50376 1994 87 ccogen 2010/00

503+6

1984

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE FLANDRES-ARTOIS

N° Ordre: 1279

## SCHÖNECK Ralf

Thèse de Doctorat Sciences de la Vie et de la Santé



Titre:

# CLONAGE ET CARACTERISATION MOLECULAIRE D'UN ADNC DE TRYPANOSOMA CRUZI CODANT POUR UNE PROTEINE HOMOLOGUE AUX GLUTATHION S-TRANSFERASES : APPROCHE FONCTIONNELLE

Soutenue le 18 février 1994

Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire INSERM U167-CNRS 624 Institut Pasteur de Lille

Président : Rapporteurs:

**Examinateurs:** 

Pr. A. DHAINAUT
Dr. E. PAYS
Dr. R.J. PIERCE
Pr. A. CAPRON
Dr. M.A. OUAÏSSI

Je dédie ce mémoire

à mon épouse, Hélène, à mes enfants, Chloé et Bastien. L'ensemble de ce travail a été réalisé au Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, Unité INSERM 167-CNRS 624 (Institut Pasteur de LILLE), dirigé par Monsieur le Professeur A. CAPRON, et plus particulièrement, dans le groupe de recherche étudiant le parasite *Trypanosoma cruzi*, animé par Monsieur le Dr. M.A. OUAISSI.

Il a fait l'objet d'une collaboration avec le "Service de Chimie des Biomolécules", CNRS URA 1309 (Institut Pasteur de LILLE), dirigé par Monsieur le Professeur A. TARTAR.

La C.E.E, L'Université de l'Europe ainsi que la "Studienstiftung des Deutschen Volkes" ont participé au financement de cette thèse.

### A Monsieur le Professeur A. CAPRON,

Vous m'avez accueilli avec bienveillance, au sein de votre laboratoire. Veuillez accepter dans ce travail, le témoignage de mon respect et de ma sincère reconnaissance.

### A Monsieur le Professeur A. DHAINAUT,

Vous avez accepté de présider cette thèse. Qu'il me soit permis de vous exprimer mes plus vifs remerciements.

### A Monsieur le Docteur M.A. OUAISSI,

Vous m'avez accueilli au sein du groupe de recherche que vous animez. Vous m'avez fait profiter de vos connaissances sur la Maladie de Chagas. Vous avez guidé avec beaucoup de clairvoyance, l'ensemble de ces travaux. Que ce mémoire soit le témoignage de ma gratitude et de toute mon amitié.

### A Monsieur le Docteur E. PAYS,

Vous vous êtes intéressé à mon travail et avez accepté de le juger. Qu'il me soit permis de vous exprimer mes très sincères remerciements.

### A Monsieur le Docteur R.J. PIERCE,

Vous avez suivi tout ce travail et avez accepté spontanément de le juger. Soyez en chaleureusement remercié.

Je tiens également à remercier :

Madame et Monsieur les Docteurs B. PLUMAS-MARTY et A. TAIBI pour notre collaboration scientifique fructueuse mais aussi pour leur aide, leur amitié et tous les bons moments passés ensemble.

Madame le Docteur C. VERWAERDE, pour les nombreuses heures de discussion qu'elle m'a très aimablement consacrées et pour ses nombreux conseils.

Ce travail a fait l'objet d'une collaboration avec l'équipe du Professeur A. TARTAR et plus particulièrement avec Mesdames et Messieurs les Docteurs M. AUMERCIER, P. MAES-AUMERCIER H. GRAS-MASSE, D. MEZIANE-CHERIF, Mademoiselle M. MOUTIEZ. Qu'il me soit permis de les remercier très sincèrement pour cette collaboration qui a été déterminante dans l'achèvement de ce travail. Je tiens également à remercier les nombreuses personnes qui m'ont aidé ou conseillé durant ces dernières années et en particulier,

Monsieur M. LOYENS qui avec beaucoup d'humour, m'a fait bénéficier de sa grande compétence technique;

tous les membres du groupe de recherche sur les Trypanosomatidae.

Un grand merci enfin à toutes celles (O. BILLAUT-MULOT, O. OUWE MISSI OUKEM, N. IVANOFF, L. LECORDIER, C. LEMAIRE, C. MERCIER et N. VANTOUROUX) qui par leur lecture attentive, leurs connaissances et leur gentillesse, m'ont aidé non-seulement à corriger et à réaliser ce manuscrit, mais aussi à surmonter les difficultés de la langue française.

Je ne saurais oublier avant de terminer, Madame J. DERYCK qui avec une grande disponibilité et une constante bonne humeur, m'a aidé à réunir les supports bibliographiques de ce mémoire.

#### **Publications**

Ouaisssi, A., Cornette, J., Schöneck, R., Plumas - Marty, B., Taibi, A., Loyens, M., and A. Capron. (1992). Fibronectin cleavage fragments provide a growth factor - like activity for the differentiation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes to amastigotes. *Eur. J. Cell Biol.* **59**: 68 - 79.

Ouaissi, A., Aguirre, T., Plumas - Marty, B., Piras, M., Schöneck, R., Gras - Masse, H., Taibi, A., Loyens, M., Tartar, A., Capron A., and R. Piras. (1992). Cloning and sequencing of a 24 kDa *Trypanosoma cruzi* antigen released in association with membrane vesicles and defined by a monoclonal antibody. *Biol. Cell* **75**: 11 - 17.

Billaut - Mulot, O., Pommier, V., Schöneck, R., Plumas - Marty, B., Taibi, A., Loyens, M., Capron, A., and M. A. Ouaissi. (1993) Nucleotide sequence of a *Trypanosoma cruzi* cDNA encoding a parasite protein homologous to mammalian elongation factor gamma. *Nucl. Acids Res.* **21**: 3901.

Yahiaoui, B., Loyens, M., Taibi, A., Schöneck, R., Dubremetz, J.F., and M. A. Ouaissi.(1993) Characterization of a *Leishmania* antigen associated with cytoplasmic vesicles resembling endosomal - like structure. *Parasitology* **107**: 497-507.

Taibi, A., Plumas - Marty, B., Guevara-Espinosa, A., Schöneck, R., Pessoa, H., Loyens, M., Piras, R., Aguirre, T., Gras - Masse, H., Bossus, M., Tartar, A., Capron, A., and A. Ouaissi..(1993). *Trypanosoma cruzi* : immunity-induced in mice and rats by trypomastigote excretory - secretory antigens and identification of peptide sequence containing a T cell epitope with protective activity. *J. Immunol.* **151**: 2675-2689.

Schöneck, R., Plumas - Marty, B., Taibi, A., Loyens, M., Gras - Masse, H., Capron, A., and A.Ouaissi. Characterization of a *Trypanosoma cruzi* cDNA encoding a novel parasite protein with an internal repeat domain structure. (soumis).

Schöneck, R., Plumas-Marty, B., Taibi, A., Billaut-Mulot, O., Loyens, M., Gras-Masse, H., Capron, A., Ouaissi, M. A.. *Trypanosoma cruzi* cDNA encodes a tandemly repeated domain structure characteristic of small stress proteins and glutathione *S*transferases. (accepté).

Plumas-Marty, B., **Schöneck**, **R**., Billaut-Mulot, O., Taibi, A, Ouaissi, M. A. Molecular cloning of a *Trypanosoma cruzi* cDNA encoding a protein homologous to mammalian EF1β. (soumis).

Schöneck, R., Ouaissi, M A. Evolutionary relationships between glutathion *S*-transferases and related proteins. (en préparation).

Mezingue-Cherif, D., Schöneck, R., et coll.

Single-step purification by S-hexylglutathion-agarose column of a *Trypanosoma cruzi* protein homologous to glutathione S-transferases. (en préparation).

Taibi, A., Guevara Espinosa, A., **Schöneck, R.**, Loyens, M., Ouaissi, A. *Trypanosoma cruzi*: a recombinant trypomastigote excretory/secretory antigen useful for the diagnosis of chronic Chagas' disease. (en préparation).

#### **Communications**

Schöneck, R., Plumas - Marty, B., Taibi, A., Loyens, M., Capron, A., and A. Ouaissi. Identification of *Trypanosoma cruzi* proteins with acetylcholinesterase activity. *Annales de la Sociéte de Medecine Tropicale*, 1992, **72**, supl.1: 74. International Colloquium : Trypanosomiasis Seminar. Antwerpen (Belgium), 1991.

Schöneck, R., Plumas - Marty, B., Taibi, A., Loyens, M., Capron, A., and A. Ouaissi. Cloning and sequencing of a *Trypanosoma cruzi* antigen sharing common epitope(s) with various host components. VIth European Multicolloquium of Parasitology. The Hague (Netherlands), 1992.

Ouaissi, A., Cornette, J., Schöneck, R., Marty, B., Velge, P., and A. Capron. *Trypanosoma cruzi* : cleavage of fibronectin by parasite protease(s) and release of biologically active fragments. European Congress of Protistology. Nedde (France), 1992.

Schöneck, R., et al. A *Trypanosoma cruzi* cDNA encoding a duplicated domain sharing characteristics of stress proteins and glutathione *S*-transferases. Spring Meeting of the British Society for Parasitology. Leeds (England), 1993

Plumas-Marty, B., **Schöneck, R.**, Taibi, A., Capron, A., Ouaissi, A. *Trypanosoma cruzi* antigens homologous to elongation factors 1β. Spring Meeting of the British Society for Parasitology. Leeds (England), 1993

Schöneck, R., et al. A *Trypanosoma cruzi* cDNA encoding a GST-like protein. IX International Congres of Protozoology. Berlin (Germany), 1993.

Taibi, A., Plumas-Marty, B., Guevera, A., Schöneck, R., Loyens, M., Gras-Masse, H., Bossus, M., Capron; A., Oauissi, A. *Trypanosoma cruzi*: Immunity induced in mice and rats by trypomastigote excretory-secretory antigens and identification of peptide sequence with protective activity. IX International Congres of Protozoology. Berlin (Germany), 1993.

Taibi, A., Plumas-Marty, B., Guevara Espinoza, A., Schöneck, R., Pessoa, H., Loyens, M., Piras, R., Aguirre, T., Gras-Masse, H., Bosus, M., Tartar, A., Capron, A., Ouaissi, A. *Trypanosoma cruzi*: Induccion de immunidas en ratones BALB/c y ratas Fischer causada pof antigenos de excretion/secretion de trypomastigotes e identification de una secuenca peptidica correspondiente a determinantes antigenicos T con actividad protectiva. *Acta Parasitologica Portuguesa*, 1993, 1: 88. III Congresso Ibérico de Parasitologia. Lisboa (Portugal).

Schöneck, R., Billaut-Mulot, O., Ouaissi, M. A. *Trypanosoma cruzi* cDNA encodes a tandemly repeated domain structure characteristic of small stress proteins. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 1993, 88 - Suppl. : 157. XX Annual Meeting on Basic Research in Chagas' Disease. Caxamu (Brésil).

# Abréviations

AChE : acétylcholinestérase

ADCC : cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps

ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire

ADNk : acide désoxyribonucléique kinétoplastique

ADNmit : acide désoxyribonucléique mitochondrial

ADNr : acide désoxyribonucléique ribosomal

ADNt : acide désoxyribonucléique de transfert

AMPc : adénosine monophosphate cyclique

ARNg : acide ribonucléique guide

ARNm : acide ribonucléique messager

ARNt : acide ribonucléique de transfert

BET : Bromure d'éthidium

CD : "cluster" de différenciation

CDNB: 1-chloro-2-4-dinitrobenzène

DEPC : Diéthylpyrocarbonate

CMH : complexe majeur d'histo-compatibilité

DFMO : difluorométhylornithine

DMSO: Diméthylsulfoxyde

dNTP: désoxyribonucléotide-triphosphate

D.O. : Densité optique

DTT : Dithiothréitol

EDTA: Acide Ethylène Diamine Tétraacétique

eEF: Facteur d'élongation eucaryotique de la synthèse protéique

ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay

ES : excrétion/sécrétion

GMPc : guanosine-monophophate cyclique

GSH : glutathion réduit

GSH-SPD : glutathionyl-spermidine

GSSG : glutathion oxydé

GST : glutathion S-transférase

HCA : "Hydrophobic Cluster Analysis"

hsp : protéine de choc thermique ("Heat Shock Protein")

IFN- $\gamma$ : interféron- $\gamma$ 

IL : interleukine

IPTG : Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranoside

kDa : kilodalton

 $K_{\rm m}$  : constante de Michaelis

LDL : lipoprotéine de faible densité

mhsp : protéine de choc thermique mitochondriale

MIF : facteur inhibiteur de migration

MTT: 3-[4,5-diméthyldiazole-2-yl]-2,5-diphényltetrazolium bromide

NBT : tetrazolium blue chloride

NP-40 : Nonidet P-40

ODC : ornithine décarboxylase

PBS: Tampon phosphate

PCR : réaction de polymérisation en chaîne

PMFS : Fluorure de Phényl Méthyl Sulfonyle

PO : fraction de membrane plasmique et des organelles

PSA : persulfate d'ammonium

SDS : sodium docécylsulfate

sHsp : protéine de stress de faible poids moléculaire

SL : "Spliced Leader"

SOD : superoxyde-dismutase

SVF : sérum de veau fétal

TEMED: Tetraméthyléthylène diamine

T[S]<sub>2</sub> : trypanothion oxydé

T[SH]<sub>2</sub> : trypanothion réduit

U snRNP :"uridine rich small nuclear ribonucleoproteins

VSG : "variable surface glycoproteins"

## Introduction

### I. Le défi des maladies parasitaires

Les maladies parasitaires touchent essentiellement la santé des populations vivant dans les pays en voie de développement. De plus, ces affections présentent également des conséquences sur l'économie de ces pays qui est souvent basée sur la production agricole et l'élevage du bétail.

Ces dernières années, bien que l'on ait développé plusieurs axes de recherche permettant de bien comprendre les interactions hôte-parasite dans le but d'établir des vaccins et des traitements contre certaines de ces maladies parasitaires, celles-ci ne cessent de se propager.

Des estimations données par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) montrent par exemple que 200 millions de personnes seraient infectées par *Plasmodium*; un chiffre comparable est donné pour la bilharziose. 90 millions d'individus seraient atteints de filariose lymphatique et environ 40 millions souffrent de l'onchocercose. La maladie du sommeil touche un nombre important de personnes en Afrique et affecte également le bétail. Enfin, la maladie de Chagas due à *Trypanosoma cruzi* sévit en Amérique du Sud et Centrale où l'on estime à 15-20 millions le nombre d'individus atteints et à environ 90 millions, le nombre de personnes exposées à l'infection.

L'explosion démographique mondiale, essentiellement des pays en voie de développement, les catastrophes naturelles, les guerres, les déplacements de population, mais également l'intervention de l'homme sur l'équilibre de la nature (barrages, agriculture, etc...) sont des facteurs de propagation de ces maladies, hors des régions endémiques.

Pour remédier à cette situation, il est important de développer des moyens de diagnostic sensibles et de traitement efficaces. Aussi, beaucoup de travaux ont été entrepris ces dernières années dans le but d'élaborer des vaccins contre certaines maladies parasitaires. Cependant, cette stratégie est particulièrement délicate à établir, étant donné la complexité des divers mécanismes d'échappement qu'un parasite peut développer pour dévier la réponse immune de son hôte.

Actuellement, la schistosomiase humaine et animale, la distomatose animale ainsi que le paludisme représentent les principales parasitoses où des progrès sensibles ont été réalisés pour l'élaboration de vaccins.

Par ailleurs, les médicaments utilisés actuellement dans le traitement des différentes parasitoses sont loin efficace de façon optimale. En effet, le parasite peut développer une résistance contre les molécules thérapeutiques, comme cela a déjà été observé pour certains protozoaires tel que *Plasmodium*. De plus, certains médicaments peuvent avoir des effets néfastes sur l'hôte qui peuvent être dangereux pour son organisme.

La famille des *Trypanosomidae* regroupe des organismes protozoaires possédant la capacité d'infecter des plantes et des animaux et dont la plupart sont définis comme parasites. C'est le cas de *Phytomonas* chez les plantes, *Leishmania* et *Trypanosoma* chez les animaux et l'homme.

Certains auteurs pensent qu'en ce qui concerne *T. cruzi*, l'hôte intermédiaire représenté par la punaise se nourrissait à l'origine de plantes. Au cours de l'évolution, certains insectes auraient changé de comportement pour se nourir en piquant des animaux. Ainsi, les trypanosomes ont pu s'adapter aux nouvelles conditions de nutrition des punaises et développer un pouvoir infectieux chez les vertébrés.

## Répartition géographique de la trypanosomiase américaine



Répartition géographique de la trypanosomiase américaine (maladie de Chagas) (d'après WILCKOCKS & MANSON-BAHR 1972).

Figure 1

### <u>II. La maladie de Chagas</u>

L'agent responsable de la maladie de Chagas est un parasite flagellé qui fut découvert au début du siècle par Carlos Chagas. Celui-ci le nomma d'abord *Schizotrypanonum* avant de l'appeller *Trypanosoma cruzi* en hommage à son maître Oswaldo Cruz. Carlos Chagas découvrit ensuite le vecteur qui est un insecte hématophage et décrivit les formes aiguës et chroniques de la maladie. Cette affection est aussi connue sous le nom de trypanosomiase américaine dont la zone d'endémie est représentée par différents pays d'Amérique latine (**figure 1**).

*T. cruzi* est transmis par un insecte vecteur de l'ordre des Hémiptères, famille des Réduviidés, sous-famille des Triatominae, dont les principales espèces sont représentées par *Panstrogylus megistus, Triatoma infestans* et *Rhodnius prolixus* (**figure 2**). Ce sont des punaises, hématophages obligatoires qui peuvent transmettre les parasites tout au long de leur développement. Celles-ci sont également des vecteurs d'autres espèces de trypanosomes telle que *T. rangeli*. Il faut noter que *T. rangeli* ne provoque pas de pathologie chez l'homme bien qu'il soit infectieux pour celui-ci.



Figure 2: Les vecteurs principaux du parasite *T. cruzi*, *Panstrongylus megistus* (a), *Triatoma infestans* (b) et *Rhodnius prolixus* (c).

La maladie de Chagas reste essentiellement une maladie socio-économique. De plus, l'amélioration de l'habitat et l'éducation de la population rurale des régions endémiques sont nécessaires, afin de diminuer le risque de contamination par le vecteur. L'utilisation de peintures insecticides et de cartouches fumigènes permet de lutter contre l'infection naturelle. Ces traitements appliqués depuis quelques années ont fait leurs preuves dans certains pays d'Amérique latine (Brésil, Argentine, Venezuela et Paraguay). Avec l'aide de l'Organisation Pan Américaine de la Santé (PAHO) et la Communauté Economique Européenne (CEE), les pays endémiques ont décidé d'adopter une stratégie simultanée de ce type afin d'éliminer le vecteur principal, *Triatoma infestans*.

### 1. Cycle évolutif de T. cruzi.

Au cours de son cycle de développement (**figure 3**), l'environnement du parasite alterne entre l'insecte vecteur et l'hôte vertébré.

Pendant son repas sanguin, l'insecte ingère des trypomastigotes sanguicoles qui se différencient en épimastigotes, stade non-infectant pour l'homme. Les épimastigotes se multiplient dans l'intestin de l'insecte, où ils se différencient en trypomastigotes métacycliques. Ce processus porte le nom de métacyclogenèse.

L'infection de l'hôte mammifère survient après le repas sanguicole de l'insecte. Les trypomastigotes métacycliques présents dans les fécès pénètrent dans l'organisme lorsque l'hôte se gratte au niveau de la piqûre de l'insecte et ils infectent divers types cellulaires (macrophages, fibroblastes, lymphocytes T, cellules musculaires, etc.). Dans les cellules, les trypomastigotes se transforment en amastigotes qui après plusieurs multiplications, se différencient en trypomastigotes sanguicoles. La cellule infectée est détruite et les parasites sont ainsi libérés dans le sang. Les trypomastigotes peuvent alors infecter d'autres cellules ou bien être ingérés par l'insecte vecteur au cours de son repas sanguin, assurant ainsi la pérénité du cycle.



(avec modifications)

Le processus de différenciation des différents stades parasitaires n'est pas encore connu en détail. Les épimastigotes peuvent être cultivés à 28°C dans différents milieux semi-définis tels que le GLSH (CORNETTE et coll., 1988) ou le LIT (DE MAIO et coll., 1984). L'addition de certaines substances au milieu, comme un analogue de l'urine de l'insecte vecteur riche en L-proline (GOLDENBERG et coll., 1987), des extraits de l'intestin de l'insecte vecteur (ISOLA et coll., 1981; ISOLA et coll., 1986), de l'AMPc (RANGEL-ALDAO et coll., 1987) ou un fragment de l'a<sup>D</sup>-globine du poulet (FRAIDENRAICH et coll., 1993) permet la différenciation des épimastigotes en trypomastigotes "métacycliques" *in vitro* (GOLDENBERG et coll., 1987; DE ISOLA et coll., 1987). Ces derniers restent cependant tout de même différents des trypomastigotes issus de l'insecte.

En 1968, BRACK et coll. avaient identifié dans le tube digestif de l'insecte, des formes du parasite rondes mais pourvues de flagelle nommées "sphéromastigotes". Ces formes sont comparables aux amastigotes, mais sont extracellulaires et ne se multiplient pas. PAN et coll. (1978) ont décrit les même formes chez l'hôte vertébré. Lorsque des formes trypomastigotes de culture sont incubées dans un milieu acellulaire tel que le RPMI, elles donnent naissance aux formes sphéromastigotes. Ces formes arrondies sont dotées d'un pouvoir infectant supérieur à celui des trypomastigotes (PIRAS et coll., 1982). Récemment, LEY et coll. (1988) ont montré que ce pouvoir infectant existait *in vitro* et *in vivo*.

L'infection par des trypomastigotes issus des déjections du vecteur représente la voie principale de transmission du parasite. Cependant, d'autres voies de contamination constituant un danger réel sont à considérer. L'augmentation des transfusions sanguines et l'internationalisation du marché du sang et de ses dérivés posent un problème particulier (MARTELLI et coll., 1992), non seulement pour les régions endémiques, mais aussi pour les pays importateurs de produits sanguins. Des cas de maladie de Chagas aiguë ont été décrits aux Etats-Unis et au Canada à la suite de transfusions sanguines chez des individus immunodéprimés (GRANT et coll., 1989; NICKERSON et coll., 1989; MILEI et coll., 1992). Il est apparu dans ces cas, que les donneurs de sang

provenaient de zones d'endémie (Bolivie et Paraguay). L'utilisation du violet de gentiane représente l'additif le plus utilisé pour l'élimination des parasites du sang. Son seul effet indésirable est de colorer le sang et les organes en violet.

Le pourcentage d'infection congénitale n'est pas négligeable et peut varier de 0,7 à 10,5 % chez les mères séropositives (BRABIN, 1993). En Bolivie par exemple, le taux est de 7,5 % .

*T. cruzi* infecte également un grand nombre d'autres vertébrés comme les rongeurs, le chien, le chat, l'armadillos, l'opossum, et les chauve-souris. Tout ces animaux sont les cibles des triatomes pour leur repas sanguin et représentent un réservoir de *T. cruzi*.

Les parasites peuvent également être transmis d'un insecte à l'autre. En effet, *T. infestans* est aussi coprophage, et les formes nommées "blastocrithidia" sont capables de survivre pendant une période de trois ans dans les déjections des punaises.

### 2. La maladie

L'infection par *T. cruzi* est une infection qui persiste toute la vie, à l'exception des cas aigus traités et présentant après traitement, une sérologie négative. Il n'a pas été rapporté dans la littérature de cas de guérison spontanée de maladie de Chagas.

#### a) La phase aiguë

Cette phase dure 1 à 3 mois et passe souvent inaperçue car les symptômes peuvent être atypiques ou bénins. Cependant, chez les jeunes, les troubles cliniques peuvent être graves et conduisent parfois à la mort. La mortalité durant la phase aiguë de la maladie peut atteindre 2 à 3 %.

Au niveau de la peau, au point d'inoculation du parasite, se produit parfois une inflammation locale nommée chagôme. Elle porte le nom de signe de Romaña si la piqûre a lieu au niveau de la conjonctive. A cet endroit, une conjonctivite et une adénopathie de la région périocculaire apparaissent. La formation d'un œdème est accompagnée d'une infiltration lymphocytaire avec prédominance de macrophages et de lymphocytes. Une invasion ultérieure des tissus par des fibroblastes, des cellules géantes et des lymphocytes peut être observée. Pendant cette phase, se produit une multiplication intense des parasites qui se disséminent dans divers tissus et provoquent une infiltration de lymphocytes, de monocytes et de polynucléaires. On observe également des parasites à l'intérieur des cellules gliales ou neuronales et dans les espaces périvasculaires.

La phase aiguë est caractérisée par une fièvre (38-40°C) variable durant le premier mois de l'infection. On observe également dans certains cas des asthénies, des céphalées, une hépatosplénomégalie, l'anasarque et la tuméfaction des ganglions lymphatiques. D'autres symptômes possibles sont un exanthème généralisé, une anorexie, des diarrhées et des vomissements. Un nombre important de malades (environ 30 %) montre des anomalies de l'électrocardiogramme (ECG), signifiant la présence d'une myocardite aiguë. Une méningoencéphalite peut survenir chez les enfants de moins de deux ans et provoque jusqu'à 50 % de mortalité.

Dans la majorité des cas, les symptômes régressent quelques semaines après l'infection.

### b) La phase de latence ou phase indéterminée

C'est une phase qui peut durer 10 à 20 ans. Les patients présentent une bonne condition physique et les symptômes cliniques sont absents, alors que l'examen sérologique peut être positif. L'examen parasitologique ne révèle pas de trypomastigotes dans le sang. Cependant, le xénodiagnostic indique 20 à 60 % de cas positifs. Les atteintes observées (dans un certain nombre de cas) sont notamment des fibroses, des altérations du nœud sinusal et du système de conduction auriculoventriculaire, ainsi que du système neurovégétatif.

Des atteintes cardiaques, digestives ou neurologiques sont observées chez 30 % des sujets, environ 10 à 20 ans après la phase indéterminée.

Durant cette phase, on peut distinguer deux types de pathologie:

- la forme cardiaque,

- la forme digestive.

Ces manifestations peuvent apparaître séparément ou associées chez le même patient.

(1) *Forme cardiaque*. Les manifestations cliniques de cette forme dépendent du degré d'altération du myocarde. Dans ce cas, les signes se traduisent par une dyspnée, un œdème, des syncopes, des étourdissements, des palpitations et des douleurs thoraciques. On observe également une hypertrophie cardiaque qui peut être décelée par radiographie thoracique. L'électrocardiogramme représente le moyen de détection des modifications de la conduction auriculoventriculaire, des arythmies et des troubles de conduction ventriculaire. Parfois, on peut avoir une fibrilation ventriculaire du cœur qui peut entraîner la mort subite.

(2) *Forme digestive*. Les atteintes de la forme digestive sont souvent localisées au niveau de l'œsophage et du côlon. Des lésions importantes au niveau du plexus nerveux entraînent des troubles du péristaltisme. Les syndromes de méga-œsophage et méga-côlon peuvent être associés à une cardiopathie.

A ce jour, aucune relation entre la gravité du processus infectieux et la souche de parasite ou le système HLA de l'individu n'a pu être démontrée. Le rôle exact de la persistance du parasite dans les tissus, en particulier dans le tissu cardiaque, n'est pas clair et il ne semble pas exister de corrélation entre la quantité de parasites présents dans les tissus et la gravité de la forme clinique (HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ et coll., 1993).

(1) *Diagnostic parasitologique*. Lorsque l'on est en présence d'une forte parasitémie, surtout pendant la phase aiguë, la simple observation d'une goutte de sang sous le microscope permet de déceler des trypomastigotes. Mais le plus souvent, la coloration au Giemsa est réalisée après hémolyse d'une goutte épaisse de sang. Seulement 50 % des cas de phase aiguë de l'infection chagasique sont détectés par cette méthode.

L'hémoculture réalisée à partir du sang du malade est également un moyen de diagnostic parasitologique. Le sang est incubé avec du milieu de culture dans lequel les parasites se multiplient. Dans ce cas, le taux de positivité n'excède pas 40 à 50 %.

Des "nids" d'amastigotes tissulaires peuvent être identifiés par biopsie des ganglions. Le diagnostic par observation directe des parasites pose donc des problèmes de fiabilité. Par contre, la technique de xénodiagnostic permet de dépister près de 100 % des cas en phase aiguë et 40 à 50 % des cas en phase chronique de l'infection chagasique. Le xénodiagnostic se sert de l'insecte vecteur comme d'une "étuve naturelle": le triatome prend son repas sanguin sur le patient et la présence des trypomastigotes métacycliques est recherchée 30 à 90 jours plus tard dans les déjections de l'insecte.

(2) *Diagnostic par la technique de PCR (polymérisation en chaine)*. La PCR représente la technique la plus récente pour le diagnostic de la maladie de Chagas (DEGRAVE et coll., 1988; MOSER et coll., 1989; BRENIERE et coll., 1992). Une partie des minicercles (une forme de l'ADN circulaire qui se trouve dans la mitochondrie des trypanosomes) est amplifiée par une polymérase thermorésistante. Bien que l'utilisation de cette technique soit limitée aux laboratoires de recherche, sa propagation comme technique de base dans les laboratoires de diagnostic est très probable dans un avenir proche. Les premières expériences montrent qu'il est possible de détecter un seul parasite dans 20 ml de sang, ce qui rend cette technique plus sensible et plus rapide que le xénodiagnostic (AVILA et coll., 1991).

La validation définitive de cette méthode, nécessite l'analyser un nombre plus important d'échantillons. Une restriction pour cette technique de diagnostic est que l'extrême sensibilité de la PCR fait risquer de fausse-positivité à cause des contaminations. De plus, cette technique nécessite l'utilisation d'un matériel coûteux.

(3) *Diagnostic sérologique*. Le diagnostic sérologique utilise plusieurs techniques: la réaction de fixation du complément, la réaction d'agglutination, l'agglutination de particules de latex sensibilisées avec l'antigène parasitaire, l'hémagglutination indirecte, les techniques d'immunoprécipitation en gel, l'immuno-fluorescence indirecte et la technique d'ELISA ("enzyme linked immunosorbent assay").

Parfois des réactions de fausse positivité sont rencontrées. Elles sont dues aux réactivités croisées que présente *T. cruzi* avec d'autres parasites protozoaires règnant dans la même zone d'endémie, en particulier *T. rangeli, Leishmania brasiliensis, L. donovani* et *L. mexicana*.

### e) Les traitements

La chimiothérapie de la maladie de Chagas reste un problème non-résolu et la recherche de molécules thérapeutiques se poursuit. Deux médicaments à base de nitrohétérocycles sont utilisés en clinique actuellement: le nifurtimox (3-methyl-4-(5-nitrofurfurylideneamino) tétrahydro-4*H*-1,4-thiazine -1,1-dioxyde; Bay 2502), commercialisé sous le nom de Lampit par Bayer, et le benznidazole (*N*-benzyl-2-nitroimidazole acetamide; RO 7-1051), commercialisé sous le nom de Rochagan (Roche Company). Ces produits sont capables d'éliminer certains symptômes de la phase aiguë en diminuant la parasitémie. Ils agissent sur les formes trypomastigotes et amastigotes, mais sont beaucoup moins efficaces sur les formes présentes chez l'insecte, les épimastigotes. Parfois, ce traitement ne donne pas toujours les résultats attendus, probablement à cause de l'hétérogénéité des souches de *T. cruzi*.

Le traitement à l'aide de ces nitrodérivés cause de nombreux effets secondaires. Cela pose un problème car la durée du traitement a son importance pour une bonne efficacité (30 à 60 jours pour le nifutimox, 60 à 90 jours pour le benznidazole). Il est possible que la toxicité du nifurtimox soit liée à la formation de radicaux libres et à leur interférence directe avec des composants cellulaires et/ou à l'oxydation des lipides. Dans le cas du benznidazole, la toxicité semble être due à l'interaction des produits intermédiaires avec des composants cellulaires (CASTRO et coll., 1988). De plus, le nifurtimox et le benznidazole semblent être des agents génotoxiques pour les bactéries et les lapins (NAGEL, 1987; SOUZA et coll., 1991; TEIXEIRA et coll, 1990). L'utilisation du benznidazole pour traiter des enfants chagasiques a révélé une augmentation des altérations chromosomiques des lymphocytes périphériques (GORLA et coll., 1988).

Des enfants traités par nifurtimox présentent 13 fois plus d'atteintes génétiques que des enfants non-traités (GORLA et coll., 1989). Néanmoins, il ne faut pas oublier que 2 à 8 % des personnes n'ayant pas suivi de traitement pendant la phase aiguë de la maladie, décèdent.

Beaucoup de recherches sont maintenant basées sur le "drug design". Cela nécessite une meilleure connaissance de la biochimie du parasite. Les cibles les plus prometteuses sont les enzymes qui utilisent le trypanothion comme co-substrat. C'est le cas de la trypanothion réductase (WALSH et coll., 1991) et des enzymes de la glycolyse (OPPERDOES, 1987).

### 3. La réponse immune de l'hôte vis-à-vis de l'infection par T. cruzi

Chez l'homme, juste après l'infection se développe une réponse immune qui va entraîner une réduction de la parasitémie à la fin de la phase aiguë et contrôler l'infection pendant la phase chronique de la maladie. Ces dernières années, les travaux menés par plusieurs auteurs ont permis de mieux comprendre certaines caractéristiques de la réponse immune anti-*T. cruzi* à la fois chez l'homme et chez les modèles animaux. Cependant, les mécanismes jouant un rôle dans la destruction de *Trypanosoma cruzi* ne sont pas très bien définis.

#### a) La réponse cellulaire

Les lymphocytes T jouent un rôle important dans la résistance à l'infection par *T*. *cruzi*. L'infection expérimentale de souris thymectomisées (SCHMUNIS et coll. 1971) ou traitées par des anticorps anti-thymocytes (ROBERSON et coll., 1973) entraîne une augmentation de la susceptibilité de ces animaux à l'infection. Cette susceptibilité est retrouvée également chez les souris "nudes" (KIERSZENBAUM et coll., 1979; TRISCHMANN, 1980). De plus, le transfert passif de lymphocytes enrichis en cellules T provenant de souris infectées (TRISCHMANN, 1980; BURGESS et coll., 1980; REED, 1980) ou de lignées CD4<sup>+</sup> ou encore de clones T, spécifiques de *T. cruzi*, protège d'une infection létale (NICKELL et coll., 1987).

Les mécanismes possibles impliqués dans la protection par des lymphocytes T incluent:

(1) l'augmentation de la réponse humorale spécifique par les cellules CD4<sup>+</sup>

(KRETTLI et coll., 1976; KRETTLI et coll., 1982; ARAUJO, 1989);

(2) la sécrétion des lymphokines activant les macrophages (NOGUEIRA, 1981);

(3) une cytotoxicité directe vis-à-vis des cellules hôtes infectées.

En particulier, l'administration d'anticorps anti-IFN $\gamma$  à des souris (BALB/c, C57BL/6) augmente leur susceptibilité à l'infection par des souches réticulotropiques (RA ou Tulahuen). Plusieurs auteurs ont souligné le rôle de l'interféron  $\gamma$  dans le contrôle de l'infection qui passe par l'activation du macrophage (McCABE et coll., 1991; PLATA et coll., 1987; REED et coll., 1988; WIRTH et coll., 1985).

Plusieurs auteurs ont également mis en évidence l'importance des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> au cours de l'infection chagasique (ARAUJO, 1989; ROTTENBERG et coll., 1988). Cependant, le rôle des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> dans la résistance à l'infection est loin d'être négligeable. Ainsi, Tarleton et coll. ont montré que des souris déplétées en lymphocytes T CD8<sup>+</sup> ou déficientes en  $\beta$ 2 microglobuline sont plus susceptibles à l'infection que les souris normales (TARLETON, 1990; TARLETON et coll., 1992).

Etant donné la localisation intracellulaire de la forme de multiplication de *T. cruzi*, il est probable que certains antigènes parasitaires soient présents à la surface de la cellulehôte, en association avec les antigènes du CMH de classe I. Cette cellule serait donc la cible des cellules CD8<sup>+</sup> cytotoxiques. Les cellules CD8<sup>+</sup> cytotoxiques sont également impliquées dans la réponse immune au cours d'infections virales (ZINKERNAGEL et coll., 1977), d'infections par *Listeria monocytogenes* (KAUFMANN et coll., 1986) ou encore par des protozoaires intracellulaires comme *Leishmania major* (TITUS et coll., 1987), *Plasmodium* (SCHOFIELD et coll., 1987; WEISS et coll., 1988; KUMAR et coll., 1988), *Toxoplasma gondii* (HAKIM et coll., 1991; SUZUKI et coll., 1988) et *Theileria parva* (PEARSON et coll., 1992).

Les plaquettes représentent également des cellules effectrices vis-à-vis de *T. cruzi*. UMEKITA et coll. (1989) ont montré que ces cellules, en présence d'anticorps de classe IgG, sont capables de lyser des formes trypomastigotes. Ce mécanisme serait dépendant du facteur C3 du complément et se traduit par la dégranulation des plaquettes qui libèrent des enzymes protéolytiques. Des expériences réalisées *in vitro* ont montré l'existence d'un mécanisme d'ADCC (cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps) vis-à-vis des formes épimastigotes, en utilisant des cellules spléniques (ABRAHAMSOHN et coll., 1977; SANDERSON et coll., 1978), des éosinophiles et des neutrophiles de rat (LOPEZ et coll., 1978), ainsi que des granulocytes humains (MADEIRA et coll., 1979). Par la suite, il a été démontré que ce phénomène d'ADCC faisait intervenir surtout des anticorps de classe IgG1, IgG2a et IgG2b dans la destruction des trypomastigotes sanguicoles (TAMBOURGI et coll., 1989).

Par ailleurs, des travaux réalisés *in vitro* par (MOLINA et coll., 1988) montrent que des formes trypomastigotes de *T. cruzi* peuvent également être lysées par des produits provenant d'éosinophiles.

#### b) La réponse humorale

L'infection par *Trypanosoma cruzi* entraîne l'induction d'une réponse immune humorale qui est d'abord caractérisée par une prédominance des anticorps de type IgM, puis par l'apparition des IgG et des IgA pendant la phase aiguë de la maladie (TEIXEIRA et coll., 1974). Cette réponse anticorps persiste tout au long de la phase chronique.

La réponse humorale joue son rôle dans la résistance à l'infection par *T. cruzi*. Cela a été démontré en comparant le niveau de susceptibilité des souches de souris produisant soit un faible taux, soit un taux important d'anticorps (KIERSZENBAUM et coll., 1976). Par ailleurs, le transfert passif de sérum immun de rat en phase aiguë à des rats sains entraîne une protection significative (CULBERSON et coll., 1938). D'autres expériences réalisées par RODRIGUEZ et coll., (1981) montrent que des rats Fischer traités par un sérum de lapin anti- $\mu$ , deviennent plus susceptibles à l'infection que des rats normaux. De plus, le transfert de cellules spléniques, lorsqu'elles sont déplétées en lymphocytes B, ne confère aucune protection chez la souris normale vis-à-vis de l'infection par *T. cruzi* (SCOTT, 1981). Afin d'identifier le ou les isotypes impliqués dans la résistance à l'infection, SCOTT et coll. (1984) ont réalisé le transfert des différentes sous-classes d'anticorps purifiées à partir d'un sérum de souris infectée. Les meilleurs résultats ont été obtenus en utilisant les anticorps de sous-classe IgG2, et plus précisément la fraction correspondant aux IgG2b (TAKEHARA et coll., 1981).

Les mécanismes d'action des anticorps dans la destruction du parasite sont nombreux:

- les anticorps se fixent à la surface du parasite et inhibent ainsi l'adhésion et la pénétration de celui-ci dans la cellule hôte,
- ils participent à la phagocytose du parasite par les macrophages et les monocytes (opsonisation),
- les anticorps lytiques provoquent la lyse directe du parasite en présence du complément (KRETTLI et coll., 1976),

 - ils interviennent dans le mécanisme d'ADCC (cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps) en collaboration avec différentes populations cellulaires présentant des récepteurs Fc à leur surface.

La réponse humorale joue donc un rôle déterminant dans la résistance à l'infection par *T. cruzi*. Il est vrai que la plupart des travaux ont été conduits *in vitro*. Il reste donc à démontrer *in vivo* l'implication des différents mécanismes décrits .

### c) Autoimmunité et immuno-pathologie

Les phénomènes pathologiques caractéristiques de la maladie de Chagas se traduisent principalement par des lésions cardiaques, musculaires et neuronales. A l'heure actuelle, il est bien démontré que ces phénomènes sont dûs au moins en partie à des réactions autoimmunes développées par l'hôte au cours de l'infection. Certains auteurs ont montré l'existence de réactivités antigéniques croisées entre certains composants de l'hôte et des molécules parasitaires. C'est le cas entre une molécule de 49 kDa exprimée au niveau du tissu nerveux de rat et un composant de 160 kDa présent au niveau de la poche flagellaire de *T. cruzi* (VAN WOORHIS et coll. 1989).

Certains de ces épitopes cross-réactifs semblent être des glycanes (PETRY et coll., 1988; PETRY et coll., 1989). Les auteurs supposent que cette réactivité est due à une perturbation du système immun plutôt qu'à un mimétisme antigénique.

Récemment, la présence d'anticorps anti-acétylcholinestérase humaine et d'anticorps anti-idiotype ont été décrits dans notre laboratoire chez les patients chagasiques en phase chronique (OUAISSI et coll., 1988). L'épitope reconnu par les auto-anticorps est de type glycanique. D'une façon plus générale, les interactions entre *T. cruzi* avec le système nerveux de l'hôte sont multiples : on peut distinguer une hypersensibilité due à une dénervation des neurones (KÖBERLE, 1968), à une déplétion de la choline acétyltransférase (TANOWITZ et coll., 1981), à une augmentation de l'expression des récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine (TANOWITZ et coll., 1983), ou à une diminution de l'activité acétylcholinestérasique chez les souris susceptibles (A/J) à l'infection (BRENNESSEL et coll., 1985). Chez les souris résistantes (C57BL/6), ce phénomène n'est pas observé.

Par ailleurs, certains anticorps qui se lient aux récepteurs β-adrénergiques des lymphocytes de malades chagasiques sont capables d'activer ces lymphocytes CD4<sup>+</sup> en augmentant le niveau intracellulaire d'AMPc, tandis que d'autres anticorps en se liant aux récepteurs muscarino-cholinergiques des lymphocytes CD8<sup>+</sup>, augmentent le niveau intracellulaire de GMPc. L'existence d'une modulation des récepteurs de neurotransmetteurs sur les lymphocytes au cours de l'infection chagasique pourrait expliquer, au moins en partie, l'immunosuppression et certains désordres cardiaques (BORDA et coll., 1984; GORELIK et coll., 1990).

Par ailleurs, CONNELLY et coll. (1988) ont décrit l'existence de récepteurs adrénergiques  $\alpha$  et  $\beta$  à la surface des trypomastigotes sanguicoles de *T. cruzi*. De plus, des anticorps dirigés vis-à-vis du récepteur  $\beta$ -adrénergique de pigeon réagissent avec les trypomastigotes. D'autres études ont montré que l'épitope R-13 de la protéine ribosomale de *T. cruzi* est spécifiquement reconnu par les sérums de malades chagasiques présentant une cardiopathie grave et une correlation significative existe entre le niveau d'anticorps anti-R13 et la sévérité de la maladie (LEVIN, 1991).

Plus récemment, BONFA et coll. (1993) ont réalisé une étude sur des antigènes du soi reconnus par des sérums chagasiques, en utilisant un grand nombre d'échantillons (102): 12 % des sérums testés réagissent avec des histones et environ 4 % montrent une immunofluorescence indirecte positive avec des cellules d'une lignée de HeLa (HEp-2). En Western-blotting, 7 sérums des 31 positifs réagissent avec une protéine de 23 kDa. Cette protéine montre une réaction croisée avec une protéine ribosomale de *T. cruzi* ayant le même poids moléculaire.

Plusieurs auteurs se sont intéressés à l'étude des facteurs responsables de l'induction de la réponse autoimmune observée dans une infection chagasique. Cependant, jusqu'à présent, l'origine des lymphocytes B et T autoréactifs induits après l'infection reste inconnue.

Cette réponse autoimmune pourrait être due à l'existence d'épitopes communs au parasite et à son hôte. La présence d'autoanticorps pourrait être également une conséquence de la prolifération polyclonale B et T observée lors de l'infection.

Il a été démontré que plusieurs types de cellules sont impliqués dans la pathogénèse de la maladie de Chagas : le transfert adoptif de lymphocytes T CD4+ (et non de CD8+) de souris infectées à des souris saines, en absence de parasite, entraîne l'apparition de symptômes neuro-pathologiques chez ces dernières qui sont comparables à ceux observés chez des souris infectées (SAID et coll., 1985; HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ et coll., 1987). Cependant, il n'a pas été possible de reproduire la pathologie par transfert passif de sérums de souris chroniques à des souris naïves (SAID et coll., 1985).

TANOWITZ et coll. (1990) discutent l'augmentation de l'aggrégation des plaquettes pendant l'infection chagasique. Cette aggrégation pourrait conduire aux thrombus microvasculaires qui provoquent ensuite des ischémies locales et une pathologie au niveau de la microcirculation coronarienne, ce qui serait à la base de la cardiomyopathie de la maladie de Chagas.

MOLINA et coll. (1989a, 1989b) associent la présence des éosinophiles activés dans le myocarde de patients chagasiques à l'apparition de certaines pathologies au cours de l'infection. Ces auteurs ont mis en évidence la présence de la MBP et de l'ECP au niveau des myofibres nécrotiques. Ces composants présentent une toxicité pour les cellules de mammifères.

CABEZA-MECKERT et coll. (1991) ont mis en évidence l'expression anormale de molécules du CMH de classe II au niveau des cellules des muscles squelettiques et du myocarde. L'expression de ce type de molécules jouant un rôle dans le phénomène d'immunoreconnaissance pourrait également pour un rôle dans les phénomènes d'auto-réactivité observés dans la maladie de Chagas.

### d) Les moyens d'échappement du parasite

L'infection par *Trypanosoma cruzi* est accompagnée d'une activation polyclonale des lymphocytes B et T (MINOPRIO et coll., 1986a) suivie d'une immuno-suppression. L'activation polyclonale apparaît tôt lors de la phase aiguë, persiste pendant toute la phase chronique (MINOPRIO et coll., 1986b; D'IMPERIO LIMA et coll., 1985; D'IMPERIO LIMA et coll., 1986) et entraîne une perturbation de la réponse immune de l'hôte. Le parasite se protège de la réponse immune en se multipliant à l'intérieur de la cellule. Le parasite se retrouve ensuite dans le phagolysosome d'où il échappe rapidement pour se diviser dans le cytoplasme de la cellule hôte. *T. cruzi* s'échappe du phagolysosome en produisant une protéine immunologiquement apparentée au composant C9 du Complément et à la perforine de souris. Cette protéine est capable de former des pores dans la membrane du phagolysosome. De cette façon, il est à l'abri des anticorps, des cellules effectrices et des mécanismes de dégradation par le phagolysosome.

*In vitro*, en stimulant par la PHA ou un anticorps anti-CD3 des lymphocytes T de patients, on peut mettre en évidence une inhibition de l'expression des marqueurs CD3, CD4, CD8 et du récepteur à l'IL2 ce qui objective une certaine suppression de la réponse immune (SZTEIN et coll., 1990). BELTZ et coll. (1987) ont montré que la production et l'utilisation d'IL-2 par les PBMC humaines se trouvent diminuées chez les patients chagasiques.

Chez la souris, le taux d'expression du récepteur à l'IL-2 n'est pas réduit; cependant, dans ce cas, c'est le taux d'IL-2 lui-même qui est diminué (REED et coll., 1984a; REED et coll., 1984b, TARLETON, 1988). La production d'autres lymphokines telles que l'IL-3 et l'IFN- $\gamma$  se trouve également diminuée pendant l'infection chagasique (TARLETON, 1991). La diminution de production d'IFN- $\gamma$  est probablement dû à une faible synthèse d'IL-2, lymphokine stimulant son expression. Si la forme épimastigote de *T. cruzi* est sensible à la lyse par le complément, le trypomastigote peut échapper à cette lyse en exprimant une protéine capable d'inhiber la formation d'une C3 convertase alterne efficace (en phase liquide ou associée à la membrane) (FISCHER et coll., 1988). De plus, JOINER et coll. (1988) et NORRIS et coll. (1991) ont décrit un facteur sécrété par *T. cruzi*, analogue au DAF de l'hôte ("Decay Acceleration Factor"). Ces deux facteurs semblent réagir au même niveau de la formation de la C3 convertase. Ce phénomène est qualifié de "mimétisme fonctionnelle". Par ailleurs, des formes amastigotes dans le sang échappent à la lyse par le complément bien qu'elles aient à leur surface le complexe C5b-9. Celui-ci est apparemment incapable de former des trous dans la membrane (IIDA et coll., 1989).

MARTINEZ et coll (1993) ont décrit une protéine parasitaire ayant une activité protéolytique (la cruzipain); cette protéine contient deux domaines, dont celui aminoterminal qui serait nécessaire à l'activité enzymatique de la protéine. De manière remarquable, au cours de l'infection, les anticorps produits par l'hôte ne réagissent qu'avec l'extrémité carboxy-terminale. Selon ces auteurs, la réponse humorale serait déviée vers une partie non-essentielle de la protéine afin de protéger la région portant l'activité enzymatique.

Une autre moyen pour *T. cruzi* d'échapper à la réponse immune de l'hôte serait sa capacité d'incorporer des molécules de l'hôte à sa surface, réalisant ainsi une sorte de camouflage des antigènes parasitaires.

La connaissance de la biologie du parasite et des bases moléculaires des relations avec ses hôtes est nécessaire pour l'élaboration de stratégies anti-parasitaires. L'interface hôte-parasite et la différenciation jouent un rôle déterminant dans la vie du parasite. *T. cruzi* infecte la plupart des cellules de son hôte définitif et se montre hautement pléomorphe dans son cycle évolutif. Chaque stade est caractérisé par des propriétés uniques qui font que le parasite est un être parfaitement adapté à son environnement. La transformation et le développement de chaque forme est une réponse du parasite vis-à-vis des changements de son habitat.

### 1. Les différents stades évolutifs

Il existe trois stades évolutifs pour *T cruzi* que l'on classe en:

- formes réplicatives, c'est-à-dire
  - + les épimastigotes de l'insecte vecteur et
  - + les amastigotes intracellulaires de l'hôte mammifère;

- formes non-réplicatives, à savoir

- + les trypomastigotes métacycliques de l'insecte vecteur et
- + les trypomastigotes sanguicoles issus des cellules des hôtes mammifères infectés.

Les différents stades évolutifs de *T. cruzi* sont assez faciles à distinguer par la localisation du noyau en relation avec le kinétoplaste et l'insertion du flagelle dans la cellule (poche flagellaire). Concernant ces critères, on distingue les trois formes décrites ci-dessus: les épimastigotes, les trypomastigotes et les amastigotes.

(1) Les trypomastigotes présentent un kinétoplaste postérieur au noyau et sont d'une taille d'environ 20  $\mu$ m de longueur et de 2  $\mu$ m de largeur (**figure 4a**). Dans l'insecte vecteur, on trouve des formes métacycliques dans la lumière de l'intestin postérieur. Cependant, chez l'hôte mammifère, ils sont sous forme sanguicole. Le flagelle couvre presque toute la longueur du parasite en le tirant en avant par des mouvements ondulatoires et est inséré entre le kinétoplaste et le noyau.

(2) Les amastigotes correspondent au stade réplicatif chez l'hôte vertébré (figure
4b); ils sont plutôt arrondis et ne possèdent qu'un flagelle rudimentaire. Leur temps de duplication est environ de 7 à 14 heures selon la température du milieu de culture.

(3) Chez les épimastigotes, formes réplicatives de l'intestin moyen du vecteur, le noyau est placé dans la partie postérieure suivie antérieurement par le kinétoplaste et la poche flagellaire (**figure 4c**). Leur longueur est de 20 à 40  $\mu$ m.

### 2. L'organisation cellulaire

Comme la majorité des cellules eucaryotes, *T. cruzi* contient un réticulum endoplasmique, des ribosomes, des péroxysomes, des lysosomes, un appareil de Golgi et une seule (!) mitochondrie. Les fonctions de ces organelles sont similaires à celles de mammifères. Il est nécessaire ici de parler de la particularité de la mitochondrie des trypanosomes: il n'en existe qu'une par cellule, et elle présente des crètes discoïdales. Elle est linéaire dans les trypomastigotes mais possède des ramifications dans les autres stades. La mitochondrie peut s'étendre sur toute la longueur de la cellule. La partie contenant l'information génétique s'appelle le kinétoplaste, d'où le nom de Kinetoplastidae. Cette structure est caractéristique de ce groupe d'organismes et sera abordée plus en détail.
Les trypanosomes possèdent des microtubules subpelliculaires qui sont connectés les uns aux autres et avec la membrane plasmique, ce qui conduit à la fois à une forte rigidité et à une grande flexibilité de la cellule. Près de la poche flagellaire existe le "microtubule-organizing center" (SHERWIN et coll., 1989) qui constitue le point d'origine des microtubules. La poche flagellaire ne contient qu'un groupe de quatre microtubules. Ce compartiment est supposé être l'endroit de l'endocytose. C'est une région hautement différenciée protégeant certains récepteurs d'endocytose parasitaires du système de défense de l'hôte.

