

50376  
1996  
198

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE  
LILLE  
FLANDRES-ARTOIS

N° Ordre:

***Odile BILLAUT- MULOT***

Thèse de Doctorat  
Sciences de la vie et de la santé

**Clonage et caractérisation moléculaire des gènes codant pour le complexe d'elongation EF-1 de la synthèse protéique de *Trypanosoma cruzi*: approche fonctionnelle par la technique de transfection.**



Soutenue le 1<sup>er</sup> Octobre 1996

Président: Pr. A. DHAINAUT

Rapporteurs: Dr. H. VIAL  
Dr. J.F. DUBREMETZ

Examinateurs: Pr. A. CAPRON  
Dr. M.A. OUAISSI

*Je dédie ce travail*

*à Christophe, mon époux,  
à mes parents,  
à mes frères et soeurs et leurs conjoints,  
à ma famille et belle famille,  
à mon grand-père,  
à la mémoire d'Yvonne.*

L'ensemble de ce travail a été réalisé:

au

**Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire,  
Unités INSERM 167 et 415**

à

**l'Institut Pasteur de LILLE**

**dirigé par**

**Monsieur le Professeur A. CAPRON,**

et plus particulièrement

dans le

**Laboratoire de recherche sur les trypanosomatidés  
sous la direction scientifique du  
Docteur A. Ouaïssi.**

**A Monsieur le Professeur A. CAPRON,**

Vous m'avez accueillie avec bienveillance au sein de l'Institut Pasteur de Lille il y a 4 ans afin d'y effectuer mon DEA, puis ce travail de recherche. Veuillez accepter dans ce travail le témoignage de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

**A Monsieur le Docteur A. OUASSI,**

Vous m'avez acceptée au sein de votre équipe de recherche et vous avez suivi ce travail quotidiennement avec beaucoup de disponibilité, de gentillesse et de patience. Que ce mémoire soit le témoignage de toute ma gratitude et de mon amitié.

**A Monsieur le Professeur A. DHAINAUT,**

Vous avez accepté de présider le jury de la soutenance de cette thèse. Je vous en remercie très vivement.

**A Monsieur le Professeur H. VIAL,**

Pour l'honneur que vous me faites de juger l'ensemble de ce travail, soyez assuré de ma profonde reconnaissance.

**A Monsieur le Docteur J.F. DUBREMETZ,**

Pour avoir accepté de porter un jugement sur ce travail, je tiens à vous remercier très sincèrement.

**Je tiens également à remercier:**

Tous les membres du laboratoire de recherche sur les Trypanosomatidés Messieurs M. LOYENS, R. FERNANDEZ-GOMEZ, les docteurs R. SCHÖNECK, A. TAIBI, A. GUEVARA et B. YAHIAOUI qui m'ont conseillée et encouragée tout au long de ces années.

Messieurs les docteurs T. IDZIOREK et J.C. AMEISEN pour leur collaboration efficace.

Tous les membres du CIBP qui d'une façon ou d'une autre m'ont aidée dans la réalisation de ce travail.

# PUBLICATIONS

## Publications faisant l'objet de la thèse

**O. Billaut-Mulot**, V. Pommier, R. Schöneck, B. Plumas-Marty, A. Taibi, M. Loyens, A. Capron and M.A. Ouaissi. Nucleotide sequence of a *Trypanosoma cruzi* cDNA encoding a protein homologous to mammalian EF1 $\gamma$ . *Nucleic Acids Research*, 1993, 21,3901.

**O. Billaut-Mulot**, R. Schöneck, R. Fernandez-Gomez, A. Taibi, A. Capron, V. Pommier, B. Plumas-Marty, M. Loyens and M.A. Ouaissi. Molecular and immunological characterization of a *Trypanosoma cruzi* protein homologous to mammalian elongation factor 1  $\gamma$ . *Bio. Cell* 1994, 82, 39.

**O. Billaut-Mulot**, R. Fernandez-Gomez and A. Ouaissi. *Trypanosoma cruzi* elongation factor 1- $\alpha$  : nuclear localization in parasites undergoing apoptosis. *Gene* (in press, 1996).

**O. Billaut-Mulot**, R. Fernandez-Gomez and A. Ouaissi. Phenotype of recombinant *Trypanosoma cruzi* which over-express elongation factor 1 $\gamma$ : resistance to clomipramine by the GST-like domain (soumis, 1996).

J. C. Ameisen, **O. Billaut-Mulot**, T. Idziorek, M. Loyens, J.P. Tissier, A. Potentier and A. Ouaissi. Apoptosis in a unicellular eukaryote (*Trypanosoma cruzi*): implications for the evolutionary origin and role of programmed cell death in the control of cell proliferation, differentiation and survival. *Cell Death and Differentiation* 1995, 2, 285.

B. Plumas-Marty, R. Schöneck, **O. Billaut-Mulot**, A. Taibi and M.A. Ouaissi. Molecular cloning of a *Trypanosoma cruzi* cDNA encoding a protein homologous to mammalian EF1 $\beta$ . *Parasitology Research*. 1994, 80, 626.

## Participation à la réalisation d'autres travaux de recherche

R. Schöneck, B. Plumas-Marty, A. Taibi, **O. Billaut-Mulot**, M. Loyens, H. Gras-Masse, A. Capron and M.A. Ouaissi. *Trypanosoma cruzi* cDNA encodes a tandemly repeated domain structure characteristic of small stress proteins and glutathione S-transferases. *Biol. Cell.* 1994, 80, 1.

A. Ouaissi, J.F. Dubremetz, R. Schöneck, R. Fernandez-Gomez, R. Gomez-Corvera, **O. Billaut-Mulot**, A. Taibi, M. Loyens, A. Tartar, C. Sergheraert and J.P. Kusniez. *Trypanosoma cruzi*: A 52 kDa protein sharing sequence homology with glutathione S transferase is localized in parasite organelles morphologically resembling reservosomes. *Exp. Parasitol.* 1995, 81, 453

A. Guevara-Espinoza, A. Taibi, **O. Billaut-Mulot** and A. Ouaissi. A polymerase chain reaction-based detection of *Trypanosoma cruzi* useful for specific diagnosis of human Chagas' disease. *J. Clin. Microbiol.* 1996, 34, 485.

