

Université de Montréal

**Intermédiaires réactionnels de la fructose-1,6-
biphosphate aldolase de *Leishmania mexicana*:
Comparaison avec l'enzyme de mammifère et recrutement de la
région C-terminale**

par

Julien Lafrance-Vanasse

Département de biochimie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès sciences
en biochimie

Décembre 2006

© Julien Lafrance-Vanasse, 2006



W
4
U58
2007
V.069

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Intermédiaires réactionnels de la fructose-1,6-biphosphate aldolase de *Leishmania mexicana*: Comparaison avec l'enzyme de mammifère et recrutement de la région C-terminale

présenté par :

Julien Lafrance-Vanasse

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

James G. Omichinski, président-rapporteur

Jurgen Sygusch, directeur de recherche

Mirek Cygler, membre du jury

Résumé

Les structures de la fructose-1,6-biphosphate aldolase liée avec son substrat et avec l'inhibiteur compétitif mannitol-1,6-biphosphate ont été résolues à une résolution de 2.2 Å. L'intermédiaire base de Schiff a été figée dans le site actif du complexe enzyme-substrat alors que la liaison de l'enzyme à l'inhibiteur imite l'intermédiaire carbinolamine, ce qui vient corroborer les résultats obtenus avec l'enzyme de mammifère. En absence de contraintes cristallographiques des symétries adjacentes à la queue C-terminale de l'enzyme, un modèle pour son recrutement est proposé. En absence de ligand au site actif, la région C-terminale, très flexible, est désordonnée pour réduire l'interférence avec la liaison du ligand au site actif. Une fois le substrat lié à l'aldolase, la région C-terminale est recrutée grâce à des interactions induites par le mouvement de résidus conservés. La liaison du P₁-phosphate est la source de ces mouvements. La queue C-terminale, grâce à sa tyrosine terminale, échange des protons lors de l'étape de l'intermédiaire énamine. Même si la séquence de cette région est variable parmi les aldolases de classe I, l'ancre constituée par les résidus conservés Ser-Leu contrôle la position de la tyrosine terminale, pour agir exactement sur le C₃ de l'énamine. Ce mécanisme accélère la réaction enzymatique en réduisant l'entropie de configuration.

Mots-clés : Fructose-1,6-biphosphate aldolase, glycolyse, *Leishmania mexicana*, *Trypanosoma brucei*, région C-terminale, recrutement, cristallographie rayons-x, structure.

Abstract

Structures of the *Leishmania mexicana* fructose-1,6-bis(phosphate) aldolase complexed with its substrate and with the competitive inhibitor mannitol-1,6-bis(phosphate) were solved at 2.2 Å resolution. A Schiff base was trapped in the structure complexed with the substrate and the inhibitor-enzyme complex mimics the carbinolamine intermediate, consistent with previous analysis of the same complexes of the mammalian enzyme. In the absence of crystallographic packing constraints surrounding the C-terminal tail, we developed a model for its recruitment. In the free enzyme, the flexible C-terminal region is disordered to minimize interference of ligand binding to the active site. The C-terminus is then recruited following ligand binding. This recruitment is made possible through interactions between conserved residues. Specifically, the P₁ phosphate of the ligand induces the structural modifications necessary for this stabilization. The C-terminal region is known to play an important role in catalysis with the final tyrosine mediating proton transfer at the enamine intermediate step. Although the sequence of the C-terminal region is variable among species, a conserved Ser-Leu anchor controls the position of the final tyrosine, so that it is able to act precisely on the C₃ position of the enamine. This mechanism accelerates the enzymatic reaction by reducing configurational entropy.

Keywords : : Fructose-1,6-biphosphate aldolase, glycolysis, *Leishmania mexicana*, *Trypanosoma brucei*, C-terminal region, recruitment, x-ray crystallography, structure.

Abréviations :

DHAP: dihydroxyacétone-phosphate

FBP: fructose-1,6-biphosphate

G-3-P: glycéraldéhyde-3-phosphate

GBP: glucitol-1,6-biphosphate

EDTA: *ethylenediaminetetraacetic acid* (acide éthylènediaminetetraacétique)

HBP: hexitol-1,6-biphosphate

MBP: mannitol-1,6-biphosphate

rmsd: root mean square deviation

* la nomenclature des acides aminés à trois lettres est celle conventionnelle [1]

Table des matières

Chapitre 1 Introduction.....	1
Introduction générale	1
Chapitre 1 section 2 : Trypanosomes.....	4
2.1 Généralités	4
2.2 Cycle de vie	6
2.3 Métabolisme du glucose des trypanosomes.....	9
2.4 Glycosome	12
Chapitre 1- section 3 Aldolases	16
3.1 Généralités	16
3.2 Mécanisme général	19
3.3 Structure générale	21
3.4 Résidus du site actif et mécanismes précis proposés	24
3.5 Région C-terminale de l'aldolase	27
3.6 Inhibiteurs connus de l'aldolase	29
3.7 Aldolase de trypanosome.....	30
Hypothèses et objectifs	33
Chapitre 2: article.....	37
Abstract.....	38
Introduction.....	39
Material and methods.....	45
Results and discussion	50
Acknowledgements.....	60
References.....	61
Figures and tables	63
Chapitre 3: Discussion.....	69
Références.....	77

Liste des tableaux

Tableau I: Taxonomie des trypanosomes, avec quelques exemples d'espèces	5
Tableau II: Structures tridimensionnelles résolues d'aldolases de classe I natives	23
TABLE I. Data collection and refinement statistics	67
TABLE II. Intermolecular interactions of the C-terminal tail of aldolases from different species	68

Liste des figures

Figure 1: Cycle de vie de <i>L. mexicana</i> et <i>T. brucei</i>	8
Figure 2: Voies métaboliques majeures de production d'énergie chez les trypanosomes.	11
Figure 3: Produits et substrats de l'aldolase.	17
Figure 4: Formes en solution du fructose-1,6-biphosphate	19
Figure 5: Mécanisme de base des aldolases de classe I d'eucaryotes.	20
Figure 6: Représentation schématiques de la structure tridimensionnelle d'une sous-unité de l'aldolase de muscle de lapin native	22
Figure 6.2: Alignement de séquences d'aldolase de classe I d'organismes eucaryotes et structure secondaire associée.	23.2
Figure 7. Mécanisme complet de l'aldolase proposé par Choi et al.	26
Figure 8. Premières étapes mécanistiques de l'aldolase, par St-Jean et al.	26
Figure 9: Représentations schématiques de la structure tridimensionnelle d'un tétramère de l'aldolase de <i>L. mexicana</i>	32
Fig. 1. Electron density showing the Schiff base intermediate trapped in the active site of <i>L. mexicana</i> aldolase.	63
Fig. 2. Electron density showing MBP bound in the active site of <i>L. mexicana</i> aldolase.	64
Fig. 3. C-terminal residues 359-366 of the aldolase are recruited upon ligand binding.	65
Fig. 4. Binding in the P ₁ phosphate site is responsible of the recruitment of the C-terminal tail to the active site.	66

À Ariane.

Remerciements

Je tiens d'abord à remercier mon directeur de recherche, Dr Jurgen Sygusch, et tous les autres membres du laboratoire, présents et anciens, qui ont croisé mon chemin. Ce mémoire n'aurait pu voir le jour sans l'aide financière du CRSNG et de la FES, du département de biochimie, de la Fondation Luigi Liberatore et de la fondation de la Banque de Montréal. Merci à Paul Michels et Nathalie Chevalier pour les discussions éclairées et pour l'aide technique.

Pour leur soutien continu, un merci spécial est dédié aux parents et amis, qui m'ont motivé tout au long de mes études. Finalement, merci à Ariane qui est d'un support incommensurable, et d'une compréhension merveilleuse. Tu es mon inspiration.

Chapitre 1 Introduction

Introduction générale

Une situation de crise existe dans les pays du tiers-monde, en raison des maladies parasitaires infectant humains et bétail. La plus connue de ces infections, la malaria, tue plus de 1,2 millions de personnes chaque année [2]. D'autres maladies parasitaires, moins connues, font, elles aussi, beaucoup de victimes, tout en étant hors de contrôle: le seuil de la pandémie sera bientôt atteint. Un exemple flagrant est celui des maladies causées par les parasites de la famille des trypanosomes, que le *Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases* (TDR) classe comme dans sa catégorie I (prioritaire) des maladies tropicales émergentes et incontrôlées [3]. Les maladies telles que la maladie du sommeil, la maladie de Chagas et la leishmaniose touchent respectivement 0,5 , 0,3 et 2 millions de personnes en plus d'entraîner le décès de plus de 144000 personnes chaque année au total [2].

Plus précisément, la leishmaniose est causée par un protozoaire flagellé, du genre *Leishmania*, qui se propage grâce à un vecteur, une espèce de mouche, le phlébotome (*sandfly*), à un hôte humain ou animal [4]. À elle seule, elle tue 57 000 personnes et le

fardeau de la maladie est évalué à plus de 2 millions de DALYⁱ [5]. Selon l'espèce de *Leishmania* qui infecte l'hôte (20 espèces), quatre formes de maladies peuvent se développer. La forme cutanée localisée ne cause que des lésions et cicatrices et se guérit d'elle-même alors que la forme cutanée diffuse se traite difficilement. La forme mucocutanée crée des ulcères dans les muqueuses comme la bouche et le nez. Quant à la leishmaniose viscérale, elle touche 500 000 personnes chaque année et affecte surtout les populations rurales d'Amérique latine (Brésil), d'Inde (et pays avoisinants) et de l'est de l'Afrique (Éthiopie, Kenya, etc) [6]. Il s'agit de la forme la plus grave et elle est fatale si non-traitée. De plus en plus, on rapporte des cas de co-infection de la leishmaniose avec le virus de l'immunodéficience humaine VIH, situation qui démontre l'urgence d'agir, pour éviter l'épidémie [7, 8, 9].

L'injection intramusculaire ou intraveineuse d'antimoine pentavalent (antimonate de meglumine ou stibogluconate de sodium) constitue le traitement le plus utilisé pour traiter les leishmanioses. Ce traitement s'échelonne sur plus d'un mois et l'opération est douloureuse, dispendieuse, mais elle comporte surtout de grands risques pour la vie du patient. On rapporte même des cas de résistance à la drogue [10]. D'autres drogues sont également disponibles, chacune ayant des désavantages par rapport à l'antimoine. Par exemple, la pentamidine s'avère peu efficace et très toxique, alors que l'amphotéricine B est

i DALY: Disability-adjusted life years. Mesure développée par le World Health Organization pour mesurer l'impact d'une maladie sur une population. Il s'agit de la somme des années d'une vie perdue à cause d'une mort prématurée et du nombre d'années d'invalidité pour toutes les personnes affligées.

efficace, mais très dispendieuse [11]. Toutes deux engendrent des effets secondaires irréversibles.

C'est donc dans un contexte de crise au tiers-monde, d'une maladie près de l'épidémie pour laquelle aucun médicament peu dispendieux et sécuritaire n'existe, que s'inscrit l'étude qui suit. Le but global est donc de travailler à améliorer les connaissances des maladies parasitaires, en particulier les maladies causées par des trypanosomes, dont les leishmanioses. L'approche consistera à effectuer une étude comparative de la structure d'une enzyme, l'aldolase, avec l'aldolase humaine en vue d'un possible design rationnel de médicament.

Dans le présent mémoire, un survol de la biologie des trypanosomes sera d'abord effectué, en plus de brosser un portrait des cibles actuellement étudiées pour inhiber les trypanosomes, dont la glycolyse. Nous verrons ensuite en détail le mécanisme, la structure tridimensionnelle et les autres particularités de la fructose-1,6-biphosphate aldolase de classe I. Pour terminer l'introduction, les objectifs, questions et hypothèses du projet de recherche seront exposés. Par la suite, le coeur du mémoire est un article en préparation pour la revue *Biochemistry* qui relate une partie du travail fait dans l'étude des structures des intermédiaires réactionnels de l'aldolase de *Leishmania mexicana*. Des pistes de solution aux questions du projet de recherche y sont expliquées, tout comme dans la discussion finale, suivant l'article.

Chapitre 1 section 2 : Trypanosomes

2.1 Généralités

Dans la présente section, nous traiterons de deux espèces de trypanosomes: *Trypanosoma brucei* et *Leishmania mexicana* dans le cadre général de la famille des Trypanosomes (*Trypanosomatidea*). Comme il sera possible de le voir plus loin, leur aldolase est très semblable. Toutefois, comme celle de *L. mexicana* a été peu étudiée, nous utiliserons souvent celle de *T. brucei* comme modèle (et vice-versa).

Les trypanosomes sont une famille (*Trypanosomatidea*) de l'ordre *Trypanosomatida* qui fait partie de la classe des kinetoplastides (*Kinetoplastea*) [12] (voir tableau I). Cette classe fait elle-même partie de l'embranchement *Euglenozoa*, qui est du règne des protistes (*Protista*): en somme, ce sont des protozoaires eucaryotes unicellulaires. La famille des trypanosomes comporte neuf genres, dont : *Trypanosoma* et *Leishmania*. *Trypanosoma* inclut plusieurs espèces dont : *T. brucei* qui cause la maladie du sommeil ; *T. cruzi* qui est responsable de la maladie de Chagas ; *T. avium* qui est l'agent de la trypanosomiase des oiseaux, et plusieurs autres [13]. Le genre *Leishmania* est tout aussi divers, avec plus d'une vingtaine de genres. La leishmaniose viscérale est causée par *L. donovani*, *L. infantum* et *L. amazonensis*, qui peuvent aussi être responsables du penchant cutané de la maladie. *L. mexicana*, *L. peruviana* et *L. major* provoquent le plus souvent des leishmanioses cutanées

[2]. Ceci ne sont que des exemples pour montrer toute la diversité et la complexité des relations espèce-maladie. Toutefois, comme leur nom l'indique souvent, ces espèces sont confinées à des régions géographiques précises, ce qui limite le type de maladie à diagnostiquer pour les médecins.

Tableau III: Taxonomie des trypanosomes, avec quelques exemples d'espèces

Règne	<i>Protista</i>	
Embranchement	<i>Euglenozoa</i>	
Classe	<i>Kinetoplastea</i>	
Ordre	<i>Trypanosomatida</i>	
Famille	<i>Trypanosomatidea</i>	
Genre	<i>Leishmania</i>	<i>Trypanosoma</i>
Espèce	<i>L. mexicana</i>	<i>T. brucei</i>
	<i>L. donovani</i>	<i>T. cruzi</i>
	<i>L. infantum</i>	<i>T. avium</i>
	<i>L. amazonensis</i>	
	<i>L. peruviana</i>	
	<i>L. major</i>	

Les deux genres *Leishmania* et *Trypanosoma* possèdent toutefois des propriétés semblables, mais distinctes des cellules eucaryotes animales. Par exemple, tous les organismes de la classe des kinetoplastides possèdent une région de l'unique mitochondrie de la cellule appelée kinetoplaste, qui contient plus de 15% de l'ADN de la cellule [14]. Cette différence n'est toutefois pas exploitée. Heureusement, il existe d'autres différences qu'il est possible d'exploiter pour trouver un remède. Un bon exemple est le métabolisme du

trypanothion, que le parasite synthétise afin de jouer le même rôle antioxydant que le glutathion chez les mammifères. Le *knockout* du gène de la trypanothion réductase a démontré son importance pour la survie du parasite [15]. Un criblage à haut débit de bibliothèques de médicaments a d'ailleurs déjà été effectué sur cette enzyme [16]. La biosynthèse des stérols et des acides gras, qui ne se fait pas par les mêmes enzymes chez les parasites et chez l'hôte, constitue une autre cible [17]. De plus, il a été démontré que les fonctions des cystéine peptidase des parasites sont diverses et surtout qu'elles diffèrent de celles de l'hôte [18]. Aussi, la dihydrofolate réductase qui est déjà utilisée pour traiter les cancers, la malaria et des infections bactériennes, des inhibiteurs spécifiques essaient d'être trouvés [19]. Une autre voie métabolique étudiée est celle des polyamines [20]. Finalement, une propriété commune à *Leishmania* et *Trypanosoma* est l'utilisation d'une compartimentation pour effectuer la glycolyse, le glycosome, dont le contenu en enzymes varie selon le cycle de vie du parasite.

2.2 Cycle de vie

Le cycle de vie de *L. mexicana* débute lorsque une mouche pique un animal déjà infecté pour se nourrir de son sang [21,22], tel que schématisé à la figure 1. Cet animal peut être un humain, mais il s'agit le plus souvent de bétail ou de rongeurs qui en sont le réservoir principal, qu'ils soient morts ou vivants. La mouche devient alors vecteur du parasite qui se trouve dans sa forme promastigote, c'est-à-dire une forme allongée et mobile

grâce à un flagelle. Le parasite vivra ainsi dans le système digestif de la mouche pendant quelques jours, le temps de se reproduire. Quelques jours plus tard, il migrera jusqu'à l'oesophage et aux glandes salivaires où il vivra, jusqu'à ce que la mouche ne pique un humain (ou un animal), ce qui entraînera le transfert au sang. C'est par la salive de l'insecte que le parasite est transféré, puisque cette salive est injectée dans l'hôte pour agir comme anti-coagulant. Le parasite se retrouve alors dans sa forme « sanguine » et toujours sous la forme promastigote. Reconnu comme un corps étranger par le système immunitaire, il se fera ingérer par un macrophage. Dans celui-ci, le parasite survivra aux tentatives de destructions du macrophage [23]. Il se changera sous sa forme amastigote, plus petite que la forme promastigote, mais surtout sans flagelle lui permettant de bouger. Ceci lui permet de se reproduire en grand nombre par scission binaire, ce qui fera éventuellement éclater le macrophage et ira en infecter d'autres. Ceci crée l'infection, qu'elle soit de la peau ou des viscères, dépendant de la localisation des macrophages infectés. Puis, le cycle recommence lorsque une mouche pique à nouveau l'hôte, en attrapant au passage quelques macrophages. Dans l'estomac de la mouche, le parasite retourne dans sa forme promastigote, puis remonte vers les glandes salivaires pour se transformer en forme métacyclique prête à envahir un hôte, et le cycle recommence.

Le cycle de vie de *T. brucei* s'avère très semblable, mais ne comporte pas de phase intracellulaire. Le parasite possède donc toujours un flagelle pour se déplacer [4, 24] (voir figure 1). Dans le sang, il se divise par scission binaire, dans une forme qu'on appelle

« trypomastigote du flux sanguin », dans des régions du tissu nerveux, dont le cerveau. Plus tard, en passant par le même mécanisme que *L. mexicana* à la mouche, il se transformera dans la forme trypomastigote procyclique. Pour migrer aux glandes salivaires, il se métamorphosera en forme épimastigote. Dans les glandes salivaires, il se transformera dans la forme trypomastigote métacyclique: il est prêt à envahir un humain. À l'intérieur de l'hôte, il se transformera à nouveau en « trypomastigote du flux sanguin ».

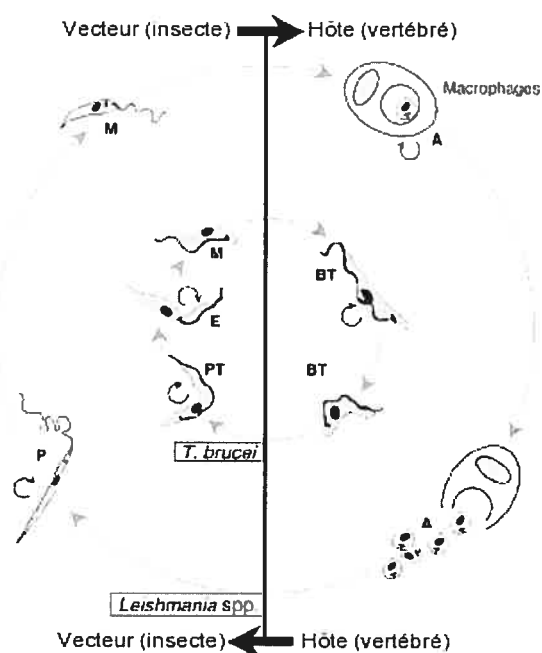


Figure 1: Cycle de vie de *L. mexicana* et *T. brucei*. Dans le cercle extérieur, les différentes étapes du cycle de vie de *L. mexicana*: A: amastigote dans les macrophages; P: promastigote et M: métacyclique. Dans le cercle intérieur, la vie de *T. brucei*: BT: trypomastigote du flux sanguin; PT: trypomastigote procyclique; E: épimastigote M: métacyclique. Adapté de [25].

Chez *Leishmania* et *Trypanosoma*, les différentes formes parasitaires du cycle de vie possèdent la particularité que leur métabolisme énergétique diffère. L'environnement, la disponibilité des substrats et les besoins énergétiques sont les principales raisons de cette dissemblance. De plus, les voies métaboliques peuvent être des cibles de choix: si on réussit à en trouver une nécessaire à la survie du parasite, l'inhiber peut causer sa mort. C'est le cas du métabolisme du glucose qui produit la majorité de l'énergie des trypanosomes.

2.3 Métabolisme du glucose des trypanosomes

Le métabolisme du glucose, chez tous les organismes, débute par son importation dans le cytosol. Chez les trypanosomes, il doit traverser une seconde membrane, celle d'une organelle nommée glycosome, dont il sera question dans une prochaine section. Sept enzymes de la glycolyse y sont séquestrés [26,27]. La séquence de la glycolyse est celle de la voie classique de Embden-Meyerhof (voir figure 2). Dans le glycosome, la séquence s'arrête au 3-phosphoglycérate, qui est exporté de l'organelle pour devenir du pyruvate. C'est dans les étapes suivantes que les différences émergent, entre les espèces de trypanosomes et même entre les différentes formes du cycle de vie d'une même espèce.

