

# ***Caractérisation de chitinases chez les nématodes***

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

Par  
Muriel Nirina MAEDER

Jury de thèse :

Pr Bruno Betschart (directeur de thèse)  
Pr Jean-Marc Neuhaus (co-directeur de thèse)  
Pr Fritz Müller  
PD Dr Ronald Kaminsky

## IMPRIMATUR POUR LA THESE

# Caractérisation de chitinases chez les nématodes

## Muriel Nirina MAEDER

---

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, F. Müller (Fribourg),  
et R. Kaminsky (Novartis, St-Aubin)

autorise l'impression de la présente thèse.

Neuchâtel, le 18 juin 2007

Le doyen :  
T. Ward

UNIVERSITE DE NEUCHATEL  
FACULTE DES SCIENCES  
Secrétariat-décanat de la faculté  
Rue Emile-Argand 11 - CP 158  
CH-2009 Neuchâtel

***« Les fous, les marginaux, les rebelles, les anticonformistes, les dissidents, tous ceux qui voient les choses différemment, qui ne respectent pas les règles, vous pouvez les admirer, les désapprouver, les glorifier ou les dénigrer mais vous ne pouvez les ignorer, car ils changent les choses. Ils inventent, ils imaginent, ils explorent, ils créent, ils inspirent, ils font avancer l'Humanité. Là où certains ne voient que folie, nous voyons du génie, car seuls ceux qui sont assez fous pour penser qu'ils peuvent changer le monde, y parviennent. »***

Citation extraite de « Think different », Apple computer

*A mes parents,  
A Léonie,*

# Table des matières

<b><i>TABLE DES MATIÈRES</i></b>	<b>2</b>
<b><i>ABSTRACT</i></b>	<b>5</b>
<b><i>RÉSUMÉ</i></b>	<b>7</b>
<b><i>INTRODUCTION</i></b>	<b>10</b>
Biologie générale des nématodes	10
Un exemple modèle de nématodes libres : <i>Caenorhabditis elegans</i>	14
Biologie des nématodes parasites	16
Chitine et chitinases	24
<i>Fonctions et rôles des chitinases</i>	29
<i>Les chitinases chez les nématodes</i>	30
Aspects immunologiques	31
Objectifs	33
<b><i>MATÉRIEL ET MÉTHODES</i></b>	<b>35</b>
<b>Matériel</b>	<b>35</b>
<i>Nématodes libres</i>	35
<i>Nématodes parasites</i>	35
<i>Souches de bactéries</i>	36
<b>Méthodes</b>	<b>36</b>
<i>Biologie moléculaire</i>	36
<i>Analyses bioinformatiques</i>	44
<b><i>RÉSULTATS</i></b>	<b>47</b>
Gènes codant pour des chitinases de la famille 18 et 19 chez <i>C. elegans</i>	47
Documentation de l'expression des gènes de chitinase des familles 18 et 19 dans les différents stades de développement de <i>C. elegans</i>	51
Caractéristiques des chitinases de la famille 19	53
Identification des différents gènes ou fragments de gènes codant pour des chitinases de la famille 19 dans le génome de <i>C. elegans</i>	55
<i>Alignement après séquençage</i>	61
Identification des différents gènes codant pour des chitinases de la famille 19 chez <i>A. suum</i>	64
Isolation de fragments de gènes codant pour des chitinases de la famille 19 chez <i>H. megidis</i>	64
<i>Alignement après séquençage</i>	66

<b>Identification de gènes ou de fragments de gènes codant pour des chitinases de la famille 19 chez B. pahangi et B. malayi</b>	<b>67</b>
<i>Alignement après séquençage</i>	70
<b>Alignement des séquences des chitinases des divers nématodes</b>	<b>71</b>
<b>Expériences pour exprimer des chitinases codant pour la famille 19:</b>	<b>76</b>
<b>a) Induction des protéines codant pour des chitinases de la famille 19 dans le système des levures (système eucaryote)</b>	<b>76</b>
<b>b) Induction des protéines codant pour des chitinases de C. elegans et de B. malayi dans le système bactérien (système procaryote)</b>	<b>78</b>
<b>Analyse des séquences codant pour des gènes de chitinases chez C. elegans</b>	<b>81</b>
<i>Phylogénie</i>	81
<i>Profil d'hydropathie</i>	87
<i>Analyse des profils protéiques des chitinases de la famille 19 chez C. elegans</i>	89
<i>Visualisation</i>	91
<b>Analyse des chitinases de la famille 18 chez B. malayi et B. pahangi</b>	<b>92</b>
<i>Profil d'hydropathie</i>	94
<i>Analyse des profils protéiques des chitinases chez Brugia spp.</i>	94
<i>Visualisation</i>	96
<b><u>DISCUSSION</u></b>	<b><u>98</u></b>
<b>Nombre et type de chitinases chez les nématodes</b>	<b>98</b>
<b>Localisation chromosomique des gènes de chitinases des familles 18 et 19 chez C. elegans</b>	<b>98</b>
<b>Comparaison des chitinases de la famille 18 des filaires B. pahangi et B. malayi</b>	<b>99</b>
<b>Expression des chitinases des familles 18 et 19 chez C. elegans</b>	<b>99</b>
<b>Caractéristiques des chitinases de la famille 19 de C. elegans, B. malayi, B. pahangi, A. suum et H. megidis</b>	<b>102</b>
<b>Comparaisons des chitinases de la famille 19 de C. elegans et des vers parasites</b>	<b>103</b>
<b>Production des chitinases recombinantes</b>	<b>105</b>
<b>Rôles et fonctions des chitinases de la famille 19 chez les nématodes</b>	<b>107</b>
<b>Perspectives</b>	<b>108</b>
<b><u>RÉFÉRENCES</u></b>	<b><u>111</u></b>
<b><u>REMERCIEMENTS</u></b>	<b><u>119</u></b>
<b><u>ANNEXES</u></b>	<b><u>121</u></b>
<b>Annexes I</b>	<b>121</b>
<i>Alignement après séquençage</i>	121
<i>Différentes séquences des chitinases de la famille 19</i>	124
<b>Annexes II</b>	<b>131</b>
<b>(Protocoles des différentes expériences citées dans le chapitre "Matériel et méthodes")</b>	<b>131</b>
<i>Elevage de C. elegans</i>	131

<i>Formation du tapis bactérien</i>	131
<i>Transfert des vers</i>	131
<i>Extraction d'ADN des vers (A. suum)</i>	131
<i>Ligation</i>	132
<i>Transformation</i>	132
<i>Miniprep (isolement d'ADN de plasmide)</i>	134
<i>Induction des protéines dans un système bactérien</i>	134

## Abstract

The plants have defence mechanisms against external attacks (infectious agents, insects, herbivores) by using constitutive means (wall and cuticle) and chemical molecules. The first studies on the chitinases in plants classified them as “pathogenesis related proteins” (PR proteins). The chitinases were on this observation divided into 5 classes according to their amino acids sequences. Later studies revealed that chitinases are not only found in plants, but also in other organisms like animals, fungi and bacteria. A new classification was therefore established in subdividing chitinases into family 18 and family 19. Whereas the first one is ubiquitous, family 19 was for a long time considered to be specific for plants before recently also described in other organisms like bacteria and the roundworm *Ascaris suum*, but not in Human.

In the fight against parasites and the infection of hosts, chitinases were thought to be good vaccine targets. WHO financed studies in order to develop vaccines to prevent lymphatic filariasis, which was placed in third position in term of economical losses in the tropical and subtropical regions. The crossreaction between the chitinases of the filaria and human chitotriosidases prematurely put an end to this project. In fact it is now clear that these studies were based on the analysis of four chitinases of family 18.

The biology of nematodes is relatively well preserved within the phylum and the study of *C. elegans* as a biological model for parasite species is a logical approach. This study intended to describe and analyse all chitinases present in the genome of *C. elegans*. In a second part the findings were used to detect and describe chitinases of family 19 in entomopathogenic, intestinal and filarial nematodes. Finally the production of recombinant chitinases was attempted.

Forty genes were identified in the *C. elegans* genome, whereby the large majority codes for chitinases of family 18 and 6 chitinases were identified as belonging to family 19. Whereas the chitinases of family 18 are localised on all chromosomes except chromosome I, the chitinases of family 19 are all present on chromosome V. Chitinases of family 18 seem to be expressed in all developmental stages except L2 larvae. Their expression pattern varies from one developmental stage to the other, not all chitinases seem to be expressed and the chitinase *cht-1* is so far the only one to be studied in more details.

The identification of genes coding for chitinases of family 19 in *C. elegans* also indicated their expression in all stages except in oocytes and 10 days adult hermaphrodites. The isolation and sequencing of this gene family, allowed then the use of these specific primers in order to search chitinases of the family 19 also in parasitic nematodes. The presence of these chitinases was for the

first time detected in the entomopathogenic *Heterorhabditis megidis*, in the filaria *B. pahangi* and *Brugia malayi* and in the intestinal *Ascaris suum*.

The analysis of genomic DNA of L3 indicated the presence of the gene *chia-5* in *Heterorhabditis megidis*, in cDNA libraries of *B. pahangi* three chitinases (*chia-2, 3 and 5*) were detected in L3 and adults. In *B. malayi* these three chitinases were also detected, but one showed a different expression pattern. In *A. suum* *chia-2, 3 and 5* were also detected in the genome of adult worms and one chitinase (As-p50) was recently described.

In spite of several efforts the expression of recombinant chitinases was not successful. These findings are in agreement with earlier observations made also by other groups. The precise role and the functions of the chitinases of both families should further be elucidated in order to better understand their role as potential pathogenesis related proteins.

## Résumé

Les plantes possèdent des mécanismes de défense contre les attaques externes (agents infectieux, insectes, herbivores) utilisant des moyens constitutifs (paroi et cuticle) et des molécules chimiques. Les premières études avec les chitinases de plantes les a classé comme des "protéines associées à la pathogénèse" (PR protéines). A la suite de ces observations, les chitinases ont été divisées en 5 classes selon leurs séquences en acides aminés. Des études postérieures ont indiqué que les chitinases sont non seulement trouvées chez les plantes mais également dans d'autres organismes comme les bactéries, les champignons et les animaux. Une nouvelle classification a donc été établie en une subdivision des chitinases en famille 18 et famille 19. La première famille est omniprésente alors que la famille 19 a pendant longtemps été considérée comme spécifique pour les plantes avant d'avoir récemment été décrite dans d'autres organismes comme les bactéries ou le ver intestinal *Ascaris suum*, mais pas chez l'Homme.

Dans la lutte contre les parasites et l'infection de nouveaux hôtes, les chitinases ont été présentes comme de bonnes cibles pour les vaccins. Des études ont été financées par l'OMS afin de développer de nouveaux vaccins pour empêcher la filariose lymphatique, maladie classée en troisième position en termes de pertes économiques dans les régions tropicales et subtropicales. La réaction croisée entre les chitinases de filaires et les chitotriosidases humaines a prématurément mis un terme à ce projet. En fait il est maintenant clair que ces études étaient basées sur l'analyse de quatre chitinases de la famille 18.

La biologie des nématodes est relativement bien préservée dans le phylum et l'étude de *C. elegans* comme modèle biologique pour les espèces de parasite est une approche logique. Le but de cette étude était donc de décrire et d'analyser toutes les chitinases du génome de *C. elegans*. Dans un deuxième temps, les résultats ont été employés pour détecter et décrire des chitinases de la famille 19 dans les nématodes entomopathogènes et intestinaux ainsi que dans les filaires. La production de chitinases recombinantes a également été tentée.

Quarante gènes ont été identifiés dans le génome de *C. elegans*, pour lesquels la majorité code pour des chitinases de la famille 18 et 6 ont été identifiés comme appartenant à la famille 19. Les chitinases de la famille 18 sont localisés sur tous les chromosomes excepté le chromosome I alors que les chitinases de la famille 19 sont tous présents sur le chromosome V. Les chitinases de la famille 18 semblent également être exprimées dans tous les stades de développement, excepté dans les larves L2. Leur modèle d'expression change d'un stade de développement à un autre et toutes les chitinases ne semblent pas être exprimées. La chitinase *cht-1* est jusqu'à présent la seule à avoir été étudiée en détails.

L'identification des gènes codant pour des chitinases de la famille 19 chez *C.elegans* a également indiqué leur expression dans tous les stades de développement, excepté dans les oocytes et les adultes hermaphrodites de 10 jours. L'isolation et le séquençage de cette famille de gènes, a permis l'utilisation d'amorces spécifiques afin d'également rechercher des chitinases de la famille 19 dans les nématodes parasites. La présence de ces chitinases a été détectée pour la première fois dans les vers entomopathogènes *Heterorhabditis megidis*, dans les filaires *Brugia pahangi* et *B. malayi* ainsi que dans les vers intestinaux *A. suum*.

L'analyse de l'ADN génomique des larves L3 de *H. megidis* a indiqué la présence du gène *chia-5*, les trois chitinases (*chia-2*, 3 et 5) ont été détectées dans les banques d'ADN de *B. pahangi*, aux stades L3 et adulte. Ces trois chitinases ont également été détectées chez *B. malayi*, mais avec un modèle d'expression différent. Les chitinases *chia-2*, 3 et 5 ont également été détectées chez *A. suum* dans le génome des vers adultes et une chitinase (*As-p50*) a récemment été décrite.

En dépit de nombreux efforts, l'expression des chitinases recombinantes n'a pas été réussie. Les résultats sont cependant en accord avec les observations faites par d'autres groupes. Le rôle précis et les fonctions des chitinases des deux familles devraient ainsi être élucidés afin de mieux comprendre leur implication en tant que protéines potentiellement associées à la pathogénèse.

**I  
N  
T  
R  
O  
D  
U  
C  
T  
I  
O  
N**

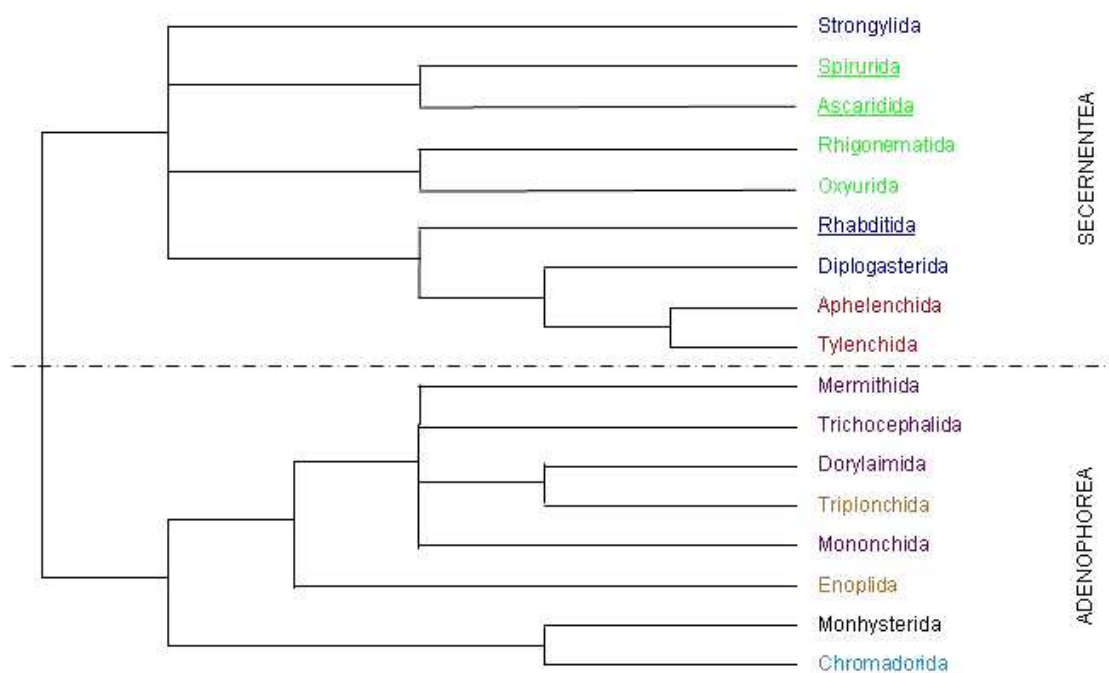
## Introduction

### **Biologie générale des nématodes**

Un grand nombre d'espèces, estimé entre 40'000 et 100 millions, compose le phylum **Nematoda** et environ 26'000 espèces ont été décrites [1 , 2]. Particulièrement bien adaptés à leur environnement, les nématodes ont développé 2 modes de vie parallèles, d'un côté les espèces libres qui sont répandues dans tous les milieux terrestres et aquatiques et de l'autre les espèces parasites qui ont pour hôtes aussi bien des plantes que des animaux. La taille des nématodes est extrêmement variable, de moins de 0.3 mm (*Mansonella perstans*) à plus de 8 mètres (*Placentonema gigantisma*) [3]. Economiquement parlant, de grandes pertes pour l'Homme sont imputables aux vers parasites, indirectement par les dommages causés aux cultures ou par les maladies causées aux animaux domestiques voire même directement par les maladies touchant l'Homme lui-même.

Deux classes composent le phylum **Nematoda**, à savoir les *Adenophorea*, trouvés dans tous les milieux marins, dulçaquicoles ou terrestres et les *Secernentea* qui au contraire, ne sont présents que dans les habitats terrestres (Fig. 1). La première classe ne comprend pratiquement que des formes libres et relativement peu de parasites alors que la seconde classe contient une pléthore de parasites et de formes libres. Cette répartition en 2 types d'habitat distincts ainsi que la séparation des modes de vie suggèrent que les *Adenophorea* et les *Secernentea* sont paraphylétiques [1, 4 , 5]. Bien que la morphologie de base des nématodes soit commune aux 2 classes, certains caractères comme les organes sensoriels, entre autres, aident à les distinguer. Les nématodes possèdent en effet une paire d'organes chémosensoriels et sécréteurs placés de chaque côté de la tête, les amphides, contenant des cils modifiés appelés sensilles [6]. Une structure similaire appelée phasmide est parfois présente à l'extrémité postérieure. La présence ou l'absence des phasmides permet la division des nématodes en *Adenophorea* – nématodes aphasmidiques – et les *Secernentea* – nématodes phasmidiques [7-9]. Cette classification a été complétée par des analyses moléculaires (sur la base de l'ARN de la petite sous unité ribosomale principalement) ce qui a permis de répartir les différentes familles en 6 clades distincts (Fig. 1) qui respectent la division *Adenophorea* et *Secernentea* établie auparavant, apportant toutefois des modifications à l'intérieur de chacune de ces divisions [1, 10].

De surprenantes similarités anatomiques et de développement ont été conservées au sein de tous les membres du phylum **Nematoda** en dépit de la multitude de styles de vie et de la diversité des habitats occupés [11].



**Fig. 1 :** Phylogénie des nématodes. La répartition des différentes familles se fait selon leur appartenance à l'une des 2 classes : *Adenophorea* ou *Secernentea*. Les 3 familles soulignées seront détaillées et correspondent aux familles des vers étudiés par la suite. Les différentes couleurs correspondent aux différents clades établis par analyse moléculaire : clade V (Strongylida, Rhabditida, Diplogasterida), clade III (Spirurida, Ascaridida, Rhigonematida, Oxyurida), clade IV (Aphelenchida, Tylenchida), clade I (Mermithida, Trichocephalida, Dorylaimida, Mononchida), Clade II (Triplonchida, Enoplida) et clade C (Chromadorida). Les Monhysterida ne correspondent à aucun clade [1, 10].

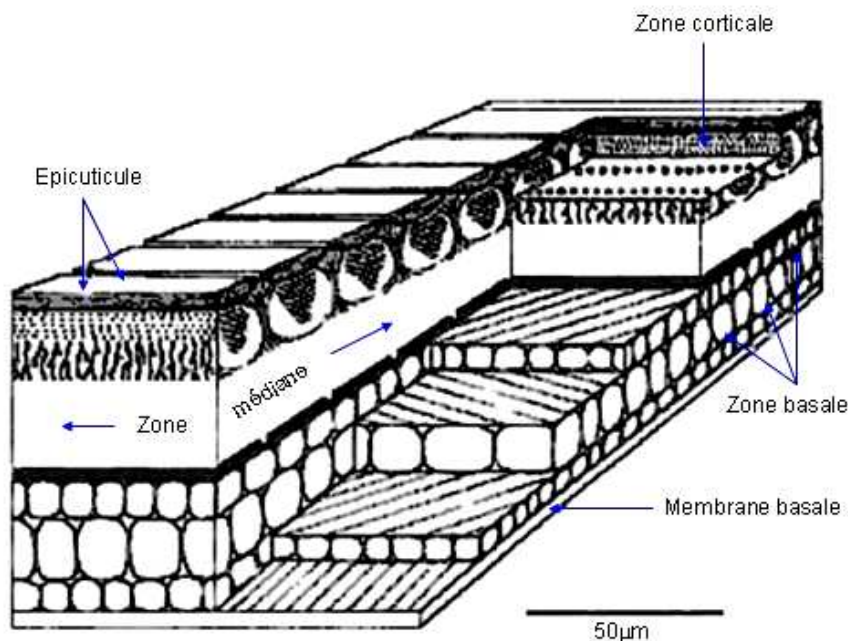
Les nématodes sont des protostomiens avec un développement déterminé. Leur morphologie est cylindrique ce qui a donné leur appellation commune de « vers ronds ». Le plan de leur corps est un tube externe – cuticule, hypoderme, neurones et muscles – entourant un espace pseudocœlomique contenant l'intestin et les gonades. Les nématodes sont des vers allongés non segmentés. La forme du ver est assurée par la pression hydrostatique contrôlée par un système d'osmorégulation [3, 8, 12].

Les nématodes ont parfois dû s'adapter à des conditions extrêmes du sol ou des plantes. Des individus d'une même espèce s'agglutinent dans certaines situations pour former un grand agrégat les protégeant ainsi des conditions extérieures [13]. D'autres espèces peuvent subir momentanément un stress environnemental (sécheresse, manque de nourriture, surpopulation ou pour les parasites, détérioration de l'hôte) si grand qu'elles ont développé un stade larvaire de dormance – *dauer larvae* – allant parfois jusqu'à entrer en anhydrobiose, un état extrême de quiescence. Lorsque cet état se

prolonge, le métabolisme des vers chute jusqu'à atteindre un niveau non détectable, état de dormance particulier appelé alors anabiose ou alternativement cryptobiose [13].

Le cycle de développement des nématodes est rythmé par 4 mues qui marquent le passage entre les différents stades larvaires jusqu'au stade adulte (L1 → L2 → L3 → L4 → adulte). Leur couche de surface est chaque fois remplacée par la formation d'une nouvelle cuticule [5]. Une grande diversité de structures des cuticules est rencontrée chez les vers mais de manière générale, chez toutes les espèces, la surface extracellulaire des nématodes assure diverses fonctions physiologiques [5] : la cuticule des nématodes possède en effet des fonctions fondamentales importantes aussi bien pour la structure que pour la nutrition, la défense de l'organisme avec un rôle protecteur contre la déshydratation, l'abrasion, la prédation (pour les espèces libres) ou l'attaque immunologique (chez les formes parasites) [5].

La cuticule (Fig. 2) représente une structure histologique et chimique complexe composée de 4 couches : (i) l'épicuticule, (ii) la zone corticale, (iii) la zone médiane et (iv) la zone basale [8, 14]. Les limites entre ces différentes régions ne sont pas strictement définies et la composition de la cuticule peut être très variable d'un genre ou d'une espèce à l'autre et même d'un stade à un autre à l'intérieur d'une même espèce.



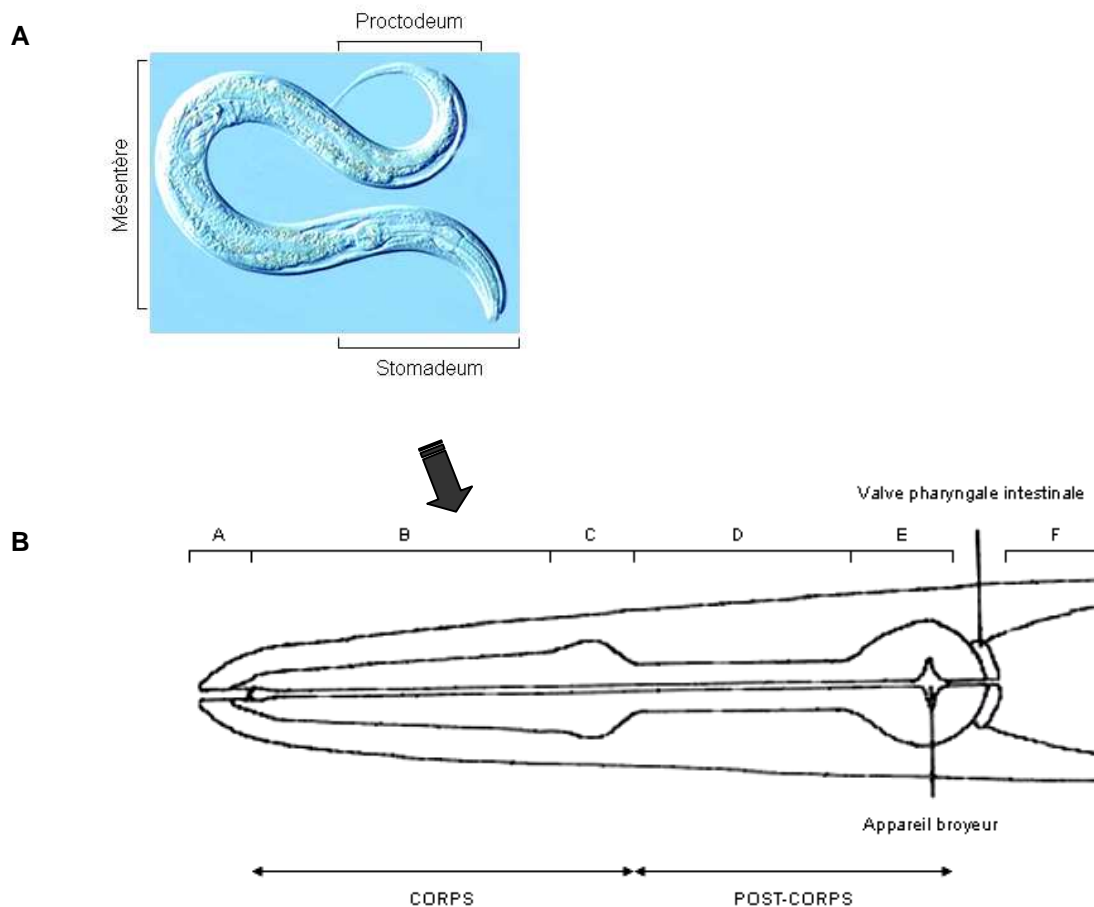
**Fig. 2 :** Diagramme schématisé de la cuticule d'*A. suum* [14]. La succession des 4 couches, de l'extérieur vers l'intérieur, commence par l'épicuticule, la zone corticale, la zone médiane pour se terminer avec la zone basale et la membrane basale.

Trois grandes catégories de protéines cuticulaires ont été identifiées : (i) les collagènes, (ii) la cuticuline et (iii) les protéines et glycoprotéines associées à la surface. Les collagènes sont quantitativement le composant de la cuticule le plus important (plus de 80%). Leur nombre et leur expression varient en fonction des stades et des espèces. Toutefois, ils ne sont jamais exposés à la surface. Les collagènes de nématodes jouent un rôle fonctionnel structurel similaire que ce soit chez les formes libres ou les formes parasites. La cuticuline, quant à elle, paraît être localisée dans la zone corticale, couche sous-jacente de l'épicuticule. Les protéines associées à la surface semblent se trouver dans l'épicuticule mais également partiellement distribuées uniformément parmi toutes les couches de la cuticule. Elles sont très variées et probablement impliquées dans les aspects fonctionnels largement dictés par les contraintes environnementales. Les propriétés structurelles ou dynamiques de la cuticule pendant leur développement sont cependant très similaires entre les vers libres et les vers parasites [11, 14].

Les nématodes ne possèdent ni organe respiratoire ni système circulatoire et leur système nerveux est particulièrement simple. En effet, 2 régions principales riches en éléments nerveux se trouvent dans la région œsophagienne et dans la région anale connectées entre elles par des axons longitudinaux [15].

Le canal alimentaire est complet et divisé en 3 régions : (i) le stomadeum – ouverture orale, cavité buccale et œsophage – (ii) le mésentère – intestin grêle et gros intestin – possédant 2 sphincters, à son entrée appelé valve pharyngale intestinale et à son extrémité postérieure valve intestinale rectale ou pylore et (iii) le proctodeum ou rectum. Les intestins sont composés d'une seule couche d'épithélium endodermique. Toute la paroi interne des intestins est tapissée de microvillosités dont la longueur varie et permet d'établir la limite de ces régions distinctes. Le proctodeum – ou rectum – est la partie ectodermique postérieure du canal alimentaire et consiste en un simple tube menant des intestins à l'anus [8]. Le pharynx et le rectum possèdent une cuticule, en continuité avec celle recouvrant la surface du corps [16]. Le système digestif n'est cependant pas toujours fonctionnel dans les stades larvaires – particulièrement chez des nématodes parasites – et la cuticule sert alors pour l'absorption des éléments nutritifs.

L'organe le plus complexe chez les nématodes est sans doute l'œsophage composé de 4 types de tissus différents ; à savoir l'épiderme, les nerfs, les muscles et toutes les glandes associées. L'anatomie de l'œsophage (Fig. 3) peut être divisée en 2 régions distinctes, le corps et le post-corps. Chacune de ces régions est encore à son tour subdivisée en 2 parties. Le corps comprend le pro-corps et le métacorps alors que l'isthme et le bulbe terminal composent le post-corps [17, 18].



**Fig. 3 :** A. Représentation schématique d'un nématode avec ses 3 parties distinctes : le stomadeum, le mésentère et le proctodeum. B. La région du stomadeum est ensuite détaillée : la cavité buccale (A), le pro-corps (B), le métacorps (C), l'isthme (D), le bulbe terminal (E) et l'intestin (F). Le corps est composé des parties pro-corps et métacorps alors que le post-corps comprend l'isthme et le bulbe terminal. Présence d'un appareil broyeur à l'intérieur du bulbe terminal [19].

### **Un exemple modèle de nématodes libres : *Caenorhabditis elegans***

Le modèle utilisé aujourd'hui pour étudier les multiples aspects biologiques est *Caenorhabditis elegans*, un petit ver libre et cosmopolite trouvé communément dans le sol. Il fait partie de la classe des *Secernentea*, de l'ordre des *Rhabditida* et de la famille des *Rhabditidae* [20].

*C. elegans* est un ver allongé et effilé aux 2 extrémités avec une symétrie bilatérale. Il possède également 4 cordes épidermiques principales et une cavité pseudocœlomique remplie de liquide. Le

système digestif est complet avec une cavité orale à l'extrémité antérieure et un anus à l'autre extrémité.

Les populations de *C. elegans* sont composées de mâles (♂) et d'hermaphrodites (♂&♀) auto-fertiles, produisant aussi bien des œufs que du sperme (Fig. 4). La proportion des mâles ne représente que 0.2% de la population. Les mâles sont morphologiquement différents des hermaphrodites et mesurent environ 1 mm de long, les hermaphrodites étant de plus grande taille. La composition chromosomique comprend toujours 5 paires de chromosomes autosomes et une paire de chromosomes sexuels. Les mâles (5AA+XO) contiennent un chromosome sexuel de moins que les hermaphrodites (5AA+XX).

*C. elegans* représente un modèle expérimental idéal en raison de son cycle de vie court et de sa capacité à engendrer une multitude de descendants dans un milieu de culture *in vitro* simple. Les hermaphrodites adultes possèdent exactement 959 cellules somatiques et les mâles 1031 dont le lignage complet a pu être établi. L'avantage le plus significatif est sans nul doute sa simplicité anatomique, son organisation génomique et les méthodes élaborées qui permettent de mettre en relation des fonctions potentielles avec des gènes non encore caractérisés. Son génome est relativement petit et compact (100 Mb) et a entièrement été cartographié et séquencé [21, 22]. C'était la première carte totale disponible pour un organisme pluricellulaire. L'intérêt d'utiliser un ver de forme libre est d'éviter tous les problèmes liés au maintien des souches parasites *in vitro* avec un cycle complexe [23].

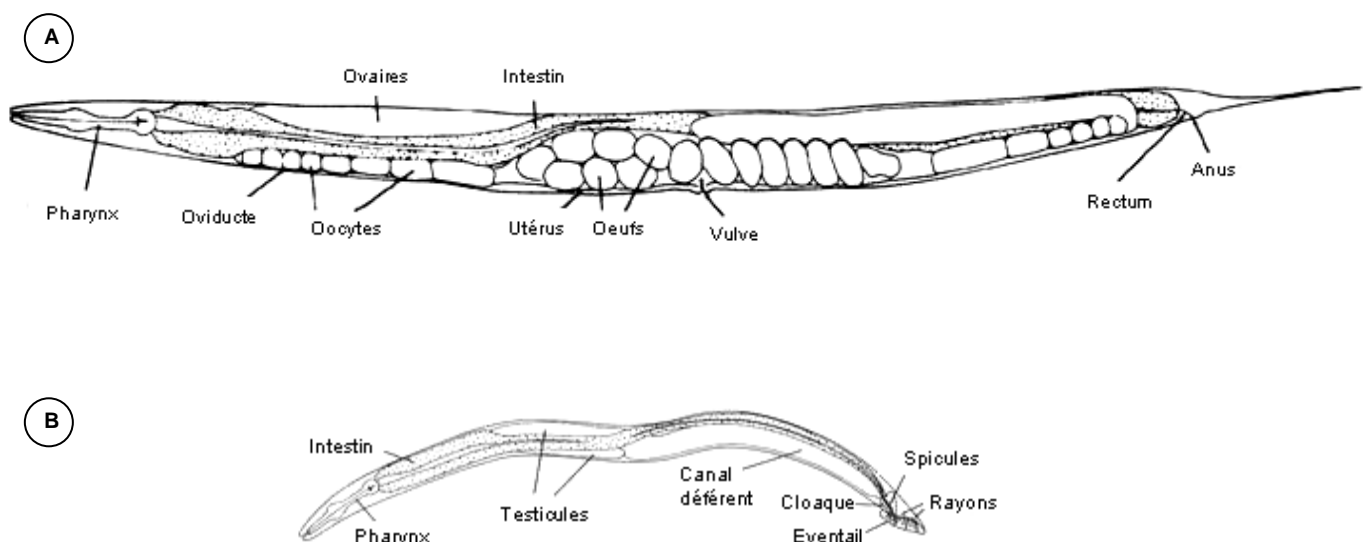


Fig. 4 : Anatomie de *C. elegans*. Hermaphrodite (A) et mâle (B) [24].

La conservation d'une multitude de processus biologiques entre *C. elegans* et les nématodes parasites permet ainsi d'étendre encore son utilisation comme modèle non seulement biologique mais également moléculaire et génétique pour les parasites responsables d'importantes maladies vétérinaires et humaines. En effet, plus de 40% des gènes des vers parasites montrent un fort niveau d'homologie avec les gènes de *C. elegans* [25]. Certains gènes des vers parasites ne montrent cependant aucune homologie avec les séquences des gènes disponibles dans les banques de données (GenBank). Ils semblent donc avoir un rôle spécifique dans l'interaction avec l'hôte [25]. La compréhension des fonctions spécifiques des enzymes, comme leur expression temporelle et spatiale, tout au long du développement de *C. elegans* permet une approche beaucoup plus rationnelle face à l'élaboration des nouveaux traitements (médicaments ou vaccins) destinés à la lutte contre les parasites dans leurs hôtes respectifs.

### **Biologie des nématodes parasites**

Des vers parasites sont présents aussi bien chez les *Adenophorea* que chez les *Secernentea* [1, 10].

Les nématodes sont aussi d'importants parasites de plantes. Certaines espèces vivant dans les sols, responsables de lourds dégâts et pertes économiques, sont au centre de l'intérêt dans les recherches agricoles. Ces différentes pertes contribuent significativement à la malnutrition et à la maladie dans certaines parties du monde (pays en voie de développement notamment). En Afrique, plus précisément en Afrique du Sud et au Ghana, plus de 60% des pertes de production de bananes plantains sont imputables aux nématodes (INIBAP – International Network for the Improvement of Banana and Plantain – 1999). Les nématodes parasites des plantes ont subi une modification de la cavité buccale associée avec leur mode alimentaire, qui représente sans doute le caractère morphologique le plus important. En effet, ils ont élaboré un stylet qui leur permet de perforer les cellules végétales pour se nourrir. Les parasites des plantes peuvent s'attaquer aussi bien aux parties aériennes qu'aux racines. Ils peuvent également être ecto- ou endoparasites, obligatoires ou facultatifs ou encore migrants ou sédentaires [26].

Les ectoparasites migrants se nourrissent principalement sur les cellules épidermiques des racines ou des pousses, causant généralement peu de dommages à la plante. Les espèces d'*Aphelenchoides* vivent dans les replis des jeunes feuilles et migrent au fur et à mesure de la croissance de la plante vers les feuilles les plus jeunes. Les ectoparasites sédentaires par contre prennent leur nourriture en un seul site, racine ou tige, conduisant à la formation de galles. Les nématodes restent physiquement toujours à l'extérieur des cellules (espace extracellulaire), profitant de l'hyperplasie et de l'hypertrophie du cortex radicaire. Les espèces de *Meloidogyne* pénètrent dans les racines à l'aide de leur stylet, se dirigent ensuite vers les vaisseaux conducteurs et induisent la formation de cellules géantes, la galle. Les *Pratylenchus* pénètrent quant à eux à l'intérieur des cellules des radicules puis migrent à

l'intérieur des tissus formant de véritables cavernes. Les endoparasites migrants pénètrent en effet dans la plante et s'y nourrissent tout au long de leurs déplacements causant de gros dommages le long de leur parcours de migration. A l'inverse, les endoparasites sédentaires, entrant dans la plante et s'alimentant en un seul endroit ne provoquent que des dégâts restreints et localisés [26]. Il existe une forte spécialisation entre le parasite et l'hôte pour cette dernière catégorie.

Les nématodes peuvent également être parasites d'animaux (principalement des annélides, des mollusques et des arthropodes) des vertébrés ou même de l'Homme. Les interactions entre les nématodes et les insectes sont bien étudiées, et ce, principalement par le fait que les nématodes ont été reconnus comme des agents potentiels de contrôle biologique des pestes végétales. Parmi eux les espèces entomopathogènes *Steinernema* et *Heterorhabditis* qui représentent 2 catégories commercialement exploitées. Le cycle de ces vers entomopathogènes présente effectivement une particularité (Fig. 5).

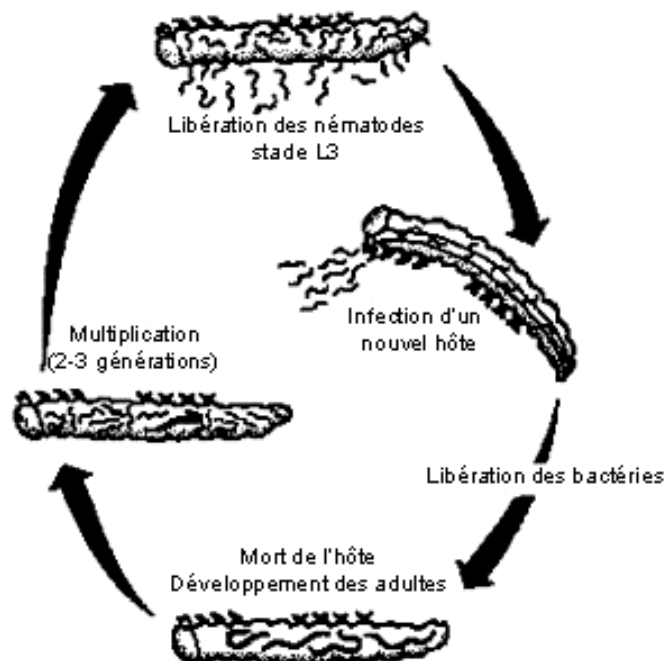


Fig. 5 : Cycle de vie des vers entomopathogènes. Les stades infectieux L3 infectent un nouvel hôte avant la libération des bactéries symbiotiques. L'hôte meurt puis les nématodes atteignent le stade adulte avant de se multiplier et de libérer à nouveau les stades L3 qui engendreront un nouveau cycle.

Les larves L3 des nématodes pénètrent dans l'hôte par une ouverture naturelle avant de relâcher des bactéries symbiotiques (*Xenorhabdus* spp.) contenues dans leur intestin. La multiplication rapide de ces bactéries entraîne la mort de l'hôte offrant ainsi des conditions nutritives idéales pour les nématodes [27]. L'intérêt de ces 2 genres *Steinernema* et *Heterorhabditis* est qu'ils sont relativement versatiles et largement utilisés contre plusieurs espèces d'insectes parasites des cultures [[www.oardc.ohio-state.edu/nematodes](http://www.oardc.ohio-state.edu/nematodes)].

La relation entre le parasite et les vertébrés est plus complexe que celle établie entre les parasites et les insectes ou les plantes [28]. En effet, 2 modes de parasitisme cohabitent chez les nématodes des vertébrés. Certains vers localisés à l'intérieur de l'hôte, mais sans pénétration active (contamination par voie orale) sont appelés mésoparasites et sont généralement trouvés tout le long du système digestif. Dans le cas le plus simple, fréquent chez les nématodes parasites des plantes ainsi que chez les mésoparasites, le cycle se fait directement entre le nématode et l'hôte définitif.

*Ascaris suum*, parasite le plus répandu des porcs illustre parfaitement ce type de cycle (Fig. 6).



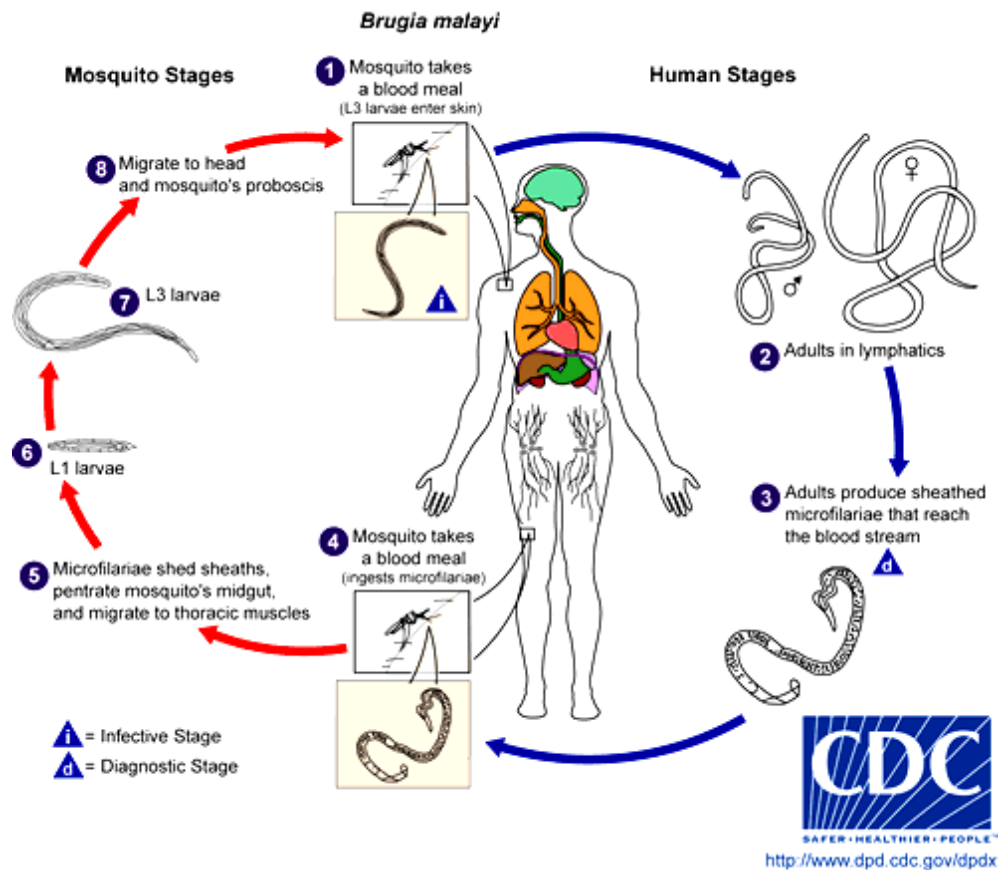
**Fig. 6 :** Cycle de vie d'*A. suum*. Les œufs embryonnés sont ingérés par un nouvel hôte dans lequel toutes les mues L2-L3, L3-L4 et L4-adulte auront lieu. Différents organes seront touchés par les migrations successives des larves avant d'atteindre le stade adulte. Les œufs nouvellement pondus seront ensuite relâchés par les fèces avant de contaminer un nouvel hôte.

L'animal s'infecte en ingérant des œufs embryonnés contenant la larve L2. Les œufs éclosent ensuite dans l'intestin libérant les larves qui migrent alors jusqu'au foie en 24 heures. Première mue pour passer du stade L2 en L3, avant que les larves ne poursuivent leur migration jusqu'aux poumons et atteignent les bronches 4 à 6 jours après l'ingestion. Nouvelle migration ensuite jusqu'au pharynx où les larves seront avalées par déglutition. Les 2 dernières mues de L3 à L4 puis de L4 au stade adulte prennent place dans l'intestin grêle 3 à 4 semaines après l'infection. La maturation des adultes s'ensuit pour atteindre entre 10 et 40 cm de long (6 à 8 semaines après l'infection). Les femelles gravides peuvent alors pondre jusqu'à 1 million d'œufs par jour. Les œufs nouvellement pondus, pourvus d'une épaisse paroi qui leur confère une grande résistance jusqu'à 4 ans en-dehors de l'hôte, sont expulsés avec les fèces. Le développement jusqu'au stade larvaire L2 se déroule à l'intérieur de l'œuf et un nouveau cycle s'amorce lorsqu'un nouvel hôte ingère l'œuf.

Le second mode de parasitisme, indirect – endoparasitisme – concerne les nématodes établis à l'intérieur de l'hôte et fait intervenir un hôte intermédiaire (au minimum) et un hôte définitif. L'hôte définitif représente l'hôte dans lequel le parasite atteint sa maturité sexuelle alors que l'hôte intermédiaire est un transmetteur passif obligatoire au développement du parasite. Les parasites sont parfois transmis d'un hôte à un autre par des vecteurs, qui sont des transmetteurs actifs. Certains animaux peuvent s'infecter et représenter une source de laquelle d'autres animaux seront infectés, ce sont alors des réservoirs [29].

Les filaires responsables de l'éléphantiasis (*Brugia* spp. et *Wuchereria bancrofti*) possèdent le même cycle de vie (Fig. 7) avec un hôte intermédiaire (arthropode) et l'Homme comme hôte définitif [30]. Toutes les filaires sont ovipares et le développement intra-utérin se fait généralement à l'intérieur d'un œuf sphérique. Au fur et à mesure de sa croissance et de son allongement, l'embryon s'enroule sur lui-même. Toutefois, chez ces 2 espèces, les embryons étirent leur coquille environnante en grandissant et au moment de leur naissance, une gaine entoure les microfilaires. Cette enveloppe disparaît peu de temps après l'ingestion des microfilaires par un moustique. Chez les filaires lymphatiques, la larve infectieuse (stade L3) est transmise à l'Homme (hôte définitif) lors d'un repas sanguin du vecteur (hôte intermédiaire). La larve migre alors jusqu'aux vaisseaux et ganglions lymphatiques où elle subit 2 mues successives du stade larvaire L3 à L4 puis L4 à adulte. La maturation sexuelle est atteinte après environ 9 mois et les nématodes peuvent vivre entre 5 et 10 ans. Les vers adultes possèdent un dimorphisme sexuel. Les mâles mesurent environ 4 mm de long et les femelles 6.5 mm. Les femelles et les mâles vivent ensemble et la femelle produit un grand nombre de microfilaires (vivipares) qui migrent à leur tour du système lymphatique au système circulatoire (sang périphérique). Un nouveau moustique se contamine ainsi en prenant un repas sanguin. Les microfilaires présentent une périodicité associée au comportement alimentaire du moustique, généralement nocturne. Les microfilaires pénètrent dans le nouvel hôte par la blessure causée lors du repas sanguin. Après environ 5 à 30 minutes, les microfilaires perdent leur gaine (paroi modifiée de l'œuf) et commencent leur migration de l'intestin vers les muscles thoraciques qui durera

entre une et 24 heures. La première mue du stade larvaire L1 à L2 prend place environ 2 jours après et il faut attendre une semaine avant que larve ne passe du stade larvaire L2 à L3, stade infectieux pour l'Homme. Nouvelle migration pour la larve L3 par l'hémocoèle pour atteindre le proboscis du moustique. L'hôte définitif est ainsi infecté lors du prochain repas sanguin.



**Fig. 7 :** Cycle de vie des filaires lymphatiques. Les stades des microfilaries jusqu'au stade larvaire L3 se déroulent dans l'hôte intermédiaire (le moustique) avant d'être transmis à l'hôte définitif (l'Homme) où les filaires vont passer du stade L3 à adulte.

Une grande variété de parasites d'animaux sont connus mais seul ceux directement liés à l'Homme – interaction directe nématode/Homme ou interaction indirecte nématode/animaux domestiques – ont principalement été étudiés.

Dans les régions pauvres, il n'est pas rare de constater que 90% des enfants en âge de scolarité sont porteurs d'une espèce au moins de parasites helminthiques (trématodes et cestodes compris) [31].

Approximativement un tiers de la population humaine souffre d'une infection chronique causée par des nématodes (Tableau 1).

Tableau n°1 : Incidence des maladies causées par des nématodes dans le monde [31, 32].