R. Schöneck, **O.Billaut-Mulot**, A. Ouaissi, L. Krauth-Siegel. Cloning and expression of *Trypanosoma cruzi* lipoamide dehydrogenase. *Gene* (soumis, 1996).

## Communications

**O. Billaut-Mulot** and M.A. Ouaissi. Nucleotide sequence of a *Trypanosoma cruzi* cDNA encoding a parasite protein homologous to mammalian elongation factor 1 $\gamma$ . *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, Vol. 88, Supl., November, 1993, Page 157.

R. Schöneck, **O. Billaut-Mulot** and M.A. Ouaissi. *Trypanosoma cruzi* cDNA encodes a tandemly repeated domain structure characteristic of small stress proteins. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, Vol. 88, Supl., November, 1993, Page 157.

## RESUME

Le contrôle de la synthèse des protéines et de leur phosphorylation chez les Trypanosomatides n'a fait l'objet daucun travail à notre connaissance, vraisemblablement du fait que ces organismes sont des eucaryotes et il est a priori logique de penser qu'il n'y a pas de différences majeures au niveau de la machinerie de la synthèse protéique par rapport aux cellules de l'hôte vertébré. Pour notre part, nous avons cloné et séquencé des ADNc et certains gènes codant pour l'ensemble des sous-unités du facteur d'elongation EF-1. Deux observations originales importantes découlent de ce travail.

La première concerne la sous-unité  $\gamma$ . La fonction de cette sous-unité n'est pas encore connue de façon précise. En effet, l'inactivation du gène correspondant chez la levure n'empêche pas le processus d'elongation de la synthèse protéique. Après le séquençage de l'ADNc codant pour TcEF-1 $\gamma$ , nous avons rapporté pour la première fois que cette sous-unité possède des homologies de séquence avec les GSTs. Alors que nos travaux étaient sous presse, une équipe allemande travaillant sur la structure des protéines a publié les mêmes observations (Koonin *et coll.* (1994) *Protein Sci.* 3, 2045). Il est donc vraisemblable que cette protéine puisse jouer un rôle dans d'autres processus biologiques. Afin de répondre à cette question, nous avons conduit des expériences de transfection avec une construction plasmidique permettant la surexpression de TcEF-1 $\gamma$ . Les résultats obtenus à ce jour sont extrêmement intéressants. En effet, la surexpression induit l'apparition de mutants dont le phénotype se caractérise par une résistance accrue à la clomipramine. Les résultats obtenus suggèrent que TcEF-1 $\gamma$ , par son domaine de type GST, pourrait participer au phénomène de détoxication des xénobiotiques.

La deuxième observation concerne la sous-unité  $\alpha$  du facteur EF-1. En effet, après avoir cloné et séquencé le gène codant pour EF-1 $\alpha$ , exprimé la protéine dans le système bactérien et produit des anticorps,

nous avons étudié sa localisation chez la forme épimastigote au cours de la croissance *in vitro*. La courbe de croissance des épimastigotes *in vitro* présente 2 phases, une phase logarithmique où il y a une multiplication exponentielle des parasites et une phase stationnaire où on observe une mortalité importante, en même temps qu'une fraction des épimastigotes se différencie en trypomastigotes métacycliques, formes infectantes pour l'hôte vertébré. Nous avions rapporté dans un travail récent que la mort de ces formes parasitaires en phase stationnaire présente l'ensemble des caractéristiques morphologiques et biochimiques de l'apoptose observée chez les organismes multicellulaires. Le résultat surprenant est que la distribution de la sous-unité  $\alpha$  est différente en fonction de la phase de croissance du parasite. Elle est cytoplasmique en phase logarithmique et préférentiellement nucléaire chez les formes en sénescence ou en apoptose présentes dans la phase stationnaire. Afin de confirmer la localisation nucléaire, nous avons traité les parasites avec la génétidine que l'on savait induire 100 % d'apoptose dans les formes épimastigotes. Dans ces conditions, 100 % des formes parasitaires traitées par la drogue montrent une localisation nucléaire de TcEF-1 $\alpha$ . Il faut rappeler que de nombreux travaux ont montré que EF-1 $\alpha$  pourrait jouer un rôle dans d'autres processus biologiques en plus de l'elongation de la synthèse protéique. En particulier il a été suggéré que EF-1 $\alpha$  pourrait jouer un rôle au niveau de la transcription. Par ailleurs, il a été montré que la surexpression de EF-1 $\alpha$  par transfection de la drosophile augmente leur longévité. Nous pensons que la faisabilité des transfctions chez *Trypanosoma cruzi* peut apporter des informations complémentaires sur la fonction de cette sous-unité  $\alpha$  chez le parasite en particulier et de façon générale chez les cellules eucaryotes.

# ABREVIATIONS

- AMPc: adénosine monophosphate cyclique  
 ADN: acide désoxyribonucléique  
 ADNc: ADN complémentaire  
 ADNk: ADN du kinétoplasme  
 ARN: acide ribonucléique  
 ARNr: ARN ribosomal  
 ARNm: ARN messager  
 ARNt: ARN de transfert  
 ATP: adénosine triphosphate  
 CMH: complexe majeur d'histocompatibilité  
 EF: facteur d'elongation  
 eIF: facteur d'initiation eucaryotique  
 GSTs: glutathion S-transférase  
 GSH: glutathion réduit  
 GSSG: glutathion disulfure  
 G418: génétidine  
 GDP: guanosine diphosphate  
 GTP: guanosine triphosphate  
 IL: interleukine  
 Kb: kilobase  
 KDa: kilodalton  
 mRNP: petite particule ribonucléique  
 MCP: mort cellulaire programmée  
 MPF: facteur promoteur de la phase M  
 Nt: NH<sub>2</sub>-terminale  
 PCR: réaction de polymérisation en chaîne  
 pb: paire de base  
 RF: facteur de libération  
 TcGBP: protéine de *T. cruzi* fixant le glutathion  
 S: constante de sédimentation  
 SL: spliced leader

# *INTRODUCTION*

Les maladies parasitaires posent de graves problèmes de santé publique dans de nombreuses aires tropicales et subtropicales. Elles augmentent les difficultés que connaissent les pays en voie de développement. Il n'existe pas de traitement satisfaisant contre certaines de ces parasitoses et en particulier contre la maladie de Chagas.