Pour *T. cruzi*, on trouve en plus chez les formes épimastigotes et sphéromastigotes (amastigotes ?), un cytostome qui n'existe pas chez les formes trypomastigotes (stade non-réplicatif exposé au système humoral de l'hôte). Chez *T. brucei*, les récepteurs pour les LDL (COPPENS et coll., 1988; COPPENS et coll., 1991) et la transferrine (SCHELL et coll., 1991) sont localisés dans la poche flagellaire. Les Trypanosomes ont besoin de lipides et de la transferrine pour leur croissance, ce qui peut expliquer la présence de ces récepteurs à la surface des parasites. D'une façon intéressante, certaines lipoprotéines sont toxiques pour les Trypanosomes (HADJUK et coll., 1989). Le système de fixation et d'internalisation de la transferrine chez les Trypanosomes semble être différent de celui des mammifères. Chez les cellules des eucaryotes supérieurs, la transferrine chargée (transferrine diferrique) est internalisée à l'aide d'un récepteur dans un compartiment légèrement acide. Le fer est alors dissocié de la transferrine qui est ensuite recyclée à la surface de la cellule. Par contre, chez les Trypanosomes, la transferrine n'est pas recyclée mais transportée et dégradée dans des lysosomes (GRAB et coll., in press).

Par ailleurs, la poche flagellaire est aussi l'endroit de la sécrétion des protéines parasitaires. Ceci a été montré pour une glycoprotéine de 98-140 kDa de *L. donovani* et la phosphatase acide de *L. mexicana*. Il semble que beaucoup de protéines membranaires sont insérées dans la membane plasmique au niveau de la poche flagellaire (WEBSTER et coll., 1993).

Un autre organelle très intéressant des Kinetoplastidae est le glycosome (OPPERDOES et coll., 1976; OPPERDOES et coll., 1993). Les cellules peuvent en contenir 200 à 300. Dans leur fonction, on peut les comparer avec les péroxysomes et les glyoxysomes des autres organismes mais il manque quelques marqueurs typiques aux fonctions de ces organelles (la catalase par exemple, chez les Trypanosomes pathogènes pour l'homme). Leur particularité est la localisation de certaines enzymes glycolytiques dans ces vesicules, alors qu'elles sont normalement cytoplasmiques chez les eucaryotes supérieurs. De plus, les glycosomes contiennent certaines enzymes de la  $\beta$ -oxydation des acides gras et de la biosynthèse des éthers lipides (OPPERDOES, 1984; HART, 1984). La composition des enzymes des glycosomes varie selon les espèces (OPPERDOES et coll., 1993).

Au niveau de la *N*-glycosylation, les trypanosomatidae montrent de nombreuses différences avec les mammifères (pour revue, PARODI, 1993). En particulier, la composition des sucres des glycoprotéines semble être différente des mammifères; par exemple, la glycoprotéine GP-72 des épimastigotes contient du ribose, un pentose qui ne se trouve pas chez les autres eucaryotes, sauf dans certaines protéines subissant une ADP-ribosylation.

# 3. L'interaction hôte-parasite

Le parasite doit interagir avec les composants de la surface des cellules de l'hôte afin d'assurer sa pénétration. Plusieurs structures de l'hôte ont été décrites comme facteurs d'adhésion : le dimère de la fibronectine et plus précisément la séquence RGDS, qui peut former un pont entre les récepteurs cellulaires d'une part et les récepteurs parasitaires d'autre part (OUAISSI et coll., 1988). Après fixation de la fibronectine, celle-ci est hydrolysée par les protéases du parasite ce qui libère des fragments peptidiques (OUAISSI et coll., 1992). Ces peptides semblent accélérer la différenciation des trypomastigotes en amastigotes. Une augmentation de l'AMPc intracellulaire ainsi que la synthèse des protéines et leur phosphorylation accompagnent la transformation du parasite. Le récepteur parasitaire de la fibronectine semble être un complexe de protéines de 80-85 et de 68 kDa. Ce dernier possède la capacité de fixer le collagène (VELGE et coll., 1988).

ORTEGA-BARRIA et coll. (1991) ont montré qu'un même récepteur peut fixer l'héparine, l'héparane sulfate et le collagène.

En 1993, RAMIREZ et coll. ont décrit un composant de 82 kDa du stade trypomastigote métacyclique qui intervient dans l'infection *via* une relation ligand/récepteur. L'infection des cellules par la souche CL de *T. cruzi* peut être inhibée par incubation préalable avec la protéine purifiée ou des anticorps dirigés contre ce composant. Néanmoins, l'infection par la souche Tulahuen n'est inhibée qu'en partie. Ceci montre encore une fois qu'il existe de multiples mécanismes d'infection pour les différentes souches de *T. cruzi*.

*Trypanosoma cruzi* contient une enzyme unique, la t*rans*-sialidase. Cette enzyme catalyse le transfert des acides sialiques de l'hôte vers des glycoprotéines de surface du trypanosome (revue par COLLI, 1993; CAZZULO et coll., 1992; et CROSS et coll., 1993). Le parasite n'est pas capable de synthétiser les acides sialiques et doit prélever ces composants chez son hôte. D'une façon intéressante, l'invasion des cellules-hôtes exprimant moins d'acides sialiques à leur surface est plus faible que celle des cellules normales (SCHENKMAN et coll., 1993). Ces auteurs ont proposé un modèle dans lequel le trypanosome adhère d'abord à un ligand tel que les acides sialiques, des protéoglycanes ou des molécules de la matrice extracellulaire (comme le collagène ou la fibronectine). Ensuite, le parasite provoque une invagination qui formera le phagolysosome. Dans ce modèle, le transfert des acides sialiques vers le parasite et *vice-versa* facilite le processus d'invasion.

Les résultats concernant l'implication des acides sialiques et la *trans*-sialidase dans les mécanismes d'infection et de protection du parasite sont encore assez contradictoires (COLLI, 1993). Il faut donc attendre une étude plus approfondie de ces mécanismes afin d'évaluer leur rôle dans l'interaction parasite/hôte.

# 4. La génétique de T. cruzi

Les Kinetoplastidae possèdent certaines caractéristiques intéressantes au niveau de l'organisation de leur information génétique et son expression. La grande majorité des expériences qui sont à la base des connaissances actuelles sur l'organisation et l'expression de cette information génétique ont été menées chez *Trypanosoma brucei*. Les particularités de ce groupe d'organismes se manifestent dans:

- la maturation des ARN pré-messagers codés par le génome,

- le kinétoplaste et l'édition des ARN pré-messagers mitochondriaux.

LANAR et coll. (1981) ont montré que *T. cruzi* est un organisme diploïde dont le génome a une complexité d'environ 2,5 x  $10^8$  paires de bases (2,8 x  $10^{-13}$  g). L'ADN kinétoplastique contient 4,9 x  $10^7$  paires de bases (5,4 x  $10^{-14}$  g). 9 % du génome est représenté par des régions répétitives, 51 % du génome correspond à des éléments faiblement répétés et 23 % à des structures "uni-copie". 68 % de ces dernières sont représentées dans l'ARN polysomal. Le nombre d'ARN différents est chiffré à 12000 dont 9000 seraient polyadénylés. Ces ARN poly (A)<sup>+</sup> peuvent être classés en trois groupes: deux séquences présentes 3000 fois dans la cellule, 750 présentes 20 fois, et 15000 présentes 1 à 2 fois.

GIBSON et coll. (1986) ont montré que *T. cruzi* contient 125 chromosomes; contrairement à *T. brucei* (GONZALEZ, et coll., 1984), *T. cruzi* ne contient pas de minichromosomes qui sont apparemment nécessaires pour la diversité antigénique. Les chromosomes ne sont pas classiquement condensés pendant la mitose (SOLARI, 1980); la raison de cette particuliarité n'est pas connue car la présence de l'histone H1, normalement impliquée dans la condensation des chromosomes, a été montrée recemment (TORO et coll., 1993).



## a) Mécanisme de maturation des ARN pré-messagers codés par le noyau

Chez la plupart des organismes, les transcrits sont modifiés avant d'être traduits en protéines. Dans le cas des Kinetoplastidae, on observe la liaison de deux ARN différents (l'ARN pré-messager et l'ARNmed) en un seul, nommé *trans*-épissage (SUTTON et coll., 1986; revue par AGABIAN, 1990; DONELSON et coll., 1990; BONEN, 1993). En effet, certains gènes des Kinetoplastidae sont transcrits sous forme d'un ARN polycistronique (**figure 5**) et peuvent ensuite donner naissance à plusieurs ARNm matures. Cela pourrait expliquer le nombre étonnant de gènes multiples chez ce groupe d'organismes qui sont transcrit en un seul messager pré-mature. Ce phénomène est également retrouvé chez les nématodes (revue par NILSEN, 1993) les trématodes (RAJKOVIC et coll., 1990), l'*Euglena gracilis* (TESSIER et coll. 1991) et les chloroplastes (KOLLER et coll., 1987).

Après transcription, les pré-ARNm sont modifiés dans un premier temps, au niveau de leur extrémité 5' où s'ajoute un oligo-nucléotide de 39 bases (BORST, 1986). Puis dans un deuxième temps, une queue de poly(A)<sup>+</sup> est ajoutée à leur extrémité 3' (ULLU et coll., 1993). Les 39 bases du côté 5' sont connues sous le nom de "Spliced Leader" (SL), qui se trouve sur un transcrit ARNmed (pour "mini-exon derived RNA" ou medRNA) d'environ 110 bases (McCARTHY-BURKE et coll., 1989). Les gènes de l'ARNmed sont organisés en séquences répétées de 0,6 kb. Il existe de multiples mutations dans ces gènes selon les différentes souches de *T. cruzi* La séquence du SL semble cependant être conservée (McCARTHY-BURKE et coll., 1989). L'ARNmed lui-même n'est normalement pas poly-adénylé (McCARTHY-BURKE et coll., 1989). Cependant, chez *T. brucei*, un certain nombre d'ARNmed sont polyadénylés (PELLÉ et coll., 1993) dans la forme sanguicole "long slender". La fonction de cet ARNmed poly(A)<sup>+</sup> n'est pas connue.



Le *trans*-épissage chez les trypanosomes conjugue deux ARN (medRNA et ARN pré-messager) en une seule molécule, l'ARN messager.



L'addition du SL permet la dissociation des ARN pré-messagers polycistroniques. Le mécanisme du *trans* épissage ressemble à celui du *cis* épissage connu chez les autres eucaryotes et est composé de deux étapes: le clivage et la ligation (MURPHY et coll., 1986; SUTTON et coll., 1986). La partie SL de l'ARNmed fusionne au niveau du "SL acceptor site" (20-200 bases en amont du codon d'initiation) avec l'ARN pré-messager. La partie 3' du medRNA et la partie 5' du "SL acceptor site" forment une structure Y dont le branchement est caractérisé par une liaison peu fréquente, un pont phosphodiester du type 2'-5', comparable à la structure en "lasso" du cis-épissage (SHARP, 1987a,b). L'ARNm chimérique est ensuite maturé par addition de la séquence poly(A) (ULLU et coll., 1993). Le "SL acceptor site" ne semble pas être bien conservé, car un ARN prémessager peut produire plusieurs ARNm matures de tailles différentes (AGABIAN, 1990; KAPLER et coll., 1987; LAYDEN et coll., 1988). La structure "cap" (coiffe) en 5' de l'ARNm, est fournie par le SL qui est préalablement modifié: au lieu d'une structure m<sup>7</sup>G (m=méthylguanosine), comme chez la plupart des eucaryotes, le SL est modifié au niveau de ses quatre premières bases et présente la structure  $(m^{7}G(5')ppp(5')m^{6}AmpAmpCmpm^{3}Ump)$  (BANGS et coll; 1992).

Les facteurs impliqués dans le processus de *trans* épissage sont homologues à ceux qui jouent un rôle dans le *cis* épissage: l'U2 snRNP, l'U4 snRNP, l'U5 snRNP, et l'U6 snRNP (PALFI et coll., 1991). Les U snRNA correspondants sont connus, à l'exception de l'U5 ARN. Le medRNA joue peut-être le rôle de l'U1 snRNA à cause de sa capacité de complémentarité dans un système de *cis* épissage déficient en U1 snRNA (BRUZIK et coll., 1990).

Jusqu'à maintenant, il n'y a aucune évidence montrant l'existence du phénomène de *cis* épissage chez les Kinetoplastidae. En effet, il semblerait qu'aucun des gènes étudiés ne contienne d'introns. La question est de savoir s'ils les ont perdus ou s'ils n'en ont jamais eu. Si cette dernière hypothèse est vraie, le mécanisme de l'épissage en *cis* pourrait avoir évolué à partir de l'épissage en *trans*. D'une façon intéressante, les bactéries possèdent aussi des ARN polycistroniques mais n'ont pas d'intron et ne présentent pas de phénomène d'épissage. Le seul exemple d'intron (11 bases) et de *cis*-épissage décrit chez les Trypanosomes jusqu'à maintenant se trouve dans l'ARNt<sup>Tyr</sup> de *T. cruzi*. Le système de *cis*-épissage particulier pour cet intron est connu dans toutes les branches phylogénétiques (SCHNEIDER et coll., 1993).

### b) Le kinétoplaste et l'édition des ARN pré-messagers mitochondriaux

Les trypanosomes ne contiennent qu'une seule mitochondrie qui s'étale sur toute la longueur du parasite. Comme chez les autres eucaryotes, cet organelle possède de l'ADN circulaire. Les Kinetoplastidae se singularisent par l'existence de deux types différents d'ADN circulaire, les maxi-cercles et les mini-cercles, organisés dans une sorte de réseau (SIMPSON, 1986). Ce réseau est nommé le *kinétoplaste* et l'ensemble de l'ADN porte l'abréviation ADNk. Les maxi- et les mini-cercles sont très différents dans leur structure et leur fonction.

Un mini-cercle à une taille d'environ 0,7 à 2,5 kb selon les espèces. Ils n'ont pas de cadre de lecture ouvert, mais peuvent produire des transcrits. Leur nombre est de 5.000 à 10.000 par kinétoplaste avec généralement une grande diversité entre eux, mais pas pour *T. equiperdum* et *Crithidia fasciculata* par exemple. Les maxi-cercles sont, comme leur nom l'indique, plus grands: leur taille est de 20 à 38 kb, elle représente l'équivalent en taille de l'ADN mitochondrial des autres eucaryotes. Les maxi-cercles codent pour certaines protéines telles que la sous-unité III de la cytochrome-oxydase (STURM et coll., 1990), le cytochrome b (STURM et coll., 1990) ou la sous-unité 6 de l'ATPase mitochondriale (BHAT et coll., 1990). Mais les maxi-cercles se distinguent de ADNmit des autres organismes d'une part, par l'absence de l'ADNt et d'autre part, par une taille plus petite des ADNr.

L'édition de l'ARN chez les Kinétoplatides est définie comme un processus posttranscriptionnel qui additionne ou délete des bases uraciles sur les ARN mitochondriaux (revue par HADJUK et coll. 1993). Normalement, l'ARN pré-édité n'est pas fonctionnel et seul le mécanisme d'édition rend le messager traduisible. Le degré de modification varie selon les ARN : par exemple, l'ARN de la cytochrome-oxydase II subit seulement l'addition de 4 uraciles (BENNE et coll., 1986) alors que 557 uraciles sont ajoutés et 41 délétés dans l'ARN de la cytochrome-oxydase III (FEAGIN et coll., 1988). En général, l'addition de bases est plus fréquente que leur délétion.

La découverte de l'édition de l'ARN à conduit les scientifiques à rechercher son origine, c'est-à-dire la ou les molécules portant l'information pour ces modifications. Récemment, différents groupes de chercheurs (BLUM et coll., 1990b; SIMPSON, 1990) ont découvert des petits ARN d'environ 70 nucléotides de long. Ces petits ARN portent l'information pour l'édition des ARN pré-matures. Ce mécanisme n'est pas encore tout à fait clair. Néanmoins, BLUM et coll. (1990a, 1991) proposent le modèle dans lequel les petits ARN serviraient de matrices pour l'édition des ARN pré-matures. Ces petits ARN sont nommés ARNg pour "guide RNA". L'extrémité 5' de ces ARNg est complémentaire d'une région 3' de l'ARN pré-mature et les deux ARN s'hybrident à ce niveau. La région de reconnaissance sur l'ARNg s'appelle: ancre. Une réaction de transestérification (BLUM et coll., 1990a, 1991; CECH, 1991; HADJUK et coll., 1993) aura lieu au niveau du premier "mismatch" entre l'ARN prémature et l'ARNg: l'uracile de l'extrémité 3' de l'ARNg attaque ainsi l'ARN pré-mature et est lié d'une façon covalente avec la dernière base complémentaire de l'ARN pré-mature. Ensuite, un certain nombre d'uraciles (dépendant des bases correspondantes de l'ARNg) est ajouté. Il arrive exceptionnellement, qu'un uracile soit placé en face d'une guanine. Cette transestérification continue selon l'information existante sur l'ARNg. Souvent, un grand nombre de ces ARNg est nécessaire afin d'obtenir l'ARNm mature. Les informations concernant les ARNg se trouvent sur les maxi- et les mini-cercles du kinétoplaste. D'autres modèles ont été proposés où l'addition des uraciles se fait plus ou moins par hasard (DECKER et coll., 1991), pourtant, les modèles de transestérification semblent à présent les plus probables.

L'existence de ce modèle original nous conduit à essayer de comprendre pourquoi il a été selectionné et comment il a évolué. L'édition chez les Kinetoplastidae ressemble au mécanisme de *cis*-épissage des autres organismes et du *trans*-épissage discuté plus haut (BLUM et coll., 1991). Peut-être existe t-il un mécanisme ancestral à partir duquel ces différents processus auraient évolué. L'édition des ARN "coûte assez cher" à la cellule, il faut donc qu'il y ait un "gain" pour les organimes, dans le "struggle for life", gain qui justifierait l'existence et le maintien de ce type de maturation.

# IV. La réponse des organismes aux facteurs de stress

Il y a environ 30 ans que l'on a découvert que les chocs thermiques, les traitements par des agents découplants de phosphorylations oxydatives, l'alcool éthylique etc... font apparaître des *puffs* sur les chromosomes polytènes des glandes salivaires de Drosophile. Dix ans plus tard, les premières protéines synthétisées à la suite de ces *stress*, ont été identifiées. Ce phénomène a été appelé "réponse au choc thermique" et les protéines induites dénommées "protéines de choc thermique" ou hsp (pour heat shock proteins). La réponse au choc thermique est donc en fait, une réponse au *stress* due à des facteurs de l'environnement. Parmi ces stress, l'infection par des microorganismes pathogènes nous intéresse tout particulièrement. Les protéines de stress sont produites à la fois par l'agent pathogène et par l'hôte qui l'héberge; elles agissent mutuellement sur chacun d'eux.

Les plantes aussi ont développé un mécanisme apparenté de résistance systémique contre les agents pathogènes. Sous l'effet d'une infection, elles produisent des médiateurs comme l'acide salique, la systémine, l'éthylène, l'acide jasmonique et méthyljasmonique qui eux-mêmes induisent l'expression de "pathogenesis-related proteins" (PR) comme les chitinases ou les glucanases (revue par ENYEDI et coll., 1992).

Des homologies de séquences ont permis de rapprocher certaines de ces protéines PR, dont la PR1 de la pomme de terre (TAYLOR et coll., 1990), ou une protéine de blé homologue au GST (DUDLER et coll., 1991), des glutathion *S*-transférases de différentes origines, et de la "stringent starvation protein" (SSP) d'*E. coli* (SERIZAWA et coll., 1987), ainsi que la hsp26-A de soja (CZARNECKA et coll., 1984). Curieusement, l'auxine provoque la synthèse de l'hsp26-A et d'une protéine qui a une activité GST (TAKAHASHI et coll., 1992).

En général, les hsp sont classées d'après leur masse moléculaire. On classe ainsi plusieurs familles :

| Famille                         | Fonction  |
|---------------------------------|---|
| hsp 110                         | est concentrée dans le nucléole                         |
| hsp 90                          | • forme un complexe avec les récepteurs des             |
| 1                               | hormones stéroïdes                                      |
|                                 | • fixe la protéine p50 sur le pp60scr (produit d'un     |
|                                 | oncogène) et inhibe son activité kinase                 |
|                                 | • fixe l'actine et la Ca/calmoduline                    |
|                                 | • apparaît (GRP 94 ) dans le réticulum                  |
|                                 | endoplasmique à la suite d'une déficience en glucose    |
|                                 | • possède une activité ATPase                           |
| hsp 70                          | • famille de molécules chaperonnes                      |
|                                 | • famille la plus importante dans les cellules animales |
|                                 | • famille hautement conservée sur le plan évolutif      |
| hsp 60                          | • famille de molécules chaperonnes                      |
| (appelées chaperonines)         |   |
| hsp 20 (small ou sHsp)          | • protéines induites à des stades spécifiques lors      |
| et les $\alpha$ -B-crystallines | du développement chez la drosophile et d'autres         |
|                                 | organismes  |
|                                 | • protéines de faible poids moléculaire, très           |
|                                 | abondantes chez les plantes                             |
|                                 | • molécules chaperonnes                                 |
| hsp 10                          | • molécules chaperonnes                                 |
| Ubiquitine (8,5 kDa)            | • impliquées dans le catabolisme protéique              |

**Tableau 1**: Les différentes familles de protéines de stress et leur fonctions (d'après(DURAND, 1991), avec quelques modifications).

L'induction de l'expression de protéines de stress chez les eucaryotes est souvent médiée par des protéines régulatrices (*heat shock factors*). Celles-ci reconnaissent des éléments spécifiques (HSE pour *heat shock elements*) de la réponse de choc thermique dans la région 5' du site d'initiation de la transcription.

Ces HSE (nnTCnnGAAnnTCnnnGAAnnTTCnnGAAn) se trouvent environ entre 80 et 150 nucléotides en amont du début de la transcription (SORGER et coll., 1987). En dehors des conditions d'induction de l'expression, certaines hsp - sinon la plupart - sont exprimées également dans le conditions normales, mais plus faiblement.

Dans ce qui suit, nous discuterons plus précisement deux rôles des hsp :

• leur fonction chaperonne,

• leur implication dans les processus de développement.

# 1. Les molécules chaperonnes

Cette fonction est la plus connue chez les hsp. Les points les plus marquants de leurs propriétés sont les suivants (DURAND, 1991) :

- elles sont impliquées dans les changements conformationnels majeurs et empêchent les interactions pouvant conduire à la formation d'aggrégats;

- elles ne sont pas partie prenante des systèmes multi-enzymatiques dont elles ont catalysé l'assemblage;

- elles développent généralement une activité ATPase lors de la dissociation du complexe qui ne met jamais en jeu des liaisons covalentes.

Comme cela est indiqué sur le tableau, plusieurs familles d'hsp sont concernées. En particulier, les protéines homologues à des protéines de choc thermique de 70 kDa (hsp70) représentent le groupe le mieux connu; une deuxième famille, nommée chaperonines, regroupe des protéines existant dans les organites ainsi que des analogues des protéines GRO EL et GRO ES de *E. coli*. La dernière famille est celle des *small hsp* (sHsp, pour protéine de choc thermique de faible poids moléculaire), de taille variant entre 15 et 30 kDa.

Commençons par la famille des hsp70 qui est aujourd'hui certainement celle pour laquelle les connaissances sont les plus avancées. Les hsp70 sont largement répandues chez toutes les espèces, d'*E. coli* jusqu'à l'homme. Le tableau suivant indique les fonctions principales des différents membres de cette famille. Il faut noter une propriété importante commune aux hsp70 qui est de fixer l'ATP.

| Organisme/localisation         | Fonction des protéines  |  |  |  |  |
|--------------------------------|---|--|--|--|--|
| <u>E. coli</u>                 | • produit du gène DnaK, indispensable pour                        |  |  |  |  |
|                                | la réplication du phage λ   |  |  |  |  |
| Eucaryotes :                   |   |  |  |  |  |
| Cytoplasme                     | • transport de précurseurs de protéines dans les                  |  |  |  |  |
|                                | mitochondries et le réticulum endoplasmique                       |  |  |  |  |
|                                | désassemblage des clathrines dans le processus                    |  |  |  |  |
|                                | d'endocytose  |  |  |  |  |
| Réticulum endoplasmique        | • fixation des chaînes lourdes des                                |  |  |  |  |
|                                | immunoglobulines (protéine BiP)                                   |  |  |  |  |
|                                | • fixation des polypeptides en cours de la                        |  |  |  |  |
|                                | glycosylation dans les cellules privées de                        |  |  |  |  |
|                                | glucose (protéine GRP78)  |  |  |  |  |
| Mitochondrie et chloroplaste   | <ul> <li>réception de précurseurs de protéines dans la</li> </ul> |  |  |  |  |
|                                | matrice des mitochondries et le stroma des                        |  |  |  |  |
|                                | chloroplastes   |  |  |  |  |
| Noyau                          | <ul> <li>on trouve des hsp70 dans les régions</li> </ul>          |  |  |  |  |
|                                | nucléolaires endommagées par des chocs                            |  |  |  |  |
|                                | thermiques  |  |  |  |  |
| Membranes                      | • "processing" des antigènes et présentation en                   |  |  |  |  |
| (la localisation est disputée) | association avec les molécules de classe II                       |  |  |  |  |
|                                | du complexe majeur d'histocompatibilité                           |  |  |  |  |
|                                | (DENAGEL et coll., 1992)  |  |  |  |  |
|                                |   |  |  |  |  |

**Tableau 2** : Localisation des molécules chaperonnes et leurs fonctions (d'aprèsDUDLER et coll., 1991, avec quelques modifications).

La deuxième famille de molécules chaperonnes impliquées dans l'assemblage de complexes protéiques est celle dont les composants ont une masse moléculaire de 60 kDa (GRO EL chez *E. coli* ou hsp60 chez les autres espèces) et de 10 kDa (GRO ES ou hsp10). Ces protéines qui agissent sous forme de complexes, sont indispensables pour la vie des cellules et aussi pour l'assemblage des particules de phages  $\lambda$ , T4 et T5. Chez les eucaryotes, on les trouve dans la mitochondrie et le chloroplaste; il est probable qu'elles reçoivent les protéines qui ne sont pas encore repliées, apportées par la hsp70. La fixation des protéines - destinées au transport dans les organites - après leur synthèse sur les hsp70, éviterait un repliement prématuré. Dans les organites, les hsp70 mitochodriales/chloroplastiques peuvent les accueillir et assurer leur repliement. Une alternative est qu'elles les transmettent aux complexes hsp60/hsp10 pour finir l'assemblage ou le repliement.

Très récemment, une troisième famille de molécules chaperonnes a été découverte regroupant les hsp de petite taille (small hsp, sHsp) et les  $\alpha$ -B-cristallines (JAKOB et coll., 1993). Leur taille varie entre 15 et 30 kDa. Elles existent sous forme d'un complexe de haut poids moléculaire chez les vertébrés, les champignons et les plantes. Ce complexe a un poids moléculaire de 800 kDa et contient environ 32 sous-unités (ARRIGO et coll., 1988; BEHLKE et coll., 1991). D'une façon intéressante, les sHsps sont aussi exprimées en absence de stress. Ces protéines montrent non seulement une homologie de séquence remarquable avec les  $\alpha$ -crystallines (protéines formant le crystallin des céphalopodes) et le *Schistosoma* egg-antigen p40, mais aussi un profil d'hydrophobicité comparable (DE JONG et coll., 1988). De plus, la hsp27 humaine d'une lignée cellulaire cancéreuse confère une résistance contre le médicament anticancereux doxorubicine (OESTERREICH et coll., 1993).

L'expression des sHsp est liée à de multiples phénomènes: croissance cellulaire et différenciation; elle est augmentée lors de la phase stationnaire des cellules tumorales (GAESTEL et coll., 1989), du développement des différents stades chez *Brughia pahangi* (DEVANEY et coll., 1992) et de la drosophile (PAULI et coll., 1990). De plus, il a été montré que leur surexpression augmente non seulement la thermotolérance des

51

cellules (LANDRY et coll., 1989) mais inhibe également la prolifération cellulaire (KNAUF et coll., 1992). On sait aussi que la sHsp du pigeon est capable d'inhiber la polymérisation de l'actine *in vitro* (MIRON et coll., 1991).

L'origine moléculaire des membres de la famille des crystallines est très diverse. Cette famille regroupe des protéines qui jouent un rôle dans la fonction de réfraction dans les lentilles (WISTOW, 1993). D'autre part, elles exercent normalement une autre fonction qui est souvent enzymatique. Par exemple la S-crystalline, trouvée chez les céphalopodes, présente de nombreuses homologies avec les GST (TOMAREV et coll., 1993). Cependant, l'homologie de séquence entre les différentes classes de crystallines est très faible ou peu significative, en raison de leurs différentes origines.

# 2. Le Rôle régulateur des hsp dans la différenciation des parasites

Le choc thermique provoque souvent un arrêt de prolifération des cellules et une baisse de leur métabolisme. Chez de nombreux parasites, le changement de température fait partie de leur cycle de différenciation: ils passent d'un hôte poïkilotherme à un hôte homéotherme et vice-versa. L'augmentation ou la baisse de température a des effets considérables sur l'activité des enzymes et la fluidité des membranes. Le parasite est donc obligé de s'adapter. Il se protège en exprimant des hsp (voir tableau) stabilisant les protéines et en synthétisant d'autres types de lipides membranaires pour maintenir la fluidité de la membrane plasmique. L'expression des hsp est donc ainsi corrélée avec la différenciation du parasite d'un stade à l'autre. Les hsp sont également impliquées dans certains processus de développement chez un grand nombre d'organismes (LINDQUIST, 1986), notamment dans l'embryogénèse (BENSAUDE, 1983) et l'érythropoïèse (MANDALESHWAR et coll., 1984). VAN DER PLOEG et coll. (1985) ont montré qu'un choc thermique peut induire une différenciation des promastigotes L. major en amastigotes, ce qui entraîne aussi un changement dans le profil d'expression des hsp70. De plus, il a été montré que l'expression des gènes codant pour les hsp70 et hsp83 augmente avant la différenciation de stade promastigote en stade amastigote. Des

amastigotes axéniques et des promastigotes soumis à un choc thermique sont plus infectieux que des promastigotes non-traités (SMEJKAL et coll., 1988). La présence des hsp avant la transmission du parasite pourrait préadapter celui-ci au stress subi dans son hôte mammifère (SHAPIRA et coll., 1988). Cependant, chez une souche qui n'est plus capable de se différencier, toutes les hsp70 sont exprimées normalement, indiquant que ces protéines ne sont pas impliquées directement dans les mécanismes de différenciation (LEE et coll., 1988). Dans le cas de L. donovani, l'hsp70 est présente dans tous les stades du cycle évolutif (MACFARLANE et coll., 1990) et les promastigotes de L. major expriment, à température normale, la plupart de ces hsp (SMEJKAL et coll., 1988). Après choc thermique (37-41°C), les épimastigotes de T. brucei expriment le profil classique des hsp mais ces protéines sont aussi présentes dans la phase exponentielle de croissance, à température habituelle (DE CARVALHO et coll., 1990). Dans les formes trypomastigotes, la plupart des hsp synthétisées à 29°C sont également présentes à 24°C. L'abondance des hsp dans les formes trypomastigotes métacycliques pourrait donc être un processus qui a lieu dans l'insecte vecteur, en vue de l'adaptation du parasite à son environnement futur chez l'hôte vertébré (ALCINA et coll., 1988).

| <u>Pathogène</u> | <u>hsp</u>             | stade de développement                         | <u>hsp_antigénique</u>  |
|------------------|------------------------|--|-------------------------|
| L. major         | hsp82, hsp70*, hsp65,  | promastigotes non-infectieux (phase log)       |                         |
|                  | hsp41, hsp23, hsp22    | et infectieux (phase stationnaire) de culture, |                         |
|                  |                        | dans un milieu sans sérum et changement        |                         |
|                  |                        | de température de 26 à 34°C                    |                         |
| L. mexicana      | hsp83, hsp70, hsp68    | promastigotes cultivés à 34°C                  |                         |
|                  | hsp27, hsp26, hsp23    |  |                         |
|                  | hsp22                  |  |                         |
| L. tropica et    | hsp88, hsp74, hsp54    | promastigotes cultivés à 37 ou 40°C            |                         |
| et L. enrettii   |                        |  |                         |
| L. donovani      | hsp88, hsp74, hsp54    | hsp88, hsp74, hsp54 dans les pro-              | hsp70                   |
|                  | hsp70*                 | mastigotes cultivés à 37 ou 40°C;              |                         |
|                  |                        | hsp70 tous les stades                          |                         |
| T. cruzi         | hsp83*, hsp70*, hsp60* | hsp83, hsp70, hsp60 dans les                   | protéine de 85 kDa      |
|                  | hsp55, mhsp70          | épimastigotes cultivés à 37-41°C;              | cross-réactive avec les |
|                  |                        | hsp83, hsp70, hsp60, hsp55 dans                | hsp83 et hsp90, dans    |
|                  |                        | les trypomastigotes cultivés à 27°C            | les épimastigotes et le |
|                  |                        | et à 37°C                                      | trypomastigotes; hsp7   |
| T. brucei        | hsp83, hsp70*          | dans tous les stades mais plus après           |                         |
|                  |                        | exposition à 37°C                              |                         |
| C. fasciculata   | mhsp70*                |  |                         |
| P. falciparum    | hsp70*, hsp90*         | protéine spécifique du stade intra-            | hsp70, hsp90            |
|                  | grp78-like*            | érythrocytaire                                 |                         |
| P. chabaudi      | hsp70*                 | dans tous les stades                           | hsp70                   |
| E. histolytica   | hsp70*                 | trophozoïtes                                   | hsp70                   |
| S. mansoni       | hsp86*, hsp70*, hsp60, | hsp60, hsp58 dans les cercaires après          | protéine de 86 kDa      |
|                  | hsp58, hsp27 (p40)*    | exposition à 37-42°C; hsp70, hsp86             | cross-réactive avec les |
|                  |                        | exprimées constitutivement dans les            | hsp83 et hsp90;         |
|                  |                        | schistosomules à 37°C; p40 exprimée            | p40                     |
|                  |                        | constitutivement dans les œufs et les          |                         |
|                  |                        | miracidies                                     |                         |
| S. japonicum     | hsp70                  | exprimée constitutivement                      | hsp70                   |
| T. annulata      | hsp70*                 | exprimée constitutivement à 28°C,              |                         |
|                  |                        | augmentée à 37°C                               |                         |
|                  |                        |  |                         |

**Tableau 3**: Listing des hsp parasitaires. \* signifie que la protéine a été séquencée.

L'un des effets du choc thermique consiste en l'inhibition de l'épissage de l'ARNM. Ceci a été mis en évidence chez la drosophile (YOST et coll., 1986) et les cellules HeLa (MAYRAND et coll., 1983). Après choc thermique, l'assemblage des ribonucléoprotéines et des U snRNP (pour *uridine-rich small nuclear ribonucleoproteins*) et d'autres facteurs, créent le "spliceosome" (MANIATIS et coll., 1987; SHARP, 1987a,b). Chez *T. brucei*, un choc thermique (42°C) augmente la quantité dARN steadystate du SL, une réduction de la quantité des structures Y et une accumulation des transcrits polycistroniques des gènes de l' $\alpha$ – et  $\beta$ -tubuline (MUHICH et coll., 1988). D'une façon intéressante, le messager de la hsp 70 est maturé normalement (MUHICH et coll., 1989). Cependant, chez *Leishmania amazoniensis*, aucun changement au niveau de l'ARN "steady-state" de SL n'est observé mais le SL RNP semble être sensible au choc thermique (MICHAELI et coll., 1993). L'accumulation des RNA du SL chez *T. brucei* pourrait être due à sa nonutilisation provoquée par l'inhibition de l'épissage.

# 3. Interaction hôte/parasite - hsp - immunité

Ce triangle de mécanismes replace les protéines de stress dans la co-évolution des parasites et de leurs hôtes. Lors de l'infection de l'hôte par le parasite, l'hôte répond souvent par une inflammation locale et par la fièvre. Bien sûr, cela induit des hsp chez certains parasites, mais également chez l'hôte. FORSDYKE (1985) a suggéré que l'accumulation de protéines anormales chez l'hôte induirait une réponse de stress qui pourrait être impliquée dans l'élimination des pathogènes *via* un mécanisme non-immunologique, par discrimination du soi/non-soi. L'induction des hsp serait donc une première ligne de défense contre des pathogènes notamment intracellulaires. Effectivement, des protéines du non-soi peuvent dans certains cas, induire une réponse du type choc thermique; ceci a été montré après infection par des virus (YOUNG et coll., 1990) et des parasites intracellulaires (POLLA, 1991). De plus, les macrophages semblent utiliser des protéines de stress afin de se protéger contre les effets de leurs

propres radicaux libres de l'oxygène, radicaux produits pendant l'infection par des parasites se multipliant dans des cellules phagocytaires (YOUNG et coll., 1990). Dans le cas de *Salmonella typhimurium*, le germe synthétise des hsp, en réponse à la présence de péroxyde d'hydrogène (CHRISTMAN et coll., 1985). Une souche mutée de *S. typhimurium* qui n'est plus capable de générer une réponse de stress, n'est plus résistante vis-à-vis de la lyse par des macrophages (BUCHMEIER et coll., 1990).

La famille des hsp70 est la famille la mieux caractérisée parmi les protéines de stress. La comparaison des séquences des différentes hsp70 a révélé qu'elles sont fortement conservées dans leur extrémité N-terminale et moins conservées du côté C-terminal, ce qui est aussi en partie vrai pour la hsp90. Cette forte conservation structurale a renforcé l'hypothèse que leur fonction est identique dans toutes les cellules.

Des tests d'immuno-reconnaissance des hsp parasitaires par les sérums de patient infectés des régions endémiques montrent qu'elles font partie des antigènes les plus immunogéniques (**tableau 4**) :

| <u>Parasite</u> | <u>famille de hsp</u> | <u>%</u> |  |
|-----------------|-----------------------|----------|--|
| S. mansoni      | hsp 70                | 100      |  |
|                 | hsp 40                | 90       |  |
| S. japonicum    | hsp 70                | 100      |  |
| O. volvulus     | hsp 70                | 50       |  |
| B. pahangi      | hsp 70 (Bpa 26)       | 83       |  |
|                 | hsp 70 (Bpa 36)       | 30       |  |
| P. falciparum   | hsp 70-1              | 61       |  |
|                 | hsp 70-2              | 38       |  |
| L. donovani     | hsp 70                | 53       |  |
| T. cruzi        | hsp 70                | 100      |  |

**Tableau 4** : Pourcentage des sérums de patients infectés qui réagissent avec la hsp duparasite infectant (MAZIER et coll., 1991).

Ainsi, les hsp70 font partie des antigènes majeurs de parasites, non seulement à cause de leur abondance (jusqu'à 1 % des protéines synthétisées par le schistosome adulte; MAZIER, 1991), mais aussi du fait de leur immunogénicité. D'une façon intéressante, la réponse humorale contre les hsp70 semble être très spécifique et discriminante: en effet, les anticorps anti-hsp70 parasitaires ne reconnaissent normalement pas les hsp70 de l'hôte et rarement les hsp70 d'autres espèces (MAZIER et coll., 1991). Ceci n'est pas le cas pour les anticorps obtenus à partir des hsp70 dénaturées: la réactivité croisée est alors importante entre les différentes hsp70 (MAZIER et coll., 1991). Cependant, les épitopes immunodominants des hsp70 natives sont probablement localisés dans des régions faiblement conservées (MAZIER et coll., 1991).

L'immunisation en utilisant une hsp70 a abouti à une protection contre l'infection par *Plasmodium falciparum* (MAZIER et coll., 1991). De plus, l'hsp70 mycobactérienne a été utilisée comme adjuvant et protéine porteuse pour un peptide issu de la protéine circumsporozoite (CS) de *P. falciparum*, dans les tests d'immunisation d'un singe (PERRAUT et coll., 1993).

Cette utilisation de la hsp70 parasitaire comme adjuvant pose évidemment le problème des réactions croisées avec les hsp70 de l'hôte. Comme nous l'avons déjà mentionné, la réponse vis-à-vis des hsp70 est relativement spécifique. Néanmoins, l'autoimmunité est aussi un des problèmes qu'il faut prendre en considération pour les expériences d'immunisations avec les hps70. En effet, même pendant l'infection naturelle par *P. falciparum*, le Pfhsp70 induit des anticorps auto-réactifs (MATTEI et coll., 1989) qui sont éventuellement dûs à l'activation polyclonale des lymphocytes B. Mais, jusqu'à maintenant, il n'y a aucune preuve de leur implication dans la pathologie.

Dans la maladie de Chagas, où la pathologie est en partie due aux clones autoréactifs, aucune réactivité croisée entre les anticorps anti hsp70 de *T. cruzi*, provenant de la phase chronique de l'infection chagasique, et la hsp70 humaine n'a été observée (ENGMAN et coll., 1989). Tout le problème de l'immunologie de la hsp70 repose sur la présentation de cette protéine au système immunitaire. En effet, la protéine native n'induit normalement pas d'anticorps autoréactifs. Ceci n'est pas vrai pour la hsp65 des bactéries qui induit des anticorps et des cellules T  $\gamma/\delta$  autoréactives (KAUFMANN, 1990).

Dans les parasites, la hsp majoritairement reconnue par le système immunitaire est la hsp70 mais parfois, la hsp90 ou les hsp de petits poids moléculaires le sont aussi. Par contre, la hsp60 n'est, jamais reconnue (MORANGE et coll., 1991). Au cours d'une co-infection de l'homme par *T. cruzi* et *L. bransiliensis bransiliensis*, la hsp70 est le déterminant antigénique majeur (YEYATI et coll., 1991).

*T. cruzi* contient plusieurs gènes (> 10, organisés dans un cluster) codant pour les isoformes de la hsp70 (REQUENA et coll., 1988). Certains de ces gènes sont exprimés d'une façon constitutive (28°C), d'autres sont inductibles par un choc thermique (37°C) (REQUENA et coll., 1992). Le locus des hsp70 chez *T. brucei* comporte 7 gènes (GLASS et coll., 1986) qui ont une sensibilité différente aux chocs thermiques (LEE et coll., 1990; LEE et coll., 1990a). *L. major* a arrangé les gènes dans deux loci différents: 4 gènes de hsp70 dans le premier locus et un seul gène dans le deuxième. Le premier est inductible par choc thermique tandis que le deuxième est exprimé de façon constitutive (LEE et coll., 1988).

Les hsp70 mitochondriales (mhsp70) de *T. cruzi* -plus homologues aux hsp70 bactériennes qu'aux hsp70 eucaryotes- (ENGMAN et coll., 1989), *Crithidia fasciculata* (EFFRON et coll., 1993) et de *Saccharomyces cerevisiae* (CRAIG et coll., 1989), contiennent un peptide signal qui permet le transfert dans la mitochondrie. Celles de *Trypanosoma cruzi* sont codées par deux gènes (ENGMAN et coll., 1989). Jusqu'à maintenant, on ne sait pas si les deux gènes des mhs70 de *T. cruzi* sont exprimés de façon différente ou non.

L'expression différentielle des hsp des parasites pourrait être un mécanisme d'adaptation à leur hôte qui est souvent homéotherme et possède une température de 10 à 15°C supérieure à celle des hôtes intermédiaires. L'hôte, de son côté, réagit à l'infection parasitaire par l'expression immédiate des hsp. Malgré l'homologie des hsp entre elles, des réactions autoimmunes sont rares. Ceci montre qu'il y a un équilibre entre les deux organismes, équilibre qui s'est établi au cours de la co-évolution du parasite et de son hôte.

# V. Mécanismes de résistance et de détoxification

# 1. <u>Mécanismes impliqués dans les processus de résistance et de</u> <u>détoxification</u>

### a) Mécanismes de résistance

L'environnement impose aux organismes, de nombreux stress auxquels il doivent s'adapter. Les facteurs de stress sont par exemple, les variations de la température, d'osmolarité, les radiations, le niveau d'oxydo-réduction et les xénobiotiques (**figure 6**).

Des êtres vivants comme les parasites peuvent changer brusquement de milieu de vie, en passant d'une forme libre à une vie parasitaire ou l'inverse ou encore, en passant d'un hôte à un autre.

Afin de répondre à ces différentes conditions de vie, les organismes ont développé des mécanismes de résistance. La résistance aux xénobiotiques est présente chez tous les organismes. Les processus impliqués sont très divers. En effet, les xénobiotiques peuvent être détoxifiés, éliminés; leur passage transmembranaire peut être inhibé ou encore, leurs cibles peuvent être modifiées.

# Résistance naturelle des organismes



Schema des résistance chez les organismes (d'après HAYES & WOLF, 1988)



Tous les mécanismes de résistance décrits existent chez les parasites. La résistance des parasites devient un problème de santé publique majeur. En effet, le traitement des patients par des produits anti-parasitaires a conduit à l'apparition de nombreuses souches résistantes.

- Dans le cas du paludisme, l'apparition de la résistance de *Plasmodium falciparum* à la chloroquine fait des ravages parmi les populations touchées alors que le mécanisme impliqué n'est pas encore identifié. Un phénomène de résistance multiple est par ailleurs connu pour les espèces du genre *Plasmodium* (revue par SCHUSTER et coll., 1993).

- Chez certains schistosomes, la perte d'une activité enzymatique est à l'origine de la résistance vis-à-vis des hycanthones/oxamniquines (revue par CIOLI et coll., 1993).

- La résistance chez *Giardia intestinalis*, *Trichomonas vaginalis* et certaines bactéries Gram-positives comme *Bacteroides fragilis* et *Clostridium* est apparue après traitement au Métronidazole contre les infections provoquées par des germes anaérobies. La résistance serait due à une diminution de l'expression ou à l'absence de certaines enzymes. Ceci est le cas pour la pyruvate : ferridoxine : oxydoréductase et l'hydrogénase chez *Gardia* et *Trichomonas* (pour revue JOHNSON, 1993; UPCROFT et coll., 1993).

- Chez *Leishmania*, des résistances vis-à-vis des antimoines pentavalents sont apparues dans les années 40 et se répandent encore (pour revue OUELLETTE et coll., 1993).

- Chez les trypanosomes africains, la résistance vis-à-vis de plusieurs médicaments est due à la déficience en un transporteur de purines. La nouvelle drogue  $DL-\alpha$ difluorométhylornithine (DFMO) est active contre les Trypanosomes d'Afrique de l'ouest mais pas contre ceux d'Afrique de l'est. D'autres résistances contre le melarsoprol, les diamidines et la suramine sont fréquentes (pour revue, BACCHI, 1993).

## b) Mécanismes de détoxification

Parmi les différents mécanismes de résistance, la détoxification des xénobiotiques prend une place importante. On peut distinguer trois étapes dans le métabolisme des xénobiotiques: 1. Rendre les xénobiotiques plus hydro-solubles par oxydation, réduction ou hydrolyse (phase I). Les enzymes qui catalysent ces réactions sont les cytochromes P-450 et les oxydases flaviniques (ISHIKAWA, 1992). Ces réactions de phase I peuvent permettre l'engagement de certains xénobiotiques dans des réactions de phase II.

2. Conjugaison de certains produits de la phase I avec le GSH, le glucuronate (dans le règne animal) ou les résidus malonyl- ou glycosyl (dans le règne végétal) (phase II). Ceci les rend plus hydrosolubles et les prépare pour être exportés hors de la cellule. Les enzymes catalysant le transfert du xénobiotique au GSH sont nommées glutathion *S*-transférases (GST). Certaines GST sont aussi impliquées dans le métabolisme des produits biologiquement actifs comme le leucotriène A4 des prostaglandines (SIES, 1988) et l'hépoxiline A3 (ISHIKAWA, 1992).

3. Exportation des glutathion S-conjugués par une pompe ATP-dépendante (ISHIKAWA, 1992; MARTINOIA et coll., 1993) (phase III). Cette pompe n'exporte pas seulement les xénobiotiques conjugués avec le glutathion mais également le leucotriène A4, les prostaglandines A et J et l'hépoxiline A3.

Bien que ce mécanisme de détoxification élimine certains xénobiotiques, certains des produits intermédiaires sont plus toxiques que le produit de départ.

# 2. Enzymes impliquées dans les mécanismes de résistance et de détoxification

## a) Les glutathion S-transférases ou GST

Les GST occupent une place clé dans la détoxification et le transport des molécules lipophiles (MANNERVIK et coll., 1985a). Elles catalysent l'attaque nucléophile du glutathion ( $\gamma$ -Glu-Cys-Gly) sur une large gamme de composés hydrophobes possédant un centre électrophile (époxydes, hydropéroxydes, thiocyanates, esters, alkènes, lactones,...). Une autre activité de certaines GST a été mise en évidence en utilisant les hydropéroxydes comme substrat; il s'agit de l'activité glutathion péroxydase indépendante du sélénium (KETTERER et coll., 1988).

La séquence primaire des différentes GST a permis de distinguer trois grandes classes:

- les GST cytosoliques,

- les GST microsomales,

- les GST ayant une activité "macrophage inhibitory factor" (MIF).

## (1) Les GST cytosoliques

Ce groupe est le plus vaste et le plus étudié des GST. Les enzymes sont associées sous forme d'homo- ou d'hétérodimères, chaque sous-unité possède un poids moléculaire de 23 à 28 kDa.

La classification est basée selon plusieurs critères:

- le poids moléculaire,

- le point isoélectrique,

- les propriétés enzymatiques,

- les spécificités vis-à-vis des différents substrats,

- la séquence primaire en acides aminés.

Cinq familles multigéniques ont été répertoriées:  $\alpha$ ,  $\mu$ ,  $\pi$ ,  $\sigma$ , et  $\theta$  (BUETLER et coll., 1992). Les sous-unités des GST sont souvent codées par des gènes multiples. Cette diversité est certainement due à la duplication d'un gène ancestral, suivie d'une diversification par mutations.

### La famille des $\alpha$ -GST

Toutes les  $\alpha$ -GST connues ont été caractérisées exclusivement chez les vertébrés. Parmi ces GST, la GST Ya du rat est la mieux connue. L'expression de cette enzyme est souvent liée à la présence de phénobarbital, de composés aromatiques plans, de *tert*-butyl hydroquinone, de métaux lourds, d'arsenate et d'arsenite (revue par DANIEL, 1993). De plus, les  $\alpha$ -GST de la souris sont impliquées dans la détoxification de certains xénobiotiques, par exemple l'aflatoxine B<sub>1</sub>-8,9-époxyde (BUETLER, 1992).

La famille des  $\mu$ -GST contient des protéines de vertébrés, de nématodes et de trématodes. Ces GST sont également impliquées dans la détoxification des xénobiotiques comme par exemple, certains carcinogènes. En effet, il a été montré que des fumeurs déficients en  $\mu$ -GST ont un risque plus élevé de développer un cancer du poumons (KIHARA et coll., 1993).

Les GST de *Schistosoma* et de *Fasciola hepatica* ne sont pas classifiées. La GST de 28 kDa de *S. mansoni* (Sm28GST) et la GST de 26 kDa de *S. japonicum* (Sj26GST) possèdent des spécificités de substrat et des sensibilités envers les inhibiteurs d'un type intermédiaire entre les GST  $\alpha$ ,  $\mu$  et  $\pi$  (WALKER et coll., 1993). Cependant, l'analyse de plusieurs paramètres laisse penser que la Sm28GST est du type  $\mu$  et la Sj26GST, d'un type intermédiaire à  $\alpha$  et  $\mu$ . Pourtant, une simple comparaison de la séquence N-terminale (71 acides aminés) place la Sm28GST dans la famille des  $\sigma$ -GST (BUETLER et coll., 1992). Des protéines homologues à la Sm28GST ont été clonées chez *S. haematobium* et *S. bovis* (TROTTEIN et coll., 1992).

Lorsqu'on immunise des rongeurs ou des singes avec la Sm28GST, ceux-ci montrent une certaine protection vis-à-vis de l'infection par *S. mansoni*. L'immunisation diminue également la fécondité des femelles (BOULANGER et coll., 1991). De même, l'immunisation des bovins par la GST de 28 kDa diminue la production des oeufs chez *S. bovis* mais pas la charge parasitaire (BUSHARA et coll., 1993). De plus, l'immunisation des ovins par la GST de 28kDa de *Fasciola hepatica* permet une protection non négligeable contre l'infection par ce trématode (SEXTON et coll., 1990).

### La famille des $\pi$ -GST

Les GST de la famille  $\pi$  sont en général codées par un seul gène par espèce et très peu d'isoformes ont été décrits jusqu'à aujourd'hui. Une seule  $\pi$ -GST d'invertébré a été séquencée jusqu'à maintenant (WESTON et coll., 1989) mais aucune caractérisation enzymatique n'a été réalisée. Il est cependant intéressant de noter que l'expression de ce type de GST est augmentée dans certains types de tumeurs par un facteur qui agit en *trans* (MORIMURA et coll., 1993) et qui reste à caractériser.

## La famille des o-GST

En 1992, BUETLER a proposé à partir d'un alignement de séquences, de considérer une famille supplémentaire: les  $\sigma$ -GST. Cette nouvelle famille contiendrait les GST de 28kDa des espèces du genre *Schistosoma*, les GST et les S-crystallines des céphalopodes. Cependant, les caractéristiques enzymatiques des GST 28 kDa se rapprochent plutôt de celles de la famille  $\mu$ .

On soupçonne que les GST et les S-crystallines des céphalopodes ont le même ancêtre moléculaire. Bien que les S-crystallines ne montrent aucune activité GST, elles sont en matière de séquence primaire très proches des GST (TOMAREV et coll., 1993; HARRIS et coll., 1991).

## La famille des $\theta$ -GST

La famille  $\theta$  des GST est la plus hétérogène. Elle regroupe des protéines qui appartiennent aux différents ordres du monde animal et végétal ainsi que des bactéries. Comme cela a été déjà mentionné, cette famille semble être la plus ancienne (PEMBLE et coll., 1992).

En général, les GST classées dans cette famille ont un  $K_m$  plus élevé que les autres. Par exemple, la GST 5-5 du rat possède un  $K_m$  qui est environ 50 fois plus élevé que celui des GST  $\alpha$ ,  $\mu$  et  $\pi$ . Par ailleurs, cette GST n'est pas inhibée par les glutathion *S*conjugués, ce qui est le cas dans les familles  $\alpha$ ,  $\mu$  et  $\pi$  (MEYER, 1993).

Certaines  $\theta$ -GST sont également induites par des hormones végétales (MEYER Jr et coll., 1991; TAKAHASHI et coll., 1992a).