	Infection/an	Maladie/an	Mort/an
Helminthes	4'500'000'000		
Ascarirose	1'400'000'000	1'000'000	20'000
Ancylostomiase	1'300'000'000	1'500'000	60'000
Trichocéphalose	1'000'000'000	100'000	<5'000
Filariose	657'000'000	2'000'000	<50'000
Onchocercose	30'000'000	250'000	25'000

Les infections aux nématodes mésoparasites sont communes. En effet, souvent cosmopolites, les nématodes intestinaux sont très largement répandus dans le monde, et sont souvent associés à des infections asymptomatiques ou des maladies bénignes. Les enfants sont les principaux concernés et la transmission se fait par voie orale. Les parasites les plus importants qui concernent l'Homme sont *Enterobius vermicularis*, agent de l'oxyurose, *Ascaris lumbricoides*, agent de l'ascaridose et *Trichuris trichuria* agent de la trichocéphalose. Les ruminants sont également concernés par des nématodes mésoparasites appelés strongles gastro-intestinaux. Les manifestations souvent asymptomatiques sont toutefois liées à une perte économique en raison d'une baisse de rendement au niveau de la viande ou du lait. Les problèmes liés aux nématodes mésoparasites touchant aussi bien les animaux que les humains sont particulièrement importants pour les pays en voie de développement.

Les filaires semblent être les nématodes parasites les plus spécialisés, faisant partie de la classe des *Secernentea*, de l'ordre des *Spirurida* et de la famille des *Filariidea*. Elles se retrouvent chez des hôtes appartenant à toutes les classes de vertébrés [33] excepté les poissons [34, 35]. Les filaires sont généralement des vers fins aux lèvres réduites entourant une capsule buccale. Ces nématodes sont adaptés aux tissus sous-cutanés et profonds des vertébrés, comprenant les systèmes circulatoire et lymphatique ainsi que les tissus conjonctifs, les séreuses et les muscles. Ce sont généralement des parasites d'animaux sauvages, mais quelques espèces de filaires sont toutefois responsables des maladies les plus importantes de l'Homme et des animaux domestiques allant de la cécité à de grosses malformations du corps [35, 36].

Huit espèces sont responsables des filarioses et peuvent être subdivisées en fonction de leur tropisme tissulaire en filaires lymphatiques – *Brugia* spp. et *Wuchereria bancrofti* – générant des pathologies

obstructives (éléphantiasis) et en filaires de tissus – *Onchocerca volvulus*, *Loa loa* et *Mansonella* spp. – qui se retrouvent sous la peau formant souvent des nodules palpables ou dans les yeux. Les filaires sont les seuls nématodes transmis activement par l'intermédiaire d'un vecteur. Les insectes jouent le rôle de vecteur (hôte intermédiaire) pour ces nématodes parasites [37, 38]. Les microfaires nécessitent en effet pour compléter leur cycle de vie un arthropode hématophage du genre *Aedes*, *Anopheles*, *Chrysops*, *Culex*, *Mansonia* ou *Simulium*.

Les filaires sont sans doute à l'origine de la maladie humaine la plus impressionnante appelée éléphantiasis. L'hypertrophie de certaines parties du corps est rapportée depuis l'Antiquité. Les anciens scripts grecs et romains font déjà état de « personnes à la peau épaisse et fissurée comme celle des éléphants » même si à l'époque une certaine confusion existait entre la lèpre et la filariose lymphatique [39]. L'éléphantiasis est en effet la conséquence d'une infection aux filaires *W. bancrofti*, *B. malayi* et *B. timori*, maladie la plus prévalente des pays tropicaux et subtropicaux. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), environ 120 millions de personnes sont infectées chaque année et environ un cinquième de la population mondiale vit dans des régions où la filariose lymphatique est endémique [30]. Les différentes filaires possèdent en effet des aires de distribution relativement restreintes (Fig. 8) à l'exception de *W. bancrofti* qui est largement distribué dans les tropiques. *B. malayi* se situe dans le sud est de l'Asie alors que *B. timori* n'est rencontré que dans l'archipel malais. L'hôte définitif est toujours l'Homme bien que les animaux sauvages et domestiques soient des hôtes alternatifs pour les espèces de *Brugia*. *B. pahangi* possède la même distribution que *B. malayi* et *B. timori* mais ses hôtes définitifs sont généralement les animaux domestiques, principalement le chat.

La filariose lymphatique est responsable d'immenses souffrances psychologiques et cause chaque année des pertes économiques estimées à plus de 5 millions de dollars US, la classant en troisième position en terme de perte, juste derrière la malaria et la tuberculose [30, 40]. La filariose lymphatique concerne généralement la population défavorisée, aussi bien dans les régions urbaines que les régions rurales. Elle fait partie des 6 maladies infectieuses considérées « à éradiquer » à l'aide des moyens actuels. Parmi les 38 pays en voie de développement, 32 sont concernés par l'endémicité de la filariose lymphatique [30].

L'utilisation intensive des techniques moléculaires pour étudier les filaires a permis de déterminer chez *B. malayi* environ 11'000 gènes du génome complet estimé entre 85 et 95 Mb réparti sur 5 paires de chromosomes autosomes et une paire de chromosomes sexuels [www.tigr.org]. Contrairement à d'autres projets d'étude du génome de parasite, le « projet du génome des filaires » (FGP pour Filarial Genome Project) possède un modèle particulièrement bien caractérisé en l'organisme de *C. elegans*. Ce projet, initié à la demande de l'OMS en 1999, est parallèle au programme qui a pour mission de rassembler tous les partenaires de la santé privés et publics (GPELF pour Global Programme to Eliminate the Lymphatic Filariasis) dans le même but d'éliminer la filariose lymphatique d'ici 2020 [30].

La principale méthode utilisée consiste en un traitement médicamenteux de masse (TMM) des populations concernées par l'endémicité de la filariose lymphatique avec le citrate de diéthylcarbamazine (DEC) seul, en association parfois avec l'ivermectine ou encore avec l'ivermectine couplée à l'albendazole. Le dernier compte-rendu officiel [41] met en lumière la lenteur de l'efficacité d'un tel traitement et des problèmes de financement. La date butoir de 2020 représente ainsi un défi utopique devant l'ampleur de la maladie [[www.filariasis.org](http://www.filariasis.org)].



**Fig. 8 : Distribution de la filariose lymphatique dans le monde en 2001 (Source : OMS)**

Parmi d'autres cibles potentielles, un moyen de lutte contre la filariose a donc été proposé par l'intermédiaire d'un vaccin visant à empêcher la transmission des parasites lors des piqûres par les arthropodes hématophages. Les premières recherches ont ainsi pu mettre en évidence la chitinase, candidat le plus sérieux dans ce combat contre l'éléphantiasis [42-44].

### Chitine et chitinases

La chitine (Fig. 9) est un polymère fibreux, insoluble et naturel, le plus abondant après la cellulose. En terme de biomasse, la chitine représente approximativement 10 gigatonnes ( $1 \times 10^{13}$  kg) de matière synthétisée et dégradée chaque année dans la biosphère [45]. C'est un composant structural de l'exosquelette des insectes, de la carapace des crustacés, de la paroi cellulaire des champignons et des algues mais également de la paroi des œufs de certains nématodes [46-50]. A noter que la paroi de l'œuf est la seule structure connue chez les nématodes contenant de la chitine [51]. Les plantes, les vertébrés et les procaryotes ne contiennent pas de chitine [46].

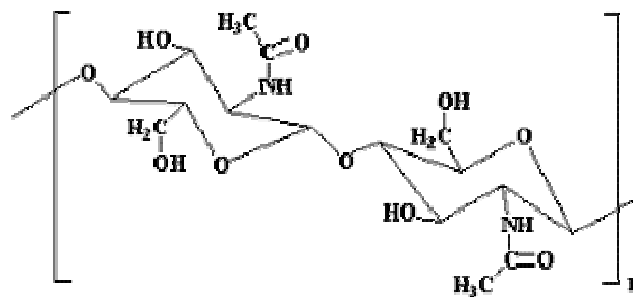


Fig. 9 : Monomère de chitine composé de 2 N-acétylglucosamine

La chitine est composée de résidus N-acétylglucosamine (GlcNAc) liés entre eux par des ponts  $\beta(1,4)$ -glycosidiques. Les polymères de chitine tendent à former des microfibrilles d'approximativement 3 nm de diamètre, stabilisées par des ponts hydrogène formés entre les groupes amine et carbonyle. Les fibres de chitine sont synthétisées par une enzyme – la chitine synthase – une glycosyltransférase largement répandue chez les champignons, les nématodes et les arthropodes. La chitine est dégradée en monomères par des enzymes chitinolytiques [52, 53]. La chitine synthase et les enzymes chitinolytiques travaillent généralement de concert pour le remodelage des structures chitineuses [50].

Les chitinases [EC 3.2.1.14] sont classées comme des glycosylhydrolases et ont été isolées de plusieurs organismes différents [47, 54]. Elles peuvent être divisées en 2 catégories, à savoir les endochitinases et les exochitinases (Fig. 10). Les endochitinases clivent de manière aléatoire la chaîne de chitine en hydrolysant les ponts  $\beta(1,4)$ -glycosidiques formant ainsi des molécules de taille variable. Les exochitinases par contre agissent progressivement sur l'extrémité non-réduite de la chaîne de chitine formant ainsi des monomères ou des dimères [54, 55].

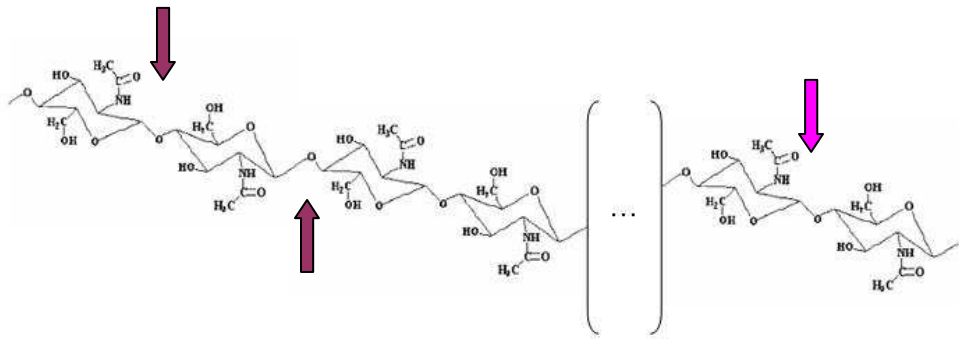


Fig. 10 : Monomères de chitine avec représentation des sites d'action des endo- et des exochitinasés

Les chitinasés trouvées dans les plantes supérieures et dans les algues possèdent un poids moléculaire d'environ 30 kDa. Les chitinasés extraites des mollusques, des arthropodes et de certains vertébrés comme les poissons, les amphibiens ou les mammifères ont un poids moléculaire compris entre 40 et 90 kDa et peuvent, pour certaines espèces, atteindre des valeurs plus élevées, jusqu'à 120 kDa. Des poids moléculaires compris entre 30 et 120 kDa ont également été observés chez les bactéries et les champignons.

Le pH correspondant au point isoélectrique (pI) des chitinasés est très variable. Les chitinasés d'insectes sont généralement plus grandes que les chitinasés de plantes qui sont plus petites et plus compactes et ainsi thermiquement plus stables [56]. En effet, des valeurs de 3.0 à 10.0 ont été trouvées chez les plantes supérieures et les algues, 4.7 à 9.3 chez les insectes, les crustacés, les mollusques et les poissons. Les microorganismes présentent des valeurs de pI pour les chitinasés comprises entre 3.5 et 8.8. Des chitinasés acides et basiques sont donc présentes dans ces différents organismes.

Sur la base de leurs séquences en acides aminés, les chitinasés ont été subdivisées en 2 familles – famille 18 et famille 19 – qui diffèrent également dans leurs structures tridimensionnelle et dans leurs mécanismes catalytiques [47, 57]. D'importantes différences dans les propriétés biochimiques ont également été relevées [48] :

La **Famille 18** est ubiquitaire et comporte des chitinasés de bactéries, de champignons, de virus, d'animaux et de plantes [48, 52, 53, 57]. Les membres de cette famille possèdent tous une structure tridimensionnelle commune composée d'un tonneau à 8 unités  $\alpha/\beta$  (Fig. 11), structure tertiaire stable [57, 58]. Les régions les mieux conservés correspondent à 2 segments courts contenant les résidus catalytiques [57]. Les chitinasés de la famille 18 ne possèdent qu'un seul site catalytique bien que la plupart comprennent une structure modulaire contenant un ou plusieurs domaines non-catalytiques

trouvés indifféremment au N- ou au C-terminal [59]. Ces structures modulaires supplémentaires remplissent le rôle de domaine fixateur de la chitine (CBD = Chitin Binding Domain). Les chitinases de la famille 18 hydrolysent les ponts glycosidiques en conservant la configuration anomérique par un mécanisme catalytique assisté par le substrat [47, 48, 57, 60].

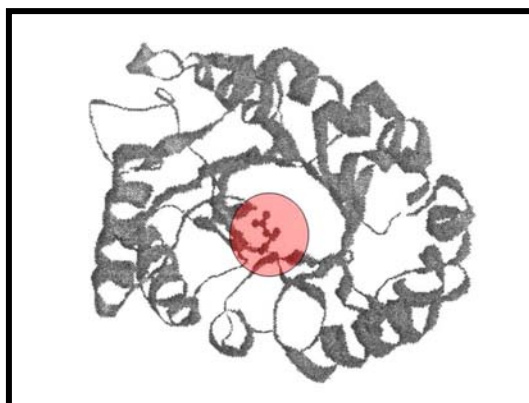


Fig. 11 : Modèle tridimensionnel des chitinases de la famille 18, avec le site catalytique marqué (cercle rouge) au centre du tonneau formé par les 8 unités  $\alpha/\beta$  [57].

La famille 18 comprend plusieurs régions d'acides aminés conservés (Fig. 12). Ces séquences signatures sont trouvées dans le site actif qui contient un résidu aspartate (D) et un résidu glutamate (E), crucial pour le mécanisme catalytique.

<i>Tobacco</i>	GQSNTRPLGDAV	LDGIDF <b>D</b> IEGGTT
<i>Cucumber</i>	GQSDSRPLGAAV	LDGVDF <b>D</b> IESGSG
<i>Maize</i>	GSGSSRPLGAAV	LDGIDF <b>D</b> IENGQS
<i>Coccidioides immitis</i>	LSIGGWTYSPMF	FDGID <b>I</b> DW <b>E</b> YPED
<i>Trichoderma harzianum</i>	LSIGGWTYSTNF	FDGID <b>I</b> DW <b>E</b> YPAD
<i>Aphanocladium album</i>	LSIGGWTYSTNF	FDGID <b>I</b> DW <b>E</b> YPAD
<i>Serratia marcescens</i>	PSIGGWTLSDPF	FDGV <b>D</b> I <b>D</b> W <b>E</b> FPGG
<i>Caenorhabditis elegans</i>	IDSAITFVRTWG	FDGID <b>I</b> DW <b>E</b> YPSG
<i>Brugia malayi</i>	IKSAIAFLRKNN	FDGF <b>D</b> L <b>D</b> W <b>E</b> YPVG
		* *

Fig. 12 : Régions conservées chez les chitinases de la famille 18 : résidus catalytiques conservés dans toutes les séquences (\*) avec un résidu aspartate et un résidu glutamate, qui joue un rôle clé dans le mécanisme catalytique [57, 60].

La **Famille 19** contient surtout des chitinases de plantes mais certains résultats ont mis en évidence ces chitinases chez *Streptomyces griseus* [48, 61, 62]. Plusieurs gènes codant pour des chitinases de la famille 19, ont cependant également été identifiés dans le génome de *C.elegans* [21, 22]. Les chitinases de la famille 19 semblent ainsi être distribuées beaucoup plus largement que ce qui avait été supposé. Les chitinases de cette famille présentent un domaine catalytique différent de celui de la famille 18 ; une structure tridimensionnelle principalement composée d'hélices  $\alpha$  (Fig. 13) [57]. Les chitinases de la famille 19 hydrolysent les liaisons glycosidiques en inversant la configuration anomérique par un mécanisme catalytique acido-basique [47, 48, 57, 60].



Fig. 13 : Modèle tridimensionnel des chitinases de la famille 19, avec le site catalytique composé de 2 régions distinctes (cercles rouges) [57].

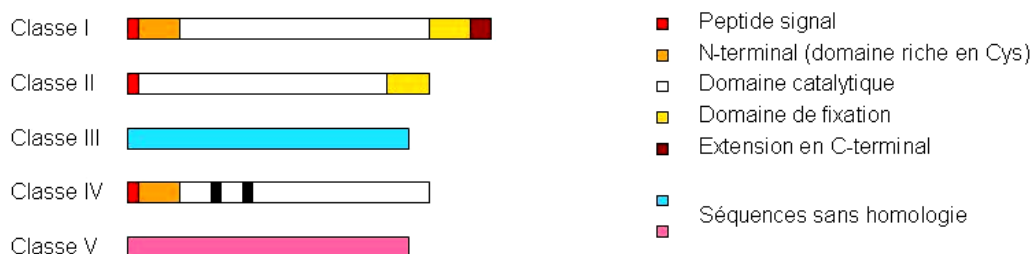
Les chitinases de la famille 19 contiennent comme séquences signatures (Fig. 14) 2 sites glutamate (E).

<i>Barley I</i>	STETRKQ <b>E</b> V <b>A</b> AF <b>F</b> FGQTS <b>H</b> ET <b>T</b> GG--WATAPDGPYSWG <b>Y</b> C-----YRR- <b>E</b> LG <b>S</b>
<i>Jbean II</i>	DTNTR <b>K</b> RE <b>V</b> <b>A</b> AF <b>L</b> AQTS <b>H</b> ET <b>T</b> GG--AAGSPDGPYAW <b>G</b> YC-----FVT- <b>E</b> RD <b>K</b>
<i>Osati IV</i>	TNDDS <b>K</b> RE <b>I</b> <b>A</b> AF <b>F</b> AHV <b>T</b> H <b>E</b> T <b>G</b> -----HMC-----YIN- <b>E</b> ING
<i>ChiC_Sgris</i>	SDEV <b>K</b> RE <b>A</b> <b>A</b> FLANV <b>S</b> H <b>E</b> T <b>G</b> -----LFY <b>I</b> K- <b>E</b> V <b>N</b> E
<i>C. elegans</i>	ADEN <b>K</b> R <b>D</b> L <b>A</b> AF <b>F</b> AHAV <b>Q</b> <b>E</b> T <b>G</b> ENNIALYDTLS <b>D</b> QDAS <b>N</b> C <b>F</b> YR <b>G</b> G <b>F</b> Y <b>N</b> W <b>F</b> <b>E</b> GG <b>P</b> * * *

Fig. 14 : Régions conservées chez les chitinases de la famille 19 : résidus conservés dans toutes les séquences (bleu) avec 2 résidus (rouge) glutamate, qui jouent un rôle clé dans le mécanisme catalytique [60].

La première classification des chitinases (Fig. 15), avait été effectuée sur la base de différentes séquences de chitinases d'espèces de plantes variées réparties en 5 classes bien distinctes [63, 64]. La famille 18 est ainsi répartie entre les classes III et V et la famille 19 dans les classes I, II et IV [47, 48, 65].

**Classe I :** chitinases contenant un domaine N-terminal riche en résidus cystéine (impliqué dans la liaison avec la chitine) et une structure principale hautement conservée [63]. La plupart des chitinases de la classe I possèdent une extension en C-terminal qui leur sert de signal pour la vacuole [66]. Les chitinases de la classe I sont présentes aussi bien chez les plantes monocotylédones que chez les dicotylédones [64, 67].



**Fig. 15 :** Présentation schématique des différents domaines constituant les 5 classes de chitinases chez les plantes [68].

**Classe II :** chitinases possédant une grande identité de séquence en acides aminés avec la classe I des chitinases. Le domaine N-terminal riche en résidus cystéine est absent ainsi que l'extension en C-terminal [63]. Les chitinases de la classe II sont sécrétées dans l'espace extracellulaire et possèdent une activité spécifique plus faible que les chitinases de la classe I [67]. Les chitinases de la classe II sont principalement trouvées chez les plantes dicotylédones [64].

**Classe III :** chitinases d'une famille distincte de protéines (famille 18) sans similarité avec les chitinases des classes I, II ou IV (famille 19) [67]. Les chitinases de cette classe possèdent la même structure secondaire en tonneau à 8 unités  $\alpha/\beta$  [57]. Les chitinases de la classe III ont été identifiées chez plusieurs plantes dicotylédones et monocotylédones [64].

**Classe IV :** chitinases contenant un domaine riche en résidus cystéine (comme la classe I). Présence d'une structure principale mettant en évidence une identité de séquence en acides aminés comprise entre 41 et 47% avec les chitinases de la classe I [63]. Les chitinases de la classe IV présentent 2 délétions caractéristiques dans le domaine catalytique. Les chitinases de la classe IV sont principalement connues chez les plantes dicotylédones [64].

**Classe V** : les chitinases de la classe V ne ressemblent que peu aux autres chitinases de famille 18 de plantes et ont été isolées d'abord du tabac (plante dicotylédone) [63, 64].

La classification des chitinases a été faite en 2 étapes, s'attardant tout d'abord sur les chitinases végétales. Les chitinases ont été réparties en cinq classes en fonction de leurs séquences en acides aminés. L'étude a ensuite été étendue à l'ensemble des chitinases mettant en évidence des différences de structures tridimensionnelles et de mécanismes catalytiques permettant ainsi de former 2 catégories, les chitinases de la famille 18 et famille 19 (Tableau 2).

**Tableau n2 :** Classification des différentes chitinases en fonction de leurs séquences en acides aminés et de leur provenance (modifié de [68]) :

Famille 19			Famille 18	
<b>Nématodes</b>			Virus	
			Bactéries	
			Champignons	
			Nématodes	
			Invertébrés	
			Vertébrés	
<b>Classe I</b>	<b>Classe II</b>	<b>Classe IV</b>	<b>Classe III</b>	<b>Classe V</b>
Plantes				

### Fonctions et rôles des chitinases

Les chitinases et les enzymes liées jouent plusieurs rôles dans une multitude de systèmes biologiques différents [69]. Les chitinases interviennent ainsi dans une grande variété de fonctions dans la nature incluant la morphogenèse, les défenses, la nutrition et la pathogénicité [55]. Chez les plantes comme chez les animaux, les chitinases ont pour rôle principal la défense de l'organisme contre les attaques des pathogènes, rôle qui peut être tout aussi passif qu'actif [54].

La course aux armements entre les pathogènes et les plantes implique une interaction étroite et coévolutive entre l'hôte et le pathogène [70]. En effet, chez les plantes, les chitinases jouent un rôle dans la résistance contre les pathogènes. Des recherches ont en effet montré que les chitinases sont également impliquées dans un grand nombre d'événements physiologiques, lors du développement ou dans les processus de croissance. Les chitinases semblent contrôlées par une variété de conditions de stress, aussi bien abiotique que biotique et par certaines phytohormones. Les chitinases de plantes sont communément appelées « protéines liées à la pathogénèse » (PR protéines). Les chitinases paraissent de plus impliquées dans d'autres mécanismes importants à la survie de la plante.

En effet, une chitinase semble intervenir dans la voie de transduction de l'éthylène, hormone végétale, et dans le processus d'élongation cellulaire. Les chitinases pourraient ainsi être des médiateurs dans les différentes voies de transduction. Une activité de molécule signal est également supposée dans l'apoptose ainsi qu'un rôle potentiel en tant qu'antigel [54, 57].

Les rôles des chitinases, de la famille 18, ont bien été étudiés et se situent visiblement dans une large palette de fonctions. Chez les champignons, les chitinases possèdent un rôle autolytique, nutritionnel et morphogénétique. La chitinase des virus quant à elle est impliquée dans la pathogénèse [71].

Chez les insectes et les crustacés, les chitinases sont étroitement liées avec les mues et le besoin d'une dégradation partielle de l'ancienne cuticule. La présence des chitinases chez les vertébrés est ainsi principalement associée au système digestif. Ces enzymes sont également associées à un rôle de défense contre les attaques pathogènes des champignons. De nombreux venins de vertébrés possèdent également pour composante de la chitinase [69, 71].

Les chitinases semblent également jouer un rôle dans la virulence de certains pathogènes qui infectent les insectes via la membrane péritrophique, comme *Plasmodium*, responsable de la malaria, les trypanosomes, *Leishmania* ou encore *Autographa californica nucleopolyhedrovirus*. En effet, le tube digestif de la plupart des vecteurs (insectes) est recouvert de matériel chitineux – membrane péritrophique – qui semble freiner voire même bloquer l'invasion des parasites. Certains parasites semblent donc avoir développé des mécanismes pour déjouer voire détruire les barrières chitineuses potentielles. Les chitinases leur permettent de franchir cet obstacle et semblent intervenir de manière cruciale dans la réussite de la propagation des parasites [42, 44, 72, 73].

Les fonctions de la chitinase chez les bactéries montrent également un rôle dans la nutrition et *Streptomyces griseus* HUT6037, qui possède une chitinase de la famille 19, présente une activité antifongique [61, 62]. Les chitinases bactériennes jouent de plus un rôle potentiel dans le parasitisme [71]. Chez la bactérie *Burkholderia gladioli* souche CHB101, des chitinases de chaque famille – famille 18 et famille 19 – sont présentes mais les chitinases de la famille 19 semblent être la famille principale impliquée dans la dégradation de la chitine [74].

### Les chitinases chez les nématodes

Les premières études sur les chitinases des microfilaires a permis de mettre en évidence 2 protéines p70 et p75 chez *B. malayi*, agent responsable de la filariose lymphatique humaine [75] ainsi que 3 protéines p69, p73 et p76 chez *B. pahangi* [76]. Ces 5 protéines sont détectées par le même anticorps monoclonal MF1. La séquence N-terminale des protéines p70 et p75 chez *B. malayi* présente en effet une région de 684 acides aminés similaires aux chitinases de *Serratia marcescens*, *Bacillus circulans*

et *Streptomyces plicatus*. Une activité chitinolytique a été démontrée et semble ainsi être impliquée dans la dégradation des structures contenant de la chitine chez les microfilaires ou chez le vecteur pendant le développement du parasite ou lors de la transmission. L'antigène MF1 a été défini comme une chitinase de microfilaires de *B. malayi* [75].

Une étude similaire a été menée auprès des populations résidant dans les régions où *W. bancrofti*, le second agent responsable de la filariose lymphatique est présent de manière endémique. Parmi ces populations, certains individus (8%) semblent naturellement immunisés et ne développent aucun symptôme clinique [77]. Un anticorps de 43 kDa, trouvé au sein des populations concernées par *B. malayi*, a été isolé puis utilisé pour établir un criblage d'une banque de *W. bancrofti*. Un clone recombinant WbN43, contenant un insert de 2.3 kb a été isolé et montre également des similarités significatives avec MF1 bien qu'il n'y ait insertion que d'un gène partiel. L'expression de WbN43 se manifeste chez les microfilaires et au stade larvaire L3 mais pas chez les adultes. Aucune activité de WbN43 ne peut être détectée dans un système d'expression en raison du gène tronqué.

Une activité chitinolytique a été démontrée dans tous les stades de développement de *C. elegans* [78]. Cependant, une seule chitinase active a pour l'heure été caractérisée chez ce nématode [68]. Cette chitinase – *cht-1* – a été localisée dans le pharynx et pourrait jouer un rôle dans la digestion des parties chitineuses des aliments ingérés par le nématode. Cette chitinase active fait partie de la famille 18. Les chitinases des vers parasites ont également été étudiées notamment chez les filaires, dans l'espoir de trouver un moyen de lutte contre les filarioses. En présence des filaires lymphatiques, le sérum des patients amicrofilarémiques contient des anticorps dirigés contre des chitinases [42-44, 75]. Ces différentes études portaient principalement sur des chitinases de la famille 18.

L'étude phylogénique des chitinases de la famille 19 de plantes, bactéries et *C. elegans* établie 5 groupes distincts, le groupe V étant spécifique pour les chitinases de *C. elegans* [79]. Certaines enzymes de chitinases de la famille 19 semblent cependant être présentes chez *Ascaris suum* [80] en plus de chez *C. elegans*.

### **Aspects immunologiques**

Les chitinases ont été proposées comme candidat pour l'élaboration de vaccin contre la filariose lymphatique il y a plus de 10 ans déjà. Toutes les études qui ont été menées jusqu'à présent ont mis en évidence le caractère antigénique des chitinases de la famille 18. L'immunisation des animaux avec des chitinases purifiées de filaires réduit le taux d'infection par *B. malayi* et *W. bancrofti* [44]. L'immunisation des humains avec les chitinases des parasites ne provoque aucune complication post-immune [44]. Les individus potentiellement immunisés, c'est-à-dire les individus possédant des anticorps contre les chitinases des parasites, ne présentent aucun effet secondaire comparé aux

individus infectés. Le vaccin contre les filarioses lymphatiques n'avait pas été élaboré dans le but de protéger les individus infectés mais bien de bloquer la transmission à d'autres sujets sains.

Une étude de la réactivité des sera humains avec de la chitinase recombinante de microfilaires a également été menée. Un déterminant antigénique sur la molécule de parasite identifiée à l'aide de l'anticorps MF1 monoclonal a été utilisé [81]. Les individus amicrofilarémiques et ne présentant aucun symptôme clinique sont reconnus par MF1. Les individus des régions endémiques amicrofilarémiques avec éléphantiasis chronique ont un niveau d'anticorps IgG contre la chitinase faible ou indétectable. Les anticorps de MF1 qui reconnaissent les antigènes spécifiques des microfilaires sont souvent présents chez les donneurs amicrofilarémiques sans filariose lymphatique clinique. Ces observations indiquent donc que la présence des anticorps de MF1 reflète un certain degré de résistance immunitaire à la filarémie (dans un sous-groupe de patients avec filariose asymptomatique). MF1 *in vitro* semble favoriser l'adhérence des cellules à la surface des microfilaires, lesquelles sont tuées pendant le processus. *In vivo*, le transfert passif de MF1 réduit la microfilarémie des rongeurs infectés avec *B. malayi*. MF1 semble ainsi être la cible d'une réponse immunitaire protectrice. La protéine de fusion utilisée dans ces différentes études possède la même activité enzymatique et antigénique que la protéine native du parasite [81].

L'anticorps MF1 ne reconnaît pas les microfilaires nouvellement pondues, mais une réaction se développe graduellement avec leur maturation. Cette apparition décalée de l'antigène explique ainsi la présence d'un niveau ultra faible de microfilaires dans la circulation systémique de certains individus possédant des anticorps à MF1. MF1 bloque donc la transmission des microfilaires, ce qui était le but recherché pour ce vaccin. Des réactions croisées avec les chitotriosidases humaines ont cependant été observées, ce qui a mis fin à ces études [82, 83].

- Ces différentes études permettent de relancer l'hypothèse émise par Fuhrman et Shahabuddin sur l'importance du rôle de la chitinase dans la transmission des parasites par les vecteurs et ainsi représente une cible possible dans les recherches de lutte contre les filarioses lymphatiques. Cette hypothèse doit toutefois être remise en cause puisque des chitinases ont été décrites chez *C. elegans*, organisme libre qui n'a pas de transmission par des vecteurs.
- Des réactions croisées entre les chitinases de la famille 18 et des chitotriosidases ont été décrites. L'antigène MF1 n'étant pas spécifique à la famille 18, il n'est pas utilisable comme vaccin.
- Des chitinases de la famille 19 sont présentes chez *C. elegans* [68]. L'intérêt réside ainsi dans le fait que les hôtes définitifs ne semblent pas contenir de chitinases de cette famille et donc

permettrait ainsi d'obtenir une cible distincte, dans l'espoir d'élaborer un vaccin spécifique contre la filariose lymphatique.

- Le rôle des chitinases chez les nématodes reste ainsi encore à élucider.

### **Objectifs**

Le but de ce travail était de :

- caractériser les gènes codant pour des chitinases de la famille 19 chez *C. elegans*,
- identifier ces mêmes chitinases chez les vers parasites *B. malayi* et *B. pahangi* responsables de la filariose lymphatique
- vérifier leur conservation au sein du phylum Nematoda en recherchant également leur présence chez le ver mésoparasite *A. suum*
- ainsi que chez le ver entomopathogène *H. megidis*
- essayer de produire des protéines recombinantes, si possible, avec une activité chitinolytique
- comparer à l'aide des outils moléculaires les différentes chitinases

**M  
A  
T  
E  
R  
I  
E  
L  
  
&  
  
M  
E  
T  
H  
O  
D  
E  
S**

## Matériel et méthodes

### **Matériel**

#### Nématodes libres

Les *Caenorhabditis elegans* var Bristol N2 proviennent du *Caenorhabditis Genetics Center* (Minneapolis, USA). Les nématodes sont élevés dans les mêmes conditions pour toutes les expériences, à 25°C sur du milieu NGM agar avec *Escherichia coli* lignée OP 50SR (Stratagene) comme nourriture [20].

Les plaques contenant les nématodes (culture mixte) sont lavées avec du tampon M9 (3g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 6g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5g NaCl, 1000ml H<sub>2</sub>O and 1ml MgSO<sub>4</sub> 1M après stérilisation) pour le maintien et le transfert de la souche.

#### Nématodes parasites

Les adultes d'*Ascaris suum* ont été récoltés sur des porcs de l'abattoir et sont conservés à -20°C à l'Université de Neuchâtel (Suisse).

Les vers entomopathogènes *Heterorhabditis megidis*, tous au stade L3, proviennent d'Andermatt Biocontrol AG (Grossdietwil, Suisse). Les vers sont conditionnés dans des sachets à diluer dans de l'eau. La culture est continuellement agitée afin que les vers ne se déposent pas au fond de la bouteille de culture.

Plusieurs banques d'ADNc de *Brugia pahangi* ont été obtenues du Dr. Hunter (Université de Liverpool, Royaume Uni). Elles avaient été préparées dans le phage λUniZap XR à partir de l'ARNm des stades L3, L3 3 jours après infection (jpi) et adultes.

Deux banques différentes d'ADNc de *Brugia malayi* ont été utilisées. La première avait été préparée dans le phage λUniZap XR à partir de l'ARNm de vers L3 3jpi (Dr. Hunter, Liverpool, R. U.) et la seconde dans le phage λSCREEN à partir de l'ARNm de vers femelles uniquement (Dr. Hirzmann, Université de Munich, Allemagne).

Une banque d'ADNg de *B. malayi*, a été préparée dans le phage DASH II à partir de filaires adultes, sans distinction de sexe (Dr. Hirzmann, Université de Munich, Allemagne).

### Souches de bactéries

Quatre souches différentes d'*Escherichia coli* ont été utilisées pour les diverses expériences :

**Souche DH5 $\alpha$ :** F<sup>-</sup> Ø80 lacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ (lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(r<sub>k</sub><sup>-</sup> m<sub>k</sub><sup>+</sup>)  
phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1

(Don de l'institut de biochimie, Université de Neuchâtel)

**Souche JM109:** endA1 recA1 gyrA96 thi-1 hsdR17(r<sub>k</sub><sup>-</sup> m<sub>k</sub><sup>+</sup>) relA1 supE44  $\Delta$ (lac-proAB)  
[F' traD36 proAB lacI<sup>q</sup>Z $\Delta$ M15]

(Don de l'institut de biologie végétale, Université de Fribourg)

**Souche XL1-Blue MRF':**  $\Delta$ (mcrA)183  $\Delta$ (mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1  
gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacI<sup>q</sup>Z $\Delta$ M15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)]

(Propriété du laboratoire de Parasitologie, Université de Neuchâtel)

**Souche BL21:** *E. coli* B F<sup>-</sup> dcm ompT hsdS(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>+</sup>)gal

(Propriété du laboratoire de Parasitologie, Université de Neuchâtel)

*E. coli* possède un système régulateur appelé *lac operon* utilisé comme outil pour le clonage dans les bactéries.

### **Méthodes**

Les protocoles détaillés des différentes expériences citées dans ce chapitre se trouvent en annexe (Annexes II).

### Biologie moléculaire

Toutes les méthodes décrites ici proviennent du « *Current protocols in molecular biology* », références continuellement mises à jour.

#### *Extraction d'ADN*

L'extraction d'ADN de *C. elegans* et de *H. megidis* a été faite avec le kit *QIAamp DNA Mini kit* (Qiagen). Pour *C. elegans*, 3 boîtes de Pétri contenant des cultures mixtes ont été préalablement

lavées au tampon M9 et les vers sont récupérés après une centrifugation d'une minute à 1000 rpm. Pour *H. megidis*, 5 ml de culture ont été nécessaires. Une étape de lyse (à l'aide de protéinase K) a précédé l'utilisation des colonnes à membrane de silice. En présence d'une forte concentration de sel, l'ADN se lie en effet par affinité à la membrane de silice. Les colonnes ont ensuite été lavées 3 fois avec le tampon de lavage, compris dans le kit et l'ADN a été élué avec 50 µl d'H<sub>2</sub>O ou de tampon TE.

*A. suum* a également subi une lyse (protéinase K et β-mercaptoéthanol) avant une extraction d'ADN au phénol-chloroforme [84].

L'ADN provenant des différentes banques a, quant à lui, été précipité à l'aide d'une solution d'acétate de sodium 3M et d'EtOH 100% (1 v/v ADNc : 1/10 v/v NaAc 3M : 2.5 v/v EtOH 100%).

#### Choix d'amorces

L'amplification d'ADN des différents vers s'est toujours faite avec les amorces spécifiques pour *C. elegans* (Tableaux 3). Celles-ci ont été dessinées sur la base des séquences de chitinases disponibles sur <http://www.wormbase.org>.

Plusieurs sets d'amorces ont été dessinés (Fig. 1) et synthétisés par MWG-Biotech AG. Un premier lot a été dessiné pour chacun des gènes d'intérêt afin d'amplifier la séquence entière des gènes codant pour des chitinases de la famille 19. Des sites de restriction spécifiques – *SnaBI* et *NotI* – ont ensuite été ajoutés à ces amorces pour l'expression dans les levures. Ces 2 sites de restriction permettent théoriquement l'insertion du fragment séquencé dans le plasmide pPIC9K, spécifique à *Pichia pastoris*. Un autre set d'amorces a ensuite été dessiné sur une partie conservée du gène afin de n'amplifier qu'un fragment, en y ajoutant les sites de restriction *BamHI*, *EcoRI* ou *SmaI* nécessaires par la suite pour l'insertion du fragment dans le plasmide pGEX-3X spécifique pour l'induction de protéines dans les bactéries *E. coli* BL21.

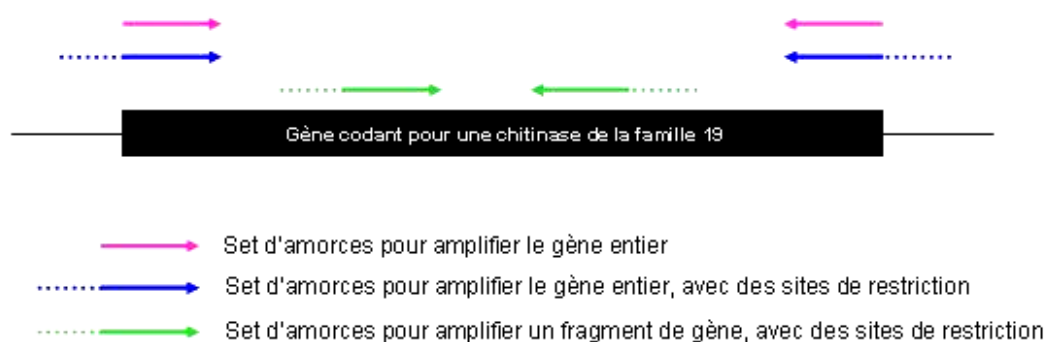


Fig. 16 : Schéma des différentes amorces utilisées

Un dernier set d'amorces spécifique pour le gène *cht-1* (chitinase de la famille 18) chez *C. elegans* a ensuite encore été utilisé comme contrôle positif [68].

Tableaux n°3 : Liste des amorces utilisées pour les différentes amplifications

a) Amorces utilisées pour amplifier les gènes entiers codant pour des chitinases de la famille 19 sans site de restriction

	Amorces sens		Amorces antisens	
<b>T05H4.7</b>	ATG GCT GAG CAA AGA GCA	1	CTA TCC CCT TAT TCC AGT	2
<b>C08B6.4</b>	ATG ACT CGC ATC AAA AGT	2	AAT GGA GTT AAT AAT TTA	4
<b>R10D12.15</b>	ATG TCG GCG CAA TTC	3	TCA ATA ATT AAG GCA TAA TG	6

- |    |                  |    |                  |
|----|------------------|----|------------------|
| 1) | <b>CEchia2.1</b> | 2) | <b>CEchia2.2</b> |
| 3) | <b>CEchia3.1</b> | 4) | <b>CEchia3.2</b> |
| 5) | <b>CEchia5.1</b> | 6) | <b>CEchia5.2</b> |

b) Amorces utilisées pour amplifier les gènes entiers codant pour des chitinases de la famille 19 avec sites de restriction pour l'insertion du gène entier dans le plasmide pPIC9K

	Amorces sens		Amorces antisens	
<b>T05H4.7</b>	CTC TAC GTA ATG GCT GAG CAA AGA GCA	7	GCA GCG GCC GGC TAT CCC CTT ATT CCA GT	8
<b>C08B6.4</b>	CTC TAC GTA ATG ACT CGC ATC AAA AGT	9	GCA GCG GCC GCA ATG GAG TTA ATA ATT TA	10
<b>R10D12.15</b>	CAC TAC GTA ATG TCG GCG CAA TTC	11	GCT GCG GCC GCT CAA TAA TTA AGG CAT AAT G	12

- |     |                     |     |                     |
|-----|---------------------|-----|---------------------|
| 7)  | <b>CEchia2.1res</b> | 8)  | <b>CEchia2.2res</b> |
| 9)  | <b>CEchia3.1res</b> | 10) | <b>CEchia3.2res</b> |
| 11) | <b>CEchia5.1res</b> | 12) | <b>CEchia5.2res</b> |

c) Amorces utilisées pour amplifier les fragments de gène codant pour des chitinases de la famille 19 avec sites de restriction

	Amorces sens		Amorces antisens	
<b>T05H4.7</b>	SMAI CAC CCC GGG AAG AGA GAT GTA GC	13	EcoRI GCT GAA TTC (CT)CC (AG)TA GTT GTA G	14
<b>C08B6.4</b>	SMAI		BamHI	
<b>R10D12.15</b>	CAC CCC GGG AAA (AC)GA GA(CT) TTG GC	15	GCT GGA TCC CCC GTA GTT GTA G	16

- |     |                        |     |                        |
|-----|------------------------|-----|------------------------|
| 13) | <b>CEfrachia2res</b>   | 14) | <b>CEfrachia2/3res</b> |
| 15) | <b>CEfrachia3/5res</b> | 16) | <b>CEfrachia5res</b>   |

Remarque : 3 nucléotides supplémentaires ont été utilisés au début des sites de restriction pour assurer l'activité de l'enzyme.

d) Amorces utilisées pour amplifier le gène *cht-1* comme contrôle positif (chitinase de la famille 18)

	Amorces sens		Amorces antisens	
CHT-1	ATG CTA TTA GGC TTC CTT CTC	17	TTA TTT TGC ACA TTT TGA TGG	18

17) *cht-1*18) *cht-2*

D'autres amorces ont encore été utilisées pour les différentes vérifications (Tableau 4). Des sets d'amorces spécifiques à chacun des plasmides utilisés sont encore utilisés. Les amorces universelles M13 ont permis les différentes vérifications sur le plasmide pGEM-T (Promega), les amorces AOX, les vérifications sur le plasmide pPIC9K (Invitrogen) et les amorces pGEX, les vérifications sur le plasmide pGEX-3X (Amersham).

Tableau n 4 : Liste des amorces utilisées pour les différentes vérifications

	Plasmide pGEM-T
M13(-20)f	GTA AAA CGA CGG CCA GT
M13rev	GGA AAC AGC TAT GAC CAT G

	Plasmide pPIC9K
5'AOX1	GAC TGG TTC CAA TTG ACA AGC
3'AOX1	GGC AAA TGG CAT TCT GAC AT

	Plasmide pGEX-3X
pGEX5'	CCGGGA GCT GCA TGT GTC AGA A
pGEX3'	GGG CTG GCA AGC CAC GTT TGG TG

Les amorces spécifiques à l'insert permettent de vérifier la taille de l'insert ; les amorces spécifiques au vecteur permettent de vérifier l'intégration correcte de l'insert dans le vecteur (Fig. 17).

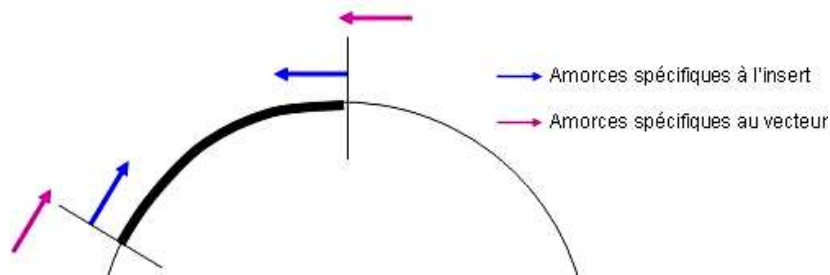


Fig. 17 : La PCR de vérification se fait avec les amorces spécifiques au vecteur pour confirmer la présence de l'insert en entier.

*Réaction de polymérisation en chaîne (Touchdown PCR)*

Un protocole de touchdown PCR a ici été appliqué pour l'amplification des gènes codant pour des chitinases de la famille 19 chez les différents nématodes en raison de leur faible représentation. Cette méthode permet une amplification spécifique de la séquence d'intérêt. La température d'hybridation des premiers cycles est en effet très haute puis abaissée progressivement pour assurer une meilleure efficacité.

L'amplification d'ADN s'est faite dans un volume final de 50  $\mu$ l contenant 0.2  $\mu$ M de chacune des amorces (sens et antisens) auquel 1  $\mu$ l d'ADN extrait (> 1  $\mu$ g) a été ajouté. Le contrôle positif contient les amorces spécifiques pour le gène *cht-1* (chitinase de la famille 18) alors que le contrôle négatif contient les amorces pour les chitinases de la famille 19 mais sans ADN. Cette réaction s'est faite à l'aide du kit commercial *Taq PCR Polymerase* (Qiagen) dans un thermocycleur (Primus 25-PCR Thermal cyclers, MWG-Biotech).

Programme utilisé : 3 minutes à 94°C

<b>5x</b>	{	30 secondes à 94°C		
	}	30 secondes à X°C		
		1 minute à 72°C	<i>où X = (Tm + 5°C) – 1°C à chaque cycle</i>	<b>X = 56°C</b>
<b>30x</b>	{	30 secondes à 94°C		
	}	30 secondes à Y°C		
		1 minute à 72°C	<i>où Y = Tm – 2°C</i>	<b>Y = 54°C</b>
		10 minutes à 72°C		

Les conditions de l'amplification ont été optimisées à l'aide de l'ADN de *C. elegans* qui devient alors le contrôle positif pour toutes les expériences suivantes d'identification des chitinases de la famille 19 avec l'ADN des vers parasites.

*Visualisation et isolation des produits PCR*

Tous les produits amplifiés ont été déposés sur gel d'agarose 1% contenant 1  $\mu$ l/ $\mu$ g de bromure d'éthidium (0.5 mg/ml) et après l'électrophorèse, visualisés sous UV. Les différentes photographies

ont été prises à l'aide de la caméra Kodak EDAS 290 et les images ont été traitées à l'aide du programme associé *Scientific imaging systems*, Kodak ID v.3.6.0.

Les bandes d'intérêt ont ensuite été découpées au scalpel et le kit *MinElute Gel Extraction kit* (Qiagen) a permis la purification des produits PCR.

#### *Ligation et clonage pour le séquençage des gènes*

La ligation a été effectuée entre le produit PCR purifié et le plasmide approprié. La réaction a été faite dans un volume final de 10  $\mu\text{l}$  (1  $\mu\text{l}$  d'ADN, 1  $\mu\text{l}$  de plasmide et 1  $\mu\text{l}$  de ligase T4). Une heure d'incubation à température ambiante est cependant nécessaire avant de poursuivre.

Le plasmide pGEM-T possède un T supplémentaire en 3' qui permet d'augmenter significativement l'efficacité de la ligation de l'insert dans le plasmide. Cet ajout empêche la recircularisation du plasmide et surtout fournit une extrémité compatible aux produits PCR générés par la Taq DNA polymérase. Une autre particularité du plasmide pGEM-T est qu'il contient une séquence codant pour un fragment  $\alpha$  de  $\beta$ -galactosidase. L'autre partie codant pour la  $\beta$ -galactosidase appelée fragment  $\omega$  est portée par le plasmide F' d'*E. coli*. Lorsque les deux fragments  $\alpha$  et  $\omega$  se retrouvent dans une même cellule, l'activité de la  $\beta$ -galactosidase est observée : c'est l' $\alpha$ -complémentation (principe de la sélection blanc-bleu).

#### *Transformation par choc thermique*

Les plasmides recombinants ont ensuite été introduits dans les cellules compétentes (DH5 $\alpha$ , JM109 et XL1-Blue MRF' pour les plasmides pGEM-T et pPIC9K et BL21 pour le plasmide pGEX-3X). Les transformants ont été identifiés par sélection génétique.

Cent microlitres de cellules compétentes ont été mélangés avec 3.5  $\mu\text{l}$  de plasmide recombinant et incubés sur la glace pendant 30 minutes. Après exactement 2 minutes de choc thermique à 42°C (bain-marie), les cellules ont à nouveau été incubées sur glace pendant 10 minutes avant d'être étalées sur des plaques de milieu Luria-Bertani (LB) solide contenant de l'ampicilline (concentration finale de 100  $\mu\text{M}$ ). Nouvelle incubation à 37°C toute la nuit.