Pour *T. brucei*, dans la forme trypomastigote du flux sanguin, la voie métabolique s'arrête au pyruvate, il n'y a pas de cycle de Krebs [28]. La mitochondrie ne sert qu'à l'équilibre rédox, grâce à une oxidase de sa membrane [29]. Dans la forme trypomastigote

procyclique, la mitochondrie et ses enzymes sont présentes et actives. Toutefois, le cycle de Krebs, même si les enzymes sont présentes et que le cycle est fonctionnel, ne sert pas à produire de l'énergie [30,31]. D'ailleurs, une bonne partie de l'acétyl-coA sert à produire directement de l'énergie, étant transformé en acétate par une succinate CoA-transférase [32]. Dans cette forme, c'est la conversion du phosphoénolpyruvate en malate, de retour dans le glycosome, qui permet l'équilibre rédox. Le malate est par la suite transformé en pyruvate à l'extérieur du glycosome. Le (1,3)-biphosphoglycérate sort du glycosome, puisque la phosphoglycérate kinase se trouve davantage dans le cytosol que dans l'organelle, attribuable à une régulation génique [30]. C'est la recherche d'équilibre, dans ce cas-ci du ratio ATP/ADP plutôt que du potentiel rédox, qui est responsable de ce changement.

Chez les *Leishmania*, les deux formes promastigote et amastigote présentent un métabolisme semblable à celui de *T. brucei* dans la forme procyclique [33]. La mitochondrie est présente, ainsi que les enzymes de la chaîne respiratoire. Le cycle de Krebs est également sous-utilisé, le succinate servant à la production d'énergie avec l'acétyl-coA et étant un « déchet » pour la cellule, tout comme le pyruvate, l'acétate et le CO₂.

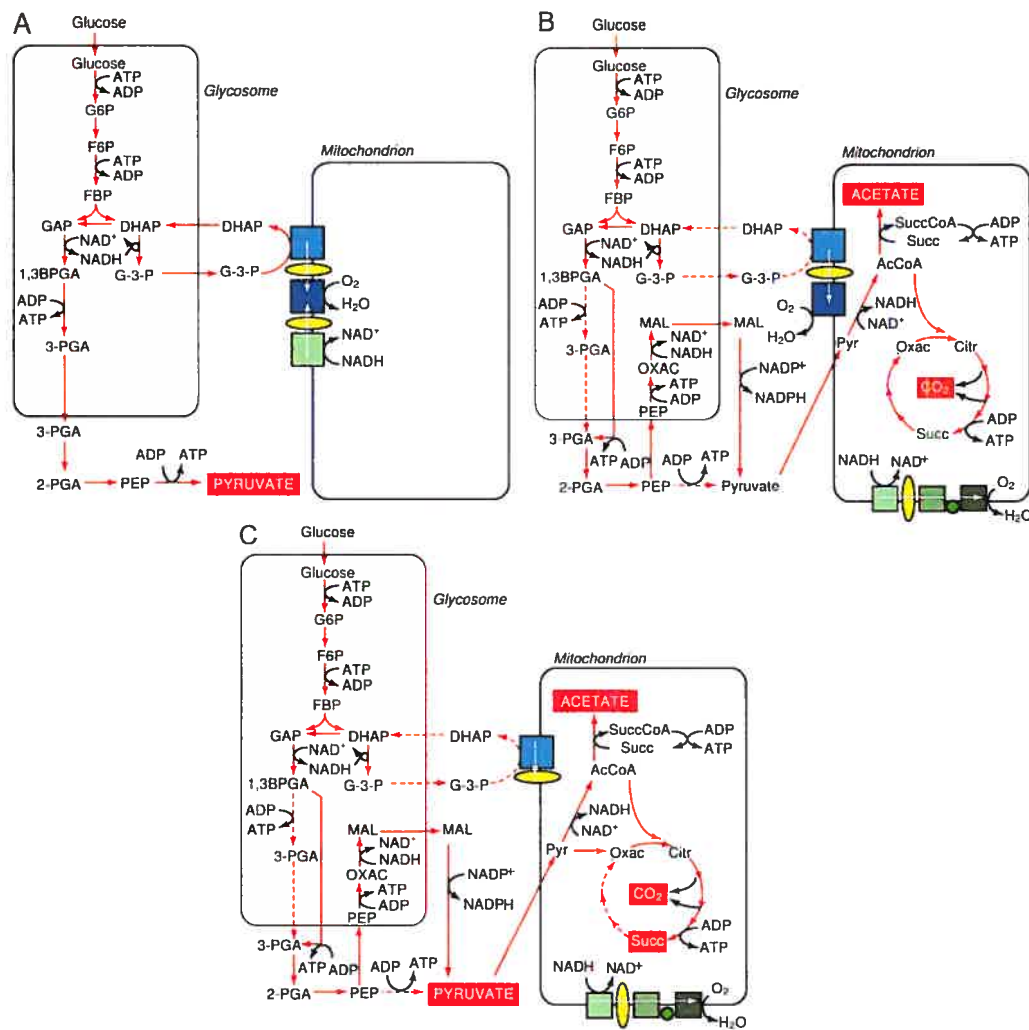


Figure 2: **Voies métaboliques majeures de production d'énergie chez les trypanosomes.** a) Dans la forme trypomastigote du flux sanguin de *T. brucei* b) Dans la forme promastigote de *T. brucei*. c) Dans la forme amastigote de *L. mexicana*. Les produits finaux sont encadrés en rouge et les réactions enzymatiques principales sont d'un trait rouge continu. Le trait rouge pointillé montre une réaction enzymatique moins utiliséeⁱⁱ. Adapté de [37]

ⁱⁱ Abréviations: AcCoA, acétyl-CoA; Citr, citrate; DHAP, dihydroxyacétone phosphate; FBP, fructose-1,6-biphosphate; F6P, fructose-6-phosphate; GAP, glyceraldéhyde-3-phosphate; G-3-P, glycerol 3-phosphate; G6P, glucose 6-phosphate; MAL, malate; Oxac, oxaloacétate; PEP, phosphoénolpyruvate; Pyr, pyruvate; Succ, succinate; SuccCoA, succinyl-CoA; 1,3BPGA, 1,3-bisphosphoglycérate; 2-PGA, 2-phosphoglycérate; 3-PGA, 3-phosphoglycérate.

Chez *T. brucei*, la forme dans le flux sanguin de l'hôte génère l'ATP uniquement grâce à la glycolyse [34]. Chez *Leishmania* toutefois, la cible n'est pas aussi claire, puisque dans la phase amastigote, à l'intérieur du macrophage, le parasite possède la capacité de métaboliser les sucres, acides aminés et acides gras [35]. Toutefois, le parasite utilise tout de même le glucose comme source majeure d'énergie [36,37]. Il a d'ailleurs été prouvé que le transporteur de glucose était nécessaire à la survie du parasite, par l'inactivation de cette protéine [38]. Également, dans la forme amastigote, l'absence de glucose tue le parasite. En conclusion, la glycolyse est une cible de choix dans la lutte contre les trypanosomes [39]. Tel que cité ci-dessus, cette voie métabolique se fait dans un organelle particulier aux trypanosomes, le glycosome.

2.4 Glycosome

Les kinetoplastides sont les seuls organismes connus à posséder un organelle séquestrant la glycolyse, d'où son nom glycosome [29]. Le glycosome ressemble à un peroxyosome, sans avoir le même contenu ni les mêmes fonctions [40]. Cet organelle n'est pas le lieu du métabolisme du glucose uniquement, il séquestre également les enzymes de plusieurs autres voies métaboliques telles que la bêta-oxidation des acides gras [41], la récupération des purines [42] et la synthèse des lipides-éthers [43,44]. Toutefois, la glycolyse est la raison principale de l'existence du glycosome. Cet organelle n'existe pas en raison du haut flux de la glycolyse, mais plutôt pour éviter les interférences métaboliques

[45,46]. Plusieurs enzymes du glycosome, lorsque exprimées dans le cytosol deviennent toxiques pour le parasite. À titre d'exemple, pensons à la triose phosphate isomérase [47].

Connaissant ainsi le glycosome et le métabolisme du glucose relié à celui-ci, il est possible d'en définir des cibles thérapeutiques pouvant être exploitées [48]. Il est à noter que la plupart des exemples utilisés, à moins d'une contre-indication, concernent *T. brucei*, puisque beaucoup d'expériences rattachées à la glycolyse sont réalisées sur ce parasite contrairement à *Leishmania*, pour des raisons de priorité d'orientation de la recherche. Ainsi, l'assemblage du glycosome, l'importation de glucose dans la cellule et le glycosome ainsi que les enzymes glycolytiques sont des voies étudiées.

L'assemblage du glycosome et l'importation des enzymes du glycosome s'effectuent par des peroxines (PEX), des protéines membranaires ou cytosoliques [49]. Certaines sont des récepteurs reconnaissant l'enzyme à importer, grâce à un signal de ciblage au peroxisome (peroxisome-targeting signal ou PTS). Le récepteur doit ensuite interagir avec une protéine lui permettant ensuite de traverser la membrane grâce à des peroxines de translocation. Laisant l'enzyme dans le glycosome, le récepteur doit être par la suite recyclé vers le cytosol pour recommencer le cycle. Toutes ces étapes peuvent être arrêtées pour empêcher l'assemblage du glycosome. Des expériences d'ARN interférence récentes ont d'ailleurs prouvé que le retrait d'une peroxine engendrent des effets néfastes sur le parasite [50]. Également, il a déjà été démontré que si une seule des enzymes de la

glycolyse, en l'occurrence la phosphoglycérate kinase, ne parvenait pas dans le glycosome et restait dans le cytosol, ceci causait la mort du parasite [51]. Or, ces étapes d'importation sont également communes à la formation du peroxisome chez les mammifères. Toutefois, leurs peroxines présentent de très faibles similarités avec celles de parasites [52,53]. De plus, les protéines importées ne sont pas toutes les mêmes, il s'agit donc d'une excellente cible [54].

L'importation de glucose dans la cellule est une cible étudiée et prouvée, à la fois pour *T. brucei* [55] et pour *L. mexicana* [38]. Des différences notables ont été trouvées avec le transporteur de l'humain, dont la possibilité de transporter le D-fructose [56]. Ceci a mené à la tentative de synthétiser des analogues du D-fructose, mais aussi du D-glucose pour explorer leur inhibition, mais ceci n'a pas donné des résultats concluants [57]. En fait, il existe des inhibiteurs, comme la cytochalasin B, du transporteur GLUT1 humain qui inhibent beaucoup moins le transporteur de parasite [58]. Les différences sont donc présentes, mais les inhibiteurs sont dans la mauvaise équipe. L'absence d'une structure cristallographique ne facilite pas la découverte de différences exploitables pour la conception rationnelle de médicaments.

Finalement, les enzymes glycolytiques sont des cibles de choix. Plusieurs analyses *in silico* l'ont démontré chez *T. brucei* [59,60]. De plus, des expériences utilisant l'ARN interférence ont été effectuées sur quelques enzymes glycolytiques, dont l'hexokinase, la

pyruvate kinase, la phosphofructokinase, l'énolase et la phosphoglycérate mutase [61]. Celles-ci ont démontré qu'une réduction de ces enzymes, créant une réduction ne serait-ce que de 50% du flux glycolytique ont causé la mort des parasites. Ainsi, l'inhibition, même partielle, de certaines enzymes glycolytiques causerait la mort du parasite. Toutefois, ces expériences n'ont pu être transposées à *Leishmania*, puisque le mécanisme d'ARN interférence n'existe pas chez cette espèce [62]. Ainsi, plusieurs enzymes glycolytiques sont ciblées actuellement telles l'hexokinase, la glucose-6-phosphate isomerase, la phosphofructokinase, la triosephosphate isomerase, la glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, la phosphoglycerate kinase la phosphoglycerate mutase, l'énolase et la pyruvate kinase. De plus, deux autres enzymes reliées à la glycolyse, la glycerol-3-phosphate dehydrogenase et la glycerol-3-phosphate oxidase font également l'objet d'études [39]. La conception d'inhibiteurs liant affinité, mais aussi spécificité pour les enzymes de parasite, en comparaison avec les enzymes humaines, constitue le principal axe de recherche. Alors que le criblage de bibliothèques de composés est un outil essentiel pour la découverte de médicaments, la conception rationnelle de drogues demeure une voie privilégiée pour atteindre les cibles.

Une enzyme glycolytique manque à cette liste: la fructose-1,6-biphosphate aldolase. Il s'agit de la cible que nous avons choisie pour le présent projet. Plongeons maintenant dans l'univers de cette enzyme.

Chapitre 1- section 3 Aldolases

3.1 Généralités

Quelques enzymes connues catalysent des réactions de création et de bris de liaisons carbone-carbone. Parmi celles-ci, il existe une famille d'enzymes utilisant la réaction d'aldolisation, consistant en la création d'une telle liaison grâce à l'addition d'une cétone-énolate à un aldéhyde. Une telle famille d'enzymes, appelée aldolase, comporte plusieurs membres, dont les 2-keto-3-deoxyg-6-phosphogluconate aldolase, les fructose-1,6-biphosphate aldolase, les tagatose-biphosphate aldolase, etc. Elles sont nommées selon le produit de réaction d'aldolisation. Ces enzymes peuvent également toutes catalyser la réaction inverse de rétro-aldolisation, qui est le bris de la liaison carbone-carbone.

La fructose-1,6-biphosphate aldolase (EC 4.1.2.13) catalyse, d'une façon réversible, la réaction de condensation aldolique du dihydroxyacétone phosphate (DHAP) et du glycéraldéhyde 3-phosphate (G3P) en fructose-1,6-biphosphate (FBP) dans la gluconéogenèse [63]. Inversement, elle catalyse l'hydrolyse du FBP en DHAP et G3P durant la glycolyse (voir figure 3). Or, ces voies métaboliques du glucose étant communes à toutes les formes de vie, la FBP aldolase est présente chez la majorité des organismes. Toutefois, elle n'est pas présente sous la même forme, puisqu'il existe deux classes de cette enzyme, selon le mécanisme catalytique opéré [64,65]. L'aldolase de classe II, utilise un ion

divalent pour effectuer la réaction: un ion de Zn^{2+} ou le Ca^{2+} est nécessaire à la polarisation de la cétone et à la stabilisation de l'intermédiaire carbanion [66]. Quant à elle, l'aldolase de classe I forme une base de Schiff entre la cétone d'un substrat (FBP ou DHAP) et l'azote de la chaîne latérale d'une lysine [67]. À la lumière des réactions, on comprend mieux pourquoi l'aldolase de classe II se voit inhibée par des agents chélateurs tels que l'EDTA et que l'agent réducteur $NaBH_4$ ne désactive que l'aldolase de classe I, tests spécifiques à chaque classe utilisés pour déterminer la nature de l'aldolase en situation d'expérimentation [64]. La distribution des deux classes n'est cependant pas aussi tranchée. L'aldolase de classe I est présente dans les cellules eucaryotes, chez certaines espèces procaryotes et chez les archéobactéries. L'aldolase de classe II, beaucoup plus primitive, est surtout présente chez les procaryotes, mais aussi chez les mycètes, algues et levures [68]. Quelques espèces, tel que *E. coli*, possèdent simultanément les deux classes d'enzymes [68]. La classe I est même divisée en une classe IA avec la découverte de l'absence de similarité de l'aldolase d'archéobactérie [69].

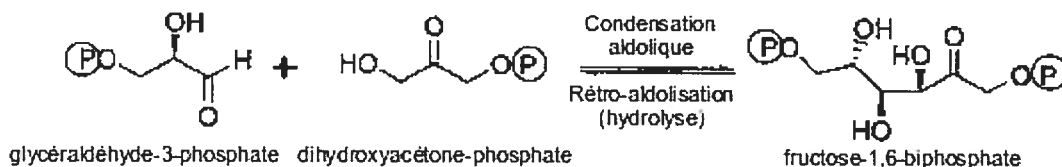


Figure 3: **Produits et substrats de l'aldolase.**

La subdivision continue chez la FBP aldolase de classe I de mammifères, où il existe trois isoenzymes, chacune ayant leurs propriétés cinétiques propres [70]. Toutefois, ces propriétés comportent peu de différences entre elles, montrant ainsi l'aspect conservé de la réaction. La séquence d'acides aminés des isoenzymes est également bien conservée, se situant entre 70% et 81% d'identité [71]. En plus de cliver le FBP, les aldolases peuvent également hydrolyser le fructose-1-phosphate (F1P). Cette réaction distingue les différentes isoformes de l'aldolase [72]. L'aldolase A, située dans les muscles squelettiques, clive plus rapidement le FBP que le F1P, par un facteur de 50, attribuable à l'affinité marquée pour le premier substrat [73]. L'aldolase B, qu'on retrouve dans le foie mais aussi dans le rein et le petit intestin, n'a aucune préférence pour l'un ou l'autre des deux substrats. Finalement, l'aldolase C, est liée aux tissus nerveux (dont le cerveau) et est aussi présente dans les muscles lisses. Cette isoenzyme a des propriétés cinétiques semblables à l'isoforme A, bien que le ratio des activités spécifiques FBP/F1P soit un peu moindre [74].

Longtemps, c'est l'aldolase de muscle de lapin qui a été utilisée comme modèle. Alors que les techniques d'ADN recombinant et de production d'enzymes à l'intérieur de systèmes bactériens n'existaient pas, l'enzyme était purifiée à partir des tissus de l'animal. Encore aujourd'hui, et dans le présent mémoire, nous référons à cette enzyme qui est un excellent modèle pour les aldolases A de mammifères. Attardons-nous maintenant au mécanisme et à la structure des FBP aldolase de classe I d'eucaryote.

3.2 Mécanisme général

En solution, le D-FBP se présente sous trois formes : cyclique α , cyclique β (fructofuranose) et linéaire qui sont présentes à 22,5%, 76% et 1,5% respectivement [75] (voir figure 4). La FBP aldolase de classe I réagit uniquement avec sa forme β [76], ce qui implique une première étape de décyclisation, dont le mécanisme est inconnu. Un intermédiaire réactionnel a toutefois été trouvé récemment, chez une aldolase de classe IA, sans toutefois proposer de mécanisme [77]. Après décyclisation, l'attaque d'une lysine nucléophile s'effectue alors sur le carbonyle du FBP (le carbone C2), ce qui mène à un intermédiaire carbinolamine [78] (voir figure 5). Une déshydratation suit et crée un intermédiaire base de Schiff (imine protonée ou ion immonium) [79,80]. Ceci est nécessaire

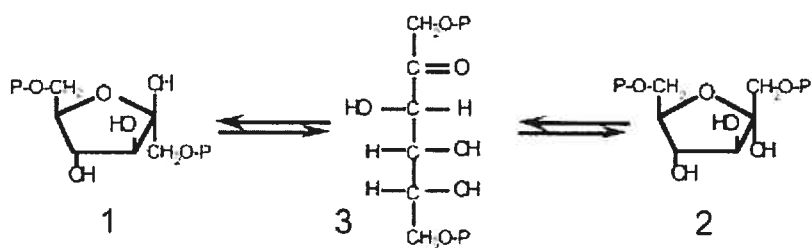


Figure 4: **Formes en solution du fructose-1,6-biphosphate.** Forme cyclique β (1) cyclique α (2) (fructofuranose) et linéaire (3) du fructose-1,6-biphosphate. La numérotation des carbones, dans (3), débute par C₁, le premier carbon du haut, pour aller jusqu'à C₆, tout en bas. On associe les phosphates P₁ et P₆ à ces carbones. *Tiré de* [76].

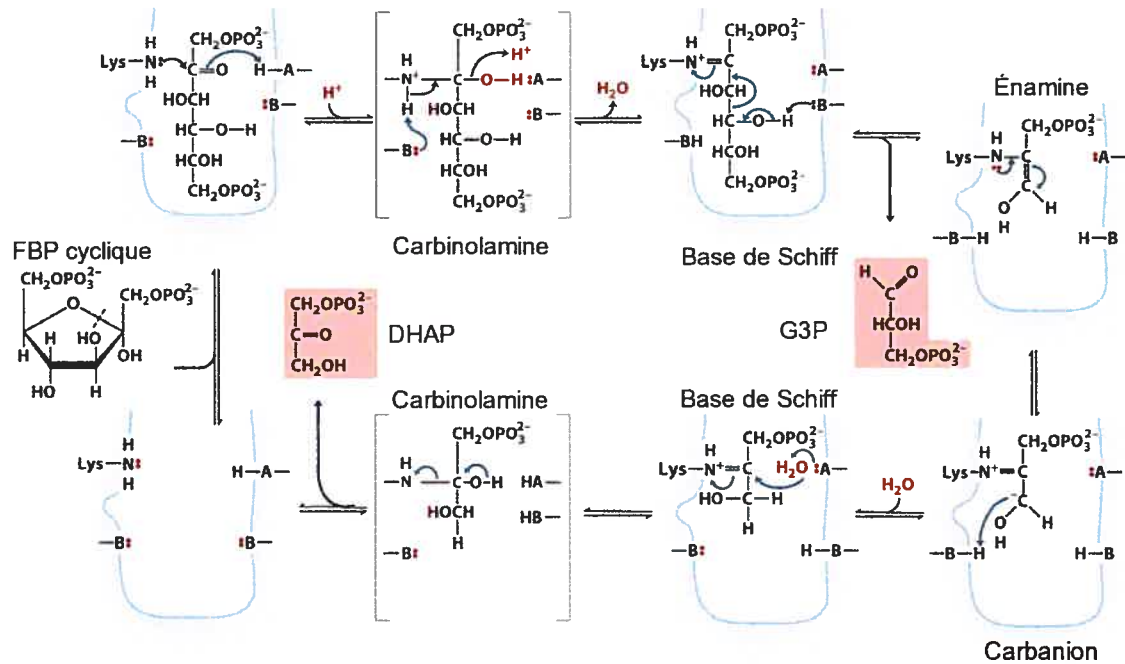


Figure 5: **Mécanisme de base des aldolases de classe I d'eucaryotes.** Dans le sens horaire, réaction de clivage du FBP, explicité grâce à des flèches de réaction. Il est à noter que l'acide (**A**) et les bases (**B**) ne sont pas nécessairement les même résidus pour toutes les réactions. Des modèles plus complets de la réaction seront présentés plus loin. Abréviations: DHAP, dihydroxyacétone phosphate; FBP, fructose-1,6-biphosphate; G3P, glyceraldéhyde-3-phosphate.

pour cliver le lien C3-C4 du FBP, réaction initiée par l'abstraction du proton sur l'hydroxyle du carbone C4 par un acide. En effet, la charge positive sur l'azote fragilise la liaison C3-C4 du FBP en attirant ses électrons. Le glycéralaldéhyde 3-phosphate (G3P) quitte le site actif et c'est un intermédiaire énamine qui reste. Rapidement, il deviendra à son tour un intermédiaire carbanion capable d'extraire un proton d'un résidu acide [81]. Encore une fois, la base de Schiff formée se réhydrate, ce qui mène à un intermédiaire carbinolamine qui redonnera le proton de l'hydroxyle en C2 à un résidu avoisinant pour ainsi recréer un

carbonyle et se séparer de la lysine. Le dihydroxyacétone phosphate (DHAP) ainsi formé quitte le site actif. Tel que démontré ici, la réaction se compose uniquement de mouvements de protons des résidus du site actif. Pour mieux comprendre leurs rôles, la connaissance de la structure tridimensionnelle de l'enzyme est essentielle.