D'autres membres de cette famille sont impliqués dans la détoxification des herbicides (SHAH et coll., 1986) ou encore dans la réponse du blé, après infection par un champignon (DUDLER et coll., 1991). Les GST bactériennes sont impliquées dans le métabolisme des hydrocarbures halogénés (LA ROCHE et coll., 1990) et dans la dégradation de la lignine (DANIEL, 1993).

Cette famille contient également des protéines pour lesquelles aucune activité GST n'a pu être mise en évidence jusqu'à présent, telles que la protéine SSP d'*Escherichia coli* ou l'URE 2 de la levure. La SSP est induite quand il existe une déficience en acides aminés (REEH et coll., 1976; FUKUDA et coll., 1985) et l'URE 2 est impliquée dans l'inactivation de la glutamine synthétase (COSCHIGANO et coll., 1991).

En 1991, HARRIS et coll. (1991) ont décrit une GST mitochondriale du foie de rat codée par le noyau contenant apparemment une séquence amino-terminale de 5 acides aminés nécessaires à la translocation dans la mitochondrie.

| <u>GST:</u>             | α | μ                     | π | θ | <u> </u>         |
|-------------------------|---|-----------------------|---|---|------------------|
| Vertébrés:              |   |                       |   |   |                  |
| homme                   | Х | Х                     | Х |   |                  |
| rat                     | Х | Х                     | Х | X |                  |
| souris                  | Х | Х                     | Χ |   |                  |
| hamster                 |   | Х                     |   |   |                  |
| cochon d'Inde           |   | X                     |   |   |                  |
| lapin                   | Х |                       |   |   |                  |
| bovin                   |   |                       | Х |   |                  |
| porc                    |   |                       | Х |   |                  |
| poulet                  | Х | Х                     | Х | Х |                  |
| carrelet                |   |                       |   | Х |                  |
| truite                  |   |                       | Х |   |                  |
| Céphalopodes:           |   |                       |   |   |                  |
| Ommastrephes sloanei    |   |                       |   |   | $\mathbf{X}^1$   |
| O. sloanei pacificus    |   |                       |   |   | х                |
| Loligo vulgaris         |   |                       |   |   | х                |
| Octopus dofleini        |   |                       |   |   | $\mathbf{X}^{1}$ |
| Plathelminthes:         |   |                       |   |   |                  |
| Schistosoma mansoni     |   | <b>X</b> <sup>3</sup> |   |   | $\mathbf{X}^2$   |
| S. japonicum            |   | X <sup>3</sup>        |   |   | $\mathbf{X}^2$   |
| S. bovis                |   |                       |   |   | $\mathbf{X}^2$   |
| S. haematobium          |   |                       |   |   | $\mathbf{X}^2$   |
| Fasciola hepatica       |   | Х                     |   |   |                  |
| Nemathelminthes:        |   |                       |   |   |                  |
| Caenorhabditis elegans  |   |                       | Х |   |                  |
| Insectes:               |   |                       |   |   |                  |
| Drosophila spec.        |   |                       |   | Х |                  |
| Musca domestica         |   |                       |   | X |                  |
| Champignons:            |   |                       |   |   |                  |
| Issatshenkia orientalis |   |                       |   | Х |                  |

continu...

|                  | <u>GST:</u> | α | μ | π | θ | <u>_</u> σ |
|------------------|-------------|---|---|---|---|------------|
| Plantes:         |             |   |   |   |   |            |
| Tabac (protéine  | e parB)     |   |   |   | Х |            |
| Triticum         |             |   |   |   | X |            |
| <b>Ze</b> a maïs |             |   |   |   | Х |            |
| Daucus caryop    | hyllus      |   |   |   | Х |            |
| Bactéries:       |             |   |   |   |   |            |
| Methylobacteri   | um spec.    |   |   |   | Х |            |
| Proteus mirabi   | lis         |   |   |   | Х |            |
| Serratia marces  | scens       |   |   |   | Х |            |
| Mitochondrion    | du rat      |   |   |   | Х |            |
|                  |             |   |   |   |   |            |

**Tableau 5** : Présence des différentes familles de GST dans les espèces. Ce tableau estétabli à partir des résultats publiés par BUETLER et coll., 1992; PEMBLE et coll., 1992;TOMAREV et coll., 1993; WALKER et coll., 1993.

<sup>1</sup>) Ce groupe contient les S-crystallines.

- <sup>2</sup>) Les GST de 28 kDa sont répertoriées dans cette famille après l'alignement des séquences. Cependant plusieurs autres paramètres permettent leur classification dans la famille des μ-GST (WALKER et coll., 1993).
- <sup>3</sup>) Les GST de 26 kDa sont apparemment d'un type intermédiaire entre les familles  $\alpha$  et  $\mu$  (WALKER et coll., 1993).

Relation en terme d'évolution entre les différentes familles de GST.

En 1992, PEMBLE et coll. ont proposé un "arbre généalogique" des GST (**figure** 7). Les familles  $\alpha$ ,  $\mu$  et  $\pi$  possèdent les plus fortes homologies. L'hypothèse est que ces familles possèderaient un seul gène progéniteur, à partir duquel les différents types de GST ont evolué. Le mécanisme proposé est une duplication de ce gène, suivi d'une diversification par mutations. La famille  $\theta$  contient les protéines appartenant aux espèces phylogénétiquement les plus anciennes (bactéries, champignons). L'homologie des  $\theta$ -GST avec les autres familles atteint au maximum 7 % lorsque l'on considère la totalité de la séquence. Les régions conservées entre  $\theta$ -GST et les familles  $\alpha$ ,  $\mu$  et  $\pi$  se trouvent autour de l'acide aminé 70. Cependant, deux régions amino-terminales sont conservées uniquement entre  $\alpha$ ,  $\mu$ ,  $\pi$ . L'hypothèse proposée par les auteurs est donc que les GST des familles  $\alpha$ ,  $\mu$  et  $\pi$  ont évolué à partir d'une copie d'un gène codant pour une  $\theta$ -GST.

## Réactions chimiques catalysées par les GST.

Bien qu'il existe une grande hétérogénéité dans la séquence primaire des différentes familles de GST, ces protéines possèdent toutes des fonctions enzymatiques semblables.

1. Conjugaison avec le GSH

**RX + GSH .....> R-SG + HX** 

2. Réduction de fonction hydropéroxyde en fonction alcool

 $R-OOH + 2 GSH -----> R-OH + GSSG + H_2O$ 

3. Isomérisation par déplacement d'une double liaison

 $R_1$ -CH<sub>2</sub>-CH=CH-R<sub>2</sub> ----->  $R_1$ -CH=CH-CH<sub>2</sub>-R<sub>2</sub>

# Relation en terme d'évolution entre les différentes familles de glutathion S-transférases (d'après PEMBLE & TAYLOR, 1992, avec quelques modifications)



Figure 7

## Structure des GST cytosoliques

Les GST cytosoliques sont composées de deux domaines: le domaine aminoterminal d'environ 80 acides aminés fixant le glutathion (domaine G) et le domaine hydrophobe carboxy-terminal fixant le substrat (domaine H). En général, le domaine H ne possède pas une grande spécificité pour le substrat car de nombreuses GST sont capables de fixer plusieurs composés.

L'importance des différents résidus impliqués dans la fixation et l'activation du GSH ainsi que dans la catalyse, a pu être étudiée chez les GST cytosoliques de classe  $\alpha$ ,  $\mu$  et  $\pi$ . Deux approches ont été essentiellement utilisées:

- la diffraction aux rayons X,

- la mutagenèse dirigée.

## La structure tri-dimensionelle des GST cytosoliques

Les structures tri-dimensionnelles de trois GST ont été publiées :

| <u>GST</u>              | Ligand               | Auteur                    |
|-------------------------|----------------------|---------------------------|
| $\pi$ (porc, poumon)    | glutathion-sulfonate | (REINEMER et coll., 1991) |
|                         |                      | (DIRR et coll., 1991)     |
| $\pi$ (homme, placenta) | S-hexylglutathion    | (REINEMER et coll., 1992) |
| μ (rat, foie)           | glutathion           | (JI et coll., 1992)       |
|                         |                      |                           |

**Tableau 6:** Les GST analysées par diffraction en rayons X

Les structures secondaires (établies à partir des structures tri-dimensionnelles) de la  $\pi$ -GST de l'homme, de la  $\pi$ -GST du porc ainsi que de la  $\mu$ -GST du rat se ressemblent de façon étonnante.

| <u>Domaine</u> | <u>π hu</u>            | <u>main</u> | <u>π po</u> | <u>rc</u> | <u>µ</u> rat | _       |
|----------------|------------------------|-------------|-------------|-----------|--------------|---------|
| G              | β1                     | 3-7         | β1          | 3-7       | β1           | 2-7     |
|                | αA                     | 15-23       | αΑ          | 15-23     | α1           | 14-22   |
|                | β2                     | 29-32       | β2          | 29-32     | β2           | 27-32   |
|                | αBl                    | 35-39       | αB/3        | 10 38-43  | α2           | 43-46   |
|                | αB2                    | 40-44       |             |           |              |         |
|                | β3                     | 52-55       | β3          | 52-55     | β3           | 61-64   |
|                | β4                     | 58-61       | β4          | 58-61     | β4           | 67-70   |
|                | αC                     | 63-71       | αC          | 63-74     | α3           | 72-82   |
|                |                        |             |             |           |              |         |
| Н              | αD                     | 81-107      | αD          | 81-107    | α4           | 90-114  |
|                | αE                     | 109-133     | αΕ          | 109-133   | α5a          | 119-127 |
|                | 3 <sub>10</sub>        | 135-137     | 310         | 135-137   | a5b          | 130-141 |
|                | αF                     | 148-163     | αF          | 148-163   | α6           | 154-169 |
|                | <b>3</b> <sub>10</sub> | 168-170     |             |           |              |         |
|                | αG                     | 172-183     | αG          | 172-182   | α7           | 178-189 |
|                | аH                     | 185-191     | αH          | 185-192   | α8           | 191-197 |
|                | αΙ                     | 194-197     |             |           |              |         |
|                |                        |             |             |           |              |         |

**Tableau 7**: Comparaison des structures secondaires des différentes GST dont lesstructures tri-dimensionnelles sont connues (tableau 6).

α: hélices alpha (A-I pour les π-GST, 1-8 pour la  $\mu$ -GST), β: feuillets bêta (1-4 pour les trois GST);  $3_{10}$  est une forme hélicoïdale.
#### Eude des GST par mutagenèse dirigée

Grâce à l'analyse des structures tri-dimensionnelles et à l'aide de diverses modifications chimiques, les acides aminés importants ont pu être déterminés et choisis pour subir une mutation.

| <u>GST</u> | <u>mutation</u> | <u>activité</u><br>spécifi | <u>relative</u><br>que                 | <u>fixatior</u><br>du gli | <u>relative</u><br>Itathion | <u>reférence</u> |
|------------|-----------------|----------------------------|--|---------------------------|-----------------------------|------------------|
| a          | Y6F             | 2-8                        | <br>%                                  |                           |                             | 1                |
| α          | R13I            | 2.0                        | ~<br>~                                 |                           |                             | 2                |
| α          | 054N            | <b>2</b> ,0                | %                                      |                           |                             | 2                |
| α          | 25 F            | 0                          | %                                      |                           |                             | 2                |
| π          | Y7F             | 0.7                        | ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~ | 27.0                      | %                           | 3                |
| π          | R11S            | 51.0                       | %                                      | _ , , -                   |                             | 3                |
| π          | R13S            | 0.3                        | %                                      | 6,9                       | %                           | 3,4              |
| π          | L48F            | 9,0                        | %                                      | ,                         |                             | 4                |
| π          | D57K            | N N                        | /1                                     | 8,0                       | %                           | 4                |
| π          | G58F            | 21,0                       | %                                      |                           |                             | 4                |
| π          | Q64R            | 0,5                        | %                                      | 5,0                       | %                           | 4                |
| π          | Q62L            | 0,3                        | %                                      | 2,9                       | %                           | 3                |
| π          | I68Y            | NN                         | 1                                      |                           |                             | 4                |
| π          | H71R            | 11,0                       | %                                      |                           |                             | 4                |
| π          | L72F            | 0,6                        | %                                      | 4,0                       | %                           | 4                |
| π          | D96L            | 0,4                        | %                                      | 5,3                       | %                           | 3                |
| π          | R182S           | 11,0                       | %                                      |                           |                             | 4                |
|            |                 |                            |  |                           |                             |                  |

**Tableau 8**: La colonne intitulée "mutations" indique le résidu muté et sa position ainsi que le nouveau résidu; NM: non-mesurable; (1)  $\alpha$ -GST humaine (STERNBERG et coll., 1991); (2)  $\alpha$ -GST de rat (WANG et coll., 1993); (3)  $\pi$ -GST humaine (MONAHARAN et coll., 1992a); (4)  $\pi$ -GST humaine (MONAHARAN et coll., 1992b).

Les résultats de ces travaux mettent en évidence un certain nombre de résidus essentiels pour la fixation du glutathion ou la catalyse enzymatique. Une étude théorique de KARSHIKOFF et coll. (1993) renforce les observations de plusieurs auteurs qui ont montré que la tyrosine 6 ou 7 (selon les GST) est indispensable pour créer l'anion thiolate GS- qui possède une forte réactivité nucléophilique. L'anion thiolate représente une forme du glutathion particulièrement réactive. Ceci est étayé par l'observation que le pKa du glutathion fixé est plus faible que celui de GSH libre (pKa 6-7 au lieu de  $\approx$ 9) (LIU et coll., 1992; KARSHIKOFF et coll., 1993). De plus, la mutation du résidu Tyr7 en Phe diminue la fixation du GSH de 73 % mais supprime complètement l'activité enzymatique.

Les résidus formant la cavité dans laquelle le GSH est fixé, sont tous situés dans le domaine G. Cependant, un résidu du domaine H de l'autre sous-unité est impliqué dans la fixation du GSH (REINEMER et coll., 1991; JI, 1992). En effet, la GST native est un dimère composé de deux sous-unités homo- ou hétérologues.

#### (2) Les GST microsomales

Ce type de GST a été décrit dans un premier temps dans les microsomes du foie du rat puis a été trouvé en quantité plus faible, dans divers autres tissus. La distribution de ces protéines semble être liée à leur rôle de détoxification (MORGENSTERN et coll., 1984). Dans les hépatocytes, la GST microsomale est localisée dans la membrane et la lumière du réticulum endoplasmique (ou microsomale) plutôt que dans la membrane externe de la mitochondrie (MORGENSTERN et coll., 1984). Cette enzyme possède également une activité péroxydase sélénium-indépendante vis-à-vis des produits de péroxydation des lipides, comme par exemple l'hydropéroxyde de cumène (MORGENSTERN et coll., 1983) et l'hydropéroxyde de l'acide linoléique (MORGENSTERN et coll., 1988). Ainsi, les GST microsomales pourraient être impliquées dans la protection des membranes contre le stress oxydatif (MOSIALOU et coll., 1993).

Les GST microsomales ne sont pas induites par les inducteurs classiques des GST cytosoliques tels que le phénobarbital, le 3-méthachloranthrène et l'oxyde de *trans*-stilbène (MORGENSTERN et coll., 1980).

La structure des GST microsomales est essentiellement de nature hydrophobe (MORGENSTERN et coll., 1980). Ces enzymes ont un poids moléculaire d'environ 17 kDa et leur structure quaternaire s'organise en trimère (MORGENSTERN et coll., 1985).

#### (3) Les MIF ("migration inhibitory factors" pour facteur inhibiteur de migration)

Récemment, l'utilisation d'une colonne d'affinité du type *S*-hexylglutathion a conduit à la purification d'une protéine de poids moléculaire 13 kDa issue du foie de rat (BLOCKI et coll., 1992). Cette protéine possède une homologie presque totale avec le MIF humain dans sa région N-terminale déterminée par microséquençage peptidique. De plus, ce facteur s'avère positif dans le test d'inhibition de la migration des macrophages. L'activité vis-à-vis du 1-chloro-2,4-dinitrobenzène (CDNB) n'est pas significative. En revanche, cette protéine catalyse la conjugaison du glutathion avec le 1,2-époxy-3-(*p*-nitrophénoxy)propane.

Bien que cette protéine possède une activité enzymatique de type GST et qu'elle soit purifiée grâce à son affinité pour le glutathion, son homologie avec les GST est très faible. Jusqu'à présent, aucune donnée ne permet de savoir si cette activité glutathion *S*transférase est liée à la fonction MIF.

# b. Enzymes impliquées dans la défense contre les intermédiaires oxygène-réactifs (stress oxydatif).

En plus des GST, il existe de nombreuses enzymes intervenant dans les processus de détoxification et plus particulièrement contre les intermédiaires oxygène-réactifs (figure 8).

Les plus importants sont :

## Défense biologique contre le stress oxydatif



Défence biologique contre les dommages qui résultent du stress oxydatif (d'après WALSH et coll. 1991, modifié).

Des intermédiaires oxygènes réactifs (IOR) sont produits par les mécanismes d'oxydo-réductions. Ces IOR ( $O_2$ ,  $H_2O_2$  et HO<sup>•</sup>) sont très réactifs et donc toxiques pour les cellules. Ils peuvent être détoxifiés par des enzymes comme la SOD, les péroxydases et les catalases. Un autre moyen est la voie non-enzymatique par le glutathion ou le trypanothion.



(1) Les superoxydes dismutases (SOD).

Ces enzymes sont des métallo-enzymes, qui sont classées selon trois groupes majeurs:

- SOD à cuivre qui contiennent parfois aussi du zinc (Cu<sup>2+</sup>, Cu<sup>+</sup> -SOD),

- SOD à fer non-hémique (Fe<sup>3+</sup>, Fe<sup>2+</sup> -SOD),

- SOD à manganèse (Mn<sup>3+</sup>, Mn<sup>2+</sup> -SOD).

Ces enzymes catalysent la réaction de l'anion superoxyde en hydrogène-péroxyde:

 $2 O_2^- + 2H^+ \underline{SOD} > H_2O_2 + O_2$ 

(2) Les péroxydases (Px).

Nous pouvons distinguer trois grands groupes essentiels selon le co-facteur utilisé:

- les péroxydases fer-dépendantes,

- les péroxydases glutathion-dépendantes,

- les péroxydases trypanothion-dépendantes.

De plus, certaines de ces péroxydases sont des séléno-GSH-péroxydases.

Ces enzymes catalysent la réduction du péroxyde d'hydrogène ainsi que celle de certains hydropéroxydes:

# $2 \text{ GSH} + \text{H}_2\text{O}_2 \xrightarrow{P_X} > \text{GSSG} + 2 \text{H}_2\text{O}$ $2 \text{ GSH} + \text{ROOH} \xrightarrow{P_X} > \text{GSSG} + \text{ROH} + \text{H}_2\text{O}$

#### (3) Les catalases (Cat).

Ces enzymes qui sont des Fe-hémoprotéines qui possèdent une activité péroxydase. Les catalases catalysent la réaction suivante:

 $H_2O_2 + H_2O_2 \xrightarrow{Cat} O_2 + 2 H_2O$ 

# <u>3. Moyens de protection contre le stress oxydatif et les</u> <u>xénobiotiques chez les Trypanosomes</u>

#### a) Enzymes protégeant contre le stress oxydatif et implication des thiols

Il est connu que *Trypanosoma cruzi* est très susceptible au stress oxydatif. En effet, bien qu'il possède une superoxyde dismutase, probablement du type Cu, Zn-dépendante (BOVERIS et coll., 1977; DOCAMPO, 1990), ce parasite est déficient en catalase (DOCAMPO, 1990). Une activité péroxydase, dépendante de  $T[SH]_2$  a été démontrée chez *C. fasciculata* et *T. brucei* (HENDERSON et coll., 1987). Cette activité péroxydasique est de nature non-enzymatique chez *T. cruzi* (CARNIERI et coll., 1993). Néanmoins, cette activité ne peut éliminer qu'une faible quantité de péroxyde d'hydrogène. L'activité péroxydasique de *C. fasciculata* et *T. brucei* n'ayant pas été purifiée, il est difficile de savoir si cette activité est de nature enzymatique ou non.

La seule possibilité pour *T. cruzi* de se débarrasser du péroxyde d'hydrogène semble être le trypanothion car il est assez réactif pour permettre la réduction de  $H_2O_2$ . Le  $T[SH]_2$  semble donc remplacer les activités péroxydase et catalase. Cette déficience en diverses enzymes chargées de lutter contre le stress oxydatif pourrait expliquer la susceptibilité de *T. cruzi* aux molécules augmentant le stress oxydatif comme le nifurtimox, le cristal violet et éventuellement le benznidazole.

#### b) Métabolisme du glutathion et du trypanothion chez les Trypanosomes.

L'une des caractéristiques des Kinetoplastidae est qu'en plus du glutathion (pour le métabolisme du GSH voir **figure 9**), ils utilisent aussi un dérivé de celui-ci qui est le trypanothion. Cette molécule résulte en fait de la conjugaison de deux molécules de glutathion avec une polyamine, la spermidine (**figure 10 I**). Les deux différences majeures entre le glutathion et le trypanothion sont:

1) la charge: le GSSG est chargé négativement alors que le  $T[S]_2$  est chargé positivement,

### Métabolisme et conjugaison du glutathion



Voies impliquées dans le métabolisme du glutathion et de ces conjugués. Ce schéma est représentatif des voies dans lesquelles le GSH ou les GST peuvent être impliqués. aa : récepteur d'acides aminées; E-GS : conjugué du glutathion (d'après NEAL et coll., 1988).

2) le pont spermidine qui donne un aspect hydrophobe à la partie carboxy-terminale de la molécule.

Le trypanothion est synthétisé à partir de deux molécules de glutathion et une molécule de spermidine. La trypanothion-synthétase catalyse la première réaction où une molécule de glutathion est liée à son extrémité carboxylique à une molécule de spermidine. Deux différents produits existent : la N<sup>1</sup>- et la N<sup>8</sup>-glutathionylspermidine. La trypanothion-synthétase ajoute à ces molécules, une molécule de GSH afin de synthétiser le trypanothion. Ces deux réactions sont ATP-dépendantes. Le trypanothion oxydé  $T[S]_2$  peut être réduit par la trypanothion-réductase en  $T[SH]_2$ . Ces trois enzymes sont uniques pour les Kinetoplastidae. La glutathion-réductase des autres organismes n'utilise pas le trypanothion mais le glutathion et *vice-versa*. Ces enzymes sont les cibles potentielles de nouveaux médicaments spécifiques des parasites.

### Les thiols glutathion et trypanothion chez les trypanosomes et les inhibiteurs de la voie de synthèse du trypanothion



I. Formes oxydées et réduites des thiols glutathion et trypanothion (d'après FAIRLAMB & CERAMI 1992).

II. La voie de synthèse du trypanothion. DMFO : difluorométhylornithine. (d'après WALSH et coll. 1991).

Les trypanosomes sont capables de synthétiser le glutathion *de novo* par la voie classique. L'autre composant, le trypanothion, est synthétisé à partir de l'ornithine. Des substances inhibitrices de la voie de synthèse du trypanothion sont indiquées dans la **figure 10 II**. Le DMFO n'agit pas sur *T. cruzi* car celui-ci ne contient pas d'ODC. En revanche, une arginine-décarboxylase a été mise en évidence par MAJUMDER et coll. (1992). Cette enzyme n'existe pas chez les mammifères. Elle catalyse la décarboxylation de l'arginine en agmatine qui pourrait être convertie ensuite en putrescine, afin d'être utilisée pour la synthèse de la spermidine. Cependant, les précurseurs de la spermidine: l'ornithine, l'adénosine, la méthionine, l'agmatine et l'arginine ne peuvent pas être utilisés pour sa synthèse et *T. cruzi* est dépendant des polyamines (putrescine, spermine ou spermidine) présentes dans le milieu de culture (ARIYANAYAGAM et coll. 1993).

Les inhibiteurs de la trypanothion-réductase sont à l'heure actuelle, encore trop toxiques ou peu actifs *in vitro* ou *in vivo*. Jusqu'à maintenant, aucun médicament intervenant dans les voies métaboliques indiquées dans la **figure 9** n'est employé contre *T. cruzi*.

Les pourcentages des trois différents thiols glutathion, glutathionylspermidine et trypanothion chez les différentes espèces sont indiqués dans le **tableau 9**. Il est important de noter que ces pourcentages varient selon la phase ou les conditions de culture. Il faut noter qu'*E. coli*, qui ne possède pas de trypanothion (FAIRLAMB et coll., 1992), produit également comme dans le cas de *C. fasciculata*, plus de glutathionylspermidine dans la phase stationnaire (TABOR et coll., 1975). Le glutathionylspermidine est utilisé dans ce cas, comme réservoir de spermidine (SHIM et coll., 1988).

| <u>Organisme</u> | GSH_total                              | % GSH sous forme de |                |              |  |
|------------------|--|---------------------|----------------|--------------|--|
|                  | ( <u>nmol/10<sup>8</sup>_cellules)</u> | <u>GSH</u>          | <u>GSH-SPD</u> | <u>T[SH]</u> |  |
| T.c. epi         | 9,5                                    | 19                  | 2              | 79           |  |
| T.b. sang        | 5,6                                    | 24                  | 5              | 71           |  |
| T.b. proc        | 11,4                                   | 27                  | 4              | 69           |  |
| C.f. exp         | 51,1                                   | 12                  | 20             | 68           |  |
| C.f. stat        | 38,7                                   | 10                  | 68             | 22           |  |
| L.b.g. prom      | 13,7                                   | 14                  | 4              | 82           |  |
| L.d. prom        | 15,6                                   | 14                  | 4              | 82           |  |
|                  |  |                     |                |              |  |
|                  |  |                     |                |              |  |

Tableau 9 : Pourcentages de glutathion, glutathionyl-spermidine et de trypanothion chez les différents *Trypanosomatidae*. T.c.epi: *T. cruzi* stade épimastigote; T.b. sang.: *T. brucei* stade sanguicole: T.b. proc: *T. brucei* stade procyclique; C.f. exp: *C. fasciculata* culture en phase exponentielle; C.f. stat: *C. fasciculata* culture en phase stationnaire; L.b.g. prom: *L. brasiliensis guanensis* stade promastigote; L. d. prom: *L. donovani* stade promastigote. (d'après FAIRLAMB et coll., 1992).

#### c) Les moyens de détoxification

- la phase I rend les xénobiotiques plus hydrosolubles par oxydation, réduction ou hydrolyse. Celle-ci est catalysée par les cytochromes P450 et les oxydases flaviniques;
- la phase II est la conjugaison de certains produits de la phase I avec le GSH, le glucuronate ou les résidus malonyl- ou glycosyl;
- la phase III comprend l'exportation des glutathion S-conjugés par une pompe ATPdépendante.

La présence des cytochromes P450 dans *T. cruzi* a été démontrée par différents groupes (GOAD et coll., 1989; AGOSIN et coll., 1976; AGOSIN et coll., 1976; AGOSIN et coll., 1984; BERGER et coll., 1993). Cependant, le type exact de ce(s) P450(s) n'est pas encore connu.

Les enzymes de la phase II sont encore à l'heure actuelle beaucoup moins connues.

Certains travaux concernant l'activité GST chez les Trypanosomes ont été effectués. Des activités de l'ordre de 0,8-2,0 nmoles par minute et par milligramme de protéine en utilisant le CDNB comme substrat, ont été mises en évidence (YAWETZ et coll., 1980; ETAH et coll., 1993). Néanmoins, nous n'avons pas pu reproduire ces résultats sur un extrait total du stade épimastigote. En effet, l'activité détectée était la même que celle du contrôle contenant l'extrait total dénaturé par chauffage (D. MEZINGUE CHERIF, communication personnelle; PLUMAS-MARTY et coll., 1992). En 1981, YAWETZ et coll. (1981) ont rapporté la purification d'un dimère de 17 et 20 kDa ayant une activité GST. Cependant, aucune caractérisation biochimique ou moléculaire n'a été présentée depuis par ces auteurs. Les deux sous-unités de ce complexe seraient hétérogènes et cette enzyme serait donc différente des autres GST. Ces résultats restent donc à confirmer.

Dans notre laboratoire, B. Plumas-Marty a purifié un complexe de trois protéines de 25, 30 et 45 kDa par chromatographie d'affinité, en utilisant une colonne de glutathionagarose (PLUMAS-MARTY et coll., 1992). Ces trois composants se sont révélés être homologues à des facteurs d'élongation de la traduction protéique EF1 $\beta$ ,  $\gamma$  et probablement  $\delta$ . L'analyse de la séquence de la sous-unité 1 $\gamma$  a révélé des homologies avec les GST dans sa moitié N-terminale (BILLAUT-MULOT et coll., 1993). Ceci pourrait donc expliquer la purification de ce complexe par chromatographie d'affinité sur colonne de glutathion. De plus, l'éluat de la colonne possède une faible activité GST (70 nmol par minute et milligramme de protéine, en utilisant le CDNB comme substrat (PLUMAS-MARTY et coll., 1992). Très récemment, ETAH et coll.(1993) ont rapporté la purification d'une trypanothion S-transférase (TST) chez *Crithidia fasciculata*. Cette protéine de 62 kDa est active sous forme de dimère (120 kDa) avec le CDNB comme substrat. De plus, une activité péroxydasique est associée à cette protéine. La taille de cette TST est double de celle des GST cytosoliques. Sa caractérisation moléculaire permettra de savoir si cette protéine appartient à la superfamille des GST cytosoliques.

A notre connaissance, aucun travail sur les conjugués du glutathion, de la glutathionyl-spermidine ou du trypanothion n'a été publié.

L'étude approfondie du métabolisme du trypanothion et des enzymes dépendantes du trypanothion est d'une importance primordiale car elle peut aboutir à la découverte d'inhibiteurs spÉcifiques des chemins métaboliques des Trypanosomes. De telles molécules pourraient donner naissance à des médicaments afin de lutter contre les maladies graves dont ce groupe de parasites est responsable.

## **BUT DU TRAVAIL**

La maladie de Chagas est une infection chronique qui dure plusieures années. Au cours de l'infection parasitaire, l'hôte développe souvent des réactions autoimmunes comprenant une importante activation non-spécifique des lymphocytes B (ORTIZ-ORTIZ et coll. 1980; D'IMPERIO LIMA et coll., 1985, 1986; MINOPRIO et coll., 1986) et la présence de lymphocytes T CD4+ autoréactifs (SAID et coll., 1985; HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ et coll., 1987).

Une conséquence de l'activation polyclonale et de l'expression inhabituelle des molécules de classe II (Ia) du complexe majeur d'histocompatibilité sur les cellules musculaires et les cardiocytes, et leur expression particulièrement élévée sur les lymphocytes B au cours de la phase chronique, serait l'induction de l'autoréactivité et la rupture de la tolérance au soi (MINOPRIO et coll., 1988; SPINELLA et coll. 1989; CABEZA MECKERT et coll., 1991).

En effet, OUAISSI et coll. (1988) ont montré l'existence d'anticorps antiacétylcholinestérase humaine et d'anticorps anti-idiotypiques chez les patients chagasiques en phase chronique. L'épitope reconnu par les auto-anticorps est de type glycanique. Par ailleurs, les interactions entre *T. cruzi* est le système cholinergique sont multiples : on observe une hypersensibilité due à une dénervation des neurones (KÖBERLE et coll., 1968), une déplétion en choline-acétyltransférase (TANOWITZ et coll., 1981), une augmentation de l'expression des récepteurs nicotinergiques de l'acétylcholine (TANOWITZ et coll., 1983) ainsi qu'une diminution de l'activité acétylcholinestérasique (BRENNESSEL et coll., 1985).

Il serait donc possible qu'une acétylcholinestérase parasitaire soit impliquée dans la dérégulation du système nerveux. Ceci serait dû soit à un mimétisme fonctionnel (EISEN et coll., 1991), soit à l'induction d'auto-anticorps qui réagiraient avec l'acétylcholinestérase de l'hôte. Nous nous sommes donc intéressé à la purification et au clonage moléculaire de l'acétylcholinestérase de *T. cruzi*.

Le criblage d'une banque d'expression de l'ADNc du stade épimastigote de *T. cruzi* à l'aide d'un sérum anti-AChE de torpille (obtenu auprès du Dr. Massoulie) n'a pas abouti à l'isolement d'un clone positif. Un sérum obtenu par immunisation de souris à l'aide d'une bande d'un gel d'électrophorèse natif contenant le ou les composant(s) du stade épimastigote de *T. cruzi* ayant une activité acétylcholinestérasique, a abouti à l'isolement d'un clone d'ADNc (TcAc2) codant pour une protéine homologue aux GST et à certaines protéines de stress des plantes.

Les GST et les différentes protéines de stress ont déjà été décrites pour leur rôle dans la protection de différents organismes, contre les phénomènes de stress auxquels ils se trouvent soumis, au cours des différentes étapes de leur cycle de développement.

Dans ce contexte, nous avons poursuivi la caractérisation de ce clone et de la protéine codée par l'insert, dans le but de mieux comprendre les mécanismes de détoxification et les mécanismes de protection du parasite contre les stress auxquels il est exposé au cours de son cycle évolutif.

## **RESULTATS**

#### I. Détection de l'activité acétylcholinestérasique

Afin d'obtenir un sérum qui permet le criblage d'une banque d'expression du stade épimastigote, nous avons utilisé un protocole modifié avec lequel DURIEZ-VAUCELLE et coll. (1983) ont déjà montré la présence de cette activité acétylcholinestérase dans ce stade de différenciation de T. cruzi. Cette méthode nous a permis d'identifier une seule bande d'activité ayant une charge négative (migration vers l'anode). Les acétylcholinestérases (AChE) sont une famille d'enzymes qui existent sous diverses formes: membranaires, solubles et excrétées. Nous avons utilisé le fractionnement cellulaire cytosol (C) et membranes plasmiques/organelles (PO) afin de déterminer la localisation de l'activité AChE. Le résultat de cette expérience est montré dans la figure 11: l'activité est liée uniquement à la fraction PO solubilisée par du Triton-X100. Aucune activité n'est décelable dans les fractions cytosoliques extraites avec des tampons de forces ioniques différentes. Ceci nous a amené à tester différents détergents et à chercher le meilleur rapport protéine/détergent qui permet d'obtenir un rendement optimal et une activité nette dans le système de gel natif après migration. Le meilleur résultat a été obtenu avec le Triton X-100 et un rapport de 0,1-0,3% de TX-100 pour 10 mg/ml de protéines. Par contre le désoxycholate ne semble pas être capable de solubiliser l'activité acétylcholinestérasique. L'octyl- $\beta$ -D-glucoside et Nonidet P40 ont une capacité nettement plus faible que le TX-100 pour rendre l'AChE soluble. La migration de la fraction sans traitement préalable avec un détergent ne donne aucun signal d'activité acétylcholinestérase.

# Détection de l'activité acétylcholinestérasique chez les formes épimastigotes de *T. cruzi*



- 1) Sérum de veau fétal
- 2) Surnageant de culture
- 3) Fraction PO solubilisée avec Triton X-100
- 4) Fraction cytosolique obtenue après sonication dans un tampon de faible osmolarité
- 5) Fraction cytosolique obtenue après sonication dans un tampon de forte osmolarité

### II. Production et caractérisation d'un sérum anti-TXepi

Un sérum contre la protéine parasitaire ayant une activité AChE a été obtenu en immunisant des souris avec la bande de gel natif contenant cette activité enzymatique. La cinétique de la réponse humorale a été étudiée par la technique de Western-blot (**figure 12**). Un extrait total d'épimastigotes incubé avec le sérum anti-TXepi, réagit principalement avec deux antigènes de masse moléculaire 52 et 40 kDa. Le sérum reconnait également des composants mineurs.

En revanche, l'immunoprécipitation des produits de traduction *in vitro* des ARN messagers des formes épimastigotes par l'immunsérum anti-TXepi, met en évidence un antigène de 52 kDa (**figure 13 A**, piste 1) et un deuxième de 55 kDa. Ce dernier semble être non-spécifique car il apparaît également très faiblement avec le sérum nonimmun. La réactivité du sérum anti-TXepi avec les produits de traduction nous a incité à cribler une banque d'expression d'ADNc du parasite que nous avions construite préalablement à cette étude.

L'immunoprécipitation des antigènes métaboliques marqués à la méthionine<sup>[35</sup>S] ne montre qu'une seule bande à 52 kDa (**figure 13 B**, piste 1), indiquant l'absence d'une modification post-traductionnelle.

# Réactivité du sérum anti-TcAc2 vis-à-vis de différents stades de développement de *T. cruzi*



# Immunblot sur les extraits de différents stades de développement de *T. cruzi*

- A) Epimastigote
- 1) Sérum anti-TcAc2
- B) Trypomastigote
- 2) Sérum de contrôle

a welled and the second states and

C) Amastigote

### Immunoprécipitation des antigènes radio-marqués d'épimastigotes par antisérum TXepi



A) Produits de traduction *in vitro* des ARNm du stade épimastigoteB) Produits métaboliques du stade épimastigote

1) Antisérum TXepi

- 2) Sérum de contrôle
- 3) Sérum de souris infectée

# III. Criblage de la banque d'expression du stade épimastigote avec le sérum anti-TXepi

La banque d'ADNc a été construite dans le vecteur d'expression  $\lambda$ ZapII (Stratagène), à partir de 5 µg d'ARN poly(A)<sup>+</sup> de stade épimastigote, avec un rendement de 1x10<sup>6</sup> recombinants avant amplification. Le criblage de 4 x 10<sup>4</sup> plages de lyse, à l'aide du sérum de souris anti-TXepi a conduit à l'isolement de 4 clones. L'analyse des fragments d'ADNc des clones pBluescript après une double digestion double par *Eco*RI et *Xho*I, a montré qu'ils sont identiques: ils donnent deux fragments de taille 850 et 750 pb. L'hybridation des différents inserts avec l'insert du clone 2 marqué à la digoxigénine confirme ce résultat: les clones 1, 2, 3, et 4 hydrident avec cette sonde. Ce clone 2 a été nommé par la suite TcAc2.

La sélection d'anticorps sur les plages du clone TcAc2 révèle une bande majeure à 52 kDa (**figure 14**, piste 2). La comparaison avec le sérum anti-TXepi nous montre que l'insert du clone TcAc2 code pour la protéine de 52 kDa du stade épimastigote.

### Reconnaissance des antigènes d'épimastigotes par les anticorps anti-TXepi sélectionnés sur le clone TcAc2



Immunoblot avec l'extrait NP-40 d'épimasigote

- 1) Sérum de contrôle
- 2) Anticorps sélectionnés sur le clone TcAc2

# IV. Expression et caractérisation de la protéine de fusion Sj26GST/TcAc2

Le sous-clonage de l'insert TcAc2 dans un vecteur d'expression permet l'obtention de quantités importantes de la protéine correspondante. Comme système d'expression, nous avons choisi le vecteur pGEX-2T dans lequel l'insert est cloné en phase de lecture avec la glutathion *S*-transférase de *Schistosoma japonicum* (SjGST26) ayant un poids moléculaire de 26 kDa. Ceci permet de purifier la protéine de fusion en une seule étape, sur une colonne d'affinité de glutathion (SMITH et coll., 1988). L'analyse des protéines éluées de cette colonne montre deux composants principaux: la SjGST26 et la protéine de fusion SjGST26-TcAc2 qui a une masse moléculaire d'environ 78 kDa (**figure 15 I**). En plus de cette protéine, on observe également des produits de dégradation. La quantité de Sj26GST peut varier selon les préparations. Cependant, le rendement en protéine de fusion obtenu reste assez faible; ceci serait dû à la difficulté de solubiliser la protéine au cours de la purification. Ainsi, nous avons réutilisé le culot bactérien trois à quatre fois afin d'extraire la protéine de fusion. Ceci nous a permis d'obtenir environ 300 µg de protéine par litre de culture.

Afin de confirmer qu'il s'agit bien de la même protéine que celle issue du clone TcAc2 provenant du vecteur pBluescript, nous avons appliqué la technique du Westernblot. La **figure 15 IIA** (piste 1) montre que la protéine de fusion est reconnue par le sérum de criblage anti-TXepi. De plus, la protéine de fusion Sj26GST/TcAc2 réagit avec des sérums anti-peptides C1-C3 issus de la séquence du clone TcAc2 (**figure 15 III**, pistes 1-3).

### Reconnaissance de la protéine de fusion Sj26GST/TcAc2 par l'antisérum TXepi



I. SDS-PAGE de la protéine de fusion Sj26GST/TcAc2 après coloration au bleu de coomassie

II.A) Immunoblot sur la protéine de fusion Sj26GST/TcAc2

II.B) Immunoblot sur la protéine Sj26GST

(1) Sérum anti-TXepi, (2) sérum de contrôle, (3) dsérum anti-TcAc2, (4) sérum anti-Sj26GST.

III. Immunoblot sur la protéine de fusion Sj26GST/TcAc2

(1) Sérum de contrôle, (2) sérum anti-peptide C1 TcAc2, (3) sérum anti-peptide C2 TcAc2, (4) sérum anti-peptide C3 TcAc2.

# <u>1</u>. <u>Présence de la protéine TcAc2 dans les différents stades évolutifs</u> de <u>T. cruzi</u>

En vue d'obtenir un sérum polyclonal anti-TcAc2, des souris BALB/c ont été immunisées par la protéine de fusion en présence de *Bordetella pertussis* et d'hydroxyde d'aluminium (Alum) comme adjuvant. L'immunsérum (anti-TcAc2) obtenu a été testé par Western blot sur des extraits de différents stades de développement de *T. cruzi*: (épimastigote, trypomastigote et amastigote). Dans toutes ces formes de différenciation, un seul polypeptide de masse moléculaire 52 kDa est mis en évidence par l'anticorps anti-TcAc2 (**figure 16**, pistes 1). En revanche, le sérum contrôle (anti-SjGST26) ne montre aucune réactivité ce qui démontre la spécificité de l'anticorps anti-TcAc2.

# 2. <u>Existence de la protéine TcAc2 chez les différentes souches de T.</u> <u>cruzi et chez d'autres espèces de Kinetoplastidae</u>

Une analyse de la réactivité du sérum anti-TcAc2 avec des extraits NP-40 de différentes souches de *T. cruzi* révèle la présence d'une protéine de 50-52 kDa dans tous les extraits testés (**figure 17**). Cependant, un doublet est mis en évidence dans le cas de la souche Tulahuen.

Nous avons aussi testé deux espèces proches de *T. cruzi, T. rangeli* et *T. marinkelli*. Dans le cas de *T. rangeli* (**figure 18, Tr**), un doublet aux environs de 60 kDa et une bande à 48 kDa ont été détectés. En revanche, l'extrait de *T. marinkelli* (**figure 18, TM**) contient un composant de 52 kDa immunoréactif.

En utilisant des extraits NP-40 de *Leishmania donovani infantum* et *Phytomonas* spec., nous n'avons pas pu mettre en évidence de réactivité croisée avec l'anticorps anti-TcAc2 par la technique du Westernblot (**figure 18, Ldi** et **Ph**).

#### Réactivité du sérum anti-TcAc2 vis-à-vis de différents stades de développement de *T. cruzi*



# Immunblot sur les extraits de différents stades de développement de *T. cruzi*

- A) Epimastigote
- 1) Sérum anti-TcAc2
- B) Trypomastigote
- 2) Sérum de contrôle
- C) Amastigote





Réactivité du sérum anti-TcAc2 avec les extraits NP-40 du stade épimastigote de différentes souches de *T. cruzi* 

Tehuentepec (Teh), Tulahuen (Tul), ECH, C23, CL, Y.

| kDa                 | Tc  | Tr   | Tm   | Ldi               | Ph |
|---------------------|---|--|--|-------------------|----|
| 105,1 -             |   |  |  |                   |    |
| 69,8 <del>- )</del> |   |  |  |                   |    |
| 43,3 →              |   |  |  |                   |    |
| 28,3 →              |   |  |  |                   |    |
| 18,1 -><br>15,4 ->  |   |  |  |                   |    |
|                     | 12  | 12   | 12   | 12                | 12 |
|                     | Réactivité sur<br>avec les extrai<br>ches de T. cru<br>Tc:T. cruzi<br>Tr: T. rangeli<br>Tm: T. marink<br>Ldi: Leishman<br>Ph: Phytomore | immunoblot of<br>its NP-40 de d<br>zi<br>elli<br>ia donovani inj<br>zs spec. | du sérum anti-<br>ifférentes espèc<br>fantum | TcAc2<br>ces pro- |    |

#### Expression de TcAc2 par la forme épimastigote au cours de la culture *in vitro*



L'expression du gène codant pour la protéine TcAc2 change avec l'âge et la densité de la culture d'épimastigotes *in vitro*. Extraits NP-40 (I, II) et ARN totaux (III, IV) des formes épimastigotes prélevées après les jour 1 (j1, phase de latence), 3 (j3, phase exponentielle) et 5 (j5, phase stationnaire) de la culture *in vitro*.

Figure 19

#### 3. Expression de la protéine TcAc2 chez T. cruzi

L'expression de la protéine TcAc2 dans les formes trypomastigotes et sphéromastigotes (formes rondes extra-cellulaires) semble ne pas être homogène: une forte réactivité est observée vis-à-vis d'un extrait de trypomastigotes qui proviennent de fibroblastes infectés (4 et 5 jours après infection). Une réactivité plus faible est obtenue avec les antigènes de sphéromastigotes (jour 10) et presque absente dans les jours 3, 6 et 7 de culture. Les préparations de trypomastigotes contiennent généralement 5 à 10% d'un mélange d'amastigote et de formes sphéromastigotes. Il est donc vraisemblable que la réactivité observée vis-à-vis des formes trypomastigotes soit due en partie aux amastigotes contaminants.

Un changement d'expression est aussi observé au cours du stade épimastigote. Celle-ci augmente continuellement avec l'âge et la densité de la culture. En effet, la technique du Westernblot appliquée aux antigènes des épimastigotes prélevés à différents temps de culture et révélés par l'anticorps anti-TcAc2 (**figure 19, I**), montre qu'il y a augmentation de l'expression de la protéine TcAc2 au cours de la culture *in vitro*. En revanche, l'incubation avec un anticorps anti-Sj26GST/TcEF1β25 (PLUMAS-MARTY, 1992) révèle une dimunition de la réactivité au cours de la culture (**figure 19, II**).

L'hybridation de la sonde TcAc2 marquée au  $[\alpha - {}^{32}P]dCTP$  avec l'ARN d'épimastigotes recoltés à différents temps de culture, montre la présence d'un transcrit dont le signal augmente avec l'âge de la culture (**figure 19, III**). Le contrôle effectué avec une sonde  $\beta$ -tubuline indique un signal constant pour les différents préparations (**figure 19, IV**).

#### 4. Modifications post-traductionnelles de la protéine TcAc2

Afin de déterminer si la protéine subit des modifications post-traductionnelles, nous avons réalisé des expériences d'immunoprécipitation par les anticorps anti-TcAc2, des produits de traduction des ARN messagers d'épimastigotes en parallèle avec des antigènes métaboliques du parasite, après marquage à la méthionine[<sup>35</sup>S]. La masse moléculaire de la protéine immunoprécipitée à partir des deux types de préparations d'antigènes est identique, suggérant une faible, voire une absence de modification post-traductionnelle de la protéine.

La séquence primaire en acides aminés contient plusieurs sites pututifs de phoshorylation. Comme la régulation de l'activité enzymatique de nombreuses protéines dépend de la phosphorylation, nous avons donc marqué des épimastigotes avec de l'orthophosphate radioactif. L'immunoprécipitation des antigènes du stade épimastigote avec le sérum anti-TcAc2 n'a révélé aucun signal spécifique. Néanmoins, il faut signaler que cette technique ne met en évidence que les phosphorylations relativement stables tandis que d'autres, de nature plus labile, ne peuvent pas être détectées.

#### 5. Détection de la protéine dans les composants d'excrétion/sécrétion

Dans le but d'identifier un précurseur éventuel de la protéine TcAc2, nous avons réalisé des expériences de "pulse-chase". Les épimastigotes et trypomastigotes sont marqués à la méthionine[<sup>35</sup>S] (pulse). Les cellules sont ensuite incubées dans un milieu contenant de la méthionine froide (chasse). Les échantillons des culots parasitaires et leurs surnageants sont précipités après différents temps de chasse. La **figure 20** montre le résultat obtenu. Durant la chasse, aucun changement de la masse moléculaire de la protéine n'est observé; ceci suggère que la protéine TcAc2 n'a pas de précurseur et n'est pas elle-même, précurseur d'une autre molécule.

Ces résultats montrent également que la protéine TcAc2 fait partie des produits d'excrétion/sécrétion (ES) des formes épimastigote et trypomastigote. Le profil total des produits ES des épimastigotes comprend quatre autres composants majeurs marqués à la méthionine: >220 kDa, 220 kDa, 60 kDa et 20 kDa.

## Immnoprécipitation des antigènes des stades épimastigote et trypomastigote marqués à la méthionine[<sup>35</sup>S]



Marquage métabolique des stades épimastigote et trypomastigote à la méthionine<sup>[35</sup>S].

1) Immunoprécipitation des antigènes excrétes/sécrétés après 3 heures de chasse par l'antisérum Sj26GST

2) Immunoprécipitation des antigènes NP-40 après 3 heures de chasse par l'antisérum Sj26GST

3) Immunoprécipitation des antigènes excrétes/sécrétés après 3 heures de chasse par l'antisérum Sj26GST/TcAc2

4) Immunoprécipitation des antigènes excrétés/sécrétés après 18 heures de chasse par l'antisérum Sj26GST/TcAc2

5) Immunoprécipitation des antigènes NP-40 après 3 heures de chasse par l'antisérum Sj26GST/TcAc2

6) Immunoprécipitation des antigènes NP-40 après 18 heures de chasse par l'antisérum Sj26GST/TcAc2

#### 6. Localisation de la protéine TcAc2

L'étude de la localisation de la protéine TcAc2 dans les parasites a été abordée par immunofluorescence indirecte et en microscopie électronique. Pour le stade trypomastigote, une réactivité est observée dans la partie postérieure du kinétoplaste et de la poche flagellaire (**figure 21, Ia**). Dans les formes amastigotes, les anticorps anti-TcAc2 réagissent avec des structures qui ne sont pas déterminées jusqu'à maintenant (**figure 21, IIa**). En revanche, la réactivité mise en évidence en microscopie électronique, vis-à-vis des stades épimastigotes montre que la distribution de la protéine de 52 kDa est diffuse. Elle est cependant surtout présente dans le cytoplasme et dans des vésicules.

#### 7. Détermination du pHI

Chaque protéine est caractérisée par un point isoélectrique qui dépend de sa charge électrique. Le pH auquel la charge est de zéro est le point isoélectrique de cette protéine. La détermination du pH*I* d'une protéine est utile pour plusieurs raisons: par exemple, il peut constituer un renseignement utile pour la purification de la protéine. De plus, on peut parfois comparer le pH*I* de plusieurs protéines ayant la même activité enzymatique ou ayant un rôle biologique similaire, afin de trouver des homologies entre elles. En utilisant l'isoélectrofocalisation couplée à la technique du Westernblot, nous avons déterminé le pH*I* de TcAc2 à 5,4 (**figure 22**). Une bande mineure est également visible à pH 5,2. Trois hypothèses pourraient être formulées pour expliquer le résultat :

1. il existe une seul isoforme de la protéine TcAc2;

2. la molécule TcAc2 subit une modification post-traductionnelle mineure qui ne change pas de façon significative sa masse moléculaire mais qui modifie son pH*I*,

3. il existe un autre polypeptide qui présente une réactivité croisée avec TcAc2.

## Immufluorescence indirecte avec le sérum anti-TcAc2



Immunofluorescence indirecte réalisée avec le sérum anti-TcAc2 sur les stades trypomastigote (I a) et amastigote intracellulaire (II a). Le sérum contrôle (I b et II b).

## Détection de TcAc2 en immunoblot après isoélectrofocalisation



Immunoblot après isoélectrofocalisation de la fraction cytosolique du stade épimastigote.

- 1) Sérum anti-TcAc2
- 2) Sérum de contrôle

Le séquençage de l'insert TcAc2, obtenu par criblage avec l'antisérum anti-TXepi, a révélé l'absence de "spliced leader" (SL). Cet insert ne représente donc pas la totalité de l'ARNm. Afin d'obtenir la région 5' de l'ADNc, nous avons utilisé la réaction de polymérisation en chaîne. L'ARNm est transcrit par la polymérase réverse, en présence d'une amorce (I) qui se trouve dans la région 5' de la séquence connue. Ensuite, l'ARN est dégradé par la soude et le deuxième brin est synthétisé avec l'amorce homologue au SL. Le SL est présent à l'extrémité 5' de tous les ARNm matures codés par le noyau. L'ADN est ensuite amplifié avec ce SL et une amorce qui se trouve en 5' de l'amorce I. Ces amorces augmentent la spécificité de la réaction car seuls, les ADNc portant cette séquence seront amplifiés. Après 35 cycles d'amplification, un seul produit d'environ 150 pb est visible sur gel d'agarose. Ce fragment a donc été sous-cloné dans le vecteur pBluescript, puis sequencé.