#### *Isolation de l'ADN de plasmide (miniprep)*

Les colonies de bactéries obtenues ont alors été repiquées en culture individuelle liquide contenant de l'ampicilline (concentration finale de 50  $\mu\text{M}$ ) et incubées toute la nuit à 37°C avec agitation. L'ADN de

plasmide a ensuite été préparé à partir de 1.5 ml de chacune des cultures par lyse alcaline. L'ADN extrait a directement pu être utilisé aussi bien pour l'analyse par digestion à l'aide d'enzymes de restriction que pour le séquençage.

Le rendement final d'ADN est déterminé par le type de plasmide utilisé et la souche de bactérie.

### Séquençage

L'amplification d'ADN s'est faite dans un volume final de 30 µl contenant 1 µl d'ADN (miniprep) et 0.2 µM de chacune des amorces universelles (M13(-20)f et M13rev) avec le kit *Taq PCR polymerase* (Qiagen). Ces amorces ont été modifiées en 5' avec le chromophore IRD800. Le contrôle négatif a été préparé sans ADN mais avec les amorces.

Programme utilisé :

	2 minutes à 94°C
30x	{ 30 secondes à 94°C
	{ 30 secondes à 56°C
	{ 1 minute à 72°C
	10 minutes à 72°C

Le séquençage proprement dit a été réalisé à l'aide du kit *Thermo sequenase primer cycle sequencing kit* (Amersham Pharmacia Biotech Inc.) et le séquenceur automatique Li-Cor 4000L. Un second séquençage de confirmation a été demandé à Synergene Biotech GmbH (Schlieren, Suisse).

### Expression

#### Digestion

Les différentes enzymes de restriction ainsi que leurs tampons respectifs sont stockés à -20°C et sont utilisés en leur faisant subir le moins de décongélation possible.

Les inserts (ADN de nématode) une fois séquencés ont été ressortis du plasmide pGEM-T par digestion (*SnaBI* et *NotI* respectivement *SmaI*, *EcoRI* et *BamHI*). Les plasmides pPIC9K et pGEX-3X, utilisés pour l'expression, ont également subi une digestion.

La réaction de digestion a été préparée en mélangeant 2.5 µl de tampon, 0.25 µl d'albumine de sérum bovin (BSA) 100x, 1 µl d'enzyme de restriction appropriée ainsi que 8 µl d'ADN. Incubation d'une nuit à 37°C. La seconde enzyme a été ajoutée dans la même réaction de digestion pour autant qu'elle soit active à la même température et dans le même tampon.

#### *Stabilisation des constructions*

L'insert et le plasmide digérés ont alors été ligués, toujours dans un volume final de 10 µl (3 µl d'ADN, 1 µl de vecteur et 1 µl de ligase T4) avant d'être incubés une heure à température ambiante.

La nouvelle construction est ensuite insérée dans des bactéries afin d'être multipliée et d'éviter la dégradation de l'ADN.

#### *Expression avec le vecteur pPIC9K*

Le vecteur pPIC9K est fonctionnel dans les souches GS115 et KM71 de *P. pastoris* et contient un gène de résistance à la kanamycine pour le dépistage *in vivo* des inserts en copies multiples.

Une amplification de l'insert a alors été réalisée avec les amorces AOX1 (voir Tableau 2) avec un programme de 30 cycles et une température d'hybridation de 55°C.

Le nouveau vecteur transformé est alors introduit dans les levures par électroporation puis étalé sur plaque.

#### *Expression avec le vecteur pGEX-3X*

Le vecteur pGEX-3X permet de produire des protéines de fusion GST et est fonctionnel dans les bactéries *E. coli* BL21.

Une amplification de vérification a encore été faite avec les amorces pGEX (voir Tableau 2) dans un programme normal de 30 cycles (température d'hybridation de 58°C) afin de vérifier que le fragment de PCR digéré avec les enzymes adéquates a bien été intégré (par ligation) dans le plasmide pGEX-3X.

Le plasmide contenant l'insert a alors été introduit dans les bactéries par choc thermique. Les colonies obtenues ont été repiquées en culture liquide contenant de l'ampicilline (concentration finale 100 µM). L'induction d'expression des protéines de fusion se fait en ajoutant de l'IPTG (concentration finale de

0.1 mM) aux colonies en culture liquide. Incubation à 37°C avec agitation. Un aliquot a ensuite été récupéré toutes les heures pendant 4 heures pour la culture induite ainsi que pour le contrôle négatif sans IPTG. La visualisation de l'induction se fait sur gel d'acrylamide.

### Analyses bioinformatiques

Différentes séquences codant pour des chitinases chez *C. elegans*, *B. malayi* et *B. pahangi* ont été comparées pour évaluer la structure et les fonctions potentielles de ces gènes et protéines. Toutes les séquences codant pour des chitinases de *C. elegans* sont disponibles sur la base de données <http://www.wormbase.org>. Les séquences de *B. malayi* et *B. pahangi* sont retrouvées sur le site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> à l'aide de leur numéro d'accèsion.

L'analyse des séquences codant pour des chitinases de la famille 19 chez *C. elegans* a été réalisée à l'aide du programme PAUP\*4.0 qui permet la représentation des variations de séquences sous forme d'un arbre phylogénétique. Un alignement préalable des différentes séquences avec *Clustal X* est nécessaire. Chaque position est considérée comme un caractère potentiel. Cette représentation a l'avantage de minimiser la longueur de chaque branche pour les divergences de séquences et ainsi de livrer une représentation atemporelle des relations phylogénétiques puisque l'intérêt ici porte sur le taux de divergence des séquences codant pour des chitinases de la famille 19. La méthode Neighbor-Joining (NJ) donne un arbre non-enraciné tenant compte de la moyenne de divergence de chaque séquence. Chacune d'entre elles est comparée tour à tour avec chacune des autres séquences sans pour autant définir la représentation d'un ancêtre commun [85].

Le poids moléculaire des protéines ainsi que le point isoélectrique sont estimés à l'aide du programme disponible sur [http://us.expasy.org/tools/pi\\_tool.html](http://us.expasy.org/tools/pi_tool.html). A la suite de quoi, les différentes séquences ont été alignées à l'aide du programme *Clustal W*, mis à disposition par EMBL-EBI à l'adresse <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>. Les analyses théoriques s'appuient sur les niveaux d'organisation des protéines, tout d'abord sur la base de la structure primaire. Le profil d'hydrophobie des protéines a également été établi pour chacune des séquences à l'aide de l'algorithme de Kyte et Doolittle : [http://occawlonline.pearsoned.com/bookbind/pubbooks/bc\\_mcampbell\\_genomics\\_1/medialib/activites/kd/kyte-doolittle.htm](http://occawlonline.pearsoned.com/bookbind/pubbooks/bc_mcampbell_genomics_1/medialib/activites/kd/kyte-doolittle.htm).

Les interactions hydrophobe/hydrophile des acides aminés stabilisent la structure tertiaire des protéines. Les groupes hydrophiles sont polaires et interagissent avec l'eau alors que les groupes hydrophobes sont non polaires. L'hydrophobie des acides aminés détermine leur localisation potentielle dans la structure finale de la protéine. Un alignement des séquences de chitinases avec l'ensemble des protéines connues à ce jour est effectué sur le site <http://globplot.embl.de> qui a permis de mettre en évidence des fragments de séquences déjà connus. Les structures secondaires (hélice  $\alpha$  et feuillet  $\beta$ ) sont ici considérées comme des structures ordonnées. L'étude par globplot permet

surtout de prédire la structure des protéines entre les portions connues. La représentation graphique permet de visualiser la probabilité de désordre d'une protéine en fonction de chacune des positions des résidus qui composent la séquence. L'étape de visualisation à l'aide du programme RasMol (v.2.7) prédit les structures secondaires et tertiaires des protéines. Un fichier intermédiaire au format (.pdb) est nécessaire pour la visualisation de la protéine et la conversion est possible à l'adresse <http://www.genesilico.pl/meta/>.

**R  
E  
S  
U  
L  
T  
A  
T  
S**

## Résultats

### Gènes codant pour des chitinases de la famille 18 et 19 chez *C. elegans*

A l'aide du terme général « chitinase », pas moins de 40 gènes ont été trouvés dans la banque de données de Wormbase (<http://www.wormbase.org>) chez *C. elegans* parmi lesquels 34 semblent coder pour des chitinases de la famille 18 (Tableau 6).

Les gènes codant pour des chitinases de la famille 18 sont localisés sur l'ensemble des chromosomes, aussi bien le chromosome sexuel que les chromosomes autosomes à l'exception du chromosome I. Le gène *cht-1*, décrit par Azzouz [68] est le seul gène présent sur le chromosome X. La majorité des autres gènes sont localisés sur le chromosome II. Un gène se trouve sur le chromosome III, 4 gènes sur le chromosome IV et 2 gènes sur le chromosome V (Tableau 5).

**Tableau n°5 : Répartition chromosomique des 34 gènes de *C. elegans* codant pour des chitinases potentielles de la famille 18. En gras, le gène *cht-1* [68] (voir aussi tableau 6).**

<b>C04F6.3</b> <b>(<i>cht-1</i>)</b> <i>chromosome X</i>	T19H5.1 – 3 ( <i>cht-17</i> à <i>cht-19</i> ) <i>chromosome II</i>	C45E5.2 – 3 ( <i>cht-30</i> à <i>cht-31</i> ) <i>chromosome IV</i>
T10D4.3 ( <i>cht-2</i> ) <i>chromosome II</i>	ZK938.6 ( <i>cht-20</i> ) <i>chromosome II</i>	C25A8.4 ( <i>cht-32</i> ) <i>chromosome IV</i>
T13H5.3 ( <i>cht-3</i> ) <i>chromosome II</i>	C08H9.6 - 7 et 10 – 14 ( <i>cht-21</i> à <i>cht-27</i> ) <i>chromosome II</i>	K08F9.3 ( <i>cht-33</i> ) <i>chromosome V</i>
M176.8 ( <i>cht-4</i> ) <i>chromosome II</i>	F15A4.8 ( <i>cht-28</i> ) <i>chromosome II</i>	M01B2.6 ( <i>cht-34</i> ) <i>chromosome V</i>
R09D1.1 - 11 et 14 ( <i>cht-5</i> à <i>cht-16</i> ) <i>chromosome II</i>	Y22D7AL.14 ( <i>cht-29</i> ) <i>chromosome III</i>	

Les différents gènes sont rebaptisés en fonction de leur position sur les chromosomes, par analogie avec le premier gène de chitinase caractérisé chez *C. elegans*, *cht-1*. Les gènes codant pour des chitinases de la famille 18 sont donc nommés *cht-1* à *cht-34*. Le nombre d'introns, la position chromosomique exacte ainsi que la taille du gène, avant et après épissage, sont alors comparées (Tableau 6).

Les gènes codant pour des chitinases de la famille 18 forment un groupe relativement homogène au niveau de leur taille (généralement comprise entre 1200 et 2000 pb) ainsi qu'au niveau de leur position plutôt télomérique. Tous les gènes possèdent des introns dont le nombre varie entre un et quatorze. La position des gènes semble répartie en groupe principalement sur le chromosome II. En effet, un groupe contenant les 12 gènes *cht-5* à *cht-16* se situe entre 9.44 et 9.47 Mb immédiatement

suivi par le groupe composé des 3 gènes *cht-17* à *cht-19* situé entre 9.47 et 9.48 Mb. Un dernier groupe présent sur le chromosome II est composé des 7 gènes *cht-21* à *cht-27* et possède une localisation comprise entre 9.85 et 9.87 Mb. Le chromosome IV possède également un groupe composé des 2 gènes voisins *cht-30* et *cht-31* compris entre 5.73 et 5.74 Mb.

**Tableau n°6 :** Tableau récapitulatif des différents gènes codant pour des chitinases de la famille 18. La première colonne correspond à la nouvelle nomenclature définie ici et la seconde colonne reprend les numéros d'accèsion.

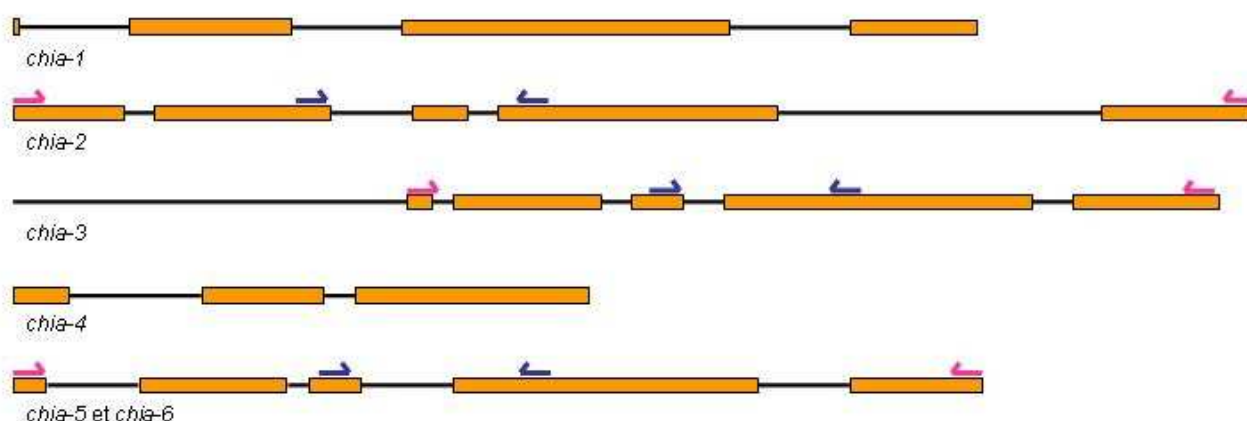
		Position chromosomique	Région non-épissée	Région épissée	# introns		
<i>cht-1</i>	C04F6.3	X:3400008-3397595 pb	2414 pb	1854 pb	3		
<i>cht-2</i>	T10D4.3	II:3129174-3131283 pb	2110 pb	1233 pb	2		
<i>cht-3</i>	T13H5.3	II:8520835-8523395 pb	2561 pb	1881 pb	8		
<i>cht-4</i>	M176.8	II:9438205-9436600 pb	1606 pb	1203 pb	4		
<i>cht-5</i>	R09D1	R09D1.1	II:9443535-9442081 pb	1455 pb	1299 pb	2	
<i>cht-6</i>		R09D1.2	II:9441851-9440354 pb	1498 pb	1323 pb	3	
<i>cht-7</i>		R09D1.3	II:9440073-9438524 pb	1550 pb	1308 pb	3	
<i>cht-8</i>		R09D1.4	II:9447618-9446003 pb	1616 pb	1233 pb	4	
<i>cht-9</i>		R09D1.5	II:9448189-9449582 pb	1394 pb	1290 pb	2	
<i>cht-10</i>		R09D1.6	II:9454197-9452614 pb	1584 pb	1335 pb	4	
<i>cht-11</i>		R09D1.7	II:9456530-9455330 pb	1201 pb	1110 pb	2	
<i>cht-12</i>		R09D1.8	II:9461885-9460041 pb	1845 pb	1341 pb	4	
<i>cht-13</i>		R09D1.9	II:9464006-9462450 pb	1557 pb	1272 pb	4	
<i>cht-14</i>		R09D1.10	II:9466108-9464449 pb	1659 pb	1353 pb	3	
<i>cht-15</i>		R09D1.11	II:9468385-9466873 pb	1512 pb	1299 pb	3	
<i>cht-16</i>		R09D1.14	II:9459475-9458934 pb	541 pb	453 pb	2	
<i>cht-17</i>		T19H5	T19H5.1	II:9474246-9472604 pb	4569 pb	2295 pb	3
<i>cht-18</i>			T19H5.2	II:9474968-9476208 pb	1241 pb	1077 pb	3
<i>cht-19</i>	T19H5.3		II:9477784-9479449 pb	1666 pb	1224 pb	5	
<i>cht-20</i>	ZK938.6	II:9845224-9843295 pb	1930 pb	1383 pb	3		
<i>cht-21</i>	C08H9	C08H9.6	II:9874517-9873179 pb	1339 pb	1185 pb	2	
<i>cht-22</i>		C08H9.7	II:9861382-9859699 pb	1684 pb	1344 pb	3	
<i>cht-23</i>		C08H9.10	II:9855605-9853908 pb	1698 pb	1374 pb	3	
<i>cht-24</i>		C08H9.11	II:9859546-9858025 pb	1522 pb	1380 pb	3	
<i>cht-25</i>		C08H9.12	II:9857772-9855851 pb	1922 pb	1383 pb	3	
<i>cht-26</i>		C08H9.13	II:9871087-9869371 pb	1717 pb	1380 pb	4	
<i>cht-27</i>		C08H9.14	II:9872901-9871523 pb	1379 pb	1200 pb	2	
<i>cht-28</i>		F15A4.8	II:12478825-12475246 pb	3580 pb	2268 pb	11	
<i>cht-29</i>	Y22D7AL.14	III:1657469-1653717 pb	3753 pb	795 pb	6		
<i>cht-30</i>	C45E5	C45E5.2	IV:5741437-5743995 pb	2559 pb	1410 pb	3	
<i>cht-31</i>		C45E5.3	IV:5739812-5740856 pb	1045 pb	801 pb	2	
<i>cht-32</i>	C25A8.4	IV:7003609-7009246 pb	5638 pb	3204 pb	14		
<i>cht-33</i>	K08F9.3	V:15142514-15143716 pb	1203 pb	894 pb	4		
<i>cht-34</i>	M01B2.6	V:15241390-15243749 pb	2360 pb	1353 pb	3		

Les 6 gènes restants sont tous des gènes codant pour des chitinases de la famille 19 (Tableau 7). Tous ces gènes se trouvent sur le chromosome V entre 6.42 et 13.98 Mb et aucun groupement de gènes n'est observé comme pour la famille 18. Ces 6 différents gènes de *C. elegans* ont été rebaptisés *chia-1* à *chia-6* par analogie avec les gènes de chitinases de la famille 19 trouvés chez les bactéries. Leur position chromosomique, la longueur du gène, avant et après épissage, ainsi que le nombre d'introns sont présentés dans le tableau 7.

**Tableau n°7 :** Tableau récapitulatif des différents gènes codant pour des chitinases de la famille 19. La première colonne reprend la nomenclature adoptée ici et la seconde colonne correspond aux numéros d'accession.

		Position chromosomique	Région non-épissée	Région épissée	# introns
<i>chia-1</i>	Y50D4A.3	V:1184546-1182636 pb	1911 pb	1224 pb	3
<i>chia-2</i>	T05H4.7	V:6417587-6420023 pb	2437 pb	1536 pb	4
<i>chia-3</i>	C08B6.4	V:10117346-10119894 pb	2400 pb	1344 pb	4
<i>chia-4</i>	C51E3.8	V:10148146-10146989 pb	1158 pb	819 pb	2
<i>chia-5</i>	R10D12.15	V:13972441-13970454 pb	1988 pb	1362 pb	4
<i>chia-6</i>	T26F2.1	V:13977151-13979138 pb	1988 pb	1362 pb	4

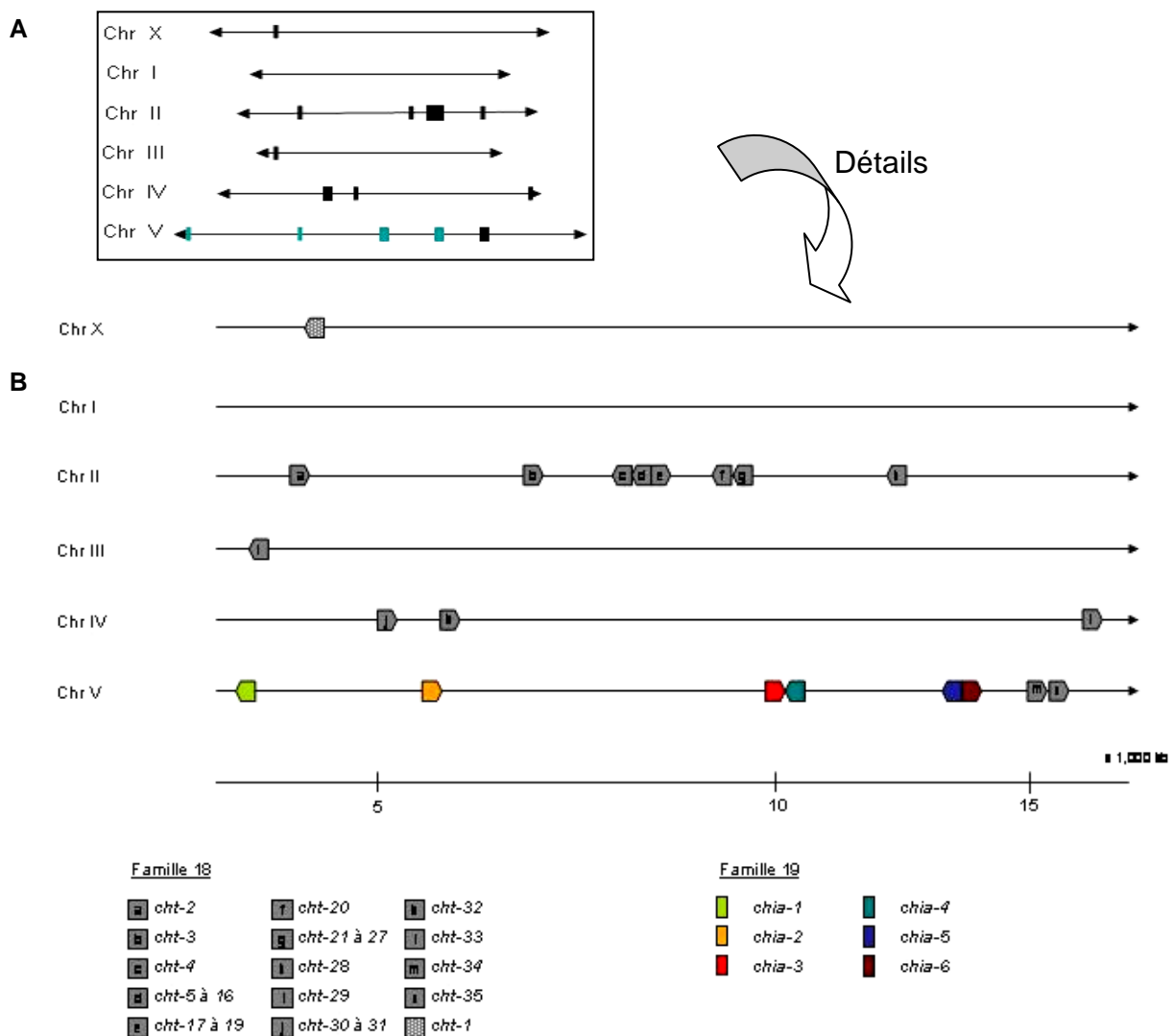
Les gènes codant pour des chitinases de la famille 19 forment un groupe homogène au niveau de leur taille entre 1200 et 1600 pb. Tous les gènes possèdent entre 2 et 4 introns et leur position semble plutôt centromérique (Fig. 18).



**Fig. 18 :** Représentation schématique des différents gènes codant pour les chitinases de la famille 19. Les exons sont représentés par les boîtes orange et les introns par les lignes. Les différents sets d'amorces utilisées sont également représentés : les sets magenta ont été utilisés pour isoler les gènes entiers et les sets bleus pour l'isolation des fragments.

La position ainsi que l'orientation (sens/antisens) sur les chromosomes de chacun de ces gènes de chitinase de la famille 18 et de la famille 19 sont représentées schématiquement sous la forme d'un diagramme (Fig. 19).

Tous les gènes présents sur le chromosome II ne démontrent pas la même orientation, en effet, *cht-2*, *cht-3*, *cht-17*, *cht-18* et *cht-19* se retrouvent dans l'orientation inverse des autres gènes (5 : 22). Sur le chromosome V, les gènes présentent également les 2 orientations. Les gènes de la famille 19 sont indifféremment en orientation sens/antisens (3 : 3).



**Fig. 19 :** Localisation des différents gènes codant pour des chitinases chez *C. elegans*. A) Les chromosomes sont représentés dans leur entier avec, pour les chitinases de la famille 18, les positions indiquées en noir et pour les chitinases de la famille 19, les positions indiquées en turquoise. B) Des fragments des 6 chromosomes (5 autosomes et 1 sexuel) sont schématisés : les différents gènes sont représentés selon leur orientation indiquée par les flèches.

**Documentation de l'expression des gènes de chitinase des familles 18 et 19 dans les différents stades de développement de *C. elegans***

Des micro-réseaux d'expression testés pour les chitinases sont disponibles sur <http://www.wormbase.org>. Les conditions expérimentales testées correspondent ici aux 8 stades distincts de développement de *C. elegans*, à savoir : (i) oocytes, (ii) embryon, (iii) larve L1, (iv) larve L2-L3, (v) larve L3-L4, (vi) larve L4 / adulte hermaphrodite précoce, (vii) adulte hermaphrodite mature et (viii) adulte hermaphrodite 7-10 jours post-L4.

Aucune expression n'est dominante pour les gènes codant pour des chitinases de la famille 18 (Tableau 8). Les gènes *cht-14* (Aff\_R09D1.10, Hill 2000) et *cht-15* (Aff\_R09D1.11, Hill 2000) sont détectés au stade embryonnaire alors qu'aucun autre gène ne donne de signal. Le gène *cht-14* est parfois décelable au stade larvaire L3-L4 alors que *cht-29* (Aff\_Y22D7AL.14, Hill 2000) est toujours présent. Une expression ponctuelle est également décelable au stade larvaire L4 / adulte hermaphrodite précoce pour les gènes *cht-22* (Aff\_C08H9.7, Hill 2000) et *cht-32* (Aff\_C25A8.4, Hill 2000). Le gène *cht-34* (Aff\_K08F9.3, Hill 2000) est toujours exprimé au stade adulte hermaphrodite mature et parfois *cht-14* et *cht-22*. Aucune expression n'est détectée pour les oocytes, larve L1, larve L2-L3 et adulte hermaphrodite 7-10 jours post-L4.

**Tableau n°8 :** Tableau récapitulatif de l'expression des chitinases des familles 18 présentes sur les chromosomes autosomes en fonction de 8 stades de développement définis.

	Famille 18 (autosome)	Famille 18 (sexuel)
Oocytes	-	<i>cht-1</i>
Embryon	<i>cht-14</i> / <i>cht-15</i>	<i>cht-1</i>
Larve L1	-	<i>cht-1</i>
Larve L2-L3	-	-
Larve L3-L4	<i>cht-14</i> / <i>cht-29</i>	-
Larve L4 / adulte hermaphrodite précoce	<i>cht-22</i> / <i>cht-32</i>	-
Adulte hermaphrodite mature	<i>cht-14</i> / <i>cht-22</i> <i>cht-34</i>	<i>cht-1</i>
Adulte hermaphrodite 7-10 j post-L4	-	<i>cht-1</i>

Sur l'ensemble des 35 gènes codant pour les chitinases de la famille 18, seul 6 gènes ont ainsi émis un signal d'expression pendant le développement de *C. elegans*.

Des micro-réseaux d'expression pour les chitinases de la famille 19 sont également disponibles à l'exception de *chia-1* et *chia-6*. L'expression des chitinases de la famille 19 (Tableau 9) est présente dans tous les stades de développement à l'exception des oocytes et du stade adulte hermaphrodite 7-10 jours post-L4. L'expression ne concerne cependant que 2 gènes, *chia-2* (Aff\_T05H4.7, Hill 2000) et *chia-3* (Aff\_C08B6.4, Hill 2000). Une expression est toujours décelable dans les embryons et parfois présente au stade larvaire L1 pour *chia-3*. Une manifestation est également parfois présente au stade L2-L3 pour *chia-2*. L'expression de *chia-2* et *chia-3* est toujours visible au stade larvaire L3-L4 ; parfois présence de *chia-3* au stade larve L4 / adulte hermaphrodite précoce et parfois également présence de *chia-2* au stade adulte hermaphrodite mature.

**Tableau n°9 :** Tableau récapitulatif de l'expression des chitinases des familles 19 présentes sur les chromosomes autosomes en fonction de 8 stades de développement définis.

	Famille 19
Oocytes	-
Embryon	<i>chia-3</i>
Larve L1	<i>chia-3</i>
Larve L2-L3	<i>chia-2</i>
Larve L3-L4	<i>chia-2</i> / <i>chia-3</i>
Larve L4 / adulte hermaphrodite précoce	<i>chia-3</i>
Adulte hermaphrodite mature	<i>chia-2</i>
Adulte hermaphrodite 7-10 j post-L4	-

De manière générale, l'analyse des micro-réseaux met en évidence la faible expression des gènes codant pour des chitinases durant le cycle de développement de *C. elegans*. En effet, sur les données disponibles pour 40 gènes codant pour des chitinases, famille 18 et famille 19 confondues, seul 8 gènes sont exprimés (Tableau 10). L'expression de ceux-ci couvre cependant l'ensemble des stades de développement du ver, des oocytes au stade adulte hermaphrodite 7-10 jours post-L4. Les chitinases de la famille 18 semblent être exprimées de manière ponctuelle (embryon, larve L3-L4, larve L4 / adulte hermaphrodite précoce et adulte hermaphrodite mature) alors que les chitinases de la famille 19 sont exprimées tout au long du cycle à l'exception des oocytes et du dernier stade de développement (adulte hermaphrodite 7-10 jours post-L4). La chitinase codée par le gène porté par le chromosome sexuel est quant à elle exprimée dans 5 des 8 stades de développement (oocytes, embryon, larve L1, adulte hermaphrodite mature et adulte hermaphrodite 7-10 jours post-L4).

**Tableau n°10 :** Tableau récapitulatif de l'expression des chitinases des familles 18 et 19 présentes sur les chromosomes, sexuel et autosomes, en fonction de 8 stades de développement définis. L'expression peut être non présente (NP), parfois présente (PP) ou toujours présente (TP). Les cases correspondant aux stades présentant une expression sont grisées et celles pour lesquelles aucune détection n'a été possible restent blanches.

	Famille 18 (autosome)	Famille 18 (sexuel : <i>cht-1</i> )	Famille 19
Oocytes	NP	TP	NP
Embryon	TP	TP	TP
Larve L1	NP	TP	PP
Larve L2-L3	NP	NP	PP
Larve L3-L4	PP ou TP	NP	TP
Larve L4 / adulte hermaphrodite précoce	PP	NP	PP
Adulte hermaphrodite mature	PP ou TP	PP	PP
Adulte hermaphrodite 7-10 j post-L4	NP	PP	NP

La présence et les caractéristiques des chitinases de la famille 19, si différentes des chitinases de la famille 18, forment l'intérêt de cette étude. Les gènes des chitinases de la famille 19 chez des animaux n'ont pas encore été étudiés en détails. Les bases de données de *C. elegans* révèlent quelques résultats bruts concernant la présence de ces gènes bien qu'aucune interprétation n'a été faite. Aucune donnée n'est disponible pour les vers parasites d'où la focalisation de cette étude sur cette famille des chitinases chez les nématodes de forme libre, entomopathogènes et parasites.

### **Caractéristiques des chitinases de la famille 19**

La longueur des séquences des chitinases de la famille 19 est comprise entre 407 et 511 acides aminés. La séquence *chia-4* ne comprend que 272 acides aminés mais cette séquence n'est pas complète. Les différentes données concernant la longueur de la protéine, son poids moléculaire ainsi que son point isoélectrique (pI) ont ainsi été rassemblées dans un même tableau (Tableau 11) pour en faciliter l'interprétation.

Tableau n°11 : Caractéristiques biochimiques des chitinases de la famille 19

	nbre d'acides aminés	Taille de la protéine	pI
<i>chia-1</i>	407 aa	45.3 kDa	8.37
<i>chia-2</i>	511 aa	57.9 kDa	6.73
<i>chia-3</i>	447 aa	49.6 kDa	4.76
<i>chia-4</i>	272 aa	30.9 kDa	8.84
<i>chia-5</i>	453 aa	50.2 kDa	6.00
<i>chia-6</i>	453 aa	50.2 kDa	6.00

Le poids moléculaire calculé des chitinases de la famille 19 est relativement homogène compris entre 45.3 et 57.9 kDa. *chia-4*, séquence en acides aminés incomplète, possède également le poids moléculaire le plus petit avec 30.9 kDa. Le point isoélectrique (pI) est variable avec des valeurs comprises entre 4.76 pour *chia-3* et 8.84 pour *chia-4*. Il existe donc à l'intérieur des chitinases de la famille 19 des isoenzymes acides (pI < 7.0 comme *chia-2*, *chia-3*, *chia-5* et *chia-6*) et des isoformes basiques (pI > 7.0 comme *chia-1* et *chia-4*). La valeur obtenue pour *chia-4* est encore une fois incertaine puisque liée à sa séquence incomplète.

### Identification des différents gènes ou fragments de gènes codant pour des chitinases de la famille 19 dans le génome de *C. elegans*

Sur la base des alignements, le gène *chia-1* ne présente pas le site catalytique (QET et E) spécifique aux séquences de chitinases de la famille 19. Le gène codant pour *chia-4*, trop court et le gène codant pour *chia-6* (identique en tous points avec le gène *chia-5*), ne seront pas pris en considération. De plus, l'information disponible des micro-réseaux de ces 3 gènes *chia-1*, *chia-4* et *chia-6* codant pour des chitinases de la famille 19 ne démontre aucune expression lors du développement de *C. elegans*. Seuls les gènes *chia-2*, *chia-3* et *chia-5* seront donc étudiés par la suite.

Des amorces spécifiques (CEchia2.1-2, CEchia3.1-2 et CEchia5.1-2) pour les gènes entiers codant pour des chitinases de la famille 19 ont été dessinées sur la région codante au début de la région 5' ainsi que sur la région N-terminale 3' de chacun de ces 3 gènes (Fig. 1).

La réaction PCR a été effectuée sur de l'ADNg de *C. elegans* var. N2 afin de confirmer la présence de ces 3 gènes. La PCR amplifie des fragments aux alentours de 2000 pb, ce qui correspond à la séquence codante entière des gènes de chitinases de la famille 19 prédits (Fig. 20). Un signal est obtenu pour les 3 gènes. Le contrôle positif est défini à l'aide d'amorces spécifiques (Cht-1 et Cht-2) pour le gène déjà caractérisé *cht-1* qui possède une taille de 2219 pb (séquence non-épissée). Le premier gène potentiel *chia-2* possède une taille théorique de 2437 pb, le second *chia-3* est attendu à 2400 pb et le dernier gène *chia-5* a une taille de 1988 pb, valeurs auxquelles il faut ajouter la taille des amorces. Après l'amplification, une bande distincte est obtenue pour chacun des gènes recherchés *chia-2*, *chia-3* et *chia-5*, bien qu'avec une taille inférieure à celle prédite.

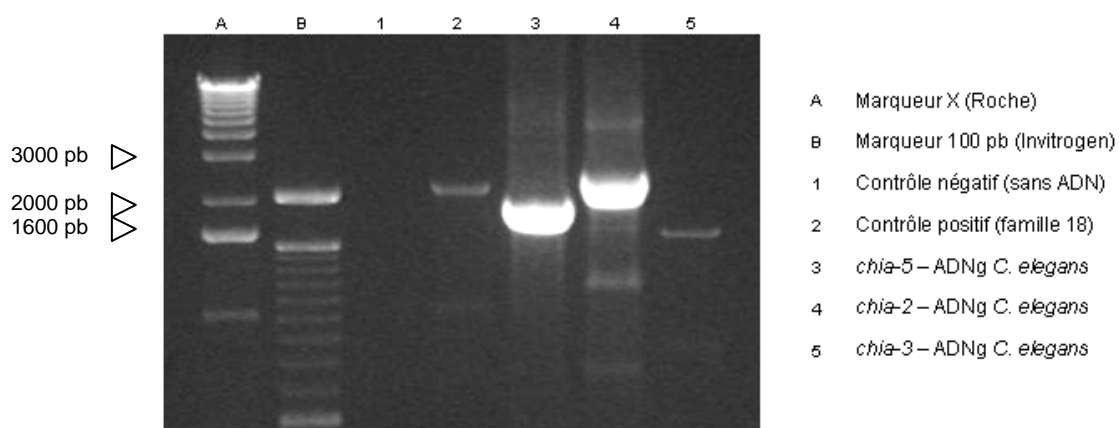
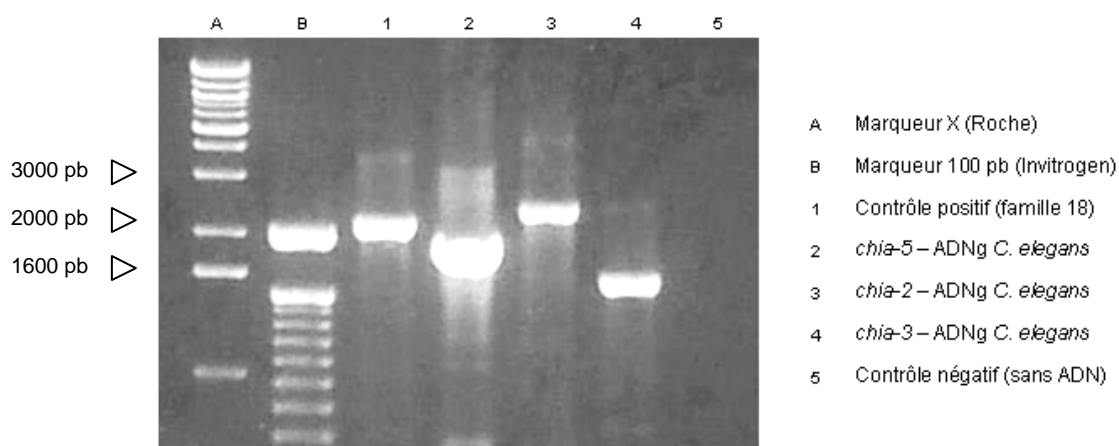


Fig. 20 : Amplification par PCR des gènes entiers codant pour les chitinases de la famille 19. Les amorces utilisées ne possèdent aucun site de restriction. Le contrôle positif est ici *cht-1*, gène de chitinase de la famille 18.

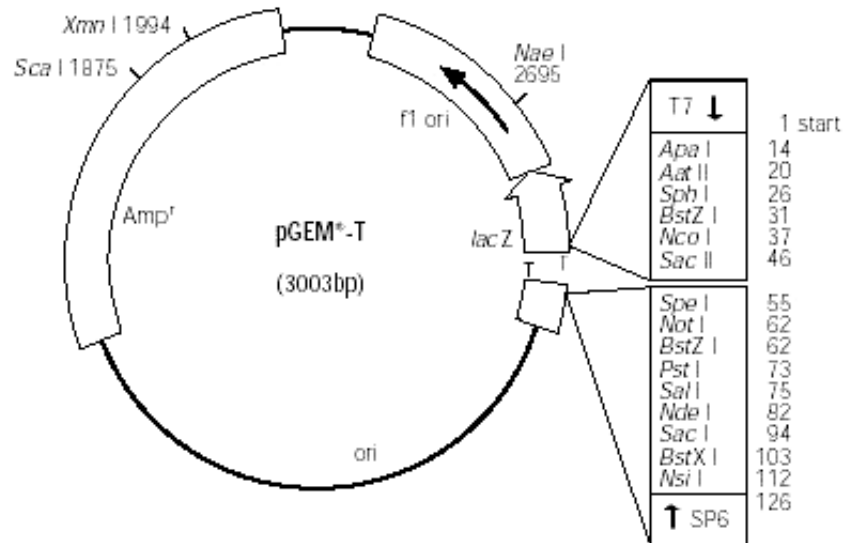
La température théorique d'hybridation des amorces, pour l'isolation des 3 gènes codant pour les chitinases *chia-2*, *chia-3* et *chia-5* est calculée à 47°C. Le gradient de température de la touchdown PCR est calculé théoriquement à 42° - 52°C. Différentes réactions PCR à gradient de température ont permis d'ajuster le gradient optimal pour la touchdown PCR à 54° - 56°C. L'intensité du signal des différentes bandes amplifiées est ainsi plus homogène et uniforme (Fig. 21). Une bande unique est obtenue pour chacun des gènes amplifiés. Afin que les amplicons soient compatibles avec le plasmide d'expression pPIC9K spécifique aux levures, 2 sites de restriction – *SnaB I* et *Not I* – sont ajoutés à chacune des amorces (CEchia-2.1-2.res, CEchia3.1-2.res et CEchia5.1-2.res) pour chacun des gènes codant pour des chitinases de la famille 19.



**Fig. 21 : Amplification par PCR des gènes entiers codant pour les chitinases de la famille 19 après ajustement du gradient de température à 54° - 56°C. Les amorces utilisées possèdent les sites de restriction *SnaB I* et *Not I*.**

Pour permettre le séquençage des bandes amplifiées par PCR contenant les sites de restriction, le vecteur pGEM-T est utilisé (Fig. 22).

Après purification des bandes amplifiées et ligation avec les plasmides, une transformation des bactéries *E. coli* XL1 Blue MRF' a eu lieu par choc thermique. L'ADN plasmidique de chacune des colonies obtenues a été extrait et déposé sur gel d'agarose. L'ADN des colonies de bactéries présentant un profil d'une taille plus grande que 2000 bp (ADN circulaire), sont alors sélectionnées puis analysées (Fig. 23). Treize colonies ont été obtenues après transformation avec le plasmide contenant potentiellement le fragment amplifié avec les amorces spécifiques pour le gène *chia-2*. Une vérification par PCR du plasmide intégré a montré que 4 colonies ont été transformées avec le plasmide contenant l'insert *chia-2*. Seize colonies ont également été obtenues suite aux transformations avec le plasmide *chia-5*. Dix-neuf colonies ont encore été obtenues après transformation avec *chia-3* et 10 colonies ont été sélectionnées.



pGEM-T 5' CGTCCATTTCGCCATTTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTC 2880  
3' GCAGGTAAGCGGTAAGTCCGACGCGTTGACAACCCTTCCCGCTAGCCACGCCCGGAGAAG

pGEM-T 5' GCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCC 2940  
3' CGATAATGCGGTCGACCGCTTTCCTTACACGACGTTCCGCTAATTC AACCCATTGCGG

pGEM-T 5' AGGGTTTTCCAGTCACGACGTT**GTAAACGACGGCCAGT**GAAATTGTAATACGACTCACT 3000  
3' TCCCAAAGGGTCAGTGCTGCA**CAATTTGCTGCGGTCAC**TTAACATATATGCTGAGTGA  
M13 (-20) f \*\*\*\*\*

pGEM-T 5' ATA 3003  
3' TAT

Insertion du fragment  
▽

pGEM-T 5' GGGCGAATTGGGCCGACGTCGCATGCTCCCGCCGCCATGGCCGCGGATT- ATCACTAGT 60  
3' CCCGCTTAACCGGGCTGCAGCGTACGAGGGCCGGGTACCGGCCCTA -TTAGTGATCA

pGEM-T 5' GCGGCCGCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGA 120  
3' CGCCGCGGACGTCAGCTGGTATACCTCTCGAGGGTTGCGCAACCTACGTATCGAACT

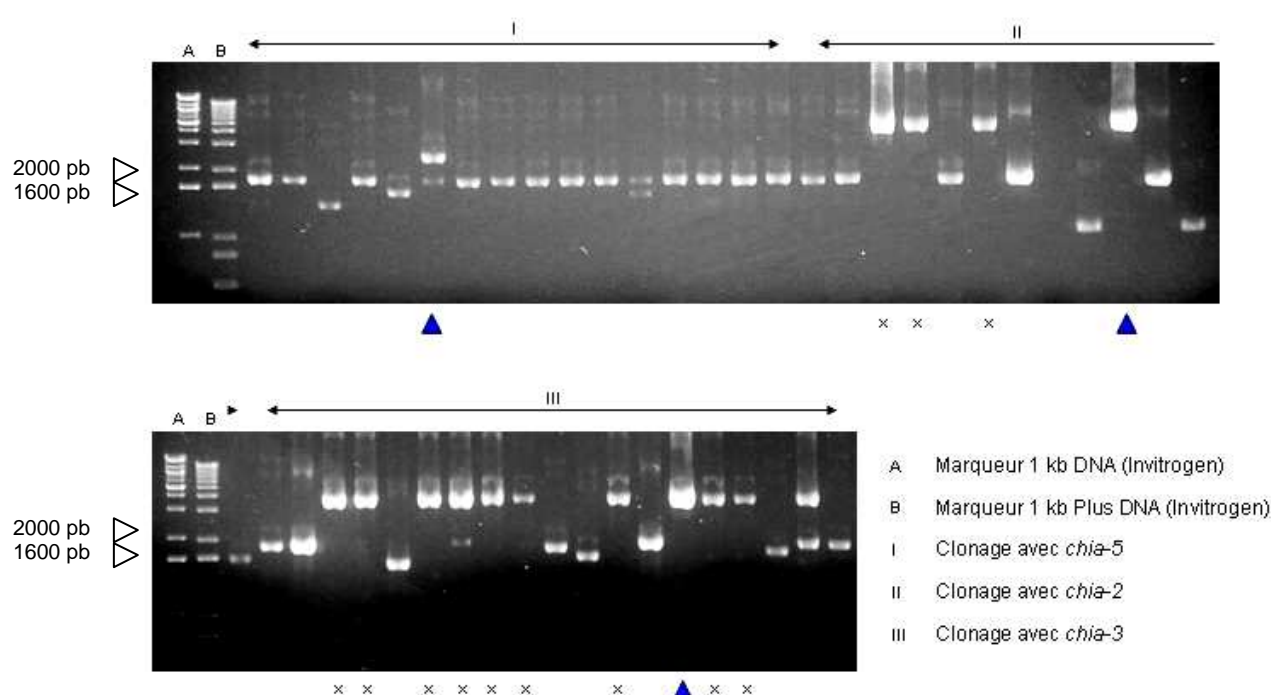
pGEM-T 5' GTATTCTATAGTGTACCTAAATAGCTTGGCGTAAT**CATGGTCATAGCTGTTTCC**TGTGT 180  
3' CATAAGATATCACAGTGGATTATCGAACCGCATTAG**TACCAGTATCGACA**AAGGACACA  
M13rev \*\*\*\*\*

pGEM-T 5' GAAATTGTTATCCGCTCACAATTCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAG 240  
3' CTTTAAACAATAGGCGAGTGTAAAGTGTGTTGATGCTCGGCCTTCGTATTTACATTTTC

Fig. 22 : Carte du plasmide pGEM-T utilisé pour les différentes constructions avant le séquençage. Les positions des amorces universelles M13 sont indiquées par des astérisques le long de la séquence du vecteur pGEM-T.

Une étape supplémentaire de vérification par PCR avec les amorces universelles (M13(-20)f et M13rev) spécifiques au vecteur pGEM-T a été effectuée sur ces différentes colonies sélectionnées afin de vérifier la présence de l'insert entier. Une seule colonie par transformation a ensuite été choisie parmi les candidats pour le séquençage.

Le séquençage a été effectué par un séquenceur automatique pour porter la limite de lecture à environ 600 pb, celle-ci étant fortement dépendante de la quantité d'ADN par échantillon (miniprep). Le séquençage a été effectué à partir de chacune des extrémités de chacun des gènes, la totalité du gène ne pouvant cependant pas être couverte par la lecture car la taille de la séquence de ces gènes est comprise entre 2.0 et 2.5 kpb.



**Fig. 23 :** Contrôle de l'insertion du plasmide dans les colonies transformées avec les inserts correspondants aux 3 gènes *chia-2*, *chia-3* et *chia-5*. Les échantillons présentant une taille plus grande que 5000 pb (croix noire et triangle bleu) ont tous été analysés et une colonie par transformation a été choisie pour le séquençage (triangle bleu).

Une portion interne du gène n'a donc pas pu être vérifiée par le séquençage (Fig. 24). En cas de correspondance des séquences nucléotidiques des 2 extrémités, il a été admis que la portion interne des nucléotides, non-séquencée, correspond également à la séquence du gène.

L'alignement de la séquence de la miniprep de *chia-2* avec le génome de *C. elegans* a confirmé la présence et l'identité du gène *chia-2* codant potentiellement pour une chitinase de la famille 19 (voir Annexes I). Le séquençage a permis la lecture d'environ 600 pb pour chacune des amorces

(sens/antisens). Une seule base a visiblement été substituée (A par C) pour le séquençage sens. Une base également a été mutée par duplication (G) dans une région aux limites de la fiabilité de lecture. La position de cette dernière mutation, après plus de 600 pb séquencées, ne peut ainsi être prise en considération.



**Fig. 24 : Limite des capacités de lecture par un séquenceur automatique**  
Représentation schématique du gène entier (boîte noire) inséré dans le plasmide. Le séquençage se fait à partir de chacune des extrémités (flèches violettes).

L'alignement de la séquence de la miniprep de *chia-3* (voir Annexes I) avec le génome de *C. elegans* a mis en évidence le gène *chia-3* codant potentiellement pour une chitinase de la famille 19. Le séquençage a permis la lecture d'un peu moins de 800 pb pour l'amorce antisens. Deux bases ont visiblement été substituées (A par G et T par C).

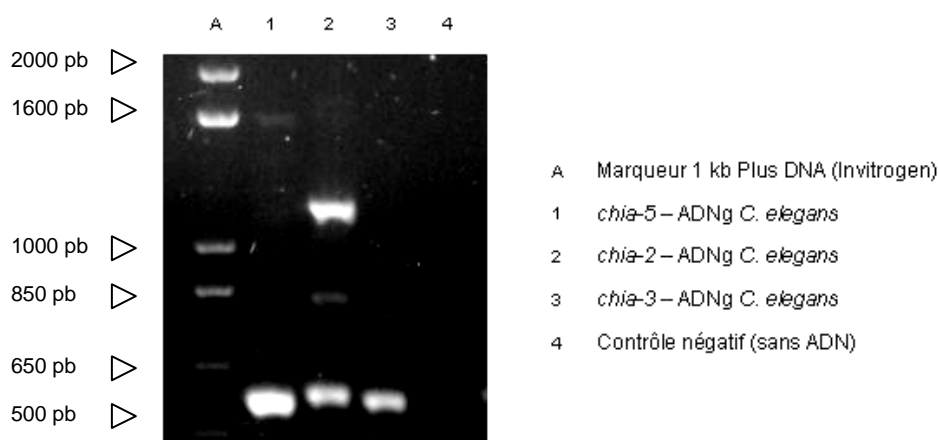
La quantité d'ADN provenant des échantillons étant très variable, tous n'ont pas pu être séquencés. La réaction de séquençage n'a ainsi pas été possible pour les minipreps de *chia-3* (sens) ainsi que de *chia-5* (sens et antisens).