Plus que toute autre parasitose, la maladie de Chagas est liée au développement socio-économique: le réduve vecteur et la maladie transmise par cet insecte persisteront aussi longtemps que la médiocrité de l'habitat, l'ampleur des mouvements de population et la rapidité de l'urbanisation constitueront la norme en Amérique latine.

Les programmes de lutte doivent être axés, entre autre, sur l'élimination de l'agent vecteur de la maladie, avec une véritable politique d'amélioration de l'habitat. Cependant, le plâtrage des murs n'est pas la première priorité des habitants des zones endémiques. Par ailleurs, une méthode de diagnostic fiable et sensible doit être mise au point afin de traiter le plus rapidement possible les individus atteints, mais également, afin de limiter les contaminations par transfusion sanguine qui sont de plus en plus fréquentes en dehors des foyers naturels de transmission.

Enfin, l'élaboration d'un vaccin par l'identification de protéines à potentialités protectrices serait la voie idéale qui permettrait à l'homme de lutter contre cette infection. Cependant, cette stratégie est particulièrement difficile étant donné la complexité du cycle évolutif du parasite, avec en particulier la présence de divers stades exprimant des antigènes pouvant être différents. Par ailleurs, les parasites ont évolué en acquérant des mécanismes sophistiqués qui leur permettent d'échapper à la réponse immunitaire de l'hôte.

C'est dans ce contexte que nous avons entrepris notre recherche, avec pour objectif de mieux connaître certains aspects de la biologie cellulaire de *Trypanosoma cruzi*. Nous nous sommes intéressés à la synthèse protéique du parasite et en particulier à la phase d'elongation. En effet, une meilleure connaissance du mécanisme et du mode de contrôle de la synthèse protéique peut être important pour comprendre les processus aussi divers que la division cellulaire, la différenciation ou le vieillissement, ceci afin d'élaborer une stratégie de lutte contre le parasite en inhibant son développement, sa différenciation ou en accélérant son processus de mort.

## ***I. La maladie de Chagas***

En 1909, lors d'une campagne de lutte contre le paludisme dans la région de Lassance au Brésil, Carlos Chagas détecta dans le tube digestif d'un insecte hématophage (le triatome), un trypanosome jusqu'alors inconnu qu'il désigna *Schizotrypanum* puis *Trypanosoma cruzi* en hommage à Oswaldo Cruz. A lui seul, ce médecin détermina l'hôte vecteur, le parasite, le réservoir et les formes cliniques de la maladie parasitaire qui porte son nom (CHAGAS, 1909), la maladie de Chagas ou trypanosomiase américaine en raison de sa prévalence sur le continent sud américain.

## A. Le parasite

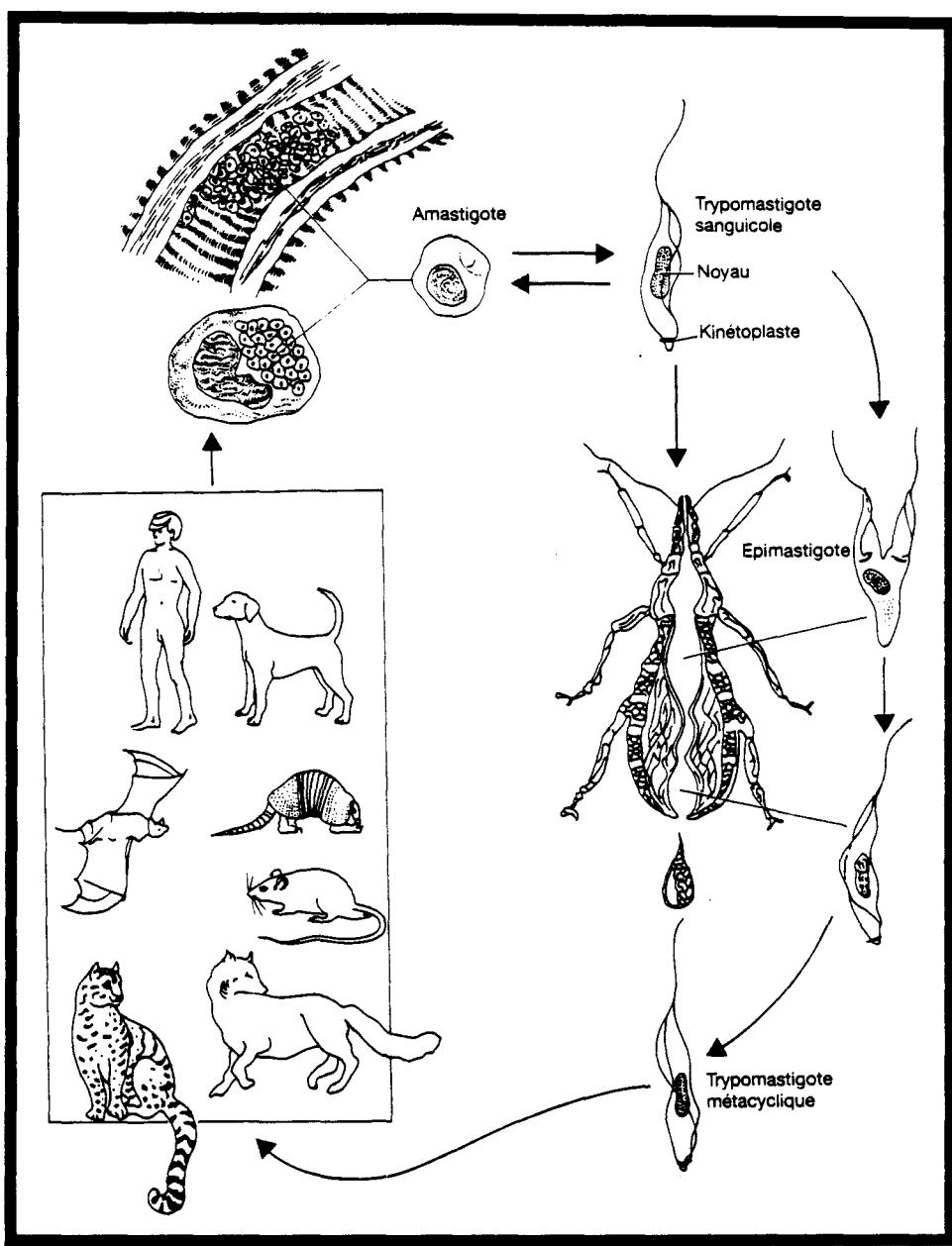
*Trypanosoma cruzi* est un protozoaire flagellé, de la famille des Trypanosomatidés, de l'ordre des Kinétoplasmidés et du sous-genre des Schizotrypanum.