La séquence complète codant pour la protéine TcAc2 a donc été obtenue par recouvrement des séquences du clone d'ADNc et du fragment PCR. Elle contient un cadre de lecture ouvert de 1335 pb codant pour une protéine de 445 acides aminés. Le poids moléculaire de cette protéine est d'environ 51 kDa (exactement 50.687). Une très courte séquence 5' non-codante (12 pb) est située entre le SL et le codon d'initiation (**figure 23**). La région 3' non-codante a une longeur de 244 bases. Elle contient une séquence présentant une symétrie de miroir à la position 1556-1569 (GAGAAT[T]TAAGAG) et cinq répétitions du motif AAA(2 ou 3 G/C)AAA. La signification de cette structure est inconnue.
### La séquence de l'ADNc de TcAc2 et sa séquence déduite en acides aminés

|            | "spliced leader"   |
|------------|--|
| 1          | AACTAACGC <u>TATTGATACAGTTTCTGTACTATATTG</u> GAATCACACATT  |
| 52         | ATG AAGGCTTTGAAACTTTTTAAAGACCGATTATGCCCCTTTTG <u>CCAACGCGTGTTGATCAC</u> GGCGAAGGAAAAGCGTGTCACGTTGGAG |
| 1          | M K A L K L F K D R L C P F C Q R V L I T A K E K R V T L E  |
| 142        | GAGGTGGAGGTTCCTCTTGGCGATGACATGCCGCAGTGGTACAAGGAGCTGAACCCACGGGAGACGGTTCCAACGCTTCAGGTGGATGGA           |
| 31         | E V E V P L G D D M P Q W Y K E L N P R E T V P T L Q V D G  |
| 232        | AAAAATGCATGATCGAGTCAGATCTCATTTCACGGTACATTGACCGCATTTCTTCTCCCGCGAACGCCCTTATGGGGTCAAGCCCCTAC            |
| 61         | K K C M I E S D L I S R Y I D R I S S P A N A L M G S S P Y  |
| 322        | CAACGCACCGCGTGGAGTTTTTTCTGGGTGAGATCGGCGATCTTGTCAAAGCATATTTTGGCCTTGTTAGGGACCCTTTCAATGAGGAG            |
| 91         | Q R H R V E F F L G E I G D L V K A Y F G L V R D P F N E E  |
| 412        | AAGCGGAAGTCCGTGGATAACAACACCGCATATATCGAGGATATCATTGCAGAACATCAGGGGGACGACGACCATATTTTCTTGATGACACG         |
| 121        | K R K S V D N N T A Y I E D I I A E H Q G D G P Y F L D D T  |
| 502        | TTTTCCATGGCTGAAGTTATGGTCGTTCCATTTCTTGCTTG  |
| 151        | F S M A E V M V V P F L A C F R P V L S Y Y C G Y D I F H N  |
| 592        | GCTCCCCGTCTCAAGAAAATGTACGTGACGTCCATGCAGCGTACAACTGTGAAGGAAACGATTTCAAAGCCAGAAGAATACATTATTGGC           |
| 181        | A P R L K K M Y V T S M Q R T T V K E T I S K P E E Y I I G  |
| 682        | TTTAAGAGTAAGGTGCCAAAATCGCACGTCACATGGTCATTGGCTCCTGGCTATGTACTTTTTGTTAACAAGTATTCTCCATTTTCGGAT           |
| 211        | F K S K V P K S H V T W S L A P G Y V L F V N K Y S P F S D  |
| 772        | CGCCCTCGTTTGGCATGTGCACTGAAGAATATTGATTTGCCCCATGCTTGAAATTGATTTGAAACAGTTGCCCCCGTGGTTCCCGATGGTTT         |
| 241        | R P R L A C A L K N I D L P M L E I D L K O L P P W F R W F  |
| 960        |  |
| 002<br>271 |  |
| 271        | N Q K E I V F I L L F Q G I I V H E S Q L I V H I L D D G  |
| 952        | TTCCCAGAGCATGGGCCTGCGCTACTTCCCAAGGATGCCGATGGATCGTACCATGTGAGGTTTGTTGAATCTAATGTGGATTACTTTATG           |
| 301        | F P E H G P A L L P K D A D G S Y H V R F V E S N V D Y F M  |
| 1042       | GATGCCATGTATTCTTTCATAAAGGATCCAAAAAACATGAATGCAAAGGAAGAATTTGATTGGGCAGCAGGTGAGCTTGAGAAATTATTG           |
| 331        | D A M Y S F I K D P K N M N A K E E F D W A A G E L E K L L  |
| 1132       | GCGGAACATCAGTTTGGGGAGGGTCCATTTTTTGGTGGAGCCACAATGAACGCTGCTGACGTTTCTCTTGTGCCCATGCTGGTGCACCTG           |
| 361        | A E H Q F G E G P F F G G A T M N A A D V S L V P M L V H L  |
| 1222       | AAGGCCTGCACTCCAGAACTGACGGAAGGCCAGGATTTGCTTGC   |
| 391        | K A C T P E L T E G Q D L L A N Y K L L A A A A E A G L T S  |
| 1312       | GAGGCAGGCAAAAAGGTCTTTTTGTCACTCTCGGAATACTCGAGTATATACAAGACGTTTTTGCGTCCATCGTCTTGA GACAAACGCGGA          |
| 421        | E A G K K V F L S L S E Y S S I Y K T F L R P S S STOP   |
| 1402       | <u>᠌᠘ᠿᢕᠿᠧᡎᢗᡊᢕᡎᢗᡢᢗᡊᡇᡊ᠔</u> ᠋ᡘᡎᡘᡆᡏᡏᡗᢃᡘᠿᢕᢄᡊ᠋ᢙ᠔᠘ᢗᡗ᠔ᠿᠮᡗᡘᡔᠬᡍᠯ᠋᠕ᠿ᠋ᢊᠧᡎᡆᠯᡊᠬᡎᡆᠬᠬᡎᡆᡆ᠋ᠬᡡ᠘ᡊᢕᢕ᠔᠔ᠺ᠔ᢕᢕᠬᠯᠯᢙᡘᡘᠥᡘ       |
| 1492       | AGGATCGTAGTGGAGAGAATTTAAGAGGCTGCCAACGACTGTGGGGGGGAAAGCAAAATAAGCCCAAAGCGAAATGAATG                     |
| 1582       | AATTTGAATAAAGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACACAAAAATGAAACGAAAAAAAA  |
|            |  |

La séquence complète de l'ADNc de TcAc2 est présentée ci-dessus. Les oligonucléotides utilisés pour la 5'RTPCR sont indiqués par des flèche. La séquence entière du SL est également représentée. Le début de l'insert du clone TcAc2 est indiqué par une étoile.

## Figure 23

| <u>Résidu</u> | nombre | <i>%</i> | <u>Résidu</u> | nombre | %   |
|---------------|--------|----------|---------------|--------|-----|
| Leu           | 46     | 10,3     | Tyr           | 21     | 4,7 |
| Glu           | 33     | 7,4      | Thr           | 20     | 4,4 |
| Lys           | 31     | 6,9      | Arg           | 19     | 4,2 |
| Ala           | 31     | 6,9      | Ile           | 18     | 4,0 |
| Val           | 30     | 6,7      | Met           | 14     | 3,1 |
| Pro           | 30     | 6,7      | Asn           | 14     | 3,1 |
| Ser           | 38     | 6,2      | Gln           | 12     | 2,6 |
| Asp           | 27     | 6,0      | His           | 10     | 2,2 |
| Phe           | 26     | 5,8      | Cys           | 7      | 1,5 |
| Gly           | 23     | 5,1      | Trp           | 5      | 1,1 |
|               |        |          |               |        |     |

**Tableau 10 :** Composition en acides aminés de la séquence de TcAc2.

La répartition des acides aminés à partir de leurs groupements fonctionnels est la suivante:

| Acides aminés fortement basiques (K R):  | 50 (11 %)  |
|--|------------|
| Acides aminés fortement acides (D E):    | 60 (13 %)  |
| Acides aminés polaires (N C Q S T Y):    | 102 (23 %) |
| Acides aminés hydrophobes (A I L F W V): | 156 (35 %) |

Le point isoélectrique calculé à partir de la composition en acides aminés est de pH 5,7.

De nombreux sites potentiels de modification post-traductionnelle sont présents dans la séquence:

- sites de phosphorylation par la kinase dépendante de l'AMPc et du GMPc (Thr25, Ser121);
- sites de phosphorylation par la protéine kinase C (Thr18, Thr193, Ser236);
- sites de phosphorylation par la caséine kinase II (Thr18, Thr25, Ser149, Thr193, Ser199, Ser321, Ser426);
- site de N-glycosylation (Asn124);
- sites d'amidation (Asp56, Ala419);
- site de sulfatation (Tyr142);
- sites de N-myristylation (Gly370).

De plus, deux motifs consensus ont été identifiés dans la séquence :

- le "leucine zipper pattern" (Leu382-Leu403), une région constituée de leucines, qui apparaissent regulièrement tous les sept acides aminés dans une conformation alpha-hélicoïdale. Cette alpha-hélice n'est fonctionnelle qu'en présence d'une deuxième située dans un autre polypeptide. Ce motif joue un rôle dans la régulation de la transcription. Le "leucine zipper pattern" n'existe pas dans la moitié amino-terminale de la TcAc2. Ceci suggère que cette strucure n'est probablement pas fonctionnelle.

- un peptide de transit trans-mitochondrial (Met1-Val18), qui caractérise certaines protéines transférées dans la mitochondrie. Cependant, cette protéine n'a pas été détectée dans ce compartiment en microscopie électronique.

## VII. Cartographie génomique du gène TcAc2

Chez les Trypanosomes, de nombreux gènes existent sous forme de copies multiples plus ou moins homogènes. Par exemple, les copies des gènes codant pour une protéine fixant le potassium (GONZALES et coll., 1985) sont fortement homologues alors que ceux codant pour la neuraminidase (CAMPETELLA et coll., 1992) sont fortement divergents.

Afin d'évaluer le nombre de copies du gène TcAc2, l'ADN génomique de *T. cruzi* a été digéré par différentes enzymes de restriction et hybridé en Southern-blot avec l'insert TcAc2 (**figure 24**). La cartographie réalisée à l'aide du profil de restriction et de la séquence de l'insert TcAc2 indique que le gène TcAc2 est probablement unique (**figure 25**).



Structure du gène (A) et de l'ARN (B) codant pour la protéine TcAc2 obtenue par cartographie sur l'ADN génomique et par analyse de l'insert TcAc2 ainsi que du produit de la 5'RTPCR. B: *Bam*hI, K: *KpnI*, X: *XhoI*, SL: Spliced Leader.



### L'analyse du gène codant pour la protéine TcAc2 par la technique d'hybridation de Southern



### Carte de restriction génomique du gène codant pour la protéine TcAc2

L'ADN génomique de *T. cruzi* digéré par différentes enzymes de restriction et soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose. L'hybridation en Southern avec l'insert du clone TcAc2 révèle la présence d'un seule gène codant pour la protéine TcAc2.

# Figure 24

#### VIII. Identification du transcrit de TcAc2

Afin de connaître la taille du transcrit, nous avons hybridé la sonde TcAc2 avec de l'ARN des différents stades de *T. cruzi* (souche Y) : dans le cas des épimastigotes et des amastigotes intracellulaires, un seul signal à environ 2500 bases est présent (**figure 26 A**, pistes 1 et 3). Ce signal se trouve légèrement au-dessus de celui obtenu avec la sonde de  $\beta$ -tubuline. Cependant, dans le cas des trypomastigotes (piste 2), aucun messager n'est détecté, alors que le sérum anti-TcAc2 immunoprécipite la protéine de 52 kDa à partir des antigènes métaboliques de la forme trypomastigote, réagit avec la même protéine dans un extrait total testé par Westernblot et montre une réaction positive en immunofluorescence indirecte. L'ARN fibroblastique (piste 4) utilisé comme contrôle pour les amastigotes intracellulaires ne s'hybride pas avec la sonde d'ADNc du clone TcAc2, indiquant la spécificité du signal obtenu chez les amastigotes.

Trois souches de *T. cruzi* (ECH, CL et C23) et deux autres espèces (*T. rangeli* et *T. marinkelli*) ont également été analysées en Northern-blot. Parmi les trois souches de *T. cruzi*, seule la souche C23 possède un méssager s'hybridant avec la sonde TcAc2 dans des conditions relativement stringentes (piste 5). Ce transcrit a une taille légèrement inférieure à celle de la souche Y. Un trancrit de même taille est mis en évidence pour *T. rangeli* (piste 9). D'une façon intéressante, *T. marinkelli* possède deux transcrits de tailles différentes (1750 et 2300 bases, piste 8).

La différence entre la taille du cDNA (1648 pb) et du transcrit (2500 bases) est significative (750 bases). Afin de savoir si le transcrit de 2500 bases est un précurseur de l'ADNc TcAc2, nous avons hybridé la sonde TcAc2 avec l'ARN total, l'ARN enrichi en poly(A)<sup>+</sup> et l'ARN poly(A)<sup>-</sup> du stade épimastigote (**figure 26 B**). La sonde TcAc2 s'hybride avec un transcrit de 2500 bases dans l'ARN total (piste 2) et dans l'ARN enrichi en poly(A)<sup>+</sup> (piste 1), mais pas avec de l'ARN poly(A)<sup>-</sup> (piste 3). Le signal obtenu avec la préparation poly(A)<sup>+</sup> est plus fort que celui de l'ARN total. L'absence de signal dans la préparation poly(A)<sup>-</sup> suggère que le transcrit de 2500 bases n'est pas un précurseur de l'ADNc TcAc2 mais un ARNm mature. En effet, la polyadénylation est effectuée après le *trans*-épissage (ULLU et coll., 1993).

#### IX. Recherche d'homologies

La comparaison de la séquence en acides aminés de la protéine TcAc2 avec les banques de données (DNASTAR) n'a pas révélé d'homologie avec les acétylcholinestérases. D'une façon surprenante, des homologies avec des protéines de stress de petite taille et des glutathion S-transferases (GST) ont été mises en évidence. Cette homologie n'excède pas 25% d'identité lorsque l'on considère la totalité de la chaîne polypeptidique. De plus, l'alignement avec les protéines de stress peut s'effectuer soit avec la moitié N-terminale (TcAc2-N), soit avec la moitié C-terminale (TcAc2-C). Ceci nous a conduit à comparer entre elles, les deux parties de TcAc2: l'homologie entre ces deux moitiés de la protéine est de 54%, 27% de résidus étant strictement conservés (figure 27).

#### Comparaison de la moitié N-terminale de la protéine TcAc2 avec la moitié C-terminale par alignement de séquence en acides aminés

| LF :: .PF.:R :: K.:.L :E: L .::P.W:: :N.RETVTCAC2C 227YVLFVNKYSPFSDRPRLACALKNIDLPMLEIDL-KQLPPWFRWFNQRETV54PTLQVDGKKCMIESDLISRYIDR-ISSPANALMGSSPYQRHRVEFFLGEIPTL: ES:LI :Y:D ::: AL:: V F :::277PTLLTPQGTYVHESQLIVHYLDDGFPEHGPALLPKDADGSYHVRFVESNV103GDLVKAYFGLVRDPFNEEKRKSVDNNTAYIEDIIAEHQ-GDGPYFLDDTF:::.A :::::DP N : : D .:: :E.::AEHQ G:GP:F :.T:327DYFMDAMYSFIKDPKNMNAKEEFDWAAGELEKLLAEHQFGEGPFFGGATM |
|--|
| TCAC2C227YVLFVNKYSPFSDRPRLACALKNIDLPMLEIDL-KQLPPWFRWFNQRETV54PTLQVDGKKCMIESDLISRYIDR-ISSPANALMGSSPYQRHRVEFFLGEI<br>PTL: ES:LI :Y:D ::: AL:: V F :::<br>277277PTLLTPQGTYVHESQLIVHYLDDGFPEHGPALLPKDADGSYHVRFVESNV103GDLVKAYFGLVRDPFNEEKRKSVDNNTAYIEDIIAEHQ-GDGPYFLDDTF<br>: ::.A ::::DP N : : D .:: :E.::AEHQ G:GP:F :.T:<br>DYFMDAMYSFIKDPKNMNAKEEFDWAAGELEKLLAEHQFGEGPFFGGATM                              |
| <ul> <li>54 PTLQVDGKKCMIESDLISRYIDR-ISSPANALMGSSPYQRHRVEFFLGEI<br/>PTL: ES:LI :Y:D ::: AL:: V F :::</li> <li>277 PTLLTPQGTYVHESQLIVHYLDDGFPEHGPALLPKDADGSYHVRFVESNV</li> <li>103 GDLVKAYFGLVRDPFNEEKRKSVDNNTAYIEDIIAEHQ-GDGPYFLDDTF<br/>: ::.A :::::DP N : : D .:: :E.::AEHQ G:GP:F :.T:</li> <li>327 DYFMDAMYSFIKDPKNMNAKEEFDWAAGELEKLLAEHQFGEGPFFGGATM</li> </ul>  |
| <ul> <li>54 PTLQVDGKKCMIESDLISRYIDR-ISSPANALMGSSPYQRHRVEFFLGEI</li> <li>PTL: ES:LI :Y:D ::: AL:: V F :::</li> <li>277 PTLLTPQGTYVHESQLIVHYLDDGFPEHGPALLPKDADGSYHVRFVESNV</li> <li>103 GDLVKAYFGLVRDPFNEEKRKSVDNNTAYIEDIIAEHQ-GDGPYFLDDTF</li> <li>::.A ::::DP N : D .:: :E.::AEHQ G:GP:F :.T:</li> <li>327 DYFMDAMYSFIKDPKNMNAKEEFDWAAGELEKLLAEHQFGEGPFFGGATM</li> </ul>                                   |
| PTL: ES:LI :Y:D ::: AL:: V F :::<br>277 PTLLTPQGTYVHESQLIVHYLDDGFPEHGPALLPKDADGSYHVRFVESNV<br>103 GDLVKAYFGLVRDPFNEEKRKSVDNNTAYIEDIIAEHQ-GDGPYFLDDTF<br>: ::.A ::::DP N : : D .:: :E.::AEHQ G:GP:F :.T:<br>327 DYFMDAMYSFIKDPKNMNAKEEFDWAAGELEKLLAEHQFGEGPFFGGATM  |
| <ul> <li>277 PTLLTPQGTYVHESQLIVHYLDDGFPEHGPALLPKDADGSYHVRFVESNV</li> <li>103 GDLVKAYFGLVRDPFNEEKRKSVDNNTAYIEDIIAEHQ-GDGPYFLDDTF</li> <li>:::.A ::::DP N : : D .:: :E.::AEHQ G:GP:F :.T:</li> <li>327 DYFMDAMYSFIKDPKNMNAKEEFDWAAGELEKLLAEHQFGEGPFFGGATM</li> </ul>   |
| <ul> <li>GDLVKAYFGLVRDPFNEEKRKSVDNNTAYIEDIIAEHQ-GDGPYFLDDTF</li> <li>::.A ::::DP N : D .:: :E.::AEHQ G:GP:F :.T:</li> <li>DYFMDAMYSFIKDPKNMNAKEEFDWAAGELEKLLAEHQFGEGPFFGGATM</li> </ul>  |
| 103GDLVKAYFGLVRDPFNEEKRKSVDNNTAYIEDIIAEHQ-GDGPYFLDDTF: ::.A ::::DP N : : D .:: :E.::AEHQ G:GP:F :.T:327DYFMDAMYSFIKDPKNMNAKEEFDWAAGELEKLLAEHQFGEGPFFGGATM  |
| : ::.A :::::DP N : : D .:: :E.::AEHQ G:GP:F :.T:<br>327 DYFMDAMYSFIKDPKNMNAKEEFDWAAGELEKLLAEHQFGEGPFFGGATM   |
| 327 DYFMDAMYSFIKDPKNMNAKEEFDWAAGELEKLLAEHQFGEGPFFGGATM   |
|  |
|  |
| 152 SMAEVMVVPFLACFRPVLSYYCGYDIFHNAPRLKKMYVTSMQ   |
| : A:V :VP.L AC PL: Y.:: .A: :TS .  |
| 377 NAADVSLVPMLVHLKACT-PELTEGQDLLANYKLLAAAAEAGLTSEA  |
|  |
| 194 -RTTVKETI-SKPEEYIIGFKSKVPKSHVTWSLAPG   |
| : K EY :K: : :.:   |
| 423 GKKVPLSLSEYSSIYKTFLRPSS  |

Alignement de séquences en acides aminés de la moitié Nterminale (TcAc2N) et de la moitié C-terminale (TcAc2C) de la protéine TcAc2 de *T. cruzi* 

Figure 27

L'alignement des protéines de stress et des GST avec les séquences TcAc2-N et TcAc2-C met en évidence la présence de résidus conservés. Ces acides aminés sont situés surtout dans la région amino-terminale (acides aminés 1-90; **figure 28**), tandis que la région carboxy-terminale semble moins conservée.

L'alignement simultané par le logiciel "CLUSTAL" (PCGENE) de toutes ces séquences permet de les classer en quatre grands groupes (**figure 29**):

1. Les GST de familles  $\alpha$ ,  $\mu$ ,  $\pi$  et la S-crystalline, représentées par l' $\alpha$ -GST humaine du foie (HUMHA1; TU et coll., 1986), la S-crystalline des céphalopodes (CRYS; TOMAREV et coll., 1988), la GST 28 kDa de *S. mansoni* (SM28; BALLOUL et coll;, 1987), la  $\pi$ -GST du porc (PIGGST PI; DIRR et coll., 1991), la GST 26 kDa de *S. japonicum* (SM26; TROTTEIN et coll., 1990), et la  $\mu$ -GST humaine du foie (HUMLIVMU; TAYLOR et coll., 1991).

2. Les GST de la famille  $\theta$  et les GST bactériennes (PM GST; MIGNOGNA et coll., 1993), notamment la sous-unité 5 de la GST du rat (RAT SU 5; PEMBLE et coll., 1992), la GST27 de *D. melanogaster* (DM GST 27; TOUNG et coll., 1992), la GST III du maïs (ZM GST III; GROVE et coll., 1988), la GST de l'œuillet-girofllé (CLOVE; MEYER Jr et coll., 1991), une protéine de blé homologue aux GST (WHEAT; DUDLER et coll., 1991), la dichlorométhane-déhalogénase de *Methylobacterium* spec.(METH; LA ROCHE et coll., 1990), la  $\beta$ -étherase de *Pseudomonas paucimobilis* (ne figure pas sur le dendrogramme, MASAI et coll., 1993) la "Stringent Starvation Protein" d'*E. coli* (SSP; FUKUDA et coll., 1985), la protéine URE2 de la levure (URE2; COSCHIGANO et coll., 1991) et une GST du tabac induite par l'auxine (parB) (non représentée sur la figure; TAKAHASHI et coll., 1992a).

**3**. La partie amino-terminale des facteur d'élongation 1 γ de la synthèse protéique des eucaryotes comme celui de l'homme (HUMEF1G; SANDERS et coll., non-publié, numéro d'accès de GenBank Z11531), *de Xenopus laevis* (XLEF1G; CORMIER et coll., 1991), de l'*Artemia salina* (ASEF1G; MAESSEN, 1987) et de *T. cruzi* (TCEF1G; BILLAUT-MULOT et coll., 1993).

### Comparaison de la séquence en acides aminés de la protéine TcAc2 avec la séquence des protéines de stress et une θ-GST

| *<br>TCAC2N   |
|---|
| * * * * * * *<br>- MPQUYKELNP-RETUPTLQUDGKKCMIESDLISRYIDR-ISSPANALMGSSPYORHRU-<br>PPWFRUFN-ORETUPTLLTPQGTYUHESQLIUHYLDDGFPEHGPALLPKDADGSYHU-<br>- SPAUYKDKUYAQGTUPSLEHDSE-URGESLDLIRYIDSNFDGPALLPEDAAKRQFA-<br>- SSLLLQ-SNPUHKKUPUL-IHNGKPIVESMUILEYIDETFEGPSILPKD-YDRALA-<br>- SDLLLK-YNPUHKKUPUL-IHNGKPINESNUILEYIDETFEGPSILPKD-YDRALA-<br>PEFUK-LNPQH-CIPTL-UDDGFSINESRAILIYLVEKYG-ADDSLYPSDPQKKAUUN |
| -EFFLGE[IGD]UKAYFGLURDPFNEEKRKSUDHNTAY-EDIIAEHQGDGPYFL-<br>-RFUESNUDYFMDATIYSFIKDPKNTNAKEEFDWAAGE-EKLLAEHQFGEGPFFGG<br>-DFWAKYUEDKGAAUWKSFFSKGEEQEKAKEEAYEMLKILDNEFKDKKCFUGDKF-GF<br>-RFWSKFLLGDKUAAUUNTFFRKGEEQEKGKEEUYEMLKULDNELKDKKFFUG<br>-RFWSKF[IDD]KIUGAUSKSUFTUDEKEREKNUEE]]YEALQFLENELKDKKFFGG<br>QRLYFDMGT-LFQSFUEAIY-PQIRMNHP-ADPEAMQ-KUDSAFG-HLDTFLEDQEYUAG                                 |
| DDTFSMAEUMUUPFLACFRPULSYYCGYDIFHNAPRUKKMYUTSMQ-RTT<br>-ATMAAADUSLUPMUUHLKACT-PELTEGQDLLANYKLLAAAAEAGLTSEAGK<br>ADIVANGAALKFPNF<br>DK-FGFADIAALVUTSEKFPNF<br>EE-FGLVDIAAUFIVTSEKFPNF<br>EE-FGLVDIAAUFIFTSEKFPIL<br>D-CLTIADIALLASYPNV  |
| GFKSKUPKSHUTUSLAPG.224<br>RPSS.445<br>CAURDEYCTQNEEYFPSR-DELLIIRYRAYIQPUDASK.217<br>SRURDEYINCSQUKESLPSR-DELLAFFRARF-QAUUASISAPK.225<br>YKUSQEFLNHPFUHEULPPR-DPLFAYFKARYESLSASK.225<br>ASUYENAKEVTPGU-EENUDGUQLIK-KLUQERNE212   |

Comparaison des séquences peptidiques des deux moitiés de la protéine TcAc2 (TcAc2N, TcAc2C), de la protéine PR1 de la pomme de terre (St PR1), de l'hsp26-A du soja (Gm HSP26), d'une protéine du tabac dont l'expression est induite par l'auxine (Nt pCTN103) et d'une  $\theta$ -GST de *D. melanogaster* (Dm GST27). Certains acides aminés impliqués dans l'activité enzymatique des GST sont indiqués par des étoiles.

Figure 28

### Dendrogramme de la TcAc2 et des protéines homologues



#### Dendrogramme des deux moitiés de la protéine TcAc2 et des protéines homologues établi à partir d'alignement multiple (résidus 1-90).

HUMLIVMU:  $\mu$ -GST humaine, Sj26: *S. japonicum* GST 26 kDa, PIGGST PI:  $\pi$ -GST porc, SM28: *S. mansoni* GST 28 kDa, CRYS: S-crystalline, HUMHA1:  $\alpha$ -GST humaine, BRONZE 2: protéine Bronz-2 de maïs, PR1: "pathogenesis related" protéine de la pomme de terre, NT: protéine du tabac induit par l'auxine, GMHSP26: hsp26a du soja, NPMSR1: "multiple stress response" protéine de *Nicotiana plumbaginifolia*,TCAC2C: TcAc2 moitié C-terminale, TCAC2N: TcAc2 N-terminale, URE2: URE2 protéine de la levure, WHEAT: GST de blé induite après infection par un champignon, ZM GST III: GST III du maïs, CLOVE: GST de l'œuillet-giroflée, RAT SU 5:  $\theta$ -GST 5-5 de rat, DM GST 27:  $\theta$ -GST de *D. melanogaster*, METH: dichlorométhyl-déhalogénase de *Metholobacterium* spec., SSP: "stringent starvation protein" d'*E. coli*, PM GST: GST de *Paucis mirabilis*, HUMEF1G: eEFI $\gamma$  humain, XLEF1G: eEF1 $\gamma$  de Xenopus laevis, ASEF1G: eEF1 $\gamma$  d'Artemia salina, TCEF1G: eEF1 $\gamma$  de *T. cruzi*.



**4**. Un groupe de protéines répondant aux différents stress ("multiple stress response proteins" ou "msr") contenant la protéine Bronze-2 du maïs (BRONZE 2; SCHMITZ et coll., 1992), la "Pathogenesis-Related" protéine de la pomme de terre (PR1; TAYLOR et coll., 1990), diverses protéines induites par l'auxine ou d'autres hormones de plantes (par exemple, les protéines codées par les gènes *par* du tabac (NT; TAKAHASHI et coll., 1992, VAN DER ZAAL, 1987), la hsp26a du soja (GMHSP26; CZARNECKA et coll;, 1988), la "Multiple Stress Response Protein 1" *Nicotiana plumbelliformis* (NPMSR1; DOMINOV et coll., 1992) et les deux moitiés de la protéine TcAc2 (TCAC2N et TCAC2C).

Un autre moyen de comparer les séquences en acides aminés est d'analyser leur profil d'hydrophobicité. En comparant les profils des protéines indiquées sur la **figure 30**, on constate la présence de quatre régions hydrophobes communes (1-4) et de trois parties hydrophiles communes (a, b, c). En particulier, la région c-4 est conservée dans toutes les séquences analysées.

### Graphes d'hydropathie des deux moitiés de la protéine TcAc2 et de protéines homologues à la TcAc2



## X. <u>Représentation des molécules en deux dimensions ("HCA</u> <u>plot")</u>

L'utilisation d'un système de représentation en deux dimensions d'une séquence peptidique sous forme théorique d'hélice  $\alpha$  permet l'étude des "clusters" hydrophobes mais également, le rapprochement d'acides aminés éloignés en séquence primaire (GABORIAUD et coll., 1987, LEMESRE et coll., 1990). La représentation des deux moitiés de la protéine TcAc2 montre la conservation de nombreux motifs hydrophobes et non-hydrophobes (figure 31a). Parmi les acides aminés non-hydrophobes, la conservation des résidus proline est particulièrement importante. En effet, la proline est l'acide aminé introduisant la plus grande contrainte dans une chaîne polypeptidique.

La comparaison de ces résidus et des clusters hydrophobes des protéines de stress de faible masse moléculaire, des facteurs d'élongation  $1\gamma$  de la synthèse protéique et des GST, indique, malgré leur faible taux d'homologie en séquence primaire, une conservation structurale importante (**figure 31b**). Plusieurs motifs toujours présents sont, entre autres, la sérine en position 67 (TcAc2 N-term) flanquée de part et d'autre, de deux résidus hydrophobes et un motif en forme de botte dans une région de faible homologie, entre les acides aminés Tyr145 et Phe151 (TcAc2 N-term) suivi d'une grande région hydrophobe. La séquence de référence est la GST de la classe  $\pi$  des poumons de rat. Cette protéine a été cristallisée et sa structure tri-dimensionelle déterminée.



**Figure 31** A : Représentation en deux dimensions (HCA) des deux moitiés de la protéine TcAc2. ↓proline, € cystéine, ♦ glycine, □ thréonine, □ sérine.



Figure 31 B: Représentation en deux dimensions (HCA) des protéines TcAc2, moitié N-terminale, le facteur d'élongation 1γ de la synthèse protéique de *T. cruzi*, la θ-GST27 de *D. melanogaster*, et la π-GST du porc. La structure bi-dimensionelle de la GST du porc, obtenue par diffraction aux rayons X (REINEMER et coll., 1991), est indiquée en dessous de sa structure en HCA. Les résidus prolines conservés sont indiqués par des flèches ainsi qu'une grande région hydrophobe dans le domaine H (αD). Les résidus qui interagissent avec les GSH sont marqués en vert. proline, & glycine, Intréonine, Sérine.

## XI. Purification de la protéine TcAc2 native sur la matrice S-hexylglutathion

L'existence d'une homologie entre la protéine TcAc2 et les GST (surtout de la classe  $\theta$ ) nous a conduit à analyser la capacité de cette protéine à fixer le GSH. Des travaux antérieurs, effectués dans notre laboratoire par B. Plumas-Marty, ont montré que trois protéines parasitaires étaient retenues sur une colonne d'affinité *S*-glutathion-agarose (PLUMAS-MARTY et coll., 1992). Cependant, aucune d'entre elles n'est reconnue par un sérum dirigé contre la protéine de fusion Sj26GST/TcAc2.

Afin de purifier les molécules de *T. cruzi* capables de fixer le glutathion, Djalal Meziane-Cherif dans le Service de Chimie des Biomolécules dirigé par le Pr. A. Tartar, a adopté une autre approche: la chromatographie sur colonne de *S*-hexylglutathion couplé à l'agarose. Deux différences existent entre ces deux matrices : la première concerne le couplage du glutathion à l'agarose; dans le cas de la colonne *S*-glutathion-agarose, le glutathion est fixé d'une manière covalente au support par son groupe -SH. Alors que dans le cas de la *S*-hexylglutathion-agarose, le ligand est couplé de façon covalente par le groupement -NH<sub>2</sub> du résidu glutamique. Deuxièmement, ce dernier présente un groupement aliphatique au niveau du groupement actif, le thiol (**figure 32**). Il faut noter que ce type de colonne a déjà été utilisé par certains auteurs pour la purification des GST (OOI et coll., 1993) ou d'une GST de rat qui présente aussi une activité "MIF" ("migration inhibitory factor" (BLOCKI et coll., 1992).

126

### Les structures des matrices du glutathion



Figure 32

Le passage de la fraction cytosolique du stade épimastigote sur le *S*-hexylglutathion a abouti à la purification d'une seule protéine de masse moléculaire approximative de 52 kDa. Celle-ci après analyse en SDS-PAGE suivie d'une coloration au nitrate d'argent, présente un dégré de pureté excellent (**figure 33 I**). Un sérum de souris anti-TcAc2 et des sérums anti-peptides C1-C3 dérivés de la séquence TcAc2, réagissent avec la protéine p52 purifiée par chromatographie d'affinité (**figure 33 II**). Ces résultats suggèrent que la protéine TcAc2 présente des homologies avec la protéine p52 purifiée sur colonne *S*hexylglutathion. Il est également vraisemblable que ces deux protéines soient identiques. Afin de vérifier cette hypothèse, la protéine p52 a été séquencée par le Dr. P. Maes-Aumercier du service du Pr. A. Tartar. Le séquençage des fragments de clivage de la p52 obtenus par hydrolyse enzymatique et chimique, a montré qu'ils sont identiques à la séquence TcAc2 (**figure 23**). Par ces résultats, nous pouvons donc conclure que la protéine TcAc2 pourrait correspondre à la protéine p52 purifiée sur colonne *S*héxylglutathion-agarose à partir de la fraction cytosolique d'épimastigotes.

Nous nous sommes intéressés à une caractérisation plus fine de l'affinité de TcAc2 pour le glutathion et ses dérivés. Pour cela, nous avons testé différents types de matrices et fait varier les conditions d'élution.

Trois types de matrices ont été utilisés : la *S*-glutathion-agarose, la  $NH_2$ -glutathionagarose et la *S*-hexylglutathion-agarose. La protéine TcAc2 n'est retenue que sur la matrice *S*-hexylglutathion-agarose. A pH 7,5, la protéine TcAc2 est totalement éluée par le *S*-hexylglutathion alors que le GSH ou le GSSG ne permettent l'élution que d'une faible quantité de protéine (environ un dixième). Par contre, à pH basique (9,6) la protéine TcAc2 peut être éluée en totalité par le GSH (**tableau 11**).

#### Reconnaissance de la protéine p52 purifiée sur la matrice S-hexylglutathion-agarose par des anticorps anti-TcAc2



I. SDS-PAGE suivi d'une coloration au nitratre d'argent de la fraction éluée de la matrice S-hexylglutathion-agarose avec 5 mM S-hexylglutathion.

**II.** Immunoblot sur la fraction éluée de la matrice S-hexylglutathion-agarose avec 5 mM S-hexylglutathion.

(1) Sérum anti-Sj26GST,(2) sérum anti-Ovalbumine, (3) sérum anti-TcAc2, (4) sérum anti-peptide C1 TcAc2, (5) sérum anti-peptide CII TcAc2, (6) sérum anti-peptide CIII TcAc2.

Figure 33

|          |                                 | Protéine Protéine |       |                   |            |                   |                |
|----------|---------------------------------|-------------------|-------|-------------------|------------|-------------------|----------------|
|          |                                 | α-GST             | μ-GST | π-GST             | Sm28GST    | <del>θ-G</del> ST | TcAc2          |
| Matrice  | Fixation<br>Elution             | +                 | 4     | +                 |            | _                 | +              |
|          | S-hex pH7,5                     | +                 | 4     | _ +               | + (pH 9,1) |                   | Ŧ              |
| S-hex-G- | GSSG pH7,5                      |                   | I     |                   |            |                   | I ( <b>†</b> ) |
| agarose  | GSH pH7,5                       |                   | 4-4   |                   |            |                   | (+)            |
|          | GSH pH9,5                       |                   | +     | - <b>-</b> -<br>+ |            |                   |                |
| S-G-     | Fixation<br>Elution             | +                 | l + l | ÷                 | ¦ +        |                   | ۱ <u> </u>     |
| agarose  | S-hex pH7,5                     | +                 | /     | -+                |            | · · · · · · · · · | +              |
|          | GSH pH7,5                       | +                 | +     | +                 | + (pH 9,1) |                   |                |
| NH2-GSH- | Fixation<br>Elution             |                   |       |                   | i ((+)) i  |                   | i —            |
| agarose  | <u>S-hex pH7,5</u><br>GSH pH9,6 |                   |       |                   | + (pH 9,6) |                   | <br>           |

**Tableau 11** : Capacité de fixation des différents dérivés du glutathion par les GST et la protéine TcAc2.

S-hex-G-agarose: S-hexylglutathion-agarose; S-G-agarose: S-glutathion-agarose; S-hex: S-hexylglutathion; +: positif; (+): faible; ((+)): très faible; cases vides: non-déterminé; "-": négatif; 4-4: isoenzyme 4-4 de rat de la famille des  $\mu$ -GST.

## XII. Analyse de la réponse immune anti-TcAc2 lors de l'infection expérimentale

## <u>1. Cinétique de la réponse humorale chez la souris BALB/c infectée</u> par <u>T. cruzi.</u>

Les sérums de souris BALB/c ont été prélevés à différents temps après infection avec une dose de 2500 trypomastigotes. La protéine de fusion Sj26GST/TcAc2 a été utilisée comme antigène dans la technique ELISA. La **figure 34** montre qu'il y a une faible réponse anticorps vis-à-vis de la protéine TcAc2. En revanche, l'immunisation avec la protéine de fusion Sj26GST/TcAc2 induit une très bonne réponse anticorps. Cependant, une légère augmentation des isotypes IgG1 (**figure 34 I**), IgG2b (**figure 34 II**) et IgA (**figure 34 III**) apparaît lors de l'infection chagasique. En ce qui concerne les autres isotypes testés (IgM, IgG2a et IgG3), les valeurs obtenues sont tout à fait comparables à celles observées avec les sérums contrôles.

La même observation est retrouvée dans les résultats obtenus par la technique du Westernblot qui montre une très faible réactivité des sérums de souris infectées par *T*. *cruzi* vis-à-vis de la protéine TcAc2 (**figure 34 IV**).

#### 2. Réponse humorale dans l'infection naturelle

De même que pour la réponse des souris, les sérums humains chagasiques ont été testés par la technique d'ELISA et en Western-blot. Les résultat obtenus sont similaires à ceux obtenus dans le cas de la souris. En effet, les deux techniques montrent la présence d'une très faible réponse anticorps qui peut parfois être absente (**figure 34 IV**).

Réponse humorale dans l'infection naturelle et expérimentale par Trypanosoma cruzi Ι Π IgG1 IgG2b 0,2 0,4 OD OD 0,3 0,1 0,2 0.1 0.0 0,0 J10 J17 J23 **S S S** J2 J10 sss J2 J17 J23 Jours après infection Jours après infection A IgA 0,10 1 2 3 4 5 6 7 kDa QD 100,6 — 0,08 71,2 — 0,06 43,5 -28,6 -0,04 0,02 18,3 — 0,00 J2 J10 J17 J23 sss Jours après infection B Ш IV Cinétique de la réponse humorale dans l'in-1 2 3 4 5 6 7 kDa fection expérimentale : IgG1 (I), IgG2b (II), IgA (III). 100,6 -Immunoblot de sérums chagasiques sur la 71,2 protéine de fusion Sj26GST/TcAc2 (IV): 43,5 -A) Sérums de souris infectées par T. cruzi: phase aiguës (1-4); phase chronique (5), sé-28,6 rum de souris anti-TcAc2 (6) et sérum de souris saine (7). B) Sérum humain normal (1); sérum de souris 18,3 anti-peptide C2 de TcAc2 (2); sérums humains chagasiques de phase chronique (3-7).

Figure 34

## XIII. Pouvoir protecteur de la protéine de fusion Sj26GST/TcAc2 contre l'infection expérimentale

Afin de tester le pouvoir protecteur de la protéine TcAc2, nous avons immunisé des souris BALB/c avec la protéine de fusion Sj26GST/ TcAc2, avant de les infecter avec une dose létale de trypomastigotes sanguicoles.

Le pourcentage de mortalité est déterminé en fonction des jours d'infection.

Dans deux groupes de souris (Sj26GST et Sj26GST/TcAc2), la mortalité commence 20 jours après infection (figure 35).

Seulement 15 % des souris contrôles (Sj26GST) survivent en phase aiguë après 60 jours d'infection, alors que dans le groupe de souris immunisées avec la Sj26GST/TcAc2, on observe un retard de la mortalité en comparaison avec le groupe témoin. De plus, environ 57 % des souris ayant été injectées avec la protéine Sj26GST/TcAc2 survivent à l'infection en phase aiguë. Toutes les souris survivantes ont été maintenues en vie jusqu'à 150 jours après l'infection.



Figure 35 : Pouvoir protecteur de la protéine de fusion Sj26GST/TcAc2 vis-àvis de la mortalité par *T. cruz*i. Les colonnes en gris correspondent au groupe de souris immunisées avec la protéine de fusion Sj26GST/TcAc2 avant l'infection par *T. cruzi* et les colonnes en noir correspondent au groupe contrôle immunisé par Sj26GST.

### DISCUSSION

#### <u>Généralités</u>

*Trypanosoma cruzi* est un protozoaire parasite intracellulaire obligatoire peu spécifique dans son choix de l'hôte vertébré. Il infecte à la fois un grand nombre d'animaux sauvages et domestiques ainsi que l'homme. Le parasite possède la capacité d'infecter différentes populations cellulaires. De nombreux travaux ont été consacrés à l'étude des protéines, jouant un rôle dans l'interaction hôte-parasite.

Au cours de l'infection, l'homme développe une réponse immune dont les composantes humorale et cellulaire contrôlent la parasitémie pendant la phase chronique. Néanmoins, il subsiste des "nids" de formes amastigotes chez l'hôte infecté.

La pathologie caractéristique de cette maladie est la destruction des muscles squelettiques et du coeur, et l'apparition des méga-viscéres. Ces symptômes semblent être directement ou indirectement dûs à des phénomènes immunologiques d'auto-réactivité induits pendant l'infection chagasique.

L'étude des antigènes potentiellement vaccinants est encore au stade expérimental. Le but premier de la réalisation d'un vaccin est d'éviter une trop forte parasitémie car celle-ci peut être fatale. Il reste en effet à démontrer qu'une vaccination peut être capable de protéger contre la pathologie de la phase chronique.

L'autre approche anti-parasitaire est la chimiothérapie. Malheureusement, les deux médicaments en usage, le nifurtimox et le benznidazole ne sont efficaces que pendant la phase aiguë de la maladie. De plus, des effets secondaires fréquents sont constatés chez les patients traités.

#### L'activité acétylcholinestérase

La présence d'une activité acétylcholinestérasique dans les extraits du stade épimastigote de *T. cruzi* a déjà été démontrée par DURIEZ-VAUCELLE et coll. (1983). Des travaux ultérieurs (OUAISSI et coll., 1988) ont montré l'existence d'anticorps antiacétylcholinestérase et d'anticorps anti-idiotypiques dans les sérums des patients chagasiques. Il était donc intéressant d'identifier la molécule capable d'exprimer cette activité enzymatique et d'induire ces auto-anticorps.

Nous avons d'abord abordé ce projet en reproduisant ces résultats à l'aide d'un système d'électrophorèse plus résolutive que celui utilisé par DURIEZ-VAUCELLE et coll. (1983). L'activité acétylcholinestérase de la forme épimastigote n'est trouvée que dans le culot (après sonication et ultra-centrifugation à 230.000 xg) solubilisé avec le Triton X-100. Cette activité est concentrée dans une seule bande après électrophorèse en gel natif. La fraction cytosolique ne contient pas d'activité acétylcholinestérase. Cette activité enzymatique est absente du culot extrait par un tampon de faible ou de forte osmolarité.

Afin d'obtenir un sérum vis-à-vis de la protéine(s) portant l'activité acétylcholineestérase, nous avons immunisé des souris BALB/c à avec la région du gel contenant cette activité. La cinétique de réactivité de ce sérum nommé sérum anti-TXepi, avec un extrait NP-40 de la forme épimastigote met en évidence une bande majeure de 52 kDa et une deuxième (40 kDa) d'une intensité plus faible. Plusieurs antigènes mineurs réagissent avec les sérums des dernières saignées.

Afin de cribler une banque d'expression d'ADNc de *T. cruzi*, nous avons testé la réactivité du sérum anti-TXepi vis-à-vis des produits de traduction des ARNm du parasite. L'autoradiogramme des antigènes immunoprécipités par ce sérum montre une bande de 52 kDa et une autre d'environ 55 kDa. Une bande de 52 kDa a également été immunopécipitée par le sérum anti-TXepi, à partir des antigènes métaboliques du parasite et semblerait donc correspondre au produit de traduction précédemment cité. Le composant de 55 kDa semble quant à lui, être non-spécifique car il apparaît également après immunopécipitation des mêmes produits de traduction à l'aide d'un sérum non-

immun. L'ensemble de ces résultats nous permettait cependant d'entreprendre le criblage d'une banque d'expression du stade épimastigote, à l'aide de ce sérum anti-TXepi.

#### Caractérisation de la protéine TcAc2

Le criblage en expression de la banque d'ADNc du stade épimastigote, à l'aide de l'immunsérum anti-TXepi a permis l'isolement d'un clone nommé TcAc2. L'insert du clone TcAc2 a ensuite été sous-cloné dans le vecteur d'expression pGEX-2T qui permet d'exprimer chez E. coli, la protéine recombinante en fusion avec la GST de 26 kDa de Schistosoma japonicum(Sj26GST). Ce système d'expression permet également la purification du produit de fusion par chromatographie sur colonne de glutathion-agarose. Le sérum anti-TcAc2, obtenu après immunisation de souris à l'aide de la protéine recombinante, a été utilisé dans différentes techniques immunologiques, telles que l'immunofluorescence indirecte, l'immunoblot et l'immuoprécipitation des produits métaboliques et de traduction in vitro des ARNm. Les résultats obtenus en immunoblot ont montré que l'antigène reconnu par le sérum anti-TcAc2 est présent dans trois stades de T. cruzi. De plus, l'immunoprécipitation d'un composant de 52 kDa dans les antigènes d'excrétion/sécrétion du parasite indique que la protéine TcAc2 est libérée dans le milieu de culture, par les formes épimastigotes et trypomastigotes. A ce stade, il est cependant important de signaler que les préparations de trypomastigotes contiennent toujours un certain pourcentage de formes amastigotes et des formes indifférenciées qui peuvent donc contribuer à la présence de la protéine TcAc2 mise en évidence dans les produits d'immunoprécipitation et sur les Westernblots.

L'absence de réactivité de l'immunsérum anti-TcAc2 vis-à-vis des extraits totaux d'autres Kinetoplastidae (*Phytomonas, Leishmania*) suggère que la reconnaissance immunologique de cette protéine est restreinte aux espèces du genre *Trypanosoma*. Il est à noter qu'une bande supplémentaire d'environ 60 kDa a par ailleurs été mise en évidence chez *T. rangeli*. L'analyse moléculaire de ce composant après clonage du gène correspondant et microséquencage de l'antigène natif, pourra nous renseigner sur la nature de la réaction croisée ainsi détectée entre les deux souches de Trypanosomes.

L'étude des différences antigéniques entre *T. cruzi* et *T. rangeli* est en effet particulièrement intéressante puisque cette derniere espèce, bien qu'infectieuse, n'est pas pathogène pour l'homme.

A l'inverse de la reconnaissance par anticorps, la sonde ADNc correspondant au clone TcAc2 n'hybride pas avec l'ARN total des souches ECH et C23. En revanche, elle identifie des transcrits dans les ARN totaux de *T. marinkelli, T. rangeli* et *T. cruzi* souches Y et CL Cette hétérogénéité au niveau de la reconnaissance entre les immunoblots et l'hybridation sur l'ARN pourrait s'expliquer dans l'usage différent des codons chez les différentes souches de *T. cruzi*. L'espèce *T. cruzi* semble en effet évoluer de façon clonale, c'est à dire asexuée (TIBAYERENC et coll., 1986). Ceci a pour conséquence de permettre une très grande diversité entre les souches de cette espèce. Il est vraisemblable que pour le marquer TcAc2, *T. marinkelli, T. rangeli* et CL soeint plus proche de la souche Y que ECH et C23.

Nous avons donc montré que la protéine TcAc2 est présente dans les trois stades de différenciation de *T. cruzi*. Bien qu'il soit difficile d'estimer la quantité d'ARN spécifique des formes amastigotes au sein de la population d'ARN extraits à partir de cellules infectées, le taux de messagers détecté dans les formes amastigotes semble plus faible que celui des formes épimastigotes. Cependant, l'analyse par Northernblot ne revèle pas de transcrit dans une préparation d'ARN du stade trypomastigote.

Deux hypothèses peuvent être formulées pour expliquer la présence de la protéine au stade trypomastigote:

1- une contamination des protéines trypomastigotes par des protéines d'amastigotes ou de formes indifférenciées;

2- la protéine TcAc2 présente dans les trypomastigotes persisterait à des taux résiduels, après la différenciation des formes amastigotes en formes trypomastigotes.

Par ailleurs, il est à noter que la protéine TcAc2 semble être assez stable, à la fois à l'intérieur de la cellule et dans le surnageant de culture. En effet, après 18 heures de chasse métabolique, aucune dégradation n'est observée. De plus, les formes trypomastigotes montrent une faible réactivité en immunofluorescence avec le sérum anti-TcAc2. Ceci suggère une persistance de cette protéine après différenciation des amastigotes en trypomastigotes.

#### Structure de l'ADNc

La séquence complète de l'ADNc codant pour la protéine TcAc2 a été obtenue en utilisant deux techniques différentes. Dans un premier temps, la banque d'ADNc du stade épimastigote de *T. cruzi* a été criblée à l'aide d'un sérum obtenu par immunisation de souris avec une bande d'un gel d'électrophorèse natif contenant l'activité acétylcholinestérase. Ce criblage a permis l'isolement d'un clone de 1495 paires de bases (nommé TcAc2) possédant une queue poly(A) mais pas de "spliced leader" (SL) à son extrémité 5'. Ce spliced leader a cependant été décrit jusqu'à présent pour tous les messagers matures des Trypanosomes. Afin de compléter la région 5' du clone TcAc2, nous avons employé la technique de PCR par transcription réverse à partir de l'ARNm, en utilisant un oligonucléotide spécifique de l'insert TcAc2 et un oligonucléotide spécifique du SL. Le séquençage du fragment amplifié a permis de compléter la séquence 5' de l'insert TcAc2 par recouvrement. La longueur totale de ce messager serait donc de 1647 bases, dont 1335 codant pour une protéine de 445 acides aminés (poids moléculaire théorique de 50,6 kDa).

D'une facon intéressante, la région codante renferme seulement 47% de GC, alors que la moyenne est de 57% pour les autres gènes de *T. cruzi* (ALONSO et coll., 1992). La signification de cette différence n'est pas connue. En fait, le pourcentage de GC de TcAc2 est intermédiaire entre le %GC des gènes codés par le noyau (57% GC) et des gènes mitochondriaux (31% GC). Les gènes codant pour les glycoprotéines variables de surface (VSG), la procycline (PARP) et les ESAG de *T. brucei* possèdent également un faible pourcentage de GC dans leurs codons (ALONSO et coll., 1992). Cependant, le %GC de la région 3' de TcAc2 (43%) est proche de la moyenne du %GC observée chez *T. cruzi* (41%).

| Pourcentage | de GC | (%) dans la              | région      | codar       | nte de l'ADNc de TcAc2    |
|-------------|-------|--------------------------|-------------|-------------|---------------------------|
|             | Total | région<br><u>codante</u> | <u>lère</u> | <u>2ème</u> | <u>3ème base du codon</u> |
| T. cruzi    | 51    | 56,9                     | 59,6        | 43,7        | 67,3                      |
| TcAc2       |       | 47,2                     | 54,4        | 38,9        | 51,0                      |

La région 5' non-codante située entre le SL et le codon ATG d'initiation de traduction est relativement courte (12 bases). Cependant, bien que la taille de cette région puisse atteindre plus de 200 bases, des régions 5' noncodantes de 20 bases ont déjà été décrites dans certains gènes codant pour des VSG d'une autre espèce de Trypanosomes, *T. brucei* (DONELSON et coll., 1985).

Par ailleurs, plusieurs groupes ont mis en évidence le rôle déterminant de la région 3' dans le contrôle du niveau d'expression chez *T. brucei* (PAYS et coll., 1990, JEFFERIES et coll., 1991 ; HUG et coll., 1993). La région 3' noncodante de l'ADNc TcAc2 est de 244 bases, du codon stop au site d'insertion de la queue poly(A). Elle contient une séquence particulière entre les bases 1556-1569 (GAGAAT[T]TAAGAG) et cinq répétitions du motif AAA(2 ou 3 G/C)AAA. Le rôle de ces motifs n'a cependant pas été étudié. Il serait donc intéressant de rechercher si ces motifs sont impliqués dans la régulation de l'expression de la protéine TcAc2 en fonction du stade parasitaire. En effet, le stade transitoire nonréplicatif, le trypomastigote, ne contient pas ce messager. En plus de cette régulation, selon le stade de différenciation parasitaire, nous avons observé que l'expression du gène codant pour cette protéine augmente considérablement avec l'âge de la culture d'épimastigotes *in vitro*. De plus, bien qu'il existe un motif AATAAA en amont du site d'insertion de la queue poly(A), cette séquence de polyadénylation conservée chez les eucaryotes supérieurs (PROUDFOOT et coll., 1976, FITZGERALD et coll., 1981) ne semble pas fonctionnelle chez les Trypanosomes. Le signal pour ce type de modification post-transcriptionnelle n'est d'ailleurs pas connu chez ces parasites.

#### Le transcrit TcAc2

Un résultat surprenant est que la taille du messager (2,5 kb) est supérieure à celle de l'ADNc de TcAc2. Afin de savoir s'il s'agissait d'un pré-messager, nous avons hybridé la sonde TcAc2 avec de l'ARN total, l'ARN enrichi en ARNm poly(A)<sup>+</sup> et avec de l'ARN poly(A)<sup>-</sup> du stade épimastigote. Les résultats montrent clairement qu'il s'agit d'un messager mature car aucun signal n'a été obtenu avec la fraction poly(A)<sup>-</sup>. En effet, les messagers ayant une queue poly(A) ont déjà subi l'addition du SL (ULLU et coll., 1993). La question se pose donc de savoir s'il existe plusieurs gènes homologues permettant la transcription de messagers de taille différente et en quantité variable. La cartographie réalisée sur l'ADN génomique digéré par différentes enzymes suggère en effet l'existence d'un seul gène.