A ce moment-là de la recherche, des réactions de reverse transcriptase PCR (RT-PCR) pour les gènes de chitinase de la famille 19 ont été testées. Des extractions d'ARN ont été suivies d'une réaction PCR. Aucun signal n'a cependant été obtenu. Afin d'éviter les risques de contamination par RNase, de nouvelles RT-PCR ont alors été effectuées mais cette fois, réaction en une étape. Malgré ces précautions, aucun résultat n'a été obtenu pour ce deuxième essai. Les expériences d'expression des chitinases de la famille 19 chez *C. elegans* (Wormbase) ayant démontré que seul 2 gènes sont détectables laissent penser qu'il n'y a que peu de chance de retrouver ces gènes dans l'ARN extrait ou dans une quelconque banque d'ADN complémentaire (ADNc). Le but du travail futur se déroulera ainsi avec l'ADNg des principaux vers étudiés pour lesquels aucune banque d'ADNc n'est disponible, à l'exception de *B. pahangi*. Afin de reproduire les mêmes conditions de travail pour chacun des nématodes testés, les expériences avec *C. elegans* sont également volontairement faites sur de l'ADNg.

La taille des gènes entiers comprise entre 2.0 – 2.5 kpb augmente les temps d'hybridation et d'élongation des réactions PCR ainsi que les risques d'erreurs lors de l'amplification. Pour minimiser ces risques, de nouvelles amorces sont utilisées afin de n'amplifier qu'une région conservée et spécifique commune aux 3 gènes afin de démontrer la présence des chitinases de la famille 19. Le site catalytique des chitinases de la famille 19 étant composé de 2 régions QET et E se trouvant sur 2 régions codantes distinctes séparées, les amorces sont ici dessinées sur cette région conservée présentant un intron en son centre.

Par souci de compatibilité entre les fragments amplifiés et les vecteurs utilisés dans les prochaines étapes des expériences, des sites de restriction – *Bam*HI, *Eco*RI et *Sma*I – sont ajoutés aux amorces (CEfrachia2res, CEfrachia3/5res, CEfrachia2/3res et CEfrachia5res). Le nouveau fragment amplifié (gène non-épissé) contient à présent entre 450 et 600 pb pour chacun des gènes, très exactement 571 pb pour *chia-2*, 445 pb pour *chia-3* et 557 pb pour *chia-5*. Des amorces génériques ont été dessinées dans la mesure du possible (Fig. 18).

Les nouvelles amorces ont été testées sur l'ADNg de *C. elegans* var. N2 dans les mêmes conditions que précédemment pour le gène entier, avec un programme touchdown PCR 54°- 56°C (Fig. 25).

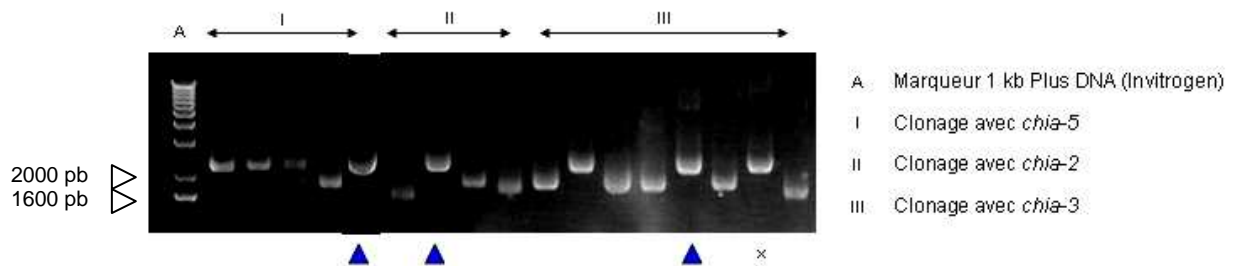


**Fig. 25 : Amplification par PCR des fragments de gènes codant pour des chitinases de la famille 19 chez *C. elegans* (à partir de l'ADN génomique). Les amorces utilisées possèdent les sites de restriction *Bam*HI, *Eco*RI et *Sma*I.**

Une bande à environ 600 pb est obtenue pour chacun des gènes correspondant au profil prédit, à l'exception de *chia-3* pour lequel une bande plus petite était attendue. Deux bandes supplémentaires ont été amplifiées pour *chia-2*, faiblement à 850 pb environ et une autre d'intensité égale au signal attendu à un peu plus de 1000 pb. Une autre bande est obtenue plus faiblement à 1500 pb pour *chia-*

5. Les bandes correspondant aux fragments attendus de 600 pb sont alors découpées, purifiées et sous-clonées dans le vecteur pGEM-T en vue du séquençage.

Le fragment amplifié et purifié a ensuite été ligué avec le vecteur pGEM-T, avant de transformer les bactéries par choc thermique. L'ADN plasmidique des colonies transformées a été extrait, déposé sur gel d'agarose avant de sélectionner les candidats au séquençage (Fig. 26). Les transformations avec *chia-2* ont donné 4 colonies parmi lesquelles une seule a présenté le profil attendu. Les transformations avec *chia-3* ont donné 8 colonies et une seule colonie a été sélectionnée bien que 2 colonies présentaient une intégration d'ADN. Cinq colonies ont également été obtenues pour la transformation avec *chia-5* et une seule colonie laisse penser qu'elle est transformée. Ces 3 colonies ont été sélectionnées pour le séquençage. La procédure appliquée a été la même que pour l'isolation du gène entier. La présence de l'insert a ensuite été vérifiée par PCR avec les amorces universelles (M13(-20)f et M13rev) pour les 3 candidats, chacun pour un gène codant pour une chitinase différente de la famille 19 (*chia-2*, *chia-3* et *chia-5*).



**Fig. 26 :** Contrôle de l'insertion du fragment dans les plasmides. Les colonies présentant le profil attendu (croix noire et triangle bleu) ont toutes été analysées et le plasmide correspondant a été choisi pour le séquençage (triangle bleu).

Le séquençage des fragments permet un séquençage complet de l'ADN intégré par un séquenceur automatique.

Alignement après séquençage

Fragment *chia-2*

```

Miniprep: 648  CACCCCGGGAAGAGAGATGTAGCTACATTTTTTGCACACGCTTTGCAGGAGACTGGTGAAAATGATGCA 629
                |||
Wormbase:      5447  AAGAGAGATGTAGCTACATTTTTTGCACACGCTTTGCAGGAGACTGGTGAAAATGATGCA 5482
    
```

Miniprep:	628	AGTGTTTATAAGTGAGTTATAAAGATCTTAGTGGAGATCCAGGTTTTGTAGTTTTTTT -	569
Wormbase:	5483	AGTGTTTATAAGTGAGTTATAAAGATCTTAGTGGAGATCCAGGTTTTGTAGTTTTTTT T	5542
Miniprep:	5568	AGTTGATTCATATTACCAAATTCAGAAGAACTGAACTGAGACCTTTTCAAAGAAATGCA	510
Wormbase:	5543	AGTTGATTCATATTACCAAATTCAGAAGAACTGAACTGAGACCTTTTCAAAGAAATGCA	5602
Miniprep:	509	CTGTCCTTTATATAGACGTCCCATAGAAAATAAAGTATTAATATTTCCAGTAATACCGAT	450
Wormbase:	5603	CTGTCCTTTATATAGACGTCCCATAGAAAATAAAGTATTAATATTTCCAGTAATACCGAT	5662
Miniprep:	424	ATAACACTTGAACAAGCTCACGAGTGCTTCTATCGTGGCGGATTCTATAATTGGTTTGAA	365
Wormbase:	5663	CTAACACTTGAACAAGCTCACGAGTGCTTCTATCGTGGCGGATTCTATAATTGGTTTGAA	5722
Miniprep:	364	CGTGGACCAAACCTACATTCCTTTCTCCAGCAGCTCCAGGTATCCAATCTTACTTTTC	305
Wormbase:	5723	CGTGGACCAAACCTACATTCCTTTCTCCAGCAGCTCCAGGTATCCAATCTTACTTTTC	5782
Miniprep:	304	TTAAAATGAGTTTAAACCTGATATTTTCAGGATTCCTCCATTTGATGGTAAAAGATGTAC	245
Wormbase:	5783	TTAAAATGAGTTTAAACCTGATATTTTCAGGATTCCTCCATTTGATGGTAAAAGATGTAC	5842
Miniprep:	244	TGACGAGGGAAGATACTGCAAGTCGGATCCGATTATTGATTTTTGGTATCCATGTAATC	185
Wormbase:	5843	TGACGAGGGAAGATACTGCAAGTCGGATCCGATTATTGATTTTTGGTATCCATGTAATC	5902
Miniprep:	184	AGATATCGAATCACATTCTGACAAAGAATATCATAAAGGATGTTATTTTCGACGAGGTGC	125
Wormbase:	5903	AGATATCGAATCACATTCTGACAAAGAATATCATAAAGGATGTTATTTTCGACGAGGTGC	5962
Miniprep:	99	TCTCCAACCTTCTGGAAC <b>TACAAC</b> TATGGAGAATTCAGC 60	
Wormbase:	5971	TCTCCAACCTTCTGGAAC <b>TACAAC</b> TATGG 6017	

Fragment du gène *chia-3*

Miniprep:	68	<b>CACCCCGGAAAAGAGACTTGGC</b> GGCTTTCTTTGCCACGCTGTTCAAGAACTGGAGAGAACAACAT	127
Wormbase:	14738	GAAAAGAGACTTGGCGGCTTTCTTTGCCACGCTGTTCAAGAACTGGAGAGAACAACAT	14797
Miniprep:	128	TGCTCTATATGAGTAAGTGCAATTTTTGCTTTATTGTGTATTGTAAACTTTGAAAATAAT	187
Wormbase:	14798	TGCTCTATATGAGTAAGTGCAATTTTTGCTTTATTGTGTATTGTAAACTTTGAAAATAAT	14857
Miniprep:	188	CTTTTGGTCAAGTTAGAACCATATAGGAAAATCACATTTCCAGCACACTTCCGATCAAG	247
Wormbase:	14858	CTTTTGGTCAAGTTAGAACCATATAGGAAAATCACATTTCCAGCACACTTCCGATCAAG	14917
Miniprep:	248	ATGCTTCAAACCTGTTTCTACCGTGGAGGATTTTATAACTGGTTTGAAGGAGGACCAACAA	307
Wormbase:	14918	ATGCTTCAAACCTGTTTCTACCGTGGAGGATTTTATAACTGGTTTGAAGGAGGACCAACAA	14977
Miniprep:	308	GTAGCTTTTTGGATCCTAAAACCTCTGGTTATACTCCAGCCGACGAAATTCATGTGCAT	367
Wormbase:	14978	GTAGCTTTTTGGATCCTAAAACCTCTGGTTATACTCCAGCCGACGAAATTCATGTGCAT	15037
Miniprep:	368	CTGCTGGTCTTTATTGTTCTGCTTCTGATCAAATAACTTATTTCTATCCATGCTCAAATT	427
Wormbase:	15038	CTGCTGGTCTTTATTGTTCTGCTTCTGATCAAATAACTTATTTCTATCCATGCTCAAATT	15097
Miniprep:	428	CAACAATTTCAAATACTGCTGCTCCATATAAAGGATGTTATTTTGGACGTGGAGCCATAC	487
Wormbase:	15098	CAACAATTTCAAATACTGCTGCTCCATATAAAGGATGTTATTTTGGACGTGGAGCCATAC	15157
Miniprep:	488	AAATTTCTGTACAA <b>TACAAC</b> TACGGAGGATCCA 520	
Wormbase:	15158	AAATTTCTGTACAA <b>TACAAC</b> TACGGA 15183	

Fragment du gène *chia-5*

```

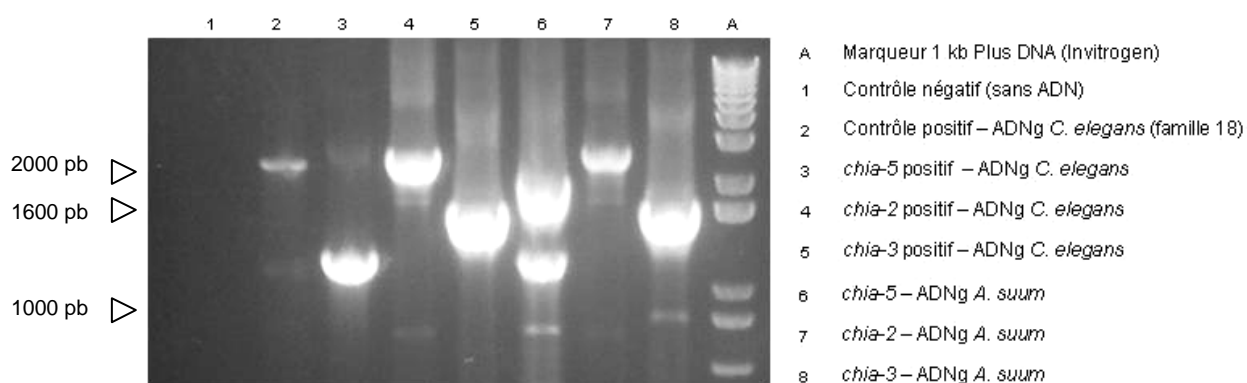
Miniprep: 60  CACCCCGGGAACGAGATTTGGCTGCCTTCTTTGCCCATGCAATTCAAGAAACTGGAGAAAACAACAAC 128
                |||
Wormbase: 6583 AAACGAGATTTGGCTGCCTTCTTTGCCCATGCAATTCAAGAAACTGGAGAAAACAACAAC 6642
                |||
Miniprep: 129  TATCTTTATACGTAAGTTTTATATAGTTAAAGATGGAGTACTGTATCGTCCGTAGAGATT 188
                |||
Wormbase: 6643 TATCTTTATACGTAAGTTTTATATAGTTAAAGATGGAGTACTGTATCGTCCGTAGAGATT 6702
                |||
Miniprep: 189  TTACTGCAAATGAAATCAAACGTGTTGAAATTGCCAAATAAACTCTTACTTCTAGAAAA 248
                |||
Wormbase: 6703 TTACTGCAAATGAAATCAAACGTGTTGAAATTGCCAAATAAACTCTTACTTCTAGAAAA 6762
                |||
Miniprep: 249  AATACTAAATTTTGTATATTTTTTTCCTTTAAAACTTTAGAACAGTTTTACGAATTTCT 308
                |||
Wormbase: 6763 AATACTAAATTTTGTATATTTTTTTCCTTTAAAACTTTAGAACAGTTTTACGAATTTCT 6822
                |||
Miniprep: 309  TAGGGTAACATTTAGTCATGACAATAATTTCCAGCGCGCTTCCCGATCAAGAGGCATCCA 368
                |||
Wormbase: 6823 TAGGGTAACATTTAGTCATGACAATAATTTCCAGCGCGCTTCCCGATCAAGAGGCATCCA 6882
                |||
Miniprep: 369  ATTGTTTCTACCGCGGAGGATTTTATAACTGGTTTGAAGGTGGACCGTCAAGTAACTTTT 428
                |||
Wormbase: 6883 ATTGTTTCTACCGCGGAGGATTTTATAACTGGTTTGAAGGTGGACCGTCAAGTAACTTTT 6942
                |||
Miniprep: 429  TAAACCCAGAAACACCTGGTCACTCTCCAAGTATGAAATTCATGTACATCTGCTGGTC 488
                |||
Wormbase: 6943 TAAACCCAGAAACACCTGGTCACTCTCCAAGTATGAAATTCATGTACATCTGCTGGTC 7002
                |||
Miniprep: 489  GTTACTGTTCTGCTTCTGATCAGATTACCTTTTTCTATCCCTGCTCCAATTCAACAATTT 548
                |||
Wormbase: 7003 GTTACTGTTCTGCTTCTGATCAGATTACCTTTTTCTATCCCTGCTCCAATTCAACAATTT 7062
                |||
Miniprep: 549  CAAACCTGCTGCTCCATATAAAGGATGCTATTTTGAAGAGGAGGAATTCAAATTCGT 608
                |||
Wormbase: 7063 CAAACCTGCTGCTCCATATAAAGGATGCTATTTTGAAGAGGAGGAATTCAAATTCGT 7122
                |||
Miniprep: 609  ATAACTACAACTACGGGGGATCCA 632
                |||
Wormbase: 7123 ATAACTACAACTACGGG 7139

```

L'alignement des 3 différentes séquences de minipreps avec le génome de *C. elegans* a permis de mettre en évidence les 3 gènes codant potentiellement pour des chitinases de la famille 19, à savoir *chia-2*, *chia-3* et *chia-5*. Le séquençage a permis la lecture de l'ensemble des fragments des gènes et aucune modification n'a visiblement eu lieu.

**Identification des différents gènes codant pour des chitinases de la famille 19 chez *A. suum***

La présence des gènes codant pour des chitinases de la famille 19 a également été étudiée chez *A. suum* (Fig. 27). La réaction PCR a été effectuée sur l'ADN génomique dans les mêmes conditions que pour *C. elegans* (touchdown PCR 54° - 56°C, Fig. 4) avec les amorces spécifiques (CEchia2.1-2, CEchia3.1-2 et CEchia5.1-2) pour identifier le gène entier.



**Fig. 27 : Amplification par PCR des gènes codant pour des chitinases de la famille 19 chez *A. suum*. Les amorces utilisées possèdent les sites de restriction *SnaB I* et *Not I*.**

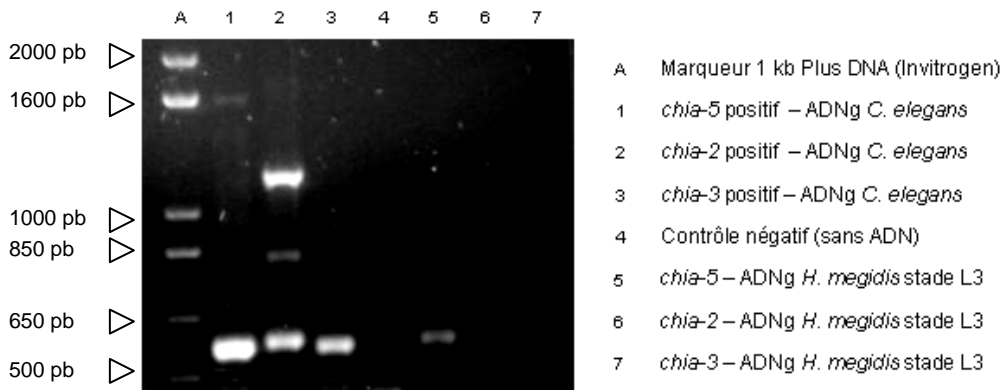
*A. suum* possède également les gènes correspondant à *chia-2*, *chia-3* et *chia-5* codant pour des chitinases de la famille 19 puisqu'un signal apparaît pour chacun des gènes testés. Les bandes obtenues présentent la même taille que celle obtenue chez *C. elegans* à l'exception de deux bandes supplémentaires pour *chia-5*.

Vu qu'à ce moment de la recherche un gène codant pour une chitinase de la famille 19 de *A. suum* (numéro d'accèsion AF395836) a été publiée, le séquençage de ces bandes n'a pas été poursuivi [80].

**Isolation de fragments de gènes codant pour des chitinases de la famille 19 chez *H. megidis***

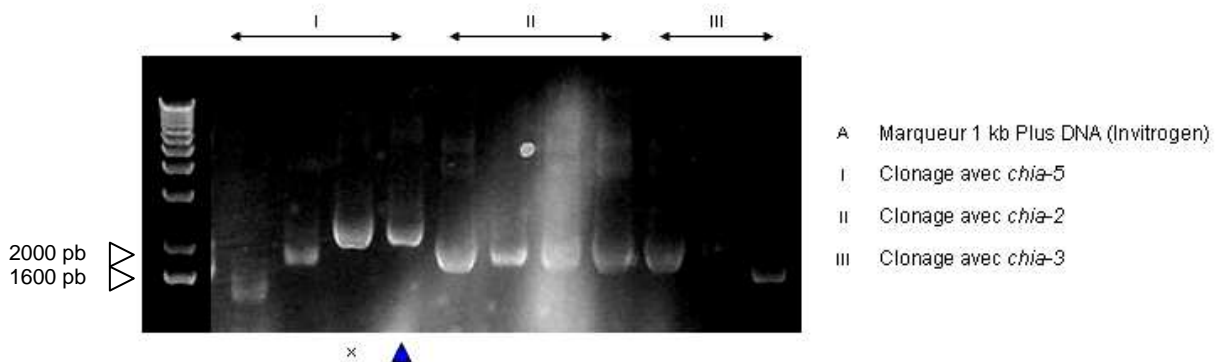
Les amorces spécifiques (CEfrachia2res, CEfrachia3/5res, CEfrachia2/3res et CEfrachia5res) pour identifier la région conservée des gènes codant pour des chitinases de la famille 19 sont également testées sur l'ADNg du stade larvaire L3 de *H. megidis*, un ver parasite entomopathogène (Fig. 28). Les conditions de PCR sont toujours celles d'une réaction de touchdown PCR 54°- 56°C.

Un signal est obtenu pour l'amplification d'un fragment de gène avec les amorces spécifiques pour *chia-5*. Bien que le signal demeure très faible, la bande amplifiée est récupérée et purifiée (Fig. 28).



**Fig. 28 : Amplification par PCR des fragments de gènes codant pour des chitinases de la famille 19 chez *H. megidis*. Les amorces utilisées possèdent les sites de restriction *BamH I*, *EcoR I* et *Sma I*.**

La bande d'intérêt est ensuite intégrée dans le plasmide pGEM-T. La présence de l'insert est confirmée par PCR avec les amorces universelles (M13(-20)f et M13rev) et 2 colonies présentent le bon profil ; une seule colonie a été envoyée au séquençage (Fig. 29).



**Fig. 29 : Contrôle de l'insertion du plasmide dans les colonies transformées. Les 2 colonies présentant le profil attendu (croix noire et triangle bleu) ont été analysées et une colonie a été choisie pour le séquençage (triangle bleu).**

Alignement après séquençage

La séquence obtenue (insert de *H. megidis*) est ensuite alignée avec la séquence correspondante disponible de *C. elegans* (Wormbase). Les tirets (-) signalent le début et la fin des introns dans les 2 séquences. Les différences entre les 2 séquences sont mises en évidence en **rouge gras**. Les amorces utilisées sont ici représentées en **bleu gras**.

*chia-5* chez *H. megidis*

```

H.megidis: 60  CACCCCGGAAACGAGATTGGCTGCCTTCTTTGCCCATGCAATTCAGAAACTAGAGAAAACAACAAC 128
                |||
C.elegans:    6583 AAACGAGATTTGGCTGCCTTCTTTGCCCATGCAATTCAGAAACTGAGAGAAAACAACAAC 6642
                |||
H.megidis:    129  TATCTTTATACGTAA--GTTTTATATAGTTAAAGATGGAGTACTGTATCGTCCGTAGAGATT 188
                |||
C.elegans:    6643  TATCTTTATACGTAA--GTTTTATATAGTTAAAGATGGAGTACTGTATCGTCCGTAGAGATT 6702
                |||
H.megidis:    189  TTACTGCAAATGAAATCAAACGTGTTGAAATTGCCAAATAAACTCTTACTTCTAGAAAA 248
                |||
C.elegans:    6703  TTACTGCAAATGAAATCAAACGTGTTGAAATTGCCAAATAAACTCTTACTTCTAGAAAA 6762
                |||
H.megidis:    249  AATACTAAATTTTGTATATTTTTTTCCTTTAAAACTTTAGAACAGTTTTACGAATTTCT 308
                |||
C.elegans:    6763  AATACTAAATTTTGTATATTTTTTTCCTTTAAAACTTTAGAACAGTTTTACGAATTTCT 6822
                |||
H.megidis:    309  TAGGGTAACATTTAGTCATGACAATAATTTCCAG--CGCGCTTCCCGATCAAGAGGCATCCA 368
                |||
C.elegans:    6823  TAGGGTAACATTTAGTCATGACAATAATTTCCAG--CGCGCTTCCCGATCAAGAGGCATCCA 6882
                |||
H.megidis:    369  ATTGTTTCTACCGCGGAGGATTTTATAACTGGTTTGAAGGTGGACCGTCAAGTAACATTTT 428
                |||
C.elegans:    6883  ATTGTTTCTACCGCGGAGGATTTTATAACTGGTTTGAAGGTGGACCGTCAAGTAACATTTT 6942
                |||
H.megidis:    429  TAAACCCAGAAACACCTGGTCACTCTCCAAGTATGGAATTCATGTACATCTGCTGGTC 488
                |||
C.elegans:    6943  TAAACCCAGAAACACCTGGTCACTCTCCAAGTATGGAATTCATGTACATCTGCTGGTC 7002
                |||
H.megidis:    489  GTTACTGTTCTGCTTCTGATCAGATTACCTTTTTCTATCCCTGCTCCAATTCAACAATTT 548
                |||
C.elegans:    7003  GTTACTGTTCTGCTTCTGATCAGATTACCTTTTTCTATCCCTGCTCCAATTCAACAATTT 7062
                |||
H.megidis:    549  CAAACCCCTGCTGCTCCATATAAAGGGTGCTATTTTGAAGAGGAGGAATTCAAATTTTCGT 608
                |||
C.elegans:    7063  CAAACCCCTGCTGCTCCATATAAAGGATGCTATTTTGAAGAGGAGGAATTCAAATTTTCGT 7122
                |||
H.megidis:    609  ATAACTACAACACTACGGGAATTCAGC 634
                |||
C.elegans:    7123  ATAACCTACAACACTACGGG 7139

```

Visiblement la séquence de la région conservée correspond à l'exception de 2 positions pour lesquelles une mutation a été observée (substitution de G par A et substitution de A par G). Une séquence correspondant au gène *chia-5* est ainsi présente chez *H. megidis*.

La prédiction de l'épissage se fait sur la base de la séquence de *C. elegans* et seul une mutation concerne une région codante. En effet, la première mutation se situe en position 1 d'un codon ce qui conduit à un changement d'acide aminé. La seconde mutation se trouve dans un intron.



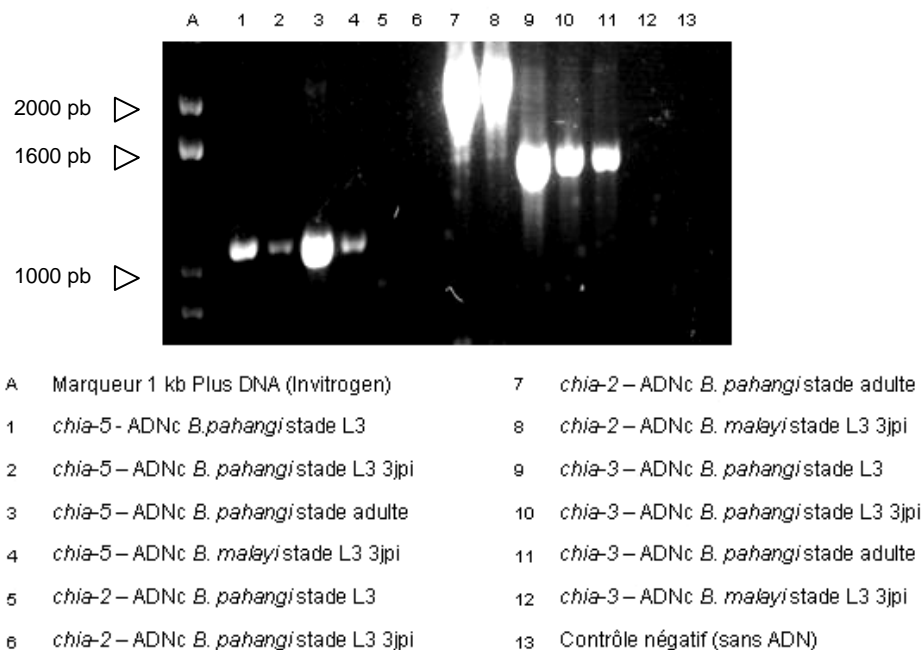


Fig. 30 : Amplification par PCR des gènes de chitinases de la famille 19 dans les banques d'ADNc de *B. malayi* et *B. pahangi*. Les amorces utilisées possèdent les sites de restriction *SnaB I* et *Not I*.

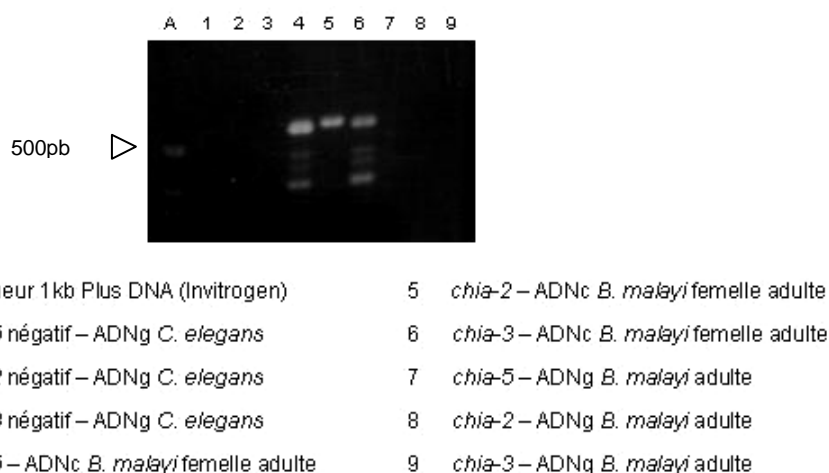


Fig. 31 : Isolation des gènes correspondant aux chitinases de la famille 19 chez *B. malayi*. Les amorces utilisées possèdent les sites de restriction *BamH I*, *EcoR I* et *Sma I*.

La présence des fragments des gènes codant pour des chitinases de la famille 19 a alors été recherchée dans d'autres banques d'ADNc disponibles pour les filaires *B. malayi*, femelles adultes et adultes sans distinction de sexe (Fig. 31) avec les amorces spécifiques à *C. elegans* (CEfrachia2res, CEfrachia3/5res, CEfrachia2/3res et CEfrachia5res) pour l'identification de la région conservée des gènes codant pour des chitinases de la famille 19. Une seule bande est présente pour *chia-2* correspondant à la taille du fragment attendu d'environ 600 pb (correspondant théoriquement à la séquence non-épissée) mais une double bande est visible pour les amplifications de *chia-3* et *chia-5*. La bande correspondant à *chia-2* a été découpée et purifiée puis liguée dans le plasmide pGEM-T dans le but de la séquencer.

En fonction des différentes amplifications obtenues sur les banques d'ADNc des filaires *Brugia* spp, un tableau d'expression est établi pour chacun des stades testés (Tableau 12).

**Tableau n°12 : Tableau récapitulatif de l'expression des chitinases des familles 19 chez les filaires *B. pahangi* et *B. malayi* en fonction des différents résultats obtenus par PCR sur les banques d'ADNc.**

	<i>B. pahangi</i>	<i>B. malayi</i>
Larve L3	<i>chia-3 / chia-5</i>	Pas de données
Larve L3 3jpi	<i>chia-3 / chia-5</i>	<i>chia-2 / chia-5</i>
Adulte (sans distinction de sexe)	<i>chia-2 / chia-3 / chia-5</i>	-
Adulte femelle	Pas de données	<i>chia-2 / chia-3 / chia-5</i>

L'ADN plasmidique des colonies transformées a été extrait, déposé sur gel d'agarose avant de sélectionner les 4 candidats au séquençage (Fig. 32). La présence de l'insert a été vérifiée par PCR avec les amorces universelles et une seule colonie a alors été séquencée.

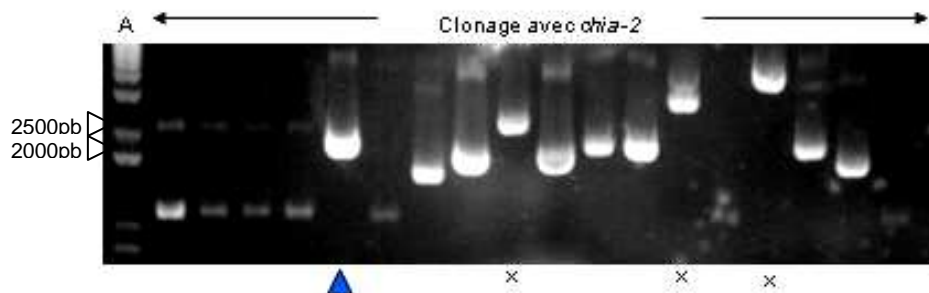


Fig. 32 : Contrôle de l'insertion du plasmide dans les colonies transformées. Les 4 colonies présentant le profil attendu (croix noire et trinagle bleu) ont été analysées et une colonie a été choisie pour le séquençage (triangle bleu).

### Alignement après séquençage

La séquence (insert de *B. malayi*) est ensuite alignée avec la séquence correspondante disponible de *C. elegans* (Wormbase). Les tirets (-) signalent le début et la fin des introns dans les 2 séquences. Les différences entre les 2 séquences sont mises en évidence en **rouge gras**. Les amorces utilisées sont ici représentées en **bleu gras**.

### *chia-2* chez *B. malayi*

```

B.malayi: 659  CACCCCGGAAGAGAGATGTAGCTACATTTTTTGCACACGCTTTGCAGGAGACTGGTGAAAATGATGCA 609
C.elegans: 5448  AAGAGAGATGTAGCTACATTTTTTGCACACGCTTTGCAGGAGACTGGTGAAAATGATGCA 5507
B.malayi: 608  AGTGTTTATAA--GTGAGTTATAAAGATCTTAGTGGGAGATCCAGGTTTTGTAGTTTTTTT- 550
C.elegans: 5508  AGTGTTTATAA--GTGAGTTATAAAGATCTTAGTGGAAGATCCAGGTTTTGTAGTTTTTTTT 5567
B.malayi: 549  AGTTGATTCATATTACCAAATTCAGAAGAACTGAACTGAGACCTTTTCAAAGAAATGCA 490
C.elegans: 5568  AGTTGATTCATATTACCAAATTCAGAAGAACTGAACTGAGACCTTTTCAAAGAAATGCA 5627
B.malayi: 489  CTGTCCTTTATATAGACGTCCCATAGAAAATAAAGTATTAATATCTCCAG--TAATACCGAT 430
C.elegans: 5628  CTGTCCTTTATATAGACGTCCCATAGAAAATAAAGTATTAATATTTCCAG--TAATACCGAT 5687
B.malayi: 429  CTAACACTTGAACAAGCTCACGAGTGCTTCTATCGTGGCGGATTCTATAATTGGTTTGAA 370
C.elegans: 5688  CTAACACTTGAACAAGCTCACGAGTGCTTCTATCGTGGCGGATTCTATAATTGGTTTGAA 5747
B.malayi: 369  CGTGGACCAAACCTCTACATTCCTTTCTCCAGCAGCTCC--CGGTATCCCAATCTTACTTTTTC 310
C.elegans: 5748  CGTGGACCAAACCTCTACATTCCTTTCTCCAGCAGCTCC--AGGTATCCCAATCTTACTTTTTC 5807
B.malayi: 309  TTAAAATGAGTTTAAACCTGATATTTCC--AGGATTCCTCCATTTGATGGTAAAAGATGTAC 250
C.elegans: 5808  TTAAAATGAGTTTAAACCTGATATTTCC--AGGATTCCTCCATTTGATGGTAAAAGATGTAC 5867
B.malayi: 249  TGACGAGGGAAGATACTGCAAGTCGGATCCGATTATTGATTTTTGGTATCCATGTAACCTC 190
C.elegans: 5868  TGACGAGGGAAGATACTGCAAGTCGGATCCGATTATTGATTTTTGGTATCCATGTAACCTC 5927

```

```

B.malayi:      189  AGATATCGAATCACATTCTGACAAAGAATATCATAAAGGATATTATTTCGGACGAGGTGC 130
                |||
C.elegans:    5928 AGATATCGAATCACATTCTGACAAAGAATATCATAAAGGATGTTATTTCGGACGAGGTGC 5987
                |||
B.malayi:      129  TCTCCAAC TTTCTGGAAC TACAAC TATGGAGA ATTCAGC 77
                |||
C.elegans:    5988  TCTCCAAC TTTCTGGAAC TACAAC TATGG 6017

```

Une séquence correspondant à la région conservée du gène codant pour *chia-2* chez *C. elegans* semble ainsi conservée et exprimée chez *B. malayi* uniquement chez les femelles adultes. La séquence correspond à l'exception de 5 positions pour lesquelles une mutation de bases a été observée (substitution de A par G, T par C, A par C et G par A ainsi qu'une délétion de T). Une séquence correspondant à une chitinase de la famille 19 a ainsi été confirmée chez *B. malayi*.

La séquence obtenue a ensuite été traduite afin de comparer les 2 séquences en acides aminés ; sur les 5 mutations, une seule d'entre elles se trouve dans un exon et entraîne une modification d'acide aminé.

```

B.malayi :      KRDVATFFAHALQETGENDASVY--NNTDLTLEQAHECFYRGGFYNWFERGPNSTFLSPAA-
                |||
C.elegans :    KRDVATFFAHALQETGENDASVY--NNTDLTLEQAHECFYRGGFYNWFERGPNSTFLSPAA-
                |||
B.malayi :      -PGFSPPFDGKRCTDEGRYCKSDPIIDFWYPCNSDIESHSDKEYHKGYFGRGALQLSWNYNY
                -
C.elegans :    -PGFSPPFDGKRCTDEGRYCKSDPIIDFWYPCNSDIESHSDKEYHKGCYFGRGALQLSWNYNY
                -

```

Une certaine retenue est observée concernant la seconde modification puisque la base perdue (délétion d'un T) dans une région riche en T peut être un artéfact. Il ne faut ainsi que considérer les 2 autres modifications.

Les propriétés des résidus Y et C n'étant pas identiques, cette modification entraîne probablement un changement dans la protéine obtenue.

La banque fournie par le Dr Hirzmann est annoncée comme une banque d'ADNc de *B. malayi* adultes femelles. Suite aux différents résultats obtenus, il semblerait que ce soit une banque d'ADN génomique. Il y a ainsi visiblement une erreur d'étiquetage.

### **Alignement des séquences des chitinases des divers nématodes**

Les différentes séquences codant pour des chitinases de la famille 19 chez *C. elegans*, *H. megidis*, *A. suum* et *B. malayi* ont été comparées. Cet alignement permet d'observer le haut degré de conservation dans le codage des chitinases de la famille 19 de ces différents nématodes bien qu'ils appartiennent à 3 familles phylogéniques distinctes.

*chia-2* ATGGCTGAGCAAAGAGCAAACAAAACCAGTCGATGCTCGATTTCCTCAGTTCTATTCCGC 60

*chia-2* GCACATTCCCCCTCTCTAGCGCCTCCGCCTTCAATCCGTGTTTTGTCCGATCCGGTCTG 120

*chia-1* -----ATGTCAGA-AACTTATGCGAATT---TCA 25  
*chia-5/6* -ATGTCGGCGCAATTTCGTCGCTTCTTCTCATCGCATTAAATTTGTCTCTACCGG-CCA 58  
*chia-3* -----ATGACTCGCATCAAAGTGTCAATTTAACGGTTTTTC-TCA 40  
*chia-4* -----ATGACTTTTTTTGTGTATACTGGGAATCCTTTGCAGATCAA-TCG 43  
*chia-2* TCGGCGTCTTTTCCGAAAAGTGACTCTCTTTGTACTTTGACTGACGCGAGCTTCAACC 180

*chia-1* CTTTCATAGACTGTT-----CTATGTGCTCTGCAAGTCGTTTGGGAAATGCTAGCT 76  
*chia-5/6* ACGCATTCAACGGT-----CAAATGCATCTGTTGGCTTTTGGAAAACGCGAGTT 109  
*chia-3* TTTTGGCACATAACT-----CAAATGTGTCGGCTGTGACTATGAAAATGCAAGTT 91  
*chia-4* CTGAAAAAAGTGGTTACATGCGTTTTGAAAAATTTCAATTTGTCAACTGAAAATGTT 103  
*A. suum* TCATTACTGATATTT-----CTATCTATGTGACGAAAAAATTAACGCGTCAATC 51  
*chia-2* ATGCAATTGCTTTTCCTTCTACTTTTCACACCTTATACGATCGTTGGAGAAAACCCGT 240

*chia-1* TGTGTCCAAAAGCAA---CGAAATATGGTAAAAGACCTCCGAAATCATGCACCTCGGCCAA 133  
*chia-5/6* CATGTCCAAAAGCAG---CAAATTTGGAAAAGGACCAACAAAGTCATGCACATATACCTA 166  
*chia-3* CTGTGTCCAAAAGCTG---CCAAGTATGGAAACAGGGCCTCCAGAAATCATGCACCTCAACCAA 143  
*chia-4* ATTTAATAATTATTTGTGTCCAAAAGCGGCAATGGACCTCCGAAATCATGCACCTCGCCAA 168  
*A. suum* GACTGTCCGCCACAG---CAAAGATTTGGCATGGACCCCATCGAGTTGTGCACACCTT 109  
*chia-2* TTCTGCCCCAAACAT--CAGTTTATGGCAAGGACCCGAAAGAGGACTGTGCTCAAGCTT 298

*chia-1* CGGACCCAAAATAATCTGCCTGCTTCAAACCTAGAATCCTGGTTCCACGAGAGAAATGTTTG 193  
*chia-5/6* GTGACCCAAAACAATAAGCCAGCTTCTCACTAGAATCCTGGTTCCACGAGAGAAATGTTTG 226  
*chia-3* CTGACCCAAAACAATAATGCTGCTTCTCAATTAGAATCCTGGTTCCACGAGAGAAATGTTTG 208  
*chia-4* CCGATCCAAAATAATCTTCTGCTTCAAACCTAGAATGCTGGTTCCACGAGAGAAATGTTTG 223  
*A. suum* CCGATCCGAAACAATTTGCCACCATCCGAACTTGAACCTGGTTTACCAAAGCCTGTTTCG 169  
*chia-2* CTGATCCAAAATGAGCTTCCAAAGTCTCCACTTGAAAATATGGTTTACAAAACAATGTTTG 358

*chia-1* AAGACCTATTCCCATTTTCAAATCTTGGATGGGGTCCATCGAGTTGCTGGCCATATTTCTT 253  
*chia-5/6* AAGACTGTTTTCCATTGCAAAATCTTGGATGGGGTCCGTCGAGCTGCTGGCCATATTTCTT 286  
*chia-3* AAGACCTATTCCCATTTGCCAAATCTTGGATGGGGTCCATCGAGTTGCTGGCCATATTTCTT 268  
*chia-4* AAGACCTGTTCCCATTTGCCAAATCTTGGATGGGGTCCATCGAGTTGCTGGCCATATTTCTT 283  
*A. suum* ACGATCTTTTCCCATATGCAAAATATGGTTGGGGTCCAAAACAATGCTGGCCATATTTCTT 229  
*chia-2* ACGACTTATTTCCAAAGTCAAATATGGAAATGGGACCTCATCCGTGCTTACCSTACTCAT 418

*chia-1* ACGATGCATTTAAAATTCATCCAGATACTTTCCAGAATTTGGAACCTTCG-ATTAATGTG 312  
*chia-5/6* ACGATGCTTTTAAAATTCATCCAGATAATTTTCCAGAGTTTGGAACTTCT-CTTAATGTG 345  
*chia-3* ACGATGCTTTTAAAATTCATCCAGATAATTTTCCAGAATTTGGAACCTTCG-ATCAATGTG 327  
*chia-4* ACGATGTTTTTAAAATTCATCCAGATACTTTCCAGAATTTGGAACCTTCG-ATCAATGTG 342  
*A. suum* ATGAAGCATTTCGTCATTGCGGGCACGTTATTTCCAGGATTTGGACCTC--ATCACCG-- 285  
*chia-2* ATGAATCTTTTATAATGCTGCTCGATACTTTCCGAGTTTGGAGCAGCACATCCAAATA 478

*chia-1* AATAATA----- 319  
*chia-5/6* AATAACACGGTGTATACTGCGGACGAGAATAAAAACACAGATTGCGCTGCGCTTCTTTGCC 405  
*H. megidis* -----AAACAGATTGCGCTGCGCTTCTTTGCC 27  
*chia-3* AATAATACGGTGTATACTGCGGATGAGAATAAGAAAACAGACTTGGCTGCGCTTCTTTGCC 387  
*chia-4* AACAATACTATGTATATACTGCAATGAATAAGAAAACAGATTGACGCGCTTCTTTGCC 402  
*A. suum* ---AATACGTGCATACGAAGGACGAGAATACGCGACCTGATTGAGCGCTTCTTTGCCA 342  
*chia-2* AACAATTCAAAAGCT-----GATGAGCATCATAAGACAGATGTAGCTACATTTTTGCCA 531  
*B. malayi* -----AAGACAGATCTAGCTACATTTTTGCCA 27

*chia-1* -----AGGAAGCTG-----TCC 331  
*chia-5/6* CATTGCAATTTCAAGAACTGGAG---AAAACAACAATACTTTTATACGTAA---CTTCC 459  
*H. megidis* CATTGCAATTTCAAGAACTAGAG---AAAACAACAATACTTTTATACGTAA---CTTCC 81  
*chia-3* CAGGCTGTTCAAGAACTGGAG---AGAACAACATTTGCTTATATGACACA---CTTCC 441  
*chia-4* CATTGCAATTTCAAGAACTTCAA---AATGTATCAATTTGAGACAT-----CAGTCC 450  
*A. suum* CAGGCACTTTCAAGAACTGGAGCTAATGATGCATCGCTTACGGAGGTGGC---AGAACT 399  
*chia-2* CAGGCTTTTCCAGGACTGGTGAATGATGCAAGTGTTTATAATAATACCGATCTAAC 591  
*B. malayi* CAGGCTTTTCCAGGACTGGTGAATGATGCAAGTGTTTATAATAATACCGATCTAAC 87