### 1. Cycle évolutif

Initialement décrit par C. Chagas puis confirmé par BRUMPT en 1912, le cycle de *T. cruzi* nécessite la présence d'un insecte vecteur (le triatome) et d'un hôte vertébré définitif (l'homme ou certaines espèces animales) Fig. 1.

Lors de la piqûre d'un individu infecté, l'insecte ingère des trypomastigotes sanguicoles (ayant un corps trapu, présentant une membrane ondulante peu plissée et un kinétoplaste postérieur au noyau) qui migrent vers l'intestin moyen où ils se différencient en épimastigotes (de forme allongée avec un kinétoplaste antérieur au noyau) Fig. 2A. Les épimastigotes, non infectants pour les cellules de vertébrés, se multiplient par scissiparité puis migrent vers l'intestin postérieur où ils se différencient en trypomastigotes métacycliques infectants.

Chez les vertébrés, les trypomastigotes métacycliques issus des déjections des triatomines traversent la peau érodée par des micro-lésions provoquées par grattage au niveau de la piqûre. Ils pénètrent alors dans différents types de cellules dont les macrophages et les polynucléaires neutrophiles, puis sont véhiculés au niveau tissulaire où ils infectent des fibroblastes, des cellules musculaires et des cellules endothéliales. A l'intérieur de la cellule, les trypomastigotes se transforment en amastigotes (ayant une forme arrondie avec un flagelle rudimentaire) qui se multiplient par scissiparité (Fig. 2B). Après plusieurs cycles de



*Fig. 1: Cycle évolutif de *T. cruzi* chez l'hôte vertébré et invertébré  
(d'après A. OUASSI, Encycl. Méd. Chir. 1993)*



*Fig. 2: A, Forme épimastigote en division  
B, Forme amastigote intracellulaire  
C, Libération des trypomastigotes*

division, les amastigotes se différencient en trypomastigotes qui sont libérés dans la circulation sanguine après rupture de la cellule infectée (Fig. 2C). Ces formes, dénommées trypomastigotes sanguicoles ne sont pas capables de se multiplier, mais pourront être de nouveau prélevées par le vecteur lors d'un repas sanguin ou infecter d'autres cellules, assurant ainsi la pérennité du cycle.

## **2. Souches de *T. cruzi***

Des investigations menées sur des populations clonées de souches de *T. cruzi* ont révélé une très forte hétérogénéité qui peut influer sur les caractéristiques de chaque souche (TIBAYRENC et LE RAY, 1984). A côté des différences morphologiques, il a été signalé une différence dans le comportement biologique de certaines souches de *T. cruzi*. Selon les sous-populations clonées, il a été observé des dissemblances portant notamment sur la vitesse de croissance en culture, l'infectiosité des souches pour leur hôte vertébré, leur virulence et leur pathogénicité. Dans la nature, les populations de *T. cruzi* qui parasitent l'homme, le réservoir domestique et sylvatique ainsi que les vecteurs, renferment un mélange de populations hétérogènes en raison du passage naturel et continu des parasites entre les différents hôtes. Les souches de *T. cruzi* peuvent être individualisées par l'étude de leur comportement et de l'évolution de l'infection chez l'hôte ou par une analyse moléculaire et génétique des parasites.

## **B. Transmission de la maladie**

La maladie de Chagas est habituellement transmise par le contact des déjections de l'insecte infecté avec une lésion au niveau de la peau ou d'une muqueuse. Cependant d'autres voies de contamination constituant un danger réel sont à considérer.

## **1. Contamination par l'insecte vecteur**

Les réduves sont les transmetteurs naturels du parasite. Ce sont des insectes de l'ordre des Hémiptères appartenant à la famille des Réduvidés et à la sous-famille des Triatomines. Une centaine d'espèce de triatomines sont connues, trois étant très importantes pour la transmission de *T. cruzi*: *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus*, *Panstrongylus megistus* (CHARLES, 1987). Ce sont des hématophages obligatoires à tous les stades, tant chez la nymphe que chez l'adulte, et dans les deux sexes, qui vivent dans les fissures des murs en torchis et dans les toits de chaume. L'inoculation est souvent nocturne au niveau des parties découvertes et des muqueuses.

Les diverses espèces de triatomidés se différencient par leur habitat domestique, semi-domestique ou sauvage. Les réservoirs varient selon la localisation de l'insecte. Le chien, le chat et le cobaye constituent les réservoirs domestiques tandis que les divers rongeurs et chauve-souris constituent les réservoirs péri-domestiques. Par ailleurs, de nombreux animaux sauvages ont été reconnus porteurs de *T. cruzi*: les primates, les marsupiaux et les édentés, alors que les oiseaux et les animaux à sang froid sont réfractaires au parasite.

## **2. Autres modes de transmission**

Hormis la contamination par l'insecte vecteur, principalement dans les zones rurales, la maladie de Chagas peut être contractée par transfusion sanguine ou par transplantation d'organes parasités, mais également par voie congénitale et par infection accidentelle en laboratoire.

## **C. Aspects cliniques de la maladie**

La maladie de Chagas évolue en trois phases: une phase aiguë de courte durée et une phase chronique prolongée, séparées par une longue phase de latence clinique, dite phase indéterminée (OUAISI, 1993).

### **1. Phase aiguë**

Cette phase se caractérise par un état de malaise général accompagné de manifestations cliniques diverses. Elle dure 1 à 3 mois et passe souvent inaperçue, les symptômes pouvant être bénins ou atypiques. Cependant, chez les plus jeunes, les troubles cliniques peuvent être très importants et conduisent parfois à la mort.

A la suite d'une piqûre par le triatome, il apparaît parfois au niveau de la peau un oedème inflammatoire connu sous le nom de chagôme. Si la porte d'entrée est au niveau de la conjonctive oculaire, un complexe ophtalmo-ganglionnaire se forme appelé signe de Romana. Ailleurs, elle n'est pas apparente. Les symptômes généraux de la phase aiguë sont la fièvre, l'hépatosplénomégalie, l'asthénie, les céphalées, l'anorexie ainsi que des diarrhées et des vomissements. Dans une proportion qui peut atteindre 30 % des cas, apparaît des anomalies de l'électrocardiogramme imputables à une myocardite aiguë plus ou moins intense, se traduisant par une tachycardie. Une cardiomégalie peut être mise en évidence par radiographie du thorax. Enfin, une méningoencéphalite peut survenir chez les enfants en bas âge qui provoque la mort dans 50 % des cas.