En 1990, Nina AGABIAN (1990) souligne que le site d'addition du SL chez les Trypanosomes ne serait pas bien conservé dans une même espèce d'ARN, et qu'il en existerait plusieurs donnant des messagers de taille différente. En effet, des sites multiples sont connus pour les gènes de la dihydrofolate réductase-thymidylate synthétase de *L. major* (KAPLER et coll., 1987), des VSG (pour "Variable Surface Glycoproteins") de *T. equiperdum* (LAYDEN et coll., 1988) d'actine (HUG et coll., 1993) et de calmoduline de *T. brucei* (TSCHUDI et coll., 1985). De plus, l'ARNm codant pour l'actine peut être polyadénylé en plusieurs sites (HUG et coll., 1993). En effet, les différences entre les messagers alternatifs peuvent atteindre quelques centaines de bases. La différence entre l'ADNc de TcAc2 et le messager est d'environ 800 bases. Il serait donc intéressant de savoir si l'extension se trouve à l'extrémité 5' ou 3'. Pour cela, la construction d'une banque génomique de *T. cruzi* est envisagée. Afin de déterminer d'autres sites possibles d'addition du SL ou de polyadénylation, des expériences d'extension d'amorce et de cartographie par la nucléase S1 seront réalisées.

D'une façon intéressante, l'hybridation de la sonde TcAc2 sur l'ARN total de *T*. marinkelli révèle deux transcrits d'environ 1750 et 2300 bases. S'il se vérifie qu'un seul gène donne naissance, dans cette espèce, à deux messagers de taille différente, la comparaison de leur séquence avec celle de l'insert TcAc2 devrait nous renseigner sur l'utilisation des séquences consensus de *trans*-splicing ou de poly-adénylation.

#### Structure et homologies de la protéine TcAc2

Afin de connaître la nature de la protéine TcAc2, sa séquence en acides aminés a été comparée avec différentes banques de données. Aucune homologie n'a été trouvée avec les acétylcholinestérases ou d'autres hydrolases.

Cependant, des homologies significatives avec certaines protéines de plantes et des membres de la superfamille des glutathion *S*-transférases ont été mises en évidence. D'une façon intéressante, il est possible d'aligner ces différentes protéines à la fois avec la moitié N-terminale de la protéine TcAc2 (N-Term) et également avec sa moitié C-terminale (C-Term). La comparaison des deux moitiés N-Term et C-Term de TcAc2 entre elles montre qu'elles possèdent 54% d'homologie, dont 27% de résidus strictement conservés. Au niveau de l'ADNc, l'homologie entre la partie 5' et la partie 3' est de 51%. Ceci nous a amené à émettre l'hypothèse qu'il existait un gène ancestral codant pour une protéine de 25 kDa environ, dont la duplication aurait donné naissance au gène codant pour TcAc2. Les différences observées entre les deux moitiés N-Term et C-term de la protéine seraient dues à des mutations. Ces différences suggèreraient également que l'événement de duplication devrait avoir eu lieu très tôt au cours de l'évolution. Il existe de nombreux exemples de duplication de gène avec fusion. C'est la cas des gènes codant pour des protéases rétrovirales (PEARL et coll., 1987) et de mammifères (DOOLITTLE

et coll., 1981).

L'activité des GST n'est induite qu'après dimérisation de deux sous-unités de 25 kDa environ. La protéine TcAc2, quant à elle, présente "intrinsèquement" une structure dimérique puisque la moitié N-terminale est homoloque à la moitié C-terminale. De plus, un motif  $\beta$ -turn est présent à la jonction entre les deux moitiés de la protéine. Ce motif, en assurant un repliement antiparallèle de la protéine, permettrait de reproduire l'arrangement observé entre les deux sous-unités monomériques des GST (REINEMER et coll., 1992).

L'alignement des deux moitiés N-Term et C-Term de TcAc2 avec les différentes protéines homologues (protéines de plantes et protéines de la superfamille des GST) montre que l'homologie est essentiellement située dans leur région N-terminale (acides aminés 1 à 90). Dans les GST, cette région constitue le domaine G responsable de la fixation du GSH. Afin de mieux caractériser l'homologie observée dans ce domaine G, nous avons essayé de localiser dans la protéine TcAc2, les résidus correspondant à ceux impliqués dans l'interaction du GSH avec les GST. Cependant, en l'absence d'analyse de structure tri-dimensionnelle des  $\theta$ -GST, qui représente la famille des GST avec lesquelles la TcAc2 montre l'homologie la plus forte, nous n'avons pu prendre en compte que les structures des  $\mu$ - et  $\pi$ -GST (READY et coll., 1979; DIRR et coll., 1991; REINEMER et coll., 1991; JI, 1992; REINEMER, 1992). Ainsi, il apparaît que les acides aminés impliqués dans la fixation du GSH sont conservés dans les deux moitiés N-Term et C-Term de la protéine TcAc2 (**tableau 12**).

| <u>π-GST humain</u> | <u>π-GST-rat</u> | <u>µ-GST rat</u> | TcAc2N | <u>TcAc2C</u> |
|---------------------|------------------|------------------|--------|---------------|
| Tyr7                | Tyr7             | Tyr6             | Leu11  | Tyr234        |
| Arg13               | Arg13            | Leu12            | Arg17  | Arg240        |
| Trp38               | Trp38            | Trp45            | Trp43  | Trp265        |
| Lys42               | Lys42            | Lys49            | Lys45  | Arg267        |
| Gln49               | Gln49            | Asn58            | Thr52  | Thr274        |
| Leu50               |                  | Leu59            | Val53  | Val275        |
| Pro51               | Pro51            | Pro60            | Pro54  | Pro276        |
| Gln62               | Gln62            | Gln71            | Glu66  | Glu288        |
| Ser63               | Ser63            | Ser72            | Ser67  | Ser289        |
| Glu95               | Glu95            |                  | Glu101 | Glu322        |
| Asp96               |                  | Asp105           | Asp104 | Asp326        |

**Tableau 12** : Résidus impliqués dans la fixation du glutathion des  $\pi$ -GST de l'homme (REINEMER et coll., 1992) et de rat (REINEMER et coll., 1991), la  $\mu$ -GST de rat (JI, 1992) et leurs équivalents dans les deux moitiés de la protéine TcAc2 de *T. cruzi*. Les résidus marqués en caractères gras sont identiques tandis que ceux qui sont écrits en italique sont homologues.

Le résidu Tyr6 (ou Tyr7) des GST est nécessaire pour l'activation du glutathion (KARSHIKOFF et coll., 1993). Le fait que cette tyrosine soit remplacée par une leucine dans la moitié N-Term de la protéine TcAc2 suggère que cette protéine aurait une activité *S*-transférase plus faible, si toutefois, celle-ci existe. La Gln49 de la  $\pi$ -GST est remplacée dans la protéine TcAc2 par une thréonine. Il faut noter que la  $\theta$ -GST1-1 de *Drosophila melanogaster* possède également une thréonine (TOUNG et coll., 1990). La Gln62, un résidu polaire, peut être remplacé dans les différentes GST par un acide glutamique. Cela est aussi le cas dans la protéine TcAc2.

Des expériences de mutagénèse dirigée sur les  $\pi$ -GST (MONAHARAN et coll., 1992b) ont mis en évidence d'autres résidus impliqués dans la fixation du glutathion ou dans l'activité enzymatique. Ces résidus sont également retrouvés dans la protéine TcAc2 (**tableau 13**).

| <u>π-GST humain</u> | TcAc2N | TcAc2C |
|---------------------|--------|--------|
| Asp57               | Asp59  | Gln282 |
| Gly58               | Gly60  | Gly283 |
| Ile68               | Ile70  | Ile292 |
| His71               | Arg72  | His294 |
| Arg182              | Arg193 | Lys424 |
|                     |        |        |
|                     |        |        |

**Tableau 13** : Résidus impliqués dans la fixation du glutathion ou dans l'activité enzymatique de la  $\pi$ -GST humaine (MONAHARAN et coll., 1992b). L'importance de ces résidus à été mise en évidence par mutagénèse dirigée. Les résidus déjà mentionnés dans le tableau 12 n'apparaissent pas ici. Les résidus marqués en caractères gras sont identiques, ceux qui sont écrits en italique sont homologues.

A l'heure actuelle, peu d'informations sont disponibles quant à l'interaction des différents substrats des GST avec le domaine H C-terminal (responsable de la fixation des substrats lipophiles). Dans les GST analysées, les structures bi- et tri-dimensionelles de ce domaine sont bien conservées. En 1993, BARYCKI et coll. (1993) ont montré que la Tyr115 d'une  $\mu$ -GST de rat, située dans un large cluster hydrophobe, est impliquée dans la fixation des xénobiotiques. Dans la protéine TcAc2, un résidu Tyr est retrouvé dans les clusters homologues, soit en un même endroit (C-Term, Tyr333), soit déplacé d'un acide aminé en direction amino-terminale (N-Term, Tyr109).

En conclusion, les résidus essentiels pour la fixation et l'activation du glutathion ainsi que pour l'activité enzymatique S-transférase sont conservés dans les deux moitiés de la protéine TcAc2, à l'exception du résidu Tyr7 dans la moitié N-terminale. Cette moitié N-Term de la protéine apparaît donc comme homologue au domaine G des GST. Il est donc probable que la protéine TcAc2 et les GST aient évolué à partir d'un gène ancestral commun.

## <u>Structure bi-dimensionelle de la protéine TcAc2 et des protéines</u> <u>homologues</u>

Afin d'explorer l'hypothèse d'un gène ancestral, nous avons comparé les profils d'hydropathie des différentes protéines montrant une homologie avec TcAc2. Les profils correspondant aux deux moitiés de la protéine TcAc2 sont en effet presque identiques et superposables. La seule exception concerne la région carboxy-terminale de la moitié C-Term qui apparaît plus hydrophobe que les régions correspondantes des protéines homologues. Nous pouvons également constater la superposition des profils d'hydropathie de plusieurs protéines qui présentent par ailleurs une homologie significative en séquence primaire avec la protéine TcAc2. Cette homologie recouvre 3 régions hydrophiles et 4 régions hydrophobes, dont la plus large se trouve dans le domaine H des GST, connu pour son affinité pour les substrats hydrophobes (MANNERVIK et coll., 1985b). Il faut noter que la plupart des GST présentent ce profil d'hydropathie. Un profil d'hydropathie semblable est également retrouvé pour certaines protéines de stress de faible poids moléculaire (sHsp) (CZARNECKA et coll., 1988) et pour les crystallines de type A et B (DE JONG et coll., 1988).

La comparaison des différentes séquences en fonction de leur structure bidimensionnelle renforce donc la valeur des homologies observées dans les autres modes de représentation (séquence primaire et profil d'hydrophobicité). Cette analyse révèle en effet une forte homologie dans la localisation des prolines qui est l'acide aminé introduisant la plus grande contrainte dans une chaîne polypeptidique. De plus, les groupes d'acides aminés hydrophobes dans le domaine H sont fortement conservés. Ce
domaine qui fixe le substrat des GST est pourtant faiblement conservé au niveau de la séquence primaire entre les différentes familles de GST.

Les résultats obtenus à l'aide des plots d'hydropathie et des profils HCA sont concordants : deux grands motifs hydrophobes sont séparés par une région hydrophile (couvrant les résidus 100-140). En HCA, nous remarquons une structure hydrophobe en forme de "botte" (entre les résidus 140-150), suivie d'un grand motif hydrophobe pour toutes les protéines analysées. La région comprenant cette "botte" permet en fait l'arrangement des  $\alpha$ -hélices  $\alpha D$  et  $\alpha F$  de la  $\pi$ -GST de rat d'une façon antiparallèle (REINEMER et coll., 1991) et semble donc nécessaire pour maintenir la structure tridimensionelle de la protéine.

L'analyse des séquences en acides aminés des eEF1 $\gamma$  (facteurs d'élongation de l'étape de traduction des protéines) en HCA révèle une homologie significative entre leur région amino-terminale et les GST. Les gènes codant pour ces protéines pourraient donc être issus de la fusion de deux gènes différents, l'un codant pour une GST (résidus 1-200) et l'autre, pour une protéine de fonction inconnue (résidus 200-400). Une telle hypothèse a été émise pour les gènes de la dihydrofolate réductase-thymidilate synthétase de la plante *Arabidopsis thaliana* (LAZAR et coll., 1993) et de *Leishmania major* (BEVERLY et coll., 1986) ainsi que pour le gène de la tryptophane synthétase d'*Escherichia coli* (MIOZZARI et coll., 1979). Le domaine de la sous-unité  $\gamma$  du complexe eEF1 $\beta\gamma(\delta)$  homologue à la GST pourrait donc être responsable de l'affinité de ce complexe pour le *S*-glutathion-agarose sur lequel il a été purifié (PLUMAS-MARTY et coll., 1992).

#### Affinité de la TcAc2 pour le glutathion

Certaines GST ont des affinités différentes pour les conjugués de glutathion. Les GST des familles  $\alpha$ ,  $\mu$  et  $\pi$  se fixent sur le glutathion-agarose et sur le S-hexylglutathionagarose. Les  $\alpha$ ,  $\mu$  et  $\pi$ -GST peuvent ainsi être éluées par ces ligands. Néanmoins, les isoformes 3-3 et 4-4 de la µ-GST du rat peuvent être séparés à l'aide d'un gradient de pH (pH 7.5 pour l'isoforme 4-4 puis 9.6 pour l'isoforme 3-3) (OOI et coll., 1993). En revanche, les  $\theta$ -GST ne peuvent pas être purifiées par ce ligand (MEYER D.J.et coll., 1991; CASTRO et coll., 1993). La TcAc2 possède une homologie plus importante avec les  $\theta$ -GST qu'avec les autres GST. Cependant, contrairement aux  $\theta$ -GST qui ne sont pas retenues par des colonnes de dérivés de glutathion, le TcAc2 présente la capacité de se fixer sur une matrice S-hexylglutathion-agarose. Elle se comporte donc à la fois différemment des  $\theta$ -GST en ce qui concerne l'affinité pour la matrice S-hexylglutathion et de façon similaire pour la matrice S-glutathion. D'une façon intéressante, l'élution de la protéine TcAc2 avec le GSH ou le GSSG à pH 7,5 est beaucoup moins efficace qu'avec le S-hexylglutathion ou avec le GSH à pH basique. La protéine TcAc2 ressemble donc plutôt aux µ-GST pour ce qui concerne son élution alors qu'en terme d'affinité et de séquence, la TcAc2 se comporte comme une forme intermédiaire entre les familles  $\mu$  et  $\theta$ .

Des protéines recombinantes correspondant soit à la moitié N-Term, soit la moitié C-Term de TcAc2 seront ainsi exprimées chez *E. coli* puis chez le *T. cruzi* lui-même après transfection (KELLY et coll., 1990). Des constructions couvrant les deux domaines homologues au domaine G des GST seront utilisées dans les mêmes systèmes d'expression afin de tester la capacité des protéines recombinantes à fixer les différentes matrices de glutathion et de ses dérivés.

#### Un rôle de détoxification pour la protéine TcAc2 ?

Certaines protéines, telles que la SSP d'*E. coli* (FUKUDA et coll., 1985) ou l'URE2 de la levure (COSCHIGANO et coll., 1991), classées par alignement de séquence dans la famille des  $\theta$ -GST ne présentent ni activité enzymatique *S*-transférase (en utilisant le CDNB comme substrat) ni affinité pour le glutathion ou ses dérivés. Ceci est également vrai pour les membres de la famille de protéines "msr" ("multiple stress response proteins") qui forment un groupe proche des  $\theta$ -GST. Excepté la TcAc2, tous les autres membres de la famille "msr" sont des protéines végétales. Leur synthèse est induite par des hormones et médiateurs végétaux comme l'auxine, la cytokinine et l'éthylène ou par les métaux lourds, le choc thermique, les polyamines et l'infection par des pathogènes. L'auxine et la cytokinine sont impliquées dans la régulation de l'expression d'un certain nombre de gènes pendant la croissance et la différenciation des plantes (NAPIER et coll., 1991). L'un des gènes dont l'expression est induite par l'auxine, est celui d'une GST. Cette GST (parB) pourrait être impliquée dans la prolifération des protoplastes du mésophyle (TAKAHASHI et coll., 1992a).

Le glutathion induit également la transcription de gènes de défense chez les plantes (DRON et coll., 1988). En outre, après une attaque par des pathogènes fongiques, certaines plantes expriment des GST qui, dans le cas du blé, induisent une résistance contre un champignon pathogène (DUDLER et coll., 1991). Le mécanisme par lequel cette GST contribue à la résistance n'est pas connu.

De plus, les GST sont impliquées dans la protection contre les dommages causés aux lipides par le stress oxydatif. La production de péroxydes dérives des lipides, souvent toxiques, est également induite pendant l'aggression des plantes par certains pathogènes (KEPPLER et coll., 1987) et pendant l'altération des pétales (SYLVESTRE et coll., 1989). L'augmentation de l'expression des GST ou des protéines fixant les conjugués du glutathion pourrait donc être un mécanisme protecteur contre les effets de la péroxydation des lipides membranaires.

148

En 1993, MEYER a émis l'hypothèse que certaines GST possèdent un rôle primaire de fixation de conjugués du glutathion plutôt qu'une fonction enzymatique *S*transférase (KETTERER, et coll. 1988; BROPHY et coll., 1990a). En effet, la "ligandine", qui est un hétérodimère des sous-unités de l' $\alpha$ -GST1-1 et 1-2 de rat, ainsi que certaines GST des Helminthes semblent être impliquées dans le transport intracellulaire, le stockage et la séquestration des molécules qui peuvent être des substrats des cytochromes P450 (TIPPING et coll., 1981). En effet, il a été montré que des conjugués pourraient être libérés par des GST dans le micro-environnement d'un transporteur transmembranaire, ceci afin d'éviter leur présence dans le cytosol (MEYER, 1993).

Il faut également noter qu'il existe des réactions chimiques de conjugaison du glutathion de nature non-enzymatiques (JAKOBY et coll., 1980). En effet, les produits de la péroxydation de lipides, comme par exemple les *trans*-alk-2-énales, les *trans*,*trans*-2,4-diénales et les 4-hydroxyl-alk-2-énales, peuvent réagir ainsi avec le glutathion (BROPHY et coll., 1990).

Il est nécessaire de rappeler à ce stade que le thiol du trypanothion est plus réactif que celui du glutathion (FAIRLAMB et coll., 1992). Certaines réactions chimiques seraient donc possibles sans intervention d'une catalyse enzymatique. La réduction des péroxydes serait ainsi assurée chez *T. cruzi*, par un processus non enzymatique plutôt que par activité péroxydasique enzymatique (CARNIERI et coll., 1993).

Par ailleurs, les trypanosomes sont déficients en glutathion-réductase mais contiennent une trypanothion-réductase (FAIRLAMB et coll., 1985). La réduction du GSSG en GSH est une réaction non-enzymatique, effectuée par le trypanothion (FAIRLAMB et coll., 1985) qui est à son tour réduit par la trypanothion-réductase. Le glutathion et/ou le trypanothion sont de plus impliqués dans la susceptibilité de *T. cruzi* vis-à-vis du nifurtimox et du benznidazole (MONCADA et coll., 1989).

L'analyse de l'ensemble de ces observations nous a conduit à émettre l'hypothèse selon laquelle chez T. cruzi, l'activité S-transférase serait surtout de nature nonenzymatique et effectuée par la forte réactivité du trypanothion avec les péroxydes, les époxydes et éventuellement d'autres électrophiles lipophiles. Il serait donc possible que la protéine TcAc2 joue un rôle dans la fixation et le transport des conjugués du trypanothion (et/ou du glutathion) afin d'assurer la séquestration de ces molécules et leur élimination du cytosol. Cette hypothèse est renforcée par l'observation que le gène codant pour la TcAc2 n'est transcrit que dans les stades réplicatifs épimastigote et amastigote et que son expression est fortement augmentée pendant la phase stationnaire de la culture épimastigote in vitro. Ces deux formes parasitaires, les épimastigotes et les amastigotes, épuisent leur environnement en produits nutritifs et sécrètent des molécules, ce qui conduit à une acidification du milieu de culture. Par la production d'intermédiaires oxygène-réactifs, ils se crént donc un environnement intra- et extracellulaire, hostile en ce qui concerne les conditions d'oxydo-réduction. Le parasite est alors obligé de se "débarrasser" des produits toxiques et d'assurer un équilibre de son pouvoir d'oxydoréduction. Le fait que la protéine TcAc2 soit libérée dans le milieu de culture pourrait laisser supposer qu'elle intervient dans un mécanisme d'exportation des conjugués du trypanothion (ou du glutathion) permettant à la cellule d'éliminer ses produits toxiques.

Il n'est cependant pas exclu que la protéine TcAc2 soit capable de fixer soit le trypanothion, soit le glutathion ou encore les deux à la fois et d'exercer ainsi une activité *S*-transférase. Il est donc séduisant de spéculer sur l'affinité de cette protéine pour ces cofacteurs et sur son rôle possible dans les phénomènes de détoxification. A l'heure actuelle, nous n'avons cependant, aucun indice d'une activité *S*-transférase pour cette protéine. En effet, les expériences réalisées en utilisant le CDNB comme substrat et le GSH ou le T[SH]<sub>2</sub> comme co-substrat n'ont révélé aucune activité de ce type. Il est intéressant de noter que les  $\theta$ -GST ne possèdent pas d'activité GST vis-à-vis ce substrat. Elles catalysent néanmoins la conjugaison du glutathion avec des époxydes et des hydropéroxydes des lipides.

L'ensemble de nos résultats (alignement de séquences primaires, analyse des profils d'hydropathie et des clusters d'hydrophobicité, affinité pour les dérivés du glutathion) nous permettent donc de considérer la protéine TcAc2 comme un membre de la superfamille des GST.

Mais afin de déterminer son rôle biologique, une étude approfondie des facteurs qui induisent son expression et son activité enzymatique sera nécessaire. De plus, grâce aux techniques de transfection des parasites, il sera possible soit de "sur-exprimer" cette protéine, soit d'inhiber sa traduction par un ARN antisens ou encore de produire des mutants nuls par recombinaison homologue. Outre les connaissances apportées sur sa fonction, ces expériences devraient également permettre de préciser l'influence de la protéine TcAc2 dans les mécanismes de virulence.

#### Rôle protecteur pour la protéine TcAc2

Etant donné le rôle des GST dans la protection contre la schistosomiase humaine (BALLOUL et coll., 1987) et animale (BUSHARA et coll., 1993) d'une part et contre la distomatose (SAXTON et coll.,1990) d'autre part, nous avons également recherché le pouvoir protecteur de la protéine TcAc2 dans un modèle murin d'infection expérimentale par *T. cruzi*. L'immunisation à l'aide de la protéine de fusion (Sj26GST/TcAc2) permet de protéger 57% des souris infectées par une dose de 2500 trypomastigotes sanguicoles. Ces expériences encourageantes devront être poursuivies afin de rechercher si l'immunisation permet d'éradiquer la présence du parasite dans l'organisme infecté.

Des homologues de la protéine TcAc2 s'expriment dans toutes les souches de *T*. *cruzi* testées jusqu'à présent et également dans certaines espèces voisines. Son implication probable dans les fonctions de détoxification du parasite permet de penser que cette protéine pourrait constituer une cible privilégiée pour le développement de nouvelles drogues trypanocides. De plus, le pouvoir protecteur induit par la protéine recombinante permet d'envisager l'utilisation de cette molécule comme composant majeur d'une chimiothérapie et d'une immunothérapie combinées.

## CONCLUSION

Nous avons cloné et séquencé un ADNc du stade épimastogote de *Trypanosoma cruzi* qui code pour une protéine de poids moléculaire 52 kDa dénommée TcAc2. L'analyse moléculaire de l'ADNc suggère qu'il résulte d'une duplication de gène dont le produit d'expression est une protéine ayant deux moitiés homologues d'environ 25 kDa chaqu'une. La recherche d'homologie montre que la protéine TcAc2 fait partie de la superfamille des glutathion *S*-transférases (GST) et des protéines de stress de faible poids moléculaire. Cette observation est renforcée par la comparaison des profils d'hydropathie de la protéine parasitaire et des structures secondaires (HCA) avec ceux des membres de la superfamille des GST. De plus, la protéine TcAc2 native a été purifiée sur colonne d'affinité *S*-hexylglutathion-agarose à partir d'un extrait total d'épimastigote.

Cette protéine est exprimée dans les stades réplicatifs (épimastigote et amastigote) de T. cruzi et résiduelle dans le stade non réplicatif: le trypomastigote. D'une façon intéressante, l'expression de TcAc2 augmente avec l'âge et la densité de la culture d'épimastigote *in vitro* et fait partie des composants d'excrétion/sécrétion.

Ces résultats nous ont amené à émettre l'hypothèse que la protéine TcAc2 pourrait être impliquée dans la fixation et le transport des molécules toxiques produites pendant la culture, telles que les péroxydes de lipides et d'autres IOR. Ce composant serait donc impliqué dans les mécanismes de détoxification du parasite.

Par ailleurs, l'immunisation des souris avec la protéine de fusion Sj26GST/TcAc2 protège partiellement (57%) contre la mortalité après l'infection par *T. cruzi*.

Ils serait donc possible d'élaborer une thérapie mixte d'immunisation par protéine TcAc2 et chimique en utilisant des analogues du glutathion ou du trypanothion afin d'inhiber l'activité de la protéine TcAc2. Celà pourrait afaiblir le parasite et le rendre plus susceptible au système de défense de l'hôte vertébré.

Une autre approche séduisante serait la transfection des parasites pour inhiber ou augmenté l'expression de la protéine TcAc2 afin d'aborder l'étude de sa fonctionnalité.

### ANNEXE TECHNIQUE

#### 1. Obtention des différents stades de T. cruzi.

#### 1.1. Souches parasitaires utilisées.

La souche principale utilisée dans ce travail est la souche Y (SILVA et coll. 1953; NUSSENZWEIG et coll. 1953) qui infecte préférentiellement les macrophages. De plus, pour des études comparatives en immuno-fluorescence, immuno-blot et en Northern-blot, les souches suivantes ont été utilisées:

-Téhuantepec, qui infecte plus particulièrement les cellules musculaires (DARMAN et coll. 1941) ainsi que les souches Tulahuén (PIZZI et coll., 1952), ECH, C23 et CL (BRENER et coll., 1963).

De même, plusieurs espèces proches de T. cruzi ont été utilisées dans ces expériences:

*-T. marinkelli*, un trypanosome qui a comme hôte naturel, la chauve-souris et qui connait également un stade de multiplication intracellulaire chez son hôte mammifère;

-*T. rangeli*, une espèce infectieuse mais non-pathogène pour l'homme (AÑEZ et coll., 1982). Ses hôtes naturels sont les mammifères d'Amérique Centrale et d'Amérique du Sud, par exemple l'oppossum;

-L. donovani infantum, agent responsable de la leishmaniose viscérale (kala-azar) en Inde.

#### 1.2. Obtention des parasites in vitro.

Les stades épimastigote des trypanosomes et promastigote de *Leishmania* ssp. sont repiqués vers la fin de la phase logarithmique (environ  $1x10^7$  parasites par ml de culture) dans le milieu GLSH (1g/l de glucose, 4,5g/l de lactalbumine hydrolysée, 15% d'extrait d'hémoglobine de boeuf) et 10% de sérum de veau foetal (SVF) (Boehringer) qui a été substitué pour les cultures de *T. cruzi* par l'Ultroser HY (IBF). Le SVF a été préalablement inactivé à 56°C pendant 30 min (Jadin et coll., 1969). Les cultures d'épimastigotes se font à 28°C et celles des promastigotes à 26°C. Les parasites sont sédimentés par centrifugation à 1000 xg pendant 10 min. à 4°C et lavés 3 fois dans du tampon Hanks-Wallace.

La culture des trypomastigotes est réalisée sur cellules fibroblastiques (NIH 3T3 FR) ou macrophagiques (OUAISSI et coll., 1986). Ces cellules sont entretenues en flacon de culture de 75 ou de 150 cm<sup>2</sup>, incubées à 37°C en étuve à 5% de  $CO_2$ , dans du milieu RPMI 1640 (Gibco BRL) additionné de 5% de SVF. Les fibroblastes sont repiqués tous les 3 jours après traitement au versène-trypsine. 10<sup>6</sup> trypomastigotes environ sont inoculés à des cultures cellulaires presque confluentes. Après 3 à 4 jours de culture les trypomastigotes apparaissent dans le milieu de culture, à partir desquels de nouvelles infections sont réalisées (SANTIAGO et coll. 1981).

Le surnageant de culture est centrifugé à 300 xg pendant 5 min à 10°C afin d'éliminer les débris cellulaires. Une deuxième centrifugation à 1000 xg pendant 10 min à 10°C permet de sédimenter les trypomastigotes et les amastigotes.

#### Tampon de Hanks-Wallace:

| NaCl                                  | 8g       |
|---------------------------------------|----------|
| KCl                                   | 0.4g     |
| CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O | 0.25g    |
| MgSO <sub>4</sub> , 2H <sub>2</sub> O | 0.2g     |
| NaHPO4, 12H <sub>2</sub> O            | 0.15g    |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>       | 0.06g    |
| NaHCO <sub>3</sub>                    | 0.98g    |
| Glucose                               | 1g       |
| Compléter à 11. avec de l'eau d       | istillée |

#### 2. Electrophorèse des protéines

#### 2.1. Dosage des protéines

Les protéines sont dosées selon la méthode de Lowry modifiée par MARCKWELL et coll. (1978).

2.2. <u>Séparation des protéines par électrophorèse en condition native.</u>

Les protéines des différentes fractions d'extrait d'épimastigotes sont séparées par la technique d'électrophorèse native sur gel d'acrylamide/agarose selon BENOIT et coll. (1990).

| Composition du ge | el de séparation: | Gel de concentration: |
|-------------------|-------------------|-----------------------|
| Acrylamide        | 7 %               | 4,5 %                 |
| Bisacrylamide     | 0,186 %           | 0,225 %               |
| Agarose           | 04 %              | 0,2 %                 |
| Trizma-base       | 0,375 M (pH 8,8)  | 0,125 M (pH 6,8)      |
| PSA               | 0,075 %           | 0,075 %               |
| TEMED             | 0,03 %            | 0,07 %                |

Les solutions (à l'exception de PSA et de TEMED) sont chauffées à 37°C avant de les mélanger avec l'agarose SeaPrep (FMC) fondu dans de l'eau. Le mélange du gel est coulé entre deux plaques de verre préchauffées à 37°C et recouvert par de l'alcool isobutylique. Après polymérisation, le gel est refroidi à 4°C afin de permettre la gélification de l'agarose.

Le tampon de migration est constitué de 250 mM Trizma base/HCL pH 8,3, 384 mM glycine et 5 mM MgCl<sub>2</sub>. Les échantillons sont repris dans du glycérol 10 % avant dépôt sur gel. La migration est réalisée à 4°C pendant la nuit, à 25 mA, après avoir soumis le gel à deux "pré-run" de 15 min. à 40 mA.

#### 2.3. Electrophorèse sur gel d'acrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE).

Pour la séparation des protéines dans des conditions dénaturantes, la technique d'électrophorèse sur gel d'acrylamide en présence de SDS est employée (SEE et coll. 1989). Les gels SDS-PAGE ont été colorés soit par le bleu de Coomassie soit par le nitrate d'argent (SEE et coll. 1989).

#### 2.4. Isoélectrofocalisation.

Cette technique d'électrophorèse utilise la charge naturelle des protéines pour leur séparation. Alors que certains protéines basiques (chargées positivement, par exemple les histones) migrent vers la cathode (pôle négatif), la plupart des protéines sont chargées négativement et migrent vers l'anode (pôle positif).

L'Ampholine PAGplate (pH 3,5-9,5) est posée après que le film en plastique ait été enlevé (pas le support!) comme indiqué sur l'appareil Multiphor II (Pharmacia LKB) refroidi avec un courant d'eau à 14°C (mettre 1 ml d'huile de paraffine sur la plaque afin d'assurer un bon refroidissement du gel). Ensuite les "strips" d'électrode sont mis sur les bords du gel et imprégnés avec 3 ml de tampon d'électrode (anode: 1 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, cathode: 1 M NaOH). Les échantillons (60  $\mu$ g/piste) sont appliqués sur des petites pièces de papier (livrées avec le kit) environ à un centimètre de la cathode et enlevés après la moitié de la migration.

Les conditions de migration sont les suivantes:

| Voltage:   | 1500 V | max. |
|------------|--------|------|
| Courant:   | 50 mA  | max. |
| Puissance: | 30 W   | max. |
| Durée:     | 1,5 h. |      |

Le pH est mesuré avec une électrode de contact (calibrée à la température du gel) à des intervalles d'un centimètre entre l'anode et la cathode ce qui donne la courbe de calibration. Après cela, le gel est remis sous tension pendant 10 min.

Pour le transfert sur membrane de nitrate de cellulose, le gel est enlevé doucement du support. Le transfert est décrit dans la section 5.2. La présence d'antigène est ensuite détectée par anticorps. Le point isoéletrique est déterminé à l'aide de la courbe de calibration.

#### 3. Détection de l'activité acétylcholinestérase

#### 3.1. Préparation de l'extrait d'épimastigotes

Les formes épimastigotes de *T. cruzi* sont maintenues en culture dans du milieu GLSH supplémenté avec l'Ultroser HY (IBF). Les antigènes sont préparés après lyse des parasites aux ultrasons (150W, 5 min., 0,5 sec. intervalle, sur glace) soit dans un tampon de faible osmolarité (10 mM Tris/HCl pH7,3, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM PMSF) soit dans un tampon de forte osmolarité (50 mM Tris/HCl pH 7,3, 300 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM PMSF). Afin de séparer le cytosol de la membrane plasmique et des organelles, le lysat est centrifugé pendant une heure à 230.000 xg à 4°C dans la Mini-ultracentrifugeuse Beckman TL100 en utilisant le rotor TL100.1. L'activité enzymatique est mesurée dans le cytosol et le culot est solubilisé avec différents détergents (Triton-X100, Nonidet P40, désoxycholate, cholate et octyl-glucoside) en utilisant différents rapports quantité de protéines/% de détergent, ceci afin de déterminer les meilleures conditions de solubilisation des protéines. Le SVF est utilisé comme contrôle positif de la réaction enzymatique.

3.2. Détection de l'activité enzymatique acétylcholinéstérasique.

L'activité acétylcholinéstérasique est détectée comme décrit ailleurs (DURIEZ-VAUCELLE et coll., 1983) :

Pour 100 ml de solution:

25 mg de MTT (3-[4,5-diméthyldiazole-2-yl]-2,5-diphényltetrazolium bromide; Sigma) dissous dans 5 ml d'éthanol absolu,

100 mg de S-acétylthiocholine dans 95 ml de tampon véronal (0,1 M, pH 8,2).

Les deux solutions sont mélangées et incubées avec le gel à 28°C. La présence de l'activité acétylcholinéstérasique se caractérise par un précipité bleu-violet.

La réaction biochimique est la suivante:

1. Enzyme +S-acétylthiocholine iodide ---> Enzyme-thiocholine + acide acétylique

2. Enzyme-thiocholine + MTT --->précipité bleu

#### 3.3. Production d'antigènes contenant l'activité enzymatique acétylcholinésterasique

Afin de préparer l'antigène pour l'immunisation de souris, le culot d'épimastigotes obtenu après ultracentrifugation est traité avec 0,3 % de Triton-X100/10 mg de protéines par ml. Après centrifugation à 230.000 xg, le surnageant est déposé sur un gel natif d'agarose SeaPrep (FMC) à 3 %. La région montrant l'activité acétylcholinésterasique est coupée, fondue à 50°C et gardée à 37°C afin d'éviter la gélification.

#### 4. Marquage des protéines.

#### 4.1.<u>Marquage métabolique à la méthionine[35S]</u>

 $1 \times 10^8$  épimastigotes ou trypomastigotes sont lavés trois fois en RPMI sans SVF et une fois en MEM sans méthionine et "mis à jeun" dans ce dernier milieu pendant 1 h à 28°C (épimastigotes) ou 37°C (trypomastigotes). Après centrifugation à 1000 xg pendant 10 min., les parasites sont incubés 1 h en présence de 500 µCi de méthionine[<sup>35</sup>S] (>37 Bq/mmol, Amersham) en MEM sans méthionine puis centrifugés. Le culot est alors incubé dans du RPMI contenant 10 % de SVF (chasse). Les échantillons sont prélevés 1 h après le marquage (T<sub>+1</sub>), 2 h après la chasse (T<sub>+3</sub>) et 18 h après la chasse (T<sub>+18</sub>). Les parasites sont lysés pendant la nuit à 4 °C (sur un roue) dans le tampon indiqué.

Tampon de Lyse:

| Trizma-base, pH 7,4 | 10 m <b>M</b> , |
|---------------------|-----------------|
| Nonidet P40         | 1 %,            |
| Aprotinine          | 100KUI/ml,      |
| PMSF                | 1 mM.           |

#### Comptage de la radioactivité incorporée:

20 µl de produits marqués sont mis en contact 2 h sur glace avec 1 ml de TCA 25 % puis filtrés sur des filtres Whatman GF/C. Les filtres sont rincés avec du TCA 8 % puis de l'eau. Après séchage, la radioactivité est comptée en présence d'un scintillateur (Aqualyte).

#### 4.2. <u>Marquage des produits de traduction à la méthionine[35S]</u>.

 $5 \mu g$  de l'ARN total dans 10  $\mu$ l d'eau traitée au DEPC sont chauffés 5 min. à 65°C afin de dissocier les structures secondaires puis gardés sur glace. Ensuite,

42 µl de lysat de réticulocyte de lapin (Promega),

3 µl de mélange d'acides aminés sans méthionine (Promega) et

7,4 µl de méthionine[<sup>35</sup>S] (111 µCi, >37 Bq/mmol, Amersham,) sont rajoutés et incubés 2 h à  $30^{\circ}$ C.

L'efficacité du marquage est contrôlée par comptage après précipitation au TCA comme suit :

1 µl de produits marqués, 500 µl d'eau et 250 µl de NaOH 1M contenant 0,68 %  $H_2O_2$  sont incubés 15 min. à 37°C. Ensuite 1 ml de TCA 25 % est rajouté et les tubes sont gardés 15 min. sur glace. Cette solution est filtrée sur un filtre Whatman GF/C et rincée avec du TCA 8 % et de l'eau. La radioactivité fixée est déterminée comme décrit dans la section 4.1.

Les produits de traduction obtenus sont immunoprécipités par différents anti-sérums et analysés par SDS-PAGE comme décrit dans la section 2.3.

#### 4.3. Marquage des parasites in vivo au [32P]O4

Afin de déterminer si une protéine est phosphorylée ou non, les parasites sont cultivés en présence d'ortho-phosphate marqué au <sup>32</sup>P. Le [<sup>32</sup>P]O<sub>4</sub> est incorporé dans les nucléotides qui sont ensuite utilisés dans la phosphorylation des protéines, des lipides et d'autres composants cellulaires.

Des épimastigotes (10<sup>8</sup>) en fin de phase logarythmique sont incubés 2 fois 15 min. à 28°C dans une solution isotonique sans phosphate. Après centrifugation, les parasites sont resuspendus dans 1 ml de ce même tampon contenant 250  $\mu$ Ci [<sup>32</sup>P]O<sub>4</sub> (Amersham) et incubés 1 h à 28°C avant de les laver 3 fois dans du milieu de culture. Des fractions aliquotées de surnageant de parasites sont prélevées deux heures (T<sub>+3</sub>) et cinq heures plus tard (T<sub>+6</sub>). Les parasites sont lysés comme décrit en 3.1. et la fraction soluble est immunoprécipitée.

# 5. Préparation des anticorps polyclonaux et analyse immuno-chimique des antigènes paasitaires

#### 5.1. Préparation des anti-sérums

Afin d'obtenir des anti-sérums pour cribler la banque d'expression, la bande du gel en condition native contenant l'activité acétylcholinéstérasique est injectée par voie intrapéritonéale à des souris BALB/c en présence de l'adjuvant (Vaxicoq, Institut Mérieux, France: 4 U.I. de *Bordetella pertussis* et 1,25 mg of aluminium hydroxyde/500  $\mu$ l), le tout complété à 500  $\mu$ l avec une solution saline. Les injections sont répétées trois fois à deux semaines d'intervalle.

Dans le cas de la protéine de fusion Sj26/TcAc2, les souris sont immunisées trois fois avec 40  $\mu$ g de protéine de fusion.

Par ailleurs, un lapin est immunisé avec 1 mg de protéine de fusion SJ26/TcAc2, selon la méthode de Vaitukaitis en présence d'adjuvant complet de Freund.

Des sérums anti-peptide issus de la séquence du clone TcAc2 sont obtenue par immunisation des souris avec des peptides couplés à l'ovalbumine.

Peptide C1 TcAc2:

Pro42-Gln-Trp-Tyr-Lys-Glu-Leu-Asn-Pro-Arg-Glu-Thr-Val-Pro-Thr-Leu-Gln-Val-Asp-Gly60 Peptide C2 TcAc2:

Ile65-Glu-Ser-Asp-Leu-Ile-Ser-Arg-Tyr-Ile-Asp-Arg-Ile-Ser-Ser-Pro80 Peptide C3 TcAc2:

Asp115-Pro-Phe-Asn-Glu-Glu-Lys-Arg-Lys-Ser-Val-Asp-Asn-Asn128

#### 5.2. Test d'immuno-fluorescence indirecte

Le test d'immuno-fluorescence indirecte est réalisé sur des épimastigotes, trypomastigotes et des formes intracellulaires (fibroblastes 3T3 ou macrophages J774) de *T. cruzi*. Les parasites sont lavés trois fois dans du Hanks-Wallace et posés sur des lames d'immunofluorescence (Diagnostics Pasteur) avant d'être séchés. Ces lames sont ensuite fixées pendant 10 min. dans du méthanol à -20°C et gardées à -20°C. Les formes intracellulaires (cultivées dans LAB-TEK tissue culter chambers/slides; Miles, Naperville, IL, USA) sont ensuite traitées avec de l'acétone pendant 10 min. à -20°C et gardées à cette température.

Sur chaque préparation,  $30 \ \mu$ l de sérum à différentes dilutions sont déposées et les lames sont incubés 30 min. à 37°C. Les anticorps non-fixés sont éliminés par lavage en PBS (2 fois brièvement et 1 fois 15 min).  $30 \ \mu$ l d'une solution de Bleu d'Evans (1:10.000) contenant le conjugué couplé au Fluoroisothiocyanate (FITC) dilué dans du PBS sont enfin déposés sur les puits séchés et incubés comme décrit plus haut. Après lavage et séchage, quelques gouttes de glycérine/PBS (1:1, v:v) sont déposées sur les lames que l'on recouvre de lamelles. La fluorescence est lue à l'aide d'un microscope en lumière UV à 490/525 nm.

#### 5.3. ELISA

Des plaques d'ELISA sont incubées pendant la nuit à 4 °C avec 100  $\mu$ l par puit, d'une solution antigenique contenant 1  $\mu$ g/ml de protéine. Les puits sont saturées pendant 1 h à température ambiante avec 2 % d'une solution de BSA préparée dans du PBS. Ensuite, les différents sérums à tester sont dilués dans du `PBS et incubés (100  $\mu$ l/puit) pendant 3 h à 37 °C. Après 3 lavages avec du PBS/0,1 % Tween-20 le conjugué (dilué au 1/10000) marqué à la péroxydase est ajouté 1 h à 37 °C. La révélation est réalisée en incubant les puits avec 100  $\mu$ l de tampon I 30 min. à 37 °C. La lecture de la densité optique est faite à une longueur de 492 nm.

#### Tampon I (extemporanément):

1 pastille d'OPD (o-phénylenediamine dihydrochloride, 10 mg; Sigma) 20 ml de tampon II 20 μl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

 Tampon II:

  $PO_4^{3-}$  0,1 M;
 500 ml

 Acide citrique
 0,1 M, pH 5,0;
 400 ml

 A conserver à -20 °C.
 °C.

5.4. Immunoprécipitation des antigènes de T. cruzi. radiomarqués.

Les protéines marquées sont soit immunoprécipitées, soit directement analysées par SDS-PAGE:

Les produits radiomarqués sont incubés avec 20  $\mu$ l de sérum sain dans un volume final de 500  $\mu$ l de tampon et incubés toute la nuit sur une roue à 4°C ou 3 h à température ambiante. 10 mg de Protéine A Sépharose CL-4B (Pharmacia) prégonflées dans du tampon sont rajoutées et les tubes sont mis sous agitation 2 h à température ambiante. Après centrifugation, le surnageant est mis en contact avec le sérum à tester (20  $\mu$ l) comme ci-dessus. Les immuns-complexes sont fixés sur 10 mg Protéine A Sépharose CL-4B comme décrit précédemment et lavés au moins dix fois dans du tampon. L'efficacité du dernier lavage est contrôlée par simple comptage en scintillation. Pour décrocher les protéines marquées 2 fois, 40  $\mu$ l de tampon d'échantillon du SDS-PAGE sont rajoutés aux billes de Protéine A Sépharose CL-4B et bouillis 3 min. Après migration sur gel SDS-PAGE, les protéines sont fixées dans un bain de méthanol 2 % et d'acide acétique 8 % pendant 30 min. et lavés 10 min. à l'eau distillée. Le gel est ensuite traité avec la solution d'Amplify (Amersham, Les Ulis, France) - pour les protéines marquées à la [<sup>35</sup>S]méthionine - séché et exposé. Dans le cas des antigènes marqués à l'orthophosphate, le gel est exposé avec des écrans Dupont Cronex lightning plus.

Les tampons d'incubation et de lavage sont le TNSTE pour les marquages métaboliques et le TNEN pour les produits de traduction .

| <u>TNSTE</u> : |             | <u>TNEN:</u> |             |
|----------------|-------------|--------------|-------------|
| Trizma-base    | 10 mM,      | Trizma-base  | 10 mM,      |
| NaCl           | 150 mM,     | NaCl         | 150 mM,     |
| SDS            | 0,3 %,      | EDTA         | 2 mM,       |
| Triton X-100   | 1,7 %,      | Nonidet-P40  | 0,5 %,      |
| EDTA           | 2 mM,       | Aprotinine   | 100 KUI/ml. |
| Aprotinine     | 100 KUI/ml. |              |             |

Le pH est ajusté pour les sérums de souris, à 8,0 et pour ceux de rat et lapin, à 7,4.

#### 5.5. La technique de Western blot.

Après séparation par SDS-PAGE, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrate de cellulose d'après la technique de TOWBIN et coll. (1979).

#### 5.6. Infection expérimentale de souris par T. cruzi.

L'infection de souris mâles BALB/C a été réalisé par voie intrapéritonéale 1 mois après la dernière immunisation (voir plus haut) avec 3500 trypomastigotes sanguicoles.

#### 6. Préparation de l'ADN

6.1. Préparation de l'ADN génomique parasitaire.

6.1.1. Préparation à grand échelle.

Ce protocole suit majoritairement les instructions de SAMBROOK et coll. (1989).

Les parasites sont recoltés par centrifugation (1800 xg, 4°C, 10 min.) et lavés 3 fois dans du Hanks-Wallace. Le culot est congelé dans l'azote liquide et repris dans le tampon de lyse après décongélation. Les ARN sont détruits par addition de RNAse (DNAse free) à 50 µg/ml final et incubation au moins 3 h à 37°C. Les protéines sont digérées par la protéinase K (100 µg/ml) pendant 3 h à 50°C. Celles-ci sont ensuite éliminées par 2 extractions au phénol (1v:1v, 15 min. sur roue à 4°C) et centrifugation à 5.000 xg (20 min., 4°C). Le surnageant est traité par un mélange phénol/chloroforme (1v:1v) et centrifugé comme précédemment. La phase aqueuse est ensuite traitée avec 1 volume de chloroforme pour éliminer le phénol qui inhibe les réactions enzymatiques. Finalement, le surnageant est traité avec 1 volume d'éther. Dans ce cas, l'ADN se trouve dans la phase inférieure. Il est précipité par 2,5 volumes d'éthanol absolu froid pendant 3 h à -20°C. Après centrifugation à 5.000 xg pendant 10 min., le culot d'ADN est lavé deux fois avec un volume d'éthanol 70 % froid. Il est alors repris dans du tampon TE et gardé à 4°C. Le dosage se fait à 260 nm avec un calcul de 50 µg/ml d'ADN par unité de densité optique. La rapport de densité 260 nm/280 nm doit être ≈2.

#### 6.1.2. Méthode de "mini"-préparation.(MEDINA-ACOSTA et coll.1993)

Cette méthode est utilisée afin d'obtenir de l'ADN chromosomique et épisomal des transfectants et des différentes souches pour les analyses par hybridation.

1 x10<sup>8</sup> cellules sont récoltées et lavées 3 fois. Le culot est lysé avec 150  $\mu$ l de tampon TELT en inversant plusieurs fois le tube, et incubé 5 min. sur glace avant de faire une extraction avec 150  $\mu$ l d'une solution phénol/chloroforme (1:1 v:v; temps de contact: 5 min.)sur une roue à 4°C). Les phases sont ensuite séparées par centrifugation à 13.000 xg pendant 5 min. à 4°C. L'ADN de la phase supérieure est directement précipité en ajoutant 300  $\mu$ l d'éthanol absolu froid. Le mélange est sécoué doucement 15 secondes et incubé pendant 5 min. à 4°C. Après centrifugation comme décrit plus haut, le culot est lavé avec 1 ml d'éthanol absolu et recentrifugé. Le culot est repris dans 100  $\mu$ l de TE contenant 20  $\mu$ g/ml de ribonucléase pancréatique et incubé à 37°C pendant 15 min.

#### TELT:

| Trizma base, pH 8,0 | 50 mM   |
|---------------------|---------|
| EDTA, pH 9,0        | 62,5 mM |
| LiCl                | 2,5 M   |
| Triton X-100        | 4 %.    |

#### 6.2. Préparation de l'ADN plasmidique bactérien.

#### 6.2.1. Mini-préparation.

Cette méthode (He et coll., 1990) utilise la principe de la lyse douce suivie d'une centrifugation. Elle est utilisée pour la caractérisation immédiate des clones bactériens transformés par analyse de restriction.

Une culture "over night" de 3 ml est centrifugée en deux temps pendant 30 secondes dans un tube Eppendorf à température ambiante. Le surnageant est jeté et le culot bactérien est lysé par 100  $\mu$ l de tampon de lyse. Un volume égal de Phénol/Chloroforme/Alcool isoamylique (25:24:1 = v:v:v) est ajouté aux bactéries resuspendues. L'ensemble est vortexé pendant 15 min. La phase aqueuse contenant l'ADN plasmidique est récupérée après 2 min. de centrifugation. L'ADN est précipité avec 2,5 volumes d'éthanol absolu et centrifugé (2 min.). Un lavage avec 200  $\mu$ l d'éthanol à 70 % est nécessaire afin d'enlever la majorité des sels. Après séchage, le culot d'ADN est resuspendu dans 20  $\mu$ l d'eau ultra-pure et analysé à l'aide d'enzymes de restriction.

Tampon de lyse :

| LiCl        | 2,5 M            |
|-------------|------------------|
| Trizma base | 50 mM            |
| Triton-X100 | 4 % (v/v)        |
| EDTA        | 62,5 mM, pH 8,0. |

#### 6.2.2. Midi-préparation.

La préparation d'ADN plasmidique en quantité plus grande (50-100 mg) se fait à l'aide du kit de Qiagen Midi-Prep (Qiagen, Coger). Cet ADN est également utilisé pour les transfections de *T. cruzi*. Pour cela, l'ADN est cependant purifié lors d'une étape supplémentaire, par gradient de chlorure de césium:

100  $\mu$ g d'ADN dans 700  $\mu$ l de l'eau sont mélangés à 1,4 g de chlorure de césium et 20  $\mu$ l de BET (10 mg/ml) et centrifugés 10 min. à 1000 *x*g. Le lysat est repris ensuite à l'aide d'une pipette Pasteur et transféré dans un tube Quick Seal (Beckman, Palo Alto, CA, USA). Le mélange est recouvert de paraffine et les tubes sont scellés. La centrifugation se fait au moins pendant 8 h à 80.000 rpm (accélération : -, décélération : 9) dans le rotor TLA 100.2 de la Mini Ultracentrifugeuse TL 100 (Beckman). Une bande rose due au BET fixé sur l'ADN indique la présence de l'ADN. Cette bande est récupérée à l'aide d'une seringue. Le BET est extrait par un volume d'isobuthanol saturé en chlorure de césium. Le chlorure de césium est éliminé par dialyse (Sartorius, Göttingen, Allemagne) contre du TE. L'ADN est précipité en ajoutant 1/10 volume d'acétate de sodium 3 M et 2,5 volumes d'éthanol absolu à -20°C pendant la nuit. Trois lavages en éthanol sont necéssaires pour éliminer les sels. L'ADN est finalement repris dans de l'eau ultra-pure et gardé à 4°C.

