPYTIVGES
PDFCQHPVYGKEPEEDCAQASDPNELPKS PLEKWF TKQMFEDLFPKSNIGMGP HPCLPYSYESFIMAARYFPEFGAA
HPNKQFKADEHHKRDVATFFAHALQETGENDASVYNN TDLTLEQAHECFYRGGFYNWFERGPNSTFLSPAAPGFS PFD
GKRCTDEGRYCKSDPIIDFWYPCNSDIESHSDKEYHKGCYFGRGALQLSWN YNYGLFQQFLLTGKV KVDLIENPNLVM
TKMDPPLAMMASLW FYMTPQPPKPSMHQIVTGDWKPSSKNRRAGYQGAIFGPTSLI INNECGGEDPDEPGGPGESRRI
KAFKWFCKYFKVPVGSERTLSCKGMLDGFDAVQHMYSWHPDWGNM WKSQSCDCAPAPYGGPLPY YDPKLYPHEFTKQN
DRNRLRCVYSMYESPETFRLDAGNSPCLKHKPKIRLTKTGIRG

CeC08B6

MTRIKSVILTVFLIFAHNSIVSAVDYGNASSCPKAAKYGTGPPESCTQPTDPNNMPASELESWFTREMFEDLFPFANL
GWGPSSCW PYSYDAFKIASRYFPEFGTSLNVNNTVYTADENKKRD LAAFFAHAVQETGENNIALYDTLSDQDASNCFY
RGGFYNWFE GGPSSFLDPKTPGYTPADGNSCASAGLYCSASDQITYFYPCSNSTISNTAAPYKGCYFGRGAIQISYN
YNYGQFQDWLRTVNIKVDLLKEPNLVMTKMDPPLAVLASLW FYMTPQPPK PAMHDIVMGNWNWSGAKNAAAGYDGP I FG
PTSLI INNECSGEDPTNPGGPGESRRIKAFKWF CGYFDTPTGPEATLSCKNMPVPLDQIFYNLSYQPDW TSTWKDVPC
TCAPASYGGLIFYYDPDYYPSSFAAQNDYNR IKCIASIYANPSMY SMDNKTS PCLNY

CeC51E3

MTFLCILGILCRSIAEKSGYMR LKISICQSEKMCYLIIIVSKSGNGPPKSCTPPTDPNNLPASKLECWFTREMFEDL F
PFANLWGWGPSSCW PYSYDVFKIASRYFPEFGTSLNVNNTMYILHENKKRD LTAFFAHAIQETSKLMNFRHQSDQDASN
CFYRGGFYNWFE RGPSSFLDPKTPGYTPADGNSCASSGLYCSASDQITYFYPCSNSTISNTVASHRG CYFGRGTIQI
SYNYNYGQFQDSRTLK KKTNNSSAFH