La mortalité à ce stade touche 2 à 8 % des sujets atteints et se manifeste particulièrement chez les enfants de moins de 2 ans. Chez les autres sujets, les symptômes régressent en quelques semaines dans la majeure partie des cas, sans séquelles cliniques à court ni à moyen terme.

## **2. Phase de latence ou phase indéterminée**

Cette phase peut durer plusieurs années (10 à 20 ans) voire indéfiniment. Elle se caractérise par l'absence de symptômes cliniques chez un sujet qui conserve son entière capacité physique et ne manifeste aucune modification de l'électrocardiogramme ni d'anomalie à la radiographie du thorax. En revanche, la sérologie reste positive tandis que la parasitose, indécelable par les méthodes directes, peut être mise en évidence par xénodiagnostic dans 20-60 % des cas. Pendant cette phase, la plupart des patients ignorent qu'ils sont parasités et constituent donc durablement un réservoir d'infestation important, contribuant à l'entretien du cycle biologique de *T. cruzi*.

## **3. Phase chronique**

On estime que la phase indéterminée évolue à long terme vers une atteinte cardiaque, digestive ou neurologique chez 30 % des sujets au maximum, les autres ne manifestant jamais d'atteinte organique.

### **3.1. Forme cardiaque**

Les manifestations cliniques de la forme cardiaque dépendent du degré d'altération du myocarde, de la présence de troubles du rythme et du degré d'insuffisance cardiaque. La symptomatologie est dominée par des palpitations, des étourdissements, des syncopes, un oedème, une dyspnée et des douleurs thoraciques. La radiographie du thorax permet de déceler l'hypertrophie cardiaque, tandis que l'électrocardiogramme met en évidence des troubles typiques du rythme et de la conduction ventriculaire. Parmi les arythmies ventriculaires, la fibrillation est la cause la plus importante et sans doute la plus fréquente de mort subite chez les chagasiques chroniques, ainsi que l'embolie pulmonaire.

### **3.2. Forme digestive**

L'appareil digestif peut être atteint chez le chagasiche chronique, le plus souvent au niveau de l'oesophage et du côlon. Des lésions importantes au niveau du plexus nerveux entraînent des troubles du péristaltisme. La dilatation progressive de l'oesophage est accompagnée de régurgitation et de dysphagie plus ou moins sévère. Le manque de coordination des mouvements du côlon aboutit à une constipation intense et à une importante dilatation. Les syndromes de méga-oesophage et de méga-côlon peuvent coexister avec une cardiopathie plus ou moins importante.

### **3.3. Forme nerveuse**

Une atteinte du système nerveux central qui se traduit par des troubles fonctionnels cérébraux, des cas de parésie, des convulsions et des troubles psychiatriques, ainsi qu'une atteinte du système nerveux périphérique ou végétatif, peuvent également survenir lors de la phase chronique. Ces altérations neurologiques sont les moins étudiées et, par conséquent, les moins bien connues des formes chroniques de la maladie. Cependant, la précocité des altérations irréversibles du système neurovégétatif, notamment des lésions neuronales au niveau de l'intestin et du cœur, donne à penser qu'elles s'inscrivent dans un mécanisme pathogène commun à toutes les manifestations de la maladie du Chagas chronique.

## **4. Diagnostic**

Plusieurs signes cliniques peuvent être évocateurs pour détecter une infection précoce, cependant la présence du parasite dans le sang doit être confirmée par différentes techniques.

### **4.1. Méthodes parasitologiques**

Lorsque l'on est en présence d'une forte parasitémie, surtout pendant la phase aiguë, l'observation microscopique des

trypomastigotes est possible par l'examen d'une goutte de sang frais entre lame et lamelle, mais en général, l'observation est réalisée sur une goutte épaisse de sang, après hémolyse et coloration au Giemsa. Cet examen ne révèle que 50 % des cas en phase aiguë de la maladie.

L'hémoculture réalisée à partir du sang des malades est également un moyen de diagnostiquer environ 40 à 50 % des infections en phase chronique et 100 % en phase aiguë. Cela consiste à inoculer le sang à du milieu de culture afin de permettre le développement du parasite *in vitro*.

La méthode indirecte du xénodiagnostic est applicable à la phase aiguë de la maladie avec une efficacité d'environ 100 % et de 20 à 50 % en phase chronique. Elle implique de provoquer la piqûre d'un patient par un triatome sain (hôte intermédiaire) et d'examiner la présence de trypomastigotes métacycliques dans les déjections de l'insecte 20 à 60 jours après le repas sanguin.

#### **4.2. Méthodes sérologiques**

Le diagnostic sérologique repose sur la détection d'anticorps spécifiques vis-à-vis de *T. cruzi* dans les sérums de patients en phase chronique. De nombreuses techniques sont utilisées, notamment 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'immunoprecipitation en gel, l'immunofluorescence indirecte et la technique d'ELISA (Enzymes Linked Immunosorbent Assay) (OUAISSI, 1993).

Ces techniques manquent parfois de spécificité du fait des réactions croisées que présente *T. cruzi* avec d'autres parasites protozoaires présents dans la même zone d'endémie, en particulier *T. rangeli*, *Leishmania brasiliensis*, *L. donovani* et *L. mexicana*.

### **4.3. Méthodes moléculaires**

Récemment, avec le développement de techniques de biologie moléculaire, le diagnostic de la maladie de Chagas est possible par la technique de polymérisation en chaîne ou PCR (Polymerase Chain Reaction). Il est possible de détecter des quantités infimes d'ADN parasitaire même en présence d'un très grand excès d'ADN humain comme c'est le cas dans le sang de sujets infectés. Cette méthode permet, en outre, d'identifier différentes souches de trypanosomes et a été utilisée pour différencier *T. cruzi* de *T. rangeli* dans un test de diagnostic (GUEVARA-ESPINOZA, 1996).

## **5. Lutte contre la maladie de Chagas**

Le combat contre l'infection présente deux aspects principaux, l'un comporte les moyens thérapeutiques et l'autre est l'élimination du vecteur.