3.3 Structure générale

La résolution des structures des aldolases de classe I a permis de constater les grandes similitudes existantes entre les organismes. À ce jour, 29 structures ont été résolues, provenant de 10 organismes différents (certaines structures sont des complexes enzyme-ligand), dont la liste des structures des enzymes natives se trouve dans le tableau I. Il est à noter que *Porphyromonas gingivalis* est un organisme procaryote et que *Thermoproteus tenax* est une archéobactérie. Telle que montrée à la figure 6, la structure générale des aldolases est un baril $(\alpha\beta)_8$, aussi simplement baril- β , dont le site actif se retrouve au centre de l'enzyme. Les brins β , parallèles, se situent au centre de l'enzyme, entourées d'hélices. Chez les enzymes d'eucaryotes, en plus des huit hélices du baril, il y a quelques hélices supplémentaires, dont la première, dans la section n-terminale de l'enzyme, qui referme le baril, de l'autre côté du site actif. La région C-terminale est une partie moins clairement définie dans les structures cristallographique, situation attribuable à sa haute mobilité. Il sera question de la région C-terminale dans une section ultérieure.

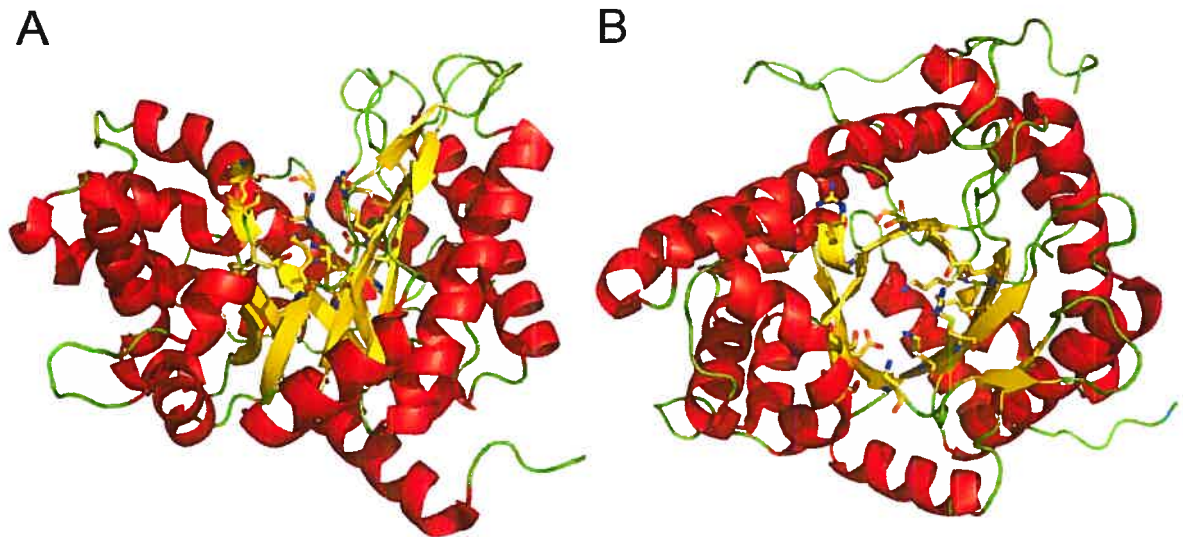


Figure 6: **Représentation schématiques de la structure tridimensionnelle d'une sous-unité de l'aldolase de muscle de lapin native.** a) vue de côté, perpendiculaire à l'axe du baril- β b) vue vers l'intérieur du baril- β , parallèle à l'axe du baril- β , les extrémités carboxyles des feuillets- β pointant vers le haut. Les boucles sont en vert, les hélices en rouge et les feuillets- β sont en jaune. Les chaînes latérales des résidus du site actif sont également tracées.

L'aldolase forme un homotétramère [64], constituant ainsi un complexe de 160kDa, chaque sous-unité étant de 40 kDa [73]. Les interactions entre les sous-unités ainsi que la structure quaternaire sont importantes, puisque le retrait d'une seule-sous-unité provoque l'arrêt d'activité des autres [82,83]. Toutefois, en mutant le résidu Glu128 pour une glycine, ce qui déstabilise une des deux surfaces d'interaction entre les sous-unités, il a été démontré que ce mutant formait un dimère toujours actif [84]. Ceci avait par contre un effet sur la stabilité de l'enzyme, grandement diminuée. L'autre interaction n'a toutefois pas été

perturbée pour observer l'effet sur l'activité. Ainsi, l'homotétramérisation offrirait à l'enzyme stabilité et coopérativité.

Tableau II: Structures tridimensionnelles résolues d'aldolases de classe I natives

Organisme-type	Code pdb	Référence
Humain- A	1ALD, 2ALD	[85,86]
Humain- B	1QO5	[87]
Humain- C	1XFB	[88]
Lapin- A	1ADO, 1ZAH	[89,90,91]
Lapin- B	1FDJ	-
<i>Drosophila melanogaster</i>	1FBA	[92]
<i>Trypanosoma brucei</i>	1F2J	[93]
<i>Leishmania mexicana</i>	1EPX	[93]
<i>Plasmodium falciparum</i>	1A5C	[94]
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	2IQT	[95]
<i>Thermoproteus tenax</i>	1OJX	[96]

Les séquences des aldolases d'eucaryotes sont bien conservées, ce qui explique la grande similitude des structures. Un alignement des séquences de diverses espèces eucaryotes le démontre clairement (figure 6.2). Les résidus du site actif, auxquels on attribue une importance catalytique, sont tous strictement conservés. Ceux-ci sont Asp-33, Lys-107, Lys-147, Arg-148, Glu-187, Glu-189, Lys-229, Ser-300, Ser-271, numérotation de l'aldolase de muscle de lapin. Voyons maintenant leurs rôles suggérés dans les divers modèles existants.

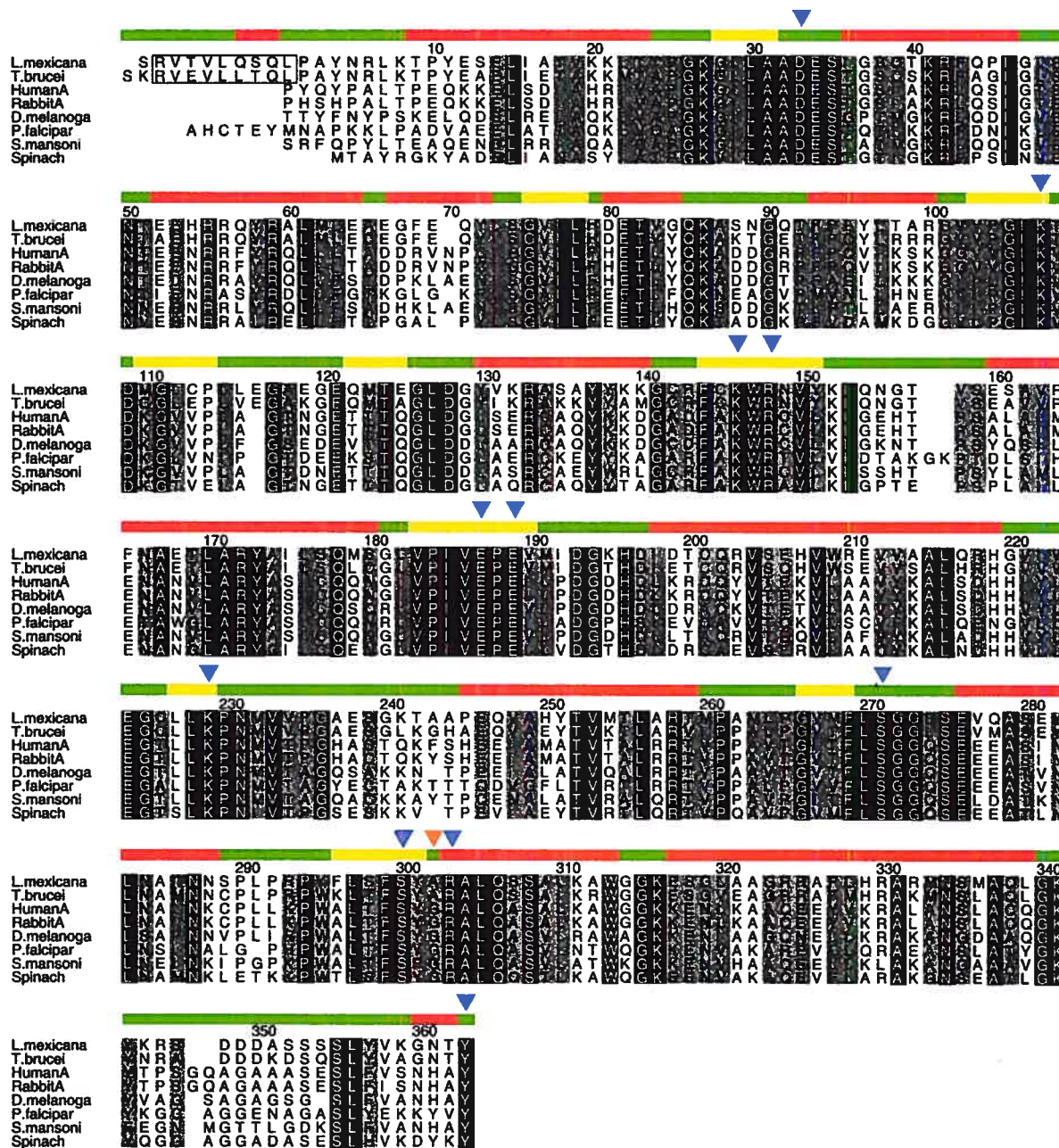


Figure 6.2: **Alignement de séquences d'aldolases de classe I d'organismes eucaryotes et structure secondaire associée à ces séquences.** Les séquences des organismes *L. mexicana*, *T. brucei*, l'aldolase A d'humain, l'aldolase A de lapin, *D. melanoga* (drosophile), *Plasmodium falciparum*, *S. Mansoni* et d'épinard ont été alignées avec l'algorithme CLUSTAL W. La numérotation suit celle de l'aldolase de lapin. Les résidus identiques sont surlignés en noirs, ceux qui ont des substitutions conservées sont surlignés en gris. Au-dessus des séquences, la bande représente la structure secondaire associée à chaque résidu; les boucles sont en vert, les hélices en rouge et les feuillets- β sont en jaune. De plus, les résidus importants sont marqués d'un triangle bleu. Le triangle orange montre la substitution Gly-302/Ala-312 existant chez *L. mexicana*. (adapté de [53])

3.4 Résidus du site actif et mécanismes précis proposés

Quatre types de résidus sont essentiels à la réaction de l'aldolase. Il est nécessaire d'avoir des sites de liaison des phosphates, des résidus régissant la spécificité des stéréocentres du substrats ainsi que des résidus participants à la réaction chimique, soient les résidus faisant des liens covalents avec le substrat et d'autres régissant les transferts de protons.

Le résidu faisant un lien covalent avec le substrat est connu depuis longtemps, il s'agit de la Lys-229 (numérotation de la FBP aldolase de muscle de lapin) [97]. Celle-ci doit cependant être déprotonée pour être nucléophile, rôle attribué à Lys-146 pour certains auteurs ou à Glu-187 pour d'autres auteurs [98]. Les sites de liaison des phosphates sont assez bien définis. Le résidu Lys-107 serait sans contredit responsable de la liaison du phosphate P6 [99,100]. Il serait également stabilisé par les résidus Ser-35 et Ser-38. Le phosphate en P1 est stabilisé par les chaînes latérales des résidus Ser-271 et de Arg-303 et par les chaînes principales de Gly-272, Gly-302 et Arg-303 [91].

Un grand débat persiste toujours autour des résidus régissant la stéréospécificité et ceux qui agissent comme base ou acide pour régir le transfert de proton. Deux modèles sont ainsi proposés, le premier de Choi et *al.* à la figure 7 et celui St-Jean et *al.* à la figure 8.

Dans ces deux modèles, il n'y a pas de doute que c'est le résidu Glu-187 qui effectue la catalyse acide de la déshydratation de la carbinolamine en base de Schiff. Toutefois, l'étape subséquente d'abstraction du proton de l'hydroxyle en C₄ ne fait pas l'unanimité. Choi *et al.* proposent que c'est le résidu Asp-33 qui ferait cette réaction, alors que St-Jean *et al.* proposent ici aussi le rôle de Glu-187. Cette hypothèse est fortement soutenue par l'intermédiaire base de Schiff cristallisé ainsi que des études cinétiques [101]. Choi *et al.* proposent que par la suite, ce soit encore le résidu Asp-33 qui fournit le proton au carbanion, d'une façon stéréospécifique du côté *proS*. Ceci est soutenu par le fait que des mutants du résidu Asp-33 retirent toute activité enzymatique [102]. D'autres émettent l'hypothèse que ce soit la tyrosine terminale, Tyr-363 [103,104], qui effectue l'abstraction du proton. Cette proposition est également soutenue par des expériences de digestion à la carboxypeptidase A [105]. Par la suite, le résidu Glu-187 médie alors les derniers transferts de protons, menant de la carbinolamine à la dissociation DHAP-enzyme. Une autre lysine occupe une place importante, le résidu Lys-146. Des expériences de mutagenèse de ce résidu réduisent grandement son activité [106,107]. Certains suggèrent qu'il jouerait un rôle dans la décyclisation de la forme fructo furanose cyclique du FBP [98]. Un rôle plus probable est de polariser l'hydroxyle en C₄ pour aider à ce que son proton parte, favorisant le bris de la liaison C₃-C₄ [91]. Tel que décrit ci-dessus, la tyrosine terminale joue un rôle dans le mécanisme catalytique. Étudions plus en profondeur cette région de l'enzyme.

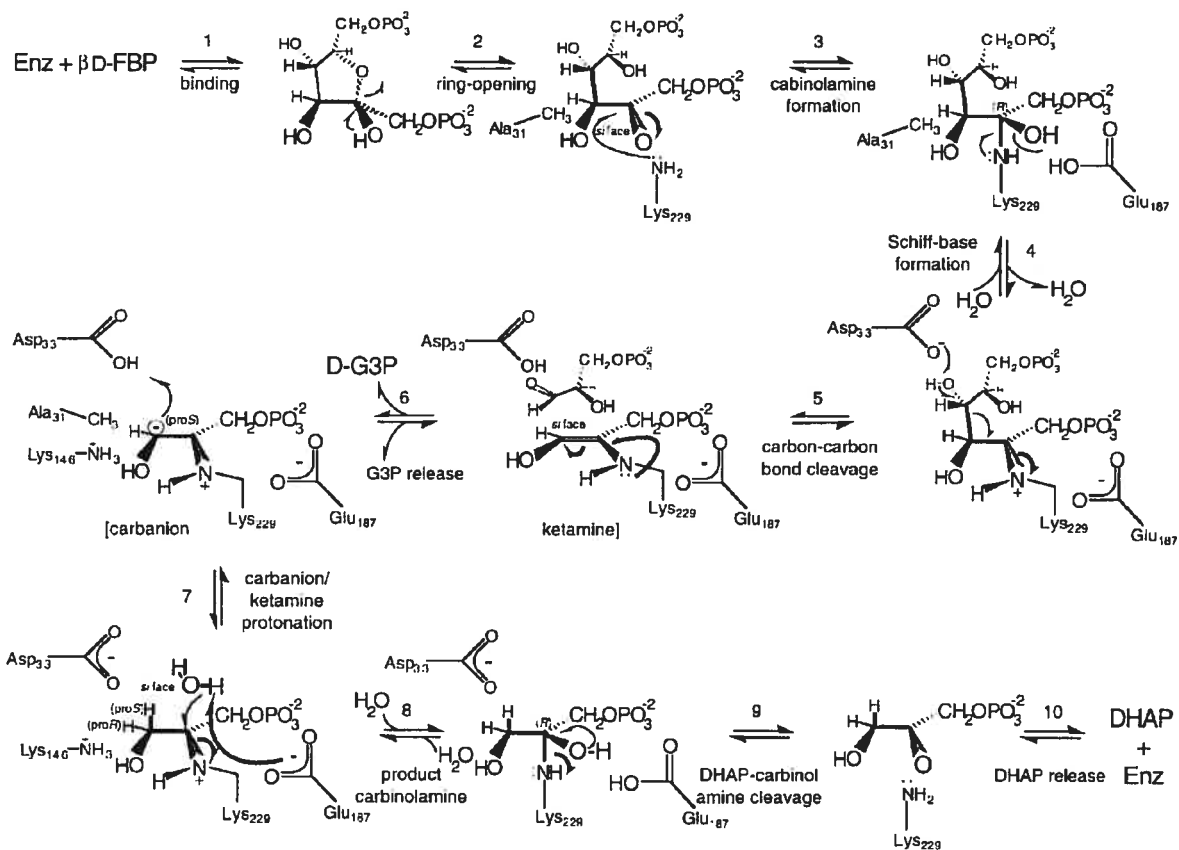


Figure 7. Mécanisme complet de l'aldolase proposé par Choi et al. Tiré de [108].

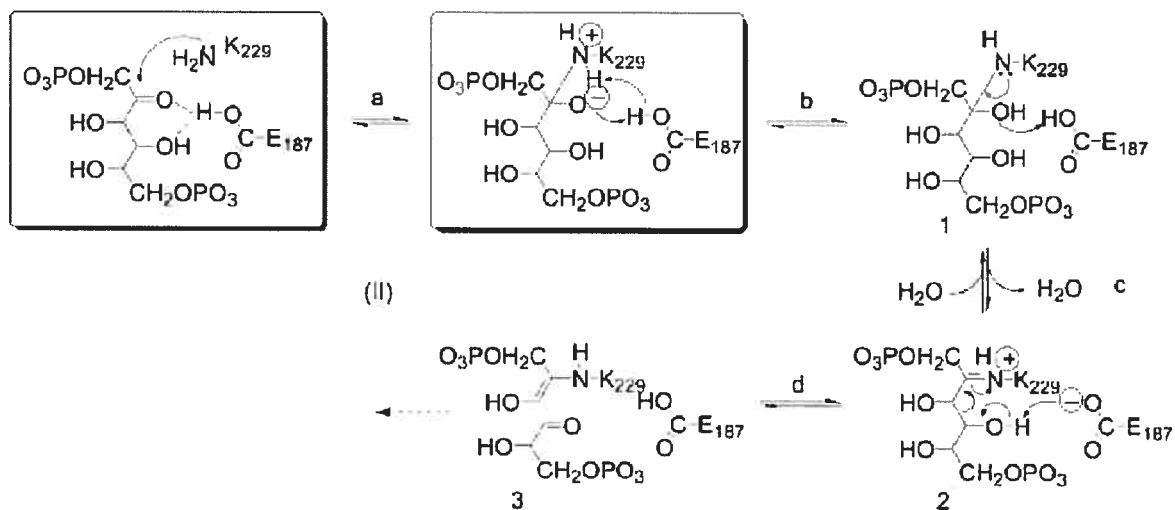


Figure 8. Premières étapes mécanistiques de l'aldolase, par St-Jean et al. Tiré de [91]

3.5 Région C-terminale de l'aldolase

Depuis longtemps, la région C-terminale de la FBP aldolase est reconnue pour avoir un rôle dans la catalyse. Les premières expériences de traitement à la carboxypeptidase A démontraient que l'aldolase perdait toute activité aldolasique sur le FBP [105]. Toutefois, cette perte complète d'activité ne s'effectuait pas avec le F1P comme substrat, perdant uniquement 30% de son activité [109]. Il a été découvert que l'échange de proton avec le DHAP se trouvait elle aussi compromise, et plus précisément c'est l'échange stéréospécifique du proton, qui ne se faisait plus lors de l'étape de l'intermédiaire énamine, qui en était la cause [81, 110].