<i>chia-1</i>	GATCA-GATGCTTCAAACTGTTTCTACCGTGGAGGATTTATAACTGGTTTGAAGGAGGG	390
<i>chia-5/6</i>	GATCAAGAGGCATCCAATGTTTCTACCGCGGAGGATTTATAACTGGTTTGAAGGATGGA	519
<i>H. megidis</i>	GATCAAGAGGCATCCAATGTTTCTACCGCGGAGGATTTATAACTGGTTTGAAGGATGGA	141
<i>chia-3</i>	GATCAAGATGCTTCAAACTGTTTCTACCGTGGAGGATTTATAACTGGTTTGAAGGAGGA	501
<i>chia-4</i>	GATCAAGATGCTTCAAACTGTTTCTACCGTGGAGGATTTATAACTGGTTTGAAGGAGGA	510
<i>A. suum</i>	GTTCAAGAAAGCAACGACTGTTTACTAATGCGGTGGATTCTATAATGGTTTGAAGGATGTT	459
<i>chia-2</i>	CTTGAAACAAGCTCAGCTGCTTCTAATCGTGGGAGGATTTATAATGGTTTGAAGCTGGA	651
<i>B. malayi</i>	CTTGAAACAAGCTCAGCTGCTTCTAATCGTGGGAGGATTTATAATGGTTTGAAGCTGGA	147
<i>chia-1</i>	CCATAAGTAGCTTTTTGGACCCATAAACTCCTGGTTATACTCCATCCGACGGAAATTCA	450
<i>chia-5/6</i>	CCGTCAAGTAACCTTTTTAAACCCAGAAACACCTGGTCACTCTCCAAGTATGGAAATTCA	579
<i>H. megidis</i>	CCGTCAAGTAACCTTTTTAAACCCAGAAACACCTGGTCACTCTCCAAGTATGGAAATTCA	201
<i>chia-3</i>	CCACAAGTAGCTTTTTGGATCCTATAAACTCCTGGTTATACTCCAGCCGACGGAAATTCA	561
<i>chia-4</i>	CCACAAGTAGCTTTTTGGACCCATAAACTCCTGGTTATACTCCAGCCGACGGAAATCTCA	570
<i>A. suum</i>	TGTGTTTCAAGTTCCTCAACCCAAACTCCTGGTATCAACCAAAACGATGGAAAGGGAG	519
<i>chia-2</i>	CCAAACTCTACATTCCTTCTCCAGCAGCTCCAGGATTCCTCTCAATTGATGGTAAAGA	711
<i>B. malayi</i>	CCAAACTCTACATTCCTTCTCCAGCAGCTCCAGGATTCCTCTCAATTGATGGTAAAGA	207
<i>chia-1</i>	TGTTCACTCTGCTGGTCTTTATGTTCTGCTTCTGATCAAAATACTTATTTCTATCCATGC	510
<i>chia-5/6</i>	TGTACATCTGCTGGTCTTTACTGTTCTGCTTCTGATCAGATTACCTTATTTCTATCCCTGC	639
<i>H. megidis</i>	TGTACATCTGCTGGTCTTTACTGTTCTGCTTCTGATCAGATTACCTTATTTCTATCCCTGC	261
<i>chia-3</i>	TGTGATCTGCTGGTCTTTATGTTCTGCTTCTGATCAAAATACTTATTTCTATCCATGC	621
<i>chia-4</i>	TGTGATCTGCTGGTCTTTATGTTCTGCTTCTGATCAGATTACCTTATTTCTATCCCTGC	630
<i>A. suum</i>	TGTAATGTGGCCGGAAATATATGTTTCAATCATCTCCAGAGATCAGCTACTGGTATCCATGC	579
<i>chia-2</i>	TGTACTGACCAAGGAAGATACGCAAGTCGGATCCGATTATTGATTTTGGTATCCATGT	771
<i>B. malayi</i>	TGTACTGACCAAGGAAGATACGCAAGTCGGATCCGATTATTGATTTTGGTATCCATGT	267
<i>chia-1</i>	TCAAATCAACAGTATCAAATACCTGCT---GCTCCATATAAAGGATGTTATTTTGGACGT	567
<i>chia-5/6</i>	TCAAATCAACAAATTTCAAACCTGCT---GCTCCATATAAAGGATGTTATTTTGGAGA	696
<i>H. megidis</i>	TCAAATCAACAAATTTCAAACCTGCT---GCTCCATATAAAGGATGTTATTTTGGAGA	318
<i>chia-3</i>	TCAAATCAACAAATTTCAAATACCTGCT---GCTCCATATAAAGGATGTTATTTTGGACGT	678
<i>chia-4</i>	TCAAATCAACAAATTTCAAACCTGCT---GCTCCATATAAAGGATGTTATTTTGGACGT	687
<i>A. suum</i>	AAAGGTAGTACTGAGCCAA---TAAT---GGCTATTATACTGGTTCATTTTGGTAGA	633
<i>chia-2</i>	AACTCAGATATCGAATCACATTCCTGACAAAAGATATCATAAAGGATGTTATTTTGGACGA	831
<i>B. malayi</i>	AACTCAGATATCGAATCACATTCCTGACAAAAGATATCATAAAGGATGTTATTTTGGACGA	327
<i>chia-1</i>	GGAGCCATTCAAATTTTCGTACAACACTACAACTACGGACAATTCCAAGATTGGTTGAGA	627
<i>chia-5/6</i>	GGAGCAATTCAAATTTTCGTATAACTACAACTACGGCACTTCCAAGATTGGTTGAAATCT	756
<i>H. megidis</i>	GGAGCAATTCAAATTTTCGTATAACTACAACTACGGCACTTCCAAGATTGGTTGAAATCT	354
<i>chia-3</i>	GGAGCCATCAAAATTTTCGTACAACACTACAACTACGGACAATTCCAAGATTGGTTGAGA	738
<i>chia-4</i>	GGAAACAATTCAAATTTTCGTACAACACTACAACTACGGACAATTCCAAGATT---CCAGAAC	744
<i>A. suum</i>	GGAGCAATTCAAATTTTCGTACAACACTACAACTACGGTCAATTTCAAATTTGGTTACACAGT	693
<i>chia-2</i>	GGTGCCTTCCAACTTTCTGGAACTACAACTATGGGCTTTTCCAAACATTTCTGCTCACA	891
<i>B. malayi</i>	GGTGCCTTCCAACTTTCTGGAACTACAACTATGGG---TTCGCTCACA	363
<i>chia-1</i>	GTAATATTAAGTTGATTTTATTAAGAAACCAATCTTGTAATGACTAAAATGGATCCA	687
<i>chia-5/6</i>	GTAATATTAAGTTGACTTTATTAAGAAACCAATCTTGTAATGACTAAAATGGATCCA	816
<i>chia-3</i>	GTAATATTAAGTTGATTTTATTAAGAAACCAATCTTGTAATGACTAAAATGGATCCA	798
<i>chia-4</i>	TTGAAAAAATAACTAA---TAATCTTCTGCAATTTACACTTACTTTATTTGTCATCA	799
<i>A. suum</i>	ACAGGTATCAATGTCAATCTTCTGAGCGAACCTAATCTAGTTTAAACAAAATGGATCCC	753
<i>chia-2</i>	AAAGGGTGAAGTTGATCTAAATGAGAACTCAAATCTAGTTATGACAAAATGGATCCA	951
<i>chia-1</i>	CCACTTGGCGTCTGGCTTCTCTTTGGTTCTATATGACACCTCAACCACCGAAACCAGCA	747
<i>chia-5/6</i>	CCACTTGGCGATFATGGCTTCTCTTTGGTTCTATATGACACCTCAACCACCGAAACCAGCA	876
<i>chia-3</i>	CCACTTGGCGTCTGGCTTCTCTTTGGTTTATATGACACCTCAACCACCGAAACCAGCA	858
<i>chia-4</i>	TGAGTGTCCGGAAGATCTGA-----TTCGCTTCTGCTCCTGCTCCTGCTCCTGCTCCT	819
<i>A. suum</i>	CCAAATGGGGTCTTGTCTTCTATATGTTCTATATGACTCCCAACCACCGAAACCAGCT	813
<i>chia-2</i>	CCAAATGGCAATGATGGGATCTTTGGTTTATATGACTCCCAACCACCGAAACCAGCT	1011
<i>chia-1</i>	ATGCATGATATTGTAATGGAAACTGGAATAGTGGAGCAAAGAATGCAGCAGCTGGATAT	807
<i>chia-5/6</i>	ATGCATGATATTGTAATGGAAACTGGAATAGTGGAGCAAAGAATGCAGCAGCTGGATAT	936
<i>chia-3</i>	ATGCATGATATTGTAATGGAAACTGGAATAGTGGAGCAAAGAATGCAGCAGCTGGATAT	918
<i>A. suum</i>	ATGCATGATATTGTAATGGAAACTGGAATAGTGGAGCAAAGAATGCAGCAGCTGGATAT	873
<i>chia-2</i>	ATGCATGAAATAGTAACCGGCGACTGGAACCGTCTTCAAAGAATCGGAGAGCCGGATAT	1071
<i>chia-1</i>	GATGGACCAATCTTTGGACCAACTTTCATGATCATTAAACAATGAATGTTCTGGAGAAGAT	867
<i>chia-5/6</i>	GATGGGCCAATCTTTGGACCAACTTTCATGATCATTAAACAATGAATGTTCTGGAGAAGAT	996
<i>chia-3</i>	GATGGACCAATCTTTGGACCAACTTTCATGATCATTAAACAATGAATGTTCTGGAGAAGAT	978
<i>A. suum</i>	ACGGGACCGATCTTTGGACCAACAAGTCTGATCATTAAACAATGAATGTTCTGGAGAAGAT	933
<i>chia-2</i>	CAAGGACCTATTTTGGACCAACAGTCTTATCATTAAACAATGAATGTTCTGGAGAAGAT	1131

<i>chia-1</i>	CCAACAATCCAGGAGGTCAGGAGAATCTAGAAGAATCAAGGCATTCAAATGGTTCAAT	927
<i>chia-5/6</i>	TCAAAAATCCAGGAGGTCAGGAGAATCAAAGAATCAAGGCATTCAAATGGTTCAAT	1056
<i>chia-3</i>	CCAACAATCCAGGAGGTCAGGAGAATCTAGAAGAATCAAGGCATTCAAATGGTTTCT	1038
<i>A. suum</i>	GCCAGTAACCCAGGTGGTCAGGAGAAGTCTCGAATCAAAGCGTTAAATGGTTTCT	993
<i>chia-2</i>	CCAGATCAGCCGGAGGTCAGGAGAATCTAGAAGAATAAAGCATTCAAATGGTTCTCT	1191
<i>chia-1</i>	GGATAITTTGGTTCCCCCGTTGGACCTGAGCATACATGTCTCTGTAAA-----TG	978
<i>chia-5/6</i>	GGATACTTTGGCTCCCTGGTTGGACCTGAACATACACTGTCTTGTGGAAAAATGCCAGTG	1116
<i>chia-3</i>	GGTACTTTGACACTCCAACAGGACCGAGGCCACCTCTCTGTAAAACATGCCTGTA	1098
<i>A. suum</i>	AACATAITTCGGAGTCCCTATGGAGAAGACGATTAATTCATGCAAGATATGCCGCA	1053
<i>chia-2</i>	AAATACTTCAAAGTTCCAGTTGGCTCCAGAGAACACTTAGCTGTAAAGGAATGCTGGAC	1251
<i>chia-1</i>	AAGCTGGACGGATTTCCCAACAATTTAAGTTATCAACCTAATTGGCTTACATCCGGAAA	1038
<i>chia-5/6</i>	AAACTTAATGCGATACCCCACTATCAGAGTTATCAACCTGATTGGAGTTCATCCGGAAA	1176
<i>chia-3</i>	CCACTGGATCAAATTTTCTATAATCTGAGTTATCAGCTGATTGGACATCCACCGAAA	1158
<i>A. suum</i>	AAGTTTCATATGATGCGCTATAATCTCAGTTACCAACGGATTGGTCATCGACATGGAAA	1113
<i>chia-2</i>	GGATTCCACGCTGTCAACACATGTACTTTGGCATCCAGATTGGGGGAATATCGAAA	1311
<i>chia-1</i>	GAGAACCATGTGATTGTGCTCCTGCAAGTTATGGAGGACTTGTGAATTAATGATGACCA	1098
<i>chia-5/6</i>	CCAGAACGATGTGACTGTGCTCCTGCAAGTTATGGAGGACTCCTGTATTAATTTGATCCA	1236
<i>chia-3</i>	GATGTTCCATGCACTTGTGCACCAAGCAGTTATGGAGGCTCATTTTCTATTATGATCT	1218
<i>A. suum</i>	TCCGAGCCGTGCCAATGTGCTCCAGCGACATAAGCAGGTATCGTACCCTACTTCGATCCA	1173
<i>chia-2</i>	TCTCAATCGTGTGATTGTGCTCCGCTCCATATGGTGGTCCACTTCCATACTAGATCCG	1371
<i>chia-1</i>	GTTTATATCCAGCAAAGTTTGAGCTCAGAAATGAAATAAATCGCAAAAAATGTATCAAA	1158
<i>chia-5/6</i>	AACTATTAACCCAGCCAGTTTGTGCTCAAAAAGATTTGAATCGCAAGAAATGTATTGAA	1296
<i>chia-3</i>	GACTACTATCCATCTAGTTTTGTGCTCAAAAAGACTACAACCGTATTAAAGTGTATTGCC	1278
<i>A. suum</i>	GATTAATATCCAGAAAGAAATTCGTTGCTTGAATGAAGAGAATCGTAAACGTTATGTGATT	1233
<i>chia-2</i>	AACTGTATCCACACGAATTTACAAAACAAAAAGATCGAAATCGTTTGGCATGTCTTAC	1431
<i>chia-1</i>	TGGAITATGCAAAACCAATCAATGTATTCATATGGACAAGAAAACTTCTGCATGCTTAAAT	1218
<i>chia-5/6</i>	ACTGTTTATGCAAAATCCATCAATGTATTTTCATGGATAAAAAAATTCATTTATGCTTAAAT	1356
<i>chia-3</i>	AGTATCTATGCAACCCATCCATGTATTCATATGGATAACAAGACTTCTCCATGCTTAAAT	1338
<i>A. suum</i>	AGCGTCTATGCAAAATCAAGTATGTACGGTATGGTTCCCGGTTAAATCCATGCTTCAA	1293
<i>chia-2</i>	AGTATCTACGAAAGCCAGAGACATTCGCACTTGATGCTGGAAACTCGCTTGTCTGAAG	1491
<i>chia-1</i>	CACTAA-----	1224
<i>chia-5/6</i>	TATTGA-----	1362
<i>chia-3</i>	TATTAA-----	1344
<i>A. suum</i>	TACGACACGATCGAGGGAAGTGGTACCAACTAA-----	1326
<i>chia-2</i>	CAATAACCGAAAATTCGCTTGACCAAAACTGGAATAAGGGGATAG	1536

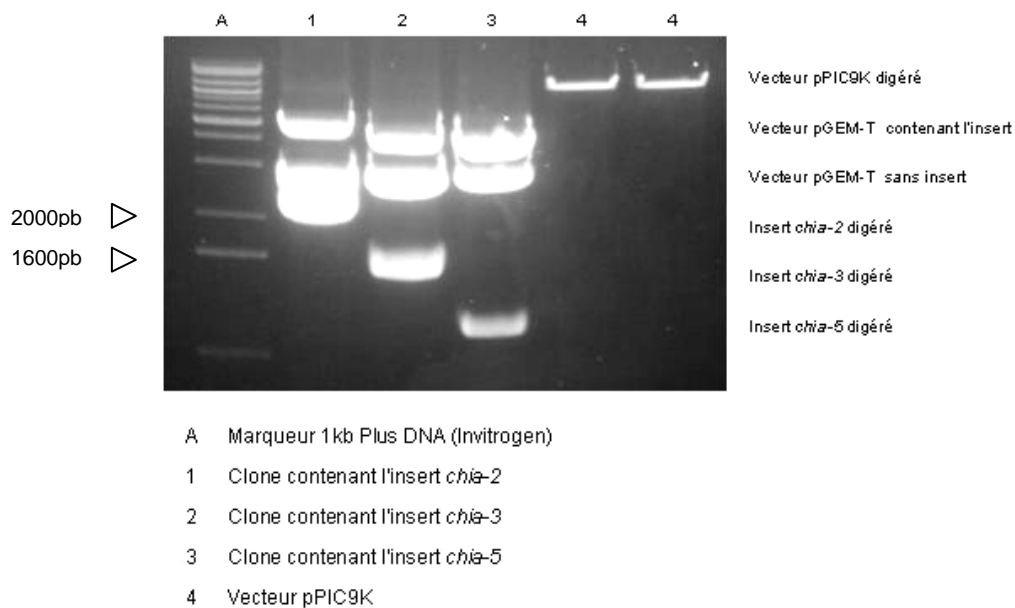
**Fig. 16 :** Alignement des différentes séquences nucléotidiques codant pour des chitinases de la famille 19 chez les nématodes *C. elegans* (*chia-1* / *chia-2* / *chia-3* / *chia-4* / *chia-5/6*), *H. megidis*, *A. suum* et *B. malayi*. Le niveau de conservation est mis en évidence de la manière suivante : 100% d'identité entre les 8 séquences comparées en **bleu gras**, 87.5% en **noir écrit en blanc**, 75% en **gris écrit en noir**, 62.5% en **noir gras** et 50% en **noir**. Les séquences avec des homologies plus faibles ou sans homologie sont inscrites en **gris**. Les séquences de *C. elegans* et *A. suum* proviennent des bases de données et les séquences de *H. megidis* et *B. malayi* ne correspondent qu'aux fragments amplifiés de la région conservée et non pas à la séquence complète.

Cet alignement permet de mettre en évidence 2 zones fortement conservées pour l'ensemble de ces 8 séquences entre les positions 100 à 319 et 390 à 450 en prenant comme référence la séquence *chia-1*. La séquence *chia-1* présente quant à elle une délétion entre les positions 319 à 329 avec toutefois la présence de 9 bases dans l'intervalle. Il est également possible d'observer que la séquence *chia-2*

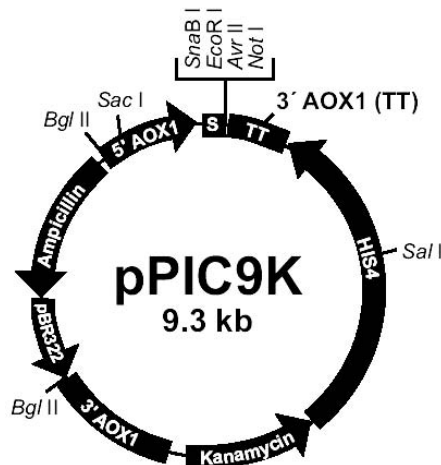
se trouve plus proche des séquences de *H. megidis* et *B. malayi* que des autres séquences de *C. elegans*. La séquence de *B. malayi* se démarque plus fortement des 7 autres séquences, à l'exception des 2 zones de forte conservation. Les séquences de *A. suum* et *H. megidis* quant à elles sont plus proches des séquences de *C. elegans*. La comparaison des séquences complètes provenant de *C. elegans* et d'*A. suum*, montrent la grande conservation entre ces 2 espèces. Les différences se manifestent également par les espacements (gap) propres à chacune des séquences ; *H. megidis* et *B. malayi* semblent en effet en posséder plusieurs : positions 66, 166, 219, 225 et 243 chez *H. megidis* et positions 44, 63, 75, 151 et 205 chez *B. malayi*. L'espacement en position 219 pour *H. megidis* et 205 pour *B. malayi* concerne également la séquence *chia-2* de *C. elegans* en position 432. Les séquences *chia-2* et *B. malayi* présentent encore une insertion d'un codon aux positions 456 et 666 de *chia-5/6*.

**Expériences pour exprimer des chitinases codant pour la famille 19:****a) Induction des protéines codant pour des chitinases de la famille 19 dans le système des levures (système eucaryote)**

Les gènes entiers *chia-2*, *chia-3* et *chia-5* une fois séquencés ont été ressortis du vecteur pGEM-T par digestion avec les enzymes *SnaB I* et *Not I* (Fig. 33). Trois produits de digestion sont alors visibles : le vecteur contenant encore l'insert est représenté par la bande la plus haute. Les 2 autres bandes représentent le vecteur vide et l'insert. Les 3 niveaux étant bien marqués, la digestion s'est déroulée correctement bien que pas complètement.



**Fig. 33 :** Résultats de la digestion des différentes constructions (pGEM-T + insert) et du vecteur pPIC9K avec les enzymes de restriction *SnaB I* et *Not I*.



**Fig. 34 :** Carte du vecteur pPIC9K utilisé pour l'expression des protéines chez les levures *P. pastoris*

Le plasmide pPIC9K (Fig. 34), vecteur d'expression fonctionnel dans les levures, a également été digéré dans les mêmes conditions afin de l'ouvrir et de le rendre compatible avec les différents inserts.

Les différents inserts digérés ainsi que le plasmide pPIC9K ont ensuite été purifiés avant la ligation (Fig. 35).

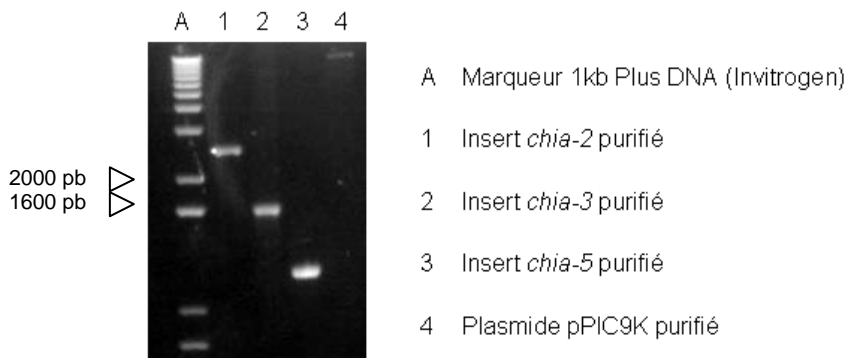


Fig. 35 : Purification des différents inserts correspondant aux gènes entiers *chia-2*, *chia-3* et *chia-5*.

Afin de vérifier que la ligation est bien correcte, les plasmides pPIC9K + inserts ont été testés par PCR avec les amorces AOX spécifiques pour le vecteur pPIC9K. Les amorces AOX dessinées en amont et en aval du site d'insertion permettent d'amplifier une région correspondant à un segment du plasmide de 492 pb sans insertion.

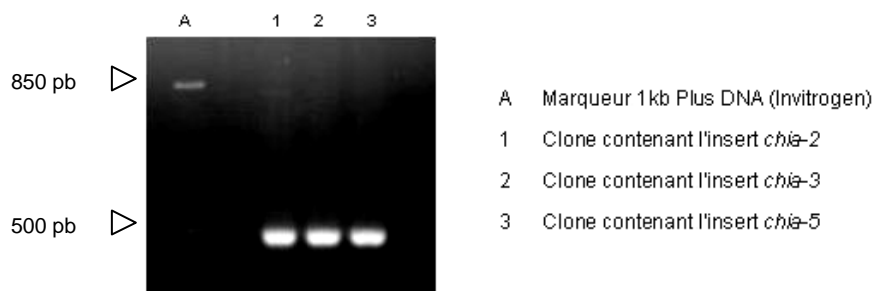


Fig.36 : Amplification des nouvelles constructions avec les amorces AOX spécifiques au vecteur pPIC9K.

Chaque amplification a donné un signal PCR à 492 pb ce qui met en évidence la non-insertion de gène codant pour des chitinases de la famille 19 (Fig. 36). Les vecteurs transformés ne possèdent donc pas l'insert.

Les conditions de ligation ont alors été variées afin de favoriser l'insertion des gènes entiers. La concentration d'insert est généralement 5 fois plus concentrée que le plasmide mais un essai avec une concentration d'insert 2 fois plus concentrée a également été tenté. Les nouvelles constructions ont ensuite servi à la transformation de bactéries des 2 souches de cellules compétentes différentes DH5 $\alpha$  et JM109 compatibles avec le plasmide pPIC9K testées ici. Les colonies obtenues aussi bien pour DH5 $\alpha$  que pour JM109 ont particulièrement mal poussé voire pas poussé du tout. Ces 2 types de bactéries présentent en effet les mêmes mutations de base qui permettent la transformation avec le vecteur pPIC9K. Cette étape a été répétée plusieurs fois afin de vérifier que les problèmes de croissance des bactéries sont bien liés à l'insertion du plasmide contenant le fragment désiré et non pas liés à des facteurs extérieurs comme la température, le temps d'incubation ou le milieu utilisé. Les multiples essais ont tous montré des problèmes de croissance des bactéries transformées seulement, le contrôle (bactéries transformées avec le vecteur vide) poussant normalement.

Afin d'éviter l'étape dépendante des bactéries, les constructions ont également été introduites directement dans les levures par électroporation. Après une incubation de 72 heures, aucune croissance des levures transformées n'est observée sur les boîtes de milieu. Cette dernière étape n'a cependant été réalisée qu'une seule fois et nécessite d'être répétée.

#### **b) Induction des protéines codant pour des chitinases de *C. elegans* et de *B. malayi* dans le système bactérien (système procaryote)**

La transformation avec le gène entier dans le système eucaryote ayant échoué, l'induction a ensuite, bien que contre tout bon sens, été testée dans un système bactérien (système procaryote). Les fragments amplifiés de la région conservée (contenant un intron) ont ainsi été séquencés puis ressortis du vecteur pGEM-T par digestion avec les enzymes de restriction *Bam*HI, *Eco*RI et *Sma*I. Les différents fragments correspondant à la région conservée des chitinases de la famille 19 ainsi que le plasmide pGEX-3X (Fig. 37) obtenus après digestion ont ensuite été purifiés puis ligués. Le déroulement de ces mêmes étapes avec *B. malayi* présente toutefois un intérêt puisque les fragments sont amplifiés à partir de banques d'ADNc.

Les nouvelles constructions pGEX-3X + fragment ont ensuite servi à transformer par choc thermique les cellules compétentes *E. coli* BL21. Les différentes étapes de transformation des bactéries se passent facilement. Une vérification de la construction a donc été effectuée sur les plasmides intégrés dans les bactéries. Cette confirmation se fait par l'amplification d'un segment du vecteur pGEX-3X avec les amorces spécifiques au plasmide (pGEX5' et pGEX3') donnant un signal de 155 pb environ sans insertion. Les vérifications des constructions confirment ainsi l'insertion du fragment de chitinase de la famille 19 de *C. elegans* et *B. malayi*. En effet, un signal clair est obtenu pour chacune des transformations correspondant bien à environ 600 pb correspondant à la construction pGEX-3X + insert (Fig. 38).

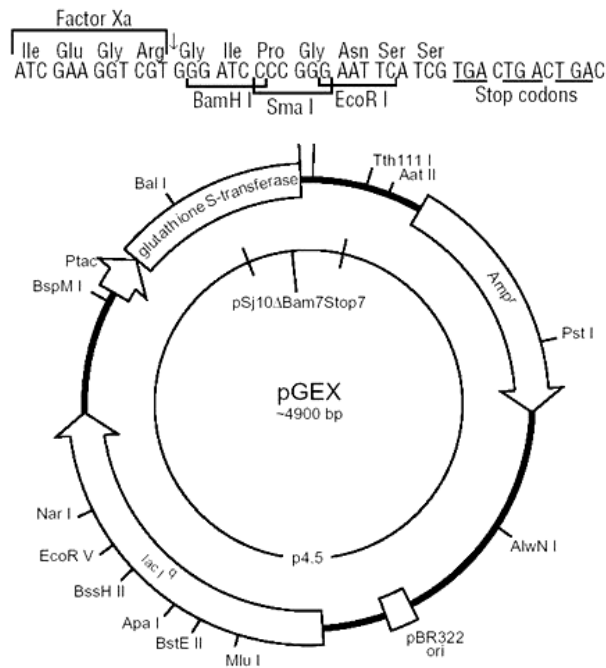
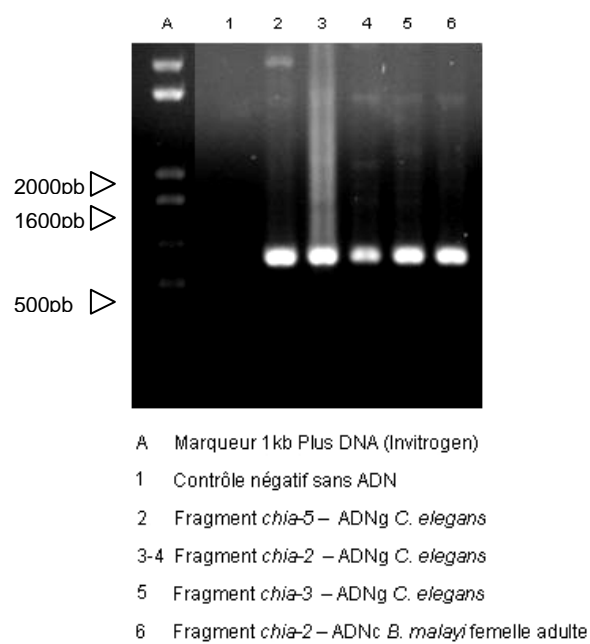


Fig. 37 : Carte du vecteur pGEX-3X utilisé pour l'expression des protéines dans les bactéries I

Lors de l'incubation des différentes cellules compétentes transformées, des problèmes de croissance sont observés. En effet, la croissance des bactéries s'arrête après quelques heures ou ne s'amorce même pas. L'utilisation ici d'un fragment comportant un intron représente en effet sans doute un obstacle. La répartition du site catalytique sur 2 régions distinctes séparées par un intron ne permet en effet pas l'induction de la protéine dans un organisme procaryote. L'induction des protéines proprement dite semble être une étape cruciale. Il se trouve cependant que ce même comportement est observé pour les clones possédant l'insert provenant de *B. malayi* ne comportant pas d'intron. La croissance des bactéries n'étant également pas possible, il semble que les chitinases de la famille 19 présentent un problème de toxicité pour les bactéries transformées.



**Fig. 38 : Amplification des nouvelles constructions avec les amorces pGEX.**

**Analyse des séquences codant pour des gènes de chitinases chez *C. elegans***Phylogénie

Pour observer le degré de conservation entre les différentes séquences de chitinases de la famille 19 chez *C. elegans*, le pourcentage de similarité a été établi entre les différentes séquences (Tableau 13). La représentation phylogénique permet ainsi la visualisation des ressemblances entre les différentes séquences, respectivement des divergences (substitution d'acides aminés).

**Tableau n°13 :** Tableau présentant le pourcentage de similarité entre les différentes séquences en acides aminés des chitinases de la famille 19 chez *C. elegans*.

	<i>chia-1</i>	<i>chia-2</i>	<i>chia-3</i>	<i>chia-4</i>	<i>chia-5</i>	<i>chia-6</i>
<i>chia-6</i>	79%	52%	78%	59%	100%	
<i>chia-5</i>	79%	52%	78%	59%		
<i>chia-4</i>	55%	38%	63%			
<i>chia-3</i>	84%	55%				
<i>chia-2</i>	55%					
<i>chia-1</i>						

L'arbre considéré est un arbre non enraciné obtenu à l'aide de la méthode Neighbor-Joining (NJ) qui est un moyen de visualiser les distances entre les différentes séquences des chitinases de la famille 19 (Fig. 39). Le faible taux d'homologie (38%) entre les 2 séquences *chia-2* et *chia-4* est reflété par leurs positions aux antipodes l'une de l'autre. Par contre, les séquences *chia-6* et *chia-5* avec leur analogie de séquence de 100% sont tout naturellement retrouvées sur la même feuille. La filiation entre les différentes séquences ne peut cependant pas être établie.

Cette étude phylogénique est certes succincte mais elle permet de mettre en évidence les variations de séquences entre les différentes séquences de gènes codant pour des chitinases de la famille 19 chez *C. elegans*. Cette première étude est en parfaite adéquation avec les données obtenues par Kawase lors de ses études des chitinases de la famille 19 et plus particulièrement chez *Actinobacteria* [79].

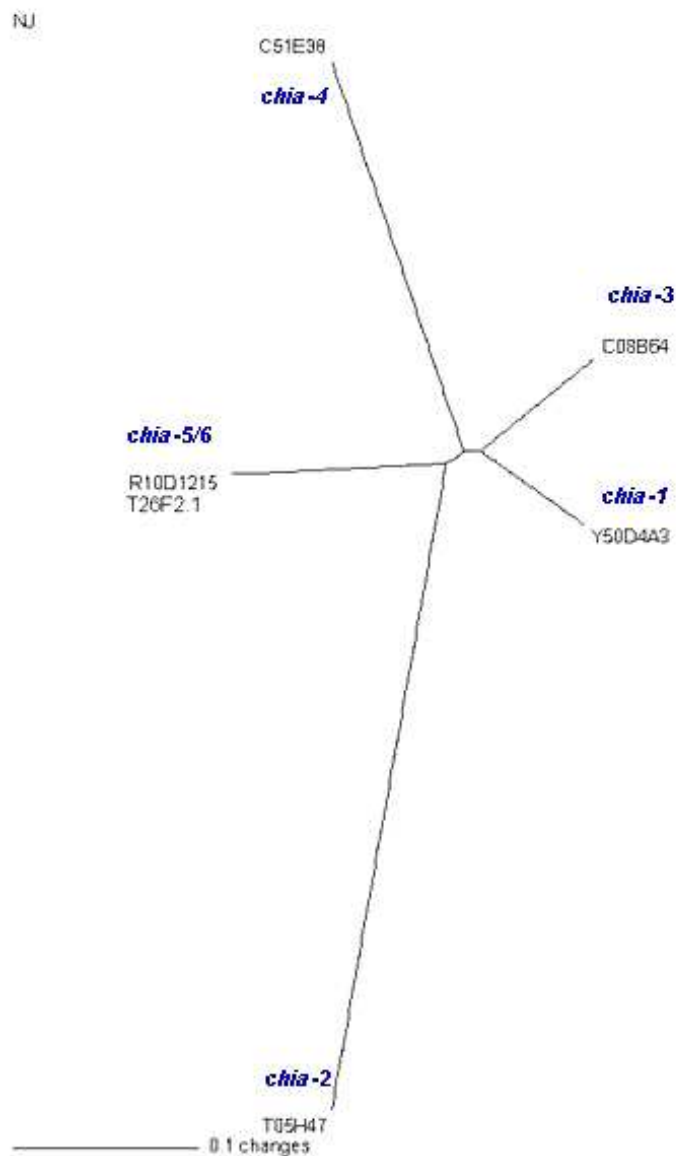


Fig. 39 : Evaluation du taux de similarité entre les différentes séquences de chitinases de la famille 19. Les feuilles représentent les différents gènes et chaque branche est graduée.

Les différentes séquences d'acides aminés des chitinases de la famille 19 sont alignées avec *Clustal W* [<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>] afin de pouvoir comparer les séquences connues de chitinases de chacune des classes I (orge *Hordeum vulgare*, riz *Oryza sativa*, vigne *Vitis vinifera*), classe II (orge, arachide *Arachis hypogaea*, pois sabre *Canavalia ensiformis*) et classe IV (arabette *Arabidopsis thaliana*, riz) des plantes ainsi qu'une séquence de chitinase de bactéries (*Streptomyces griseus*). Ces alignements permettent la comparaison des différentes séquences de chitinases de la famille 19 provenant des plantes, des bactéries et les séquences de chitinases de la famille 19 des nématodes *C. elegans* et *A. suum* (Fig. 40).

H.vulgare\_I MRGPSVVVAIVAVIVLSAALAMAMVVR-AQQCGSQAGGATCPNCLCCSRFGYC----- 51  
H.vulgare\_II MR-----AFVLFVAVVAMAATMAVAEQCGSQAGGATCPNCLCCSRFGWC----- 43  
O.sativa\_I MKATT-----TAVALLVAAAAMVAQVVAEQCGSQAGGALCPNCLCCSSYGWC----- 47  
A.hypogaea\_II MK-----FCNFFTFTLALIVVLQA---LGASA----- 24  
C.ensiformis\_II MK-----LGSVFTFTLAYILLVTSKLPVAVG----- 27  
V.vinifera\_I MG-----LWALVAFCLLSLILVGSAEQCGGQAGGRVCPGGACCSKFGWC----- 44  
A.thaliana\_IV MLT-----PTISKSLSVTLILVLQAFSNTTKAQNCGCSSELCCSQFGFC----- 45  
O.sativa\_IV -----MANSPTLTMVFLAIGLS-----LVLS----- 22  
S.griseus MYR-----RVMSLLVALGAIVAAIVLVP-ATTAQAATCATAWSSSSVYTN----- 44  
chia-1 MSETY-----ANFTF-----IDCSIVSASRFGNASL----- 26  
chia-3 MTRIKSVILTFLIF-----AHNSIVSAVDYGNASS----- 31  
chia-5/6 MSAQFVAFLLIAFNLSLPANAFNGANASVGLFGNASS----- 37  
chia-4 MTFLCILGILCRSIAE-KSGYMRLKISICQSEKMCYL----- 36  
chia-2 MAEQRANKTSRCSISS-VLFRASPLSSASAFNPFVRSGLSASFPKSDSLCTLTDASFN 59  
A.suum -----SLLIPLF-----YVTKKINASFD----- 18

H.vulgare\_I -----GSTDYCGAGCQSQSCGCG-----PTPPGPPSGGG-----V 82  
H.vulgare\_II -----GSTP-YCGDGCQSQSCGCGGGSTPVTPTPSGGGG-----V 77  
O.sativa\_I -----GSTDYCGDGCQSQCDGCGGGGGGGGGGGGGGGGAV 85  
A.hypogaea\_II -----DDAG----- 28  
C.ensiformis\_II -----DDVG----- 31  
V.vinifera\_I -----GNTADYCGSGCQSQC-----SSTGDIG----- 66  
A.thaliana\_IV -----GNTSDYCGVGCQQGPCFAP-----PPANGVS-----V 72  
O.sativa\_IV -----AAGVS-----V 28  
S.griseus -----GGTVSYNGRNYTAKWWTQ-----NERPG-----T 68  
chia-1 -----CPKATKYGKRPPKSCTRPT-----DPNNLPASKL 55  
chia-3 -----CPKAAKYGTGPPESCTQPT-----DPNNMPASEL 60  
chia-5/6 -----CPKAAKFGKPPKSCTIPS-----DPNNKPAQSL 66  
chia-4 -----IIIVKSGNGPPKSCTPPT-----DPNNLPASKL 65  
chia-2 PMQLLFLLLFTPYTIVGESPDFCPQHPVYKPEEEDCAQAS-----DPNELPKSPL 110  
A.suum -----CPPQQRFGMGPPSSCAPS-----DPNNLPSEL 47

H.vulgare\_I SSIISRDLFQFLLR-DR-CQD-----AAGFYTYDAFLAAATFPFAGTTG 127  
H.vulgare\_II SSIIVSRALFDRMLLHRNDGACQ-----AKGFYTYDAFVAASAFRGGFTTG 123  
O.sativa\_I EIVVSKELFELLLHRNDAAACP-----ARGFYTYDAFVAASAFDFFAATG 131  
A.hypogaea\_II -TIITQPLYNEFLKHTDSRCE-----AHGFYTYNAFVFAARAFPAFGTTG 73  
C.ensiformis\_II -SVIDASLFDQLLKHNDPACFE-----GKGFYSYNAFVFAARSEGGFTTG 76  
V.vinifera\_I -CLITRSMFNMLKHRNEGSCPE-----GKGFYTYDAFVAASAFDFFAATG 111  
A.thaliana\_IV AEIVTQEFFNGLISQAASSCAG-----NRFYSRGAFLAALDSYSRFGRVG 117  
O.sativa\_IV ESVVTQEAFFNGLKQAPNCCAG-----KSFYTRQSFLNAARSYSGFANDR 73  
S.griseus SFVWADKGCAGTGGEGPCCNNGFVVSSEAQFNQMFNPNRNAFYTYRGLTDAALSYPAFAATG 128  
chia-1 ESWFTRMFEDLFPFANLQWGP-----SSCWPYSYDAFKIASRPFPEFGTST 102  
chia-3 ESWFTRMFEDLFPFANLQWGP-----SSCWPYSYDAFKIASRPFPEFGTST 107  
chia-5/6 ESWFTRMFEDLFPFANLQWGP-----SSCWPYSYDAFKIASRPFPEFGTST 113  
chia-4 ECWFTRMFEDLFPFANLQWGP-----SSCWPYSYDVFKIASRPFPEFGTST 112  
chia-2 EKWFTRMFEDLFPKSNLQWGP-----HPCLPYSYEFITMAARPFPEFGAAH 157  
A.suum ETWFTKDVFEDEFPYANLQWGP-----NKCWPYSYEAFLVIAARPFPEFGTSS 94

H.vulgare\_I STET-----RKLEVAAFFAQISHETGGWATAPD----- 156  
H.vulgare\_II GTDT-----RKREVAAFFAQISHETGGWATAPD----- 152  
O.sativa\_I DDEA-----RKREVAAFFAQISHETGGWATAPD----- 160  
A.hypogaea\_II DDVT-----RKRELAFFAQISHETGGTTNAPD----- 102  
C.ensiformis\_II DTNT-----RKREVAAFFAQISHETGGGAAGSPD----- 105  
V.vinifera\_I DTTT-----RKREIAAFFAQISHETGGWASAPD----- 140  
A.thaliana\_IV STDD-----SREIAAFFAHVTHETGR----- 139  
O.sativa\_IV TNDD-----SKREIAAFFAHVTHETG----- 94  
S.griseus SDEV-----KKREIAAFFANVSHETG----- 149  
chia-1 NVNN-----KLE-----AVRS-----DASNCFYRGGFYNNWF 128  
chia-3 NVNNTVYTADENKKRDLAFFFAHVAQETGENNIALY--DTLSDQDASNCFYRGGFYNNWF 165  
chia-5/6 NVNNTVYTADENKKRDLAFFFAHVAQETGENNINYLY--TALPDQEASNCFYRGGFYNNWF 171  
H.megidis -----KRDIAAFFFAHVAQETRENNINYLY--TALPDQEASNCFYRGGFYNNWF 45  
chia-4 NVNNTMYILHENKKRDLAFFFAHVAQETSKLMN--F--RHQSDQDASNCFYRGGFYNNWF 168  
chia-2 PNKQ--FKADEHHKRDVAFFFAHVAQETGENDASVYNNNTDLTLEQAHECFYRGGFYNNWF 215  
A.suum PNTV--HTKEQNTRRDLAFFFAHVAQETGANDASLYG--GGRTVQEAANDCFYRGGFYNNWF 151  
B.malayi -----KRDVAFFFAHVAQETGENDASVYNNNTDLTLEQAHECFYRGGFYNNWF 47

\*\*\*\*\*C1\*\*\*\*\*

```

H.vulgare_I      -----GPYSWGYCYRERELGSP--PLYCQFS-----SQWPCV-----QDRQ--YY 191
H.vulgare_II    -----GFAWGYCFKQERGAT--SNYCTFS-----AQWPCA-----PGKS--YY 187
O.sativa_I      -----GPYSWGYCFKREIAAA--ASYCVAS-----AEWPCA-----ADKK--YF 195
A.hypogaea_II   -----EFEWGYCFRERQTKR--QHCDST-----QAPCP-----AGKQ--YY 134
C.ensiformis_II -----GPYAWGYCFWTERDKS--NKYCDP-----GTECP-----AGKS--YY 138
V.vinifera_I    -----GPYAWGYCYRERQGSP--GAYCVFS-----AQWPCA-----AGRK--YY 175
A.thaliana_IV   -----NFCYTEREIDGAS--KDYCDENA-----TQYPCN-----PNKG--YY 171
O.sativa_IV     -----HMCYINERINGAN--MDYCDRSN-----KQWPCQ-----PGKK--YY 126
S.griseus       -----GLFYTKERVNEANYPHYCDIT--QSYECP-----AGQAA--Y 182
chia-1          GGPISFLDPKTPGYTPSDGNSCASSAGLYCSASDQITYFYFPCSNSTVSNT--AAPYKGCYF 187
chia-3          GGPTSSFLDPKTPGYTPADGNSCASSAGLYCSASDQITYFYFPCSNSTISNT--AAPYKGCYF 224
chia-5/6        GGPSSNFLNPETPGHSPIDGNSCTSAGRYCSASDQITFFYFPCSNSTISNP--AAPYKGCYF 230
H.megidis       GGPSSNFLNPETPGHSPIDGNSCTSAGRYCSASDQITFFYFPCSNSTISNP--AAPYKGCYF 104
chia-4          RGPTSSFLDPKTPGYTPADGNSCASSAGLYCSASDQITYFYFPCSNSTISNT--VASHRGCYF 227
chia-2          RGPNSTFLSPAAPGFSFDFGKRCTDEGRYCKSDPIIDFWYPCNSDIESHSDKEYHKGYF 275
A.suum          GGPVSSFLNPNPSPGYQPDNGRECNVAGIYCSSSPEISYWYPCKGSTEPING--YYTGCYF 209
B.malayI       RGPNSTFLSPAAPGFSFDFGKRCTDEGRYCKSDPIIDFWYPCNSDIESHSDKEYHKGYF 107
    
```

```

H.vulgare_I      GRGPIQLSWNYNYGPAGRAIG-----VDLLNNDPLVA--TDAVVSFRTALWFWMTPQANK 244
H.vulgare_II    GRGPIQLSWNYNYGPAGRAIG-----VDLLNNDPLVA--TDAVVSFKTALWFWMTPQANK 240
O.sativa_I      GRGPIQLSYNYNYGPAGRAIG-----FDLLNNDPLVA--SDPVVSFKTALWFWMTPQANK 248
A.hypogaea_II   GRGPIQLTSNRYNYQLAGQAIK-----ADLINDPLVA--TDAVVSFKTALWFWMTPQANK 187
C.ensiformis_II GRGPIQLTHNYNYAQAARALG-----VDLINDPLVA--RDAVVSFKTALWFWMTPQANK 191
V.vinifera_I    GRGPIQLSYNYNYGQAGRAIG-----VDLVNNDPLVA--TDAVVSFKTALWFWMTPQANK 228
A.thaliana_IV   GRGPIQLSWNYNYGPAGRAIG-----FDLNAPEAVA--TDAVVSFKTALWFWMTPQANK 223
O.sativa_IV     GRGPIQLSWNYNYGPAGRAIG-----FDLNRDPLVA--QDAVVSFKTALWFWMTPQANK 178
S.griseus       GRGPIQLSWNYNYKAGRAIG-----INLLNNDPLVA--QDAVVSFKTALWFWMTPQANK 235
chia-1          GRGAIQLSYNYNYGQFQDWLRITVNIKVDLLKBPMLVMTKMDPELAVLASLWFYMTPOANK 247
chia-3          GRGAIQLSYNYNYGQFQDWLRITVNIKVDLLKBPMLVMTKMDPELAVLASLWFYMTPOANK 284
chia-5/6        GRGAIQLSYNYNYGQFQDWLRITVNIKVDLLKBPMLVMTKMDPELAIMASLWFYMTPOANK 290
H.megidis       GRGAIQLSYNYNY----- 117
chia-4          GRGTIQLSYNYNYGQFQD--SRTLKKTIN-----NSSAFHTYFIVIMSVRKL----- 272
chia-2          GRGALQLSWNYNYGLFQQFLLTKGVKVDLINDPLVMTKMDPELAIMASLWFYMTPOANK 335
A.suum          GRGALQLSYNYNYGQFQNLHRSRGINVLLAENLVMTKMDPELAVLASLWFYMTPOANK 269
B.malayI       GRGALQLSWNYNY----- 120
    
```

~~~~~ C2 ~~~~~

~~~~~ C3 ~~~~~

```

H.vulgare_I      PSSHAVITGGWTPPTAADTAAGRVPG--YGVITNIIIN--GGLECIRGADSRVADRIGFYQR 300
H.vulgare_II    PSSHAVITGGWTPSGTDRAGRVPG--FGVITNIVN--GGIECIRGQDSRVADRIGFYQR 296
O.sativa_I      PSCHDVITGGWTPSSGDIAGRVPG--YGVITNIIIN--GGLECIRGPDDRVANRIGFYQR 304
A.hypogaea_II   PSCHDVITINAWPTATDSAAGRAPG--YGVITNIIIN--GGIECIRGKANTNSNRRIGFYQR 243
C.ensiformis_II PSCHDVITINRWTPSAADVAARTPG--FGVITNIIIN--GGIECIRGSPSPASGDRIGFYQR 247
V.vinifera_I    PSCHDVITGGWTPSGDRASAGRLPG--FGVITNIIIN--GGVECIRGKVVPPQVQDRIGFYQR 284
A.thaliana_IV   -----VISQG--FGATIRAIN--GALECDGANTATVQARVRYTD 259
O.sativa_IV     -----VMSQG--FGATIRAIN--GALECNKGNPAGAVNARVRYTD 214
S.griseus       T-----MTPHNAIVNNAAG--FGETIRASIN--GALECNNGNPAQVQSRINRYTD 279
chia-1          PAMHDIVMGWNSGAKNAAGYDGPVFGPPTS--LIINNECSGEDPTNPGGPGESRRIKAPKW 307
chia-3          PAMHDIVMGWNSGAKNAAGYDGPVFGPPTS--LIINNECSGEDPTNPGGPGESRRIKAPKW 344
chia-5/6        PAMHDIVMGWNSGAQNSAAGYDGPVFGPPTS--LIINNECSGEDSKNPGGPGESRRIKAPKW 350
chia-2          PSMHIVMGWNSPKNRRRAGYQGAIFGPPTS--LIINNECSGEDPDEPGGPGESRRIKAPKW 395
A.suum          PAMHDIVGLWNSGPVDAAGYTGPIFGPPTS--LIINNECSGEDASNPGGPGESRRIKAPKW 329
    
```

~~~~~ C4 ~~~~~

```

H.vulgare_I      YCNILGVGYGNN--LRCYNQRPFVEGLLIQRVTE----- 332
H.vulgare_II    YCDILGVGYGNN--LRCYSQRPFA----- 318
O.sativa_I      YCDVILGVGYGNN--LRCYDQRPFNGLAAVQ----- 333
A.hypogaea_II   YCDILKIGYGSN--LRCANQHF----- 264
C.ensiformis_II YCDVILVSYGNN--LRCRDQRPFVGG----- 270
V.vinifera_I    YCDILVSYGNN--LRCNNQRPFVGSLLLDTI----- 314
A.thaliana_IV   YCRQLGVDPGNN--LRC----- 274
O.sativa_IV     YCRQGVSPGNN--LRC----- 229
S.griseus       FTQILGFTTGPNN--LRC----- 294
chia-1          FNGYFGSPVGPETHLSCK---MKLDAISHNLSYQPNWLTWSWKEEPCDCAPASYGGLVNY 364
chia-3          FCGYFDTPTGPEATLSCKNMPVPLDQIFYNLSYQPDWSTWVKVPCDCAPASYGGLIFYY 404
chia-5/6        FNGYFGSPVGPETHLSCKGKMPVKLNAIPHYQSYQPDWSSSWKPERCDAPASYGGLVYF 410
chia-2          FCKYFVVPVGSERTLSCKGMLDGFDAVQHMYSWHPDWGNMWSQSCDCAPASYGGLPY 455
A.suum          FCNYFVVPVGEORLLSCKDMPQKFDMMRYNLSYQPDWSSWKEEPCDCAPATYAGIVPYF 389
    