#### 6.3. Purification des oligonucléotides.

Les oligonucléotides sont synthétisés à l'aide du "Cyclone Plus DNA Syntheziser" (Milipore) et purifiés sur gel d'acrylamide contenant de l'urée qui garde les oligonucléotides sous forme dénaturée :

Après avoir repris les oligonucleotides dans de l'eau, la solution est centrifugée à 12.000 rpm afin de sédimenter les substances insolubles. Cette préparation est mélangée à 2 volumes de formamide et chauffé à 95°C pendant 5 min. L'ensemble est déposé sur gel de polyacrylamide et 1  $\mu$ l de bleu de bromophénol est déposé dans un puits comme témoin de migration; le tout migre à 300-400 V jusqu'à ce que le bleu ait migré jusqu'au 3/4 du gel. L'oligonucléotide est ensuite visualisé en lumière UV et la bande la plus intense est découpée du gel. Ce morceau est coupé en petits dés et l'ADN est élué avec 3 ml de le tampon d'élution pendant la nuit à 37°C sous agitation et lavé. Le lendemain, une colonne de "Sep-Pack" (Millipore) est préparée en la lavant d'abord avec 10 ml de méthanol puis 10 ml d'eau ultrapure. La solution d'oligonucléotide est appliquée sur la colonne qui est ensuite lavée avec 10 ml d'eau ultrapure. L'élution des oligonucléotides fait avec 1 ml d'éthanol absolu. Le contenu du tube est ensuite séché et repris dans 100  $\mu$ l d'eau ultra-pure. La concentration des oligonucléotides fait avec 1 ml d'éthanol absolu. Le contenu du tube est ensuite séché et repris dans 100  $\mu$ l d'eau ultra-pure. La concentration des oligonucléotides fait avec 1 ml d'éthanol absolu. Le contenu du tube est ensuite séché et repris dans 100  $\mu$ l d'eau ultra-pure. La concentration des oligonucléotides fait avec 1 ml d'éthanol absolu. Le contenu du tube est ensuite séché et repris dans 100  $\mu$ l d'eau ultra-pure. La concentration des oligonucléotides fait avec 1 ml d'éthanol absolu. Le contenu du tube est ensuite séché et repris dans 100  $\mu$ l d'eau ultra-pure. La concentration des oligonucléotides est estimée par mesure de l'absorption en UV (260 nm) et calculée avec la formule suivante:

 $c [\mu M] = D.O._{260nm}/\epsilon (T+C+G+A)$ 

| $\varepsilon$ pour T: | 8400 x nombre de T |
|-----------------------|--------------------|
|-----------------------|--------------------|

C: 7080 x nombre de C

G:  $12010 \times \text{nombre de G}$ 

A: 15200 x nombre de A.

#### Gel d'acrylamide:

| TBE (x 10)                             | 5 ml   |
|--|--------|
| Acrylamide/bisacrylamide (40 %/2,7 %): | 25 ml  |
| Urée                                   | 23 g   |
| TEMED                                  | 120 µl |
| PSA (10 %):                            | 120 µl |
| qsp 50 ml d'eau.                       |        |

Tampon d'élution:

| Acétate d'ammonium            | 500 mM |
|-------------------------------|--------|
| EDTA Na <sub>2</sub> , pH 7,5 | 100 mM |
| Acétate de magnésium          | 10 mM. |

#### 7. Préparation de l'ARN.

Tout le matériel et toutes les solutions sont traitées au diéthylpyrocarbonate (Fluka) ou autoclavées pendant 2 h afin d'inhiber les RNAses.

#### 7.1. Mini-préparation.

La préparation de l'ARN total en petites quantités est réalisée avec le Kit de RNA-ZOL (Bioprobe Systems):

 $5 \times 10^7$  parasites sont lysés dans 1 ml de solution RNA-ZOL plus 100 µl de chloroforme. Le tout est mélangé vigoureusement pendant 15 secondes et incubé ensuite 15 min. sur glace. Après centrifugation à 12.000 rpm, 4°C, la phase supérieure aqueuse contenant l'ARN est transférée dans un tube Eppendorf. Pour la précipitation, un même volume d'alcool isopropylique est rajouté et l'ensemble est mis à -20°C pendant 45 min. La solution est ensuite centrifugée comme décrit plus haut et l'ARN est lavé avec de l'éthanol à 70 %. L'ARN est enfin repris dans 20-50 µl d'eau traitée au DEPC. La concentration est mesurée à 260 nm. 1 unité O.D. correspond à 40 µg/ml d'ADN.

#### 7.2. Préparation à grande échelle.

1 litre de culture d'épimastigotes est centrifugé à 1600 xg à 4°C pendant 10 min.. Les parasites sont ensuite lavés 3 fois dans du Hanks-Wallace puis lysés avec 10 volumes de la solution d'hydrochlorure de guanidinium et centrifugés pendant 10 min. à 2500 xg à 4°C, afin d'éliminer les débris cellulaires. 2 ml de cette solution sont déposés sur 3 ml de solution de chlorure de césium, dans un tube d'ultracentrifugation (1/2 x 2 inches, Polyallomer, Beckman) puis centrifugés pendant 16 h à 38000 rpm (ultracentrifugeuse L8M, rotor TI SW 55, accélération 9, décélération 9, 25°C, Beckman). Le lendemain, le surnageant est éliminé et l'ARN (culot opalescent) est repris dans 3x50 µl de 10 mM EDTA pH 8,0 par tube. L'ARN est précipité (3 h à -20°C) en ajoutant 1/10 de volume d'acétate de sodium 0,3 M, pH 5,2 et 2,5 volumes d'éthanol absolu. Un lavage à l'éthanol 70 % est ensuite effectué et l'ARN est repris dans de l'eau traitée au DEPC. La concentration est estimée comme décrit plus haut.

#### 7.3. Purification de l'ARN poly(A)+.

L'ARN poly(A)<sup>+</sup> est purifié à partir de l'ARN total (préparé comme décrit dans le paragraphe 7.2) par passage sur une colonne d'oligo(dT) couplé à la cellulose (Pharmacia). Le protocole adopté suit les instructions de SAMBROOK et coll. (1989). 100  $\mu$ l de cellulose-oligo(dT) sont suffisants pour 1 mg d'ARN total.

La cellulose-oligo(dT) est d'abord resuspendue dans 0,1 N NaOH et lavée avec l'équivalent de 3 volumes de colonne d'eau stérile. La colonne est ensuite équilibrée avec le tampon I jusqu'à ce que le pH soit tombé en dessous de 8,0. Un volume du tampon I (x2) est ajouté à l'ARN dénaturé (chauffé à 65°C, 5 min.), refroidi rapidement et appliqué sur la colonne puis lavé avec un volume de colonne de tampon I. Les fractions sont collectées et dénaturées une deuxième fois avant de les redéposer sur la colonne. Les ARN non-fixés sont éliminés par lavage avec le tampon I (5-10 volumes de colonne, contrôles par absorbance à 260 nm). L'ARN fixé sur la colonne est élué à l'aide du tampon II. L'élution est suivie par mesure de l'absorbance à 260 nm. Les fractions contenant la plus forte concentration d'ARN sont regroupées et précipitées à -20°C pendant 2 h avec 1/10 de volume d'acétate de sodium 3 M, pH 5,2 et 2,5 volumes d'éthanol absolu froid. Les tubes sont ensuite centrigugés à 10.000 xg pendant 15 min. à 4°C et les culots sont lavés en éthanol 70 %. Après séchage, l'ARN est dissous dans de l'eau traitée au DEPC et stocké à -70°C.

Solution I:

| Trizma base, pH 7,6        | 20 mM  |
|----------------------------|--------|
| NaCl                       | 0,5 M  |
| EDTA; pH 8,0               | 1 mM   |
| Lauryl sarcosine de sodium | 0,1 %. |

La solution I est faite à partir de solutions mères et autoclavé, avant d'ajouter du lauryl sarcosine de sodium d'une solution mère à 10 % chauffée à 65°C.

| <u>Solution II</u> : |         |
|----------------------|---------|
| Trizma base, pH 7,6  | 10 mM   |
| EDTA, pH 8,0         | 1 mM    |
| SDS                  | 0,05 %. |

Cette solution est préparée à partir des solutions mères.

#### 8. Séparation et transfert des acides nucléiques

#### 8.1. Southern-blot

L'ADN génomique digéré par les enzymes de restriction est séparé par électrophorèse horizontale sur gel d'agarose (1%). A la fin de la migration, le gel est coloré par une solution de bromure d'éthidium (BET) et l'ADN est visualisé sous lumière UV à 354 nm afin de vérifier le profil de restriction. Pour le transfert, l'ADN est traité avec 0,25 M HCl jusqu'à ce que le bleu de bromophénol change de couleur (plus 10 min. supplémentaires). Cette étape est nécessaire pour fragmenter les grands fragments d'ADN (>10 kbp) et assurer leur transfert sur la membrane. Ensuite, le gel est rincé et incubé dans le tampon de dénaturation (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH) pendant 30 min., rincé et incubé dans le tampon de neutralisation (15 min.). Le gel est enfin transféré sur une membrane de nylon (Hybond N ou N<sup>+</sup>, Amersham, Les Ulis, France) par la technique de Southern (1975). Après transfert, la membrane est lavée dans du SSC x2 afin d'enlever les restes d'agarose et séchée 10 min. à 80°C. La fixation de l'ADN s'effectue pendant 3 min. sous rayons UV (354 nm).

#### 8.2. Northern blot.

L'ARN est séparé sur gel d'agarose/formaldéhyde (DAVIS et coll. 1986). La formaldéhyde étant fortement toxique, le gel est manipulé sous hotte chimique.

Pour un gel de 60 ml, 0,6 g (=1 %) d'agarose NA (Pharmacia) sont dissous dans 52,2 ml d'eau et 6 ml de MOPS sont ajoutés quand le gel est refroidi à 70°C. Sous la hotte, 1,8 ml de formaldéhyde sont rajoutés et le gel est coulé immédiatement. Les échantillons sont dilués au demi dans le "pré-mix" et chauffés à 65°C pendant 10 min., puis additionnés du tampon d'échantillon . Après 30 min. de gélification, les échantillons sont déposés et une tension de 7 V/cm est appliquée.

#### <u>MOPS x10</u>:

| MOPS 3[ <i>N</i> -morpholino]propane sulfonic acid, pH7,0        | 0,2 M              |
|--|--------------------|
| Acétate de sodium  | <b>5</b> 0 mM      |
| EDTA, pH 8,0   | 10 mM              |
| Le MOPS est fait à partir de solutions mères. Le pH final doit é | être entre 5,5-7,0 |

Prémix:

| MOPS x10 (Sigma)                   | 2,5 ml   |
|------------------------------------|----------|
| Formaldéhyde (37 % = 12,3 M, pH>4) | 4,375 ml |
| Formamide (déioniséé, Merck)       | 12,5 ml  |

| Tampon d'échantillon x5: |        |
|--------------------------|--------|
| EDTA, pH 8,0             | 1 mM   |
| Bleu de bromophénol      | 0,25 % |
| Xylènecyanol             | 0,25 % |
| Glycérol                 | 25 %.  |

Les gels d'agarose/formaldéhyde sont colorés au BET et transférés immédiatement après, par force capillaire, en SSCx20 pendant la nuit sur une membrane de nylon (Hybond N ou Hybond N<sup>+</sup>, Amersham). Après transfert, la membrane est lavée en SSCx6 pendant 10 min. afin d'enlever l'agarose résiduelle. L'ARN est fixé sur la membrane sèche par lumière UV à 354 nm pendant 3 min.

#### 9. Marquage et hybridation des acides nucléiques.

#### 9.1. Marquage de l'ADNc.

Les fragments d'ADN préparés par la méthode "freeze-squeeze" (voir chapitre 10.1.) sont marqués, soit d'une façon radioactive (pour l'analyse par la technique de Northern-blot et pour l'analyse de l'ADN génomique), soit non-radioactive (pour la technique d'hybridation des colonies et des plages de lyse).

#### 9.1.1.<u>Marquage de l'ADNc par l'α-[<sup>32</sup>P]-dCTP</u>.

L'ADN est marqué en utilisant le kit Megaprime (Amersham) selon le protocole suivant : 50  $\mu$ g dans 33  $\mu$ l d'eau et 5  $\mu$ l de solution d'amorces sont chauffés 5 min. à 95°C,

10 µl de tampon de réaction,

5 µl d' $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]-dCTP (50 µCi, ≈110 TBq/mmol, Amersham,) et

2 µl d'enzyme de Klenow (1 U/µl, Boehringer)

sont mélangés et incubés 15-30 min. à 37°C.

Les nucléotides non-incorporés sont éliminés par passage sur une colonne de Quick-Spinn Séphadex G 50 (Boehringer,).

#### 9.1.2. Marquage de l'ADNc par le digoxigénine-dUTP (Boehringer.

Ce système de marquage est basé sur l'incorporation d'un analogue de dUTP (digoxigénine -dUTP, Dig-dUTP) dans l'ADN synthétisé *de novo* par l'enzyme de Klenow en "random-priming". La détection est faite en utilisant un anticorps marqué à la phosphatase alcaline reconnaissant la digoxigénine de la base modifiée. Marquage:

250 µg d'ADN sont chauffés pendant 10 min. à 95 °C et refroidis sur la glace contenant du NaCl. 2 µl d'un mélange d'hexa-oligonucléotides, 2 µl de dNTP (1 mM dATP, 1 mM dCTP, 1 mM dGTP, 0,65 mM dTTP, 0,35 mM Dig-dUTP, pH 6,5) et 1 µl d'enzyme de Klenow (=2U) sont rajoutés dans un volume final de 20 µl. La réaction se déroule pendant la nuit à 37°C. 1 µl d'EDTA 0,5 M, pH 8,0 est ajouté pour arrêter la réaction. L'ADN marqué est séparé des nucléotides libres par passage sur une Quick-Spin Column Sephadex G-50 (Boehringer, Mannheim, Allemagne).

Hybridation: voir chapitre 6.8.2.

#### Détection:

Après lavages dans des conditions stringentes (2x15 min. dans SSC x0,1, SDS 0,1 % à 65°C), la membrane est équilibrée brièvement dans la solution I contenant 0,3 % de Tween-20 puis saturée pendant 30 min. dans la solution II. Ensuite, le conjugué est ajouté à une dilution de 1/10.000 et incubé pour une durée de 2 h. La membrane est lavée deux fois 15 min. dans la solution I et équilibrée brièvement dans la solution III. La détection se fait à l'obscurité avec la solution IV. La réaction est arrêtée par lavage avec du tampon TE, dans lequel la membrane est également gardée.

Solution I: Acide malique 100 mM, pH 7,5 NaCl 150 mM, autoclaver.

Solution II: "Blocking reagent" 1 %, dans solution I.

Solution III: Trizma base, 100 mM, pH 9,5, NaCl, 100 mM, MgCl<sub>2</sub>, 50 mM.

Solution IV: NBT (Nitro Blue Tetrazolium), 45 μl, X-Phosphate 37 μl, dans 10 ml de solution III.

#### 9.2. Marquage des oligonucléotides par le y-[32P]-ATP.

Les oligonucléotides sont marqués à l'aide de la T4 DNA-polynucléotidekinase:

15 pmol d'oligonucléotides chauffés (7,5  $\mu$ l) sont incubés avec 5  $\mu$ l de tampon x4, 5  $\mu$ l de  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-dATP (110 TBq/ml) et 1  $\mu$ l de T4 DNA-polynucléotidekinase (1U/ml) pendant 30 min. à 37°C. 1  $\mu$ l d'EDTA, 0,5M, pH 8,0 est ajouté afin d'arrêter la réaction. Les nucléotides libres sont séparés des oligonucléotides par passage sur une Quick-Spinn-Column Sephadex G-25 (Boehringer).

Un oligonucléotide spécifique pour la séquence de la  $\beta$ -tubuline de *T. cruzi* a été utilisé:

5' GGACACCAAGTGGTTCAGATCACGAACGTTTGGAGCTGTCAG 3'

#### 9.3. Hybridations.

9.3.1. Hybridation avec une sonde radioactive.

Après transfert de l'ADN (Southern-blot) ou de l'ARN (Northern-blot) la membrane est préhybridée pendant 3 h à 42°C. Ensuite l'ADN marqué à l' $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]-dCTP (1x10<sup>6</sup> cpm/ml final) est ajouté et hybridé pendant la nuit à 42°C. Le lendemain, la membrane est lavée 2x15 min. en SSC x2 à température ambiante puis 2x15 min en conditions stringentes (68°C/ 0,1x SSC/ 0,2 % SDS pour les blot contenants des acides nucléiques de la souche Y de *T. cruzi*; 60 °C/ 0,1 x SSC/ 0,1 % SDS pour les blots contenant des acides nucléiques d'autres souches de *T. cruzi* et d'autres espèces). La membrane est exposée sur un film d'autoradiographie (X-OMAT Kodak, ou Hyperfilm, Amersham,) qui est ensuite révélé.

Solution de préhybridation:

| Formamide                   | 50 %     |
|-----------------------------|----------|
| NaCl,                       | 0,9 M    |
| Phosphate de sodium, pH 6,5 | 50 mM    |
| EDTA,                       | 1 mM     |
| Solution de Denhardt        | x 4      |
| ADN de sperme de saumon     | 50 μg/ml |
| Sulfate de dextran          | 5 %      |
| SDS                         | 0,1 %    |
|                             |          |

| Solution | de De | enhardt_ | <u>(x 5</u> | <u>0):</u> |
|----------|-------|----------|-------------|------------|
|          |       |          |             |            |

| Ficoll Type 400 (Pharmacia) | 5 g |
|-----------------------------|-----|
| Polyvinylpyrrolidone        | 5 g |
| BSA (Fraction V, Sigma)     | 5 g |
| qsp. 500 ml d'eau.          |     |

#### Solution d'hybridation:

La solution d'hybridation est identique à la solution de préhybridation, à l'exception de l'eau

qui est remplacée par la sonde préalablement dénaturée.

| <u>SSC x20</u> :      |                   |
|-----------------------|-------------------|
| NaCl                  | 175,3 g           |
| Citrate de sodium     | 88,2 g            |
| Eau ultra-pure        | 800 ml            |
| Ajuster le pH à 7,0 e | t compléter à 1 l |

#### 9.3.2. Hybridation avec une sonde marquée à Dig-dUTP.

Les conditions de préhybridation, d'hybridation et de lavage sont les mêmes que celles indiquées avant. Mais les tampons diffèrent ainsi que la méthode de révélation (voir dessous). Solution de préhybridation:

| Ingrédient             | concentration finale |  |
|------------------------|----------------------|--|
| Solution de "blocking" | 2 %                  |  |
| Formamide              | 50 %                 |  |
| SSC                    | x5                   |  |
| N-Lauroylsarcosine     | 0,02 %               |  |
| SDS                    | 0,02 %               |  |
| Sperme de saumon       | 50 µg/ml             |  |

#### Solution de blockage:

Cette solution est préparée à partir d'une poudre fournie par Boehringer, dans un tampon comprenant 0,1 M acide malique, 0,15 M NaCl, pH 7,5. Pour le stockage, elle est autoclavée et gardée à 4°C.

#### Solution d'hybridation:

La solution d'hybridation est la même que la solution de préhybridation à l'exception de l'eau, qui est remplacée par la sonde préalablement dénaturée.

#### 10. Clonage.

#### 10.1. Séparation de l'ADN coupé par des enzymes de restriction et leur extraction du gel

 $10 \ \mu g$  de l'ADN plasmidique sont coupés par 10 unités d'une ou plusieurs enzymes de restriction par 1 h d'incubation à la température adéquate. Ensuite, les fragments d'ADN sont séparé sur gel d'agarose et visualisés en lumière UV après coloration au BET. La bande d'ADN est découpée du gel et traitée selon la technique de "Freeze-squeeze" (TAUZ et coll., 1983). Le morceau de gel contenant le fragment d'ADN est équilibré dans 10 volumes de tampon I, à l'obscurité pendant 15-45 min. Après cela, le gel est refroidi dans de l'azote liquide dans un tube Eppendorf de 750  $\mu$ l, perforé au fond et contenant de la laine de verre. Ce tube est placé

dans un tube Eppendorf de 1,5 ml. Ce montage est ensuite centrifugé à 12.000 rpm à température ambiante de 10 min. A l'éluat, 1/100 de volume de tampon II et 2,5 volumes de tampon III sont ajoutés. L'ADN est précipité la nuit à -20°C. Dans certains cas, 1  $\mu$ l de glycogène est ajouté afin d'assurer un bon rendement de précipitation. Le lendemain, le tube est centrifugé à 12.000 rpm pendant 30 min. suivi d'un lavage en éthanol 70 %. Un gel d'agarose est utilisé pour estimer la quantité d'ADN obtenu. On se sert de cet ADN pour les clonages et les marquages.

# Tampon I:Acétate de sodium0,3 MEDTA1 mMajuster le pH à 7,0 avec de l'acide acétique glaciale.

| <u>Tampon II:</u> |      |
|-------------------|------|
| MgCl <sub>2</sub> | 1 M  |
| Acide acétique    | 10 % |

#### Tampon III:

Acétate de sodium 3 M ajuster le pH à 6,0 avec l'acide acétique glaciale.

#### 10.2. "Blunting" de l'ADN.

Pour certains clonages, il est nécessaire de couper le fragment avec des enzymes de restriction différentes de celles utilisées pour le vecteur. Dans ce cas, les extrémités du fragment à cloner sont rendues franches ("blunt") afin de le liguer dans un vecteur linéarisé, dont les extrémités sont également été rendu franches.

Au lieu de traiter l'ADN coupé après purification, il est possible - dans la plupart des cas d'utiliser directement le mélange de la digestion en complétant éventuellement le tampon par certains composants comme le magnésium.

#### 10.2.1. <u>Blunting par l'enzyme de Klenow</u>.

Le fragment large de l'ADN Polymérase I d'*E. coli*, nommé fragment de Klenow, n'exprime pas d'activité exonucléasique 5'---> 3' mais exprime une activité exonucléasique 3'---> 5' ainsi qu'une activité polymérasique 5'---> 3'. Ces activités sont utilisées pour remplir des sites de restriction qui sont récessifs en 3', en présence de nucléotides ou éliminer les bouts cohésifs "sortant" en 5' en absence de nucléotide. Protocole pour le remplissage:

L'ADN coupé dans 19,5 µl d'eau est complété avec

 $2,5 \ \mu l$  de tampon de réaction,

 $2\,\mu l$  de dNTP (1,25 mM chacun, final 100  $\mu M$  chacun) et

1  $\mu$ l de l'enzyme de Klenow (2 U/ $\mu$ l) (1U enzyme/1 $\mu$ g ADN, Boehringer) et

incubé 30 min. à 20°C. La réaction est arrêtée en chauffant 10 min. à 68°C.

Protocole pour l'activité exonucléasique de l'enzyme Klenow:

En principe le même protocole est utilisé à l'exception des nucléotides, qui ne sont pas présents.

| Tampon de réaction:             |          |
|---------------------------------|----------|
| Phosphate de potassium, pH 7,5: | 40,0 mM, |
| MgCl <sub>2</sub> :             | 6,6 mM,  |
| 2-ß-mercaptoéthanol:            | 1,0 mM.  |

#### 10.2.2. Blunting par l'enzyme DNA Polymérase du bactériophage T4.

Les bactériophage T4 ADN polymérase et le fragment de Klenow possèdent des activités enzymatiques comparables. Néanmoins, l'activité exonucléasique de l'enzyme bactériophagique est 200 fois plus efficace que celle de la Klenow. Afin de favoriser l'activité polymérasique, la température de l'incubation est maintenue à 12°C.

Protocole:

2,5 µl de dNTP (2 mM chaqun, final 0,1 mM chacun) et

1 U T4 DNA polymérase (Boehringer) /µg de l'ADN

sont rajoutés après la digestion (eau qsp 50  $\mu$ l) et incubés pendant 15 min. à 12°C.

La réaction est arrêtée avec de l'EDTA, pH 8, à une concentration finale de 20 mM.

#### 10.3. Déphosphorylation du vecteur.

Après coupure par l'enzyme de restriction, le vecteur est déphosphorylé afin d'éviter sa religation en cours de ligation:

 $1 \ \mu l$  de Calf Intestinal Phosphatase (CIP, Boehringer) est ajouté à la réaction de restriction et incubé pendant 1 h à 37°C. Cette quantité d'enzyme est suffisante pour déphosphoryler 50 pmoles de vecteur. Une extraction au phénol/chloroforme est effectuée pour éliminer les protéines.

#### 10.4. Ligation.

Après avoir quantifié l'ADN sur gel d'agarose, deux fois plus de molécules d'insert que de vecteur sont utilisées pour la réaction de ligation. Une unité de la T4 DNA-ligase (1 U/ $\mu$ l, Boehringer) est ajoutée et le tout est incubé dans un tampon approprié pendant une nuit à 16 °C. Pour la ligation en bouts francs, cinq fois plus de molécules d'insert que de molécules de vecteur sont utilisées. Cinq unités de la T4 DNA-ligase sont ajoutées et le tout est incubé dans un tampon approprié pendant une nuit à 16 °C.

Tampon de ligation:

| Trizma base (pH 7,5) | 66 mM |
|----------------------|-------|
| MgCl <sub>2</sub>    | 5 mM  |
| Dithioerythritole    | 1 mM  |
| ATP                  | 1 mM  |

10.5. Transformation de bactéries par un plasmide:

10.5.1. Bactéries compétentes.

Reprendre 0,33 ml d'une culture effectuée sur la nuit dans 30 ml de milieu SOB contenant 10 mM MgCl<sub>2</sub> et 10 mM MgSO4 et incuber à 37 % en agitation, jusqu'à O.D.<sub>550 nm</sub>= 0,45. Après avoir refroidi les bactéries sur la glace, centrifuger 12 min. à 1500 xg (4 °C). Le culot est ensuite repris dans 10 ml de tampon TFB et placé pendant 15 min. sur la glace. Après centrifugation, le culot bactérien est repris dans 2,4 ml de tampon TFB plus 84  $\mu$ l de DMSO (ajouter goutte par goutte !). Le tout est placé de nouveau sur la glace et agité doucement (5 minutes). 84  $\mu$ l de DTT sont ensuite additionnés goutte par goutte et le tube est placé pendant 10 minutes sur la glace. Enfin, 84  $\mu$ l de DMSO sont rajoutés et le tube est mis pendant 5 min. sur la glace.

Les bactéries restent competentes pendant plusieures heures pour la transformation.

Milieu SOB:Bacto-Tryptone20 gYeast extract5 gNaCl0,58 gKCl0,18 gqsp 11 d'eau.

#### Milieu SOC:

Milieu SOB additionné de 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, et de 20 mM glucose.

Tampon TFB:KMES10 mMRbCl100 mMMnCl2 4 H2O45 mMCaCl2 2 H2O10 mMCl\_3CoH\_{13}N\_63 mM (Hexaminecobalt trichloride)(ces produits sont fournis par Fluka)

Tampon DTT:DTT2,25 MAcétate de potassium40 mMqsp 2 ml d'eau (à conserver à - 20 °C).

#### 10.5.2. Transformation.

La réaction de ligation est mélangée doucement avec 210  $\mu$ l de bactéries compétentes et placée pendant 30 minutes sur la glace puis pendant 90 secondes à 42 °C et 2 minutes sur la glace. 800  $\mu$ l de SOC (à température ambiante) sont ajoutés et le tube est placé dans un incubateur à 37 °C en agitation pendant 1 heure. Les bactéries sont ensuite étalées sur des boites SOB contenant un antibiotique approprié et incubées une nuit à 37 °C.

#### 11. Construction et criblage d'une banque d'expression du stade épimastigote.

En principe, la banque d'expression du type lambda ZAPII permet le clonage de l'ADNc en orientation 5' --> 3', ce qui augmente la représentation des clones exprimés par deux. Le schéma ci-après représente le protocole général de la construction de cette banque; nous en détaillerons ensuite les différentes étapes.

Synthèse du premier brin de l'ADNc
 Génération de bouts francs
 Production de l'ADNc ayant des bouts francs

 Ligation des adaptateurs
 Phosphorylation de l'ADNc
 Digestion par l'endonucléase *XhoI* 

 Séparation de l'ADNc sur colonne de Séphacryl S-400

 Ligation des le vecteur Uni-Zap
 Empaquetage de la ligation dans les protéines phagiques
 Infection des bactéries *E. coli* PLK-F' par les phages

11.1. Synthèse du premier brin de l'ADNc.

 $5 \mu g$  dans  $37 \mu l$  de l'ARN poly(A)<sup>+</sup> dénaturé pendant 5 min.à  $65^{\circ}$ C sont incubés avec le "prémix":

5,0 µl tampon pour la synthèse du premier brin x10

2,5 µl mélange de nucléotides (10 mM dATP, dGTP, dTTP, 5 mM 5-Methyl-

dCTP)

2,0  $\mu$ l linker-primer (1,4  $\mu$ g/ $\mu$ l)

1,0 µl RNase Block II (1 U/µl)

Après 10 min. à température ambiante, 2,5  $\mu$ l de la transcriptase réverse (18 U/ $\mu$ l) sont ajoutés et incubés 1 h à 37°C. 5  $\mu$ l de cette solution sont incubés avec 0,5  $\mu$ l d' $\alpha$ [<sup>32</sup>P]-dATP (800 Ci/mmol) comme contrôle de la réaction (voir 8.3.).

11.2. Synthèse du second brin de l'ADNc.

Après avoir mis la réaction sur glace, les composants suivants - gardés à une température inférieure à  $16^{\circ}$ C - sont ajoutés dans l'ordre:

40,0 µl tampon de synthèse du second brin x10

6,0 µl 10 mM mélange de nucléotides (10 mM dATP, dGTP, dTTP, 26 mM

dCTP --> élimination du 5-Méhyl-dCTP par compétition)

297,0 µl d'eau ultra-pure

2,0 µl d'a[<sup>32</sup>P]-dATP (800 Ci/mmol).

Afin d'éviter une réaction prématurée de l'une des deux enzymes, celles-ci sont déposées sur la paroi du tube qui est centrifugé pendant quelques secondes pour les mélanger avec le contenu:

0,8 µl RNase H (4 U/µl)

10,0 µl DNA Polymérase I (11,0 U/µl).

La réaction se déroule à 16°C pendant 2,5 h.

Les fragments de l'ARN produits par "nicking" sont utilisés comme amorces, par la DNA polymérase I pour la synthèse du brin complémentaire. Le mélange des nucléotides ne contient pas de 5-Méthyl-dCTP afin d'éviter la protection du site de restriction *Xho* I du "linker-primer" du premier brin.

Les protéines sont ensuite extraites avec  $400 \,\mu$ l de phénol/chloroforme (1:1) et le phénol restant, avec  $400 \,\mu$ l de chloroforme seul. L'ADN est précipité pendant la nuit à -20°C en ajoutant:

33,3 µl acétate de sodium 3 M

867,0 µl éthanol.

Le lendemain, le tube est centrifugé 1 h à 4°C. Le surnageant radioactif est gardé pour calculer le rendement de la réaction. L'ADN est lavé avec 1 ml d'éthanol 80 % et repris après séchage dans 43,5 µl d'eau ultra-pure. 4,5 µl sont prélevés pour l'analyse du second brin. Analyse de la synthèse du premier et du second brin: Pour le premier brin:

1,5 µl sont comptés selon la méthode de Cherenkov;

1,5 µl sont précipités avec du TCA et comptés, et

2,5 µl sont analysés sur gel d'agarose suivi d'une autoradiographie.

Pour le second brin:

1 µl est compté selon la méthode de Charenkov;

1 µl est précipité avec du TCA et compté, et

2,5 µl sont analysés sur gel d'agarose suivi d'une autoradiographie.

11.3. Production de l'ADNc ayant des bouts francs (blunting).

Avant de liguer les adaptateurs, il est nécessaire de rendre franches les extrémités des ADNc: Aux 39,5 µl restant, on ajoute

5,0 µl de tampon de l'ADN Polymérase T4 x10,

2,5 µl du mélange de nucléotides 2,5 mM, et

3,5 µl de la Polymérase T4 (2,9 U/µl)

et on incube 30 min. à 37°C.

A la fin de la réaction, 50  $\mu$ l d'eau ultra-pure sont ajoutés et l'ADN est extrait par 100  $\mu$ l de phénol/chloroforme (1:1) puis lavé avec 100  $\mu$ l de chloroforme. Pour la précipitation (2 h, -70°C)

7,0 µl d'acétate de sodium, et

226 µl d'éthanol absolu sont ajoutés.

La centrifugation (maximum, 4°C, 1 h) est suivie d'un lavage par 150  $\mu$ l d'éthanol à 80 % et séchage. La présence de l'ADNc est vérifiée avec le compteur de radioactivité.

11.4. Ligation des adaptateurs.

L'adaptateur contient le site de restriction *EcoRI*:

5' AATTCGGCACGAG 3' 3' GCCGTGCTC 5'

Le nonamère est phosphorylé, ce qui permet la ligation avec les bouts francs de l'ADNc. Au contraire, le tridécamère est déphosphorylé afin d'éviter sa ligation. Plus tard, le tridécamère va être phosphorylé afin de permettre la ligation avec le vecteur qui lui est déphosphorylé. Le culot obtenu est resuspendu dans

7,0 µl d'adaptateur *EcoR*I et

1,0  $\mu$ l de tampon de ligation x10.

En utilisant le compteur Geiger, on contrôle si toute la radioactivité a été solubilisée et on incube le tube 10 min. à 37°C. Ensuite,

1,0 µl de rATP 10 mM et

1,0  $\mu$ l de DNA Ligase T4 (U/ $\mu$ l)

sont rajoutés et laissés la nuit à 4°C afin d'assurer un bon rendement de la ligation. Le lendemain, la ligase est inactivée par la chaleur (70°C, 30 min.).

#### 11.5. Phosphorylation de l'ADNc.

Afin de permettre une ligation efficace de l'ADNc dans les bras du vecteur déphosphorylé, l'ADNc de son côté doit être phosphorylé. Après avoir inactivé la ligase, le tube est brièvement centrifugé et laissé à refroidir pendant 5 min. sur la paillasse. Pour la réaction catalysée par la kinase,

1,0 µl de tampon de ligase x10,

2,0 µl de rATP,

6,0 μl d'eau ultra-pure et

1,0 µl de la T4 Polynucléotide kinase (10U/µl)

sont rajoutés et incubés 30 min. à 37°C. La kinase est ensuite inactivée à 70°C pendant 30 min. Le contenu du tube est centrifugé et refroidi à température ambiante.

#### 11.6. Digestion par l'endonucléase XhoI.

Jusqu'à maintenant, l'ADNc contient en ses deux extrémité des adaptateurs *Eco*RI mais aussi le linker-primer au 5' de l'adaptateur 3'. Afin de permettre une orientation correcte avec le promoteur lacZ, cet ADN est digéré par l'endonucléase *Xho*I. Cette enzyme ne reconnait qu'un site de restriction qui se trouve dans le linker-primer; tous les autres sont protégés par l'analogue du dCTP, le 5-Méthyl-dCTP.

Au tube de la réaction de phosphorylation

28 µl de tampon XhoI supplémentaire et

2,0 µl de *Xho*I (45U/µl)

sont ajoutés et incubés pendant 1 h à 37°C. Le tube est ensuite mis à refroidir à température ambiante.

#### 11.7. Séparation des ADNc sur colonne de Séphacryl S-400.

Cette technique est utilisée pour séparer les ADNc selon leur taille, avant de les liguer avec le vecteur. Seuls les ADNc d'une taille supérieure à environ 500 paires de bases sont collectés après contrôle sur gel d'agarose et autoradiographie des produits d'élution de la colonne.

La colonne est préparée avec une seringue de 1 ml sans piston. Au fond de celle-ci, la moitié d'un coton d'une pipette stérile de 1 ml est posée stérilement. La seringue est remplie avec le gel Séphacryl et posée dans un tube Falcon de 15 ml qui est centrifugué ensuite 2 min. à 600 xg. De nouveau, la seringue est remplie avec le gel et centrifugée. Après cela, la colonne est lavée deux fois avec  $300 \,\mu$ l de tampon STE x1. Pour collecter les fractions, la colonne est mise dans un autre tube Falcon de 15 ml qui contient déjà un tube Eppendorf décapsulé.

Au tube contenant la réaction de restriction, 5,0  $\mu$ l de tampon STE x1 sont rajoutés et le mélange est déposé sur la colonne. Celle-ci est centrifugée ensuite à 600 xg pendant 2 min. Après la centrifugation, le tube Eppendorf est remplacé par un autre, 50  $\mu$ l de tampon STE x1 sont rajoutés à la colonne qui est recentrifugée. Ceci est répété en tout quatre fois. Une fraction aliquoté des différentes fractions est analysée sur gel d'agarose et autoradiographiée. Les fractions contenant des ADNc de taille supérieure à 500 paires de bases sont rassemblées pour la suite. Une extraction au phénol/chloroforme, un lavage au chloroforme et une précipitation à l'éthanol (sans ajouter de sels) sont nécessaires afin d'enlever les protéines avant la liguation. Le précipité est repris dans 10  $\mu$ l d'eau ultra-pure.

#### 11.8. Ligation de l'ADNc avec le vecteur Uni-Zap.

La prochaine étape comprend la ligation de l'ADNc avec le vecteur Uni-Zap. Pour cela on mélange

2,5 µl de l'ADNc,

 $0,5 \mu l$  de tampon de ligation x10,

0,5 µl de rATP 10 mM,

1,0 µl de vecteur Uni-Zap XR (1 µg/µl) et

0,5 µl de Ligase T4 (4 U de Weiss/µl)

et on incube l'ensemble deux jours à 4°C puis 2 h à température ambiante.

#### 11.9. Empaquetage de la ligation dans les protéines phagiques.

L'empaquetage de la ligation est effectué à l'aide du kit Gigapack II (Stratagène).

1 ml de l'ADNc est empaqueté en le mélangeant avec un tube d'extrait phagique et 15  $\mu$ l d'extrait phagique soniqué. Ces deux tubes sont décongelés entre les doigts et utilisés dans les secondes (!) suivantes. Le mélange est incubé 2 h à 22°C. Ensuite 500  $\mu$ l de tampon de dilution (SM) et 20  $\mu$ l de chloroforme sont rajoutés et le tube est centrifugé brièvement. Le surnageant est utilisé pour l'infection des bactéries. La solution contenant les phages est gardée à 4°C.

#### 11.10. Infection des bactéries E. coli PLK-F' par les phages.

L'ADN hémiméthylé introduit dans des souches mcrA<sup>+</sup>, mcrB<sup>+</sup> serait soumis à une digestion par des nucléases du système mcrA et mcrB. C'est pourquoi il est nécessaire d'utiliser des souches qui sont mcrA- et mcrB- comme la souche PLK-F'. Après passage dans cette souche, l'ADN n'est plus hémiméthylé mais méthylé sur les deux brins et des souches mcrA+. mcrB+ (par exemple la souche XL1-Blue) seront ensuite utilisables. En outre, la souche PLK-F' n'est pas complémentée pour un phénotype β-galactosidase positif et n'est pas utilisable pour la sélection bleu/blanc. La fréquence de recombinaison est donc testée avec la souche XL1-Blue qui elle, peut complémenter la mutation du gène *lac*Z du vecteur Uni-ZAP XR par la mutation △M15 dans le gène *lac*Z, qui se trouve sur son épisome F'. L'expression de ces deux gènes est nécessaire pour le phénotype β-galactosidase positif (bleu). S'il y a eu recombinaison (insertion de l'ADNc), le gène lacZ du vecteur Uni-ZAP est interrompu (muté) et le phénotype devient βgalactosidase négatif (blanc). L'induction de l'expression des gènes *lac*Z est régulée par le produit du gène répressif lacIq sur l'épisome F' qui supprime la transcription. Ce répresseur est important au cas où le produit du gène de fusion ß-galactosidase/insert est toxique pour la bactérie. L'expression des gènes lacZ est donc induite par dérépression, en utilisant un analogue de l'inducteur naturel allolactose, l'isophénylthiogalactoside (IPTG). La maintenance de cet épisome est assurée par le transposon Tn10 sur l'épisome F' qui exprime un gène de résistance contre la tétracycline.

Une colonie de XL1-Blue est repiquée la veille dans 3 ml de milieu LB plus 12,5 mg/ml de tétracycline (LB/tet) et incubée à 37°C sous agitation. Le lendemain, 50 ml de LB/tet sont incubés avec 1/100 de la culture de la veille et laissés en culture jusqu'à D.O.<sub>600nm</sub>=0,5. La culture est alors centrifugée à 2500 xg, reprise dans 10 mM de MgSO<sub>4</sub> et incubée pendant 1 h à 37°C sous agitation. Après cela, les bactéries compétentes sont mises à 4°C et utilisées dans les trois jours.

1  $\mu$ l de la préparation de phages et 1  $\mu$ l d'une dilution 1:10 sont préincubés avec 200  $\mu$ l de bactéries compétentes 15 min. à 37°C, mélangés à 2 ml de top-agar (48°C) et platés sur des boîtes NZY préchauffées à 37°C. Le lendemain, les plages de lyse sont comptées.

Si le total théorique donne plus d'un million de plages, le reste de l'ADNc est ligué et empaqueté.

#### 11.11. Amplification.

Comme la banque non-amplifiée est relativement instable, elle est multipliée dans des bactéries. Afin d'éviter une surreprésentation des clones abondants, l'amplification est arrêtée dès qu'il y a des plages visibles.

Après avoir titré la banque primaire, 50.000 pfu (plaque forming units) sont incubés avec 600  $\mu$ l de bactéries compétentes à 37°C et platées sur une boîte NZY de 14 cm de diamètre, après mélange avec 6 ml de top-agar. L'infection est arrêtée en ajoutant 10 ml de tampon SM pendant la nuit sous agitation à 4°C. Le lendemain, le surnageant est récupéré et l'agar est lavé avec 2 ml

du même tampon. 5 % de chloroforme sont ajoutés aux phages afin de lyser les bactéries. Après centrifugation à 4000 xg, le surnageant est séparé du culot et 0,3 % de chloroforme sont ajoutés. Finalement, la banque amplifiée est titrée et gardée à 4°C. Des fractions sont congelées en présence de de DMSO à -20 et à -70°C.

La fréquence de recombinaison est testée sur boîtes NZY, en platant à peu près 200 pfu. Afin de permettre la selection bleu/blanc, 15  $\mu$ l d'IPTG 0,5 M et 50  $\mu$ l de X-gal 250 mg/ml (dans du diméthylformamide) sont ajoutés à 3 ml de top-agar. Le X-gal sert de substrat chromophore qui donne une produit bleu indiquant les plages positives pour le phénotype  $\beta$ -galactosidase. Les plages négatives apparaissent blanches. La quantité des plages bleues ne doit normalement pas être supérieure à 1 %.

| 11.12. <u>Milieux de c</u>             | <u>ulture pour la ba</u> | ctériologie. |                                 |              |
|--|--------------------------|--------------|---------------------------------|--------------|
| NZY Broth (par litre                   | e)                       |              | NZY Boîtes/Top-Ag               | <u>ar</u>    |
| NaCl                                   |                          | 5 g          | Ajouter 15 g d'agar p           | oar litre de |
| MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O |                          | 2 g          | NZY Broth pour les boites et 7g |              |
| Yeast extract                          |                          | 5 g          | d'agarose pour le Top-Agar      |              |
| NZ amine (hydrolys                     | sat de caséine)          | 10 g         |                                 |              |
| pH 7,5.                                |                          |              |                                 |              |
| <u>Luria Broth</u> (LB) (p             | ar litre)                |              | Super Broth (par litre          | e)           |
| NaCl                                   | 10 g                     |              | NaCl                            | 5 g          |
| Yeast Extract                          | 10 g                     |              | Yeast Extract                   | 20 g         |
| Bacto-Tryptone                         | 5 g.                     |              | Bacto-Tryptone                  | 35 g         |
|  |                          |              | NaOH 5M                         | 1 ml.        |
| <u>YT Broth x2</u> (par lit            | tre)                     |              | <u>SM Buffer</u> (par litre)    |              |
| NaCl                                   | 10 g                     |              | NaCl                            | 5,8 g        |
| Yeast Extract                          | 10 g                     |              | MgSO4 x 7H2O                    | 2,0 g        |
| Bacto-Tryptone                         | 16 g.                    |              | Trizma base 1 M, p              | H 7,5 50 ml  |
|  | ·                        |              | Gélatine 2 %                    | 5 ml.        |
|  |                          |              |                                 |              |

#### 11.13. Criblage de la banque d'expression lambda ZAP par anticorps.

Le criblage d'une banque d'expression est possible à l'aide d'anticorps dirigés contre la partie protéique d'un antigène car les bactéries expriment une protéine de fusion ( $\beta$ -galactosidase + produit codé par l'insert).

Sur une boîte de 14 cm de diamètre, 10.000 à 20.000 pfu sont platés avec des bactéries de la souche XL1-Blue. Les boîtes sont incubées à 42°C jusqu'à ce que des plages commencent à apparaître. Puis elles sont mises à 4°C pendant 1 h pour éviter à la membrane de coller au topagar. Les membranes de nitrocellulose sont préalablement imprégnées avec 10 mM d'IPTG et

séchées avant de les déposer sur les boîtes. L'IPTG des membranes va induire l'expression des protéines de fusion. 4 h après, les membranes sont enlevées et saturées dans du PBS 5 % de lait Gloria 1 h à température ambiante. Les anticorps absorbés 1 h avec un lysat bactérien sont mis en contact la nuit à 4°C. Le lendemain, les membranes sont lavées 4 x 15 min. en PBS 0,05 % Tween-20 et 1 fois en PBS seul. Le conjugué marqué à la péroxidase est alors mélangé au 1/500 avec du PBS/5 % lait et incubé avec les membranes pendant 2 h à température ambiante. Ensuite les filtres sont lavés comme décrit plus haut et révélés comme décrit sous chapitre 5.5. Les plages positives sont repiquées avec une pointe de pipette Eppendorf et éluées la nuit à 4°C dans 1 ml de tampon SM. Après titrage, 500 pfu sont platées sur une boîte de 90 mm de diamètre et recriblées. Un troisième criblage est fait pour être sûr de la pureté des plages (phage stock). L'étape suivante est l'excision *in vivo*.

#### 11.14. Excision in vivo.

L'excision *in vivo* permet de sortir le phagemide Bluescript SK- du vecteur lambda et de le recirculariser. Des bactéries sont coinfectées par les phages purifiés après criblage et des phages helper R408 (dérivé du phage f1). Ce phage helper apporte les protéines nécessaires à l'excision et à la recircularisation du phagemide. Le résultat est un phage du type f1 contenant l'ADN du phagemide Bluescript SK- sous forme circulaire et monobrin. Afin d'obtenir des colonies bactériennes, des *E. coli* sont infectées avec ces phages. Dans les bactéries, l'ADN est dupliqué et se réplique ensuite comme un plasmide. Les clones positifs sont sélectionnés sur le base de leur résistance contre l'ampicilline résistance portée par le phagemide.

#### Protocole:

Dans un tube conique de 50 ml

200 µl XL1-Blue (D.O.<sub>600nm</sub>=1),

200  $\mu$ l de phage stock (>1 x 10<sup>5</sup> pfu) et

 $1 \mu l$  de phage helper R408 (>1 x 10<sup>6</sup> pfu/ml)

sont mélangés et incubés 15 min. à 37°C. Les bactéries sont incubées seulement avec les phages helpers servent de témoins négatifs. Ensuite, 5 ml du milieu YT x2 sont rajoutés et les tubes sont agités 3 h à 37°C. Les bactéries sont ensuite dénaturées par la chaleur (70°C, 20 min.) et sédimentées pendant 5 min. à 4000 xg. Le surnageant contenant le phagemide pBluescript empaqueté comme un phage filamenteux f1 est gardé à 4°C (max. 1-2 mois). De cette solution, 20  $\mu$ l de surnageant non-dilué et 20  $\mu$ l d'une dilution 1:100 sont mélangés avec 200  $\mu$ l de bactéries XL1-Blue (D.O.<sub>600nm</sub>=1) et incubés 15 min. à 37°C. 1, 10 et 100  $\mu$ l du mélange sont platés sur des boîtes LB/Ampicilline (100  $\mu$ g/ $\mu$ l) et incubés la nuit à 37°C. Les colonies obtenues contiennent le phagemide pBluescript SK- en double-brin. Les bactéries infectées avec le phage helper seul ne vont pas pousser parce qu'elles ne contiennent pas de gène de résistance.

Les clones sont mis en culture liquide la nuit et un demi volume de glycérol est ajouté. Ils sont d'abord refroidis à -20°C avant de les mettre à -80°C.
#### 12. Séquençage.

Le séquencage a été réalisé à l'aide de l'"AutoRead™ Sequencing Kit" de Pharmacie LKB.

#### 12.1. Production de l'ADN simple-brin.

Une colonie bactérienne est reprise le matin dans 5 ml de milieu Super-Broth, additionné de 100  $\mu$ g/ml de tétracycline. En fin d'après-midi, 10 ml de Super-Broth sont inoculés avec les bactéries à une D.O.<sub>550 nm</sub> de 0,05 et laissés 1 heure en agitation à 37 °C. Ensuite, des phages VSM13 sont ajoutés dans un rapport 20:1 (phages : bactéries). La culture est mise à 37 °C, en agitation pendant la nuit. Le lendemain, le tube est centrifugé pendant 10 min. à 2200 xg à 4 °C. Le surnageant est récupéré et traité 4 fois de la même façon. Ensuite, le surnageant est transvasé dans des tubes Eppendorf. Ceux-ci sont centrifugés à 12000 rpm pendant 10 min. à 4 °C. Les surnageant est transvasé (1,2 ml) dans d'autres tubes Eppendorf. 300  $\mu$ l de polyéthylène-glycol (PEG 6000 dans 2,5 M NaCl) sont ajoutés et soigneusement vortexés. Les tubes sont incubés pendant 20 min. à température ambiante et centrifugés 15 min. à 12000 rpm. Le surnageant est ensuite éliminé et le culot est repris dans 10  $\mu$ l de TE. Le tout est completé à 200  $\mu$ l avec du TE et soigneusement vortexé. Une extraction phénol/chloroforme est nécessaire afin d'éliminer les protéines. Ensuite, l'ADN est précipité pendant la nuit et repris dans 10  $\mu$ l de TE 0,1.

Tampon TE 0,1:

Trizma base 10 mM EDTA 0,1 mM pH 8,0.

#### 12.2. Séquençage automatique.

Ce système de séquençage est basé sur la méthode de la terminaison de chaîne par des nucléotides didésoxy (SANGER et coll., 1977). Au lieu d'incorporer des nucléotides radiomarqués, ce système utilise une amorce marquée à la fluorescéine. Chaque fragment fluorescent d'ADN, au cours de sa migration, passe devant un rayon laser et est aussi enregistré sur un ordinateur. Chaque réaction de terminaison est déposée sur une piste individuelle.

Deux différents protocoles sont utilisés, selon qu'il s'agit d'ADN du simple-brin ou d'ADN double-brin:

12.2.1. Séquençage en simple-brin avec le système A.L.F.

 $3 \mu l$  de l'ADN simple-brin (voir 11) dans  $13 \mu l$  d'eau ultra-pure (Millipore milli Q) sont mélangés avec

 $2\,\mu l$  d'amorce et

2 µl de tampon d'annealing.

Après avoir mélangé doucement et centrifugé, le tube est incubé 10 min. à 60°C, puis laissé sur la paillasse pendant 20 min. et on recentrifuge quelques secondes avant d'ajouter

1 µl de tampon d'extension et

2 μl de la DNA Polymérase T7 (3 U/μl).

4,3 µl du mélange sont tout de suite répartis dans quatre tubes Eppendorf (marqués A/C/G ou T) préchauffés à 37°C qui contiennent déjà 2,5 µl mix de terminaison A/C/G ou T. Ces tubes sont incubés 10 min. à 37°C. La réaction est arrêtée en rajoutant 5 µl de tampon d'échantillon. Avant de mettre les échantillons sur le gel, ils sont concentrés à moitié dans le Speed-Vac ( $\approx 5$  min.) et dénaturés 3 min. à 95°C.

Le gel est préparé avec de l'eau ultra-pure Millipore milli Q; tout le matériel est aussi lavé avec cette eau.

24 ml acrylamide/bisacrylamide,

33,6 g urée 7M (Pharmacia LKB) et

**4,8 ml TBE x1**0

sont complètés à 80 ml avec de l'eau Millipore milli Q (déionisée), filtrés et dégazés (10-15 min.). Ensuite 70  $\mu$ l de TEMED et 280  $\mu$ l de PSA 10 % sont ajoutés pour la polymérisation du gel. En général, le gel est coulé le matin et lancé le soir (6 h de migration). Les résultats sont analysés le lendemain.

12.2.2. Séquençage en double-brin avec le système A.L.F.

L'étape cruciale en séquençage double-brin est la dénaturation de l'ADN, c'est-à-dire qu'il faut travailler vite sans laisser trainer l'ADN pendant les étapes de dénaturation et de précipitation!

10 µg de l'ADN plasmidique dans 32 µl d'eau ultra-pure Millipore milli Q plus

8 μl de NaOH 2 M sont chauffés 5 min. à 70°C avant de rajouter

28 μl d'eau milli Q,

12 µl d'acétate de sodium 3 M, pH 4,8 et

240 µl d'éthanol absolu froid.

La précipitation se fait pendant 5 min. sur carbo-glace ou la nuit à -70°C. Ensuite le tube est centrifugé 15 min. et le culot est lavé avec de l'éthanol 70 % et séché. Le culot est repris dans 10  $\mu$ l d'eau milli Q froide et

2 μl d'amorces,

2 μl de tampon d'annealing,

 $3\,\mu l$  de DMSO

sont rajoutés. L'annealing se fait à 37°C pendant 20 min. puis 10 min. à température ambiante. Ensuite

1  $\mu$ l de tampon d'extension et

2 µl de DNA polymérase T7 (3 U/ml)

sont rajoutés et le tout est réparti dans 4 tubes Eppendorf (marqués A/C/G ou T) préchauffés à 37°C et contenant déjà 2,5 µl mix de terminaison A/C/G ou T. Ces tubes sont incubés 10 min. à 37°C. La réaction est arrêtée en rajoutant 5 µl de tampon d'échantillon. Avant dépot sur gel, les échantillons sont concentrés à moitié dans le Speed-Vac (≈5 min.) et dénaturés 3 min. à 95°C.

Solutions pour la réaction de séquençage:

| A Mix: | ddATP, dATP, dCTP, c7dGTP, dTTP. |
|--------|----------------------------------|
| C Mix: | ddCTP, dATP, dCTP; c7dGTP, dTTP. |
| G Mix: | ddGTP, dATP, dCTP, c7dGTP, dTTP  |
| T Mix: | ddTTP, dATP, dCTP, c7dGTP, dTTP. |

(les concentrations ne sont pas indiquées dans les instructions du kit)

M13 amorce universelle: 5'-Fluorescéine-d(CGACGTTGTAAAACGACGGCCAGT)-3',

1,5 mM (1,6 pmol/µl; 0,42 A<sub>260nm</sub> unités/ml);

M13 amorce réverse: 5'-Fluorescéine-d(CAGGAAACAGCTATGAC)-3',

2,1 mM (2,1 pmol/µl; 0,42 A<sub>260nm</sub>unités/ml).