Plus récemment, des expériences de mutagenèse dirigée sur la tyrosine terminale ont confirmé la nécessité de ce résidu pour la catalyse du FBP [111, 112]. D'autres expériences montrent une certaine protection à la carboxypeptidase A lorsque l'enzyme se trouve en présence de DHAP [112]. La phosphorylation de la tyrosine terminale désactive également l'enzyme [113]. De plus, une autre expérience de protéolyse carboxyterminale, des 6 derniers acides aminés de la protéine cette fois-ci, a permis d'observer une grande activité enzymatique face au F1P [114]. La séquence des 20 derniers résidus des FBP aldolases de classe I d'eucaryotes est très variable et compte peu de similarités entre les espèces. Certaines espèces ont même un ou deux résidus de moins que les premières. Les seuls résidus conservés parmi toutes ces espèces sont la tyrosine terminale ainsi qu'une

dyade sérine-leucine (Ser-356 et Leu-357 chez l'aldolase de muscle de lapin), qui sont les 9e et 8e derniers résidus. L'entreprise de la mutation de chacun de ces 9 derniers résidus a pu démontrer que plusieurs d'entre eux étaient importants, dont la Leu-357 [112]. Finalement, la corrélation entre l'activité enzymatique des différentes isoenzymes et la séquence de la queue C-terminale a pu être faite grâce à la production de chimères [115]. Ainsi, ce n'est pas uniquement la tyrosine terminale qui a un rôle dans l'activité enzymatique, mais bien toute la queue C-terminale.

Grâce à des études structurales, l'hypothèse que la région C-terminale contrôlerait la liaison du DHAP et la formation de la base de Schiff a été émise [90]. Toujours en se basant sur la structure, d'autres ont émis que la région C-terminale serait responsable de l'intégrité structurale de l'enzyme, son retrait menaçant la structure et donc son activité [86]. Toutefois, ceci peut être exclu, puisque la structure de l'aldolase de *T. brucei* a été cristallisée sans région C-terminale, ce qui n'a pas altéré la conformation tridimensionnelle. Dans les structures où la région C-terminale est visible, celle-ci se dirige soit vers le site actif, vers l'interface de deux sous-unités ou même vers l'interface de sous-unités d'une autre molécule du cristal [85,86,87,90,91,92]. Toutefois, toutes les régions C-terminales visibles sont biaisées par des interactions intermoléculaires. Dans les structures où la région C-terminale n'est pas visible, soit que la résolution ne permet pas [88,89] ou que les interactions intermoléculaires ne sont pas présentes [93,94]. Ainsi, une question d'intérêt

est: quel est le comportement de la queue C-terminale en l'absence de telles interactions intermoléculaires?

Finalelement, les résidus bien avant les 9 derniers résidus de la queue C-terminale, au début de la partie C-terminale, sont également importants au maintien de l'activité enzymatique. Une mutation génétique du résidu Gly-346 pour une sérine de l'aldolase de muscle cause, chez l'humain, une anémie haemolytique non-sphérocytique [116]. Dans ce cas, la flexibilité de la région C-terminale est compromise et réduit l'activité de l'aldolase. En somme, les 20 derniers résidus de la FBP aldolase constituant la queue C-terminale s'avèrent importants pour son activité et montrent une grande variabilité de séquences chez les espèces. Les expériences sur la région C-terminale ne sont pas les seuls essais à faire diminuer l'activité de l'enzyme, les scientifiques ont également tenté de créer des inhibiteurs pour l'aldolase.

3.6 Inhibiteurs connus de l'aldolase

Les inhibiteurs connus de l'aldolase ne sont pas vraiment les espèces recherchées, puisque nous cherchons des inhibiteurs spécifiques de l'enzyme de parasite par rapport à celle de mammifères. Nous ne cherchons surtout pas à inhiber l'enzyme de mammifères. Toutefois, ces inhibiteurs peuvent servir de produit de départ (*lead compound*). Il existe une panoplie d'inhibiteurs de l'aldolase, dont nous vous épargnerons la liste exhaustive [117].

Certains de ces inhibiteur sont des inhibiteurs compétitifs, imitant les substrats de l'enzyme. Ils possèdent toutefois le défaut d'être mono- ou bi-phosphorylés, ce qui rend leur entrée dans les cellules, par diffusion à travers les membranes, impossible. Notons, entre autres, l'hexitol-1,6-biphosphate qui est un mélange racémique de (2S)-mannitol-1,6-bis(phosphate) (MBP) et du (2S)-glucitol-1,6-biphosphate (GBP), puisque formé à partir de la réduction non-stéréospécifique du FBP [118, 119]. D'autres inhibiteurs sont irréversibles, agissant sur des résidus-clé du site actif, telles les lysines. Finalement, une nouvelle gamme d'inhibiteurs réversibles de type *slow-binding* sont, en ce moment, à l'étude [120, 121]. Pour synthétiser des inhibiteurs spécifiques aux aldolases parasitaires, une connaissance de ceux-ci est requise.

3.7 Aldolase de trypanosome

Les trypanosomes étant des êtres unicellulaires eucaryotes, ils possèdent une FBP aldolase de classe I. Tel que démontré par les structures des enzymes natives comparées à celles de mammifères, les sites actifs se révèlent très semblables [93]. Toutefois, une différence subsiste dans le site actif où la Gly-302 des aldolases de mammifères est une Ala-312ⁱⁱⁱ chez les parasites [46]. Cette différence est la seule différence dans le site actif des aldolases de classe I d'eucaryote dont nous connaissons la séquence à ce jour. D'autres

iii Il est à noter que la numérotation n'est pas identique, attribuable à la présence des 10 résidus supplémentaires en n-terminal, formant le PTS-2

différences existent ailleurs, puisque l'identité des séquences est d'environ 47%. Toutefois, ceci ne modifie pas l'intégrité de la structure tridimensionnelle globale. Cependant, le n-terminal des parasites possède 10 résidus de plus, constituant le signal de ciblage au peroxisome (PTS-2). Finalement, la région C-terminale des trypanosomes possède deux résidus de moins, mais conserve la tyrosine terminale ainsi que deux autres résidus dans le centre de la région, Ser-363 et Leu-364.

L'aldolase de *Trypanosoma brucei* a été très étudiée au niveau de sa cinétique enzymatique, qui a démontré que ses propriétés sont très semblables à celles de l'aldolase de muscle de lapin [122]. Toutefois, des différences existent lorsqu'on inactive l'aldolase de *T. brucei* avec de la carboxypeptidase A en retirant uniquement la tyrosine terminale. Celle-ci perd son activité de clivage du FBP, tel qu'attendu, mais elle perd également son activité de clivage du F1P [123]. L'hypothèse émise était que le site du phosphate en C6 était différent chez les deux enzymes.

L'aldolase de *Leishmania mexicana*, moins étudiée, ressemble fortement à l'aldolase de *T. brucei*. Ceci est démontré tant par la similitude de leurs séquences, elles partagent 80.5% d'identité [124], que par leur structure tridimensionnelle, avec 0.4 Å de rmsd [93]. Ainsi, ces deux enzymes sont de bons modèles l'un pour l'autre. La structure des deux enzymes a surtout révélé que les résidus n-terminaux constituant le PTS-2 forment en fait des interactions entre les sous-unités, faisant des dimères, tel que montré à la figure 9.

La cible proposée serait donc d'arriver à faire en sorte que l'interaction entre le PTS-2 et la peroxine qui la reconnaît, Pex7, ne soit pas possible. Ainsi, l'aldolase ne serait pas importée dans le glycosome.

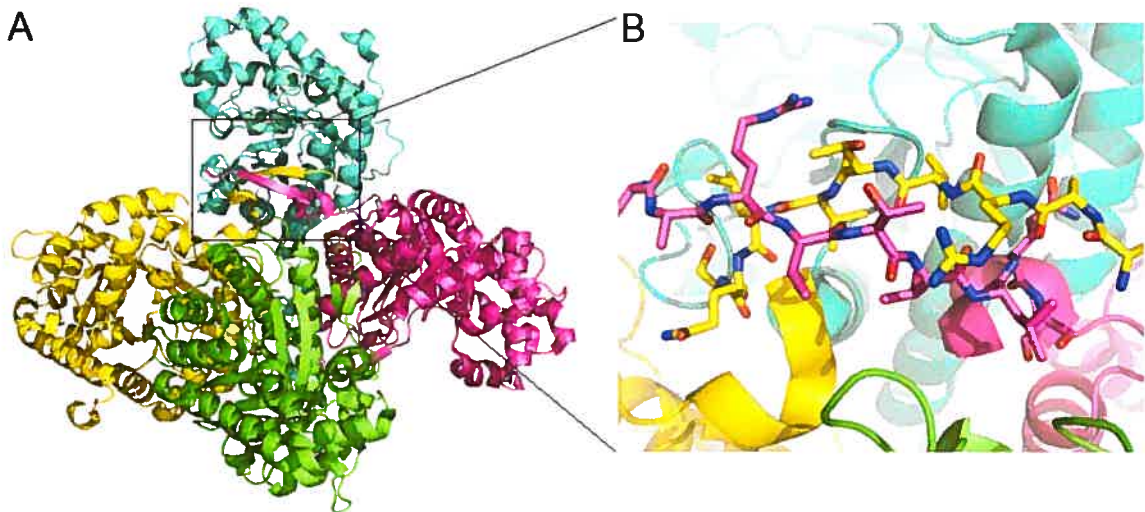


Figure 9: Représentations schématiques de la structure tridimensionnelle d'un tétramère de l'aldolase de *L. mexicana* (A) et de la structure du PTS-2 (B). Chaque sous-unité a été coloré d'une couleur différente, montrant ainsi dans la figure b) comment le PTS-2 dimérise, mais aussi interagit avec les deux autres sous-unités avoisinantes.

D'autres avenues ont également été étudiées, telles que celle des *hot spots*, ces surfaces de charge positive à la surface des enzymes glycolytiques, dont l'aldolase, qui ne sont pas présentes chez l'aldolase des vertébrés [125]. Tout comme le PTS-2, ces surfaces seraient essentielles à l'importation dans le glycosome. Des inhibiteurs potentiels ont été synthétisés, sans grand succès d'inhibition toutefois [126]. Des tentatives de créer des inhibiteurs suicides spécifiques n'ont pas porté fruit initialement [127]. Tout

récemment, un inhibiteur irréversible a par contre été découvert [121,128]. Ne s'attaquant pas à l'enzyme de muscle de lapin, ni à l'aldolase de foie d'humain, il agit avec une haute spécificité envers l'aldolase de *T. brucei*, et un peu moins envers celle de *L. mexicana*. Cet inhibiteur agit dans le site actif, créant une liaison avec la Lys-116. De plus, une façon de traverser la membrane du parasite a été découverte, permettant ainsi de faire passer un groupe phosphate chargé négativement à travers celle-ci [129]. La stratégie consiste à protéger le groupement phosphate grâce à des groupes protecteurs pouvant être retirés par la suite par les enzymes du parasite. Toutefois, nous sommes loin d'un médicament s'attaquant aux trypanosomes, ce qui incite à vouloir chercher d'autres cibles sur l'aldolase de parasite pouvant être exploitées.

Hypothèses et objectifs

Rappelons-le, le but global du projet de recherche est donc de travailler à améliorer les connaissances des maladies parasitaires, en particulier les maladies causées par des trypanosomes, dont les leishmanioses. L'approche consistera à effectuer une étude comparative de la structure d'une enzyme de parasite avec l'équivalent humain (ou de vertébré) vue d'un possible design rationnel de médicament.

La prémisse, supportée par de nombreuses études, est que les enzymes glycolytiques sont une cible de choix. L'enzyme choisie est la fructose-1,6-biphosphate aldolase pour

plusieurs raisons: c'est une enzyme centrale de la glycolyse et ses produits (dans le sens glycolytique) servent à d'autres voies métaboliques. De plus, de récentes expériences utilisant la technique de l'ARN interférence pour réduire la quantité d'aldolase chez le parasite, *in vivo*, ont démontré qu'une réduction de 73% des aldolases réduisait le flux glycolytique de 58% et arrêta la croissance de *T. brucei* [130]. La même expérience n'a toutefois pas été effectuée chez *L. mexicana* pour les raisons évoquées précédemment [62].

Ainsi, l'objectif principal de la présente étude est de comparer les structures tridimensionnelles de la fructose-1,6-biphosphate aldolase de *L. mexicana* et de la fructose-1,6-biphosphate aldolase de muscle de lapin. Nous ne nous limiterons pas uniquement aux enzymes natives, mais nous résoudrons également les structures d'intermédiaires réactionnels, ce qui permettra aussi de vérifier si le mode de liaison et le mécanisme catalytique de l'aldolase est conservé lors de l'évolution. Déjà, certaines hypothèses peuvent être avancées, à la lumière des alignements de séquences, mais aussi en connaissance des structures déjà résolues.

Une différence structurale, dont il est possible de tirer avantage, serait peut-être la substitution de la glycine 302, chez l'aldolase de muscle de lapin, par l'alanine 312 chez les trypanosomes. Ce résidu étant tout près du site de liaison du phosphate en C₁ du substrat, l'hypothèse que le méthyle de l'alanine crée une répulsion nécessaire à déplacer le phosphate des substrats vers un autre site de liaison sera vérifiée.

Un autre sous-objectif sera de vérifier le comportement de la liaison de la région C-terminale de l'enzyme lors de la liaison des substrats. L'aldolase de *L. mexicana* étant dépourvue, du moins pour deux sous-unités, de contacts intermoléculaires avec des symétries pour la région C-terminale, elle ne présentait pas de région C-terminale visible dans la structure de l'enzyme native. Comme cette région est nécessaire à la catalyse, donc doit être recrutée vers le site actif, il est possible de s'attendre à ce qu'elle devienne visible dans des structures avec un ligand au site actif. Encore une fois, c'est la liaison du phosphate en C₁ qui sera scrutée de près, puisqu'il s'agit de la seule interaction commune à tous les ligands et substrats.

Finalement, un troisième et dernier sous-objectif est de trouver d'autres différences de la structure et du mécanisme potentiellement exploitables en vue d'un design rationnel de médicament.

Le choix de l'aldolase de *L. mexicana* plutôt que celle de *T. brucei* s'est effectué majoritairement à cause de la région C-terminale. En effet, dans la première structure de *L. mexicana*, même s'il n'est pas visible dans les cartes de densité électronique, le c-terminal a été quand même cristallisé avec le reste de l'enzyme [93]. De plus, l'absence d'interactions intermoléculaires retirera tout artefact pouvant être créé. Dans le cas de l'aldolase de *T. brucei*, la difficulté à cristalliser l'enzyme a poussé les auteurs de la première structure à

couper la queue C-terminale [93]. Ainsi, les conditions cristallographiques déjà existantes, comprenant la partie C-terminale, nous poussent à choisir l'aldolase de *L. mexicana* pour mener notre étude. Toutefois, les modèles créés pour *L. mexicana* pourront être très bien utilisés pour *T. brucei*, puisque l'identité de séquence des deux enzymes est de 80% et le rmsd des C_α des structures natives est de 0.4 Å.

Pour répondre à ces questions, la structure de l'aldolase de *L. mexicana* sera résolue en présence de FBP, mais aussi de HBP. Une comparaison avec les structures équivalente de muscle de lapin pourra ainsi s'opérer. Grâce à ces expériences, une meilleure compréhension du site de la liaison du phosphate en C₁ ainsi que de la région C-terminale sera acquise.

Chapitre 2: article

Carboxy-terminus recruitment by substrate in eukaryotic fructose bis-phosphate aldolases

Julien Lafrance-Vanasse, Jurgen Sygusch ‡

From the Department of Biochemistry, Université de Montréal,

Montréal, Québec H3C 3J7, Canada

‡ To whom correspondence should be addressed: Biochimie/Médecine, Université de
Montréal, CP 6128, Station Centre-Ville, Montréal, Québec H3C 3J7, Canada. Tel.: 514-

343-2389; Fax: 514-343-6463; E-mail: [REDACTED]

Abstract

Structures of the *Leishmania mexicana* fructose-1,6-bis(phosphate) aldolase complexed with its substrate and with the competitive inhibitor mannitol-1,6-bis(phosphate) were solved at 2.2 Å resolution. A Schiff base was trapped in the structure complexed with the substrate and the inhibitor-enzyme complex mimics the carbinolamine intermediate, consistent with previous analysis of the same complexes of the mammalian enzyme. In the absence of crystallographic packing constraints surrounding the C-terminal tail, we developed a model for its recruitment. In the free enzyme, the flexible C-terminal region is disordered to minimize interference of ligand binding to the active site. The C-terminus is then recruited following ligand binding. This recruitment is made possible through interactions between conserved residues. Specifically, the P₁-phosphate of the ligand induces the structural modifications necessary for this stabilization. The C-terminal region is known to play an important role in catalysis with the final tyrosine mediating proton transfer at the enamine intermediate step. Although the sequence of the C-terminal region is variable among species, a conserved Ser-Leu anchor controls the position of the final tyrosine, so that it is able to act precisely on the C₃ position of the enamine. This mechanism accelerates the enzymatic reaction by reducing configurational entropy.

Aldolase is an essential enzyme that directs both glycolysis and gluconeogenesis, by reversibly catalyzing the conversion of fructose-1,6-bisphosphate (FBP)¹ into glyceraldehyde-3-phosphate (G3P) and dihydroxyacetone phosphate (DHAP) (1). Aldolases are abundant and ubiquitous and have been the subject of continuous interest because of their ability to catalyze carbon-carbon bond formation in living organisms. A feature common to class I aldolases, found primarily in vertebrates, insects, and higher plants, is the use of a covalent mechanism for catalysis implicating Schiff base formation between a lysine residue on the enzyme and a ketose substrate (2). In glycolysis, the enzyme cleaves the fructose C₃-C₄ bond of the covalent intermediate liberating G3P and leaving an enamine carbanion bound in the active site. Stereospecific protonation of the chemically reactive enamine (3) regenerates a ketimine intermediate which upon hydrolysis liberates DHAP. The structure of the polypeptide chain of each aldolase subunit of the aldolase tetramer has been determined by crystallographic studies for mammalian aldolases (4,5,6,7), parasite aldolases (8,9) as well as *Drosophila* aldolase (10) and corresponds to a repetitive 8-fold $\beta\alpha$ motif commonly referred to as a β -barrel.

¹ *Abbreviations:* FBP, fructose-1,6-bis(phosphate); MBP, (2R)-mannitol-1,6-bis(phosphate); G3P, glyceraldehyde 3-phosphate; DHAP, dihydroxyacetone phosphate; HBP, hexitol-1,6-bis(phosphate); GBP, (2S)-glucitol-1,6-bis(phosphate); rms, root mean square.

The aldolase active site is located in the center of the β -barrel at the bottom of a cleft and is accessible only from the carboxyl end of the β strands comprising the β -barrel. The active site contains a number of conserved charged residues, vicinal to the Schiff base forming lysine, which can participate in catalysis. In the direction of FBP cleavage, mutagenic, kinetic and crystallographic data indicate multiple mechanistic roles for specific active site residues that are conserved in all known class I aldolases (11,12). In rabbit muscle aldolase, Glu-187, adjacent to Lys-229 the Schiff base forming residue (13), initiates C_3 - C_4 bond cleavage by proton abstraction of the C_4 hydroxyl, mediates proton transfers at the level of the ketimine intermediates and promotes charge stabilisation of adjacent active site residues (11, 12). Lys-146 hydrogen bonds the C_4 hydroxyl allowing it to stabilize the developing negative charge on the C_4 hydroxyl during C_3 - C_4 bond cleavage initiated by proton transfer to Glu-187 (11). Asp-33 serves to stabilize electrostatically the charged form of Lys-146 as well as align substrate through hydrogen bonding in the Schiff base intermediate. Furthermore, site-directed mutagenesis of Asp-33 and Lys-146 significantly compromises catalytic activity (14, 15, 16, 17) and reinforces their critical roles in catalysis. Binding by substrate and analogues induces a conformational change in two helical regions flanking the active site that narrows the active site cleft and allows Arg-303 to interact with the C_1 -phosphate and Ser-35 and Ser-38 to stabilize the C_6 -phosphate attachment through hydrogen bonding with the oxyanion (11).

A distinguishing structural feature is the C-terminal region (residues 343-363) of the enzyme that is relatively flexible as indicated by high temperature factors, has

an extended secondary structure (10, 11, 18), and is specific to subunits of mammalian aldolases and their orthologues. Sequence homology of this region is limited and because it contains stretches rich in glycine and alanine amino acid residues that are considered conformationally mobile at the structural level make this region difficult to trace in its entirety in electron density maps. Where visible in electron density maps, this region can adopt various conformations in each aldolase structure, folding as an extended polypeptide chain over its proper subunit surface towards the active site more than 43Å away (10, 11), folding towards a cleft-like region formed by subunit interfaces some 34Å away (18) and extending towards subunits of adjacent tetramers in the crystal lattice also more than 35 Å away (18). The aldolase C-terminus has a significant role in catalysis as kinetic studies on muscle aldolase, subjected to limited proteolysis (19), have shown that loss of the conserved C-terminal Tyr-363 specifically inhibits stereospecific proton exchange at the level of the enamine intermediate and making it rate limiting (20). Residues distal to the COOH-terminus residue also have a functionally significant role determining the observed catalytic activity differences noted among aldolase isozymes (21). Chimers of class I aldolases wherein the penultimate residues of the C-terminal region were exchanged specifically affect the proton exchange reaction step and demonstrated a role by the C-terminal region in mediating stereospecific proton transfer. Mutation of the conserved Leu-357 residue also significantly affected exchange activity (22). Chimeric constructs exchanging residues further upstream in the COOH terminal region also perturb activity and support an additional role in catalysis for this region (22). The structural and kinetic data thus strongly indicate

that proton exchange by Tyr-363 with the enamine intermediate necessitates physical interaction by the C-terminal region with the active site.