### **5.1. Moyens thérapeutiques**

Actuellement, le traitement de la maladie de Chagas est basé sur l'utilisation de deux trypanocides chimiques, le nifurtimox et le benznidazole qui sont actifs sur les formes trypomastigotes et amastigotes. Leur administration est préconisée en phase aiguë de l'infection. Ces traitements sont efficaces dans le cas d'une méningoencéphalite aiguë qui résulte d'une complication de la maladie. En phase aiguë, l'administration de trypanocides entraîne la négativation du xénodiagnostic et de la sérologie dans un très grand nombre de cas. Cependant, ces deux produits sont responsables d'effets secondaires correspondant à des atteintes digestives, des insomnies ainsi que des polynévrites pour le nifurtimox (MARR et DOCAMPO, 1986) et des neuropathies périphériques pour le benznidazole.

L'efficacité thérapeutique d'un autre médicament, l'allopurinol, est à l'étude. Si son action positive est démontrée, il sera sans doute possible, étant donné l'absence de réactions indésirables graves, de faire bénéficier un plus grand nombre de patients d'une chimiothérapie.

A l'heure actuelle, la majorité des spécialistes s'accorde à considérer qu'un traitement trypanocide est sans intérêt en phase chronique, chez des malades qui présentent des lésions organiques patentées. Ces patients bénéficieront d'un traitement symptomatique médical selon leurs lésions, qu'elles soient cardiaques ou digestives.

### **5.2. Lutte antivectorielle**

Plusieurs moyens sont utilisés pour lutter contre la transmission de *T. cruzi*, notamment l'épandage d'insecticides afin d'éliminer les insectes vecteurs dans les habitations rurales. Cette mesure doit être accompagnée d'une véritable politique d'amélioration de l'habitat, spécialement le plâtrage des murs pour combler les fissures où se réfugie l'insecte à tous les stades de son développement et une politique d'éducation sanitaire (DUJARDIN, 1992).

## **D. Immunologie de l'infection chagasique**

Chez l'homme, l'infection chagasique conduit à une réponse immunitaire qui contrôle le niveau de parasitémie lors de la phase aiguë. 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 dans les modèles animaux.

### **1. Résistance naturelle**

L'existence d'une immunité naturelle contre l'infection à *T. cruzi* a été mise en évidence chez les animaux à sang froid et les oiseaux (BRENER, 1973). Cette résistance serait liée à la lyse directe des formes trypomastigotes par le système du complément, notamment par l'activation de la voie alterne (KIERSZENBAUM et coll., 1976), un phénomène qui n'est pas observé chez les hôtes mammifères.

### **2. Réponse immunitaire**

Très rapidement après l'infection, l'hôte développe une réponse immune qui contribue à la destruction des parasites. Ainsi, le nombre de trypomastigotes circulants pendant la phase aiguë diminue progressivement et les parasites disparaissent complètement de la circulation sanguine pendant la phase chronique de la maladie. Le pathogène persiste dans les tissus de l'hôte durant toute sa vie et stimule ainsi de façon permanente son système immunitaire. Des mécanismes de défense à médiation cellulaire et humorale semblent jouer un rôle important dans la résistance à l'infection chagasique (TRISCHMANN et coll., 1978).

#### **2.1. Immunité à médiation cellulaire**

De nombreux travaux ont montré que la réponse cellulaire participait activement dans la résistance à l'infection chagasique. Par

exemple, le traitement des souris par des anticorps anti-thymocytes ou une thymectomie néonatale augmente leur parasitémie (KIERSZENBAUM et PIENKOWSKI, 1979). De même, l'infection de souris "nudes" montre une parasitémie supérieure à la normale et les souris ne survivent pas à la phase aiguë. Par ailleurs, le transfert passif de lymphocytes T immuns induit une protection partielle chez des souris saines vis-à-vis d'une infection d'épreuve (REED, 1980).

La caractérisation des sous-populations T impliquées dans ce phénomène est très récente. Ainsi, TARLETON (1990), par une série d'expériences, indique que des souris C57BL/6 naturellement résistantes à l'infection, déplétées en lymphocytes T CD8<sup>+</sup> ou déficientes en  $\beta$ 2 microglobuline (TARLETON et coll., 1992) sont incapables de contrôler la parasitémie. D'autre part, les lymphocytes T CD8+ peuvent lyser les cellules infectées qui présentent à leur surface des antigènes parasites (NICKELL et coll., 1993). En effet, la forme de multiplication de *T. cruzi* réside librement dans le cytoplasme de la cellule hôte où certains antigènes pourraient être présentés à la surface de la cellule infectée en association avec les antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I. En outre, de récentes études ont mis en évidence que la  $\beta$ 2 microglobuline est indispensable à l'expression des produits du CMH de classe I. L'ensemble de ces observations suggère que les cellules parasitées pourraient servir de cibles aux lymphocytes T CD8+, dans le contexte du CMH de classe I, et explique que cette sous-population lymphocytaire joue un rôle majeur dans le contrôle de l'infection.

Les monocytes et les macrophages jouent un double rôle dans l'infection chagásique, en étant à la fois des cellules hôtes préférentielles du parasite, et des cellules effectrices de la réponse immune après activation. L'activité trypanocide des macrophages peut être augmentée par certaines lymphokines libérées par des lymphocytes T stimulés (NOGUIERA et coll., 1981), comme par exemple l'interféron

$\gamma$  et  $\beta$ , le GMCSF (granulocyte macrophage colony stimulating factor) ou le TNF (tumor necrosis factor).

## 2.2. Immunité à médiation humorale

Le rôle protecteur des anticorps a été mis en évidence par transfert passif de sérum immuns anti-*T. cruzi*, ou d'anticorps monoclonaux (SEGURA et coll., 1986), et le fait que des animaux mauvais producteurs d'anticorps sont plus sensibles à l'infection chagase (souris Biozzi).

Différents mécanismes faisant intervenir les anticorps ont été décrits comme jouant un rôle dans la destruction du parasite. En plus de leur capacité à se fixer à certains composants de surface du parasite et à inhiber ainsi l'adhésion de celui-ci et sa pénétration dans la cellule hôte, les anticorps participent également à la phagocytose du parasite par les macrophages et les monocytes. D'autre part, les anticorps peuvent induire une lyse directe du parasite en présence du complément ou interviennent dans le mécanisme d'ADCC (cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps) en association avec différentes populations cellulaires présentant des récepteurs Fc à leur surface.