```

|          |                                                           |     |
|----------|-----------------------------------------------------------|-----|
| chia-1   | DPVYYPAKFAAQNEINRKKCIKSIYAKPSMYSMDDKKTSACLNH-----         | 407 |
| chia-3   | DPDYYPSSFAAQNDYNRKICIASIYANPSMYSMDDKKTSPCLNY-----         | 447 |
| chia-5/6 | DPNYYPASFVAQNLDLNRKKCIETVYANPSMYFMDKKNSLCLNY-----         | 453 |
| chia-2   | DPKLYPHEFTKQNDNRNLRRCVYSMYESPETFRLDAGNSPCLKHKPKIRLTGTGIRG | 511 |
| A. suum  | DPDYYPEEFVALNEENRKYVIVSYENPSMYGMVPALNPCLEYD---TIEGSGTN-   | 441 |

**Fig. 40 :** Les acides aminés sont mis en évidence en fonction de leur conservation. Les identités sont représentées en **bleu gras**. Les acides aminés présentant les mêmes propriétés biochimiques (similarités) sont écrits en **blanc sur fond noir** : E-D, T-S, K-R, Y-F-W, I-L-V-M et Q-N-H. Le site catalytique composé de 2 régions est indiqué en **rouge gras**. Quatre régions conservées des chitinases de la famille 19 sont mises en évidence avec la ligne orange **\*\*\*** et seront nommées C1, C2, C3 et C4. Trois ponts disulfures semblent encore conservés chez les plantes et les nématodes (**turquoise**).

Cet alignement permet en effet de mettre en évidence les identités et les similarités entre les différentes séquences codant pour des chitinases de la famille 19. L'observation détaillée de cette comparaison met en évidence nette la répartition entre les chitinases de la famille 19 provenant des plantes et des bactéries et celles provenant des nématodes. La région catalytique semble particulièrement conservée chez tous les organismes avec comme site catalytique HET et E chez les plantes et les bactéries et QET et E chez les nématodes. Visiblement, *chia-1* présente une région dégénérée ne contenant pas le site catalytique. Une première région semble être spécifique à la chitinase bactérienne de *S. griseus*, des positions 91-103. Plusieurs régions d'espacement (gap) semblent également propres aux plantes et aux bactéries principalement encadrant le site catalytique : une zone en amont, une zone intermédiaire et les autres zones en aval (tirets magenta). Quatre régions semblent encore spécifiques aux chitinases de la famille 19 classe IV regroupant les chitinases de plantes (*A. thaliana IV* et *O. sativa IV*) et la chitinase de *S. griseus* représentées ici par des tirets jaunes. En effet, la région d'espacement intermédiaire (comprise entre le site catalytique) débute avant et se termine après pour les chitinases de la famille 19 classe IV (positions 139 chez *A. thaliana IV*, 94 chez *O. sativa IV* et 149 chez *S. griseus*). La région spécifique suivante se situe aux positions 224 pour *A. thaliana IV*, 179 pour *O. sativa IV* et 237 pour *S. griseus*. La dernière particularité des chitinases de la classe IV se retrouve au C-terminal de la séquence avec le dernier résidu cystéine. La zone de fixation semble également différente selon les organismes. Les séquences des nématodes se terminent effectivement bien au-delà de celles des plantes et des bactéries. Les séquences codant pour des chitinases semblent ainsi très variables selon les organismes. Un nouvel alignement est alors effectué ne rassemblant cette fois que les séquences codant pour les chitinases de la famille 19 chez les nématodes (Fig. 41).

Un alignement est alors effectué rassemblant cette fois uniquement les séquences codant pour les chitinases de la famille 19 chez les nématodes.

|            |                                                                                                                                                                                                          |     |
|------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| chia-1     | -----MSETY-----ANFTF-----IDCSIVSASRFGNASLCP-----                                                                                                                                                         | 28  |
| chia-3     | -----MTRIKSVILTVFLIF-----AHNSIVSAVDYGNASSCP-----                                                                                                                                                         | 33  |
| chia-5/6   | -----MSAQFVAFLLIAFNLSLPANAFNGANASVGLFGNASSCP-----                                                                                                                                                        | 39  |
| chia-4     | -----MTFLCILGILCRSIAE---KSGYMLRKISICQSEKMCYL-----                                                                                                                                                        | 36  |
| chia-2     | MAEQRANKTSRCSISSVLFRAHSPLSSASAFNPCFVRSGLSASFPKSDSLCTLTLDASFP                                                                                                                                             | 60  |
| A. suum    | -----SLLIFLF-----YVTKKINASFD-----                                                                                                                                                                        | 18  |
|            |                                                                                                                                                                                                          |     |
| chia-1     | -----KATKYGKRPKSCTRPTDPNNLPASKLESWFTREMFE                                                                                                                                                                | 65  |
| chia-3     | -----KAAKYGTGPPESCOTQPTDPNMPASELESWFTREMFE                                                                                                                                                               | 70  |
| chia-5/6   | -----KAAKFGKGPKSCITIPSDPNMKPASQLESWFTREMFE                                                                                                                                                               | 76  |
| chia-4     | -----IIIVSKSGNGPKSCITPPTDPNNLPASKLECWFTREMFE                                                                                                                                                             | 75  |
| chia-2     | MQLLFLLLFTPYTIVGESPDFCPQHPVYCKEPEEDCAQASDPNELPKSPLEKWFTKQMF                                                                                                                                              | 120 |
| A. suum    | -----CPPQQRFGMGPSSCAPSDPNNLPPSELETWFTKDVFE                                                                                                                                                               | 57  |
|            |                                                                                                                                                                                                          |     |
| chia-1     | DLFPFANLGGWGPSSCWPPYSYDAFKIASRYFFPFGTSLNVNN-----K-E-----                                                                                                                                                 | 108 |
| chia-3     | DLFPFANLGGWGPSSCWPPYSYDAFKIASRYFFPFGTSLNVNNVTVYTADENKKRDLAAFFAH                                                                                                                                          | 130 |
| chia-5/6   | DLFPFANLGGWGPSSCWPPYSYDAFKIASRYFFPFGTSLNVNNVTVYTADENKKRDLAAFFAH                                                                                                                                          | 136 |
| H. megidis | -----KRDKAFFFAH                                                                                                                                                                                          | 10  |
| chia-4     | DLFPFANLGGWGPSSCWPPYSYDAFKIASRYFFPFGTSLNVNNVTVYTADENKKRDLAAFFAH                                                                                                                                          | 135 |
| chia-2     | DLFPKSNLGMGPHCLPYSYSEFVIAARYFFPFGAA--HPNKQFKADEHHKRDLVAFFAH                                                                                                                                              | 178 |
| A. suum    | DLFPFANLGGWGNKCPYSYEAFFVIAARYFFPFGTSL--SPNTVHTKEQNTRRDLAAFFAQ                                                                                                                                            | 115 |
| B. malayi  | -----KRDVAFFFAH                                                                                                                                                                                          | 10  |
|            | .....N1.....C1.....                                                                                                                                                                                      |     |
|            |                                                                                                                                                                                                          |     |
| chia-1     | AVRS-----DASNCFYRGGFYNWFE <sup>*</sup> GPISSFLDPKTPGYTPSDGNSC                                                                                                                                            | 151 |
| chia-3     | AVQETGENNIALYD--ILSDQDASNCFYRGGFYNWFE <sup>*</sup> GPTSSFLDPKTPGYTPADGNSC                                                                                                                                | 188 |
| chia-5/6   | AIQETGENNNLYT--ALPDQDASNCFYRGGFYNWFE <sup>*</sup> GPTSSFLNPE <sup>*</sup> T <sup>*</sup> PGHSPTDGNSC                                                                                                     | 194 |
| H. megidis | AIQETRENNNYLYT--ALPDQDASNCFYRGGFYNWFE <sup>*</sup> GPTSSFLNPE <sup>*</sup> T <sup>*</sup> PGHSPTDGNSC                                                                                                    | 58  |
| chia-4     | AIQETSKLMN--LR--HQSDQDASNCFYRGGFYNWFE <sup>*</sup> GPTSSFLDPKTPGYTPADGNSC                                                                                                                                | 191 |
| chia-2     | ALQETGENDASVYNNNTDLTLEQAHECFYRGGFYNWFE <sup>*</sup> RGPNSTFLSPAAPGFSPFDGKRC                                                                                                                              | 238 |
| A. suum    | ALQETGANDASLYG--GGRTVQDANDCFYRGGFYNWFE <sup>*</sup> GPTSSFLNPNSTPGYQPN <sup>*</sup> DGRC                                                                                                                 | 174 |
| B. malayi  | ALQETGENDASVYNNNTDLTLEQAHECFYRGGFYNWFE <sup>*</sup> RGPNSTFLSPAAPGFSPFDGKRC                                                                                                                              | 60  |
|            | .....N2.....                                                                                                                                                                                             |     |
|            |                                                                                                                                                                                                          |     |
| chia-1     | SSAGLYCSASDQITYFYPCSNSTVSNTA--APYKGCYFGRGAIQI <sup>*</sup> ISYNYNYGQFQD <sup>*</sup> DWLR <sup>*</sup> TV                                                                                                | 210 |
| chia-3     | ASAGLYCSASDQITYFYPCSNSTISNTA--APYKGCYFGRGAIQI <sup>*</sup> ISYNYNYGQFQD <sup>*</sup> DWLR <sup>*</sup> TV                                                                                                | 247 |
| chia-5/6   | TSAGRYCSASDQITFFFYPCSNSTISNPA--APYKGCYFGRGGI <sup>*</sup> QI <sup>*</sup> ISYNYNYGQFQD <sup>*</sup> DWLKSV                                                                                               | 253 |
| H. megidis | TSAGRYCSASDQITFFFYPCSNSTISNPA--APYKGCYFGRGGI <sup>*</sup> QI <sup>*</sup> ISYNYNY-----                                                                                                                   | 117 |
| chia-4     | ASAGLYCSASDQITYFYPCSNSTISNTV--ASHRGCYFGRGTI <sup>*</sup> QI <sup>*</sup> ISYNYNYGQFQD <sup>*</sup> SR---                                                                                                 | 247 |
| chia-2     | TDEGRYCKSDPIIDFWYPCNSDIE <sup>*</sup> SHSDKEYHKGCYFGRGALQI <sup>*</sup> ISWNYNYGLFQO <sup>*</sup> FL <sup>*</sup> LTK                                                                                    | 298 |
| A. suum    | NVA <sup>*</sup> GLYCS <sup>*</sup> SSPEISY <sup>*</sup> WYPCKGS <sup>*</sup> TEPING--Y <sup>*</sup> Y <sup>*</sup> TGCYFGRGALQI <sup>*</sup> ISYNYNYGQFQ <sup>*</sup> NWL <sup>*</sup> HSR              | 232 |
| B. malayi  | TDEGRYCKSDPIIDFWYPCNSDIE <sup>*</sup> SHSDKEYHKGCYFGRGALQI <sup>*</sup> ISWNYNY-----                                                                                                                     | 120 |
|            | .....C2-N3.....                                                                                                                                                                                          |     |
|            |                                                                                                                                                                                                          |     |
| chia-1     | NIKVDLLKEPNLVMTKMDPPLAVLASLWIFYMTPQPPKAMHDIVMGWNWSGAKNAAAGYD                                                                                                                                             | 270 |
| chia-3     | NIKVDLLKEPNLVMTKMDPPLAVLASLWIFYMTPQPPKAMHDIVMGWNWSGAKNAAAGYD                                                                                                                                             | 307 |
| chia-5/6   | NIITVDLLKEPNLVMTKMDPPLAVLASLWIFYMTPQPPKAMHDILMGWNWSGAKNSAAGYD                                                                                                                                            | 313 |
| chia-4     | -----TLKKKTNNSSAFHTYFTVIMSVRKI-----                                                                                                                                                                      | 272 |
| chia-2     | GVKVDLITENPNLVMTKMDPPLAMMASLWIFYMTPQPPKPSMHQIVTIGDWKPS <sup>*</sup> SKNRRAGYQ                                                                                                                            | 358 |
| A. suum    | GI <sup>*</sup> INVNLLAEPNLVLT <sup>*</sup> KMDPPIAVLASLWIFYMTPQPPKAMHDIIGLWNP <sup>*</sup> GPVDPKAAGY <sup>*</sup> T                                                                                    | 292 |
|            | .....C3.....                                                                                                                                                                                             |     |
|            |                                                                                                                                                                                                          |     |
| chia-1     | GP <sup>*</sup> IFGPTSLI <sup>*</sup> INNE <sup>*</sup> CSGEDPTNPGGPGESRRIKAFKWFNGYFGSPVGPBHTLS <sup>*</sup> CK <sup>*</sup> ---MK                                                                       | 327 |
| chia-3     | GP <sup>*</sup> IFGPTSLI <sup>*</sup> INNE <sup>*</sup> CSGEDPTNPGGPGESRRIKAFKWFNGYFGSPVGPBHTLS <sup>*</sup> CK <sup>*</sup> NMPV <sup>*</sup> E                                                         | 367 |
| chia-5/6   | GP <sup>*</sup> IFGPTSLI <sup>*</sup> INNE <sup>*</sup> CSGEDSKNPGGPGESRRIKAFKWFNGYFGSPVGPBHTLS <sup>*</sup> CK <sup>*</sup> KMPV <sup>*</sup> K                                                         | 373 |
| chia-2     | GA <sup>*</sup> IFGPTSLI <sup>*</sup> INNE <sup>*</sup> CGEDPDE <sup>*</sup> PGGPGESRRIKAFKWFCKYFKV <sup>*</sup> VPVGS <sup>*</sup> BRTLS <sup>*</sup> CK <sup>*</sup> GMLDG                             | 418 |
| A. suum    | GP <sup>*</sup> IFGPTSLI <sup>*</sup> INNE <sup>*</sup> CGEDASNPGGPGESRRIKAFKWF <sup>*</sup> CNYF <sup>*</sup> CV <sup>*</sup> PEY <sup>*</sup> GEORLLS <sup>*</sup> CK <sup>*</sup> DMP <sup>*</sup> QK | 352 |
|            | .....C4.....                                                                                                                                                                                             |     |

```

chia-1  LDAISHNLSYQPNWLTWKEEPDCAPASYGGLVNYYPVYYPAAKFAAQNEILNRKKCKIS 387
chia-3  LDQIFYNLSYQPDWTSTWKDVPCTCAPASYGGLIFYYDPDYPPSSFAAQNDYNRKCTIAS 427
chia-5/6 LNAIPHYQSYQPDWSSSWKPERDCAPASYGGLVYYPDPNYYPASFVAQNDLNRKKCIET 433
chia-2  FDAVQHMYSWHPDWGNMWSQSDCAPAFYGGELPYYPDKLYPHEFTKQNDNRNRLRCVYS 478
A. suum  FDMRYNLSYQPDWSSSTWKSEPCQCAPATYAGIVPYFDPDYYPPEEFVALNEENRKRYS 412

```