The hypothesis for a direct structural role by the C-terminal region during catalysis implies the C-terminal region must be recruited to the active site subsequent to ligand attachment at the C₁-phosphate binding locus so as to minimize interference with active site ligand binding. Although the crystallographic data supports an apparent role for a functional interaction by the C-terminal region with the active site by virtue of the C-terminal region interacting with residues that are proximal to the active site, crystal packing contacts in the lattice between adjacent aldolase tetramers may direct the C-terminal region resulting in a conformational stabilization that is not uniquely determined by the underlying subunit surface. To examine active site recruitment of the C-terminal region by substrate attachment, a crystal structure is required where the C-terminal region does not make packing contacts with adjacent tetramers allowing it to uniquely interact with its own subunit. Attachment at the C₁-phosphate binding locus would then be predicted to induce C-terminal interaction with the active site locus.

To examine this hypothesis, we have analyzed ligand binding in the class I aldolase from *Leishmania mexicana* as its crystal structure has been reported (8). In this structure, nonhomologous residues (353-357) of the C-terminal are free of crystal contacts in two subunits. The residues Tyr-352, Asp-356 and Asp-357 of this region interact with the subunit surface and the last residue Asp-357, situated 15Å from Arg-303 involved in C₁-phosphate binding site, with remaining residues 358-373 apparently disordered. Recruitment would imply that substrate and analogue

attachment enhances order in the C-terminal region as a result of C₁-phosphate attachment and this ordering interaction occurring free of crystal contacts is functionally significant.

A secondary goal was to examine the role of the amino acid substitution, Gly-302 → Ala (23), in the aldolase active site; this residue is situated adjacent to the C₁-phosphate binding site and backbone atoms of Gly-302 participate in C₁-phosphate oxyanion binding. The substitution is unique to *Leishmania* and Trypanosome species as all other active site residues have been conserved in all eukaryotic class I aldolases sequenced to date (24). *Leishmania* is an intracellular human pathogen found in erythrocytes and is transmitted into the bloodstream of human host by the bite of the sandfly, *Phlebotomus* (25). In its amastigote stage, the parasite relies principally on ATP production from carbohydrate metabolism (26) making glycolytic aldolases a potential therapeutic target to fight *Leishmania* infections (27). Leishmaniasis is considered an emerging and uncontrolled disease with more than 12 million cases world-wide, mainly in developing countries; every year, more than 59,000 people die from it (28). Knowledge of the mode of attachment at the C₁-phosphate locus would be useful in the structure based design of specific aldolase inhibitor compounds.

To examine in detail the role of C₁-phosphate binding in active site recruitment of the C-terminal region, crystals of *Leishmania mexicana* aldolase were incubated in the presence of substrate, fructose-bisphosphate, and a tight binding competitive inhibitor, hexitol-bisphosphate (29). Flash freezing of *L. mexicana* aldolase crystals briefly soaked in saturating FBP solution trapped authentic Schiff

base intermediate while in the presence of hexitol-bisphosphate, one of two hexitol-bisphosphate diastereoisomers, (2R)-mannitol-1,6-bis(phosphate) (MBP), was uniquely trapped in the aldolase active site. In both instances, binding resulted in active site recruitment of the C-terminal region implicating conserved amino acid residues and provided further insight into determinants of the reaction mechanism describing aldolase catalysis.

Material and Methods

Hexitol-1,6-bisphosphate (HBP) was prepared by NaBH_4 reduction of FBP as described previously (29). This reaction produces a mixture of two diastereoisomers: (2R)-mannitol-1,6-bisphosphate (MBP) and (2S)-glucitol-1,6-bisphosphate (GBP) (29). All figures in the present paper were prepared using the program PyMOL (30) and with APBS (31).

Purification and Crystallization. The expression, purification and crystallization of *L. mexicana* aldolase was carried out using a method adapted from previously described (8). The PET5b plasmid containing the *L mexicana* ALD gene was fused to a sequence coding for a N-terminal hexahistidine tag and was transformed and overexpressed in *E. coli* BL21pLysS (Invitrogen). Nickel chelating affinity chromatography (HiTrap-Ni, Amersham) and size exclusion chromatography yielded a highly purified protein. Aldolase concentration was determined by BCA protein assay reagent (Pierce) with bovine serum albumin serving as a standard.

L. mexicana aldolase crystals were grown by vapor diffusion at 23°C using a 1:4 mixture of protein solution (11 mg/ml initial protein concentration in 20 mM HEPES, pH 7.0) and precipitant buffer (15% polyethylene glycol 5000 MME in 20mM sodium phosphate pH 4.0) that was equilibrated against a reservoir of precipitant. Microseeding of previously grown crystals was used to improve crystal size and quality. pH measured in equilibrated drops was 4.5.

Data Collection and Processing. *L. mexicana* aldolase crystals were soaked for 2 min in FBP buffer (mother liquor plus 10 mM FBP) or for 5 min in HBP buffer (mother liquor plus 4.5 mM HBP). Prior to data collection, crystals were

cryoprotected by transfer through a cryobuffer solution (FBP or HBP buffer plus 20% glycerol) and immediately flash frozen in a stream of gaseous N₂ cooled to 100° K. Diffraction data were collected from single crystals at beamline X29 of the National Synchrotron Light Source (Brookhaven National Laboratory, Upton, NY) using an ADSC Quantum-315 charge-coupled device (Area Detector Systems, Poway, CA). All data sets were processed with HKL2000 (32), and the results are summarized in Table I.

Structure Solution and Refinement. Initial phases used for model building of native and liganded structures were obtained by molecular replacement using the previously determined structure for the *L. mexicana* aldolase tetramer (Protein Data Bank entry 1EPX). The crystal structures belong to the orthorhombic space group P212121 and have one aldolase homotetramer in the asymmetric unit. All reflections having $I/\sigma(I) > 1$ were used in refinement; however, electron density maps were calculated to the resolution shown in Table I and corresponded to completeness of at least 70% in the highest resolution shell. The structures were subjected to iterative rounds of refinement (simulated annealing and minimization) with CNS (33) and model building using O (34). Water molecules were automatically added by CNS in initial rounds and manually near the end of refinement. C-terminal regions (residues 354-366) were traced in subunits A and B only, for the FBP and HBP soaked structures.

Ligand modeling was based on interpretation of electron density shapes of $2F_o-F_c$ and F_o-F_c annealed omit maps and the program PRODRG was used for topology and parameter generation (35). Binding by FBP and HBP, as the MBP

diastereoisomer, were readily discernable and were associated with clearly defined electron densities in the active site. Difference electron density (F_o-F_c) annealed omit maps calculated in the final round of refinement confirmed identical binding of ligands in all four subunits.

Final model statistics, calculated with CNS and PROCHECK (36), are shown in Table I. The coordinates and structure factors of native aldolase, covalently bound FBP, and MBP as noncovalent complex have been deposited with the Protein Data Bank (entry codes 1XXX, 1YYY and 1ZZZ respectively). Final models for the structure of native aldolase and complexes formed with FBP bound covalently and MBP noncovalent have an R_{cryst} (R_{free}) of 0.173 (0.203), 0.185 (0.238), and 0.190 (0.235), respectively. The corresponding Luzzati atomic coordinate error was estimated at 0.18, 0.26 and 0.24 Å, respectively. Ramachandran analysis performed with PROCHECK placed at least 90% of nonglycine and nonproline residues of the four structures in the most favorable region and with the remainder found in allowed and generously allowed regions, attesting to good model geometry in the structures. Errors in hydrogen bond distances, positional differences, and B-factors are reported as S.D. values and were estimated based on their value found in each aldolase subunit.

Structure comparisons. Superpositions were performed with the program PyMOL (30) using C_α atom coordinates of identical blocks of amino acid sequences and comparing native with liganded aldolase tetramers. Due to conformational heterogeneity among subunits in N-terminal and C-terminal regions, comparisons were performed using residues 24-353 in *L. mexicana* aldolase and residues 14-343

in rabbit muscle aldolase.

A difference distance matrix of C_{α} native and liganded structures was calculated using the program DDMP (37) to find constant structural elements. Residues 112-269, representing β -strands and α -helices 3-6 of the β -barrel structure showed the least variation (rms = 0.18Å based on C_{α} atoms) among all structures and were used in all subsequent structure superpositions to discover regions in the liganded structures that underwent conformational changes upon ligand binding. The same protocol was applied for comparisons between parasite aldolase and rabbit muscle aldolases and revealed residues 112-240 in *L. mexicana* aldolase, and the corresponding stretch of residues 103-230 in the rabbit muscle structures, were polypeptide stretches with least variations (rms = 1.0 Å based on C_{α} atoms). Inter-subunit variability within a tetramer was analyzed by the program Polypose (38) and yielded rms differences, based on C_{α} atom coordinates, that were less than the error in the atomic coordinates for each structure.

Interactions with the C-terminal region due to crystal packing, listed in table II, were performed by selecting all atoms in a crystallographic symmetry related tetramer that were within a radius of 4 Å of residues 340-373 (*L mexicana* numbering). The interacting residues identified were then used in a second round of selection to locate all atoms between 4 Å and 8 Å of the initial contact. This strategy allows for identification of solvent molecules making bridging contacts. The nature of interaction found was then characterized by visual inspection and geometrical criteria.

Surface Calculations Surface calculations were performed with the program

CNS. The buried surface was calculated between residues 1-354 and residues 355-366 of the C-terminal region for the liganded structures. The calculation was repeated with Leu-364 residue mutated to glycine. Difference of the two values gave the solvent accessible surface buried by the interaction between Arg-313 and Leu-364.

Results and discussion

Native enzyme. The combination of refined crystallization conditions and high flux of the synchrotron beamline afforded improved signal to noise ratios for diffracted intensities of native crystals of *L. mexicana* aldolase, shown in table 1, compared to the original structure (8). The improved resolution allowed placement of several side-chains missing in the original structure (Met-1, Ser-2, Lys-18, Lys-30, Lys-31, Lys-51, Gln-54, Glu-76, Gln-80, Glu-129, Lys-142, Lys-205, Lys-251, Glu-256, Leu-320, Lys-321, Arg-335, Ser-355) as well as the addition of an extra residue, Asp-358, in the C-terminal polypeptide, whose backbone oxygen interacts with the side chain of Arg-354 affording stabilization. In contrast to the original structure, electron density was found at three distinct sites in each subunit of the refined structure and was interpreted as bound phosphate oxyanions consistent with 20mM sodium phosphate used to buffer the crystallization solution. Two phosphates are bound at sites, P₂ and P₃, in the active site and are distinct from the P₁ and P₆ – phosphate binding sites used in substrate and analogues binding (11). The side chain of conserved Arg-313 (Arg-303 in rabbit muscle aldolase) involved in P₁-phosphate binding does not interact with the P₂-phosphate bound by residues Ser-281 and Gly-282; the guanidinium moiety of Arg-313 being disordered in the electron density and points towards the solvent as was observed in the crystal structure of the native rabbit muscle aldolase (PDB id #1ZAH). The P₃ phosphate hydrogen bonds with the P₂ phosphate as well as with conserved residues Glu-197 and Glu-199. Hydrogen bonding pattern implicating the P₃ phosphate and glutamate residues requires that at least one glutamate residue must be protonated and that at least one of the phosphate

oxyanions is monobasic at pH 4.5. A third phosphate binding site is located at the subunit interface and interacts with N-terminal residues of an adjacent subunit.

Schiff base. Continuous electron density, extending beyond Lys-239 N_z in each subunit, shown in Fig. 1, indicates formation of a stable covalent adduct with FBP. The planar shape of the electron density observed about the FBP C₂ carbon suggests trigonal hybridization and is consistent with trapping of a Schiff base intermediate in each aldolase subunit. Comparison of average B-factors between bound FBP and interacting side chains, $42.0 \pm 11.3 \text{ \AA}^2$ and $42.3 \pm 11.2 \text{ \AA}^2$ respectively, supports full active site occupancy by FBP. The side chain of Arg-313 curls to interact with the P₁ oxyanion and is further stabilized by hydrogen bonding with backbone amides of residues Ser-281, Gly-282, Ala-312 and Arg-313 and side chains of Ser-281, identical to FBP binding found in rabbit muscle aldolase. To make room for Arg-313 to interact with the P₁-phosphate, the backbone conformation of Gly-282 inverts such that the Gly-282 carbonyl no longer makes close contact with Arg-313 guanidinium moiety and points in the opposite direction. The change in backbone conformation by Gly-282 affects the conformation of Gly-283 moving its carbonyl oxygen closer by 1.4Å towards the incoming C-terminal region.

The remaining interactions, shown in Fig. 1, made by active site residues with the P₆-phosphate and with FBP hydroxyls were similar to FBP interactions reported in the rabbit muscle aldolase structure. Superpositions of FBP structures from rabbit muscle aldolase and *L. mexicana* aldolase (rms deviation = 1.15 Å for C α atoms of residues 14-343 for rabbit muscle aldolase and 24-353 for *L. mexicana* aldolase and rms deviation = 0.76 Å for FBP atoms) reinforce identical binding modes by FBP in

the active sites of both aldolases. The active site cavity can readily accommodate the amino acid substitution Gly-302 \rightarrow Ala (rabbit muscle aldolase numbering) as it does not perturb the mode of substrate binding or interactions. Additional electron density found in the active site was interpreted as binding by two phosphates moieties, at the previous P₃ binding site and a new P₆' site, shown in Fig. 1. Alternate interpretations of modelling the electron densities in terms of phosphates corresponding to bound cyclic and linear forms of substrate as well as triose-Ps did not result in satisfactory fits. P₃ binding shown in Fig. 1 is stabilized through interaction with Glu-197 and Glu-199 resulting in only close contact with the FBP O₄ hydroxyl ($3.57 \pm 0.17 \text{ \AA}$) instead of the hydrogen bond observed in the rabbit muscle aldolase. P₆' phosphate promotes a slight conformational displacement of Arg-158 enabling it to interact with the P₆' oxyanion.

Carbinolamine analogue. The electron density in Fig. 2 indicates formation of a stable non-covalent hexose-P₂ adduct in the active site. The non-planar shape of the electron density about the C₂ atom of the hexose-P₂ indicates tetrahedral hybridization and is consistent with trapping of (2R)-MBP in each aldolase subunit. Binding by the (2S)-GBP stereoisomer is discriminated against, as other binding modes were not observed in electron density maps. The quite similar B-factors for MBP and interacting active site residues, $34.1 \pm 8.7 \text{ \AA}^2$ and $41.8 \pm 8.7 \text{ \AA}^2$ respectively, are consistent with full active site occupancy by MBP. Superposition of FBP and MBP structures, (rms deviation = 0.28 \AA for C _{α} atoms of residues 24-353) reflects similar interactions made by the ligands with active site residues including the conformational change imposed on Gly-283, a consequence of P₁-phosphate

binding. The C₂ hydroxyl present in MBP but not the Schiff base with FBP makes an additional hydrogen bond with Glu-197 also observed in rabbit muscle aldolase (11). Furthermore, superposition of *L. mexicana* aldolase (residues 24-353) with rabbit muscle aldolase (residues 14-343) bound by MBP (rms deviation = 1.11 Å comparing C_α atoms and 0.54 Å for MBP atoms only) is consistent with identical binding modes for the MBP ligand including the same short hydrogen bond made by Ser-281 with the oxyanion (2.47 ± 0.23 Å in FBP, 2.46 ± 0.25 Å in MBP). The bound (2R)-MBP configuration mimics the transient carbinolamine precursor in FBP aldolase and thus acts as a transition state analogue maximizing its active site interactions. Similar to the FBP structure, the presence of the methyl group in Ala-312 does not affect binding integrity of the inhibitor and makes this amino acid substitution neutral with regards to substrate or analogue attachment. Phosphate anions were not observed bound in the MBP structure as the C₂ hydroxyl in MBP interferes with P₃ phosphate binding while the P₆ of MBP interferes with P₆' binding site.

Induced fit. To assess conformational changes concomitant with FBP and MBP binding, a difference matrix of C_α was calculated using native, FBP and MBP bound structures. P₁-phosphate binding imposed a conformational displacement of 0.69 ± 0.21 Å towards the active site affecting residues 310-330. An adjacent region also of α-helical secondary structure and corresponding to residues 43-61 in subunits, A and B, underwent a larger conformational change upon ligand binding that narrowed the active site cleft by 1.41 ± 0.05 Å, while a smaller conformational change of 0.57 ± 0.28 Å was observed in subunits C and D. In the crystal structure,

subunits C and D from different tetramers make reciprocal crystal packing contacts that involve residues of this region and would penalize structural movement breaking these contacts. The contacts involve Thr-50, Gln-54 and Asn-60 of subunit D that hydrogen bond with backbone atoms of Ala-247, Gly-283 and Gly-250 in subunit C of an adjacent tetramer. Similarly, subunit C makes identical contacts through its residues Thr-50, Gln-54 and Asn-60 with backbone atoms of Ala-247, Gly-283 and Gly-250 of subunit D in an adjacent tetramer inhibiting conformational adjustments. The conformational changes are nevertheless consistent with induced fit that involve the same region of homologous residues in the rabbit muscle aldolase (11) while the reduced conformational changes for subunits, C and D, indicates that the aldolase tetramer do not exhibit significant subunit cooperativity. The absence of significant conformational changes by all other active site residues corroborates the interpretation of a rigid active site that does not adapt to binding events except by large scale movement of secondary structures.

C-terminal region. In both crystal structures, additional electron density was visible beyond Asp-358 in the C-terminal region in two subunits, A and B, following active site binding and was interpreted in terms of the polypeptide sequence corresponding to 8 additional C-terminal residues (359-366) that is shown in Fig. 3. The remaining C-terminal residues 367-373, could not be confidently fitted into electron density map and were considered disordered. The majority of interactions by additional residues were made by C-terminal backbone and residues on the surface that included Ser-361 side chain with backbone amides of Glu-286 and Val-287, Leu-364 backbone amide with Gly-283 backbone carbonyl oxygen and Tyr-365

phenyl side chain stacking against Ala-247 while its hydroxyl interacts with Asp-203. Notable is hydrogen bonding by side chain of conserved Ser-363 with backbone amide of Tyr-365 that stabilizes a cyclic structure consisting of backbone atoms of two successive residues, Leu-364 and Tyr-365. The cyclic structure aligns the backbone amide of Leu-364 thus enabling hydrogen bonding with the carbonyl oxygen of Gly-283 further enhancing C-terminal region interaction with the subunit surface, shown in Fig. 4.

The interaction with Gly-283 is a direct consequence of the narrowing of the active site cleft provoked by ligand binding which flips the backbone conformation of Gly-282 due to Arg-313 interacting with the P₁-phosphate and displaces the carbonyl oxygen of Gly-283 by $1.42 \pm 0.15 \text{ \AA}$ from its position in the native enzyme. This positional displacement enables Gly-283 to hydrogen bond with Leu-364 and Tyr-365 backbone amides. The hydrogen bonding is synergistic with the interaction of Leu-364 whose side chain aligns itself against the hydrophobic portion of the Arg-313 side chain curled around the P₁-phosphate, as can be seen in Fig. 4. This interaction which depends on P₁-phosphate binding buries an additional 125 \AA^2 of solvent accessible surface representing an additional 2.5-4.3 kcal/mole of solvation energy (39). As Arg-313 and Leu-364 are disordered in the native structure, the entropic gain in the solvation energy may be slight and this estimate most likely represents an upper limit. Similar interaction patterns were found in the structures showing binding by FBP and MPB in rabbit muscle aldolase in subunit D.

The structural evidence thus points to the Arg-Leu hydrophobic interaction and the C-terminal backbone hydrogen bonding interaction with Gly-283 as

stabilizing active site attachment by the C-terminal region in the liganded structures. The multiple partner interaction further synergizes with Ser-363 hydrogen bonding through its γ -OH that structures the backbone conformation of adjacent Leu-364 and Tyr-365 residues enabling not only C-terminal attachment with Gly-283 on the subunit surface via Leu-364 backbone but also directing the Leu-364 side chain for interaction with Arg-313. In the remaining two subunits, C and D, crystal packing blocks the recruitment of C-terminal residues beyond residue Asp-358 even though all subunits were bound by ligands. Full occupancy of the P₁-phosphate binding site by both ligands in subunits C and D indicates that the C-terminal region is not required for active site binding. The ordering of a significant stretch of residues in the C-terminal region in subunits A and B alludes to C-terminal recruitment that is independent in each subunit and is not cooperative with respect to movement of other C-termini.

In a survey of 23 class I aldolase crystal structures determined from eukaryotic species, crystal packing invariably directs the orientation of the C-terminal region through interactions made with residues upstream in the C-terminal sequence (summarized in table II). There are two exceptions within the 23 structures. In the *L. mexicana* structures, the trajectories of the C-terminus of subunits A and B are more than 10Å from adjacent tetramers thus minimizing any potential bias with regards to stabilization of the C-terminus region conformation by crystal contacts. In two subunits of native *Drosophila* aldolase (10), the interaction with the subunit surface C-termini observed are however different from the liganded structures of *L. mexicana* aldolase as Gly-283 carbonyl oxygen (*L. mexicana* numbering) because it

is not displaced in the native structure for Gly-283 does not form a hydrogen bond with Leu-365 backbone amide. Rather the subunit surface interaction is stabilized by hydrogen bond formation between the guanidinium moiety of Arg-313 and the backbone carbonyl of Leu-365 and a Van der Waals close contact between the same guanidinium moiety and Leu-365 side chain. In the other two subunits, these interactions between Arg-313 and Leu-365 do not occur as the C-terminal region has shifted presumably as a result of crystal contacts that are made by these C-termini. The resultant trajectories are similar for all four C-termini in *Drosophila* aldolase with the terminal residues occluding the active site (10). The C-terminal conformation stabilized by interaction of the Arg-313 guanidinium moiety with Leu-365 would however be destabilized upon P_1 -phosphate binding. P_1 -phosphate binding requires the Arg-313 side chain to adopt a curled instead of extended conformation in order to grasp the phosphate oxyanion and thereby breaking the interaction observed in the native state. The P_1 -phosphate binding event in *Drosophila* aldolase would serve an additional function of releasing the C-terminal region trapped in a catalytically incompetent conformation (10) prior to its recruitment in a competent conformation for proton exchange.