Tampon d'annealing: une solution tamponnée contenant du MgCl<sub>2</sub>.

Tampon d'extension: une solution tamponnée contenant du DTT.

Tampon de dilution de l'enzyme: une solution tamponnée contenant du glycérol, de la BSA et du DDT.

Tampon d'arrêt de la réaction: formamide désionisée et bleu de dextran.

Solutions pour le gel:

| Acrylamide/bisacryla | <u>mide 20 %</u> : |
|----------------------|--------------------|
| Acrylamide           | 95,00 g            |
| Bisacrylamide        | 5,00 g             |
| PSA                  | 10 %               |

| 121,14 g |
|----------|
| 51,32 g  |
| 3,72 g   |
| 1,00 l.  |
|          |

#### 13. La réaction de polymérase en chaine (PCR)

Cette technique permet l'amplification de l'ADN entre deux amorces de séquence connue. La PCR est utilisée ici pour amplifier la région 5' inconnue d'un ARNm. Le principe consiste à transcrire d'abord l'ARNm par la transcriptase réverse, à l'aide d'une amorce (1) qui se trouve proche de l'extrémité 5' connue de l'ADNc. L'amplification se fait avec l'amorce (2), située en 5' de l'amorce (1) de la transcription réverse (pour augmenter la spécificité) et une amorce homologue à une partie du "Spliced Leader" (SL) qui représente l'extrémité 5' de tous les ARNm matures. Pour le séquençage, le(s) produit(s) sont séparé(s) sur gel d'agarose et cloné(s) dans le vecteur pBluescript.

Protocole de la transcription réverse:

2  $\mu$ g de l'ARN poly(A)<sup>+</sup> sont incubés avec 10 pmoles d'oligonucléotide I spécifique de la séquence TcAc2 à 65 °C, dans un volume de 16,5  $\mu$ l, pendant 5 minutes. Ensuite 3,5  $\mu$ l de tampon de transcrition réverse sont rajoutés. Le tout est incubé 1 heure à 42 °C, puis 30 minutes à 52 °C.

Les oligonucléotides libres sont ensuite retenus spécifiquement sur une colonne Séphadex G50 (Boehringer.

1 µl de l'éluat est utilisé pour la PCR.

Tampon de la transcription réverse (x 10):

| Trizma base        | 500 mM            |
|--------------------|-------------------|
| MgCl <sub>2</sub>  | 60 mM             |
| KCl                | 400 mM            |
| DTT                | 10 mM             |
| dNTP               | 10 mM (de chaque) |
| (pH 8,15 à 41 °C). |                   |

Protocole de la réaction de PCR:

5 μl de tampon PCR
5 μl de DMSO
5 μl de dNTP (15 mM de chaque)
30 μl de l'eau
1 μl d'oligonucléotide II (10μM)
1 μl d'oligonucléotide "SL" (10 μM)

2,5 U (0,5  $\mu$ l) de la polymérase thermostable (Taq-polymérase, Perkin Elmer Cetus) sont mélangés et incubés.

Tampon PCR (x 10):

| Trizma base       | 670 mM    |
|-------------------|-----------|
| MgCl <sub>2</sub> | 67 mM     |
| BSA               | 1,7 mg/ml |
| $(NH_4)_2SO_4$    | 166 mM    |

Protocole d'amplification :

5 min. à 95 °C, 1 cycle;

1 min. à 95 °C, 1 minute à 58°C, 1 minute à 72 °C, 35 cycles;

10 min. à 72 °C, 1 cyle.

Séquence de l'oligonucléotide (I) spécifique de la séquence du clone TcAc2:

5' TCCTTCGCCGTGATCAACACGCG 3'

Séquence de l'oligonucléotide (II) spécifique de la séquence du clone TcAc2:

```
5' GTGATCAACACGCGTTGG 3'
```

Séquence de l'oligonucléotide spécifique de la séquence du "Spliced Leader": 5' TATTATTGATACAGTTTCTGTACTATATTG 3'

## 14. Expression des protéines recombinantes.

14.1. Sous-clonage dans le vecteur d'expression pGEX 2T (Smith and Johnson, 1988).

Afin d'exprimer la protéine clonée de la banque d'expression, l'insert est sous-cloné dans le vecteur pGEX 2T, en fusion et en cadre avec la glutathion *S-transférase* 26 kDa de *Schistosoma japonicum*. Ceci permet la purification du produit sur une colonne d'affinité de glutathion couplé à l'agarose. Comme souche réceptrice de ce vecteur, nous avons utilisé *E. coli* JM109, qui est rendue compétente par la technique du TFB (MANIATIS et coll.., 1990). L'analyse des colonies se fait par mini-préparation de plasmide décrite plus haut, de façon à vérifier la présence de l'insert en orientation correcte. Les clones positifs sont testés pour l'expression de la protéine de fusion.

#### 14.2. Expression et purification des protéines recombinantes

Les clones ayant un insert en bonne orientation sont criblés pour l'expression de la protéine de fusion par mini-préparation: les clones sont cultivés une nuit dans 1 ml de milieu LB en présence de 100 µg ampicilline/ml. Le matin, 10 volumes de LB plus antibiotique sont ajoutés. Après une heure d'incubation, l'IPTG est ajouté à la concentration finale de 0,01 mM afin d'induire l'expression de la protéine recombinante. Une heure plus tard, les bactéries sont sédimentées et lysées dans du MTPBS (PBS pH 7,5, Triton X-100 1 %, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM). Après une sonication d'1 min., le lysat est centrifugé en tubes Eppendorf 5 min. à 12000 rpm à 4°C. Le surnageant est mis en contact pendant 5 min. avec des billes d'agarose couplées au glutathion. Après plusieurs lavages dans du MTPBS, la protéine de fusion est éluée par ébullition dans du tampon d'échantillon de SDS-PAGE.

Pour les préparations à grande échelle, le culot d'une culture d'un litre (dans un Erlen de 5 litres de volume) obtenu après centrifugation (2000 xg), est soniqué pendant 5 min. à puissance maximale. L'absorption sur billes se fait en 15 min.. Elle est suivie par 10 lavages en MTPBS. Si la protéine se dissout difficilement, il est nécessaire d'extraire la protéine de fusion plusieurs fois, afin de solubiliser la totalité de la protéine de fusion. L'élution de la protéine de fusion est ensuite réalisée par compétition avec du glutathion libre ajouté à la concentration de 5 mM en Trizma-base pH 8,0 50 mM. Ce décrochage est effectué deux fois de suite par 2 ml de cette solution pendant 2 min. à 4°C. Trois extractions d' 1,5 litre de culture donnent à peu près 1 mg de protéine de fusion. La pureté de cette préparation est analysée par la technique de SDS-PAGE. La protéine est stockée à -20°C, après dialyse contre du MTPBS et concentration sur Amicon B15 (Amicon). La concentration de la protéine est dosée par la technique décrite plus haut.

## 15. Purification de la protéine TcAc2 native sur colonne de Shexylglutathion-agarose.

Une culture massive (5 litres) de stade épimastigote de *T. cruzi* est maintenue jusqu'au début de la phase stationnaire (jour 5). Les parasites sont repris dans le tampon Hepes et lysés par 4 cycles de congélation/décongélation dans du nitrogène liquide. Le lysat est ensuite centrifugé pendant 1 h à 110.000 xg. La fraction cytosolique (surnageant) est appliquée sur la colonne de *S*-hexylglutathion-agarose (Sigma). Après passage, la colonne est lavée pendant la nuit avec le tampon Hepes. L'élution est effectuée avec 5 mM de *S*-hexylglutathion dans le tampon Hepes. La quantité de protéine éluée est de 300  $\mu$ g.

Tampon Hepes:

| Hepes  | 20 mM  |
|--------|--------|
| EDTA   | 1 mM   |
| KCl    | 150 mM |
| PMSF   | 0,5 mM |
| pH 7,5 |        |

### 16. Analyse des séquences en acides nucléiques et protéiques.

L'analyse en séquence primaire est réalisée grâce aux programmes "DNASTAR" et "PC Gene" (IntelliGenetics).

Les profils en 2 dimensions sont obtenus grâce au programme "HCA plot" (GABORIAUD et coll., 1987; LEMESLE-VARLOOT et coll., 1990). La séquence de l'insert TcAc2 en acides nucléiques et en acides amines a été comparée aux banques de données NBRF-PIR, Swiss-Prot, GenBank et EMBL.

## REFERENCES

ABRAHAMSOHN, I.A. and W.D. DA SILVA (1977). Antibody dependent cellmediated cytotoxicity against *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol*. **75**: 317.

AGABIAN, N. (1990). Trans-splicing of nuclear pre-mRNAs. Cell 61: 1157.

AGOSIN, M., A. CHERRY, J. PEDEMONTE and R. WHITE (1984). Cytochrome P450 in culture forms of *Trypanosoma cruzi*. *Comp. Biochem. Physiol.* **78** C: 127.

AGOSIN, M., C. NAQUIRA, J. CAPDEVILA and J. PAULIN (1976a). Hemoproteins in *Trypanosoma cruzi* with emphasis on microsomal pigments. *Int. J. Biochem.* 7: 585.

AGOSIN, M., C. NAQUIRA, J. PAULIN and J. CAPDEVILA (1976b). Cytochrome P-450 and drug metabolism in *Trypanosoma cruzi*: effects of phenobarbital. *Science* 194: 195.

ALCINA, A., A. URZAINQUI and L. CARRASCO (1988). The heat-shock response in *Trypanosoma cruzi. Eur. J. Biochem.* 172: 121.

ALONSO, G., P. GUERVARA and J. L. RAMIREZ (1992). Trypanosomatidae codon usage and GC distribution. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 87: 517.

ANDREWS, N.W., C.K. ABRAMS, S.L. SLATIN and G. GRIFFITHS (1990). A *T. cruzi*-secreted protein immunologically related to the complement component C9: evidence for membrane pore-forming activity at low pH. *Cell* **61**: 1277.

AÑEZ, N. (1982). Studies on *T. rangeli* Tejera 1920. IV. A reconsideration of its systematic position. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 77: 405.

**ARAUJO, F.G.** (1989). Development of resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice depends on viable population of (L3T4<sup>+</sup>) T lymphocytes. *Infect. Immun.* **57**: 2246.

**ARIYANAYAGAM, M.R. and A.H. FAIRLAMB** (1993). Growth and polyamine-thiol metabolism of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. 27th Trypanosomiasis Seminar, London, UK, British Society for Parasitology. Abstract.

ARRIGO, A. P., J. SUHAN and W. WELCH (1988). Dynamic changes in the structure and intracellular locale of the mammalian low-molecular-weight heat shock protein. *Mol. Cell. Biol.* 8: 5059.

AVILA, A. H., D.S. SIGMAN, L.M. COHEN and R.C. MILLIKAN (1991).
Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from blood lysates: diagnosis of chronic Chagas' disease. *Mol. Biochem. Parasitol.*48: 211.

**BACCHI, C.J.** (1993). Resistance to clinical drugs in african Trypanosomes. *Parasitol. Today* **9**: 190.

BALLOUL, J.M., P. SONDERMEYER, D. DREYER, M. CAPRON, J.M. GRZYCH, R.J. PIERCE, D. CAVALLO, J.P. LECOCQ and A. CAPRON (1987). Molecular cloning of a protective antigen of Schistosomes. *Nature* **326**: 149.

**BANGS, J.D., P.F. CRAIN, T. HAHIZUME, J.A. McCLOSKEY and J.C. BOOTHROYD** (1992). Mass spectroscopy of mRNA cap 4 from trypanosomatids reveals two novel nucleotides. *J. Biol. Chem.* **267**: 9805.

**BARYCKI, J.J. and R.F. COLMAN** (1993). Affinity labeling of glutathion *S*-transferas, isoenzyme 4-4, by 4-(fluorosulfonyl)benzoic acid reveals  $Tyr^{115}$  to be an important determinant of xenobiotic substrate specificity. *Biochem.* **32**: 13002.

**BEHLKE, J., G. LUTSCH, M. GAESTEL and H. BIELKA** (1991). Supramolecular structure of the recombinant murine small heat shock protein hsp25. *FEBS Let.* **288**: 119.

**BELTZ, L.A. and F. KIERSZENBAUM** (1987). Suppression of human lymphocyte responses by *Trypanosoma cruzi*. *Immunol.* **60**: 309.

**BENNE, R., J. VAN DEN BURG, J.P.H. BRAKENHOFF, P. SLOOF, J.H. VAN BOOM and M.C. TROMP** (1986). Major transcript of the frameshifted coxII gene from trypanosome mitochondria contains four nucleotides that are not encoded in the DNA. *Cell* **46**: 819.

**BENOIST, P. and J. SCHWENCKE** (1990). Native agarose-polyacrylamide gel electrophoresis allowing the detection of aminopeptidase, dehydrogenase, and esterase activities at the nanogram level: enzymatic patterns in some *Frankia* strains. *Anal. Biochem.* **187**: 337.

**BENSAUDE, O., C. BABINET, M. MORANGE and F. JACOB** (1983). Heat shock proteins, first major products of zygotic gene activity in mouse embryo. *Nature* : 331.

**BERGER, B.J. and A.H. FAIRLAMB** (1993). Cytochrome P450 in Trypanosomatids. *Biochem. Pharmacol.* 46: 149.

**BEVERLY, S.M., T.E. ELLENBERGER and J.S. CORDINGLEY** (1986). Primary structure of a gene encoding the bifunctional dihydrofolate reductase-thymidylate synthase of *Leishmania major. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 2584.

BHAT, G.J., D.J. KOSLOWSKY, J.E. FEAGIN, B.L. SMILEY and K. STUART (1990). An extensively edited mitochondrial transcript in kinetoplastids encides a protein homologous to ATPase subunit 6. *Cell* **61**: 885.

BILLAUT-MULOT, O., V. POMMIER, R. SCHÖNECK, B. PLUMAS-MARTY, A. TAIBI, M. LOYENS, A. CAPRON and A. OUAISSI (1993). Nucleotide sequence of a *Trypanosoma cruzi* cDNA encoding a protein homologous to mammalian EF1γ. *Nucl.Acids Res.* 21: 3901. **BLOCKI, F.A., P.M. SCHILEVERT and L.P. WACKETT** (1992). Rat liver protein linking chemical and immunological detoxification systems. *Nature* **360**: 269.

**BLUM, B., N. BAKALARA and L. SIMPSON** (1990a). A model for RNA editing in kinetoplastid mitochondria: "guide" RNA molecules transcribed from maxicircle DNA provide the edited information. *Cell* **60**: 189.

**BLUM, B. and L. SIMPSON** (1990b). Guide RNAs in kinetoplastid mitochondria have a nonencoded 3' oligo(U) tail involved in recognition of the predicted region. *Cell* **62**: 391.

**BLUM, B., N.R. STURM, A. SIMPSON and L. SIMPSON** (1991). Chimeric gRNA-mRNA molecules with oligo(U) tails covalently linked at sites of RNA editing suggest that U addition occurs by transesterification. *Cell* **65**: 543.

**BOND, U.** (1988). Heat shock but not other stress inducers leads to the disruption of a subset of snRNPs and inhibition of *in vitro* splicing in HeLa cells. *EMBO J.* 7: 3509.

**BONEN, L.** (1993). *Trans*-splicing of pre-mRNA in plants, animals, and protists. *FASEB J*. **7**: 40.

BONFA, E., V.S.T. VIANA, A.C.P. BARRETO, N.H. YOSHINARI and W. COSSERMELLI (1993). Autoantibodies in Chagas' disease. An antibody cross-reactive with human and *Trypanosoma cruzi* ribosomal proteins. *J. Immunol.* **150**: 3917.

BORDA, E.S., J. PASCUAL, P.M. COSSIO, R. ARANA, M. VEGA and L. STERIN-BORDA (1984). A circulating IgG in Chagas' disease which binds to beta adrenoreceptor of myocardium and modulates its activity. *Clin. Exp. Immunol.* 57: 679.

**BORST, P.** (1986). Discontinuous transcription and antigenetic variation in Trypanosomes. *Ann. Rev. Biochem.* **55**: 701.

BOULANGER, D., G.D. REID, I. STURROCK, I. WOLOWCZUK, J.M. BALLOUL, D. GREZEL, R.J. PIERCE, M.F. OTIENO, S. GUERRET, J.A. GRIMAUD, A.E. BUTTERWORTH and A. CAPRON (1991). Immunization of mice and baboons with the recombinant Sm28GST affects both worm viability and fecundity after experimental infection with *Schistosoma mansoni*. *Parasite Immunol*. **13**: 473.

**BOVERIS, A. and A.O. STOPPANI** (1977). Hydrogene peroxyde generation in *Trypanosoma cruzi. Experientia* **33**: 1306.

BRABIN, L. (1993). Trypanosoma cruzi infection in women. Parasitol. Today 9: 198.

**BRACK, C.** (1968). Elektronenmikroskopische Untersuchungen zum Lebenszyklus von *Trypanosoma cruzi. Act. Trop.* **25**: 289.

BRENIERE, S.F., M.F. BOSSENO, S. REVOLLO, M.T. RIVERA, Y. CARLIER and M. TIBAYRENC (1992). Direct identification of *Trypanosoma cruzi* natural clones in vectors and mammalian hosts by polymerase chain reaction amplification. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **46**: 335.

BRENER, Z. and E. CHIARI (1963). Variações morphologicas observedes en diferents amostras de T. cruzi. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 5: 220.

**BRENNESSEL**, **D.J.**, **M. WITTNER**, **V. BRAUNSTEIN and H.B. TANOWITZ** (1985). Acetylcholinesterase levels in skeletal muscle of mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **34**: 460.

**BROPHY, P.M., P. CROWLEY and J. BARRET** (1990a). Detoxification reactions of *Fasciola hepatica* cytosolic glutathione transferases. *Mol. Biochem. Parasitol.* **39**: 155.

**BROPHY, P.M. and J. BARRET** (1990b). Stratagies for detoxification of aldehydic products of lipid peroxidation in Helminths. *Mol. Biochem. Parasitol.* **41**: 205.

**BRUZIK, J.P. and J.A. STEITZ** (1990). Spliced leader RNA sequences can substitute for the essential 5' end of U1 during splicing in a mammalian *in vitro* system. *Cell* **62**: 889.

**BUCHMEIER, N.A. and F. HEFRON** (1990). Induction of *Salmonella* stress proteins upon infection of macrophages. *Science* **248**: 730.

**BUETLER, T.M. and D.L. EATON** (1992). Glutathione S-Transferases: amino acid sequence comparison, classification and phylogenetic relationship. *Envir. Carcino. & Ecotox. Revs.* C10: 181.

**BURGESS, D.E. and W.L. HANSON** (1980). *Trypanosoma cruzi*: the T-cell dependence of the primary immune response and the effects of depletion of T cells and Igbearing cells on immunological memory. *Cell. Immunol* **52**: 176.

BUSHARA, H.O., M.E.N. BASHIR, K.H.E. MALIK, M.M. MUKHTAR, F. TROTTEIN, A. CAPRON and M.G. TAYLOR (1993). Suppression of *Schistosoma bovis* egg production in cattle by vaccination with either glutathione *S*-transferase or keyhole limpet haemocyanin. *Parasite Immunol.* **15**: 383.

CABEZA MECKERT, P., M. HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, J.G. CHAMBO, M. LEVIN and R.P. LAGUENS (1991). *Trypanosoma cruzi*: aberrant expression of class II major histocompatibility complex molecules in skeletal muscle fibers of chronically infected mice. *Exp. Parasitol.* **72**: 8.

CAMPETELLA, O., D. SANCHEZ, J.J. CAZZULO and A.C.C. FRASCH (1992). A superfamily of *Trypanosoma cruzi* surface antigens. *Parasitol. Today* 8: 378.

CARNIERI, E.G.S., S.N.J. MORENO and R. DOCAMPO (1993). Trypanothionedependent peroxide metabolism in *Trypanosoma cruzi* different stages. *Mol. Biochem. Parasitol.* 61: 79.

CASTRO, J.A. and E.G. DIAZ DE TORANZO (1988). Toxic effects of nifurtimox and benznidazole, two drugs used against American trypanosomiasis (Chagas' disease). *Biomed. Evironm. Sci.* 1: 19.

CASTRO, V.M., M.K. KELLEY, A. ENGQVIST-GOLDSTEIN and L.M. KAUVAR (1993). Glutathione analogue sorbents selectively bind glutathione S-transferase isoenzymes. *Biochem. J.* 292: 371.

CAZZULO, J.J. and A.C.C. FRASCH (1992). SAPA/*trans*-sialidase and cruzipain: two antigens from *Trypanosoma cruzi* contain immunodominant but enzymatically inactive domains. *FASEB J.* 6: 3259.

CAZZULO, J. J. (1993). Aerobic fermentation of glucose by trypanosomatids. *FASEB J*. 6: 3153.

CECH, T.R. (1991). RNA editing: World's smallest introns? Cell 64: 667.

CHRISTMAN, M.F., F. MORGAN, F.S. JACOBSEN and B.N. AMES (1985). Positive control of a regulion for defense against oxidative stress and some heat shock proteins in *Salmonella typhimurium*. *Cell* **41**: 753.

CIOLI, D., L. PICA-MATTOCCIA and S. ARCHER (1993). Drug-resistance in Schistosomes. *Parasitol. Today* 9: 162

**COLLI, W.** (1993). Trans-sialidase: a unique enzyme activity discovered in the protozoan *Trypanosoma cruzi*. *FASEB J.* **7**: 1257.

CONNELLY, M.C., A. AYALA and F. KIERSZENBAUM (1988). Effects of alphaand beta-adrenegic agonists on *Trypanosoma cruzi* interaction with host cells. *J. Parasit.* 74: 379.

**COPPENS, I., P. BAUDHUIN, F.R. OPPERDOES and P.J. COURTOY** (1988). Receptors for the host low density lipoproteins on the hemoflagellate *Trypanosoma brucei* : Purification and involvement in the growth of the parasite. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 6753.

COPPENS, I., P. BASTIN, P.J. COURTOY, P. BAUDHUIN and F.R. OPPERDOES (1991). A rapid method purifies a glycoprotein of Mr 145,000 as the LDL receptor of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **178**: 185.

CORMIER, P., H.B. OSBORNE, J. MORALES, T. BASSEZ, R. POULHE, A. MAZABRAUD, O. MULNER-LORILLON and R. BELLÉ (1991). Molecular cloning of *Xenopus laevis* elongation factor 1γ, major M-phase promoting factor substrate. *Nucl.* Acids Res. 19: 6644

CORNETTE, J., A. CAPRON and M.A. OUAISSI (1988). Trypanosoma cruzi: fibronectin promotes uptake of epimastigote culture forms by human neutrophils and monocytes. Int. Arch. Allerg. Appli. Immunol. 86: 139.

**COSCHIGANO, P.W. and B. MAGASANIK** (1991). The URE2 gene product of *Saccharomyces cerevisiae* plays an important role in the cellular response to the nitrogen source and has homology to glutathione S-transferases. *Mol. Cell. Biol.* 11: 822.

CRAIG, E.A., J. KRAMER, J. SHILLING, M. WERNER-WASHBURNE, S. HOLMES, J. KOSIC-SMITHERS and C.M. NICOLET (1989). SSC1, an essential member of the yeast HSP70 multigene family, encodes a mitochondrial protein. Mol. Cell. Biol. 9: 3000.

CROSS, G.A.M., and G.B. TAKLE (1993). The surface *trans*-sailidase family of *Trypanosoma cruzi*. Annu. Rev. Microbiol. 47: 385.

CULBERSON, J.T. and M.H. KOLODNY (1938). Acquired immunity in rats against *Trypanosoma cruzi*. J. Parasitol. 24: 83.

CZARNECKA, E., L. EDELMAN, F. SCHOFFL and J.L. KEY (1984). Comparative analysis of physical stress responses in soybean seedlings using cloned heat shock cDNAs. *Plant Mol. Biol.* **3**: 45.

CZARNECKA, E., R.T. NAGAO, J.L. KEY and W.B. GURLEY (1988). Characterization of *Gmhsp26-A*, stress gene encoding a divergent heat shock protein of soybean: heavy-metal induced inhibition of intron processing. *Mol. Cell. Biol.* 8: 1113.

D'IMPERIO-LIMA, M.R., H. EISEN, P. MINOPRIO, M. JOSKOWICZ and A. COUTINHO (1986). Persistence of polyclonal B cell activation with undetectable parasitemia in late stages of experimental Chagas' disease. *J. Immunol.* **137**: 353.

D'IMPERIO-LIMA, M.R., M. JOSKOWICZ, A. COUTINHO, T. KIPNIS and H. EISEN (1985). Very large and isotypically atypical polyclonal plaque-forming cell responses in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Euro. J. Immunol.* 15: 201.

**DANIEL, V.** (1993). Glutathion S-transferases: gene structure and regulation of expression. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **28**: 173-207.

**DARMAN, M.** (1941). Multiplication du *Trypanosoma cruzi* dans le sang périphérique de la souris par passages successifs. Recherche de la prémunition vis-à-vis des souches homologues et hétérologues. *Ann. Parasit. (Paris)* **18**: 166.

DAVIS, L.G., M.D. DIBNER and J.F. BATTEY (1986). Basic methods in molecular biology. Elsevier, New York.

DE CARVALHO, E.F., F.T. DE CASTRO, E. RONDANELLI, C.M.A. SOARES and J.F. CARVOLHO (1990). HSP 70 gene expression in *Trypanosoma cruzi* is regulated at different levels. J. Cell. Physiol. 143: 439.

DE JONG, W.W., J.A.M. LEUNISSEN, P.J.M. LEENEN, A. ZWEERS and M. VERSTEEG (1988). Dogfish  $\alpha$ -crystallin sequences. Comparison with small heat shock proteins and *Schistosoma* egg antigen. *J. Biol. Chem.* **263**: 5141.

**DE MAIO, A. and J.A. URBINA** (1984). *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* : terminal oxidases in exponential growth phase emipastigotes cultured in vitro . Acta Cientifica Venezolana **35**: 136.

**DECKER, C.J. and B. SOLLNER-WEBB** (1991). RNA-editing involves indiscriminate U changes throughout precisely defined editing domains. *Cell* **61**: 1001.

DEGRAVE, W., S. FRAGOSO, C. BRITTO, H. van HEUVERSWYN, G.Z. KIDANE, M.A.B. CARDOSO, R.U. MUELLER, L. SIMPSON and C.M. MOREL (1988). Peculiar sequence organization of kinetoplast DNA minicircles from *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **27**: 63.

**DENAGEL, D.C. and S.K. PIERCE** (1992). A case for chaperones in antigen processing. *Immunol. Today* 13: 86.

**DEVANEY, E., A. EGAN, E. LEWIS, E.V. WARBRICK and R.M. JECOCK** (1992). The expression of small heat shock proteins in the microfilaria of *Brugia pahangi* and their possible role in development. *Mol. Biochem. Parasitol.* **56**: 209.

DIRR, H.W., K. MANN, R. HUBER, R. LADENSTEIN, R. and P. REINEMER (1991). Class  $\pi$  glutathione S-transferase from pig lung. Eur. J. Biochem. 196: 693.

**DOCAMPO**, **R** (1990). Sensitivity of parasites to free radical damage by anti-parasitic drugs. *Chem.-Biol. Interact.* **73**: 1.

**DOMINOV, J.A., L. STENZLER, S. LEE, J.J. SCHWARZ, S. LEISNER and S.H. HOWELL** (1992). Cytokinins and auxins control the expression of a gene in *Nicotiana plumbaginifolia* cells by feedback regulation. *The Plant Cell* **4**: 451.

DONELSON, J.E. and A.C. RICE-FICHE (1985). Molecular biology of Trypanosome antigenic variation. *Microbiol. Rev.* 49: 107.

**DONELSON, J.E. and W. ZENG** (1990). A comparison of trans-RNA splicing in Trypanosomes and Nematodes. *Parasitol. Today* **6**: 327.

**DOOLITTLE, R.F.** (1981). Similar amino acid sequences: chance or common ancestry? *Science* **214**: 149.

DRON, M., S.D. CLOUSE, R.A. DIXON, M. A. LAWTON and C.J. LAMB (1988). Glutathione and fungal elicitor regulation of a plant defense gene promoter in electroporated protoplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 6738.

**DUDLER, R., C. HERTIG, G. REBMANN, J. BULL and F. MAUCH** (1991). A pathogen-induced wheat gene encodes a protein homologous to glutathione S-transferases. *Molec. Plant-Microbe Interact.* **4**: 14.

**DURAND, R.** (1991). Une nouvelle classe de protéine : les molécules chaperonnes. *Médecine/Sciences* **7**: 496.

**DURIEZ-VAUCELLE, T., D. AFCHAIN and A. CAPRON** (1983). Carte enzymatique de l'extrait brut de *Trypanosoma cruzi* forme épimastigote. *Protistologica* XIX: 299.

DUSCENKO, M., I.E. IVANOV, M.A.J. FERGUSON, H. PLESKEN and G.A.M. CROSS (1988). Intracellular transport of a variant surface glycoprotein in *Trypanosoma cruzi*. J. Cell Biol. 106: 77.

EFFRON, P.N., A.F. TORRI, D.M. ENGMAN, J.E. DONELSON and P.T. ENGLUND (1993). A mitochondrial heat shock protein from *Crithidia fasciculata*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **59**: 191.

EISEN, H. and S. KAHN (1991). Mimicry in *Trypanosoma cruzi*: fantasy and reality. *Curr. Opin. Immunol.* **3**: 507.

ENGMAN, D.M., S.R. SIAS, J.D. GABE, J.E. DONELSON and E.A.

**DRAGON** (1989). Comparison of *HSP70* genes from two strains of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **37**: 285.

ENYEDI, A.J., N. YALPONI and I. SILVERMAN-RASKIN (1992). Signal molecules in systemic plant and resistance to pathogens and pests. *Cell* **70**: 879.

ETAH, E.O.A., K. SMITH and A.H. FAIRLAMB (1993). Trypanothione detoxification systems in Trypanosomatids. 27th Trypanosomiasis Seminar, London, Brit. Soc. Parasitol. Abstract. 34.

FAIRLAMB, A.H. and A. CERAMI (1992). Metabolism and function of trypanothione in the Kinetaplastida. *Annu. Rev. Microbiol.* 46: 695.

FAIRLAMB, A.H. and A. CERAMI (1985). Identification of a novel thiol containing cofactor essential for glutathione reductase enzyme activity in Trypanosomatids. *Mol. Biol. Parasitol.* 14: 187.

FEAGIN, F.E., J.M. ABRAHAM and K. STUART (1988). Extensive editing of the cytochrome oxidase III transcript in *Trypanosoma brucei*. *Cell* **53**: 413.

FISCHER, E., M.A. OUAISSI, P. VELGE, J. CORNETTE and M.D. KAZATCHKINE (1988). gp 58/68, a parasite component that contributes to the escape of the trypomastigote form of *T. cruzi* from damage by the human alternative complement pathway. *Immunology* **65**: 299.

**FITZGERALD, M. and T. SHENK** (1981). The sequence 5'-AAUAAA-3' forms part of the recognition site for polyadenylation of late SV40 mRNAs. *Cell* **24**: 251.

**FORSDYKE**, **D.R.** (1985). Heat shock proteins defend against intracellular pathogens: a non-immunological basis for self/non-self discrimination? *Theor. Biol.* **115**: 471

FRAIDENRAICH, D., C. PEÑA, E.L. ISOLA, E.M. LAMMEL, O. COSO, A. AÑEL, S. PONGOR, F. BARALLE and H.N. TORRES (1993). Stimulation of *Trypanosoma cruzi* adenylyl cyclase by an  $\alpha^{D}$ -globin fragment from *Triatoma* hindgut: Effect on differentiation of epimastigote to trypamastigote forms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 10140.

FUKUDA, R., R. YANO, T. FUKDA, T. HASE, A. ISHIHAMA and H. MATSUBARA (1985). Cloning of the *Escherichia coli* gene for the stringent starvation protein. *Mol. Gen. Genet.* 201: 151.

GABORIAUD, C. and Y. BISSERY (1987). Hydrophobic cluster analysis: an efficient new way to compare and analyse amino acid sequences. *FEBS Let.* **224**: 149.

GAESTEL, M., B. GROSS, R. BENNDORF, M. STRAUSS, W-H. SCHUNK, R. KRAFT, A. OTTO, H. BÖHM, J. STAHL, H. DRABSCH and H. BIELKA (1989). Molecular cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of the 25-kDa growth-related protein of Ehrlich ascites tumor and its homology to mammalian stress proteins. *Eur. J. Biochem.* 179: 209.

GARCIA, E.S. and A. AZAMBUJA (1991). Development and interactions of *Trypanosoma cruzi*: within the insect vector. *Parasitol. Today* 7: 240.

GLASS, D.J., R.I. POLVERE and L.H.T. VAN DER PLOEG (1986). Conserved sequences and transcription of the hsp70 gene family in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Cell. Biol.* 6: 4657.

GOAD, L.J., R.L. BERENS, J.J. MARR, D.H. BEACH and G.G. HOLZ (1989). The activity of ketoconazole and other azoles against *Trypanosoma cruzi*: biochemistry and chemotherapeutic action *in vitro*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **32**: 179.

GOLDENBERG, S., V.T. CONTRERAS, M.C. BONALDO, J.M. SALLES, M.P. LIMA-FRANCO, J. LAFAILLE, M. GONZALES-PERDOMO, J. LINSS and C.M. MOREL (1987). *In vitro* differentiating systems for the study of differential gene expression during *Trypanosoma cruzi* development. *In* " Molecular Strategies of Parasitic Invasion ". UCLA Symposium on Molecular and Cellular Biology. Agabian, H., Goodman, H., Nogueira, N, Editors. Alan R. Liss, Inc., New York. **42** N: 203.

GONZALES, A., T.J. LERNER, M. HUECAS, B. SOSA-PINEDA, N NOGEUIRA and P.M. LIZARDI (1985). Apparent generation of a segmented mRNA from two separate tandem gene families in *Trypanosoma cruzi*. *Nucl.Acids Res.* 13: 5789.

GONZALEZ, A., E. PREDIGER, M.E. HUECAC, N. NOGUEIRA and P.M. LIZARDI (1984). Minichromosomal repetitive DNA in *Trypanosoma cruzi:* its use in a high sensitivity parasite detection assay. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **81**: 3356.

GORELIK, G., A.M. GERANO, L.J. STERIN-BORDA, S. GONZALES-CAPPA and E.S. BORDA (1990). Antibodies bind and activate beta adrenergic and cholinergic lymphocyte receptors in Chagas' disease. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 55: 221.

GORLA, N.B., O.S. LEDESMA, G. BARBIERI and I.B. PARRIPA (1988). Assessment of cytogenetic damage in chagasic children treated with benznidazole. *Mutational Res.* 206: 212.

GORLA, N.B., O.S. LEDESMA, G. BARBIERI and I.B. LARRIPA (1989). Thirteenfold increase of chromosomal aberrations non-randomly distributed in chagasic children treated with nifurtimox. *Mutational Res.* 224: 263.

GRANT, I.H., J.W.M. GOLD, M. WITTNER, H.B. TANOVITZ, C. NATHAN, K. MAYER, L. REICH, N. WOLLNER, L. STEINHERZ, F. GHAVIMI, R. O'REILLY and D. ARMSTRONG (1989). Transfusion-associated acute Chagas' disease acquired in the United States. *Ann. Intrn. Med.* 111: 849.

GROVE, G., R.P. ZARLENGO, K. P., TIMMERMAN, N.Q. Li, M.F. TAM and C.P.D. TU (1988). Characterization and heterospecific expression of cDNA clones of genes in the maize GSH S-transferase multigene family. *Nucl. Acids Res.* 16: 425.

HADJUK, S.L., D.R. MOORE, J. VASUDEVACHARYA, H. SIQUEIRA, A.F. TORRI, E TYLER and J.D. ESKO (1989). Lysis of *Trypanosoma brucei* by a toxic subspecies of human high density lipoprotein. J. Biol. Chem. 264: 5210. HADJUK, S.L., M.E. HARRIS, V.W. POLLARD (1993). RNA editing in kinetoplastid mitochondria. *FASEB J.* 7: 5463.

HAKIM, F., R.T. GAZZINELLI, E. DENKERS, S. HIENY, G.M. SHEARER and A. SHER (1991). CD8<sup>+</sup> T cells from mice vaccinated against *Toxoplasma gondii* are cytotoxic for parasite-infected or antigen-pulsed host cells. *J. Immunol.* 147: 2310.

HARRIS, J.M., D.J. MEYER, B. COLES and B. KETTERER (1991). A novel glutathione transferase (13-13) isolated from the matrix of rat liver mitochondria having structural similarity to class theta enzymes. *Biochem. J.* 278: 137.

HART, D.T. and F. OPPERDOES (1984). The occurence of glycosomes in the promastigote stage of four major *Leishmania* species. *Mol. Biol. Parasitol.* **13**: 159.

HENDERSON, G.B., A.H. FAIRLAMB and A. CERAMI (1987). Trypanothione dependent peroxide metabolism in *Crithidia fasciculata* and *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biol. Parasitol.* 24: 39.

HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M., G. SAID, G. MILON, G. MARCHAL and H. EISEN (1987). L3T4<sup>+</sup> T cells able to mediate parasite-specific delayed-type hypersensibility play a role in the pathology of experimental Chagas' disease. *Eur. J. Immunol* 17: 1027.

HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M. (1993). Immunopathologie de la trypanosomiase américaine. *Bull. Inst. Pasteur* 91: 75.

HUG, M., V.B. CARRUTHERS, C. HARTMANN, D.S. SHERMAN, G.A.M. CROSS and C. CLAYTON (1993). A possible role for the 3'-untranslated region in developmental regulation in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **61**: 87.

**IIDA, K., M.B. WHITLOW and V. NUSSENZWEIG** (1989). Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* escape destruction by the terminal complement components. *J. Exp. Med.* **169**: 881.

**ISHIKAWA, T.** (1992). The ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump. *TIBS* **17**: 463.

**ISOLA, E.L., E.M. LAMMEL, V.J. KATZIN and S.M. GONZALES-CAPPA** (1981). Influence of organ extracts of *Triatoma infestans* on differentiation of *Trypanosoma cruzi. J. Parasitol.* 67: 53.

**ISOLA, E.L., E.M. LAMMEL and S.M. GONZALEZ-CAPPA** (1986). *Trypanosoma cruzi* morphogenesis: preliminary purification of an active fraction from hemolymph and intestinal homogenate of *Triatoma infestans. Exp. Parasitol.* **72**: 446.

**ISOLA, E.L.D., E.M. LAMMEL, L.A. MULLER and S.M. GONZALEZ-CAPPA** (1987). Culture medium for a continuous source of *Trypanosoma cruzi* metacyclic forms. *J. Parasitol* **73**: 441.

JAKOB, U., M. GAESTEL, K. ENGEL and J. BUCHNER (1993). Small heat shock proteins are molecular chaperones. J. Biol. Chem. 268: 1517.

JAKOBY, W.B. and W.H. HABIG (1980). Glutathione transferase. *Enzymatic basis of detoxification*. New York, Acad. Press. 63.

**JEFFERIES, D., P. TEBABI and E. PAYS** (1991). Transient activity assays of the *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein gene promoter: Control of gene expression at the posttranscriptional level. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 338.

JI, X., P. ZHANG, R.N. ARMSTRONG and G.L. GALLILAND (1992). The three-dimensional structure of a glutathione S-transferase from the mu gene class. Structural analysis of the binary complex of isoenzyme 3-3 and glutathione at 2.2-A resolution. *Biochemistry* **31**: 10169.

JOHNSON, P.J. (1993). Metronidazole and drug resistance. Parasitol. Today 9: 183.

JOINER, K.A., W.D. DA SILVA, M.T. RIMOLDI, C.H. HAMMER, A. SHER and T.L. KIPNIS (1988). Biochemical characterization of a factor produced by trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* that accelerates the decay of complement C3 convertase. *J. Biol. Chem* **263**: 11327.

**KAPLER, G.M., K. ZHANG and S.M. BEVERLY** (1987). Sequence and S1 nuclease mapping of the 5' region of the dihydrofolate reductase-thymidilate synthase gene of *Leishmania major. Nucl. Acids Res.* **15**: 3369.

KARSHIKOFF, A., P. REINEMER, R. HUBER and R. LADENSTEIN (1993). Electrostatic evidence for the activation of the glutathione thiol by Tyr7 in  $\pi$ -class glutathione transferases. *Eur. J. Biochem.* **215**: 663.

KAUFMANN, S.H.E., E. HUG and G. DE LIBERO (1986). Listeria monocytogenes-reactive T lymphocyte clones with cytolytic activity against infected targets. J. Exp. Med. 164: 363.

KAUFMANN, S.H.E. (1990). Heat shock proteins and the immune response. *Immunol. Today* 11: 129.

KELLY, J.M., H.W. WARD, M.A. MILES and G. KENDALL (1992). A shuttle vector which facilitates the expression of transfected genes in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania*. *Nucl. Acid Res.* **15**: 3963.

**KEPPLER, L.D. and A. NOVACKY** (1987). The initiation of membrane lipid peroxidation during bacteria-induced hypersensitivity reaction. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **30**: 233.

**KETTERER, B.M. and D. J., CLARK** (1988). Soluble glutathione transferase isoenzymes. *Glutathione Conjugation. Mechanisms and Biological Significance*. London, Acad. Press Limited. 73.

KIERSZENBAUM, F. and M. PIENKOWSKY (1979). Thymus-dependent control of host defense mechanisms against *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.* 24: 117.

**KIERSZENBAUM, F. and J.G. HOWARD** (1976). Mechanism of resistance against experimental *Trypanosoma cruzi* infection: the importance of antibody forming in the Biozzi high and low responder mice. *J. Immunol.* **116**: 1208.



KIHARA, M., M. NODA and N. OKAMOTO (1993). Increased risk of lung cancer in japanese smokers with class  $\mu$  glutathione *S*-transferase gene deficiency. *Cancer Letters* **71**: 151.

**KNAUF, U., H. BIELKA and M. GAESTAL** (1992). Over-expression of the small heat-shock protein, hsp25, inhibits growth of Ehrlich ascites tumor cells. *FEBS Let.* **309**: 297. **KÖBERLE, F.** (1968). Chagas' disease and Chagas' syndromes: the pathology of American Trypanosomiasis. *Advanc. Parasitol.* **6**: 63.

KOLLER, B., H. FROMM, E. GALU and M. EDELMAN (1987). Evidence for *in vivo trans* splicing of pre-mRNAs in tobacco chloroplasts. *Cell* **48**: 111.

**KRETTLI, A.U. and Z. BRENER** (1976). Protective effects of specific antibodies in *Trypanosoma cruzi* infections. J. Immunol. 116: 755.

**KRETTLI, A.U. and Z. BRENER** (1982). Resistance against *Trypanosoma cruzi* associated to anti-living trypomastigote antibodies. *J. Immunol.* **128**: 2009.

KUMAR, S., L.H. MILLER, I.A. QUAKYI, D.B. KREISTER, R.A. HOUGHTEN, W.L. MALOY, B. MOSS, J.A. BERZOFSKY and M.F. GOOD (1988). Cytotoxic T cells specific for the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum*. *Nature* 334: 258.

LA ROCHE, S.D. and T. LEISINGER (1990). Sequence analysis and expression of the bacterial dichloromethane dahalogenase strucural gene, a member of the glutathione S-transferase supergene family. J. Bacteriol. 172: 164.

LANAR, D.E., L.S. LEVY and J.E. MANNING (1981). Complexity and content of the DNA and RNA in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biol. Parasitol.* **3**: 327.

LANDRY, J., P. CHRÉTIEN, H. LAMBERT, E. HICKEY and L.A. WEBER (1989). Heat shock resistance conferred by expression orf the human HSP27 gene in rodent cells. J. Cell Biol. 109: 7

LAYDEN, R.E and H. EISEN (1988). Alternate *trans* splicing in *Trypanosoma* equiperdum: Implications for splice site selection. *Mol. Cell. Biol.* 8: 1352.

LAZAR, G., H. ZHANG and M. GOODMAN (1993). The origine of the bifunctional dihydrofolate reductase-thymidilate synthase isogens of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **3**: 657.

LEE, M.G.S., B.L. ATKINSON, S.H. GIANNINNI and L.H.T. VAN DER PLOEG (1988). Structure and expression of the hsp 70 gene family of *Leishmania major*. *Nucl. Acids Res.* 16: 9567.

LEE, M.G.S., R.I. POLVERE and L.H.T. VAN DER PLOEG (1990). Evidence for segmental gene conversion between a cognate *hsp* 70 gene and the temperature-sensitively *hsp* 70 genes of *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **41**: 213.

LEE, M.G.S. and L.H.T. VAN DER PLOEG (1990a). Transcription of the heat shock 70 locus in *Trypanosoma brucei*. Mol. Biochem. Parasitol. 41: 221.

LEMESRE, J.L., D. AFCHAIN, O. OROZCO, M. LOYENS, F.S. BRENIERE, P. DESJEUX, Y. CARLIER, U. MARTIN, A. NOGUEIRA-QUEIROZ, D. LE RAY and A. CAPRON (1986). Specific and sensitive immunological diganosis of Chagas' disease by competitive antibody enzyme immunoassay using a *Trypanosoma cruzi*-specific monoclonal antibody. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **35**: 86.

LEVIN, M.J. (1991). Molecular mimicry and Chagas' heart disease: high anti-R13 autoantibody levels are markers of severe Chagas heart complaint. *Res. Immunol.* 142: 157.

LEY, V., N.W. ANDREWS, E.S. ROBBINS and V. NUSSENZWEIG (1988). Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* sustain an infection cycle in mammalian cells. *J. Exp. Med.* **168**: 649.

LINDQUIST, S. (1986). The heat-shock response. Ann. Rev. Biochem. 55: 1151.

LIU, S., P. ZHANG, X. JI, W.W. JOHNSON, G.L. GILLILAND and R.N. ARMSTRONG (1992). Contribution of tyrosine 6 to the catalytic mechanism of isoenzyme 3-3 of glutathione *S*-transferase. *J. Biol. Chem.* **267**: 4296.

LOPEZ, A.F., M.M. BUNN-MORENO and C.J. SANDERSON (1978). The lysis of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes by eosinophils and neutrophils. *Int. J. Parasitol.* 8: 485.

MACFARLANE, J.B., M. L. BISHOP, R. P. MILES and M. A. KELLY (1990). Identification and characterization of a *Leishmania donovani* antigen belonging to the 70-kDa heat-shock protein family. *Eur. j. Biochem.* **190**: 377.

MADEIRA, E.D., A.F.B. ANDRADE, M.M. BRUNN-MORENO and M. BARCINSKI (1979). Antibody-dependent cellular cytotoxicity of *Trypanosoma cruzi*: characterization of the effector cell from normal human blood. *Infect. Immun.* 25: 34.

**MAESSEN, G.D.F., R. AMONS, J.P. ZEELEN and W. MOLLER.** (1987). Primary structure of elongation factor 1γ from *Artemia. FEBS Lett.* **223**: 181.

MALUMDER, S., J.J. WIRTH, A.J. BITONI, P.P. McCANN and F. KIERSZENBAUM (1992). Biochemical evidence for the presence of arginine decarboxylase activity in *Trypanosoma cruzi*. J. Parasitol. **78**: 371.

MANDALESHWAR, K.S and J. YU (1984). Accumulation of a heat shock-like protein during differentiation of human erythroid cell line K562. *Nature* **309**: 631.

MANIATIS, T. and R. REED (1987). The role of small nuclear ribonucleoprotein particles in pre-mRNA splicing. *Nature* **325**: 673.

MANNERVIK, B. (1985b). The isoenzymes of glutathione transferase. Adv. Enzymol. 57: 357.

MANNERVIK, B., P. ALIN, C. GUTHENBERG, H. JENSSON, M.K. TAHIR, M. WARHOLM and H. JORNVALL (1985a). Identification of three classes of cytoslic glutathione transferases common to several mammalian species: correlation between structural data and enzymatic properties. *Proc. Natl. Sci. USA.* **82**: 7202.

MARCKWELL, M.A.H., S.M. HAAS, L.L. BIEBER and N.E. TOLBERT (1978). A modification of the Lowry proceedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal. Biochem.* 87: 206.

MARTELLI, C.M.T., A.L.S.S. ANDRADE S.A. SILVA, and F. ZICKER (1992). Risk factors for *Trypanosoma cruzi* infection among blood donors in Central Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 97: 339.

MARTINEZ, J., O. CAMPETELLA, A.C.C. FRASCH and J.J. CAZZULO (1993). The reactivity of sera from chagasic patients against different fragments of cruzipain, the major cystein proteinase from *Trypanosoma cruzi*, suggests the presence of defined antigenic and catalytic domains. *Immunol. Let.* **35**: 191.

MARTINOIA, E., E. GRILL, R. TOMMASINI, K. KREUZ and N. AMRHEIN (1993). ATP-dependent glutathione *S*-conjugate 'export' pump in the vacuolar membrane of plants. *Nature* **364**: 247.

MASAI, E., Y. KATAYAMA, S. KUBOTA, S. KAWAI, M. YAMASAKI and N. MOROHOSHI (1993). A bacterial enzyme degrading the model lignin compound  $\beta$ -etherase is a member of the glutathione-*S*-transferase superfamily. *FEBS J.* **323**: 125.

MATTEI, D., A. SCHERF, O. BENSAUDE and I. PEIREIRA DA SILVA (1989). A heat shock-like protein from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* induces autoantibodies. *Eur. J. Immunol.* 19: 1823.

MAYRAND, S. and T. PEDERSON (1983). Heat shock alters nuclear ribonucleoprotein assembly in *Drosophila* cells. *Mol. Cell. Biol.* **3**: 161.

MAZIER, D. and D. MATTEI (1991). Parasite heat-shock proteins and host responses: the balance between protection and immunopathology. *Springer Semin. Immunopathol.* 13: 37.

McCABE, R., S.G. MEAGHER and B.T. MULLINS (1991). Endogenous interferon- $\gamma$  macrophage activation and murine host defense against acute infection with *Trypanosoma cruzi*. J. Infect. Disease 163: 912.

McCARTHY-BURKE, C., Z.A. TAYLOR and A.G. BUCK (1989). Characterization of the spliced leader genes and transcripts in *Trypanosoma cruzi*. *Gene* 82: 177.

MEDINA-ACOSTA, E. and G.A.M. CROSS (1993). Rapid isolation of DNA from trypanosomatid protozoa using a simple "mini-prep" procedure. *Mol. Biochem. Parasitol.* **59**: 327.

**MEYER, D.J.** (1993). Significance of an unusually low  $K_m$  for glutathione in glutathione transferases of the  $\alpha$ ,  $\mu$  et  $\pi$  classes. *Xenbiotica* **23**: 823.

MEYER, D.J., B. COLES, S.E. PEMBLE, K.S. GLIMORE, G.M. FRASER and B. KETTERER (1991). Theta, a new class of glutathione transferases purified from rat and from man. *Biochem. J* 274: 409.

**MEYER Jr, R.C., P.B. GOLDGROUGH and W.R. WOODSON** (1991). An ethylen-responsive flower senescence-related gene from carnation encodes a protein homologous to glutathione S-transferases. *Plant Mol. Biol.* **17**: 277.

MICHAELI, S., A. GOLDRING and A. AGABIAN (1993). Identification of mRNAbinding proteins of the lower trypanosomatid *Leptosomas collosoma*. *Exp. Parasitol.* **76**: 308.

MIGNOGNA, G., N. ALLOCATI, A. ACETO, R. PICCOLOMINI, C. DI ILIO, D. BARRA and F. MARTINI (1993). The amino acid sequence of glutathione transferase from *Proteus mirabilis*, a new prototype of a new class of enzymes. *Eur. J. Biochem.* 211: 421.

MILEI, J., B. MAUTNER, R. STORINO, J.A. SANCHEZ and V.G. FERRANS (1992). Does Chagas' disease does exist as an undiagnosed form of cardiomyopathy in the United States? *Am. Heart J.* **123**: 1732.

MINOPRIO, P., P. BURLENO, P. PEREIRA, B. GUILBERT, L. ANDRADE, M. HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ and A. COUTINHO (1998). Most B cells in acute *Trypanosoma cruzi* infection lack parasite specificity. *Scand. J. Immunol.* 28:553.

MINOPRIO, P., A. COUTINHO, M. JOSKOWICZ, M.R. D'IMPERIO LIMA and H. EISEN (1986). Polyclonal lymphocyte response to *T. cruzi* infection.-II. Cytotoxic T lymphocytes. *Scand. J. Immunol* 24: 669.

MIOZZARI, G.F. and C. YANOVSKY (1979). Gene fusion during the evolution of the tryptophan operon in *Enterobacteriaceae*. *Nature* 277: 486.

MIRON, T., K. VANCOMPERNOLLE, J. VANDEKERCKHOVE, M. WILCHEK, and B. GEIGER (1991). A 25-kD inhibitor of actin polymerization is a low molecular mass heat shock protein. J. Cell. Biol. 114: 255.

**MOLINA, H.A. and F. KIERSZENBAUM** (1989a). Eosinophil activation in acute and chronic chagasic myocardial lesions and deposition of toxic eosinophil granule proteins on heart myofibers. *J. Parasitol.* **75**: 129.

MOLINA, H.A. and F. KIERSZENBAUM (1989b). Interaction of human eosinophils or neutrophils with *Trypanosoma cruzi in vitro* causes bystander cardiac cell damage. *Immunology* **66**: 289.

MOLINA, H.A., F. KIERSZNBAUM, K.J. HAMMAN and G.J. GLEICH (1988). Toxic effects produced or mediated by human eosinophil granule components on *Trypanosoma cruzi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **38**: 327.