```

chia-1  IYAKPSMYSMDRKTSAQLNH----- 407
chia-3  IYANPSMYSMDNKTSPQLNY----- 447
chia-5/6 VYANPSMYFMDRKNLNLNY----- 453
chia-2  MYESPETERLDAGNSPOLKHKPKIRLTKTGIRG 511
A. suum  VYENPSMYGMVPALNPLEYD---TIEGSGTN- 441

```

**Fig. 41** : Les acides aminés sont mis en évidence en fonction de leur conservation. Les identités sont représentées en **bleu gras**. Les acides aminés présentant les mêmes propriétés biochimiques sont écrits en **blanc sur fond noir** : E-D, T-S, K-R, Y-F-W, I-L-V-M et Q-N-H. Le site catalytique composé de 2 régions est indiqué en **rouge gras**. Les 4 régions conservées des chitinases de la famille 19 sont mises en évidence avec la ligne orange

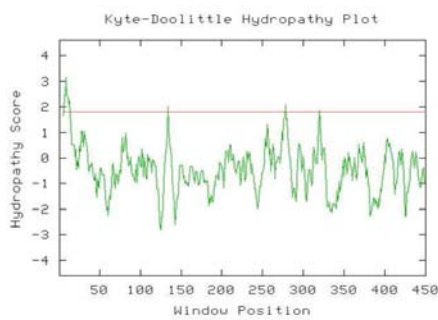
La première région, généralement composée de 10 à 30 acides aminés non-polaires et aliphatiques, constitue le signal peptide. Le domaine catalytique commence juste derrière contenant le site catalytique QET et E. La particularité du site catalytique des chitinases de la famille 19 consiste en 2 régions distinctes formant un site actif lorsque la protéine se retrouve dans sa conformation tridimensionnelle. Celui-ci est conservé dans toutes les séquences à l'exception de *chia-1* chez *C. elegans* qui présente sans doute une séquence dégénérée. Des résidus cystéine semblent conservés en C-terminal chez les nématodes, au nombre de 6 pour *C. elegans* et 7 pour *A. suum*. Trois ponts disulfures semblent également conservés, structure tridimensionnelle de stabilisation. Les régions de très forte conservation (C1, C2, C3 et C4) concernant l'ensemble des chitinases de la famille 19 (ligne ondulée orange) semblent ici côtoyer 3 régions conservées spécifiques aux nématodes qui ont été nommées N1, N2 et N3 (ligne ondulée magenta). La première séquence N1 comprend 54 acides aminés, N2 en contient 30 et la séquence N3, 21 acides aminés. Ces différentes régions, généralement conservées pour les 8 séquences de chitinases de la famille 19 chez les nématodes montrent une très grande similarité entre elles. La conservation au sein des séquences codant pour des chitinases de la famille 19 chez les nématodes est ainsi très forte bien que *C. elegans*, *B. malayi*, *H. megidis* et *A. suum* ne proviennent pas de la même famille selon la systématique.

### Profil d'hydrophatie

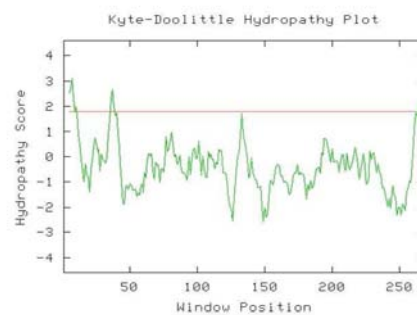
Les interactions entre des acides aminés hydrophobes et hydrophiles stabilisent la structure tertiaire des protéines. La valeur d'hydrophatie de chaque acide aminé est définie entre -4.5 et 4.5 sur une

fenêtre de 8 acides aminés ; plus la moyenne est élevée plus la séquence est hydrophobe. Le domaine transmembranaire est quant à lui prédit par un plateau présent au-delà de 1.8 (Fig. 42 indiqué par la ligne rouge).

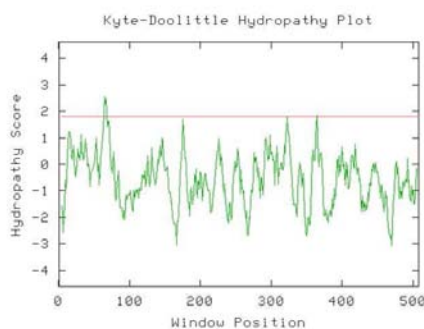
Les séquences codant des chitinases de la famille 19 chez *C. elegans* présentent toutes un profil généralement hydrophile avec au départ quelques acides aminés hydrophobes (moins de 100 correspondant au peptide signal) (Fig. 41). La très grande conservation observée dans l'alignement des différentes séquences de chitinases de la famille 19 se manifeste également dans l'analyse de l'hydropathie. En effet, les 5 protéines semblent ainsi construites sur le même schéma. La séquence des acides aminés possède en effet les mêmes propriétés et aucune de ces différentes séquences de chitinases ne présente de domaine transmembranaire.



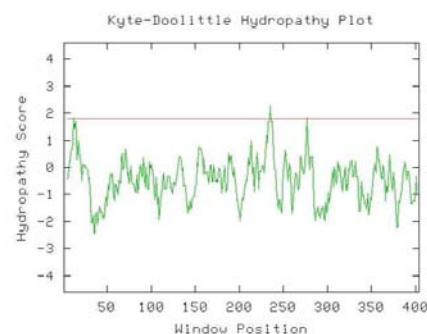
a) Protéine *chia-1*



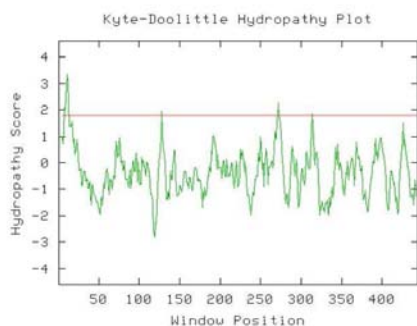
b) Protéine *chia-2*



c) Protéine *chia-3*



d) Protéine *chia-4*



**Fig. 42 :** Graphiques de Kyte et Doolittle calculé pour chacune des séquences de chitinases de la famille 19. L'abscisse représente la position de chacun des acides aminés et l'ordonnée porte la valeur d'hydropathie de chacun d'eux.

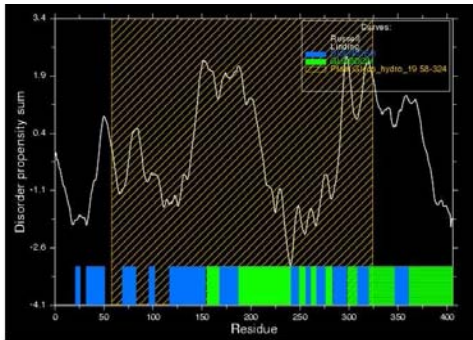
e) Protéine *chia-5/6*

Analyse des profils protéiques des chitinases de la famille 19 chez *C. elegans*

Deux grands groupes de comparaison existent pour l'analyse des domaines de protéines : les domaines Pfam (Protein FAMily) et les domaines Smart (Simple Modular Architecture Research Tool) qui rassemblent une collection de familles de protéines diverses pour lesquelles de multiples informations sont disponibles (alignements, distribution au sein des espèces et modélisation). En effet, les domaines répertoriés sont annotés en fonction de leur distribution phylogénique, de leur classe fonctionnelle et de leur structure tertiaire.

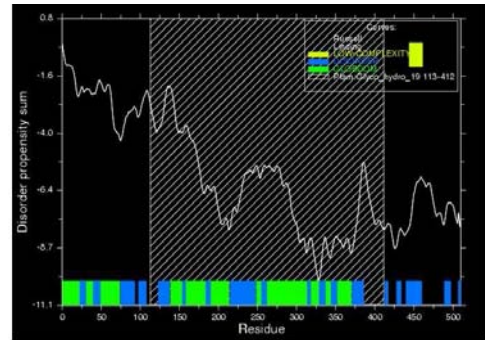
Les domaines Pfam/Smart ont alors été recherchés dans les séquences de chitinases de la famille 19 afin de prédire la structure et la fonction de ces protéines. Cette recherche se fait à l'aide des globplot, programme de comparaison entre la séquence donnée et les différents domaines (Pfam/Smart), afin d'identifier les motifs connus et les régions ne contenant apparemment aucun domaine identifié.

Les globplot des protéines *chia-1*, *chia-2*, *chia-3* et *chia-5/6* présentent tous des homologies avec le domaine catalytique glyco\_hydro\_19, spécifique aux chitinases de la famille 19. Pour les protéines *chia-3* et *chia-5/6*, un peptide signal a même été retrouvé au début de la séquence. En ce qui concerne la protéine *chia-4*, sa séquence incomplète ne permet pas de trouver d'homologie avec un quelconque domaine Pfam ou Smart (Fig. 43).



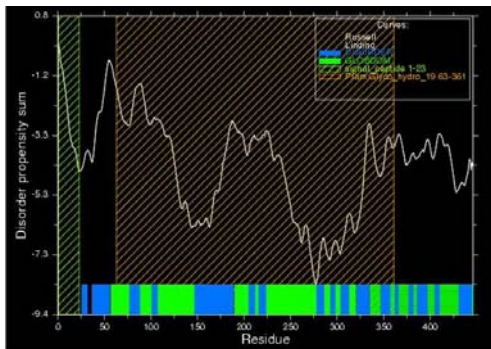
a) Protéine *chia-1*

Homologie avec le domaine glyco\_hydro\_19  
(Résidus 58-324)



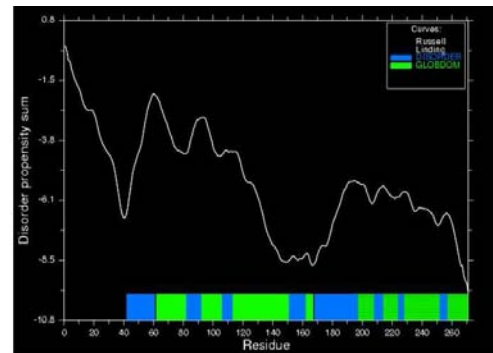
b) Protéine *chia-2*

Homologie avec le domaine glyco\_hydro\_19  
(Résidus 113-412)



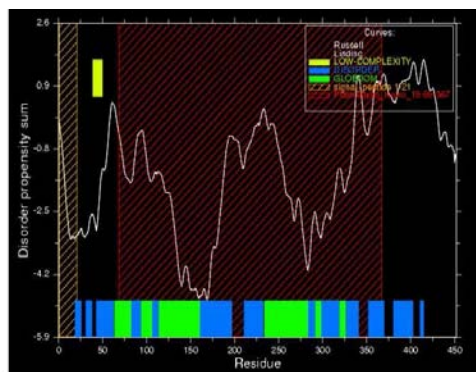
c) Protéine *chia-3*

Homologie avec un peptide signal  
(Résidus 1-23)  
Homologie avec le domaine glyco\_hydro\_19  
(Résidus 63-361)



d) Protéine *chia-4*

Aucune homologie détectée



e) Protéine *chia-5/6*

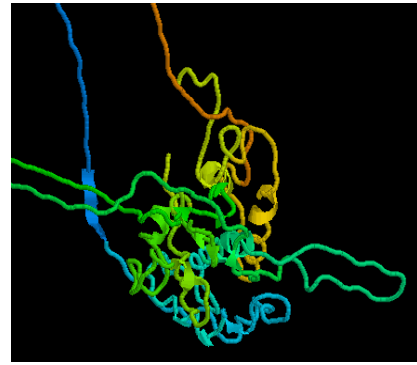
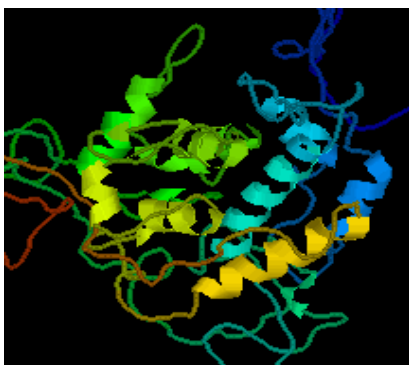
Homologie avec un peptide signal  
(Résidus 1-21)  
Homologie avec le domaine glyco\_hydro\_19  
(Résidus 69-367)

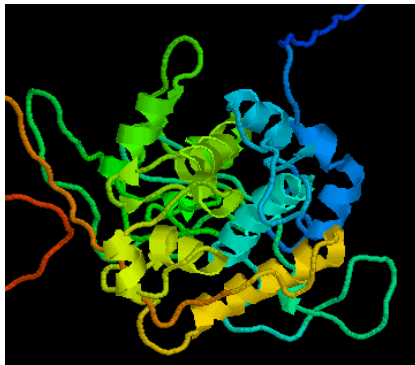
Fig. 43 : Pour l'analyse Globplot, l'abscisse représente les acides aminés et l'ordonnée la propension au désordre.

- Domaine de faible complexité
- Domaine théorique souvent prédit par les domaines Smart/Pfam
- Désordre prédit des protéines
- Domaine prédit (Pfam/Smart)

Visualisation

Une modélisation tridimensionnelle a été effectuée avec RasMol, version 2.7. Ce programme d'utilisation relativement simple permet en effet la visualisation en 3D des molécules. Les différentes modélisations de chitinases de la famille 19 présentent des caractères communs (Fig. 44). En effet, chacune des séquences possède une région globulaire renfermant le site catalytique. Il est visiblement composé de 2 repliements formant une crique. Une particularité encore à signaler est la présence d'une boucle plus ou moins grande à l'extrémité du site catalytique, donnant ainsi la forme d'un mousqueton au site catalytique. La grandeur de la boucle semble spécifique à chaque protéine. Les limites du programme ne permettent de modéliser que le domaine catalytique.

a) Protéine *chia-1*b) Protéine *chia-2*c) Protéine *chia-3*d) Protéine *chia-4*



e) Protéine *chia-5/6*

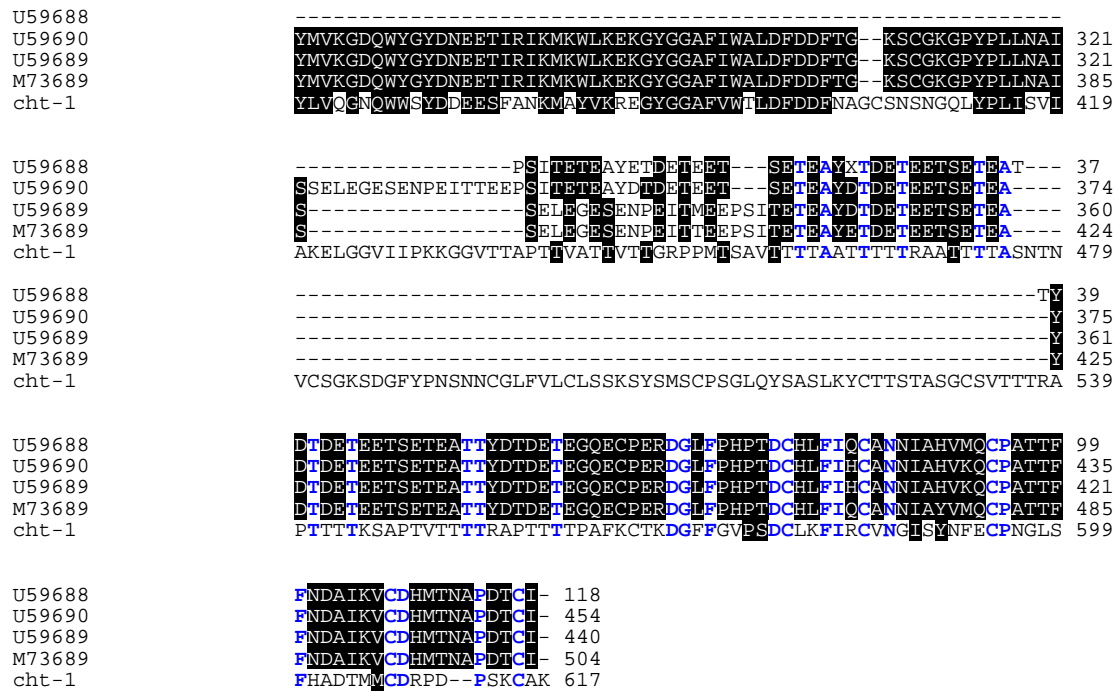
Fig. 44 : modélisation tridimensionnelle des sites catalytiques des chitinases de la famille 19 de *C. elegans* (réalisée avec *RasMol*, v.2.7).

Les modélisations sont ici présentées sous forme de ruban. Les différentes couleurs correspondent à la position des acides aminés ; le premier acide aminé se trouve à l'extrémité bleue et le dernier et le dernier acide aminé à l'extrémité rouge. Les motifs d'hélices  $\alpha$  et de feuillets  $\beta$  sont représentés et forment la structure secondaire des protéines.

### Analyse des chitinases de la famille 18 chez *B. malayi* et *B. pahangi*

Les banques de données (GenBank) contiennent 4 séquences d'ADN complémentaire de chitinases de *Brugia* spp. : U59688 et M73689 (*MF-1*) chez *B. malayi* et U59689 et U59690 chez *B. pahangi* [86]. Bien que déjà séquencés, aucune caractérisation moléculaire n'a été faite. Les 4 séquences de protéines ont été alignées avec *Clustal W* et une séquence codant pour une chitinase de la famille 18 de *C. elegans* (*cht-1*) a été ajoutée comme séquence de comparaison (Fig. 45).

|        |       |                                                                |     |
|--------|-------|----------------------------------------------------------------|-----|
| U59688 | ----- |                                                                |     |
| U59690 | ----- |                                                                |     |
| U59689 | ----- |                                                                |     |
| M73689 | ----- | -----MNRTTLILFFIILSNTITVIHGYVRCYYT                             | 30  |
| cht-1  | ----- | MLLGKFLLVASFILPIAYTWTGATIRNHPADVVAARNKITSRSVARSEPTNSYIRPCYFT   | 60  |
| U59688 | ----- |                                                                |     |
| U59690 | ----- | -----LGDSKAFEWNDEDIPEK-KGMYSAVT                                | 25  |
| U59689 | ----- | -----LGDSKPFEWNDEDTEWS-KGMYSAVT                                | 25  |
| M73689 | ----- | NWAQYRDGEGKFLPGNIPNGLCTHILYAFKVDLELGDSKPFEWNDEDTEWS-KGMYSAVT   | 89  |
| cht-1  | ----- | NWAQYRQGRAKFVPEDYTPGLCTHILYAFGWMMNADYTVRAYDPADLPNDWAGEGMYRRVN  | 120 |
| U59688 | ----- |                                                                |     |
| U59690 | ----- | KLRETNPGLKVLVLSYGGYNFGSAIFTGIAKSAQKTERFIKSAIAFLRKNNFDFGLDWEY   | 85  |
| U59689 | ----- | KLRETNPGLKVLVLSYGGYNFGSAIFTGIAKSAQKTERFIKSAIAFLRKNNFDFGLDWEY   | 85  |
| M73689 | ----- | KLRETNPGLKVLVLSYGGYNFGSAIFTGIAKSAQKTERFIKSAIAFLRKNNFDFGLDWEY   | 149 |
| cht-1  | ----- | KLKVTDTQLKLLSFGGWSFGTALFQGMASASARKVFIDSATIFVRFWGFDCIDIDWEY     | 180 |
| U59688 | ----- |                                                                |     |
| U59690 | ----- | PVGVAEEH--AKLVEAMKTAFAVEEAKTSGKQRLLLTAAVSACKGTIDGSYNVESLGNFD   | 143 |
| U59689 | ----- | PVGVAEEH--AKLVEAMKTAFAVEEAKTSGKQRLLLTAAVSACKGTIDGSYNVESLGNFD   | 143 |
| M73689 | ----- | PVGVAEEH--AKLVEAMKTAFAVEEAKTSGKQRLLLTAAVSACKGTIDGSYNVESLGNFD   | 207 |
| cht-1  | ----- | PSCATDMANYVALVKELEKAAACESEAGSTGKDRLLVTAAVAAGPATIDAGYDIPNLAPNFD | 240 |
| U59688 | ----- |                                                                |     |
| U59690 | ----- | LLFLMSYDLHGSWEKNVDLHGKLNHPTKGEVSGIGIFNTEFAADYWASKGMPKOKIIGIP   | 203 |
| U59689 | ----- | LLFLMSYDLHGSWEKNVDLHGKLNHPTKGEVSGIGIFNTEFAADYWASKGMPKOKIIGIP   | 203 |
| M73689 | ----- | LLFLMSYDLHGSWEKNVDLHGKLNHPTKGEVSGIGIFNTEFAADYWASKGMPKOKIIGIP   | 267 |
| cht-1  | ----- | FLLMSYDFFCAWASTVGFNSPLIYATTELPAEWNGWNVDSARVWNOKGMPEKIKIIVGMP   | 300 |
| U59688 | ----- |                                                                |     |
| U59690 | ----- | MYAQGWTLDNPSSETAIGAAASRPSSASKTNPAGGTASYWEICKYLKEGGKETIHQEGVGA  | 263 |
| U59689 | ----- | MYAQGWTLDNPSSETAIGAAASRPSSASKTNPAGGTASYWEICKYLKEGGKETIHQEGVGA  | 263 |
| M73689 | ----- | MYAQGWTLDNPSSETAIGAAASRPSSASKTNPAGGTASYWEICKYLKEGGKETVHQEGVGA  | 327 |
| cht-1  | ----- | TYGRGWTLNNAASAINPCTSGSPAKITQYVQVQAG-VGAVYFEFCMLANCATRYWDSQSQVQ | 359 |

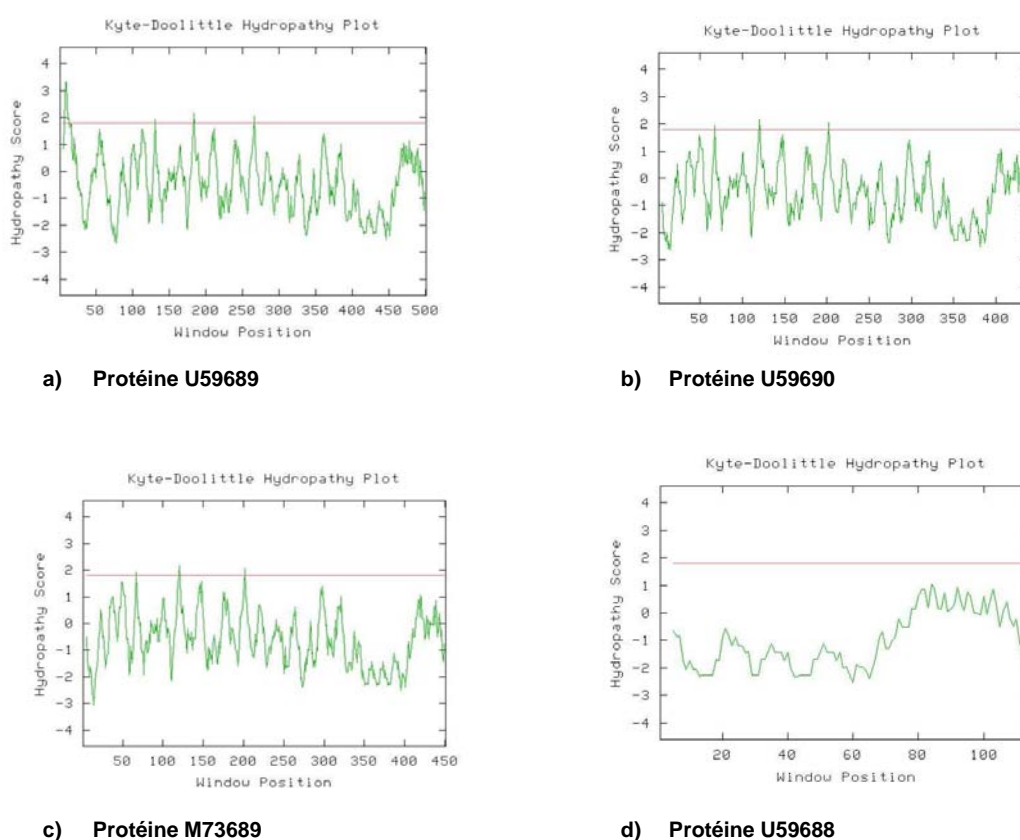


**Fig. 45 :** Alignement multiple des séquences des chitinases de la famille 18 provenant des espèces de *B. malayi* et *B. pahangi* en comparaison avec la séquence de chitinase déjà caractérisée *cht-1* de *C. elegans*. Plusieurs régions sont mises en évidence : les identités sont mises en évidence en **bleu gras** et les similarités E-D, T-S, K-R, Y-F-W, I-L-M-V et Q-N-H (acides aminés possédant les mêmes propriétés) sont notées en **blanc sur fond noir**. La région correspondant au signal peptide est notée en *gris italique*.

Seule la séquence M73689 de *B. malayi* présente un peptide signal débutant par un résidu méthionine et est complète. Une région très conservée se situe en C-terminal avec 6 résidus cystéine, caractéristique des chitinases de la famille 18 chez les nématodes. La séquence U59688 ne représente pas une protéine entière mais un fragment analogue des 3 autres protéines, uniquement composé du domaine catalytique. Une grande conservation est observée entre ces 4 séquences bien que ce soit chez des organismes différents. Les séquences provenant de *Brugia* spp. sont identiques à l'exception des positions 6 et 15 à 17 pour U59689 et U59690 correspondant aux positions 70 et 79 à 81 de M73689. Une autre région présentant des différences se situe aux positions 323 à 339 pour U59689 et U59690 correspondant aux positions 387 à 403 de M73689. La région correspondant aux positions 1 à 17 de U59688 présente également des modifications. La séquence de *C. elegans* diverge plus fortement mais 5 des 6 résidus cystéines sont conservés.

Profil d'hydropathie

Les profils d'hydropathie sont également établis pour chacune de ces séquences. Les différents graphiques correspondent aux séquences des 3 protéines U59689, U59690 et M73689 des chitinases de *Brugia* spp. (Fig. 46). La séquence U59688 ne représentant qu'une petite portion des autres séquences ne donne aucune indication importante. Le profil de la séquence U59689 présente au départ quelques acides aminés hydrophobes (moins de 50 qui correspondent au signal peptide). Les 4 protéines semblent ainsi construites sur le même schéma globalement hydrophile, les séquences primaires possèdent les mêmes propriétés et aucune ne présente de domaine transmembranaire.

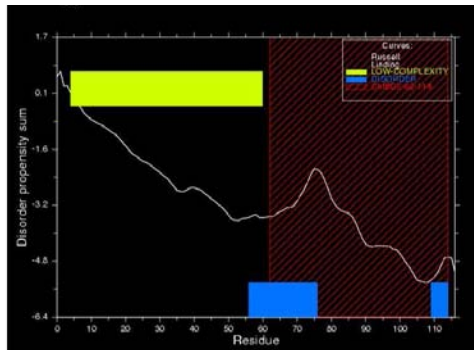


**Fig. 46 :** Graphique de Kyte et Doolittle calculé pour chacune des séquences de chitinases de *Brugia* spp. L'abscisse représente la position de chacun des acides aminés et l'ordonnée porte la valeur d'hydropathie de chacun d'eux. Le graphe d représentant la protéine U59688 ne concerne qu'une séquence très partielle de chitinase de la famille 18 du domaine de fixation de la protéine.

Analyse des profils protéiques des chitinases chez *Brugia* spp.

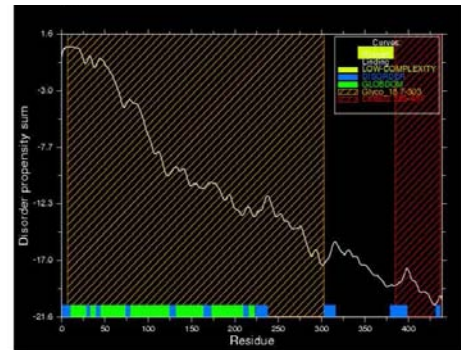
Une recherche des domaines Pfam/Smart connus a ensuite été effectuée sur les séquences des chitinases de *Brugia* spp. ou Smart connus. Les 3 séquences U59689, U59690 et M73689 présentent

une homologie avec un domaine Glyco\_18 spécifique des chitinases de la famille 18. Les 4 séquences possèdent une homologie avec le domaine ChtBD2, domaine de fixation de chitine présent chez les chitinases des insectes et d'autres animaux (trouvés également chez les baculovirus) déjà étudié. Le domaine ChtBD2 est spécifique aux chitinases de la famille 18 et ne se retrouve pas dans les chitinases de la famille 19 (Fig. 47).



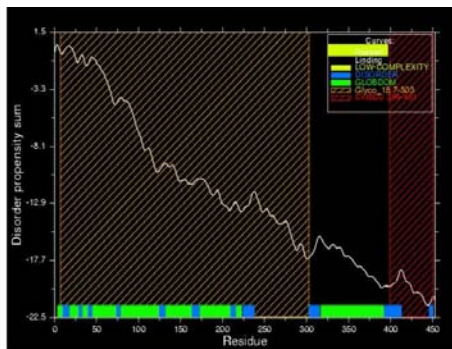
a) Protéine *U59688*

Homologie avec ChtBD2  
(Résidus 62-114)



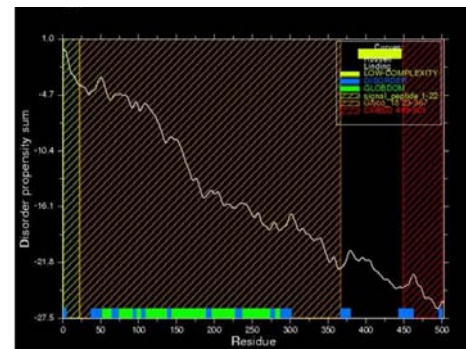
b) Protéine *U59689*

Homologie avec le domaine glyco\_hydro\_18  
(Résidus 7-303)  
Homologie avec ChtBD2  
(Résidus 385-437)



c) Protéine *U59690*

Homologie avec le domaine glyco\_hydro\_18  
(Résidus 7-303)  
Homologie avec ChtBD2  
(Résidus 399-451)



d) Protéine *M73689*

Homologie avec le peptide signal  
(Résidus 1-22)  
Homologie avec le domaine glyco\_hydro\_18  
(Résidus 23-367)  
Homologie avec ChtBD2  
(Résidus 449-501)

**Fig. 47 :** Pour l'analyse Globplot, l'abscisse représente les acides aminés et l'ordonnée la propension au désordre (voir légende page 90)

Visualisation

Mise à part U59688, ces différentes chitinases de *B. malayi* et *B. pahangi* semblent très similaires puisqu'elles présentent toutes (U59689, U59690 et M73689) un domaine catalytique globulaire. Les séquences étant très proches et M73689 étant la seule séquence complète, la modélisation ne sera faite que pour cette dernière. Le domaine catalytique de M73689 présente le motif d'un tonneau  $\alpha/\beta$ , motif attendu pour les chitinases de la famille 18 (Fig. 48).



**Fig. 48 : Modélisation de la protéine encodée par M73689**

**Image tridimensionnelle de la chitinase de *B. malayi*  
(réalisées avec RasMol v.2.7)**

La visualisation est ici choisie sous forme de ruban en mettant en couleur les différents groupes. Les motifs d'hélices  $\alpha$  et de feuillets  $\beta$  sont représentés et forment la structure secondaire des protéines. Les différentes couleurs correspondent aux positions de la séquence primaire ; l'acide aminé de départ se trouve à l'extrémité bleue et le dernier acide aminé de la séquence à l'extrémité rouge.

**D  
I  
S  
C  
U  
S  
S  
I  
O  
N**

## Discussion

### **Nombre et type de chitinases chez les nématodes**

Plusieurs chitinases ont été retrouvées chez *C. elegans*, au nombre de 34 pour les chitinases de la famille 18 (février 2002). La recherche de gènes codant pour des chitinases dans les banques de données identifie aussi 6 gènes codant pour des chitinases de la famille 19 chez *C. elegans*. La présence de ces chitinases confirme la présence de chitinases de la famille 19 chez des nématodes d'autres espèces que *A. suum* [80]. Les chitinases de la famille 19 sont donc également présente dans le règne animal.

### **Localisation chromosomique des gènes de chitinases des familles 18 et 19 chez *C. elegans***

Chez *C. elegans*, les gènes codant pour les 2 familles de chitinases sont différemment localisés. Les gènes de la famille 18 sont en position plutôt télomérique, position favorable à l'expression des gènes et sont répartis sur le chromosome sexuel et les chromosomes autosomes – à l'exception du chromosome I. Les gènes des chitinases de la famille 19 sont quant à eux tous regroupés sur le chromosome V dans une position plutôt non-télomérique. Les gènes *chia-5* et *chia-6* sont à 100% identiques et localisés tête-bêche, ce qui laisse supposer qu'ils sont issus d'une récente duplication. Le gène *chia-4* quant à lui, présente une séquence incomplète ne contenant que le domaine catalytique sans domaine de fixation. Une hypothèse serait que les gènes de chitinases de la famille 19 aient été acquis par transfert horizontal. En effet, les chitinases de la famille 19 sont principalement végétales. Une question reste toutefois ouverte : comment se fait-il que tous les gènes de la famille 19 se situent sur le chromosome V ? En effet, si l'acquisition des chitinases de la famille 19 s'est faite gène par gène, comment expliquer qu'ils ne soient présents que sur le chromosome V et non pas répartis sur l'ensemble des chromosomes ? Est-ce possible d'acquérir l'ensemble des chitinases en un seul transfert ? Une possibilité serait que seul un gène a été acquis par transfert génétique horizontal (HGT) et que, au fil de l'évolution il se soit dupliqué avant de perdre un fragment (*chia-4*) ou de subir une dégénérescence du site catalytique (*chia-1*). Des cas de HGT ont déjà été reportés, principalement des bactéries et des champignons aux nématodes [87]. Les gènes des enzymes responsables de la dégradation des parois cellulaires des plantes semblent ainsi avoir été acquis par un ancêtre commun du phylum des **Nematoda** par HGT. La duplication extensive à la suite de l'acquisition des gènes de cellulases par les nématodes parasites des plantes a également été observée [87]. Le transfert horizontal de gènes semble ainsi un phénomène plus répandu chez les Nématodes que ce que l'on pensait antérieurement.

La présence de chitinases de la famille 19 chez ces nématodes suscite ainsi une question légitime de savoir si elles proviennent des plantes par HGT, question déjà soulevée pour *Streptomyces* spp. et *Actinobacteria* [48, 79]. Les chitinases de la famille 19 des nématodes sont bien moins homologues à celles des plantes que les chitinases de *Streptomyces* spp. qui peuvent même être rapprochées de la classe IV des chitinases de la famille 19 des plantes. Il serait intéressant de savoir si les chitinases de la famille 19 sont des constituants principaux des défenses constitutives des nématodes et pourquoi les stades oocytes et adultes hermaphrodites adultes 7-10 jours post-L4 n'en expriment pas. Des études avec des vers en conditions de stress permettront de répondre à cette question.

### **Comparaison des chitinases de la famille 18 des filaires *B. pahangi* et *B. malayi***

Le travail de Arnold et al. a permis d'isoler 4 séquences de chitinases de filaires qui n'ont jamais été caractérisées [86]. La comparaison détaillée de ces séquences de chitinases de *B. malayi* (U59688, M73689) et *B. pahangi* (U59689, U59690) a mis en évidence une structure relativement stable et conservée, composée d'un domaine catalytique (N-terminal), d'une région riche en résidus Thr et d'un domaine de fixation à la chitine ou à d'autres polysaccharides (C-terminal). La comparaison avec la séquence *cht-1* de *C. elegans* démontre que les séquences des filaires sont particulièrement proches entre elles. L'absence de séquence de peptide signal des 3 séquences U59688, U59689 et U59690 laisse penser que ces chitinases sont simplement incomplètes. La protéine M73689 qui possède quant à elle un signal peptide est certainement sécrétée. Les 4 séquences (U59688, M73689, U59689, U59690) possèdent un domaine conservé de 52 acides aminés homologues à 100% entre elles, correspondant avec le domaine ChtBD2, domaine de fixation de la famille 18 trouvé chez les insectes et les animaux. Les 6 cystéines conservées du domaine C-terminal permettent justement aux enzymes sécrétées de fixer la chitine. De plus, les séquences U59689, U59690 et M73689 possèdent un domaine homologue au domaine catalytique globulaire des chitinases de la famille 18 (*glyco\_hydro\_18*) composé de 296 à 344 acides aminés. Le profil d'hydrophobie pour ces 4 séquences est globalement hydrophile. Les 3 séquences U59689, U59690 et M73689 codent ainsi des chitinases de la famille 18. La présence d'un domaine de fixation ChtBD2 trouvée dans la séquence U59688, si proche des séquences des 3 autres séquences, est sans doute également une chitinase de la famille 18.

### **Expression des chitinases des familles 18 et 19 chez *C. elegans***

L'expression d'environ 98% du génome de *C. elegans*, soit plus de 18'791 gènes prédits, a été étudiée par l'analyse de puces à ADN [88]. Les résultats disponibles concernant les chitinases, aussi bien de la famille 18 que de la famille 19, permettent de comparer leur expression. Une expression de

chitinases est effectivement décelable tout au long du développement des vers (subdivision en 8 stades distincts), mais il faut noter que les gènes exprimés ainsi que l'intensité des signaux varient. Les chitinases de la famille 18 sont plutôt exprimées de manière ponctuelle puisque les oocytes, les larves L1, les larves L2-L3 et les adultes hermaphrodites 7-10 jours post-L4 ne montrent aucune expression. Les stades qui présentent l'expression la plus grande de la famille 18 sont les embryons et les larves L3-L4, stades qui correspondent aux microfilaires et au stade infectieux chez les filaires. Le gène *cht-1*, seul gène de chitinase présent sur le chromosome sexuel, semble être seul responsable de l'expression des chitinases dans les oocytes et les adultes hermaphrodite 7-10 jours post-L4. Azzouz a démontré l'expression de *cht-1* à l'aide d'anticorps spécifiques aux domaines catalytique et de fixation dans les larves L1 à L4, mais aucun signal n'a été identifié dans les œufs ni dans les adultes [68]. Il est donc intéressant de mettre en évidence cette contradiction. La formation d'ARN et la production de protéines ne sont pas nécessairement simultanées ; les résultats obtenus ici sont donc plausibles puisqu'un décalage est parfois observé. Toutefois, il faut tenir compte du fait que la technique des microréseaux possède certaines limites comme le seuil de détection de l'ARN ou encore la sensibilité qui dépend de la sonde utilisée. Il devient ainsi nécessaire de réaliser des northern blots ou des PCR quantitatives pour confirmer les résultats des puces à ADN.

L'expression des chitinases de la famille 19 est relativement homogène et concerne tous les stades de développement à l'exception des oocytes et des adultes hermaphrodites 7-10 jours post-L4. Sur l'ensemble des 35 gènes pour lesquels des données sont disponibles, seul 6 gènes de chitinase de la famille 18 et 2 de la famille 19 sont exprimés, ce qui représente moins de 25% des gènes codant pour des chitinases. L'expression des chitinases est ainsi particulièrement faible, aussi bien la famille 18 que la famille 19. Une explication serait peut-être qu'elles ne sont exprimées qu'en situation de stress. Les plantes présentent en effet, à côté de leurs défenses constitutives, tout un mécanisme de défense qui ne s'active qu'en cas d'attaque par des agents pathogènes, appelée résistance systémique acquise (SAR) [89]. Il faudrait alors répéter l'analyse d'expression avec des vers croissant sous condition de stress biotique. Il serait également intéressant de tester des conditions de stress abiotique en faisant croître des nématodes sur un milieu incomplet ou dans des conditions de chaleur extrême. Il est possible également que ces chitinases ne représentent qu'une voie de secours et qu'elles ne sont activées que dans certaines situations très particulières. Mais sur une simple comparaison des niveaux d'expression, ces résultats font penser que les chitinases de la famille 19 jouent un rôle plus important dans le cycle de vie des nématodes que les chitinases de la famille 18.

Alaeddine a démontré une activité chitinolytique dans chacun des stades de développement de *C. elegans* avec une activité importante dans les larves L1 [78]. Vu qu'il s'agit de l'activité chitinolytique totale mesurée au cours du développement de *C. elegans*, aucune identification directe n'est possible concernant les gènes exprimés dans ces stades. Par contre, il est possible de proposer que l'activité dans les larves L1 est essentiellement due à *cht-1* et aux chitinases de la famille 19, puisque aucun autre gène de chitinase de la famille 18 n'a été trouvé exprimé à ce moment du développement.

Sur la base de ces informations, une comparaison de l'expression des chitinases de la famille 19 chez *Brugia spp.* et *C. elegans* a démontré qu'à côté des 2 gènes *chia-2* et *chia-3*, *chia-5* est aussi exprimé et cela également chez les adultes. La détection de l'expression n'a cependant été possible que dans les stades L3 à adultes.

Il est toutefois impossible à présent, sur la base de ces amplifications et de la qualité des banques, de savoir si *chia-2* est absent ou non exprimé aux stades L3 et L3 3jpi chez *B. pahangi* et si *chia-3* est exprimé, ou non, au stade L3 3jpi chez *B. malayi*. Cependant, les chitinases de la famille 19 ne sont pas induites par le contact de l'hôte définitif puisque l'expression de *chia-3* et *chia-5* est présente au stade L3 et au stade L3 3jpi mais il est, pour le moment, impossible de savoir quel rôle elles jouent dans le processus d'infection. L'expression des chitinases de la famille 19 dépend donc du stade de développement mais visiblement également de l'organisme. En fonction de ces résultats, le rôle supposé des chitinases de la famille 19 serait donc une activité dans les différentes mues ou une activité dans l'interaction entre le nématode et son environnement, mais pour répondre à cette question, la localisation des chitinases est nécessaire.

Le maintien et la réamplification régulière des banques d'ADN complémentaire altèrent la qualité des banques, ce qui provoque, à long terme, la perte de certains clones. Les banques d'ADN complémentaire disponibles provenant du Dr Hunter ayant été reçues en 1998 et ayant à présent subi un nombre certain de repiquages, les clones les moins représentés sont sans doute perdus. Les chitinases n'étant pas très fortement exprimées, il est fort probable que ces banques aient déjà subi une dégradation de ces clones si ce n'est une perte irréversible. Pour vérifier cette hypothèse, de nouvelles banques ont été obtenues du Dr Hirzmann. L'observation que la séquence de la chitinase de la famille 19 isolée de la banque de *B. malayi* (ADN complémentaire) est identique à sa séquence homologue chez *C. elegans* (Wormbase) contenant des introns, laisse craindre que la banque d'ADN complémentaire est en fait une banque d'ADN génomique. Devant cette situation, les résultats obtenus avec les banques de *B. malayi* provenant d'Allemagne ne seront pas considérés.

Une question reste cependant ouverte quant à la présence de si nombreux gènes codant pour des chitinases avec une si faible expression. Il est probable que les gènes de chitinases sont présents en grand nombre chez tous les nématodes – principalement la famille 18 – mais que leur expression dépend de voies de transduction différentes. Certaines voies de transduction sont ainsi différemment activées chez les plantes en fonction de l'agent pathogène. En effet, pour les plantes prétraitées à l'acide  $\beta$ -aminobutyrique (BABA), l'attaque par une bactérie entraîne l'activation d'une voie de transduction dépendant de l'acide salicylique (SA) causant la production de PR protéines (mais indépendante de l'acide jasmonique et de l'éthylène) alors qu'une attaque fongique active un voie de transduction différente (indépendante de SA, de l'acide jasmonique, de l'éthylène et sans production de PR protéines) [90, 91]. Ce phénomène est également possible chez les nématodes. En effet, tous

les gènes ne sont pas forcément exprimés de manière identique chez les différentes espèces de nématodes.

### **Caractéristiques des chitinases de la famille 19 de *C. elegans*, *B. malayi*, *B. pahangi*, *A. suum* et *H. megidis***

Comme le travail avec les vers parasites reste particulièrement complexe en raison de la difficulté d'obtenir des banques d'ADN complémentaire ou du matériel frais bien conditionné, ou encore des contraintes imposées par le maintien d'un cycle en laboratoire, il devient évident de vérifier d'abord la présence des chitinases chez *C. elegans*, ver de forme libre afin de l'utiliser comme modèle, comme il l'a déjà été dans diverses études précédentes [11, 25, 92, 93].

Les 6 gènes codant pour des chitinases de la famille 19 identifiés chez *C. elegans* présentent une grande homogénéité. Cependant, seul 3 séquences (*chia-2*, *chia-3* et *chia-5*) ont été étudiées plus en détail. En effet, *chia-1* a été écartée puisqu'elle ne présente pas les résidus catalytiques QET et E retrouvés dans les 5 autres séquences. La séquence *chia-4* ne possède pas de site de fixation. La séquence *chia-6* identique en tout point avec la séquence *chia-5* ne peut être analysée indépendamment. Les 3 séquences restantes sont ainsi particulièrement similaires. L'optimisation des expériences se fait dans un premier temps sur l'ADN de *C. elegans* afin de confirmer les prédictions. L'intérêt est cependant de savoir si les gènes codant pour des chitinases de la famille 19 sont conservés chez d'autres nématodes, aussi bien de forme libre que des parasites intestinaux, entomopathogènes et des filaires.

La présence de gènes codant pour des chitinases de la famille 19 a été confirmée chez *C. elegans* ainsi que chez *A. suum*. La présence du gène *chia-2* a ici été confirmée chez *B. malayi* avec 5 nucléotides différents de la séquence trouvée chez *C. elegans* ainsi que celle du gène *chia-5*, également confirmée chez *H. megidis* avec 2 nucléotides différents. Ces quelques différences entraînent un changement dans la structure primaire des protéines et peuvent influencer ainsi la structure tridimensionnelle des protéines. La présence de gènes de chitinases de la famille 19 chez d'autres nématodes que *C. elegans* et *A. suum* [80] est ainsi confirmée. Les chitinases de la famille 19 chez les filaires ont potentiellement un rôle à jouer au cours de la maturation des microfaires à l'intérieur de la femelle ou lors du développement des microfaires. Mais aucune distinction de sexe chez les vers ne peut être mise en évidence en fonction des différents résultats obtenus ici. Il serait ainsi indiqué de vérifier la présence de ces gènes dans d'autres banques d'ADN complémentaire ou sur de l'ADN génomique directement extrait des vers.

La présence des chitinases de la famille 19 ayant ainsi été confirmée chez des représentants variés des nématodes, il serait important de vérifier si l'ensemble du phylum des **Nematoda** possède des

chitinases de la famille 19. Pour que l'étude soit complète, il faudrait encore vérifier la présence de ces chitinases chez les vers parasites des plantes, ainsi que chez d'autres vers, de provenance très variée, principalement des *Adenophorea*. Geng prétend que l'expression des chitinases de la famille 19 n'est présente que chez les femelles d'*A. suum* [80], et afin de savoir si ce constat est valable pour l'ensemble des nématodes ou seulement pour certaines espèces, il serait particulièrement intéressant de vérifier la présence des chitinases de la famille 19 chez différents nématodes après avoir effectué une séparation des sexes et des différents stades de développement. Probablement une chose très difficile ou même impossible à réaliser due à la difficulté d'obtenir du matériel de qualité.

Les études ont été faites sur 3 séquences choisies mais il serait à présent intéressant de les effectuer également sur les 2 séquences écartées ici *chia-1* et *chia-4* afin de vérifier que malgré leurs différences (dégénérescence du site catalytique pour *chia-1* et perte du domaine de fixation pour *chia-4*) elles appartiennent bien à des chitinases de la famille 19 et pour affiner leur rôle chez les nématodes. La séquence *chia-6*, identique en tous points avec la séquence *chia-5* ne peut quant à elle être étudiée individuellement.

### **Comparaisons des chitinases de la famille 19 de *C. elegans* et des vers parasites**

L'alignement des séquences des chitinases de la famille 19 provenant de plantes et de bactéries avec celles provenant des nématodes permet plusieurs observations. Toutes les séquences possèdent le site catalytique sur 2 régions distinctes comprenant chacune un résidu glutamate, HET et E chez les plantes et les bactéries et QET et E chez les nématodes. L'histidine est codée par CAC et CAU alors que la glutamine est codée par CAA et CAG ; les nématodes ont donc visiblement subi une mutation de la 3<sup>ème</sup> position du codon. Les 2 résidus glutamine (Q) et histidine (H) sont polaires mais les propriétés des chitinases peuvent être différentes en raison de cette modification.

L'alignement des 5 séquences de *C. elegans* (*chia-1*, *chia-2*, *chia-3*, *chia-4* et *chia-5/6*) avec les séquences de *H. megidis*, *B. malayi* et *A. suum* met en évidence un signal peptide, région hydrophile composée de 10 à 30 acides aminés non-polaires et aliphatiques. Le site catalytique composé de 2 résidus glutamate QET et E est retrouvé dans toutes les séquences à l'exception de la séquence *chia-1* dégénérée. Les positions conservées des 6 résidus cystéine au C-terminal sont également présentes pour chacune des séquences à l'exception de *chia-4*, qui présente une séquence incomplète. Cette comparaison des différentes séquences de nématodes permet de mettre en évidence que les 4 régions conservées (C1 à C4) [79] ne sont pas les régions les mieux conservées chez les nématodes. Trois autres régions (appelées N1 à N3) sont ainsi plus conservées : les régions N1 et N2 entourent ainsi la région C1 et l'emplacement de la séquence N3 correspond à la séquence C2 débutant 4 positions avant et se terminant 4 résidus plus loin. Ces 3 régions spécifiques aux chitinases de la famille 19 des nématodes pourraient aisément servir de marqueur afin d'isoler des

séquences codant pour des chitinases de la famille 19 chez d'autres nématodes ou éventuellement chez d'autres animaux. Il serait ainsi recommandé de réaliser des amplifications sur cette région conservée C2 en complément de l'amplification du site catalytique.

Les séquences *chia-1*, *chia-2*, *chia-3* et *chia-5* possèdent entre 266 et 299 acides aminés identiques avec le domaine catalytique des autres chitinases de la famille 19 (glyco\_hydro\_19) des autres organismes. Un signal peptide est présent pour *chia-3* et *chia-5* et supposé pour les autres séquences, ce qui laisse penser que les chitinases de la famille 19 sont sécrétées. La conservation des ponts disulfures au sein des séquences des nématodes, déjà décrits par Kawase, étaye l'hypothèse de sécrétion des chitinases de la famille 19, ces ponts stabilisant certainement la conformation tridimensionnelle des protéines en cas de sécrétion.

La séquence *chia-4* ne donne aucune analogie avec le site catalytique glyco\_hydro\_19 spécifique, bien que les résidus QET et E soient retrouvés dans la séquence. Il est ainsi possible que la présence conservée de ces 4 résidus ne suffise pas à justifier l'appartenance aux chitinases de la famille 19. Ce motif QET et E étant conservé et composé de résidus peu dégénérés prédit tout de même de manière forte l'appartenance aux chitinases de la famille 19. Une autre hypothèse serait qu'en raison de sa taille particulièrement courte et l'absence du site de fixation, *chia-4* possède une conformation tridimensionnelle différente ; il faudrait ainsi vérifier son activité chitinolytique ainsi que l'activité chitinolytique de *chia-1* qui ne présente quant à lui pas le motif QET et E, ce qui permettrait de confirmer que le motif QET et E est bien spécifique des chitinases de la famille 19 (site catalytique). La modélisation de ces différentes protéines présente un site globulaire contenant le site catalytique relativement bien conservé.

Les chitinases de la famille 19 de *C. elegans*, d'une manière générale, sont très homogènes avec des séquences comprises entre 407 et 511 acides aminés (la séquence *chia-4* qui ne contient que 272 acides aminés est une séquence incomplète). La comparaison de ces différentes séquences montre une similarité de 38% (entre *chia-2* et *chia-4*) à 100% (entre *chia-5* et *chia-6*). La représentation des similitudes et divergences à l'aide d'un arbre NJ a l'avantage de minimiser la longueur de chaque branche pour les divergences de séquences et ainsi de livrer une représentation atemporelle des relations puisque l'intérêt ici ne porte pas sur le moment de la divergence des séquences mais bien sur le taux de divergence de ces séquences. Ces résultats sont en parfaite adéquation avec les résultats obtenus par Kawase [79]. En effet, selon les études phylogéniques qu'il a réalisé sur l'ensemble des chitinases de la famille 19, 5 groupes distincts ont été établis dont un ne contenant que les chitinases de la famille 19 provenant de *C. elegans* (groupe V).

Kawase et al. [79] établit que 3 ponts disulfures sont conservés au sein de l'ensemble des chitinases de la famille 19 à l'exception des chitinases de la classe IV des plantes et des bactéries qui n'en ont que 2. Ces 3 ponts sont également retrouvés chez les nématodes (à l'exception de la séquence *chia-*

4 incomplète) qui permettent la stabilisation des structures tridimensionnelles de ces protéines. Bien que les séquences soient très similaires, certaines régions semblent cependant spécifiques à l'organisme. Les chitinases provenant des bactéries ont des caractéristiques proches des chitinases de plantes de classe IV (groupe II). Une région spécifique à la séquence bactérienne de *S. griseus* (positions 91-103) est cependant mise en évidence. Les chitinases des plantes des classes I, II et IV sont quant à elles très conservées à l'exception de quelques régions spécifiques aux chitinases de la classe IV. Par contre, les séquences de nématodes sont dans l'ensemble plus longues que les séquences de plantes ou de bactéries, ce qui représente une spécificité propre aux nématodes caractérisant ainsi leur propre groupe indépendant (groupe V) [79]. La conformation tridimensionnelle de ces différentes séquences de chitinases de la famille 19 varie en fonction des organismes. Toutes ces séquences présentent cependant 4 régions conservées spécifiques aux chitinases de la famille 19 et qui peuvent ainsi servir de marqueur (régions C1 à C4) en complément au site catalytique.

Les différents alignements réalisés avec les séquences d'*A. suum*, *B. malayi* et *H. megidis* dans ce travail montrent que le groupe est spécifique à l'ensemble des chitinases de la famille 19 des nématodes. Bien que ces différents nématodes proviennent de 3 familles phylogéniques distinctes, les séquences restent particulièrement proches surtout entre *C. elegans* et *H. megidis*. La séquence de *B. malayi* semble quant à elle moins similaire mais présente toutefois une très grande conservation sur une région précise (positions 354 à 569). Les différences observées par l'alignement de ces séquences permettent également d'éliminer les doutes quant à une éventuelle contamination lors des manipulations.

Les chitinases de la famille 19 possèdent dans leur domaine catalytique un site catalytique réparti en 2 résidus glutamates distincts alors que les chitinases de la famille 18 n'en possèdent qu'un. Cette différence représente un vrai problème pour l'isolation du site catalytique puisque ces 2 régions se retrouvent séparées par un intron. Il est donc difficile d'isoler le site catalytique entier des chitinases de la famille 19 en un seul bloc à partir de l'ADN pour effectuer la production des protéines recombinantes de manière similaire comme dans les expériences concluantes qui ont été menées sur les chitinases de la famille 18 [68]. Cette problématique se manifeste d'autant plus que le matériel génétique des vers parasites n'est souvent pas disponible sous forme de banques d'ADNc. Les expériences doivent donc tenir compte de cette particularité ou amplifier des régions différentes (N1 à N3).

### **Production des chitinases recombinantes**

Azzouz [68] a utilisé un système procaryote pour la production de protéines recombinantes de chitinase de nématodes de la famille 18 (*cht-1*) en fragmentant la séquence et en exprimant chacun des domaines catalytique et de fixation séparément. La séparation des 2 sites distincts permet ainsi

l'expression de chacun des domaines au dépend de la conformation tridimensionnelle qui est potentiellement altérée. Geng [80] a utilisé le plasmide pQE-30 dans les bactéries *E. coli* M15 et a également réussi à exprimer un fragment de chitinase de la famille 19 chez *A. suum*. Un autre système d'expression composé du plasmide pQE-30 avec *Salmonella typhimurium* a été utilisé pour exprimer la chitinase de famille 18 spécifique du stade larvaire L3 d'*O. volvulus* [94]. Une fois encore, la séquence a été fractionnée en un domaine catalytique et un domaine de fixation. La fragmentation des séquences de gènes de chitinases de la famille 19 en 2 régions distinctes permettrait donc potentiellement de produire des protéines recombinantes afin de produire par la suite des anticorps spécifiques à chacune de ces 2 régions et de localiser ensuite ces chitinases *in situ*.

Les étapes d'isolation des gènes entiers de chitinases de la famille 19 par PCR et le clonage en vue du séquençage n'ont relativement pas posé de problème dans ce travail, mais la transformation des bactéries et l'expression sont restées sans succès. Le taux de réussite des transformations par électroporation des plasmides recombinants a également été très faible. D'une manière générale, l'expression de certains gènes de nématodes dans un système procaryote s'avère être inappropriée vue les difficultés répétées rencontrées dans différentes études [68, 78, 94-96]. Il est en effet surprenant que, ni pour des collagènes cuticulaires de nématodes ni pour des chitinases, aucune publication n'est disponible décrivant les caractéristiques des protéines recombinantes et cela malgré les multiples gènes de collagènes cuticulaires déjà décrits (Kramer JM principalement). Dans nos expériences, la croissance des bactéries avait été bloquée et l'insertion perdue. Les chitinases – famille 18 et famille 19 – de *C. elegans* et *A. suum* semblent être toxiques pour les bactéries ce qui a également été constaté pour les chitinases d'*O. volvulus* [94]. L'étape de stabilisation des constructions dans les bactéries n'a ainsi pas pu se faire pour des raisons de toxicité visiblement liée aux chitinases.

Aucun système ne permet pour le moment l'expression des chitinases et des collagènes entiers. Un système d'expression qui permettrait d'exprimer l'ensemble de ce type de protéines de nématodes est donc encore à trouver mais il serait intéressant de tenter aussi l'utilisation du système *Salmonella typhimurium* pris pour *O. volvulus* [94].

Le système *Gateway™* (Invitrogen) mérite d'être testé pour sa rapidité mais le passage dans les cellules BL21 pour l'expression laisse présager les mêmes problèmes de toxicité déjà rencontrés dans le système procaryote. En effet, un système procaryote ne permet pas de modifications post-transcriptionnelles et un système d'expression eucaryote (comme par exemple des levures) permet de déjouer ces problèmes. Brunisholz [96], après des essais infructueux avec un système procaryote, a utilisé le système d'expression de levures pour obtenir des protéines recombinantes de collagènes cuticulaires de *Brugia pahangi*.

Le système d'expression des bactéries ainsi que le système eucaryote des levures ne permettent visiblement pas l'expression des protéines de surface. D'autres systèmes d'expression méritent alors d'être testés. D'un côté, le système d'expression CHO (cellules ovariennes de Hamster chinois) mais qui ne permet généralement pas un grand rendement ou en dernier recours, un système *in vitro* idéal, mais bien onéreux. Le système d'expression *RTS<sup>TM</sup>* (Rapid Translation System, Roche) a l'avantage de pouvoir également produire des protéines toxiques puisque ne faisant intervenir aucune cellule vivante.

Pour vérifier l'expression des chitinases chez différents nématodes, des northern blots ou des PCR quantitatives devront être effectués en parallèle, malgré la difficulté d'obtenir des nématodes en quantité et qualité nécessaire pour effectuer ces études. Des études complémentaires avec l'inhibition par ARN interférence devront permettre d'étudier les fonctions des chitinases chez *C. elegans*. L'ADN des vers parasites n'est souvent disponible que sous forme de banques et dans certains cas plus rares sous forme de matériel congelé uniquement. Le travail avec du matériel frais permettrait cependant également d'éliminer de manière définitive tous les problèmes de contamination des banques ainsi que les problèmes de maintenance du matériel qui reste une étape particulièrement délicate et souvent clé dans la qualité des banques disponibles.

### **Rôles et fonctions des chitinases de la famille 19 chez les nématodes**

Les chitinases de la famille 18 sont longtemps restées des cibles intéressantes dans la lutte contre la filariose lymphatique. En effet, les chitinases de la famille 18 présentant un grand pouvoir antigénique semblaient être les cibles idéales dans la lutte contre les filarioses. Ces différentes études ont cependant été abandonnées après l'observation de réactions croisées avec les chitriosidases humaines. Ce constat oblige à la reconsidération de l'utilisation des chitinases de la famille 18 de nématodes comme cible dans les luttes contre les filaires [82, 83]. Si les chitinases de la famille 19 présentent également une activité antigénique forte, cette famille peut ainsi devenir une alternative au problème de réactions croisées.

Les chitinases de la famille 19 chez les nématodes n'ont été publiées que chez *C. elegans* et *A. suum* [79, 80] pour le moment. Leur présence a ici aussi été prouvée chez d'autres nématodes tels que *H. megidis*, ver entomopathogène et *B. malayi*, filaire responsable de l'éléphantiasis, ce qui allonge encore la liste des organismes possédant des chitinases de la famille 19 et confirme la présence de cette famille dans le règne animal. Si les chitinases de la famille 19 trouvées chez les nématodes présentent les mêmes propriétés immunologiques fortes que les chitinases de la famille 18, l'intérêt devrait se porter sur ces chitinases de la famille 19 pour poursuivre l'élaboration d'un nouveau vaccin dans la lutte contre l'éléphantiasis.

Les chitinases de la famille 19 n'étant pas exprimées aux mêmes stades que les chitinases de la famille 18, leur rôle semble ainsi également différent. La chitinase appartenant à la famille 19 d'*A. suum* semble être impliquée dans les premières mues. Un autre rôle dans la digestion de la coquille des œufs est envisageable mais il semble que les chitinases remplissent généralement des activités multifonctionnelles qui nécessitent de nouvelles études [80]. Il semblerait effectivement que les chitinases de la famille 19 chez les nématodes n'interviennent pas à des moments précis – comme c'est le cas pour les chitinases de la famille 18 – mais semblent être continuellement présentes. L'hypothèse de Fuhrman et al. [75] que les chitinases chez les vers parasites sont associées au développement et à la transmission du parasite semble ainsi fausse.

La localisation par des techniques d'immunolocalisation (IFAT) est indispensable afin de pouvoir déduire le rôle et les implications de ces chitinases de la famille 19 chez les nématodes.

### **Perspectives**

Les espèces contenant des chitinases de la famille 19 appartiennent à 3 familles de nématodes phylogéniques différentes mais toutes comprises dans les *Secernentea*. Il serait ainsi intéressant de rechercher la présence des chitinases de la famille 19 chez des représentants des *Adenophorea*. Une nouvelle information concernant les espèces non-parasites serait ainsi disponible.

Les études sur les chitinases de la famille 18 ont été abandonnées après avoir découvert des activités croisées entre les chitinases et les chitotriosidases humaines. Ces observations ne remettent cependant pas en question les efforts fournis jusqu'à présent dans la lutte contre les filarioses lymphatiques. En effet, les chitinases de la famille 19 étant absentes des hôtes définitifs, elles sont donc des candidats plus sérieux pour développer des moyens de lutte contre la filariose lymphatique, maladie classée priorité par l'OMS. Pour ce faire, il faudra tout d'abord trouver un système d'expression qui permettra d'induire les chitinases de la famille 19, sans problème de toxicité. L'idéal serait également d'utiliser un système d'expression eucaryote qui permettrait ainsi les modifications post-transcriptionnelles des chitinases. L'activité chitinolytique de ces protéines devra ensuite être vérifiée en séparant tous les stades (8 stades distincts) ainsi que les sexes avant de passer à la formation de protéines recombinantes et en la fabrication d'anticorps spécifiques. Le travail sur *C. elegans* permet également de faire de la localisation *in situ* à l'aide des techniques d'immunolocalisation et d'ainsi créer un lien entre une protéine et sa fonction. Un chemin parallèle d'étude par northern blot doit également être effectué pour savoir à quel moment précis l'ARN messenger est produit. Toutes ces pistes méritent ainsi d'être explorées pour apporter le plus de réponses possibles aux questions en lien avec les chitinases de la famille 19. Ces deux chemins parallèles permettront de répondre à certaines questions. A quel moment l'ARN messenger est formé et à quel moment l'activité chitinolytique est mesurable ? La compréhension de ces interactions hôte-

pathogène dans le cas précis des filarioses lymphatiques permettra d'étudier le mécanisme qui rend les filaires invisibles du système immunitaire de l'hôte plus en détail. Il faut à présent vérifier le caractère antigénique des chitinases de la famille 19 afin de mener les mêmes investigations que celles pour les chitinases de la famille 18 afin d'éliminer le problème des réactions croisées avec les chitotriosidases humaines. Il serait particulièrement intéressant de vérifier si les réponses immunitaires dirigées contre les chitinases de la famille 19 sont également protectrices, comme le sont les réponses immunitaires dirigées contre les chitinases de la famille 18. Si l'expression continue de la chitinase de la famille 19 chez *C. elegans* est représentative de l'ensemble des nématodes, il est permis d'imaginer une lutte moins contraignante vis-à-vis des vers responsables des filarioses puisqu'il n'est pas nécessaire de cibler le stade de développement. La lutte pourrait ainsi toute aussi bien se mener dans les vecteurs mais également dans l'hôte définitif, ce qui représente une double cible puisque les traitements jusqu'à présent avaient soit pour activité la lutte des vecteurs, soit l'empêchement de la propagation des parasites par les vecteurs ou encore des traitements de chimiothérapie présentant des effets secondaires particulièrement lourds. L'intérêt nouveau de cette approche est donc de permettre une lutte contre le parasite indépendante de son stade de développement et de l'hôte qu'il habite.

**R  
E  
F  
E  
R  
E  
N  
C  
E  
S**

---

## Références

1. Dorris, M., P. De Ley, and M.L. Blaxter, *Molecular analysis of nematode diversity and the evolution of parasitism*. Parasitology Today, 1999. **15**(5): p. 188-193.
2. Blaxter, M.L., *The promise of a DNA taxonomy*. Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences, 2004. **359**(1444): p. 669-679.
3. Maggenti, A., *General nematology*. 1981, Springer-Verlag. p. 32.
4. Wood, W.B., *The nematode Caenorhabditis elegans*. 1988, Cold Spring Harbor Laboratory. p. 2-5.
5. Maizels, R.M., M.L. Blaxter, and M.E. Selkirk, *Forms And Functions Of Nematode Surfaces*. Experimental Parasitology, 1993. **77**(3): p. 380-384.