C-terminal recruitment. The Ser-Leu dyad (residues 363-364 in *L. mexicana* aldolase) and the Gly-Gly dyad (residues 282-283) are conserved in currently known class I aldolases (24). Their role in recruitment necessitates attachment by the P_1 -phosphate whose binding locus is also conserved including that of Arg-313 whose side chain curls to grasp the P_1 -phosphate. Although other C-terminal residues engage in binding with the subunit surface upon ligand attachment, these are not

conserved and do not move upon P_1 -phosphate binding events. Their interaction suggests a cooperative recruitment mechanism in which P_1 -phosphate binding promotes the interaction of the C-terminal with conserved residues. The C-terminus is then stabilized by interactions with additional non-conserved residues. The dependence of P_1 -phosphate binding on interaction partners completely conserved at the level of amino acid sequence or interactions between conserved residues and backbone atoms of the polypeptide chain points to a recruitment mechanism that is a general feature of class I aldolase catalysis. Interestingly, the Gly-Gly dyad is an evolutionarily conserved motif found in a superfamily of phosphate-binding β -barrels (40). Even though the P_1 - and P_2 -phosphate sites overlap, binding solely by phosphate does not trigger the active site recruitment of the C-terminal region. Only occupancy of the P_1 -phosphate by substrate or phosphorylated analogue satisfies the structural requirement whereby the side chain of Arg-313 can curl around the phosphate oxyanion. In the unbound form, Arg-313 is mobile and juts outwards to the solvent and the energetic penalty of its desolvation is unfavourable for stable interaction with the C-terminal region.

By anchoring the C-terminal region at the active site periphery, the interaction reduces configurational entropy or degrees of freedom. This serves as a hinge for more precise delivery of the remaining C-terminal residues (366-373) into the active site cleft, following substrate cleavage. Reduction in configurational entropy by immobilization of the substrate in an active site increases effective concentration of substrate competent for catalysis and can accelerate a reaction by many orders of magnitude (41). In this context, C-terminal recruitment by substrate

prior to catalysis would reduce the consequent loss of entropy occurring during proton exchange due to active site docking. The reduction in proton exchange by mutation of the conserved leucine (22) to alanine argues that loss of the Arg-Leu side chain interaction reduces catalytic efficiency. This is consistent with the notion of enhanced configurational entropy in the substrate bound state that raises the height of transition state barrier for proton transfer.

By directing the interaction of the C-terminal residues with the active site, the molecular hinge promotes efficient proton exchange by increasing the effective concentration of the conserved terminal tyrosine residue in the active site. Active site sequestration of the C-terminal region is consistent with increased resistance to carboxypeptidase A degradation of the C-terminus in all aldolases in the presence of dihydroxyacetone-P (22) through stabilization of the C-terminal tyrosine residue in the active site cleft affords greater protection against proteolysis. Although the sequence of the C-terminal region (residues 367-372) is variable among species, the number of residues between the Ser-Leu dyad and terminal tyrosine are constant (6 residues) in all class I aldolases. The most parsimonious interpretation is that participation by Tyr-373 in proton exchange requires sufficient number of residues to reach the enamine from the Ser-Leu dyad. This interpretation is consistent with conserved reaction geometries in class I aldolases, that of a fixed distance between the P₁-phosphate and the exchangeable 3(S) hydrogen of the C₃ carbon in the enamine. Active site interactions involving primarily conserved residues and backbone atoms of nonhomologous residues from the penultimate C-terminal region, such as observed with backbone atoms of residues 364-365, would be consistent with

a constant number of intervening residues in all aldolases and which would not be subject to significant evolutionary pressure regarding sequence consensus. The sequential mechanism of C-terminal binding events indicate that the C-terminal region is not recruited to the active site anchor in the native enzyme thereby minimizing interference with substrate binding.

Acknowledgements. Research was supported by funding from National Science and Engineering Research Council (Canada) and Canadian Institutes for Health Research. Work was carried out in part at the National Synchrotron Light Source, Brookhaven National Laboratory, which is supported by the U.S. Department of Energy, Division of Materials Sciences and Division of Chemical Sciences under contract number DE-AC02-98CH10886. We also wish to thank Dr Paul Michels and Nathalie Chevalier at the Research Unit for Tropical Diseases, University of Louvain for furnishing the expression plasmid PET15b containing the *L mexicana* aldolase gene.

DATA DEPOSITION: *The atomic coordinates and structure factors (entry code xxxx for native aldolase, yyyy for the covalently bound FBP, and zzzz for the non-covalent MBP complex) have been deposited in the Protein Data Bank, Research Collaboratory for Structural Bioinformatics, Rutgers University, New Brunswick, NJ (<http://www.rcsb.org/>)*

References

- 1 Meyerhof, O., Lohmann, K., and Sehuster, P. H. (1936) *Biochem. Z.* **236**, 301-319.
- 2 Grazi, E., Rowley, P.T., Chang, T., Tchola, O., and Horecker, B.L. (1962) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **9**, 38-43.
- 3 Rose, I.A., and Rieder, S.V. (1958) *J. Biol. Chem.* **231**, 315-329
- 4 Sygusch, J. Beaudry, D., and Allaire, M. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 7846-7850
- 5 Gamblin, S.J., Cooper, B., Millar, J.R., Davies, G.J., Littlechild, J.A., and Watson, H.C. (1990) *FEBS Lett.* **262**, 282-286.
- 6 Dalby A.R., Tolan D.R., and Littlechild J.A. (2001) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **57**,1526-1533.
- 7 Arakaki T.L., Pezza J.A., Cronin M.A., Hopkins C.E., Zimmer D.B., Tolan D.R., and Allen K.N. (2004) *Protein Sci* **13**, 3077-3084.
- 8 Chudzik, D.M., Michels, P.A., de Walque, S., and Hol, W.G. (2000) *J Mol Biol.* **300**, 697-707.
- 9 Kim, H., Certa, U., Dobeli, H., Jakob, P., and Hol, W.G. (1998) *Biochemistry* **37**, 4388-4396.
- 10 Hester, G., Brenner-Holzach, O., Rossi, F. A., Struck-Donatz, M., Winterhalter, K. H., Smit, J.D., and Piontek, K. (1991) *FEBS Lett.* **292**, 237-242.
- 11 St-Jean M, Lafrance-Vanasse J, Liotard B, and Sygusch J. (2005) *J Biol Chem.* **280**, 27262-70.
- 12 Maurady, A., Zdanov, A., de Moissac, D., Beaudry, D., and Sygusch, J. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 9474-9483.
- 13 Lai, C.Y., Tchola, O., Cheng, T., and Horecker, B.L. (1965) *J. Biol. Chem.* **240**, 1347-1350.
- 14 Morris, A.J., and Tolan, D.R. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 1095-1100.
- 15 Morris, A.J., and Tolan, D.R. (1994) *Biochemistry* **33**, 12291-12297.
- 16 Blonski, C., de Moissac, D., Perie, J., and Sygusch, J. (1997) *Biochem. J.* **323**, 71-77.
- 17 Morris, A.J., Davenport, R.C., and Tolan, D.R. (1996) *Protein Eng.* **9**, 61-67.
- 18 Blom N., and Sygusch J. (1997) *Nat Struct Biol.* **4**, 36-9.
- 19 Drechsler E.R., Boyer P.D, and Kowalsky A.G. (1959) *J Biol Chem.* **234**, 2627-2634.
- 20 Rose, I.A., O'Connell, E.L., and Mehler, A.H. (1965) *J. Biol. Chem.* **240**, 1758-65.
- 21 Berthiaume, L., Tolan, D.R., and Sygusch, J. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 10826-35.
- 22 Berthiaume L., Loisel T. P., and Sygusch, J. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 17099-105.
- 23 de Walque, S., Opperdoes, F.R., and Michels, P.A. (1999) *Mol Biochem Parasitol* **103**, 279-283.

-
- 24 Hannaert, V., Bringaud, F., Opperdoes, F.R., and Michels, P.A. (2003) *Kinetoplastid Biol Dis*, **2**, 11-41.
- 25 Remme, J.H.F., Blas, E., Chitsulo, L., Desjeux, P.M.P., Engers, H.D., Kanyok, T.P., Kayondo, J.F., Kioy, D.W., Kumaraswami, V., Lazdins, J.K., Nunn, P.P., Oduola, A., Ridley, R.G., Toure, Y.T., Zicker, F., Morel, C.M. (2002) *Trends Microbiol* **10**, 435-440.
- 26 Tielens, A.G., Van Hellemond, J.J. (1998) *Parasitol. Today* **14**, 265-272.
- 27 Verlinde, C.L., Hannaert, V., Blonski, C., Willson, M., Perie, J.J., Fothergill-Gilmore, L.A., Opperdoes, F.R., Gelb, M.H., Hol, W.G., and Michels, P.A. (2001) *Drug Resist Updat* **4**, 50-65.
- 28 WHO. (2004) *World Health Report 2004: Changing history*, World Health Organization, Geneva.
- 29 Ginsburg, A., and Mehler, A.H. (1966) *Biochemistry* **5**, 2623-2634.
- 30 DeLano, W.L. (2002) *The PyMOL Molecular Graphics System*, DeLano Scientific, Palo Alto, CA, USA. <http://www.pymol>.
- 31 Baker, N.A., Sept, D., Joseph, S., Holst, M.J., and McCammon, J.A. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 10037-10041.
- 32 Otwinowski, Z., and Minor, W. (1997) *Methods Enzymol.* **276**, 307-326.
- 33 Brunger, A.T., Adams, P.D., Clore, G. M., DeLano, W.L., Gros, P., Grosse Kunstleve, R.W., Jiang, J.-S., Kuszewski, J., Nilges, N., Pannu, N.S., Read R.J., Rice, L.M., Simonson, T., and Warren, G.L. (1998) *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **54**, 905-921.
- 34 Jones, T.A., Zou, J.Y., Cowan, S.W., and Kjeldgaard, M. (1991) *Acta Crystallogr. Sect. A* **47**, 110-119.
- 35 Schuttelkopf, A.W., and van Aalten, D.M. (2004) *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **60**, 1355-1363.
- 36 Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S., and Thornton, J.M. (1993) *J. Appl. Crystallogr.* **26**, 283-291.
- 37 Richards, F.M. and Kundrot, C.E. (1988) *Proteins* **3**, 71-84.
- 38 Diamond, R. (1992) *Protein Sci.* **1**, 1279-1287.
- 39 Sharp, K.A., Nicholls, A., Fine, R.F., and Honig, B. (1991) *Science* **252**, 106-109.
40. Copley, R.R., and Bork, P. (2000) *J. Mol. Biol.* **303**, 627-640.
- 41 Page, M.I., and Jencks, W.P. (1971) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **68**, 1678-83.

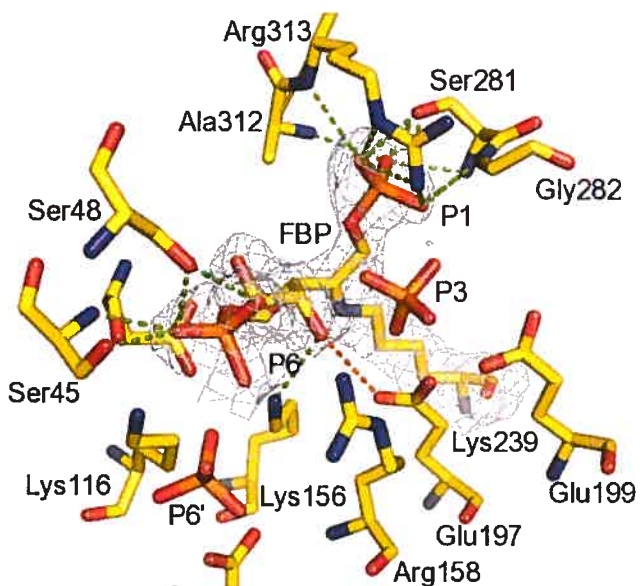


Fig. 1. Electron density map of the Schiff base intermediate trapped in the active site of *L. mexicana* aldolase. Difference electron density was calculated from a 2.2-Å annealed $F_o - F_c$ omit map encompassing Lys-239 and FBP and contoured at 3.5σ . The continuous electron density is consistent with a trapped Schiff base that is covalently bound to Lys-239 in all subunits. The *green dashes* illustrate hydrogen bonds and *orange dash* indicates close contact between Glu-197 and the C₄ hydroxyl of FBP. The orientation corresponds to a view roughly parallel to the subunit β -barrel axis and looking down into the β -barrel from the carboxyl ends of the β -strands.

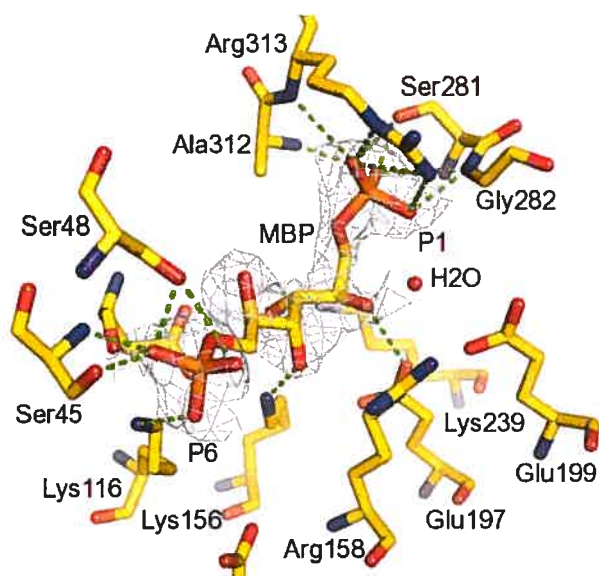


Fig. 2. **Electron density map of MBP bound in the active site of *L. mexicana* aldolase.**

Difference electron density was calculated from a 2.2-Å annealed $F_o - F_c$ omit map encompassing MBP and contoured at 2.5σ . The ligand is present in all subunits. The MBP mode of attachment is stabilized as observed for the Schiff base intermediate. *Green dashes* illustrate hydrogen bonds. The orientation is the same as in Fig. 1.

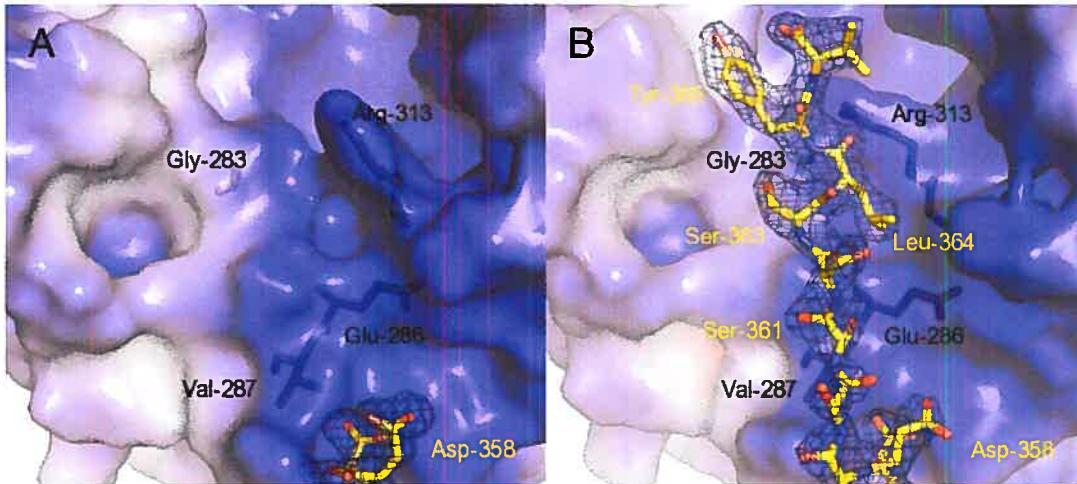


Fig. 3. C-terminal residues 359-366 of the aldolase are recruited upon ligand binding. Ionic surface potential representation showing **A)** native aldolase and **B)** MBP-bound aldolase structures in the vicinity of the C-terminal region. Difference electron density was calculated from a 2.2-Å annealed $F_o - F_c$ omit map contoured at 3.5σ encompassing the C-terminal residues 357-358 from native structure and residues 357-366, from the MBP structure. The latter sequence of the C-terminal region is visible in subunits A and B, while in C and D it is not visible beyond residue 358 as was observed in the native structure. A similar electron density map corresponding to C-terminal residues 357-366 was observed in the structure of the Schiff base intermediate. The subunit surface potentials were calculated using APBS and the scale ranges -5 to 5 on the solvent accessible surface. Blue represents positively charge surface while white is a neutral surface (red is negative, absent from this picture). The C-terminal residues are labelled in yellow and the interacting residues on the subunit surface are labelled in black. The orientation is approximately perpendicular to the axis of the subunit β -barrel, slightly tilted towards the active site, whose periphery is situated in the upper side of the figure near Arg-313.

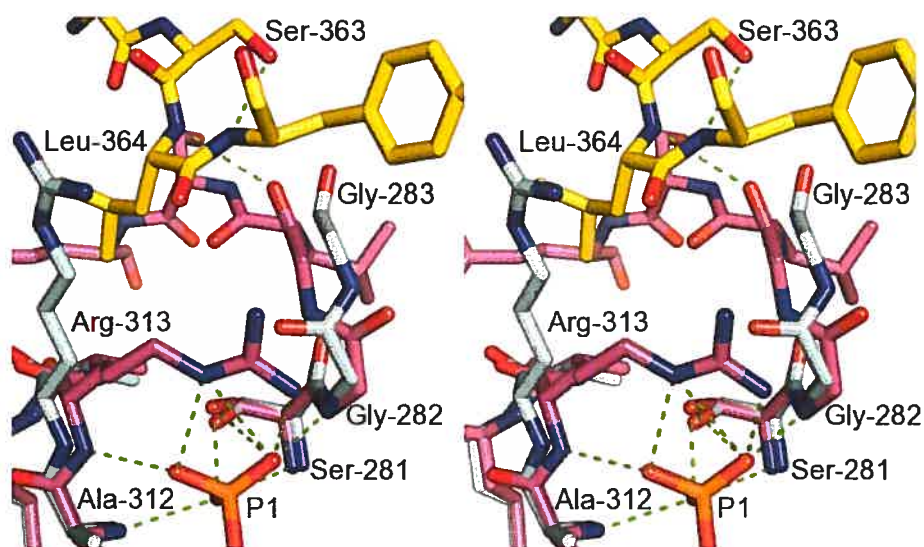


Fig. 4. Binding in the P_1 phosphate site is responsible for the recruitment of the C-terminal tail to the active site. Stereo representation illustrating the region binding the P_1 -phosphate at the active site periphery of native aldolase (cyan) and MBP (magenta) bound aldolase. The C-terminus in the MBP bound structure is shown in yellow and is identical to the binding mode observed in the Schiff base intermediate formed with FBP. The *green dashes* illustrate hydrogen bonds. The orientation of the figure is perpendicular to the axis of the subunit β -barrel.

TABLE I. DATA COLLECTION AND REFINEMENT STATISTICS

	Native	FBP	MBP
Data collection			
Resolution (Å)	50-1.71 (1.79-1.71)*	50 -2.2 (2.31 -2.2)*	50-2.14 (2.25-2.14)*
Wavelength (Å)	1.1	1.1	1.1
Reflections			
Observed	3509740	2824392	3841275
Unique	154162	69046	87658
Completeness (%)	98.4 (81.7)	90.9 (71.6)	97.7 (77.2)
Average I/σ(I)	28.6 (2.26)	18.2 (2.68)	12.6 (2.5)
R _{sym} [†]	0.080 (0.525)	0.081 (0.392)	0.080 (0.425)
Space group	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Unit cell parameters			
a (Å), b (Å), c (Å)	85.8, 117.3, 160.2	85.1, 117.1, 161.8	85.1, 116.0, 161.7
Refinement			
Number of atoms			
Protein	11075	11188	11188
Water	2032	1714	1730
Hetero	54	116	80
σ cutoff; I / σ(I) >	1	1	1
R _{cryst} (%) [‡]	0.173	0.185	0.190
R _{free} (%) [§]	0.203	0.238	0.235
rms deviation			
Bond length (Å)	0.005	0.006	0.006
Bond angle (°)	1.376	1.367	1.253
< B > (Å ²)	25.1	42.2	35.4
Ramachandran analysis[¶]			
(%)			
Most favourable	93.4	91.2	92.5
Allowed	6.6	8.8	7.5
Generously allowed	0	0	0
Luzzati plot (Å)	0.18	0.26	0.24
Intersubunit variability (Å)	0.18	0.18	0.16

*All values in parentheses are given for the highest resolution shell

[†]R_{sym} = $\frac{\sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - I_c(hkl)|}{\sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)}$ with *i* running over number of independent observations of reflection *hkl*.

[‡]R_{cryst} = $\frac{\sum_{hkl} ||I_o(hkl)| - |I_c(hkl)||}{\sum_{hkl} I_o(hkl)}$.

[§]R_{free} = $\frac{\sum_{hkl \in T} ||I_o(hkl)| - |I_c(hkl)||}{\sum_{hkl \in T} I_o(hkl)}$, where T is a test data set randomly selected from the observed reflections prior to refinement. Test data set was not used throughout refinement and contained 5%, the total unique reflections.

[¶]Analyzed by PROCHECK.