MONAHARAN, T.H., A.M. GULICK, P. REINEMER, H.W. DIRR, R. HUBER and W.E. FAHL (1992a). Mutational substitution of residues implicated by crystal structure in binding the substrate glutathione to human glutathione S-transferase pi. J. Mol. Biol. 226: 319.

MONAHARAN, T.H., A.M. GULICK, R.B. PUCHALSKI, A.L. SERVAIS and W.E. FAHL (1992b). Structural studies on human glutathione S-transferase  $\pi$ . J. Biol. Chem. 267: 18940.

MONCADA, C., Y. REPETTO, J. ALDUNATE, M.E. LETELIER and A. MORELLP (1989). Role of glutathione in the susceptibility of *Trypanosoma cruzi* to drugs. *Comp. Biochem. Physiol.* 94 C: 87.

MORANGE, M. and O. BENSAUDE (1991). Protéines de stress et immunité. Annales Inst. Past. Act. 2: 51.

MORGENSTERN, R., J. MEIJER, J.W. DePIERRE and L. ERNSTER (1980). Characterization of rat-liver microsomal glutathione S-transferase activity. Eur. J. Biochem. 104: 167.

**MORGENSTERN, R. and J.W. DePIERRE** (1983). Microsomal glutathione transferase, purification in unactivated form and further characterization of the activation process, substrate specificity and the amino acid composition. *Eur J. Biochem.* **134**: 591.

MORGENSTERN, R., G. LUNDQVIST, G. ANDERSSON, L. BALK and J.W. DePIERRE (1984). The distribution of microsomal glutathione transferase among different organelles, different organs, and different organisms. *Biochem. Pharmacol.* 33: 3609.

MORGENSTERN, R., J.W. DePIERRE and H. JÖRNVALL (1985). Microsomal glutathione transferase. J. Biol. Chem. 260: 13976.

MORGENSTERN, R. and J.W. DePIERRE (1988). Membrane-bound glutathion transferases. *Glutathion Conjugation. Mechanisms and Biological Significance*. London, Academic Press Limited. 156.

MORIMURA, S., T. SUZUKI, S.I. HOCHI, A. YUKI, K. NOMURA, T. KITAGAWA, I. NAGATSU, M. IMAGAWA and M. MURAMATSU (1993). *Trans*-activation of glutathione transferase P gene during chemical hepatocarcinigenesis of the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 2065.

MOSER, D.R., L.V. KIRCHOFF and J.E. DONELSON (1989). Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. J. Clin. *Microbiol.* 27: 1477.

MOSIALOU, E., G. EKSTROM, A.E.P. ADANG and R. MORGENSTERN (1993). Evidence that rat liver microsomal glutathione transferase is responsible for glutathione-dependent protection against lipid peroxidation. *Biochem. Pharmacol.* **45**: 1645.

MUHICH, M.L. and J.C. BOOTHROYD (1988). Polycistronic transcripts in trypanosomes and their accumulation during heat shock: Evidence for a precursor role in mRNA syntesis. *Mol. Cell. Biol.* 8: 3837.

MUHICH, M.L. and J.C. BOOTHROYD (1989). Synthesis of trypanosome hsp70 mRNA is resistant to resistance of *trans*-splicing by heat. J. Biol. Chem. **264**: 7107.

MURPHY, W.J., K.P. WATKINS and N. AGABIAN (1986). Identification of a novel Y branch structure as an intermediate in Trypanosome mRNA processing: evidence of *trans*-splicing. *Cell* **47**: 517.

NAGEL, R. (1987). Genotoxicity studies with two antichagasic drugs. Mut. Res. 191: 17.

NAPIER, R.M. and M.A.VENIS (1991). From auxin-binding protein to plant hormone receptor? *TIBS* 16: 72.

NICKELL, S.P., A. GREBEMICHAEL, R. HOFF and M.H. BOYER (1987). Isolation and functional characterization of murine T cell lines and clones specific for the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. J. Immunol. **138**: 914.

NICKERSON, P., P. ORR, M.L. SCHROEDER, L. SEKLE and J.B. JOHNSON (1989). Transfusion-associated *Trypanosoma cruzi* infection in a non-endemic area. *Ann. Intern. Med.* 111: 851.

NILSEN, T.W. (1993). Trans-splicing of nematode premessenger RNA. Ann. Rev. Microbiol. 47: 413.

NOGUEIRA, N. (1981). *Tyrpanosoma cruzi* surface antigens of blood and culture forms. J. *Exp. Med* **153**: 629.

NORRIS, K., B. BRADT, N.R. COOPER and M. SO (1991). Characterization of a *Trypanosoma cruzi* C3 binding protein with functional and genetic similarities to the human complement regulatory protein, decay-acceleration factor. *J. Immunol.* **147**: 2040.

NUSSENZWEIG, V., R. SONNTAG, A. BIANCOLANA, J.L.P. FREITAS, V. AMATO NETO and J. KLOETZEL (1953). Agao de corentes tri-fenilmeanicos sobre *trypanosoma cruzi in vitro*. Emprego de violeta de gentiana na profilascia de transmisscio de molestia de chagas per transfusao de sangue. *D. Hospitol.* **44**: 731.

**OESTERREICH, S., C.N. WENG, M. QIU, S.G. HILSENBECK, C.K. OSBORNE and S.A.W. FUQUA** (1993). The small heat shock protein hsp27 is correlated with growth and drug resistance in human breast cancer cell lines. *Cancer Res.* 53: 4443.

**OOI, S.G., R. BOLTON and J.T. AHOKAS** (1993). Selective elution of subunit 4containing rat liver glutathione S-transferases using affinity chromatography. *Biochem. Mol. Biol. Internat.* **29**: 875.

**OPPERDOES, F.R.** (1984). Localization of the initial steps in alkoxyphospholipid biosynthesis in glycosomes (microbodies) of *Trypanosoma brucei*. *FEBS Let.* **169**: 35.

**OPPERDOES, F.R.** (1987). Compartmentation of carbohydrate metabolism in trypanosomes. *Ann. Rev. Microbiol.* **41**: 127.

**OPPERDOES, F.R. and P.A.M. MICHELS** (1993). The glycosomes of the Kinetoplastida. *Biochemie* **75**: 231.

**OPPERDOES, F.R., P. BORST and K. FONK** (1976). The potential use of inhibitors of glycerol-3-phosphate oxidase for chemotherapy of African trypanosomiasis. *Febs. Lett* **62**: 169.

**ORTEGA-BARRIA**, E. and M.E.A. PEREIRA (1991). A novel *T. cruzi* heparinbinding protein promotes fibroblast adhesion and penetration of engineered bacteria and trypanosomes into mammalian cells. *Cell* 67: 411.

**ORTIZ-ORTIZ, L., D. ELLIOT PARKS, M. RODRIGUEZ and W.O. WEIGLE** (1980). Polyclonal B lymphocyte activation during *T. cruzi* infection. *J. Immunol.* **124**: 121.

OUAISSI, M.A., J. CORNETTE, P. VELGE and A. CAPRON (1988). Identification of anti-acetylcholinesterase and anti-idiotype antibodies in human and experimental Chagas's disease: pathological implications. *Eur. J. Immunol.* **18**: 1889.

**OUAISSI, M.A.** (1988). Role of the RGD sequence in parasite adhesion to host cells. *Parasitol. Today* **4**: 169.

**OUAISSI, M.A., J. CORNETTE and A. CAPRON** (1986). Identification and isolation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote cell surface protein with properties expected of a fibronectin receptor. *Mol. Biochem. Parasitol.* **19**: 201.

OUAISSI, M.A., J. CORNETTE, R. SCHÖNECK, B. PLUMAS-MARTY, A. TAIBI, M. LOYENS and A. CAPRON (1992). Fibronectin cleavage fragments provide a growth factor-like activity for the differenciation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes to amastigotes. *Eur. J. Cell Biol.* **59**: 68.

**OUELLETTE, M. and B. PAPADOPOULOU** (1993). Mechanisms of drug resistance in *Leishmania. Parasitol. Today* **9**: 150.

PALFI, Z., A. GÜNZL, M. CROSS and A. BINDEREIF (1991). Affinity purification of *Trypanosoma brucei* small nuclear ribonucleoproteins reveals common and specific protein components. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 9097.

**PAN, S.C.** (1978). *Trypanosoma cruzi*: intracellular stages grown in cell-free medium at 37°C. *Exp. Parasitol.* **45**: 215.

PARODI, A.J. (1993). N-glycosylation in trypanosomatid protozoa. Glycobiology 3: 193.

PAULI, D., C.H. TONKA, A. TISSIERES and A.P. ARRIGO (1990). Tissuespecifique expression of the heat shock protein hsp27 during *Drosophila melanogaster* developement. J. Cell. Biol. 111: 817.

PAYS, E., H. COQUELET, P. TEBABI, A. PAYS, D. JEFFERIES, M. STEINERT, E. KOENIG, R.O. WILLIAMS and I. RODITI (1990). *Trypanosoma brucei*:Constitutive activity of the VSG and procyclin gene promoters. *EMBO J.* 9: 3145.

PEARL, L.H. and W.R. TAYLOR (1987). A structural model for the secretory proteases. *Nature* **329**: 351.

**PEARSON, T.W., R.S. HEWETT, G.E. ROELANTS, D.A. STAGG and T.T. DOLAN** (1992). Studies on the induction and specificity of cytotoxicity of *Theileria*transformed cell lines. *J. Immunol.* **128**: 2509.

**PELLE, R. and N.B. MURPHY** (1993). Stage-specific differential polyadenylation of mini-exon derived RNA in African trypanosomes. *Mol. biochem. Parasitol.* **59**: 277.

**PEMBLE, S.E. and J.B. TAYLOR** (1992). An evolutionary perspective on glutathione transferases inferred from class-Theta glutahione transferase cDNA sequence. *Biochem. J.* **287**: 957.

**PEREIRA**, M.E.A. (1983). A developmentally regulated neuraminidase activity in *Trypanosoma cruzi*. Science **219**: 1444.

PERRAUT, R., A.R. LUSSOW, S. GAVOILLE, O. GARRAUD, H. MATILE, C. TOUGNE, J. VAN EMBDEN, R. VAN DER ZEE, P.H. LANBERT, J. GYSIN and G. DEL GUIDICE (1993). Successful primate immunization with peptides conjugated to purified protein derivative or mycobacterial heat shock proteins in the absence of adjuvants. *Clin. Exp. Immunol.* **93**: 382.

**PETRY, K. and H. EISEN** (1989). Chagas' disease: a model for the study of autoimmune disease. *Parasitol. Today.* **5**: 111.

**PETRY, K., E. NUDELMAN, H. EISEN and S. HAKIMORI** (1988). Sulfated lipids represent common antigens on the surface of *Trypanosoma cruzi* and mammalians tissues. *Mol. Biochem. Parasitol.* **30**: 113.

**PIRAS, M.M., R. PIRAS and D. HENRIQUEZ** (1982). Changes in morphology and infectivity of cell culture derived trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **6**: 67.

PIZZI, T. P., M. D. RUBIO, R. PRAGER, and R. C. SILVA (1952). Accion de la cortisona en la infección experimental por *Trypanosoma cruzi*. *Biol Chil. Parasitol*. 7: 22.

PLATA, F., F. GARCIA-PONS and J. WIETZERBIN (1987). Immune resistance to *Trypanosoma cruzi*: synergy of specific antibodies and recombinant interferon gamma *in vivo*. *Ann. Inst. Pasteur/Immunol.* **138**: 397.

PLUMAS-MARTY, B., C. VERWAERDE, M. LOYENS, P. VELGE, A. TAIBI, M.F. CESBRON, A. CAPRON and M.A. OUAISSI (1992). *Trypanosoma cruzi* glutathione-binding proteins : immunogenicity during human and experimental Chagas' disease. *Parasitology* **104**: 87.

**POLLA, B.S.** (1991). Heat-shock proteins in host-parasite interactions. *Immunoparasitology Today*. Cambridge, Elsevier Trends Journals. 38.

**PREVIATO, J.O., M.C.V. PESSOLANI and L. MENDONÇA-PREVIATO** (1985). Incorporation of sialic acid into *Trypanosoma cruzi* macromolecules. A proposal for a new metabolic route. *Mol. Biochem. Parasitol.* 16: 85.

**PROUDFOOT, N.J. and G.G. BROWNLEE** (1976). 3'non-coding region sequences in eukaryotic messenger RNA. *Nature* 263: 211.

**RAJKOVIC, A., R.E. DAVIS, J.N. SIMONSEN and F.M. ROTTMAN** (1990). A spliced leader is present on a subset of mRNAs from the human parasite *Schistosoma mansoni*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 8879.

RAMIREZ, M.I., R. DE CASSIA RUIZ, J.E. ARAYA, J. F. DA SILVEIRA and N. YOSHIDA (1993). Involvement of the stage-specific 82-kilodalton adhesion molecule of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes in host cell invasion. *Infec. Immun.* **61**: 3636.

RANGEL-ALDAO, R., O. ALLENDE, F. TRIANA, R. PIRAS, D. HENRIQUEZ and M. PIRAS. (1987). Possible role of cAMP in the differentiation of *Trypanosoma cruzi. Mol. Biochem. Parasitol.* 22: 39.

**READY, P.D. and M.A. MILES** (1979). Delimitation of *Trypanosoma cruzi* zymodemes by numerical taxonomy. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **74**: 238.

**REED, S.G.** (1980). Adoptive transfert of resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection with T-lymphocyte-enriched speen cells. *Inf. & Immun.* **28**: 404.

**REED, S.G., J.A. INVERSO and S.B. ROTERS** (1984a). Supressed antibody responses to sheep erythrocytes in mice with chronic *Trypansoma cruzi* infections are restored with interleukin 2. *J. Immunol.* **133**: 3333.

**REED, S.G., J.A. INVERSO and S.B. ROTERS** (1984b). Heterologous antibody responses in mice with chronic *T. cruzi* infection: depressed T helper function restored with supernatants containing interleukin 2. *J. Immunol.* **133**: 1558.

**REED, S.G.** (1988). In vivo administration of recombinant IFN $\gamma$  induces macrophage activation and prevents acute disease, immune suppression and death in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *J. Immunol.* 140: 4342.

**REEH, S., S. PEDERSEN and D. FRIESEN** (1976). Biosynthetic regulation of individuel proteins in relA<sup>+</sup> and relA strains of *Escherichia coli* during amino acid starvation. *Molec. Gen. Genet.* **149**: 279.

**REINEMER, P., H.W. DIRR, J. LADENSTEIN, J. SCHÄFFER, O. GALLAY** and **R. HUBER** (1991). The three-dimensional structure of class pi glutathione S-transferase in complex with glutathione sulfonate at 2.3 A resolution. *EMBO J.* 10: 1997.

**REINEMER, P., H.W. DIRR, R. LADENSTEIN, R. HUBER, M. LO BELLO, G. FEDERICI and M.W. PARKER** (1992). Three-dimensional structure of class pi glutahione S-transferase from human placenta in complex with S-hexylglutathione at 2.8 A resolution. *J. Mol. Biol.* 227: 214.

**REQUENA, J.M., A. JIMENEZ-RUIZ, M. SOTO, R. ASSIEGO, J.F. SANTARÉN, M.C. LOPEZ, M.E. PATARROYO and C. ALONSO** (1992). Regulation of hsp70 expression in *Trypanosoma cruzi* by temperature and growth phase. *Mol. Biochem. Parasitol.* 53: 201. REQUENA, J.M., M.C. LOPEZ, A. JIMENEZ-RUIZ, J.C. DE LA TORRE and C. ALONSO (1988). A head-to-tail-tandem organization of hsp70 genes in *Trypanosoma* cruzi. Nucleic. Acids. Res 16: 1393.

**ROBERSON, E.L., W.L. HANSIN and W.L. CHAPMAN** (1973). *Trypanosoma cruzi* : effects of antithymocyte serum in mice and neonatal thymectomy in rats. *Exp. Parasitol* **34**: 168.

RODRIGUEZ, A.M., F. SANTORO, D. AFCHAIN, H. BAZIN and A. CAPRON (1981). *Trypanosoma cruzi* infection in B cell deficient rats. *Infec. Immun.* 524.

**RONDANELLI, E.G. and M. SCAPLIA** (1993), edt. Atlas of human Protozoa. Atlante dei protozoi umani. Masson s.p.a., Milano.

**ROTTENBERG, M., R.L. CARDONI, R. ANDERSSON, E.L. SEGURA and A. ÖRN** (1988). Role of T helper/inducer cells as well as natural killer cells in resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. *Scand. J. Immunol.* **28**: 573.

RUIZ, A., M. ESTEVA, P. CABEZA-MECKERT, R.P. LAGUENS and E. SEGURA (1985). Protective immunity and pathology induced by inoculation with different subcellular fractions of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica*. **42**: 299.

SAID, G., M. JOSKOWICZ, A.A. BARREIRA and H. EISEN (1985). Neuropathy associated with experimental Chagas'disease. *Ann. Neurol.* 18: 676.

SAMBROOK, Y., E.F. FRITSH and T. MANIATIS (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Habour.

SANDERSON, C.J., M.M. BUNN MORENO and A.F. LOPEZ (1978). Antibody dependent cell mediated cytotoxicity of *Trypanosoma cruzi* : the release of <sup>3</sup>H-labelled RNA, DNA and protein. *Parasitol.* **76**: 299.

SANTIAGO, A.R., D. AFCHAIN and A. CAPRON (1981). Specific antigens of *T. cruzi* amastigotes and trypomastigotes. *Ann. Soc. Belge Med. Trop.* **61**: 369.

SCHAUER, R., G. REUTER, H. MÜHLPFORDT, A.F.B. ANDRADE and M.E.A. PEREIRA (1983). The occurrence of *N*-acetyl-and *N*-glycoloylneuraminic acid in *Trypanosoma cruzi*. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **364**: 1053.

SCHELL, D., R. EVERS, D. PREIS, K. ZIEGELBAUER, H. KIEFER, F. LOTTSPEICH, A.W.C.A. CORNELISSEN and P. OVERATH (1991). A transferrin-binding protein of *Trypanosoma brucei* is encoded by one of the genes in the variant surface glycoprotein gene expression site. *EMBO J.* **10**: 1061.

SCHENKMAN, R.P.F., F. VANDEKERCKHOVE and S. SCHENKMAN (1993). Mammalian cell sialic acid enhances invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Inf. Immun.* **61**: 898.

SCHMITZ, G. and K. THERES. (1992). Strucural and functional analysis of the Bz2 locus of *Zea mays*: characterization of overlapping transcripts. *Mol. Gen. Genet.* 233: 269.

SCHMUNIS, G.A., S.M. GONZALES CAPPA, O.C. TRAVERSA and J.F. JANOVSKY (1971). The effect of immuno-depression due to neonatal thymectomy on infections with *Trypanosoma cruzi* in mice. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 65: 89.

SCHNEIDER, A., K.P. McNALLY and N. AGABIAN (1993). Splicing and 3'processing of the tyrosine tRNA of *Trypanosoma brucei*. J. Biol. Chem. **29**: 21868.

SCHOFIELD, L., J. VILLAQUIRAN, A. FERREIRA, H. SCHELLEKENS, R. NUSSENZWEIG and V. NUSSENZWEIG (1987). Gamma interferon, CD8<sup>+</sup> T cells and antibodies required for immunity to malaria sporozoites. *Nature* **330**: 664.

SCHUSTER, B.G. and W.K. MILHOUS (1993). Reduced resources applied to antimalarial drug development. *Parasitol. Today* 9: 167.

**SCOTT, M.T.** (1981). The nature of immunity against *Trypanosoma cruzi* in mice recovered from acute infection. *Parasite Immunol.* **3**: 209.

SCOTT, M.T. and M. GOSS-SAMPSON (1984). Restricted IgG isotype profiles in *T. cruzi* infected mice and Chagas' disease patients. *Clin. exp. Immunol.* 58: 372.

SEE, Y.P. and G. YACKOWSKI (1989). Protein structure: a practical approach. Edt. Creighton.

SERIZAWA, H. and R. FUKUDA (1987). Structure of the gene for the stringent starvation protein of *Escherichia coli*. Nucl. Acids Res. 15: 1153.

SEXTON, J.L., A.R. MILNER, M. PANACCIO, J. WADDINGTON, G. WIJFFELS, D. CHANDLER, C. THOMPSON, L. WILSON, T.W. SPITHILL, G.F. MITCHELL and N.J. CAMPBELL (1990). Glutahione S-transferase. A novel vaccine against *Fascilola hepatica* infection in sheep. J. Immunol. 145: 3905.

SHAH, D.M., C.M. RIRONAKA, R.C. WIEGAND, E.I. HARDING, G.G. KRIVI and D.C. TIEMEIER, D. C. (1986). Structural analysis of a maize gene coding for glutathione-S-transferase involved in herbicid detoxification. *Plant Mol. Biol.* **6**: 203.

SHAPIRA, M., J.G. MCEWEN, and C.L. JAFFE (1988). Temperature effects on molecular processes which lead to stage differentiation in *Leishmania*. *EMBO J.* 7: 2895.

SHARP, P.A. (1987a). Splicing of messenger RNA precursors. Science 23: 766.

SHARP, P.A. (1987b). Trans-splicing: Variation on a familiar theme. Cell 50: 147.

SHERWIN, T. and K. GULL (1989). The cell division cycle of *Trypanosoma brucei* brucei: timing of event markers and cytoskeletal modulations. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* B 323: 573.

SHIM, H. and A.H. FAIRLAMB (1988). Levels of polyamines, glutathione and glutathione-spermidine conjugates during the growth of the insect trypanosomatid *Crithidia fasciculata*. J. Gen. Microbiol. 134: 807.

SILVA, L. H. P., V. NUSSENZWEIG (1953). Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* alternate virulenta para o camundogo branco. *Folia Clin. Biol.* (S. Paulo) **20:** 191.

SIMPSON, L. (1986). Kinetoplast DNA in trypanosomatid flagellates. Int. Rev. Cytol. 99: 119.

SIMPSON, L. (1990). RNA editing - a novel genetic phenomenon ? Science 250:512.

SMEJKAL, R.M., R. WOLFF and J.J.G. OLENICK (1988). Leishmania braziliensis panamensis: increased infectivity resulting from heat shock. *Exp. Parasitol.* 65: 1.

SMITH, D.B. and K.S. JOHNSON (1988). Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene.* 67: 31.

**SOLARI, A.J.** (1980). The 3-dimensional fine structure of the mitotic spindle in *Trypanosoma cruzi*. Chromosoma **78**: 239.

**SORGER, P.K. and H.R.B. PELHAM** (1987). Purification and characterization of a heat-shock element binding protein from yeast. *EMBO J.* **6**: 3035.

SOUZA, S.C., C.S. TAKAHASHI and J.S. DA SILVA (1991). Evaluation of the mutagenic potential of the antichagasic drug Rochagan in healthy and chagasic rodents. *Mutational Res.* 259: 139.

SPINELLA, S., P. LIEGEARD, B. GUILBERT and M. MONTEBEYRIE-JOSKOWICZ (1989). Anti-Ia treatment modulates specific and polyclonal antibody responses in *T. cruzi*-infected mice. *J. Autoimmun.* **2**: 791.

**STERNBERG, G., P.G. BOARD and B. MANNERVIK** (1991). Mutation of an evolutionarily conserved tyrosine residue in the active site of a human class alpha glutathione transferase. *FEBS Letters* **293**: 153.

**STURM, N.R. and L. SIMPSON** (1990). Kinetoplast DNA minicircles encode guide RNAs for editing of cytochrome oxidase subunit III mRNA. *Cell* **61**: 879.

SUTTON, R.E. and J.C. BOOTHROYD (1986). Evidence for *trans* splicing in trypanosomes. *Cell* 47: 527.

SUZUKI, Y. and J.S. REMINGTON (1988). Dual recognition of resistance against *Toxoplasma gondii* infection by Lyt2<sup>+</sup> and Lyt1<sup>+</sup> T cells. *J. Immunol.* 140: 3943.

**SYLVESTRE, I., M.J. DROILLARD, J.M. BUREAU and A. PAULIN** (1989). Effects of the ethylen rise on the peroxidation of membrane lipids during the senescence of cut carnation. *Plant Physiol. Biochem.* **27**: 407.

SZTEIN, M.B., W.R. CUNA and F. KIERSZENBAUM (1990). *Trypanosoma cruzi* inhibits the expression of CD3, CD4, CD8, and IL-2R by mitogen-activated helper and cytotoxic human lymphocytes. *J. Immunol.* 144: 3558.

TABOR, C.W. and H. TABOR (1975). Isolation, characterization, and turnover of glutathionylspermidine from *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 250: 2648.

**TAKAHASHI, Y. and T. NAGATA** (1992). Differential expression of an auxinregulated gene, parC, and a novel related gene, C-7, from tobacco mesophyll protoplasts in response to external stimili and in plant tissues. *Plant Cell Physiol.* **33**: 779.

TAKAHASHI, Y., and T. NAGATA (1992a). parB: an auxin-regulated gene encoding glutathione S-transferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 56.

**TAKEHARA, H.A., A. PERINI, M.H. DA SILVA and I. MOTA** (1981). *Trypanosoma cruzi*: role of different antibody classes in protection against infection in the mouse. *Exp. Parasitol.* **52**: 137.

**TAMBOURGI, D.V., T.L. KIPNIS and W.D. DA SILVA** (1989). *Trypanosoma cruzi*: antibody-dependent killing of bloodstream trypomastigotes by mouse bone marrowderived mast cells and by mastocytoma cells. *Exp. Parasitol.* **68**: 192.

TANOWITZ, H.B., P. DAVIES, S.M. FACTOR, T. MINASE, A. HERSKOWITZ and M. WITTNER (1981). *Trypanosoma cruzi*: choline acetyltransferase activity in tissues of susceptible and resistant mice infected with the Brazil strain. *Exp. Parasitol.* 51: 269.

TANOWITZ, H.B., P. DAVIES and M. WITTNER (1983). Alterations in acetycholine receptors in experimental Chagas' disease. J. Infect. Diseases 147: 460.

TANOWITZ, H.B., E.R. BURNS, A.K. SINHA, N.N. KAHN, S.A. MORRIS, S.M. FACTOR, V.B. HATCHER, J.P. BILEZIKIAN, S.G. BAUM and M. WITTNER (1990). Enhanced platelet adherence and aggregation in Chagas' disease: a potential pathogenic mechanism for cardiopathy. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **43**: 274.

**TARLETON, R.L.** (1988). *Trypanosoma cruzi*-induced suppression of IL-2 production. I. Evidence for the presence of IL-2 producing cells. *J. Immunol.* **140**: 2763.

**TARLETON, R.L.** (1990). Depletion of CD8<sup>+</sup> T cells increases susceptibility and reverses vaccine-induced immunity in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. J. Immunol. 144: 717.

TARLETON, R.L. (1991). The role of T-cell subpopulation in experimental Chagas' disease. *Res. Immunol.* 142: 130.

**TARLETON, R.L., B.H. KOLLER, A. LATOUR and M. POSTAN** (1992). Susceptibility of  $\beta_2$ -microglobulin-deficient mice to *Trypanosoma cruzi*. *Nature* **356**: 338.

TAUZ, D. and M. RENZ (1983). An optimal freeze-squeeze method for the recovery of DNA fragments from agarose gels. *Anal. Biochem.* 132: 14.

**TAYLOR, J.B., J. OLIVER, R. SHERRINGTON and S.E. PEMBLE** (1991). Structure of human glutathione S-transferase class Mu genes. *Biochem. J.* **274**: 587.

TAYLOR, J.T., K.H. FRITZEMEIER, I. HÄUSER, E. KOMBRINK, F. ROHWER, M. SCHRÖDER, G. STRITTMATTER and K. HAHLBROCK (1990). Structural homology and activation by fungal infection of a gene encoding a pathogenesis-related protein from potato. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **3**: 72.

TEIXEIRA, A.R.L., R. SILVA, E. CUNHA NETO, J.M. SANTANA and L.V. RIZZO (1990). Malignant, non-Hodgkin's lymphomas in *Trypansoma cruzi*-infected rabbits treated with nitroarene. *J. Comp. Pathol.* **103**: 37.

**TEIXEIRA, A.R.L. and C.A. SANTOS-BUCH** (1974). The immunology of experimental Chagas' disease : I. Preparation of *Trypanosoma cruzi* antigens and humoral antibody response to these antigens. *J. Immunol.* **113**: 859.

**TESSIER L.H., M. KELLER, C. HAN, R.L. FOURNIER, R. WEIL and P. IMBAULT** (1991). Short leader sequences may be transferred from small RNAs to premature mRNA by trans-splicing in *Euglena*. *EMBO J.* 10:2621.

**TIBAYERENC, M., P. WARD, A. MOYA and F. AYALA** (1986). Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease, have a complex multiclonal structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 115.

**TIPPING, E. and B. KETTERER.** (1981). The influence of soluble binding proteins on lipophile transport metabolism in hepatocytes. *Biochem. J.* **195**: 441.

TITUS, R.G., G. MILO, G. MARCHAL, P. VASSALI, J.C. CERROTINI and J.A. LOUIS (1987). Involvement of specific Lyt2<sup>+</sup> T cells in the immunological control of experimentally induced murine cutaneous leishmaniasis. *J. Immunol.* 1429.

**TOMAREV, S.I. and R.D. ZINVIEVE** (1988). Squid major lens polypeptides are homologous to glutathione S-transferases subunits. *Nature* **336**: 86.

TOMAREV, S.I., R.D. ZINOVIEVA, K. GUO and J. PIATIGORSKY (1993). Squid glutathione S-transferase. J. Biol. Chem. 268: 4534.

**TORO, G.C., N. GALANTI, U. HELLMAN and C. WERNSTEDT** (1993). Unambiguous identification of histone H1 in *Trypanosoma cruzi*. J. Cell. Biochem. **52**: 431.

TOUNG, Y.P.S., T.S. HSIEH and C.P.D. TU (1990). Drosophila glutathione S-transferase 1-1 shares a region of sequence homolgy with the maize glutathione S-transferase III. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 31.

TOUNG, Y.P.S. and C.P.D. TU (1992). Drosophila glutathione S-transferases have sequence homology to the stringent starvation protein of *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 182: 355.

**TOWBIN, M., T. STAEHELIN and J. GORDON** (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 4350.

**TRISCHMANN, T.M.** (1980). *Trypanosoma cruzi*: ability of T-cell-enriched and depleted lymphocyte populations to passively protect mice. *Exp. Parasitol.* **49**: 225.

TROTTEIN, F., C. GODIN, R.J. PIERCE, B. SELLIN, M.G. TAYLOR, I. GORILLOT, M.S. SILVA, J.P. LECOCQ and A.CAPRON (1992). Inter-species variation of schistosome 28-kDa glutathione S-transferases. *Mol. Biochem. Parasitol.* 54: 63.

**TROTTEIN, F., M.P. KIENY, C. VERWAERDE, G. TORPIER, R.J. PIERCE, J.M. BALLOUL, D. SCHMITT, J.P. LECOCQ and A. CAPRON** (1990). Molecular cloning and tissue distribution of the 26 kDa *Schistosoma mansoni* glutathione S-transferase. *Mol. Blochem. Parasitol.* **41**: 35.

TSCHUDI, C., A.S. YOUNG, L. RUBIN, C.L. PATTON and F.F. RICHARDS (1985). Calmodulin genes in trypanosomes are tandemly repeated and produce multiple mRNAs with a common 5' leader sequence. *Proc. Natl. Adac. Sci. USA* 82: 3998.

TU, C.P.D. and B. QIAN (1986). Human liver glutathione S-transferases: complete primary sequence of an HA subunit cDNA. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 141: 229.

ULLU, E., K.R. METTHEWS and C. TSCHUDI, C. (1993). Temporal order of RNA-processing reactions in trypanosomes: rapid trans splicing precedes polyadenylation of newly synthetized tubulin transcripts. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 720.

**UMEKITA, L.F. and I. MOTA** (1989). In-vitro lysis of sensitized *Trypanosoma cruzi* by platelets: role of C3b receptors. *Parasite Immunol.* **11**: 561.

**UPCROFT, J.A. and P. UPCROFT** (1993). Drug resistance in *Giardia*. *Parasitol*. *Today* **9**: 187.

**VAN DER PLOEG, L.H.T., S.H. GIANNINI and C.R. CANTOR** (1985). Heat shock genes: regulatory role for differentiation in parasitic protozoa. *Science* 1443.

VAN DER ZAAL, E.J., J. MEMELINK, A.M. MENNES, A. QUINT and K.R. LIBBENGA (1987). Auxin-induces mRNA species in tobacco cell cultures. *Plant. Mol. Biol.* 10: 145.

VAN WOORHIS, W.C. and H. EISEN (1989). F1-160: a surface antigen from *Trypanosoma cruzi* that mimics mammalian nervous tissue. J. Exp. Med. 169: 641.

WALKER, J., P. CROWLEY, A.D. MOREMAN and J. BARRETT (1993). Biochemical properties of cloned glutathione S-transferases from Schistosoma mansoni and Schistosoma japonicum. Mol. Biochem. Parasitol. 61: 255.

WALSH, C., M. BRADLEY and K. NADEAU (1991). Molecular studies on trypanothione reductase, a target for antiparasitic drugs. *TIBS* 16: 305.

WANG, R.W., D.J. NEWTON, A.R. JOHNSON, C.B. PICKETT and A.Y.H. LU (1993). Site-directed mutagenesis of glutathione S-transferase YaYa. J. Biol. Chem. 268: 23981.

WEBSTER, P., RUSSEL, D. G. (1993). The flagellar pocket of trypanosomatids. *Parasitol. Today* 9: 201.

WEISS, W.R., M. SEDAGAH, R.L. BEAUDOIN, L.H. MILLER and M.F. GOOD (1988). CD8<sup>+</sup> T cells (cytotoxic/suppressors) are required for the protection in mice immunized with malaria sporozoites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 573.

WESTON, K., J. YOCHEM and I. GREENWALD (1989). A Chaenorhabditis elegans cDNA that encodes a product resembling the rat glutathione S-transferase P subunit. Nucl. Acids Res. 17: 2138.

WIRTH, J.J., F. KIERSZENBAUM, G. SONNENFELD and A. ZLOTNIK (1985). Enhancing effects of gamma interferon on phagocytic cell association with and killing of *Trypanosoma cruzi*. *Inf. Immun.* **49**: 61.

WISTOW, G. (1993). Lens crystallins: gene recruitment and evolutionary dynamism. TR. Biochem. Sci. 18: 301.

YAWETZ, A. and M. AGOSIN (1980). Glutathione S-transferase and drug metabolism in *Trypansoma cruzi: in vivo* and *in vitro* formation of thioethers. *Comp. Biochem. Physiol.* 66C: 265.

**YAWETZ, A. and M. AGOSIN** (1981). Purification of the glutathione-S-transferase of Trypanosoma cruzi. Comp. Biochem. Physiol. **68 B**: 237.

YEYATI, P.L., S. BONNEFOY, G. MIRKIN, A. DEBRABANT, S. LAFON, A. PANEBRA, E. GONZALES-CAPPA, J.P. DEDET, M. HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ and M.J. LEVIN (1991). The 70-kDa heat-shock protein is a major antigenic determinant in human *Trypanosoma cruzi/Leishmania brasiliensis brasiliensis* mixed infection. *Immunol. Letters* **31**: 27.

**YOSHIDA, N., R.A. MARTARA, M.F. ARAGUTH, J.C. GONZALES and M. RUSSO** (1989). Metacyclic neutralizing effect of monoclonal antibody 10D8 directed to the 35/50 kilodalton surface glycoconjugates of *Trypanosoma cruzi*. *Infec. Immun.* **57**: 1663.

**YOST, H.J. and S. LINDQUIST** (1986). RNA splicing is interrupted by heat shock and is rescued by heat shock protein synthesis. *Cell* **45**: 185.

YOUNG, D.B., A. MEHLERT and D.F. SMITH (1990). Stress proteins and infection by viruses. *Stress proteins in biology and medecine*. Cold Spring Habor, Cold Spring Habor Laboratory Press. 131.

**ZINKERNAGEL, R. and P. DOHERTY** (1977). Major transplantation antigens, viruses and specificity of surveillance T cells. *Contemp. Top. Mol. Immunol.* **7**: 119.

# **TABLE DES MATIERES**

| ABREVIATIONS  | 11 |
|---|----|
| INTRODUCTION  | 13 |
| <u>I. Le défi des maladies parasitaires</u>             | 13 |
| <u>II. La maladie de Chagas</u>                         | 16 |
| 1. Cycle évolutif de <i>T. cruzi</i>                    | 17 |
| 2. La maladie   | 20 |
| a) La phase aiguë                                       | 20 |
| b) La phase de latence ou phase indéterminée            | 21 |
| c) La phase chronique                                   | 22 |
| (1) Forme cardiaque                                     | 22 |
| (2) Forme digestive                                     | 22 |
| d) Les moyens de diagnostic                             | 23 |
| (1) Diagnostique parasitologique                        | 23 |
| (2) Diagnostique par la technique de PCR                | 23 |
| (3) Diagnostique sérologique                            | 24 |
| e) Les traitements                                      | 24 |
| 3. La réponse immune de l'hôte vis-à-vis de l'infection |    |
| par <i>T. cruzi</i>                                     | 26 |
| a) La réponse cellulaire                                | 26 |
| b) La réponse humorale                                  | 38 |

| c) Auto-immunité et immuno-pathologie   | 39 |
|---|----|
| d) Les moyens d'échappement du parasite | 33 |

216

Page

|   | 21    |
|---|-------|
| <u>La biologie cellulaire de T. cruzi</u>   |       |
| 1. Les différents stades évolutifs  |       |
| 2. L'organisation cellulaire  |       |
| 3. L'interaction hôte-parasite  |       |
| 4. La génétique de <i>T. cruzi</i>  |       |
| a) Mécanisme de la maturation des ARNpré-messagers codés par le   | noyau |
| b) Le kinétoplaste et l'édition des ARNpré-messagers mitochondria   | JX    |
| <u>. La réponse des organismes aux facteurs de stress</u>   |       |
| 1. Les molécules chapéronnes  |       |
| 2. Le rôle régulateur des hsp dans la différenciation   |       |
| des parasites   |       |
| 2 Interaction hâte/nonosite han immunité  |       |
| 5. Interaction note/parasite - nsp - immunite   |       |
| Mécanismes de résistance et de détoxification   |       |
| 5. Interaction note/parasite - hsp - inimunite<br><u>Mécanismes de résistance et de détoxification</u><br>1. Mécanismes impliqués dans les processus de résistan  | nce   |
| 5. Interaction note/parasite - hsp - inmunite<br><u>Mécanismes de résistance et de détoxification</u><br>1. Mécanismes impliqués dans les processus de résistan<br>et de détoxification   | nce   |
| <ul> <li>S. Interaction note/parasite - hsp - infinunite</li> <li><u>Mécanismes de résistance et de détoxification</u></li> <li>1. Mécanismes impliqués dans les processus de résistante</li> <li>et de détoxification         <ul> <li>a) Mécanismes de résistance</li> </ul> </li> </ul>  | nce   |
| <ul> <li>S. Interaction note/parasite - hsp - infinunite</li> <li><u>Mécanismes de résistance et de détoxification</u></li> <li>1. Mécanismes impliqués dans les processus de résistant<br/>et de détoxification         <ul> <li>a) Mécanismes de résistance</li> <li>b) Mécanismes de détoxification</li> </ul> </li> </ul>   | nce   |
| <ul> <li>3. Interaction note/parasite - hsp - infinunite</li> <li><u>Mécanismes de résistance et de détoxification</u></li> <li>1. Mécanismes impliqués dans les processus de résistant<br/>et de détoxification <ul> <li>a) Mécanismes de résistance</li> <li>b) Mécanismes de détoxification</li> </ul> </li> <li>2. Les enzymes impliquées dans les mécanismes de</li> </ul>   | nce   |
| <ul> <li>3. Interaction note/parasite - hsp - infinunite</li> <li><u>Mécanismes de résistance et de détoxification</u></li> <li>1. Mécanismes impliqués dans les processus de résistante et de détoxification <ul> <li>a) Mécanismes de résistance</li> <li>b) Mécanismes de détoxification</li> </ul> </li> <li>2. Les enzymes impliquées dans les mécanismes de résistance et de détoxification</li> </ul>  | nce   |
| <ul> <li>3. Interaction note/parasite - hsp - infinunite</li> <li><u>Mécanismes de résistance et de détoxification</u></li> <li>1. Mécanismes impliqués dans les processus de résistant<br/>et de détoxification <ul> <li>a) Mécanismes de résistance</li> <li>b) Mécanismes de détoxification</li> </ul> </li> <li>2. Les enzymes impliquées dans les mécanismes de<br/>résistance et de détoxification <ul> <li>a) Les glutathion S-transférases ou GST</li> </ul> </li> </ul>  | nce   |
| <ul> <li>3. Interaction note/parasite - itsp - infinumite</li> <li><u>Mécanismes de résistance et de détoxification</u></li> <li>1. Mécanismes impliqués dans les processus de résistante et de détoxification <ul> <li>a) Mécanismes de résistance</li> <li>b) Mécanismes de détoxification</li> </ul> </li> <li>2. Les enzymes impliquées dans les mécanismes de résistance et de détoxification <ul> <li>a) Les glutathion S-transférases ou GST</li> <li>(1) Les GST cytosoliques</li> </ul> </li> </ul>  | nce   |
| <ul> <li>3. Interaction note/parasite - fisp - infinunite</li> <li><u>Mécanismes de résistance et de détoxification</u></li> <li>1. Mécanismes impliqués dans les processus de résistant<br/>et de détoxification <ul> <li>a) Mécanismes de résistance</li> <li>b) Mécanismes de détoxification</li> </ul> </li> <li>2. Les enzymes impliquées dans les mécanismes de<br/>résistance et de détoxification <ul> <li>a) Les glutathion S-transférases ou GST</li> <li>(1) Les GST cytosoliques</li> <li>(2) Les GST microsomales</li> </ul> </li> </ul>   | nce   |
| <ul> <li>3. Interaction note/parasite - hsp - infinunite</li> <li><u>Mécanismes de résistance et de détoxification</u></li> <li>1. Mécanismes impliqués dans les processus de résistant<br/>et de détoxification <ul> <li>a) Mécanismes de résistance</li> <li>b) Mécanismes de détoxification</li> </ul> </li> <li>2. Les enzymes impliquées dans les mécanismes de<br/>résistance et de détoxification <ul> <li>a) Les glutathion S-transférases ou GST</li> <li>(1) Les GST cytosoliques</li> <li>(2) Les GST microsomales</li> <li>(3) Les MIF</li> </ul> </li> </ul>   | nce   |
| <ul> <li>3. Interaction note/parasite - hsp - infinunite</li> <li><u>Mécanismes de résistance et de détoxification</u></li> <li>1. Mécanismes impliqués dans les processus de résistant et de détoxification <ul> <li>a) Mécanismes de résistance</li> <li>b) Mécanismes de détoxification</li> </ul> </li> <li>2. Les enzymes impliquées dans les mécanismes de résistance et de détoxification <ul> <li>a) Les glutathion S-transférases ou GST</li> <li>(1) Les GST cytosoliques</li> <li>(2) Les GST microsomales</li> <li>(3) Les MIF</li> </ul> </li> <li>b) D'autres enzymes impliquées dans la défense contre les intermédia</li> </ul>   | nce   |
| <ul> <li>3. Interaction note/parasite - hsp - infinitunite</li> <li><u>Mécanismes de résistance et de détoxification</u></li> <li>1. Mécanismes impliqués dans les processus de résistant<br/>et de détoxification <ul> <li>a) Mécanismes de résistance</li> <li>b) Mécanismes de détoxification</li> </ul> </li> <li>2. Les enzymes impliquées dans les mécanismes de<br/>résistance et de détoxification <ul> <li>a) Les glutathion S-transférases ou GST</li> <li>(1) Les GST cytosoliques</li> <li>(2) Les GST microsomales</li> <li>(3) Les MIF</li> </ul> </li> <li>b) D'autres enzymes impliquées dans la défense contre les intermédioxygène réactifs</li> </ul>  | nce   |
| <ul> <li>3. Interaction note/parasite - hsp - inintunite</li> <li>Mécanismes de résistance et de détoxification <ol> <li>Mécanismes impliqués dans les processus de résistante et de détoxification</li> <li>a) Mécanismes de résistance</li> <li>b) Mécanismes de détoxification</li> </ol> </li> <li>2. Les enzymes impliquées dans les mécanismes de résistance et de détoxification <ol> <li>Les glutathion S-transférases ou GST</li> <li>Les GST cytosoliques</li> <li>Les GST microsomales</li> <li>Les MIF</li> <li>b) D'autres enzymes impliquées dans la défense contre les intermédioxygène réactifs <ol> <li>Les superoxyde dismutases</li> </ol> </li> </ol></li></ul>   | nce   |
| <ul> <li>3. Interaction note/parasite - hsp - inintunite</li> <li><u>Mécanismes de résistance et de détoxification</u></li> <li>1. Mécanismes impliqués dans les processus de résistant et de détoxification <ul> <li>a) Mécanismes de résistance</li> <li>b) Mécanismes de détoxification</li> </ul> </li> <li>2. Les enzymes impliquées dans les mécanismes de résistance et de détoxification <ul> <li>a) Les glutathion S-transférases ou GST</li> <li>(1) Les GST cytosoliques</li> <li>(2) Les GST microsomales</li> <li>(3) Les MIF</li> </ul> </li> <li>b) D'autres enzymes impliquées dans la défense contre les interméditoxygène réactifs <ul> <li>(1) Les superoxyde dismutases</li> <li>(2) Les péroxydases</li> </ul> </li> </ul> | nce   |
|  | 218         |
|--|-------------|
| 3. Moyens de protection contre le stress oxydatif et les             |             |
| xénobiotiques chez les Kinetoplastidae                               | 78          |
| a) Enzymes protetégeant contre le stress oxydatif et l'implication   |             |
| des thiols   | 78          |
| b) Métabolisme du glutathion et du trypanothion chez les Trypanosome | s <b>78</b> |
| c) Les moyens de détoxification                                      | 83          |
|  |             |
| BUT DU TRAVAIL   | 86          |
|  | 00          |
|  |             |
| RESULTATS  | 88          |
| I. Détection de l'activité acétylcholinestérasique                   | 88          |
|  | 00          |
| II. Production et caractérisation du sérum anti-TXepi                | 90          |
|  |             |
| III. Criblage de la banque d'expression du stade épimastigote        | 2           |
| <u>avec le serum anti-IXep</u> i                                     | 93          |
| IV. Expression et caractérisation de la protéine de fusion           |             |
| Sj26GST/TcAc2  | 95          |
|  |             |
| <u>V. Caractérisation de la protéine TcAc2</u>                       | 97          |
| 1. Présence de la protéine TcAc2 dans les différents                 |             |
| stades évolutifs de T. cruzi   | 97          |
| 2. Existence de la protéine TcAc2 chez les différents                |             |
| souches de <i>T. cruzi</i> et chez d'autres espèces de               |             |
| Kinetoplastidae  | 97          |
| 3. Expression de la protéine TcAc2 chez T. cruzi                     | 101         |
| 4. Modifications post-traductionelles de la protéine                 |             |
| TcAc2  | 103         |
| 5. Détection de la protéine dans les composants                      |             |
| d'excrétion/sécrétion  | 103         |
| 6. Localisation de la protéine TcAc2                                 | 105         |
| 7. Détermination du pHI  | 105         |

| <u>VI. Analyse moléculaire de l'ADNc TcAc2 et de son produ</u>                                | <u>it</u> 108 |
|---|---------------|
| <u>VII. Cartographie génomique du gène TcAc2</u>  | 112           |
| <u>VIII. Identification du transcrit de TcAc2</u>   | 114           |
| <u>IX. Recherche d'homologies</u>   | 116           |
| <u>X. Représentation des molécules en deux dimensions</u><br><u>("HCA-plot")</u>              | 123           |
| <u>XI. Purification de la protéine TcAc2 native sur la</u><br>matrice S-hexylglutathion       | 126           |
| XII. Analyse de la réponse immune anti-TcAc2 lors de<br>l'infection expérimantale             | 131           |
| 1. Cinétique de la réponse humorale chez les souris<br>BALB/c infectée par <i>T cruzi</i>     | 131           |
| 2. Réponse humorale dans l'infection naturelle  | 131           |
| XIII. Pouvoir protecteur de la protéine de fusion Sj26GST<br>contre l'infection expérimentale | 133           |
| DISCUSSION  | 134           |
| Généralités   | 134           |
| L'activité acétylcholinestérasique  | 135           |
| Caractérisation de la protéine TcAc2  | 136           |
| Structure de l'ADNc   | 138           |
| Le transcrit TcAc2  | 140           |
| Structure et homologies de la protéine TcAc2  | 141           |
| Structure bi-dimensionnelle de la protéine TcAc2 et des protéines                             |               |
| homologues  | 145           |
| Affinité de la TcAc2 pour le glutathion   | 147           |
| Un rôle de détoxification pour la protéine TcAc2?   | 148           |
| Rôle protecteur pour la protéine TcAc2  | 151           |

|  | 220 |
|--|-----|
| CONCLUSION   | 152 |
| ANNEXE TECHNIQUE   | 153 |
| 1. Obtention des différents stades de T. cruzi.                            | 153 |
| 1.1. Souches parasitaires utilisées.                                       | 153 |
| 1.2. Obtention des parasites in vitro.                                     | 153 |
| 2. Electrophorèse des protéines  | 154 |
| 2.1. Dosage des protéines  | 154 |
| 2.2. Séparation des protéines par électrophorèse en condition native       | 154 |
| 2.3. Electrophorèse sur gel d'acrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE)     | 155 |
| 2.4. Isoélectro-focalisation   | 155 |
| 3. Détection de l'activité acétylcholinestérasique                         | 156 |
| 3.1. Préparation de l'extrait d'épimastigotes                              | 156 |
| 3.2. Détection de l'activité enzymatique acétylcholinestérasique           | 156 |
| 3.3. Production d'antigènes contenant l'activité enzymatique               |     |
| acétylcholinestérasique  | 156 |
| 4. Marquage des protéines  | 157 |
| 4.1. Marquage métabolique à la méthionine <sup>[35</sup> S]                | 157 |
| 4.2. Marquage des produits de traduction à la méthionine <sup>[35</sup> S] | 157 |
| 4.3. Marquage des parasites in vivo au $[^{32}P]O_4$                       | 158 |
| 5. Préparation des anticorps polyclonaux et analyse immuno-chimique        |     |
| des antigènes parasitaires   | 158 |
| 5.1. Préparation des anti-sérums   | 158 |
| 5.2. Test d'immuno-fluorescence indirecte                                  | 159 |
| 5.3. ELISA   | 159 |
| 5.4. Immunoprécipitation des antigènes de T. cruzi.radiomarqués            | 160 |
| 5.5. La technique de Western-blot  | 160 |
| 5.6. Infection expérimentale de souris par T. cruzi                        | 160 |
|  |     |
|  |     |
|  |     |
|  |     |
|  |     |

|  | 221  |
|--|------|
| 6. Préparation de l'ADN  | 161  |
| 6.1. Préparation de l'ADN génomique parasitaire                            | 161  |
| 6.2. Préparation de l'ADN plasmidique bactérien                            | 162  |
| 6.3. Purification des oligonucléotides                                     | 163  |
| 7. Préparation de l'ARN  | 164  |
| 7.1. Mini-préparation  | 164  |
| 7.2. Préparation à grande échelle  | 164  |
| 7.3. Purification de l'ARN poly(A)+  | 164  |
| 8. Séparation et tranfert des acides nucléiques                            | 166  |
| 8.1. Southern-blot   | 166  |
| 8.2. Northern-blot   | 166  |
| 9. Marquage et hybridation des acides nucléiques                           | 167  |
| 9.1. Marquage de l'ADNc  | 167  |
| 9.2. Marquage des oligonucléotides par le $\gamma$ -[ <sup>32</sup> P]-ATP | 169  |
| 9.3. Hybridations  | 69   |
| 10. Clonage  | 170  |
| 10.1. Séparation de l'ADN coupé par des enzymes de restriction et          | leur |
| extraction du gel  | 170  |
| 10.2. "Blunting" de l'ADN  | 171  |
| 10.3. Déphosphorylation du vecteur   | 172  |
| 10.4. Ligation   | 173  |
| 10.5. Transformation de bactéries par un plasmide                          | 173  |
| 11. Construction et criblage d'une banque d'expression du st               | ade  |
| épimastigote   | 174  |
| 11.1. Synthèse du premier brin de l'ADNc                                   | 175  |
| 11.2. Synthèse du second brin de l'ADNc                                    | 175  |
| 11.3. Production de l'ADN ayant des bouts francs (blunting)                | 176  |
| 11.4. Ligation des adaptateurs   | 176  |
| 11.5. Phosphorylation de l'ADNc  | 177  |
| 11.6. Digestion par l'endoonucléase Xho I                                  | 177  |
| 11.7. Séparation des ADNc sur colonne de Séphacryl S-400                   | 177  |
| 11.8. Ligation de l'ADNc avec le vecteur Uni-Zap                           | 178  |
| 11.9. Empaquetage de la ligation dans les protéines phagiques              | 178  |

| 11.10. Infection des bactéries E. coli PLK-F' par les phages      | 179          |
|---|--------------|
| 11.11. Amplification  | 179          |
| 11.12. Milieux de culture pour la bactériologie                   | 180          |
| 11.13. Criblage de la banque d'expression lamda-ZAP par anticorps | 180          |
| 11.14. Excision in vivo   | 181          |
| 12. Séquençage  | 182          |
| 12.1. Production de l'ADN simple-brin                             | 182          |
| 12.2. Séquençage automatique                                      | 182          |
| 13. La réaction de polymérase en chaine (PCR)                     | 185          |
| 14. Expression des protéines recombinantes                        | 186          |
| 14.1. Sous-clonage dans le vecteur d'expression pGEX 2T           | 186          |
| 14.2. Expression et purification des protéines récombinantes      | 1 <b>8 7</b> |
| 15. Purification de la protéine TcAc2 native sur colonne de       |              |
| S-hexylglutathion-agarose   | 187          |
| 16. Analyses des séquences en acides nucléiques et protéiques     | 188          |

## REFERENCES