## 3. Mécanismes d'évasion

Malgré la diversité et l'efficacité des mécanismes immunitaires impliqués dans la destruction du parasite, celui-ci survit chez son hôte. Ceci est le résultat d'un équilibre subtil entre les mécanismes effecteurs de l'hôte et les mécanismes de défense mis en oeuvre par le parasite.

En premier lieu, la multiplication intracellulaire du parasite lui permet d'échapper à la réponse immune de l'hôte. En effet, il se trouve en dehors de la circulation sanguine, donc à l'abri des anticorps et des cellules effectrices. En outre, *T. cruzi* possède la capacité d'infester plusieurs types de cellules dont les macrophages et sa destruction à

l'intérieur de la cellule serait possible après fusion du lysosome macrophagique et de la vacuole parasitophore. Cependant, une fois dans la cellule, le parasite se libère du phagolysosome en sécrétant une protéase, active à pH acide appelée hémolysine qui détruirait le phagolysosome, permettant la libération des amastigotes dans le cytoplasme où ils se multiplient (ANDREWS et WHITLOW, 1989).

Avant d'infecter les cellules, les trypomastigotes se trouvent dans le sang, ce qui les rend extrêmement sensibles aux attaques de l'hôte. Cependant, les trypomastigotes ont la capacité de résister à la lyse par activation de la voie alterne du complément. En effet, les parasites expriment une protéine capable d'inhiber la formation d'une C3 convertase alterne efficace (FISHER et coll., 1988). De plus, *T. cruzi* produit une molécule analogue au DAF (decay-accelerating-factor) des cellules de mammifères qui interfère avec la formation du C3b actif et conduit à la dégradation du C3b en C3bi marquant ainsi l'arrêt de la cascade qui conduit au C5b-9, complexe lytique du complément.

D'autres facteurs peuvent contribuer à la survie du parasite dans le sang. Par exemple, l'acquisition d'antigènes de l'hôte, décrite pour les trypomastigotes (CHESS et coll., 1983) qui possèdent à leur surface des antigènes cellulaires, pourrait également jouer un rôle dans la déviation de la réponse immune. De même, le parasite peut libérer des antigènes ce qui lui permet de dévier la réponse immune.

#### **4. Manifestations pathologiques**

L'infection chagasique provoque une rupture dans le système immunitaire de l'hôte, conduisant aux manifestations pathologiques observées durant la phase aiguë et chronique de la maladie.

#### **4.1. Immunopathologie de la phase aiguë**

Les réponses immunes à la fois humorale et cellulaire sont en partie dirigées spécifiquement vis-à-vis du parasite. On assiste cependant à une activation polyclonale et une prolifération massive de toutes les classes de lymphocytes qui se traduit par une augmentation de la taille de la rate et des ganglions (MINOPRIO et coll., 1986). Cette activation polyclonale est en grande partie aspécifique, dans la mesure où une bonne proportion d'anticorps présents dans les sérum de sujets immuns ou d'animaux infectés expérimentalement sont dirigés vis-à-vis d'antigènes non parasitaires.

En même temps, apparaissent les phénomènes d'immunosuppression, c'est à dire une incapacité à répondre aux antigènes hétérologues. Ceci serait la conséquence de l'activation polyclonale car elle conduirait à un épuisement des cellules réactives, qui seraient incapables de répondre aux stimuli antigéniques. Cependant, d'autres phénomènes pourraient expliquer cette immunosuppression. On peut citer, à titre d'exemple, l'existence de cellules suppressives telles que des macrophages ou des lymphocytes T suppresseurs, ou bien encore l'apparition de substances immuno-suppressives d'origine parasitaire ou cellulaire (LIEW et coll., 1988; OUAISSE et coll., 1995). Des altérations au niveau de la sécrétion de l'IL2 et l'expression du récepteur correspondant ont été rapportées. Par ailleurs, il a été montré que le parasite, aussi bien que les produits libérés par des formes trypomastigotes ou TIF (pour Trypanosome Immunosuppressive Factor) sont capables d'induire une diminution de la transcription du gène codant pour la protéine 55 (p55) du récepteur à l'IL2 (KIERSZENBAUM et coll., 1995).

L'activation polyclonale et l'immunosuppression ne sont pas restreintes qu'à la phase aiguë. De même, les prémisses d'une pathologie auto-immune peuvent se rencontrer dès cette phase de l'infection.

#### **4.2. Immunopathologie de la phase chronique**

Les causes exactes entraînant la pathologie de cette phase ne sont pas totalement élucidées. La pathogénie peut être la conséquence, soit de la persistance du pouvoir pathogène du parasite, soit des séquelles de la phase aiguë. Mais de plus en plus d'évidences tendent à prouver que la pathogénie est d'origine auto-immune (JOSKOWICZ, 1985).

En effet, l'infection chagásique perturbant la réponse immune de l'hôte en entraînant un dysfonctionnement des fonctions cellulaires T et B, notamment avec une stimulation polyclonale suivie d'une immunosuppression, pourrait conduire à une perte de tolérance vis-à-vis des antigènes du soi. D'autre part, l'existence d'épitopes cross-réactifs entre le parasite et son hôte vertébré ou "mimétisme moléculaire" pourrait aussi conduire à des phénomènes auto-immuns. Enfin, un autre type de mécanisme pourrait intervenir, à savoir le mimétisme fonctionnel qui concerne les protéines parasitaires possédant des fonctions analogues à des molécules de l'hôte.

## **E. Biologie cellulaire de *T. cruzi***

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 sont une réponse du parasite vis-à-vis des changements de son milieu.

### **1. Différenciation du parasite**

Au cours de son cycle de développement, l'environnement du parasite alterne entre l'insecte vecteur sous forme épimastigote et trypomastigote et l'hôte vertébré sous forme amastigote et trypomastigote.

#### **1.1. Chez l'hôte vecteur**

Chez le vecteur, les trypomastigotes sanguicoles subissent une transformation morphologique en épimastigotes qui se multiplient, migrent jusqu'au rectum, adhèrent à l'épithélium et se différencient en trypomastigotes métacycliques. Cette étape de différenciation a pu être reproduite *in vitro*: c'est le processus de métacyclogenèse (GOLDENBERG et coll., 1987). En effet, les épimastigotes cultivés dans de l'urine artificielle de réduve, riche en L-proline, adhèrent au flacon de culture, se différencient en trypomastigotes qui se détachent du support et se déplacent dans le milieu. Cet analogue de l'urine stimulerait donc les événements morphologiques et biochimiques semblables à ceux qui se produisent dans la glande rectale de l'insecte.