TABLE II. Intermolecular interactions of the oriented C-terminal tail of aldolases from different species

PDB ID	Number of subunits oriented towards the active site	Mean number of intermolecular interactions by subunit [†]
1FBA	4 out of 4	14 [§]
1ZAH	1 out of 4	1
1ZAI	1 out of 4	4
1ZAJ	1 out of 4	3
1ZAL	1 out of 4	4
2ALD	1 out of 1	7
4ALD	1 out of 1	5
1QO5	8 out of 18	5
1ADO	1 out of 4	10
1ALD	1 out of 1	9
1EWD	4 out of 4	11
1EWE	4 out of 4	7
1EWG	4 out of 4	10
1EX5	4 out of 4	13
1FDJ	3 out of 4	10
1A5C	4 out of 4 [‡]	1
1EPX	4 out of 4 [‡]	0 or 2 [¶]

* The table excludes aldolases structures which do not show any C-terminal residues: 1XDM, 1F2J, 6ALD, 1J4E, 1XDL, 1XFB

[†] Includes: ionic interactions, hydrogen-bonds, hydrophobic interactions and interactions through a water molecule. Excludes the subunits that are not oriented towards the active site. Rounded to the lower value.

[‡] Not enough residues to show a direction (only 3 residues).

[§] Two out of 4 subunits are not stabilized by any intermolecular interactions, the mean number was calculated on the two other subunits.

[¶] Only subunit C shows contacts at the beginning of the C-terminal tail.

Chapitre 3: Discussion

Dans le présent mémoire, nous avons pu résoudre les structures de la fructose-1,6-biphosphate aldolase de *L. mexicana* liée au substrat FBP et à l'inhibiteur MBP et nous avons amélioré la structure existante de l'enzyme native. Ces structures permettent de corroborer le modèle de liaison du substrat et le mécanisme catalytique apportés par les structures équivalentes chez l'aldolase de muscle de lapin [91].

La structure liée au FBP représente l'intermédiaire base de Schiff formée par le lien covalent de la lysine catalytique (Lys-239 chez *L. mexicana*) avec le substrat. Cette structure montre une géométrie de réaction qui favorise le modèle où le résidu Glu-187 (Glu-197 chez *L. mexicana*) est l'acide qui retire un proton de l'hydroxyle en C₄ pour cliver le lien C₃-C₄. Dans notre structure, sa position et son orientation est dirigée vers l'hydroxyle du C₄. Selon ce même modèle, la Lys-146 (Lys-156 chez *L. mexicana*) stabilise la charge négative qui est créée sur l'hydroxyle du C₄ par l'état de transition, ce qui est également vrai dans notre structure. Ceci corrobore également certaines expériences de mutagenèse dirigée effectuées sur l'enzyme de muscle de lapin [106,107]. Asp-43 (Asp-33 chez le lapin) n'est pas du tout en position d'effectuer cette réaction, se situant à l'opposée de l'hydroxyle, contrairement à l'autre modèle. Nous ne proposons toutefois aucun modèle venant

expliquer son rôle qui informerait pourquoi ce résidu est nécessaire à la réaction [102], la seule stabilisation des hydroxyles du ligand étant une explication insuffisante.

La structure liée au MBP imite l'intermédiaire carbinolamine du mécanisme réactionnel, à cause de la géométrie tétraédrique du carbone C_2 , propre à l'hybridation sp^3 . Ceci vient une fois de plus supporter le rôle de Glu-187, qui effectue le transfert de proton de l'intermédiaire carbinolamine, puisque son équivalent chez le parasite fait un pont-hydrogène avec l'hydroxyle du C_2 . De plus, le HBP étant un mélange racémique de MBP et de GBP, il a été possible de ne voir que le MBP dans la structure, ce qui permet de dire que c'est le MBP qui inhibe réellement l'enzyme. Le K_i de l'inhibiteur pourrait ainsi être amélioré en synthétisant stéréospécifiquement le MBP.

Les deux structures, FBP comme MBP, ont un mode de liaison semblable quant à la stabilisation des phosphates. Le phosphate P_1 , lié au carbone C_1 , est stabilisé par les chaînes latérales de Ser-271 et Arg-313 et par les atomes des chaînes principales de Gly-272, Gly-312 et Arg-313. Le phosphate P_6 est beaucoup moins stabilisé, ne l'étant que par les chaînes latérales de Ser-45, Ser-48 et Lys-116. Toutefois, cette dernière liaison est aidée par un ajustement induit de la région 43-61 qui est la seule partie qui montre une grande mobilité lors de la liaison des substrats. Le site actif est donc assez rigide et ne s'adapte que par le mouvement de cette région.

Ainsi, même si *L. mexicana* et le lapin sont des espèces eucaryotes qui ont divergé lors de l'évolution, le mode de liaison et le mécanisme catalytique de leur aldolase sont très semblables, voire même identiques. Donc, chez les eucaryotes, l'aldolase aurait très peu évolué. Il n'y aurait donc aucun avantage évolutif à avoir une glycolyse dont l'aldolase a plus d'affinité pour le FBP ou qui catalyse la réaction plus rapidement. Elle se trouve dans une dans une voie métabolique qui fonctionne bien et qui n'a pas besoin d'être améliorée [131].

La comparaison des sites actifs de l'aldolase de *L. mexicana* et de l'aldolase de muscle de lapin ont permis d'observer la similarité des deux enzymes. Les résidus liant les phosphates et ceux stabilisant le reste du ligand sont les mêmes. Les valeurs de rmsd sont aussi très faibles et les graphiques de différence de distance des C_{α} ne montrent que de faibles variations, dans les boucles des enzymes. Cette conservation du mode de liaison n'est pas surprenante, puisque les résidus du site actif, sauf à un exemple près, sont conservés chez toutes les aldolases d'eucaryotes. Au contraire de l'hypothèse proposée, le résidu Ala-312 ne fait pas bouger le site de liaison du phosphate P_1 c'est plutôt ce résidu qui bouge légèrement hors du site actif pour accueillir le phosphate. Les interactions avec les résidus avoisinants (chaîne latérale et principale de Arg-313 et avec la chaîne principale de Ala-312) sont beaucoup trop importantes dans le maintien de la force de la liaison aux substrats. Leur absence aurait des conséquences dramatiques pour l'affinité de l'enzyme pour ceux-ci. D'ailleurs, le résidu Ala-312 est situé dans une boucle entre le feuillet- β 8 et

l'hélice- α 8, ce qui explique cette mobilité. Il nous est par contre impossible de spéculer sur son rôle, cette question nécessitant plus d'études pour le comprendre, si rôle il y a.

Malgré ce manque de différences au niveau du site actif des enzymes de mammifère et parasite, des études supplémentaires, incluant entre autres la dynamique des enzymes, sont nécessaires afin de conclure ou non s'il existe des différences exploitables pour la synthèse d'inhibiteurs sélectifs. Tout récemment, un inhibiteur sélectif aux aldolases de parasites a été synthétisé [128]. Cet inhibiteur compétitif et irréversible, l'hydroxynaphtaldéhyde phosphate, agit au site actif de l'enzyme. La Lys-116 (Lys-107 chez les mammifères) attaque l'inhibiteur pour former une base de Schiff, d'où son irréversibilité. Or, par des simulation par dynamique moléculaire, la géométrie des résidus par rapport à l'inhibiteur permettant l'attaque de cette lysine n'était jamais favorable à l'attaque pour l'aldolase de muscle de lapin, alors que c'était le cas pour l'aldolase de *T. brucei*. Le méthyle supplémentaire du résidu Ala-312 a toutefois été écarté des hypothèses menant à cette différence géométrique. Ainsi, la structure seule ne peut nous informer de toutes les différences pouvant être exploitées. Toutefois, les structures d'intermédiaires réactionnels obtenues au cours du présent projet pourront aider à augmenter la précision des autres analyses pouvant être faites.

Nous avons pu observer le comportement de la partie C-terminale de l'aldolase en présence de substrat, passant d'un état désorganisé et non-visible dans la structure native à

un état organisé et visible, près du site actif, lors de la liaison des substrats. Nous proposons donc un modèle où la liaison du substrat est suivie d'un recrutement de la région C-terminale vers le site actif. À l'inverse, il ne serait pas possible de dire que c'est la liaison de la région C-terminale vers le site actif qui favorise la liaison du substrat. En effet, dans les sous-unités où la région C-terminale n'est pas visible, les ligands sont tout de même présents. Deux événements peuvent être rattachés à la liaison du substrat qui provoquerait le recrutement de la région C-terminale. D'abord, le repliement complet de la chaîne latérale du résidu Arg-313 vers le site actif stabilise le phosphate P_1 . L'interface entre Leu-364 et Arg-313 est une liaison hydrophobique qui ne peut être faite que lorsque le résidu Arg-313 lie un phosphate. Cette liaison est également orientée par le résidu Ser-363, qui dirige la leucine grâce à un pont hydrogène. De plus, le mouvement de l'oxygène du carbonyle de Gly-283, causé par le pivot de la chaîne principale du résidu Gly-282 suite à la liaison du substrat, permet de former un pont hydrogène avec le résidu Leu-364. L'importance de ces interactions est confirmée par le fait que la dyade sérine-leucine est conservée chez toutes les aldolases de classe I d'eucaryotes, tout comme la dyade Gly-282 Gly-283. De plus, leur mutation entraîne une diminution de l'activité chez l'aldolase [112]. Il est à noter que cette interaction devrait être la même pour le DHAP, puisque ce dernier possède également un phosphate en C_1 , qui est d'ailleurs commun à tous les substrats de l'aldolase.

Malgré cette preuve que la région C-terminale est recrutée au site actif, nous n'avons pu voir qu'une partie de celle-ci, les cinq derniers résidus étant toujours non-ordonnés.

Ceux-ci se trouvent deux résidus plus loin que le résidu Leu-364, qui agit ainsi comme ancre permettant à la tyrosine terminale de s'approcher du site actif. D'ailleurs, même si la longueur de toute la région C-terminale est variable entre les espèces, 18 résidus chez *L. mexicana* et 20 chez le lapin, la distance entre la tyrosine et la dyade est toujours de six résidus. Donc le rôle de cette ancre est non seulement d'apporter le résidu Tyr-373 au site actif, mais aussi de lui laisser la distance exacte qui sépare le phosphate P_1 du ligand au lieu de son action, le carbone C_3 . Le modèle proposé est donc le suivant: en l'absence de substrat, la région C-terminale est désordonnée et n'interagit pas avec le site actif, pour éviter l'interférence avec la liaison de substrat. Dès qu'une liaison a lieu, la région C-terminale est recrutée au site actif par la dyade Ser-363, Leu-364 qui interagit avec le résidu Arg-313. La tyrosine terminale est maintenant à proximité du site actif et elle est prête à agir.

Même si de cette conclusion, nous émettons un modèle qui s'applique aux aldolases de classe I possédant une région C-terminale avec une tyrosine terminale, donc une ressemblance commune chez tous les organismes, une cible potentielle pourrait quand même être peut-être exploitée. En effet, l'aldolase de mammifères possède un début de queue C-terminale très flexible, composé essentiellement de glycines et d'alanines. Ce même segment chez les parasites est constitué d'acides aminés plus volumineux et dont les chaînes latérales, acides, peuvent faire des interactions avec le reste de l'enzyme. De plus, cette partie est plus courte de deux acides aminés, la rendant encore plus rigide et

l'obligeant à longer la surface de l'enzyme. Ainsi, des différences marquées pourraient faire l'objet d'un ciblage précis pour la construction d'un inhibiteur. Cette hypothèse a déjà été émise dans le passé, à propos de l'aldolase de *Plasmodium falciparum* [23], responsable de la malaria, sans jamais être exploitée. En effet, les détails du fonctionnement de la queue C-terminale n'étant pas connus, il était impossible de déterminer précisément quel segment attaquer. Ainsi, pour avoir une inhibition sélective, il ne faut pas cibler l'ancre, commune, séquence comme le mode de liaison, chez toutes les aldolases de classe I. Il faut plutôt cibler le début de la queue C-terminale.

Finalement, y a-t-il d'autres différences qui pourraient être ciblées en vue d'une conception de drogue spécifique à l'aldolase de parasite? Certains pourraient croire que la présence de phosphates supplémentaires au site actif pourraient être une cible intéressante. Or, il n'en est rien, puisque nous considérons ces phosphates comme des artefacts attribuable au pH auquel les expériences ont été menées. Ce pH, 4.5, n'est pas du tout physiologique, il est donc impossible de croire que ces sites de liaison au phosphate seraient présents chez l'enzyme, dans les cellules. Toutefois, ces artefacts ne viennent pas compromettre notre compréhension de l'aldolase ni les comparaisons avec le lapin, les phosphates venant remplacer des molécules d'eau et donc ayant peu d'effet sur les résidus importants. D'autre part, le phosphate se trouvant dans l'interface entre les sous-unités, à plus de 23 Å du site actif, est plus intéressant. Sa présence chez l'enzyme native et son absence lors de la liaison au substrat invitent à émettre l'hypothèse d'un changement

allostérique. Toutefois, en l'absence de changements conformationnels dans cette région nous invitent à croire que non. De telles interactions de longue portée provoquant des modifications de l'activité enzymatique ont déjà été rapportées chez l'aldolase de muscle de lapin [132]. La modification d'une cystéine de surface, à plus de 25 Å du site actif, modulait l'activité de l'enzyme. Ainsi, serait-il possible de changer les comportements catalytiques grâce à ce site trouvé chez l'aldolase de *L. mexicana* ? Il faudra quand même faire d'autres expériences avant de conclure si ce site montre un intérêt quelconque.

En conclusion, la résolution des structures de la fructose-1,6-biphosphate aldolase de *Leishmania mexicana* liée au fructose-1,6-biphosphate et au mannitol—1,6-biphosphate nous ont d'abord permis de confirmer le mécanisme de l'aldolase, utilisant le résidu Glu-197 pour les premières étapes d'échange de protons. De plus la comparaison des enzymes avec leur équivalent du muscle de lapin n'a pas permis de trouver de différences importantes. Le seul résidu étant différent dans le site actif des deux aldolases, Ala-312, n'a aucun effet sur la liaison du substrat. D'autre part, nous proposons que la région C-terminale de l'enzyme des recrutée au site actif, grâce à la liaison du substrat, afin d'en approcher la tyrosine terminale pour son action d'échange de proton lors de la catalyse. Chez l'enzyme native, cette queue C-terminale ne serait pas recrutée au site actif pour éviter l'interférence avec la liaison du substrat.

Références

- 1 Claude Liebecq (1992) *Biochemical Nomenclature and Related Documents*, 2nd edition, Portland Press, 69p.
- 2 WHO. (2004) *The World Health Report 2004. Changing history*. World Health Organization, Geneva.
- 3 Remme JHF, Blas E, Chitsulo L, Desjeux PMP, Engers HD, Kanyok TP, Kayondo JF, Kioy DW, Kumaraswami V, Lazdins JK, Nunn PP, Oduola A, Ridley RG, Toure YT, Zicker F, Morel CM (2002) Strategic emphases for tropical diseases research: a TDR perspective. *Trends Microbiol*; **10**(10): 435–440.
- 4 Herwaldt BL (1999). Leishmaniasis. *Lancet*, **354**(9185): 1191–1199.
- 5 Murray CJL, Salomon JA, Mathers CD, Lopez AD (2002). *Summary measures of population health: concepts, ethics, measurement and applications*. WHO, Geneva.
- 6 Desjeux P (1996). Leishmaniasis. Public health aspects and control. *Clin Dermatol*; **14**: 417-23.
- 7 Wolday D, Berhe N, Akuffo H, Desjeux P, Britton S (2001). Emerging Leishmania/HIV co-infection in Africa. *Med Microbiol Immunol (Berl)*, **190**(1-2): 65–67.
- 8 Desjeux P, Alvar J. (2003). Leishmania/HIV co-infections: epi-demiology in Europe. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **97**(Suppl 1): 3–15.
- 9 Rosenthal E, Marty P, del Giudice P, Pradier C, Ceppi C, Gastaut JA, Le Fichoux Y, Cassuto JP (2000). HIV and Leishmania coinfection: a review of 91 cases with focus on atypical locations of Leishmania. *Clin Infect Dis*, **31**(4):1093–1095.

-
- 10 Lira R, Sundar S, Makharia A, Kenney R, Gam A, Saraiva E, Sacks D (1999). Evidence that the high incidence of treatment failures in Indian kala-azar is due to the emergence of antimony-resistant strains of *Leishmania donovani*. *J Infect Dis*, **180**(2):564–567.
- 11 Sundar, S (2004) Drug Trials, dans Report of the scientific working group on leishmaniasis *Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases*: 73p.
- 12 Wheeler DL, Chappey C, Lash AE, Leipe DD, Madden TL, Schuler GD, Tatusova TA, Rapp BA (2000). Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res*, **28**(1):10-4.
- 13 Cook GC, Zumla A, eds. (2003) *Manson's tropical disease*, 21st edn. London: Elsevier Science: 1323p.
- 14 De Souza W (2002). Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Curr Pharm Des*, **8**(4):269–285.
- 15 Dumas C, Ouellette M, Tovar J, Cunningham ML, Fairlamb AH, Tamar S, Olivier M, Papadopoulou B (1997). Disruption of the trypanothione reductase gene of *Leishmania* decreases its ability to survive oxidative stress in macrophages. *Embo J*, **16**(10):2590–2598.
- 16 Martyn DC, Jones DC, Fairlamb AH, Clardy J (2006). High-throughput screening affords novel and selective trypanothione reductase inhibitors with anti-trypanosomal activity. *Bioorg Med Chem Lett* [to be published, Epub ahead of print].
- 17 Roberts CW, McLeod R, Rice DW, Ginger M, Chance ML, Goad LJ (2003) Fatty acid and sterol metabolism: potential antimicrobial targets in apicomplexan and trypanosomatid parasitic protozoa. *Mol Biochem Parasitol*, **126**(2):129–142.

-
- 18 Sajid M, McKerrow JH (2002). Cysteine proteases of parasitic organisms. *Mol Biochem Parasitol*, **120**(1):1–21.
- 19 Gilbert IH (2002). Inhibitors of dihydrofolate reductase in Leishmania and trypanosomes. *Biochim Biophys Acta*, **1587**(2-3):249–257.
- 20 Muller S, Coombs GH, Walter RD (2001). Targeting polyamines of parasitic protozoa in chemotherapy. *Trends Parasitol*, **17**(5):242–249.
- 21 Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA (2005) *Medical microbiology 5th edition*. Elsevier, 963p.
- 22 Vannier-Santos MA, Martiny A, de Souza W (2002). Cell biology of Leishmania spp.: invading and evading. *Curr Pharm Des*, **8**(4):297–318.
- 23 Alexander J, Vickerman K (1975). Fusion of host cell secondary lysosomes with the parasitophorous vacuoles of Leishmania mexicana-infected macrophages. *J Protozool*, **22**(4):502–508.
- 24 Matthews KR (2005). The developmental cell biology of Trypanosoma brucei. *J Cell Sci*, **118** (Pt2):283–290.
- 25 Bringaud F, Riviere L, Coustou V (2006). Energy metabolism of trypanosomatids: adaptation to available carbon sources. *Mol Biochem Parasitol*, **149**(1):1–9.
- 26 Opperdoes, F.R. ; Borst, P. (1977). Localization of nine glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in *Trypanosoma brucei*: the glycosome. *FEBS Lett*, **80** , pp. 360–364.

-
- 27 D.T. Hart and F.R. Opperdoes, The occurrence of glycosomes (microbodies) in the promastigote stage of four major *Leishmania* species. *Mol Biochem Parasitol*, **13** (1984), pp. 159–172.
- 28 Fairlamb, A.H. and Opperdoes, F.R. (1986). *Carbohydrate Metabolism in Cultured Cells*, Plenum Press 224p.
- 29 Bienen, E.J., Webster, P. and Fish, W.R. (1991). Trypanosoma (Nannomonas) congolense: changes in respiratory metabolism during the life cycle. *Exp. Parasitol.* **73**, 403–412.
- 30 van Weelden SWH, Fast B, Vogt A, van der Meer P, Saas J, van Hellemond JJ, Tielens AGM, Boshart M (2003). Procyclic Trypanosoma brucei do not use Krebs cycle activity for energy generation. *J Biol Chem*, **278**(15):12854-12863.
- 31 van Weelden SWH, van Hellemond JJ, Opperdoes FR, Tielens AGM (2005). New functions for parts of the Krebs cycle in procyclic Trypanosoma brucei, a cycle not operating as a cycle. *J Biol Chem*, **280**(13):12451-12460.
- 32 Van Hellemond, J.J., Opperdoes, F.R. and Tielens, A.G.M. (1998). Trypanosomatidae produce acetate via a mitochondrial acetate:succinate CoA-transferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **95**, 3036–3041.
- 33 Hart DT, Coombs GH (1982). *Leishmania mexicana*: energy metabolism of amastigotes and promastigotes. *Exp Parasitol* **54**(3):397–409.
- 34 Clayton CE, Michels P (1996). Metabolic compartmentation in African trypanosomes. *Parasitol Today* **12**(12):465-471.

-
- 35 Burchmore RJ, Barrett MP (2001). Life in vacuoles--nutrient acquisition by *Leishmania* amastigotes. *Int J Parasitol* **31**(12):1311–1320.
- 36 Cazzulo JJ (1992). Aerobic fermentation of glucose by trypanosomatids. *Faseb J* **6**(13):3153–3161.
- 37 Tielens AG, Van Hellemond JJ (1998). Differences in energy metabolism between trypanosomatidae. *Parasitol Today* **14**(7):265–272.
- 38 Burchmore RJS, Rodriguez-Contreras D, McBride K, Merkel P, Barrett MP, Modi G, Sacks D, Landfear SM (2003). Genetic characterization of glucose transporter function in *Leishmania mexicana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(7):3901–3906.
- 39 Verlinde CL, Hannaert V, Blonski C, Willson M, Perie JJ, Fothergill-Gilmore LA, Opperdoes FR, Gelb MH, Hol WG, Michels PA (2001). Glycolysis as a target for the design of new anti-trypanosome drugs. *Drug Resist Updat* **4**(1):50-65.
- 40 Parsons M, Furuya T, Pal S, Kessler P (2001). Biogenesis and function of peroxisomes and glycosomes. *Mol Biochem Parasitol* **115**(1):19-28.
- 41 Wiemer EA, IJlst L, van Roy J, Wanders RJ, Opperdoes FR (1996). Identification of 2-enoyl coenzyme A hydratase and NADP(+)-dependent 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase activity in glycosomes of procyclic *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* **82**(1):107-111.
- 42 Shih S, Hwang HY, Carter D, Stenberg P, Ullman B (1998). Localization and targeting of the *Leishmania donovani* hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase to the glycosome. *J Biol Chem* **273**(3):1534-1541.