6. Maggenti, A., *General Nematology*. 1981, Springer-Verlag. p. 63-65.
7. Cheng, T.C., *General Parasitology (second edition)*. 1986, Academic press. p. 472.
8. Smyth, J.D., *Introduction to Animal Parasitology (third edition)*. 1994, Cambridge University Press.
9. Schmidt, G.D., *Foundations of Parasitology (sixth edition)*. 2000, McGraw-Hill International. p. 362-363.
10. Blaxter, M., *Caenorhabditis elegans is a nematode*. Science, 1998. **282**(5396): p. 2041-2046.
11. Politz, S.M. and M. Philipp, *Caenorhabditis-Elegans As A Model For Parasitic Nematodes - A Focus On The Cuticle*. Parasitology Today, 1992. **8**(1): p. 6-12.
12. Wood, W.B., *The nematode Caenorhabditis elegans*. 1988, Cold Spring Harbor Laboratory. p. 8.
13. McSorley, R., *Adaptations of nematodes to environmental extremes*. Florida Entomologist, 2003. **86**(2): p. 138-142.
14. Schmidt, G.D., *Foundations of Parasitology (sixth edition)*. 2000, McGraw-Hill International. p. 357.
15. Schmidt, G.D., *Foundations of Parasitology (sixth edition)*. 2000, McGraw-Hill International. p. 361-363.

16. Cheng, T.C., *General Parasitology (second edition)*. 1986, Academic press. p. 473-476.
17. Maggenti, A., *General Nematology*. 1981, Springer-Verlag. p. 106-109.
18. Wood, W.B., *The nematode Caenorhabditis elegans*. 1988, Cold Spring Harbor Laboratory. p. 97.
19. Wood, W.B., *The nematode Caenorhabditis elegans*. 1988, Cold Spring Harbor Laboratory. p. 96-103.
20. Brenner, S., *Genetics of Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 1974. **77**(1): p. 71-94.
21. *Genome sequence of the nematode C-elegans: A platform for investigating biology*. *Science*, 1998. **282**(5396): p. 2012-2018.
22. *Genome sequence of the nematode C. elegans: A platform for investigating biology (vol 282, pg 2012, 1998)*. *Science*, 1999. **285**(5433): p. 1493-1493.
23. Brooks, D.R. and R.E. Isaac, *Functional genomics of parasitic worms: The dawn of a new era*. *Parasitology International*, 2002. **51**(4): p. 319-325.
24. Wood, W.B., *The nematode Caenorhabditis elegans*. 1988, Cold Spring Harbor Laboratory. p. 2.
25. Hashmi, S., W. Tawe, and S. Lustigman, *Caenorhabditis elegans and the study of gene function in parasites*. *Trends in Parasitology*, 2001. **17**(8): p. 387-393.
26. Maggenti, A., *General Nematology*. 1981, Springer-Verlag. p. 158-217.
27. Schmidt, G.D., *Foundations of Parasitology (sixth edition)*. 2000, McGraw-Hill International. p. 399.
28. Maggenti, A., *General Nematology*. 1981, Springer-Verlag. p. 246-248.
29. Cheng, T.C., *General Parasitology (second edition)*. 1986, Academic press. p. 4.
30. WHO, *Fact sheet n°102 (revised in september 2000)*. 1999.
31. WHO, *Rapport de session: Paludisme, filariose et autres maladies parasitaires*. 2002.
32. Schmidt, G.D., *Foundations of Parasitology (sixth edition)*. 2000, McGraw-Hill International. p. 2.

33. Wu, Y., et al., *Chitinase genes expressed by infective larvae of the filarial nematodes, Acanthocheilonema viteae and Onchocerca volvulus*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 1996. **75**(2): p. 207-219.
34. Maggenti, A., *General Nematology*. 1981, Springer-Verlag. p. 296.
35. Schmidt, G.D., *Foundations of Parasitology (sixth edition)*. 2000, McGraw-Hill International. p. 447.
36. Cheng, T.C., *General Parasitology (second edition)*. 1986, Academic press. p. 537.
37. Cheng, T.C., *General Parasitology (second edition)*. 1986, Academic press. p. 539.
38. Schmidt, G.D., *Foundations of Parasitology (sixth edition)*. 2000, McGraw-Hill International. p. 449-450.
39. Rajan, T.V., *Lymphatic filariasis: a historical perspective*, in *Lymphatic filariasis*, T.B. Nutman, Editor. 2000, Imperial College press. p. 1-4.
40. Kumari, A.K., et al., *Physical and psychosocial burden due to lymphatic filariasis as perceived by patients and medical experts*. *Tropical Medicine & International Health*, 2005. **10**(6): p. 567-573.
41. WHO, *Sixième réunion du groupe consultatif technique sur l'élimination mondiale de la filariose lymphatique*. 2005. **80**(46): p. 401-408.
42. Shahabuddin, M. and D.C. Kaslow, *Chitinase - a Novel Target for Blocking Parasite Transmission*. *Parasitology Today*, 1993. **9**(7): p. 252-255.
43. Fuhrman, J.A., *Filarial Chitinases*. *Parasitology Today*, 1995. **11**(7): p. 259-261.
44. Shahabuddin, M., *Chitinase As A Vaccine*. *Parasitology Today*, 1995. **11**(2): p. 46-47.
45. Muzzarelli, R.A.A., *Native, industrial and fossil chitins*, in *Chitin and chitinases*. 1999, Birkhäuser Verlag Basel (Switzerland). p. 1-6.
46. Fuhrman, J.A. and W.F. Piessens, *Chitin Synthesis and Sheath Morphogenesis in Brugia-Malayi Microfilariae*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 1985. **17**(1): p. 93-104.
47. Brameld, K.A. and W.A. Goddard, *The role of enzyme distortion in the single displacement mechanism of family 19 chitinases*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998. **95**(8): p. 4276-4281.

48. Watanabe, T., et al., *Family 19 chitinases of Streptomyces species: characterization and distribution*. Microbiology-Uk, 1999. **145**: p. 3353-3363.
49. Folders, J., et al., *Characterization of Pseudomonas aeruginosa chitinase, a gradually secreted protein*. Journal of Bacteriology, 2001. **183**(24): p. 7044-7052.
50. Merzendorfer, H. and L. Zimoch, *Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases*. Journal of Experimental Biology, 2003. **206**(24): p. 4393-4412.
51. Adam, R., et al., *Identification of chitinase as the immunodominant filarial antigen recognized by sera of vaccinated rodents*. Journal Of Biological Chemistry, 1996. **271**(3): p. 1441-1447.
52. Henrissat, B., *A Classification of Glycosyl Hydrolases Based on Amino-Acid-Sequence Similarities*. Biochemical Journal, 1991. **280**: p. 309-316.
53. Henrissat, B. and A. Bairoch, *New Families in the Classification of Glycosyl Hydrolases Based on Amino-Acid-Sequence Similarities*. Biochemical Journal, 1993. **293**: p. 781-788.
54. Kasprzewska, A., *Plant chitinases - Regulation and function*. Cellular & Molecular Biology Letters, 2003. **8**(3): p. 809-824.
55. Sampson, M.N. and G.W. Gooday, *Involvement of chitinases of Bacillus thuringiensis during pathogenesis in insects*. Microbiology-Uk, 1998. **144**: p. 2189-2194.
56. Koga, D., et al., *Biochemistry of chitinases*, in *Chitin and chitinases*, P.J.a.R.A.A. Muzzarelli, Editor. 1999, Birkhäuser Verlag Basel (Switzerland). p. 111-123.
57. Neuhaus, J.M., *Plant chitinases (PR-3, PR-4, PR-8, PR-11)*. 1999, CRC Press LLC.
58. Hollis, T., et al., *The X-ray structure of a chitinase from the pathogenic fungus Coccidioides immitis*. Protein Science, 2000. **9**(3): p. 544-551.
59. Henrissat, B., *Classification of chitinases modules*, in *Chitin and chitinases*, P.J.a.R.A.A. Muzzarelli, Editor. 1999, Birkhäuser Verlag Basel (Switzerland). p. 137-156.
60. Robertus, J.D. and A.F. Monzingo, *The structure and action of chitinases*, in *Chitin and chitinases*, P.J.a.R.A.A. Muzzarelli, Editor. 1999, Birkhäuser Verlag Basel (Switzerland). p. 125-135.
61. Itoh, Y., et al., *Functional analysis of the chitin-binding domain of a family 19 chitinase from Streptomyces griseus HUT6037: Substrate-binding affinity and cis-dominant increase of antifungal function*. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2002. **66**(5): p. 1084-1092.

- 
62. Itoh, Y., et al., *Family 19 Chitinase of Streptomyces griseus HUT6037 increases plant resistance to the fungal disease*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2003. **67**(4): p. 847-855.
63. Melchers, L.S., et al., *A New Class of Tobacco Chitinases Homologous to Bacterial Exo-Chitinases Displays Antifungal Activity*. *Plant Journal*, 1994. **5**(4): p. 469-480.
64. Hamel, F., et al., *Structural and evolutionary relationships among chitinases of flowering plants*. *Journal of Molecular Evolution*, 1997. **44**(6): p. 614-624.
65. Tsujibo, H., et al., *Family 19 chitinases from Streptomyces thermoviolaceus OPC-520: Molecular cloning and characterization*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2000. **64**(11): p. 2445-2453.
66. Neuhaus, J.M., et al., *A Short C-Terminal Sequence Is Necessary and Sufficient for the Targeting of Chitinases to the Plant Vacuole*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1991. **88**(22): p. 10362-10366.
67. Iseli, B., T. Boller, and J.M. Neuhaus, *The N-Terminal Cysteine-Rich Domain of Tobacco Class-I Chitinase Is Essential for Chitin-Binding but Not for Catalytic or Antifungal Activity*. *Plant Physiology*, 1993. **103**(1): p. 221-226.
68. Azzouz, F., *Identification moléculaire d'une chitinase CHT-1, sa localisation et son rôle chez le nématode Caenorhabditis elegans*, in *Parasitologie*. 2001, Suisse: Neuchâtel.
69. Gooday, G.W., *Aggressive and defensive roles for chitinases*, in *Chitin and chitinases*, P.J.a.R.A.A. Muzzarelli, Editor. 1999, Birkhäuser Verlag Basel (Switzerland). p. 157-169.
70. Bishop, J.G., A.M. Dean, and T. Mitchell-Olds, *Rapid evolution in plant chitinases: Molecular targets of selection in plant-pathogen coevolution*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000. **97**(10): p. 5322-5327.
71. Dahiya, N., R. Tewari, and G.S. Hoondal, *Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review*. 2005: Applied Microbiology and Biotechnology.
72. Huber, M., E. Cabib, and L.H. Miller, *Malaria Parasite Chitinase and Penetration of the Mosquito Peritrophic Membrane*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1991. **88**(7): p. 2807-2810.
73. Schlein, Y., R.L. Jacobson, and G. Messer, *Leishmania Infections Damage the Feeding Mechanism of the Sandfly Vector and Implement Parasite Transmission by Bite*. *Proceedings*

- of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1992. **89**(20): p. 9944-9948.
74. Shimosaka, M., et al., *The bacterium Burkholderia gladioli strain CHB101 produces two different kinds of chitinases belonging to families 18 and 19 of the glycosyl hydrolases*. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2001. **91**(1): p. 103-105.
75. Fuhrman, J.A., et al., *Transmission-Blocking Antibodies Recognize Microfilarial Chitinase in Brugian Lymphatic Filariasis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1992. **89**(5): p. 1548-1552.
76. Fuhrman, J.A., J. Lee, and D. Dalamagas, *Structure and Function of a Family of Chitinase Isozymes from Brugian Microfilariae*. Experimental Parasitology, 1995. **80**(4): p. 672-680.
77. Raghavan, N., et al., *Cloning and Characterization of a Potentially Protective Chitinase-Like Recombinant Antigen from Wuchereria-Bancrofti*. Infection and Immunity, 1994. **62**(5): p. 1901-1908.
78. Alaeddine, F., *Etudes moléculaires de la surface des nématodes*, in *Parasitologie*. 2000, Suisse: Neuchâtel.
79. Kawase, T., et al., *Distribution and phylogenetic analysis of family 19 chitinases in Actinobacteria*. Applied and Environmental Microbiology, 2004. **70**(2): p. 1135-1144.
80. Geng, J.M., et al., *Secretion of a novel developmentally regulated chitinase (family 19 glycosyl hydrolase) into the perivitelline fluid of the parasitic nematode, Ascaris suum*. Molecular and Biochemical Parasitology, 2002. **124**(1-2): p. 11-21.
81. Dissanayake, S., et al., *Differential Recognition of Microfilarial Chitinase, a Transmission-Blocking Vaccine Candidate Antigen, by Sera from Patients with Brugian and Bancroftian Filariasis*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 1995. **53**(3): p. 289-294.
82. Boot, R.G., et al., *Cloning of a cDNA encoding Chitotriosidase, a Human chitinase produced by macrophages*. Journal of Biological Chemistry, 1995. **270**(44): p. 26252-26256.
83. Renkema, G.H., et al., *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*. European Journal of Biochemistry, 1998. **251**(1-2): p. 504-509.
84. Di Mito, C. and B. Betschart, *DNA extraction from Ascaris suum muscle tissue*. Parasitology Research, 1998. **84**(7): p. 596-597.

- 
85. Saitou, N. and M. Nei, *The Neighbor-Joining Method - a New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees*. Molecular Biology and Evolution, 1987. **4**(4): p. 406-425.
  86. Arnold, K., et al., *Discrete transcripts encode multiple chitinase isoforms in Brugian microfilariae*. Molecular and Biochemical Parasitology, 1996. **80**(2): p. 149-158.
  87. Jones, J.T., C. Furlanetto, and T. Kikuchi, *Horizontal gene transfer from bacteria and fungi as a driving force in the evolution of plant parasitism in nematodes*. Nematology, 2005. **7**: p. 641-646.
  88. Hill, A.A., et al., *Genomic analysis of gene expression in C. elegans*. Science, 2000. **290**: p. 809-812.
  89. Sticher, L., B. MauchMani, and J.P. Metraux, *Systemic acquired resistance*. Annual Review of Phytopathology, 1997. **35**: p. 235-270.
  90. Zimmerli, L., et al., *Potentiation of pathogen-specific defense mechanisms in Arabidopsis by beta-aminobutyric acid*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000. **97**(23): p. 12920-12925.
  91. Ton, J., et al., *Dissecting the beta-aminobutyric acid-induced priming phenomenon in arabidopsis*. Plant Cell, 2005. **17**(3): p. 987-999.
  92. Howells, R.E. and I. Johnstone, *Caenorhabditis-Elegans - a Model for Parasitic Nematodes*. Parasitology Today, 1991. **7**(9): p. 224-226.
  93. Mitreva, M., et al., *Comparative genomics of gene expression in the parasitic and free-living nematodes Strongyloides stercoralis and Caenorhabditis elegans*. Genome Research, 2004. **14**(2): p. 209-220.
  94. Drabner, B., *Charakterisierung und Identifizierung von immunodominanten Bereichen der L3-Chitinase von Onchocerca volvulus*, in *Parasitologie*. 2000, Allemagne: Kiel.
  95. Di Mito, C., *Isolation et caractérisation de gènes codant pour des protéines cuticulaires des nématodes Ascaris suum et Brugia pahangi*, in *Parasitologie*. 2000, Suisse: Neuchâtel.
  96. Brunisholz, V., *Characterization of the antigenicity of cuticular collagens of nematodes*, in *Parasitologie*. 2003, Suisse: Neuchâtel.

**R  
E  
M  
E  
R  
C  
I  
E  
M  
E  
N  
T  
S**

## Remerciements

Mes remerciements les plus sincères s'adressent à toutes les personnes qui d'une façon ou d'une autre m'ont permis de réaliser ce travail.

Je tiens particulièrement à remercier le Professeur Bruno Betschart, directeur de thèse, pour son accueil au sein de son laboratoire, qui a bien voulu suivre ce projet de parasitologie moléculaire et qui a mis les moyens à ma disposition pour que je puisse le mener à terme. Qu'il reçoive ici toute ma reconnaissance pour son soutien tout au long de ces années, pour ses qualités humaines et scientifiques, ainsi que pour la confiance qu'il m'a témoignée.

Merci également au Professeur Jean-Marc Neuhaus, co-directeur de thèse, pour sa disponibilité et sa patience lors de mes visites « juste pour une petite question ». Je tiens également à le remercier pour son investissement dans la correction de ce manuscrit de par ses suggestions, conseils et critiques qu'il a eu la gentillesse de me soumettre et qui m'ont été utiles pour l'élaboration de ce présent ouvrage. Qu'il reçoive ici l'assurance de mon respect et de mon estime.

Un grand merci également au Professeur Fritz Müller et au PD Docteur Ronald Kaminsky pour avoir accepté d'être membres de mon jury de thèse et pour avoir pris la peine de corriger ce travail. Qu'ils reçoivent ici ma plus grande gratitude.

Mes remerciements s'adressent également à mes collègues pour leurs conseils mais également pour la qualité de vie sociale qui m'a été donnée de partager à côté de mes activités de recherches.

Mais mes remerciements ne sauraient être complets. Une mention particulière s'adresse à mes parents, Pierre et Zoéline, ainsi qu'à ma sœur Caroline et à mon frère Ludovic pour m'avoir soutenu et encouragé toute au long de mes études, qui ont su partager avec moi mes peines et mes moments de joie qui jalonnent invariablement le long parcours d'une thèse !

Merci !

**A  
N  
N  
E  
X  
E  
S**

## Annexes

### Annexes I

#### Alignement après séquençage

##### Gène T05H4.7 (sens)

|           |      |                             |                                                     |      |
|-----------|------|-----------------------------|-----------------------------------------------------|------|
| Miniprep: | 64   | AATGGCTGAGCAAAGAGCA         | AACAAAACCAGTCGATGCTCGATTTCTCAGTTCTATTCCG            | 123  |
| Wormbase: | 4880 | AATGGCTGAGCAAAGAGCA         | AACAAAACCAGTCGATGCTCGATTTCTCAGTTCTATTCCG            | 4939 |
| Miniprep: | 124  | CGCACATTC                   | CCCCCTCTCTAGCGCCTCCGCCTTCAATCCGTGTTTTGTCCGATCCGGTCT | 183  |
| Wormbase: | 4940 | CGCACATTC                   | CCCCCTCTCTAGCGCCTCCGCCTTCAATCCGTGTTTTGTCCGATCCGGTCT | 4999 |
| Miniprep: | 184  | GTCGGCGTCTTTTCCGAAAAGT      | GACTCTCTTTGTACTTTGACTGACGCGAGCTTCAACCC              | 243  |
| Wormbase: | 5000 | GTCGGCGTCTTTTCCGAAAAGT      | GACTCTCTTTGTACTTTGACTGACGCGAGCTTCAACCC              | 5059 |
| Miniprep: | 244  | GATGCAATTGCTTTTCCTTCTACTTTT | CACACCTTATACGATCGTTGGTAAGTGTTTGAA                   | 303  |
| Wormbase: | 5060 | GATGCAATTGCTTTTCCTTCTACTTTT | CACACCTTATACGATCGTTGGTAAGTGTTTGAA                   | 5119 |
| Miniprep: | 304  | TTATCTAGAGCCAGTGAAAAAGGAGT  | ACTGAATTCCTTGATGATATCCAGGAGAAAAGCCC                 | 363  |
| Wormbase: | 5120 | TTATCTAGAGCCAGTGAAAAAGGAGT  | ACTGAATTCCTTGATGATATCCAGGAGAAAAGCCC                 | 5179 |
| Miniprep: | 364  | TGATTTCTGCCCCAACATCCAGTTT   | TATGGCAAGGAACCCGAAGAGGACTGTGCTCAAGC                 | 423  |
| Wormbase: | 5180 | TGATTTCTGCCCCAACATCCAGTTT   | TATGGCAAGGAACCCGAAGAGGACTGTGCTCAAGC                 | 5239 |
| Miniprep: | 424  | TTCTGATCCAAATGAGCTTCCAAAGT  | CTCCACTGGAAAAATGGTTTAC                              | 483  |
| Wormbase: | 5240 | TTCTGATCCAAATGAGCTTCCAAAGT  | CTCCACTGGAAAAATGGTTTAC                              | 5299 |
| Miniprep: | 484  | TGAGGACTTATTTCCAAAGTCAAAT   | TATGGAAATGGGACCTCATCCGTGCTTACCGTACTC                | 543  |
| Wormbase: | 5300 | TGAGGACTTATTTCCAAAGTCAAAT   | TATGGAAATGGGACCTCATCCGTGCTTACCGTACTC                | 5359 |
| Miniprep: | 544  | ATATGAATCTTTTATAATGGCTGCT   | CGATACTTTCCCGAGTTTGGAGCAGCACATCCAAA                 | 603  |
| Wormbase: | 5360 | ATATGAATCTTTTATAATGGCTGCT   | CGATACTTTCCCGAGTTTGGAGCAGCACATCCAAA                 | 5419 |
| Miniprep: | 604  | TAAACAATTCAAAGCTGATGAGCAT   | CATAAGAGAGATGTAGCTACATTTTTTGCACACGC                 | 663  |
| Wormbase: | 5420 | TAAACAATTCAAAGCTGATGAGCAT   | CATAAGAGAGATGTAGCTACATTTTTTGCACACGC                 | 5479 |
| Miniprep: | 664  | TTTGCAGGAGACTGGTGAAAA       | 684                                                 |      |
| Wormbase: | 5480 | TTTGCAGGAGACTGGTGAAAA       | 5500                                                |      |

##### Gène T05H4.7 (antisens)

|           |      |                         |                        |                 |        |      |
|-----------|------|-------------------------|------------------------|-----------------|--------|------|
| Miniprep: | 705  | TNNTNNNGGNNNNNTNTNTNNTN | NGNGNNNGNNNCNGTN-TTCTN | NNNNNGNC        | TTTTTT | 647  |
| Wormbase: | 6711 | TATTTGACGGGCAAATATCTCGT | AGCGAAAGCTACAGTTATTCT  | TAAAATGACTTTTTT |        | 6770 |



## Gène C08B6.4 (antisens)

|           |       |                                                                |       |
|-----------|-------|----------------------------------------------------------------|-------|
| Miniprep: | 939   | AATTNANGGGNNTNNGNNGGTNNNTNANNGTTNNGNTTNNGATNAAANAANTTATTTNNNT  | 880   |
| Wormbase: | 15025 | AATTCATGTGCATCTGCTGGTCTTTATTGTTCTGCTTCTGATCAAATAACTTATTTCTAT   | 15084 |
| Miniprep: | 879   | CCANGNTNAAATTNAACAATTTNAAANANNGNNGTCCANNTAAAGGATGTTATTTNGGA    | 820   |
| Wormbase: | 15085 | CCATGCTCAAATTCACAATTTCAAATACTGCTGCTCCATATAAAGGATGTTATTTTGGGA   | 15144 |
| Miniprep: | 819   | NGGGGAGCCATACAAATTTTCGTACAACACTACAACACGGACAATTCCAAGATTGGTTGAGA | 760   |
| Wormbase: | 15145 | CGTGGAGCCATACAAATTTTCGTACAACACTACAACACGGACAATTCCAAGATTGGTTGAGA | 15204 |
| Miniprep: | 759   | ACTGTAAATATTTAAAGTTGATTTATTTAAAGAACCAAATCTTGTAATGACTAAAATGGAT  | 700   |
| Wormbase: | 15205 | ACTGTAAATATTTAAAGTTGATTTATTTAAAGAACCAAATCTTGTAATGACTAAAATGGAT  | 15264 |
| Miniprep: | 699   | CCACCACCTTGCCGTTCTGGCTTCTCTTTGGTTTTATATGACACCTCAACCACCCAAACCT  | 640   |
| Wormbase: | 15265 | CCACCACCTTGCCGTTCTGGCTTCTCTTTGGTTTTATATGACACCTCAACCACCCAAACCT  | 15324 |
| Miniprep: | 639   | GCAATGCATGATATTTGTAATGGGAAACTGGAATAGTGGAGCAAAGAATGCAGCAGCTGGA  | 580   |
| Wormbase: | 15325 | GCAATGCATGATATTTGTAATGGGAAACTGGAATAGTGGAGCAAAGAATGCAGCAGCTGGA  | 15384 |
| Miniprep: | 579   | TATGATGGACCGATCTTTGGGCCAACTTCATTGATAATCAACAATGAATGTTCTGGAGAA   | 520   |
| Wormbase: | 15385 | TATGATGGACCGATCTTTGGGCCAACTTCATTGATAATCAACAATGAATGTTCTGGAGAA   | 15444 |
| Miniprep: | 519   | GATCCAACAAATCCAGGAGTCCAGGAGAATCTAGAAGAATCAAGGCATTCAAATGGTTT    | 460   |
| Wormbase: | 15445 | GATCCAACAAATCCAGGAGTCCAGGAGAATCTAGAAGAATCAAGGCATTCAAATGGTTT    | 15504 |
| Miniprep: | 459   | TGTGGTTACTTTGACACTCCAACAGGACCGAGGCGACCCTCTCTTGTAAGTAAGTTC      | 400   |
| Wormbase: | 15505 | TGTGGTTACTTTGACACTCCAACAGGACCGAGGCGACCCTCTCTTGTAAGTAAGTTC      | 15564 |
| Miniprep: | 399   | AGTTTCATTTTAAATGAATAAGAAATTTATATATATATTAATAAATATCGAGTTAACA     | 340   |
| Wormbase: | 15565 | AGTTTCATTTTAAATGAATAAGAAATTTATATATATATTAATAAATATCGAGTTAACA     | 15624 |
| Miniprep: | 339   | TTCCAGACATGCCTGTACCACTGGATCAAATTTCTATAATCTGAGTTATCAGCCTGAT     | 280   |
| Wormbase: | 15625 | TTCCAGACATGCCTGTACCACTGGATCAAATTTCTATAATCTGAGTTATCAGCCTGAT     | 15684 |
| Miniprep: | 279   | TGGACATCCACCTGGAAAGATGTTCCATGCACCTTGTGCACCAGCCAGTTATGGAGGTC    | 220   |
| Wormbase: | 15685 | TGGACATCCACCTGGAAAGATGTTCCATGCACCTTGTGCACCAGCCAGTTATGGAGGTC    | 15744 |
| Miniprep: | 219   | ATTTTCTATTGTGATCCTGACTACTATCCATCTAGTTTGTGCTCAAACGACTACAAC      | 160   |
| Wormbase: | 15745 | ATTTTCTATTGTGATCCTGACTACTATCCATCTAGTTTGTGCTCAAACGACTACAAC      | 15804 |
| Miniprep: | 159   | CGTATTAAGTGATTTGCGAGTATCTATGCGAACCCATCCATGTATTCTATGGATAACAAG   | 100   |
| Wormbase: | 15805 | CGTATTAAGTGATTTGCGAGTATCTATGCGAACCCATCCATGTATTCTATGGATAACAAG   | 15864 |
| Miniprep: | 99    | ACTTCTCCATGCTTAAATTATTAECTCCATT 69                             |       |
| Wormbase: | 15865 | ACTTCTCCATGCTTAAATTATTAECTCCATT 15895                          |       |

Différentes séquences des chitinases de la famille 19

## chia-1 (NP503391)

atgtcagaaacttatgogaatttcactttcatagactgttctattgtgtctgcaagtctg 60  
 M S E T Y A N F T F I D C S I V S A S R  
 ttggggaatgctagcttgggtccaaaagcaacgaaatatggtaaaagacctccgaaatca 120  
 F G N A S L C P K A T K Y G K R P P K S  
 tgcactcggccaacgggacccaataatctgctgttccaaactagaatcctgggttcag 180  
 C T R P T D P N N L P A S K L E S W F T  
 agagaaatgtttgaagacctattccattttccaatctggatggggtccatcgagttgc 240  
 R E M F E D L F P F S N L G W G P S S C  
 tggccatattcttacgatgcatttaaaattgcatccagatactttccagaatttggaaact 300  
 W P Y S Y T D P N N L P A S R Y F P E F G T  
 tcgattaatgtgaataataaggaagctgtccgatcagatgcttcaaactgtttctaccgt 360  
 S I N V N N K E A V R S D A S N C F Y R  
 ggaggattttataactgggttgaaggaggccaataagtagcttttggaccctaaaact 420  
 G G F Y N W F T E G G P I S S F L D P K T  
 cctgggttatactccatccgacggaaattcatgttcatctgctggcttttattgttctgct 480  
 P G Y T P S D G N S C S S A G L Y C S A  
  
 tctgatcaataacttatttctatccatgctcaaatccaacagtatcaataactgctgct 540  
 S D Q I T Y F Y P C S N S T V S N T A A  
 ccatataaaggatggttatttggacgtggagccattcaaatctcgtaactacaactac 600  
 P Y K G C Y F G R G A I Q I S Y N Y N Y  
 ggacaattccaagattgggtggaactgtaaatattaaagtggatttataaaagaacca 660  
 G Q F Q D W L R T V N I K V D L L K E P  
 aatcttgaatgactaaaatggatccaccacttgccgttctggcttctcttgggttctat 720  
 N L V M T K M D P P L A V L A S L W F Y  
 atgacacctcaaccaccgaaaccagcaatgcatgatattgtaatgggaaactggaatagt 780  
 M T P Q P P K P A M H D I V M G N W N S  
 ggagcaagaatgcagcagctggatgatggaccaatcttggaccaacttcattgatc 840  
 G A K N A A A G Y D G P I F G P T S L I  
 attacaatgaatgctggagaagatccaacaatccaggaggtccaggagaatctaga 900  
 I N N E C S G E D P T N P G G P G E S R  
 agaatcaaggcattcaaatggttcaatggatatttgggtcccccgttggacctgagcat 960  
 R I K A F K W F N G Y F G S P V G P E H  
 acattgtcctgtaaaaatgaagctggacgcttcccaaatataagttatcaaacctaat 1020  
 T L S C K M K L D A I S H N L S Y Q P N  
 tggcttacatcctggaaagaagaaccatgtgattgtgctcctgcaagttatggaggactt 1080  
 W L T S W K E E P C D C A P A S Y G G L  
 gtgaattactatgccagcttttattatccagcaagtttgcagctcagaatgaaataaat 1140  
 V N Y Y D P V Y Y P A K F A A Q N E I N  
 cgcaaaaatgtatcaaatcgatttatgcaaaaaccatcaatgtattcaatggacaagaaa 1200  
 R K K C I K S I Y A K P S M Y S M D K K  
 acttctgcatgtcttaactactaa 1224  
 T S A C L N H \*

## chia-2 (NP504628)

atggctgagcaaaagagcaaaaaccagtcgatgctcgatctcagttctattccgc 60  
 M A E Q R A N K T S R C S I S S V L F R  
 gcacattccccctctctagcctccgccttcaatccgtgttttgcctgatccggctcg 120  
 A H S P L S S A S A F N P C F V R S G L  
 tggcgctctttccgaaaagtgactcttggactttgacttggactgacgagcttcaaccg 180  
 S A S F P K S D S L C T L T D A S F N P  
 atgcaattgcttttctctacttttcacacctatacgatcgttgggaaagccctgat 240  
 M Q L L F L L L F T P Y T I V G E S P D  
 ttctgcccccaatccagtttatggcaaggaaccgaagaggactgtgctcaagcttct 300  
 F C P Q H P V Y G K E P E E D C A Q A S  
 gatccaaatgagcttccaaagtctccactggaaaaatggtttcaaaaacaaatgtttgag 360  
 D P N E L P K S P L E K W F T K Q M F E  
 gacttatttccaaagtcaaatattggaaatgggacctcactcgtgcttaccgtactcata 420  
 D L F P K S N I G M G P H P C L P Y S Y  
 gaatctttataatggctgctcgatactttcccaggttggagcagcatccaataaaa 480  
 E S F I M A A R Y F P E F G A A H P N K

caattcaagctgatgagcatcataagagagatgtagctacatttttgcacacgcttg 540  
 Q F K A D E H H K R D V A T F F A H A L  
 caggagactggtaaaatgatgcaagtgttataataataccgatctaacactgaacaa 600  
 Q E T G E N D A S V Y N N T D L T L E Q  
 gctcaccagtgcttctatcggtgggattctataattggtttgacgtggacaaactct 660  
 A H E C F Y R G G F Y N W F E R G P N S  
 acattcctttctccagcagctccaggattctctccatttgatggtaaaagatgtactgac 720  
 T F L S P A A P G F S P F D G K R C T D  
 gagggaaagatactgcaagtcggatccgattattgatttttggatccatgtaactcagat 780  
 E G R Y C K S D P I I D F W Y P C N S D  
 atcgaatcacattctgacaaagaatatcataaaggatgttatttcggacgagggtgctctc 840  
 I E S H S D K E Y H K G C Y F G R G A L  
 caactttcctggaactacaactatgggcttttccaacagtttctgctcacaagaaggggtg 900  
 Q L S W N Y N Y G L F Q Q F L L T K G V  
 aaagtgtgactcaattggaatccaaatctagttatgacaaaaatggatccaccacttgc 960  
 K V D L I E N P N L V M T K M D P P L A  
 atgatggcatctttgtggttttatatgactcctcaaccacaaaacctcaatgcatcaa 1020  
 M M A S L W F Y M T P Q P P K P S M H Q  
 atagtaaccggcgactggaaccgctctcaagaatcggagagccgatatacaggagct 1080  
 I V T G D W K P S S K N R R A G Y Q G A  
 atttttggccaaccagctcttataatcaataatgaatggtgggtggaagatccagatgag 1140  
 I F G P T S L I I N N E C G G E D P D E  
 cctggaggctcccgtaaatctcgaagaataaaagcattcaaatggttctgtaataactc 1200  
 P G G P G E S R R I K A F K W F C K Y F  
 aaagtccagttggctccgagagaacacttagctgtaaaggaatgctggacggattcgac 1260  
 K V P V G S E R T L S C K G M L D G F D  
 gctgttcaacacatgactcttggcatccagatgggggaatggtggaatctcaatcg 1320  
 A V Q H M Y S W H P D W G N M W K S Q S  
 tgtgattgtgctccgctccatattggtggctccacttccatactacgatccgaaactgat 1380  
 C D C A P A P Y G G P L P Y Y D P K L Y  
 ccacacgaatttacaaaaacaaacgatcgaatcgtttgcgatggtctacagatgtac 1440  
 P H E F T K Q N D R N R L R C V Y S M Y  
 gaagccagagacattccgacttgatgctggaactcgccttctgctgagcataaacgg 1500  
 E S P E T F R L D A G N S P C L K H K P  
 aaaattcgcttgacaaaactggaataaggggatag 1536  
 K I R L T K T G I R G \*

chia-3 (NP001023634)

atgactcgcacataaaagtgtcatttttaacgggtttttctcatttttgcacataaactcaatt 60  
 M T R I K S V I L T V F L I F A H N S I  
 gtgtcggctgttgactatggaaatgcaagttcttgtccaaaagctgccaaatggaaca 120  
 V S A V D Y G N A S S C P K A A K Y G T  
 gggcctccagacatgactcaaccaactgacccaacaataatgcctgcttctgaatta 180  
 G P P E S C T Q P T D P N N M P A S E L  
 gaatcctggttcaagagagaatgtttgaagacctattccatttgcacatcttggatgg 240  
 E S W F T R E M F E D L F P F A N L G W  
 ggtccttcgagttgctggccatattcctacgatgctttcaaaattgcacccagatatttt 300  
 G P S S C W P Y S Y D A F K I A S R Y F  
 ccagaatttggaaacttcgatcaatggaataatcgggtgtatactgaggatgagaataag 360  
 P E F G T S I N V N N T V Y T A D E N K  
 aaaagagacttggcggcttcttggccacgctgttcaagaaactggagagaacaacatt 420  
 K R D L A A F F A H A V Q E T G E N N I  
 gctctatgatgacacatttccgatcaagatgcttcaaaactgtttctaccgtggaggattt 480  
 A L Y D T L S D Q D A S N C F Y R G G F  
 tataactggtttgaaggaggaccaacaagtagcttttggatcctaaaactcctgggttat 540  
 Y N W F E G G P T S S F L D P K T P G Y  
 actccagccgacggaaattcattgcatctgctggctttatttctgcttctgatcaa 600  
 T P A D G N S C A S A G L Y C S A S D Q  
 ataacttatttctatccatgctcaaatccaacttcaaaactgctgctccatataaa 660  
 I T Y F Y P C S N S T I S N T A A P Y K  
 ggtatgtattttggacgtggagccatacaaaatttctgacaactacaactacggacaattc 720  
 G C Y F G R G A I Q I S Y N Y N Y G Q F  
 caagattgggttgagaactgtaaatattaaagttgatttattaaagaacaaaacttggta 780  
 Q D W L R T V N I K V D L L K E P N L V  
 atgactaaaatggatccaccacttgcgcttctggcttctcttggttttatgatgacct 840  
 M T K M D P P L A V L A S L W F Y M T P  
 caaccacccaaactgcaatgcatgattgtaatgggaaactggaatagtggagcaaaag 900  
 Q P P K P A M H D I V M G N W N S G A K

aatgcagcagctggatgatgaccgatccttgggccaacttcattgataatcaacaat 960  
 N A A A G Y D G P I F G P T S L I I N N  
 gaatgtctggagaagatccaacaaatccaggaggccaggagaatctagaagaatcaag 1020  
 E C S G E D P T N P G G P G E S R R I K  
 gcattcaaatggttttgggttactttgacactccaacaggacgggagcgacctctct 1080  
 A F K W F C G Y F D T P T G P E A T L S  
 gttaaaacatgctgtaccactggatcaaattttctataatctgagttatcagcctgat 1140  
 C K N M P V P L D Q I F Y N L S Y Q P D  
 tggacatccacctggaaagatgttccatgcacttgtgcaccagccagttatggaggctct 1200  
 W T S T W K D V P C T C A P A S Y G G L  
 attttctattatgatcctgactactatccatctagtttggctgctcaaacgactacaac 1260  
 I F Y Y D P D Y Y P S S F A A Q N D Y N  
 cgtattaagtgtattgcgagtatctatgcgaaccatccatgtattctatggataacaag 1320  
 R I K C I A S I Y A N P S M Y S M D N K  
 acttctccatgcttaaatatttaa 1344  
 T S P C L N Y \*

chia-4 (NP505607)

atgacttttttgtgtatactgggaatcctttgcagatcaatcgctgaaaaaagtggttac 60  
 M T F L C I L G I L C R S I A E K S G Y  
 atgcggttgaaaaatccaatttgcattctgaaaaatgtggttatttaataattattgtg 120  
 M R L K I S I C Q S E K M C Y L I I I V  
 tccaaaagcggcaatggacctccgaaatcatgcactccgccaacggatccaaataatctt 180  
 S K S G N G P P K S C T P P T D P N N L  
 cctgcttcaaaactagaatgctgggttcacgagagaaatgtttgaagacctgttccattt 240  
 P A S K L E C W F T R E M F E D L F P F  
 gccaatcttggatggggtccttcgagttgctggccatattcttacgatgttttcaaaatt 300  
 A N L G W G P S S C W P Y S Y D V F K I  
 gcattccagatactttccagaatttggaaacttcgatcaatgtcaacaatactatgtatata 360  
 A S R Y F P A E F G T S I N V N N T M Y I  
 ctgcatgaaaaataagaaacgagatttgcggctttctttgccatgctattcaagaaact 420  
 L H E N K K R D L T A F F A H A I Q E T  
 tcaaaattgatgaatttcagacatcagtcgatcaagatgcataaactgtttctaccgt 480  
 S K L M N F R H G F G T S D Q D A S N C F Y R  
 ggaggattttataactggtttgaagaggaccaacaagtagctttttggaccctaaaact 540  
 G G F Y N W F E R G P T S S F L D P K T  
 cctggtatactccagccgacggaactcatgtgcattcttctggtctttattgttctgct 600  
 P G Y T P A D G N S C A S S G L Y C S A  
 tctgatcaataacttatttctatccatgctcaaatcaacaatttcaaacactgttgct 660  
 S D Q I T Y F Y P C S N S T I S N T V A  
 tcccatagaggatgctattttggacgcggaacaattcaaatcttctgacaactacaactac 720  
 S H R G C Y F G R G T I Q I S Y N Y N Y  
 ggacaattccagattccagaacattgaaaaaaaaactaataattcttctgcatttccac 780  
 G Q F Q D S R T L K K K T N N S S A F H  
 acttactttattgtcatcatgagtgccggaagatctga 819  
 T Y F I V I M S V R K I \*

chia-5/6 (NP506472/NP506473)

atgtcggcgcaattcgtcgcatttcttctcatcgcatttaatttgcctctaccggccaac 60  
 M S A Q F V A F L L I A F N L S L P A N  
 gcattcaacgggtgcaaatgcattctgttggctctttttggaacgcgagttcatgtccaaaa 120  
 A F N G A N A S V G L F G N A S S C P K  
 gcagcaaaatttggaaagggaccacaaagtcatgcactatacctagtgaccacaaacat 180  
 A A K F G K G P P K S C T I P S D P N N  
 aagccagcttctcagctagaatcctggttcaccagagaatgtttgaagacttgtttcca 240  
 K P A S Q L E S W F T R E M F E D L F P  
 ttcgcaaatcttggatggggtccgctgagctgctggccatattcttacgatgcttttaa 300  
 F A N L G V G P S S C W P Y S Y D A F K  
 attgcatccagatattttccagagtttggaaacttctcttaattggaataaacacggtgat 360  
 I A S R Y F P E F G T S L N V N N T V Y  
 actgcggaagagaataaaaaacgagatttggctgcttctttgccatgcaattcaagaa 420  
 T A D E N K K R D L A A F F A H A I Q E  
 actggagaaaaacaactatctttatacggcgttcccgatcaagaggcatccaattgt 480  
 T G E N N N Y L Y T A L P D Q E A S N C

ttctaccgcccggaggattttataactggtttgaagggtggaccgtcaagtaactttttaaac 540  
 F Y R G G F Y N W F E G G P S S N F L N  
 ccagaaaacacctggctcactctccaactgatggaaattcatgtacatctgctggctggttac 600  
 P E T P G H S P T D G N S C T S A G R Y  
 tgttctgcttctgatcagattacctttttctatccctgctccaattcaacaatttcaaac 660  
 C S A S D Q I T F F Y P C S N S T I S N  
 cctgctgctccatataaaggatgctatttttggagaggaggaattcaaatctcgataaac 720  
 P A A P Y K G C Y F G R G G I Q I S Y N  
 tacaactacgggcagttccaagattggttgaaatctgtaaatattacagttgacttattg 780  
 Y N Y G Q F Q D W L K S V N I T V D L L  
 aaagaaccaaactctgtaatgactaaaatggatccaccacttggcattatggcttctctt 840  
 K E P N L V M T K M D P P L A I M A S L  
 tggttctacatgacacctcaaccaccaaaccagcaatgcatgatattttaatgggaaat 900  
 W F Y M T P Q P K P A M H D I L M G N  
 aactggaaatagtggtgcacagtcagcagctggatgatgggccaatctttggaccaact 960  
 W N S G A Q N S A A G Y D G P I F G P T  
 tcattaatcattaataatgaatgttctggagaagattcaaaaaatccaggaggaccagga 1020  
 S L I I N N E C S G E D S K N P G G P G  
 gaatcaagaagaatcaaggatccaagtggttcaatggataactttggctcccctgttga 1080  
 E S R R I K A F K W F N G Y F G S P V G  
 cctgaacatacactgtcttgggaaaaatgccagtgaaacttaatgcgatacccactat 1140  
 P E H T L S C G K M P V K L N A I P H Y  
 cagagttatcaacctgattggagttcactcctggaaaccagaacgatgtgactgtgctcct 1200  
 Q S Y Q P D W S S S W K P E R C D C A P  
 gcaagttacggaggactcgtgtattattttgatccaaactattaccagccagttttgtt 1260  
 A S Y G G L V Y Y F D P N Y Y P A S F V  
 gctcaaacgatttgaaatcgcaagaatgtattgaaactgtttatgcaaatccatcaatg 1320  
 A Q N D L N R K K C I E T V Y A N P S M  
 tatttcattggataaaaaaattcattatgccttaattattga 1362  
 Y F M D K K N S L C L N Y \*

H. megidis

aaacgagatttggctgccttctttgcccattgcaattcaagaaactagagaaaacaacaac  
 K R D L A A F F A H A I Q E T R E N N N  
 tatctttatacgttaagttttatataagtaaaagatggagtagtctgtatcgtccgtagagatt  
 Y L Y T A

ttactgcaaatgaaatcaaactggttgaattgccaaataaaactcttacttctagaaaa

aataactaaatgtatattttttccctttaaacttttagaacagttttacgaatttct

tagggtaacatttagtcatgacaataatttccagcggccttcccgatcaagaggcatcca

L P D Q E A S

attgtttctaccgcccggaggattttataactggtttgaagggtggaccgtcaagtaactttt

N C F Y R G G F Y N W F E G G P S S N F

taaaccagaaaacacctggctcactctccaactgatggaaattcatgtacatctgctggct

L N P E T P G H S P T D G N S C T S A G

gttactgttctgcttctgatcagattacctttttctatccctgctccaattcaacaattt

R Y C S A S D Q I T F F Y P C S N S T I

caaaccctgctcctcatataaagggtgctatttttggagaggaggaattcaaatctcgt

S N P A A P Y K G C Y F G R G G I Q I S

ataactacaactacgg

Y N Y N Y

B. malayi

aagagagatgtagctacattttttgacacgctttgaggagactgggaaaaatgatgca

K R D V A T F F A H A L Q E T G E N D A

agtgtttataagtggattataaagatcttagtgggagatccaggtttttagtatttttta

S V Y N

gttgattcatattaccaaatcagaagaactgaactgagaccttttcaagaatgcac

tgcctttatatagacgtoccatagaaaataaagtattaatatctccagtaataccgatc  
 N T D  
 taacacttgaacaagctcacgagtgcttctatcgtggcggattctataattggttgaac  
 L T L E Q A H E C F Y R G G F Y N W F E  
 gtggaccaaaactctacattcctttctccagcagctccgggatcccaatcttactttct  
 R G P N S T F L S P A A P  
 taaaatgagtttaaacctgatatttcaggattctctccatttgatggtaaaagatgtact  
 G F S P F D G K R C T  
 gacgaggggaagatactgcaagtcggatccgattattgatttttggtatccatgtaactca  
 D E G R Y C K S D P I I D F W Y P C N S  
 gatatcgaatcacattctgacaaagaatatcataaaggatattatttcggacgaggtgct  
 D I E S H S D K E Y H K G Y Y F G R G A  
 ctccaactttctggaactacaactatgg  
 L Q L S W N Y N Y

A.sum (AF395836)

tcattactgatattttctattctatgtgacgaaaaataaacgcgctcattcgactgtccg  
 S L L I F L F Y V T K K I N A S F D C P  
 ccacagcaaagatttggcatgggaccgccatcgagttgtgcaccacctccgatccgaac  
 P Q Q R F G M G P P S S C A P P S D P N  
 aatttgcaccatccgaacttgaacttgggtttaccaaacgctgttcgaggatctttc  
 N L P P S E L E T W F T K D V F E D L F  
 ccatatgcaaataattggttgggttccaacaaatgctggccatattcatatgaagcattc  
 P Y A N I G W G P N K C W P Y S Y E A F  
 gtcattgcccgcagttatttccaggatttggcacctcatcaccgaataactgtgcatacg  
 V I A A R Y F P G F G T S S P N T V H T  
 aaggagcagaatacgcgacgtgatttagcggccttcttcgcacaagcacttcaggaaacc  
 K E Q N T R R D L A A F F A Q A L Q E T  
 ggagctaatgatgcacgctctacggaggtggcagaactgttcaagaagcaaacgactgt  
 G A N D A S L Y G G G R T V Q E A N D C  
 tactataggggtgattctataattggttgaagggtggtccagtttcaagtttctcaac  
 Y Y R G G F Y N W F E G G P V S S F L N  
 ccaaactctcctggctatcaaccaaacgatggaagggagtgtaatgtggccggaatata  
 P N S P G Y Q P N D G R E C N V A G I Y  
 tgttcatcatctccagagatcagctactggatccatgcaaaggtagtactgagccaatt  
 C S S S P E I S Y W Y P C K G S T E P I  
 aatggctattatactggttctatttggtagaggagcacttcagatttcatacaactac  
 N G Y Y T G C Y F G R G A L Q I S Y N Y  
 aattacggtcaatttcaaaattggttacacagtagaggatcaatgtcaatcttctagcg  
 N Y G Q F Q N W L H S R G I N V N L L A  
 gaacctaatctagtttaacgaaaatggatcccccaattgcccgtgcttgcattatgg  
 E P N L V L T K M D P P I A V L A S L W  
 ttctatagactccacaaccacaaaaccagctatgcacgatattataatcgggttgtgg  
 F Y M T P Q P P K P A M H D I I I G L W  
 aatcctggaccagtggaaggcggcgggttatacgggaccgatcttggaccaacaagt  
 N P G P V D K A A G Y T G P I F G P T S  
 ctgatcatcaacaacgaatgtggtggagaagatgccagtaaccagggtggaccaggagag  
 L I I N N E C G G E D A S N P G G P G E  
 agtcgtcgaatcaaagcgtttaaattggttttgaactatttccggagtcccctatggagaa  
 S R R I K A F K W F C N Y F G V P Y G E  
 cagcgattactttcatgcaaagatatgcccgaagtttgatgatgctgctataatctc  
 Q R L L S C K D M P Q K F D M M R Y N L  
 agttaccaaccggattggtcatcgacatggaatcggagccgtgccaatgtgctccagcg  
 S Y Q P D W S S T W K S E P C Q C A P A  
 acatacgcaggatcgtaccgtaacttcgatccagattattatccagaagaattcgttgcg  
 T Y A G I V P Y F D P D Y Y P E E F V A  
 ttgaaatgaagaaatcgtaaacgttatgtgattagcgtctatgagaatccaagatgtac  
 L N E E N R K R Y V I S V Y E N P S M Y  
 ggtatggttcccgcgttaaattccatgtcttgaatacgcacagatcgaggggaagtggtaac  
 G M V P A L N P C L E Y D T I E G S G T  
 aactaa  
 N \*

**V.vinifera(I) (CAA90970)**

MGLWALVAFC LLSLILVGS A EQCGGQAGGR VCPGGACCSK FGWCGNTADY CGSGCQSQCS STGDIGQLIT RSMFNDMLKH  
RNEGSCPGKG FYTYDAFIAA AKAFPFGFTT GDTTTRKREI AAFLAQTSHE TTGGWASAPD GPYAWGYCYL REQSGPGAYC  
VPSAQWPCAA GRKYYGRGPI QISYNYNYGQ AGKAIGVDLV NNPDVATDA VISFKTAFWF WMTPQSPKPS CHNVITGGWT  
PSGADRSAGR LPFGFVITNI INGGVECGKG VVPQVQDRIG FYKRYCDILR VSYGNLDCN NQRPFSGSGLL LDTI

**H.vulgare(I) (Q42839)**

MRGPSVVVAI VAIVLSAALA MAMVVRAQQC GSQAGGATCP NCLCCSRFGY CGSTSDYCGA GCQSQCSCGC PTPPGPSPGG  
GVSSIIISRD L FEQFLLRDR CQDAAGFYTY DAFLAAATF PAFGTTGSTE TRKQEVAAFF GQTSHETTGG WATAPDGPYS  
WGYCYRRELG SPPDYCQPSS QWPCVQDRQY YGRGPIMLSW NYNYGPAGRA IGVDLLNNDP LVATDATVSF RTALWFWMTF  
QANKPSSHAV ITGQWTPATA DTAAGRVPY GYVITNIINGG LECGRGADSR VADRIGFYQR YCNILGVGYG GNLDYCNQRP  
FVEGLLIQRV TE

**O.sativa(I) (Q42992)**

MKATTTAVAL LVAAAAMVAQ VVAEQCGSQA GGALCPNCLC CSSYGCWGST SDYCGDGCQS QCDGCGGGGG GGGGGGGGGG  
GGGAVEAVVS KELFEQLLLH RNDAACPARG FYTYDAFVTA AAAPDFAAAT GDDEARKREV AAFLGQTSHE TTGGWATAPD  
GPYSWGYCFK EEIAAAASYC VASAEWPCAA DKKYFGRGPI QLSYNYNYGP AGEAIGEDLL NNPELVASDP VVSFKTALWF  
WMTPQSPKPS CHDVITGQWT PSSGDIAAGR VPGYGVITNI INGGLECGFG PDDRANRIG FYQRYCDVLG IGYSNLDCY  
DQRPFNSGLA AVQ

**A.hypogaea(II) (CAA57774)**

MKFCNFFFTT LALIVLQAL GASADDAGTI ITQPLYNEFL KHLTDSRCEA HGFYTYNAFV TAARAFPAFG TTGDDVTRKR  
ELAAFFGQTS HETTGGTTNA PDEFWGYCF LREQTKQHC DSTQAPCPAG KQYYGRGPIQ LTSNSNYQLA GQAIKADLIN  
NPDVATDAV ISFKTAIWFV MTPQGNKPS HDVITNAWRP TATDSAAGRA PGYGVITNII NGGIECGKGA NTNSNNRIGF  
YKRYCDILKI GYGSNLDCAN QQHF

**H.vulgare(II) (P11955)**

MRAFVLFAVV AMAATMAVAE QCGSQAGGAT CPNCLCCSRF GWCSTPYCG DGCQSQCSCG GGGSTPVPTT PSGGGVSSI  
VSRALFDRML LHRNDGACQA KGFYTYDAFV AAASAFRGFG TTGGTDTRKR EVAFLAQTS HETTGGWATA PDGAFWGYC  
FKQERGATSN YCTPSAQWPC APGKSYGRG PIQLSHNYNY GPAGRAIGVD LLRNPDLVAT DPTVSFKTAM WFWMTAQAPK  
PSSHAVITGQ WSPSGTDRAA GRVPGFVIT NIVNGGIECG HGQDSRVADR IGFYKRYCDI LGVGYGNLDCY CYSQRPFPA

**C.ensiformis(II) (O81934)**

MKLGSVFTFT LAYILLVTSS KLPSVAGDDV GSVIDASLFD QLLKHRNDPA CEGKGFYSYN AFVTAARSFG GFGTTGDTNT  
 RKREVA AFLA QTSHETGGA AGSPDGPYAW GYCFVTERDK SNKYCDPGTP CPAGKSYGR GPIQLTHNYN YAQAGRALGV  
 DLINNPDLVA RDAVISFKTA IWFWMTPQGN KPSCHDVITN RWTPSAADVA ANRTPGFVI TNIINGGIEC GRGSPASGD  
 RIGFYKRYCD VLHLSYGP NL NCRDQRPF GG

**A.thaliana (IV) (CAA74930)**

MLTPTISKSI SLVTILLVLQ AFSNTTKAQN CGCSSELCCS QFGFCGNTSD YCGVGCQGGP CFAPPPANGV SVAEIVTQEF  
 FNGIISQAAS SCAGNRFYSR GAFLEALDSY SRFGRVGSTD DSRREIAAFF AHVTHETGRN FCYIEEIDGA SKDYCDENAT  
 QYPCPNKGY YGRGPIQLSW NFNYGPAGTA IGF DGLNAPE TVATDPVISF KTALWYWTNR VQPVISQGGF ATIRAINGAL  
 ECDGANTATV QARVRYTYDY CRQLGVDPGN NLTC

**O.sativa(IV) (O04138)**

MANSPTLTML VFLAIGLSLV LSAAGVSVES VVTEAFFNGI KNQAPNGCAG KSFYTRQSFL NAARSYSGFA NDRTNDDSKR  
 EIAAFFAHVT HETGHMCYIN EINGANMDYC DKS NKQWPCQ PGK KYGRGP LQISWNFN YG PAGKNIGFDG LRDPDKVAQD  
 PTISFKTALW FWMNVHQVM SQFGATIRA INGALECN GK NPGAVNARVN YKDYCRQFG VSPGGNLYC

**S.griseus (BAA23739)**

MYRRVMSLLV ALGAIVAALI VLPATTAQAA TCATAWSSSS VYTINGGTVSY NGRNYTAKWW TQNERPGTSD VWADKGACGT  
 GGEGPGGNNG FVVSEAQFNQ MFPNRNAFYT YKGLTDALSA YPAFAKTGSD EVKKREAAAF LANVSHETGG LFYI KEVNEA  
 NYPHYCDTTQ SYGCPAQAA YYGRGPIQLS WNFNYKAAGD ALGINLLANP YLVEQDPAVA WKTGLWYWNS QNGPGTMTPH  
 NAIVNNAGFG ETIRSINGAL ECNGGNPAQV QSRINKFTQF TQILGTTTGP NLSC

## **Annexes II**

### **(Protocoles des différentes expériences citées dans le chapitre "Matériel et méthodes")**

#### Elevage de *C. elegans*

##### *NGM agar 2.2%*

Dissoudre 1.5 g de NaCl, 11 g d'agar, 1.25 g de Bacto-peptone et 500 µl de cholestérol dans 400 ml d'H<sub>2</sub>O. Ajuster le volume à 500 ml avec de l'H<sub>2</sub>O. Mettre l'agar directement dans les bouteilles. **Autoclaver !** Ajouter ensuite stérilement 500 µl de CaCl<sub>2</sub> 1M, 500 µl de MgSO<sub>4</sub> 1M et 12.5 ml de tampon potassium-phosphate (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 1M pH6.

Remarques : \*les solutions sont ajoutées après filtration stérile  
\*l'agar doit être maintenu à 50°C au maximum en cas d'ajout d'antibiotique (ne supporte pas les hautes températures)  
\*le milieu pauvre en uracyl prévient la sucroissance des bactéries qui masquerait les nématodes

#### Formation du tapis bactérien

Déposer quelques gouttes de culture bactérienne de *E. coli* OP50 sur l'agar à l'aide d'une pipette stérile. Etaler sur toute la surface et enlever le surplus. Laisser sécher les boîtes puis les fermer avec du parafilm.

Remarque : \*Laisser reposer les boîtes au moins une nuit avant de transférer les vers dessus afin que le tapis bactérien puisse s'établir.

#### Transfert des vers

Rincer deux fois la plaque avec du tampon M9, récolter les vers dans un tube conique et centrifuger 30 secondes à 1000 rpm pour faire décanter les adultes. Retirer le maximum de tampon M9 et déposer quelques gouttes du solde restant sur des boîtes de Pétri contenant les bactéries.

#### Extraction d'ADN des vers (*A. suum*)

→ Les vers ont auparavant été lavés et congelés !

Laisser fondre les vers à 37°C puis équilibrer les tubes pour obtenir un volume de 0.5 ml. Ajouter dans chaque Eppendorf 25µl de SDS 10%, 2.5µl de protéinase K et 1µl de β-mercaptoéthanol. Placer les tubes à incuber à 65°C au bain-marie et les renverser toutes les 10 minutes pendant 30 minutes. Laisser encore au bain-marie pendant 30 minutes supplémentaires. Ajouter alors dans chaque tube 2.5µl de protéinase K puis incuber à nouveau les tubes à 65°C au bain-marie pendant 1 heure. Ajouter encore dans chaque tube 2.5µl de protéinase K et incuber une dernière heure à 65°C au bain-marie.

→ Obtention d'un liquide visqueux homogène de couleur jaune laiteux. Si ce n'est pas le cas mettre au frigo toute une nuit ou ajouter encore de la protéinase K !

Ajouter dans chaque tube 0.5ml de phénol-chloroforme 1 : 1. Balancer les tubes pendant 30 minutes puis centrifuger 2 minutes à 14000 rpm. Prélever le surnageant (contient l'ADN et l'ARN) et le transférer dans de nouveaux tubes. Refaire les mêmes étapes et ajouter ensuite 1.2ml d'EtOH 100% et renverser les tubes une dizaine de fois (formation de la chaîne ADN-ARN). Transvaser la chaîne dans de nouveaux tubes contenant 1ml d'EtOH 100%. Balancer les tubes pendant 45 minutes puis centrifuger rapidement avant d'enlever le surnageant. Laisser sécher les tubes pendant 15 minutes avant d'ajouter 0.5ml de solution TEN (Tris 40mM pH7.5 / EDTA 1mM pH8 / NaCl 150mM). Laisser reposer toute la nuit au frigo.

Placer les tubes 1 heure à 37°C au bain-marie puis ajouter 3µl de RNase A (séparation de l'ADN et de l'ARN) et incubé à nouveau 1 heure à 37°C au bain-marie. Ajouter dans chaque tube 0.5ml de phénol-chloroforme 1 : 1. Balancer les tubes pendant 30 minutes avant de centrifuger 2 minutes à 14000 rpm. Prélever le surnageant et le transférer dans de nouveaux tubes. Ajouter ensuite 0.5ml de chloroforme uniquement, balancer, centrifuger et prélever comme avant. Ajouter alors 0.8ml d'EtOH 100% pour dénaturer l'ARN. Renverser les tubes une dizaine de fois (formation de la chaîne d'ADN en hélice) puis transvaser la chaîne dans de nouveaux tubes contenant 1ml d'EtOH 100%. Balancer les tubes pendant 1 heure et centrifuger rapidement avant d'ôter le surnageant. Ajouter 50µl de solution TE (Tris 10mM pH8 / EDTA 1mM pH8) et placer les tubes au frigo.

### Ligation

→ Pour un volume final de 20 µl

Mélanger 2µl de tampon 10x, 2µl de vecteur et 1µl de ligase T4 avant d'ajouter 6µl d'ADN. Compléter le volume avec de l'H<sub>2</sub>O. **Incuber 1 heure à température ambiante !**

### Transformation

- **Milieu LB liquide**

Dissoudre 2g de Bacto-tryptone, 1g de Bacto-yeast extract, 200µl de NaOH 1N et 1g de NaCl pour un volume final de 200 ml d'H<sub>2</sub>O. Ajuster le pH à 7 à l'aide d'une solution de NaOH 5N. **Autoclaver !** Laisser ensuite le milieu refroidir et ajouter l'antibiotique approprié si nécessaire.

- **Cellules compétentes**

a) *Bactéries (E. coli souches DH5α, JM109 et BL21)*

#### **Travailler stérilement et à 4°C ! Refroidir le rotor à 4°C avant de commencer !**

Inoculer 5ml de milieu LB liquide avec *E. coli*. Faire croître les cellules toute la nuit à 37°C sur agitation. Inoculer ensuite 50ml de LB liquide avec antibiotique dans un erlenmeyer de 500ml avec 50µl de culture bactérienne fraîche. Incuber à 37°C avec agitation jusqu'à obtenir une densité de culture de  $5 \times 10^7$  cellules par ml (DO<sub>600</sub> d'environ 0.5). Répartir la culture dans 2 tubes coniques de 50ml et incubé dans la glace pour 10 à 15 minutes. Centrifuger les cellules à 2500 rpm pendant 15 minutes et à 4°C. Enlever le surnageant ainsi que toutes les gouttes des parois en retournant les tubes sur un papier. Resuspendre le culot dans 16ml de tampon RF-1 puis vortexer à faible vitesse. Incuber les tubes 15 minutes dans la glace. Centrifuger à 2500 rpm pendant 15 minutes à 4°C. Enlever le surnageant et resuspendre le culot dans 4ml de tampon RF-2. Incuber les tubes pendant

15 minutes dans la glace puis distribuer 100µl de cellules dans des tubes Eppendorf. Plonger les tubes dans l'azote liquide et les conserver à -80°C.

**Tampon RF-1** : Dissoudre 1.96g de KCl, 1.78g de MnCl<sub>2</sub> 4H<sub>2</sub>O, 0.44g de CaCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O et 34.5g glycérol 87%. Ajouter 6ml de KAc 1M pH7.5. Ajuster le pH à 5.8 avec de l'acide acétique 200 mM et compléter le volume à 200ml. **Stériliser par filtration !**

**Tampon RF-2** : Dissoudre 0.196g de KCl, 2.2g de CaCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O et 34.5g de glycérol 87%. Ajouter 4ml MOPS 0.5M, pH6.8. Compléter le volume à 200ml.

*b) Levures (P. pastoris GS115)*

Inoculer 5ml de milieu YPD-Glu (5g extrait de levure et 10g peptone dans 500ml d'H<sub>2</sub>O distillée, autoclaver puis ajouter 50ml glucose 20% stérile) avec 1 colonie de levures 2 jours avant la transformation. Incuber toute la nuit à 30°C jusqu'à saturation. Le jour précédent la transformation, linéariser le plasmide par digestion avec *Sal I* pour générer des clones MUT+ et *Bgl II* pour obtenir des clones MUT- (5-10µg dans 2.5-5µl). Inoculer 1 bouteille de 2 litres contenant 500ml de milieu YPD-Glu avec la culture saturée la nuit avant la transformation. Incuber toute la nuit sur agitation à 30°C. Centrifuger à 1500g pendant 5 minutes à 4°C. Resuspendre vigoureusement le culot dans 500ml d'H<sub>2</sub>O stérile. Centrifuger dans les mêmes conditions, laver le culot et concentrer les cellules 3 fois par centrifugation à 1500g pour 5 minutes : resuspendre le premier culot dans 250ml d'H<sub>2</sub>O stérile froide, le second culot dans 20ml d'H<sub>2</sub>O stérile – sorbitol 1M (transférer dans un tube Falcon 50ml stérile) et le troisième culot dans 0.3ml de sorbitol 1M stérile froid (volume final de 800µl). Transférer la culture concentrée de levures dans un tube Eppendorf stérile froid.

**A) Transformation par choc thermique**

Dégeler lentement les cellules compétentes sur glace puis ajouter l'ADN de ligation. Mélanger doucement à la pipette et incuber 30 minutes dans la glace. Mettre 45 secondes à 42°C précisément. Incuber 10 minutes dans la glace puis ajouter 900µl de LB liquide. Agiter à 37°C pendant 1 heure et demie et étaler sur des boîtes de LB contenant l'antibiotique approprié. Incuber toute la nuit à 37°C.

**B) Electroporation**

*a) Bactéries (E. coli souches Dh5α)*

- **Milieu SOC**

Dissoudre 4g de Bacto-tryptone, 1g de Bacto-yeast extract ainsi que 0.12g de NaCl et 0.4g de KCl pour 200ml de solution. **Autoclaver !** Laisser ensuite le milieu refroidir et ajouter stérilement 2ml de MgCl<sub>2</sub> 2M et également 2ml de MgSO<sub>4</sub> 2M. Ajouter encore 2ml de glucose 2M.

- **Electroporation**

Décongeler les cellules compétentes lentement sur glace puis mélanger 40µl de cellules compétentes avec 1 à 2µl d'ADN. Laisser dans la glace pendant 1 minute. Régler l'appareil d'électroporation (BioRad *E. coli* pulser) :

|            |       |
|------------|-------|
| Capacité   | 25µF  |
| Voltage    | 2.5kV |
| Résistance | 2000  |

Transférer le mélange cellules/ADN dans une cuve d'électroporation puis déclencher le choc. Ajouter immédiatement 500µl de tampon SOC dans la cuve, mélanger à la pipette puis transférer la solution dans un tube Eppendorf. Incuber pendant 30 minutes à 37°C puis étaler les cellules sur un milieu sélectif.

*b) Levures (P. pastoris GS115)*

Mélanger dans un Eppendorf froid 40µl de cellules compétentes (levures linéarisées) avec 2.5-5µl d'ADN, laisser le tube quelques instants dans la glace. Electroporer à 1.5kV puis ajouter immédiatement 1ml de sorbitol 1M et mélanger les cellules à l'aide d'une pipette Pasteur (ou pointe bleue coupée). Etaler 400µl de levures transformées sur du milieu sélectif et incuber à 30°C jusqu'à l'apparition des colonies.

Miniprep (isolement d'ADN de plasmide)

Méthode de lyse alcaline :

Piquer une colonie dans 3ml de milieu LB contenant l'antibiotique approprié puis incuber la culture toute la nuit à 37°C sous agitation. Prendre 1.5ml de la culture dans un Eppendorf et centrifuger à 12000 rpm pendant 30 secondes. Eliminer complètement le surnageant avec une pipette Pasteur tirée et resuspendre le culot dans 100µl de solution I froide (4°C). Incuber 3 minutes à température ambiante en laissant le tube ouvert. Ajouter 200µl de la solution II préparée fraîchement. Mélanger rapidement par inversion jusqu'à l'obtention d'une suspension homogène transparente puis Incuber 5 minutes dans la glace. Ajouter 150µl de solution III froide (4°C). Vortexer pendant 10 secondes jusqu'à obtenir une suspension homogène et incuber à nouveau 5 minutes dans la glace. Centrifuger à 12000 rpm pendant 5 minutes à température ambiante. Récupérer le surnageant et ajouter 500µl de chloroforme. Vortexer vigoureusement et centrifuger à 12000 rpm pendant 2 minutes à température ambiante. Récupérer le surnageant et précipiter l'ADN avec 900µl d'EtOH 100%. Mélanger par inversion et incuber 5 minutes à température ambiante. Centrifuger à 12000 rpm pendant 5 minutes à température ambiante puis enlever l'EtOH. Laver le culot avec 500µl d'EtOH 70% puis laisser sécher le culot à l'air pendant 15 minutes. Resuspendre le culot dans 50µl de TE contenant de la RNase (1µl de RNase [20µg/ml] dans 500µl de TE). Conserver à 4°C pour une courte période ou à -20°C pour une longue durée.

**Solution I** : Dissoudre 0.25ml de Tris 1M pH8, 0.5ml de glucose 1M et 0.2ml d'EDTA 0.5M pH8 puis ajuster le volume à 10ml avec de l'H<sub>2</sub>O distillée. **Conservation à 4°C !**

**Solution II** : Dissoudre 2 pastilles de NaOH dans de l'H<sub>2</sub>O distillée. Ajouter 1.5ml de SDS 10% puis compléter le volume jusqu'à 25ml avec de l'H<sub>2</sub>O distillée.

**Solution III** : Dissoudre 30ml de KOAc 5M et 5.75ml d'acide acétique glacial. Compléter le volume à 50ml avec de l'H<sub>2</sub>O distillée. **Conservation à 4°C !**

Induction des protéines dans un système bactérien

Incuber les bactéries transformées (pGEX-3X + fragment de chitinase) en milieu LB liquide contenant un antibiotique (ampicilline) à 37°C, sur agitation, toute la nuit. Induire l'expression des protéines de fusion en ajoutant de l'IPTG (concentration finale 0.1mM). Echantillonnage toutes les heures pendant 4 heures.

Sédimenter les cellules par centrifugation et resuspendre le culot dans 1/20 volume de PBS (140mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH7.3). Lyse par sonication douce. Ajouter du

Triton X-100 (concentration finale 1%). Mélanger doucement à température ambiante pendant 30 minutes (solubilisation des protéines). Centrifuger à 12000 rpm pendant 5 minutes à 4°C. Purifier le surnageant avec les colonnes de glutathione sépharose pour récupérer les protéines de fusion.