-
- 43 Heise N, Opperdoes FR (1997). The dihydroxyacetonephosphate pathway for biosynthesis of ether lipids in *Leishmania mexicana* promastigotes. *Mol Biochem Parasitol* **89**(1):61-72.
- 44 Zomer AW, Opperdoes FR, van den Bosch H (1995). Alkyl dihydroxyacetone phosphate synthase in glycosomes of *Trypanosoma brucei*. *Biochim Biophys Acta* **1257**(2):167-173.
- 45 Bakker, B.M., Mensonides, F.I., Teusink, B., van Hoek, P., Michels, P.A., and Westerhoff, H.V. (2000). Compartmentation protects trypanosomes from the dangerous design of glycolysis. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 2087–2092.
- 46 Hannaert V, Bringaud F, Opperdoes FR, Michels PA (2003). Evolution of energy metabolism and its compartmentation in Kinetoplastida. *Kinetoplastid Biol Dis* **2**(1):11.
- 47 Helfert, S., Estevez, A.M., Bakker, B., Michels, P., and Clayton, C. (2001). Roles of triosephosphate isomerase and aerobic metabolism in *Trypanosoma brucei*. *Biochem J* **357**: 117–125.
- 48 Michels PA (1988). Compartmentation of glycolysis in trypanosomes: a potential target for new trypanocidal drugs. *Biol Cell* **64**(2):157-164 .
- 49 Distel, B., Erdmann, R., Gould, S.J., Blobel, G., Crane, D.I., Cregg, J.M., Dodt, G., Fujiki, Y., Goodman, J.M., Just, W.W., Kiel, J.A., Kunau, W.H., Lazarow, P.B., Mannaerts, G.P., Moser, H.W., Osumi, T., Rachubinski, R.A., Roscher, A., Subramani, S., Tabak, H.F., Tsukamoto, T., Valle, D., Van der Klei, I., Van Veldhoven, P.P. and Veenhuis, M. (1996). A unified nomenclature for peroxisome biogenesis factors. *J. Cell Biol.* **135**, 1–3.

-
- 50 Krazy H, Michels PAM (2006). Identification and characterization of three peroxins--PEX6, PEX10 and PEX12--involved in glycosome biogenesis in *Trypanosoma brucei*. *Biochim Biophys Acta* **1763**(1):6–17.
- 51 Blattner, J., Helfert, S., Michels, P. and Clayton, C. (1998). Compartmentation of phosphoglycerate kinase in *Trypanosoma brucei* plays a critical role in parasite energy metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 11596–11600.
- 52 Lorenz P, Maier AG, Baumgart E, Erdmann R, Clayton C. Elongation and clustering of glycosomes in *Trypanosoma brucei* overexpressing the glycosomal Pex1 1p. *EMBO J* 1998; **17**: 3542–3555.
- 53 De Walque S, Kiel JAKW, Veenhuis M, Opperdoes FR, Michels PAM. Cloning and analysis of the PTS-1 receptor in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 1999; **104**: 107–119.
- 54 Moyersoan J, Choe J, Fan E, Hol WGJ, Michels PAM. (2004). Biogenesis of peroxisomes and glycosomes: trypanosomatid glycosome assembly is a promising new drug target. *FEMS Microbiol Rev* **28**(5):603–643.
- 55 Seyfang, A. and Duszenko, M. (1991). Specificity of glucose transport in *Trypanosoma brucei*. Effective inhibition by phloretin and cytochalasin B. *Eur. J. Biochem.* **202**, 191–196.
- 56 Bringaud F, Baltz T (1993). Differential regulation of two distinct families of glucose transporter genes in *Trypanosoma brucei*. *Mol Cell Biol* **13**(2):1146–1154.
- 57 Azema L, Claustre S, Alric I, Blonski C, Willson M, Perie J, Baltz T, Tetaud E, Bringaud F, Cottem D, Opperdoes FR, Barrett MP (2004). Interaction of substituted

-
- hexose analogues with the *Trypanosoma brucei* hexose transporter. *Biochem Pharmacol* **67**(3):459–467.
- 58 M.P. Barrett, E. Tetaud, A. Seyfang, F. Bringaud and T. Baltz, Functional expression and characterization of the *Trypanosoma brucei* procyclic glucose transporter, THT2. *Biochem J* **321** (1995)., pp. 687–691.
- 59 Bakker BM, Michels PA, Opperdoes FR, Westerhoff HV (1999). What controls glycolysis in bloodstream form *Trypanosoma brucei*? *J Biol Chem* **274**(21):14551–14559.
- 60 Bakker BM, Westerhoff HV, Opperdoes FR, Michels PA (2000) Metabolic control analysis of glycolysis in trypanosomes as an approach to improve selectivity and effectiveness of drugs. *Mol Biochem Parasitol* **106**(1):1–10.
- 61 Albert M-A, Haanstra JR, Hannaert V, Van Roy J, Opperdoes FR, Bakker BM, Michels PAM (2005). Experimental and in silico analyses of glycolytic flux control in bloodstream form *Trypanosoma brucei*. *J Biol Chem* **280**(31):28306–28315.
- 62 Ullu E, Tschudi C, Chakraborty T (2004). RNA interference in protozoan parasites. *Cell Microbiol* **6**(6):509–519.
- 63 Meyerhof, O., Lohmann, K. and Sehuster, P. H. (1936). Über die Aldolase, ein Kohlenstoff-verknüpfendes Ferment. *Biochem. Z.* **236**, 301-319.
- 64 Rutter WJ (1964). Evolution Of Aldolase. *Fed Proc* **23**:1248–1257.
- 65 Perham RN (1990). The fructose-1,6-bisphosphate aldolases: same reaction, different enzymes. *Biochem Soc Trans* **18**(2):185-187.

-
- 66 Creighton, D.J. et Murthy, N.S.R.K. (1990). Stereochemistry of Enzyme-Catalyzed Reactions at Carbon *Enzymes* **19**, 323-421.
- 67 Grazi E, Rowley PT, Cheng T, Tchola O, Horecker BL (1962). The mechanism of action of aldolases. III. Schiff base formation with lysine. *Biochem Biophys Res Commun* **9**:38–43.
- 68 Marsh JJ, Lebherz HG (1992). Fructose-bisphosphate aldolases: an evolutionary history. *Trends Biochem Sci* **17**(3):110–113.
- 69 Siebers B, Brinkmann H, Dorr C, Tjaden B, Lilie H, van der Oost J, Verhees CH (2001). Archaeal fructose-1,6-bisphosphate aldolases constitute a new family of archaeal type class I aldolase. *J Biol Chem* **276**(31):28710–28718.
- 70 Penhoet EE, Rutter WJ (1971). Catalytic and immunochemical properties of homomeric and heteromeric combinations of aldolase subunits. *J Biol Chem* **246**(2):318–323.
- 71 Rottmann WH, Deselms KR, Niclas J, Camerato T, Holman PS, Green CJ, Tolan DR (1987). The complete amino acid sequence of the human aldolase C isozyme derived from genomic clones. *Biochimie* **69**(2):137–14.
- 72 Penhoet EE, Kochman M, Rutter WJ (1969). Isolation of fructose diphosphate aldolases A, B, and C. *Biochemistry* **8**(11):4391–4395.
- 73 Penhoet E, Kochman M, Valentine R, Rutter WJ (1967). The subunit structure of mammalian fructose diphosphate aldolase. *Biochemistry* **6**(9):2940–2949.
- 74 Penhoet EE, Kochman M, Rutter WJ (1969). Molecular and catalytic properties of aldolase C. *Biochemistry* **8**(11):4396–4402.

-
- 75 Koerner TAJ, Cary LW, Bhacca NS, Younathan ES (1973). Tautomeric composition of D-fructose phosphates in solution by Fourier transform carbon-13 nuclear magnetic resonance. *Biochem Biophys Res Commun* **51**(3):543–550.
- 76 Choi KH, Tolan DR (2004). Presteady-state kinetic evidence for a ring-opening activity in fructose-1,6-(bis)phosphate aldolase. *J Am Chem Soc* **126**(11):3402–3403.
- 77 Lorentzen E, Siebers B, Hensel R, Pohl E (2005). Mechanism of the Schiff base forming fructose-1,6-bisphosphate aldolase: structural analysis of reaction intermediates. *Biochemistry* **44**(11):4222–4229.
- 78 Grazi, E., Rowley, P. T., Cheng, T., Tchola, O., & Horecker, B. L. (1962). The Mechanism of Action of Aldolases. III. Schiff Base Formation with Lysine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **9**, 38-43.
- 79 Lai CY, Tchola O, Cheng T, Horecker BL (1965) The Mechanism Of Action Of Aldolases. 8. The Number Of Combining Sites In Fructose Diphosphate Aldolase. *J Biol Chem* **240**:1347–1350.
- 80 Trombetta, G., Balboni, G., di Iasio, A. et Grazi, E. (1977) On the Stereospecific Reduction of the Aldolase-Fructose 1,6 Bisphosphate Complex by NaBH₄. *Biochem Biophys Res Commun* **74**: 1297-1301.
- 81 Rose IA, Rieder SV (1958). Studies on the mechanism on the aldolase reaction; isotope exchange reactions of muscle and yeast aldolase. *J Biol Chem* **231**(1):315–329.
- 82 Eisenstein E, Schachman HK. (1989). Determining the roles of subunits in protein function. Dans: Creighton TE, ed. *Proteinfunction*. Oxford, UK: IRL Press. pp 135-176.

-
- 83 Sygusch J, Beaudry D (1997). Subunit interaction in mammalian aldolases. *Biochem J* **323** (Pt 3):671–676.
- 84 Beernink PT, Tolan DR (1994). Subunit interface mutants of rabbit muscle aldolase form active dimers. *Protein Sci* **3**(9):1383–1391.
- 85 Gamblin SJ, Cooper B, Millar JR, Davies GJ, Littlechild JA, Watson HC (1990). The crystal structure of human muscle aldolase at 3.0 Å resolution. *FEBS Lett* **262**(2):282–286.
- 86 Dalby A, Dauter Z, Littlechild JA (1999). Crystal structure of human muscle aldolase complexed with fructose 1,6-bisphosphate: mechanistic implications. *Protein Sci* **8**(2):291–297.
- 87 Dalby AR, Tolan DR, Littlechild JA (2001). The structure of human liver fructose-1,6-bisphosphate aldolase. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **57**(Pt 11):1526–1533.
- 88 Arakaki TL, Pezza JA, Cronin MA, Hopkins CE, Zimmer DB, Tolan DR, Allen KN (2004). Structure of human brain fructose 1,6-(bis)phosphate aldolase: linking isozyme structure with function. *Protein Sci* **13**(12):3077–3084.
- 89 Sygusch J, Beaudry D, Allaire M (1987). Molecular architecture of rabbit skeletal muscle aldolase at 2.7-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**(22):7846–7850.
- 90 Blom N, Sygusch J (1997). Product binding and role of the C-terminal region in class I D-fructose 1,6-bisphosphate aldolase. *Nat Struct Biol* **4**(1):36–39.
- 91 St-Jean M, Lafrance-Vanasse J, Liotard B, Sygusch J (2005). High resolution reaction intermediates of rabbit muscle fructose-1,6-bisphosphate aldolase: substrate cleavage and induced fit. *J Biol Chem* **280**(29):27262–27270.

-
- 92 Hester G, Brenner-Holzach O, Rossi FA, Struck-Donatz M, Winterhalter KH, Smit JD, Piontek K (1991). The crystal structure of fructose-1,6-bisphosphate aldolase from *Drosophila melanogaster* at 2.5 Å resolution. *FEBS Lett* **292**(1-2):237–242.
- 93 Chudzik DM, Michels PA, de Walque S, Hol WG (2000). Structures of type 2 peroxisomal targeting signals in two trypanosomatid aldolases. *J Mol Biol* **300**(4):697–707.
- 94 Kim H, Certa U, Dobeli H, Jakob P, Hol WG (1998). Crystal structure of fructose-1,6-bisphosphate aldolase from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Biochemistry* **37**(13):4388–4396.
- 95 Kim, Y., Zhou, M., Moy, S., Joachimiak, A. (2006). Crystal Structure of Fructose-Bisphosphate Aldolase, Class I from *Porphyromonas gingivalis* *À être publié*.
- 96 Lorentzen E, Pohl E, Zwart P, Stark A, Russell RB, Knura T, Hensel R, Siebers B (2003). Crystal structure of an archaeal class I aldolase and the evolution of (betaalpha)₈ barrel proteins. *J Biol Chem* **278**(47):47253–47260.
- 97 Grazi E, Cheng T, Horecker BL (1962). The formation of a stable aldolase-dihydroxyacetone phosphate complex. *Biochem Biophys Res Commun* **7**:250–253.
- 98 Christophe L. M. J. Verlinde, Paulene M. Quigley (1999) Structure-based Reevaluation of the Mechanism of Class I Fructose-1,6-bisphosphate Aldolase. *Journal of Molecular Modeling* **V5**(3):37–45.
- 99 Anai, M., Lai, C.Y. et Horecker, B.L. (1973). The Pyridoxal Phosphate-Binding Site of Rabbit Muscle Aldolase, *Archives of Biochemistry and biophysics* **156**, 712-719.

-
- 100 Palczewski, K., Hargrave, P.A., Folta, E.J. et Kochman, M. (1985) Affinity Labeling of Rabbit Muscle Fructose-1,6-Bisphosphate Aldolase with 5'-[p-(fluorosulfonyl)benzoyl]-1,N6-ethenoadenosine . *European Journal of Biochemistry* **146**, 309-314.
- 101 Maurady, A., Zdanov, A., de Moissac, D., Beaudry, D. et Sygusch, J. (2002). A Conserved Glutamate Residue Exhibits Multifunctional Catalytic Roles in D-Fructose-1,6-bisphosphate Aldolases *Journal of Biological Chemistry* **277**: 9474-9483.
- 102 Morris, A.J. et Tolan, D.R. (1993) Site-directed Mutagenesis identifies Aspartate 33 as a Previously unidentified Critical Residue in the Catalytic Mechanism of Rabbit Aldolase A» *Journal of Biological Chemistry* **268**, 1095-1100.
- 103 Rose IA, O'Connell EL, Mehler AH (1965) Mechanism Of The Aldolase Reaction. *J Biol Chem* **240**:1758–1765.
- 104 Littlechild JA, Watson HC (1993). A data-based reaction mechanism for type I fructose bisphosphate aldolase. *Trends Biochem Sci* **18**(2):36–39.
- 105 Drechsler ER, Boyer PD, Kowalsky AG (1959). The catalytic activity of carboxypeptidase-degraded aldolase. *J Biol Chem* **234**:2627–2634.
- 106 Morris, A.J. et Tolan, D.R. (1994). Lysine-146 of Rabbit Muscle Aldolase Is Essential for Cleavage and Condensation of the C3-C4 Bond of Fructose 1,6-Bisphosphate»*Biochemistry* **33**, 12291-12297.
- 107 Morris, A.J., Davenport, R.C. et Tolan, D.R. (1996). A Lysine to Arginine Substitution at Position 146 of Rabbit Aldolase A Shifts the Rate-determining Step to Schiff Base Formation *Protein Engineering* **9**, 61-67.

-
- 108 Choi KH, Shi J, Hopkins CE, Tolan DR, Allen KN (2001). Snapshots of catalysis: the structure of fructose-1,6-(bis)phosphate aldolase covalently bound to the substrate dihydroxyacetone phosphate. *Biochemistry* **40**(46):13868–13875.
- 109 Spolter PD, Adelman RC, Weinhouse S (1965). Distinctive Properties Of Native And Carboxypeptidase-Treated Aldolases Of Rabbit Muscle And Liver. *J Biol Chem* **240**:1327–1337.
- 110 Rutter WJ, Richards OC, Woodfin BM (1961). Comparative studies of liver and muscle aldolase. I. Effect of carboxypeptidase on catalytic activity. *J Biol Chem* **236**:3193–3197.
- 111 Takahashi I, Takasaki Y, Hori K (1989). Site-directed mutagenesis of human aldolase isozymes: the role of Cys-72 and Cys-338 residues of aldolase A and of the carboxy-terminal Tyr residues of aldolases A and B. *J Biochem (Tokyo)* **105**(2):281–286.
- 112 Berthiaume L, Loisel TP, Sygusch J (1991). Carboxyl terminus region modulates catalytic activity of recombinant maize aldolase. *J Biol Chem* **266**(26):17099–17105.
- 113 Sygusch J, Beaudry D, Allaire M (1990). Inactivation of mammalian fructose diphosphate aldolases by COOH terminus autophosphorylation. *Arch Biochem Biophys* **283**(2):227–233.
- 114 Humphreys L, Reid S, Masters C (1986). Evidence for the spatial separation of the binding sites for substrate and for cytoskeletal proteins on the enzyme aldolase. *Int J Biochem* **18**(1):7–13.

-
- 115 Berthiaume L, Tolan DR, Sygusch J (1993). Differential usage of the carboxyl-terminal region among aldolase isozymes. *J Biol Chem* **268**(15):10826–10835.
- 116 Esposito G, Vitagliano L, Costanzo P, Borrelli L, Barone R, Pavone L, Izzo P, Zagari A, Salvatore F (2004). Human aldolase A natural mutants: relationship between flexibility of the C-terminal region and enzyme function. *Biochem J* **380**(Pt 1):51–56.
- 117 Gefflaut T, Blonski C, Perie J, Willson M (1995). Class I aldolases: substrate specificity, mechanism, inhibitors and structural aspects. *Prog Biophys Mol Biol* **63**(3):301–340
- 118 Ginsburg A, Mehler AH (1966). Specific anion binding to fructose diphosphate aldolase from rabbit muscle. *Biochemistry* **5**(8):2623–2634.
- 119 Midelfort CF, Gupta RK, Rose IA (1976). Fructose 1,6-bisphosphate: isomeric composition, kinetics, and substrate specificity for the aldolases. *Biochemistry* **15**(10):2178–2185.
- 120 Blonski, C., De Moissac, D., Périé, J., and Sygusch, J. (1997). Inhibition of rabbit muscle aldolase by phosphorylated aromatic compounds. *The Biochemical journal* **323** (Pt 1) 71-77
- 121 Dax C, Coincon M, Sygusch J, Blonski C (2005). Hydroxynaphthaldehyde phosphate derivatives as potent covalent Schiff base inhibitors of fructose-1,6-bisphosphate aldolase. *Biochemistry* **44**(14):5430–5443.
- 122 Callens M, Kuntz DA, Opperdoes FR (1991). Kinetic properties of fructose bisphosphate aldolase from *Trypanosoma brucei* compared to aldolase from rabbit muscle and *Staphylococcus aureus*. *Mol Biochem Parasitol* **47**(1):1–9.

-
- 123 Callens M, Opperdoes FR (1991). Chemical modification of fructose bisphosphate aldolase from *Trypanosoma brucei* compared to aldolase from rabbit muscle and *Staphylococcus aureus*. *Mol Biochem Parasitol* **47**(1):11–17.
- 124 de Walque S, Opperdoes FR, Michels PA (1999). Cloning and characterization of *Leishmania mexicana* fructose-1,6-bisphosphate aldolase. *Mol Biochem Parasitol* **103**(2):279–283.
- 125 Wierenga R K, Swinkels B, Michels P A , Osinga K, Misset O, Van Beeumen J, Gibson W C , Postma J P, Borst P , Opperdoes F R (1987). Common elements on the surface of glycolytic enzymes from *Trypanosoma brucei* may serve as topogenic signals for import into glycosomes. *EMBO J* **6**(1); 215-221.
- 126 Trinquier M, Perie J, Callens M, Opperdoes F, Willson M (1995). Specific inhibitors for the glycolytic enzymes of *Trypanosoma brucei*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **3**(11):1423–1427.
- 127 Périé J, Rivière-Aldric I, Blonski C, Gefflaut T, Lauth de Viguierie L, Trinquier M, Willson M, Opperdoes FR, Callens M. (1994). Inhibition of the glycolytic enzymes in the trypanosome: an approach in the development of new leads in the therapy of parasitic diseases. *Pharmac Ther*; **60**: 347–365.
- 128 Dax C, Duffieux F, Chabot N, Coincon M, Sygusch J, Michels PAM, Blonski C (2006). Selective irreversible inhibition of fructose 1,6-bisphosphate aldolase from *Trypanosoma brucei*. *J Med Chem* **49**(5):1499–1502.
- 129 Azema L, Lherbet C, Baudoin C, Blonski C (2006). Cell permeation of a *Trypanosoma brucei* aldolase inhibitor: evaluation of different enzyme-labile phosphate protecting groups. *Bioorg Med Chem Lett* **16**(13):3440–3443.

- 130 Michels, PM, (2006). *Communications personnelles*
- 131 Fothergill-Gilmore LA, Michels PA (1993). Evolution of glycolysis. *Prog Biophys Mol Biol* **59**(2):105–235.
- 132 Sygusch, J.; Beaudry, D. (1997). Allosteric communication in mammalian muscle aldolase *The Biochemical journal* **327** (Pt 3) 717-720.