Ces transformations morphologiques sont associées à l'expression de protéines spécifiques présentes uniquement dans les formes différencierées (BONALDO et coll., 1988) et peuvent être induites par l'AMP cyclique et des activateurs de l'adénylate cyclase (GONZALES-PERDOMO et coll., 1988). De plus, un gène dont l'expression est augmentée durant le processus de métacyclogenèse, mais aussi en présence d'AMP cyclique ou de ses analogues a été identifié (HEATH et coll., 1990). Ces observations suggèrent que les processus de différenciation sont sous la dépendance de gènes spécifiques inductibles.

Par ailleurs, il sera montré au cours de cette thèse, que le processus de différenciation *in vitro* s'accompagne de la mort massive par apoptose des épimastigotes non différenciés.

## **1.2. Chez l'hôte vertébré**

La capacité des trypomastigotes à envahir les tissus de l'hôte dépend de processus complexes faisant intervenir des interactions ligands-récepteur et la production de protéases qui dégradent les composants de la matrice extracellulaire. D'une manière générale, ces mécanismes de reconnaissance et d'adhésion des parasites aux cellules font intervenir des interactions entre protéines de surface du parasite et de la cellule hôte. Le dimère de la fibronectine et plus précisément la séquence RGDS joue un rôle important dans l'interaction du parasite aux cellules et tissus de l'hôte (OUAISSI et coll., 1984; OUAISSI, 1988). Après fixation de la fibronectine, celle-ci est hydrolysée par les protéases du parasite libérant ainsi des fragments peptidiques qui activent la différenciation des trypomastigotes en amastigotes (OUAISSI et coll., 1992). Ce phénomène est concomitant avec une augmentation de l'AMP cyclique intracellulaire ainsi que de la synthèse de protéines et de leur phosphorylation (OUAISSI et coll., 1991).

L'adhésion par l'intermédiaire de la fibronectine n'est cependant pas exclusive et il existe d'autres mécanismes d'adhésion du

parasite à la cellule hôte, notamment ceux faisant intervenir la sous-unité C1q du composant C1 du système du complément (ORTEGA et PEREIRA, 1991). Par ailleurs, les trypomastigotes métacycliques provenant de l'insecte vecteur ou de culture axénique expriment des composants de surface qui ne sont pas présents chez les trypomastigotes sanguicoles et qui pourraient donc jouer un rôle dans l'interaction parasite-cellule hôte. Plusieurs de ces glycoprotéines de surface ont été décrites comme intervenant dans l'invasion des cellules (RAMIREZ et coll., 1993; DE CASSIA RUIZ et coll., 1993; YOSHIDA et coll., 1990; MING et coll., 1995).

## **2. Organisation cellulaire**

La plupart des organelles des eucaryotes supérieurs sont retrouvés chez *Trypanosoma cruzi*, avec des fonctions similaires. Ce parasite possède néanmoins des structures originales, comme tous les trypanosomatidés en général.

En effet, il ne possède qu'une seule mitochondrie, linéaire dans les trypomastigotes mais avec des ramifications dans les autres stades et qui s'étend sur toute la longueur de la cellule. L'ADN mitochondrial est composé de deux sortes d'ADN circulaire, les maxi-cercles et les mini-cercles qui forment ensemble une sorte de réseau localisé principalement à la base du flagelle. Il est visualisé par des colorants basiques, et avant que sa composition ne soit connue, les cytologistes l'ont nommé kinétopaste pour "corps associé au mouvement" et l'ensemble de l'ADN porte l'abréviation ADNk. Les deux types d'ADNk sont très différents dans leur structure et leur fonction. Les mini-cercles, de 0.7 à 2.5 kb selon les espèces, sont de l'ordre de 5000 à 10000 par kinétopaste. Ils n'ont pas de fonction codante connue, ni de cadre de lecture ouvert, mais ils peuvent cependant produire des transcrits (THERTULIEN et coll., 1991).

Les maxi-cercles, de 20 à 38 kb dont le nombre est limité (environ 50), possèdent des gènes essentiels au bon fonctionnement de la mitochondrie, en particulier ceux codant pour la synthèse des ARN ribosomaux, ainsi que des gènes dont les protéines sont impliquées dans le transport d'électrons et dans la synthèse de l'ATP. Comme les autres génomes mitochondriaux, les maxi-cercles utilisent le codon UGA pour coder le tryptophane, alors que ce codon est un signal de STOP dans le code génétique universel. Une autre propriété originale de ces maxi-cercles réside dans le fait que plusieurs de leur gènes sont "incomplets". En effet, leur transcrits ne sont pas fonctionnels et seul un processus post-transcriptionnel qui additionne ou délète des bases uraciles rend les messagers traduisibles. Ce processus, connu sous le terme d'édition de l'ARN (BENNE, 1994), a été décrit chez d'autres kinétoplastidés, *T. brucei*, *Leischmania tarentolae* et *Crithidia fasciculata*, mais pas encore à ce jour chez *T. cruzi*.

Les microtubules subpelliculaires sont également des structures originales. Ils sont connectés entre eux ainsi qu'à la membrane plasmique ce qui confère à la fois une forte rigidité et une grande flexibilité au parasite. Ils sont localisés sur l'entièvre surface de la membrane plasmique sauf à l'endroit où le flagelle émerge de la cellule ou poche flagellaire. Ce compartiment est supposé être l'endroit de l'endocytose, mais également de la sécrétion des protéines parasitaires.

Un autre organelle très intéressant des kinétoplastidés est le glycosome. Les cellules peuvent en contenir 200 à 300. Ces organelles, délimités par une membrane de 0.3 microns, ont un rôle métabolique. Ils contiennent plusieurs enzymes responsables de réactions cataboliques et anaboliques, en particulier des enzymes de la glycolyse et du métabolisme du glycérol. Le glycosome apparaît constituer une réserve séparée des intermédiaires de la glycolyse (OPPERDOES et MICHEL, 1993) en métabolisant le glucose 50 fois plus vite que dans le système des mammifères.

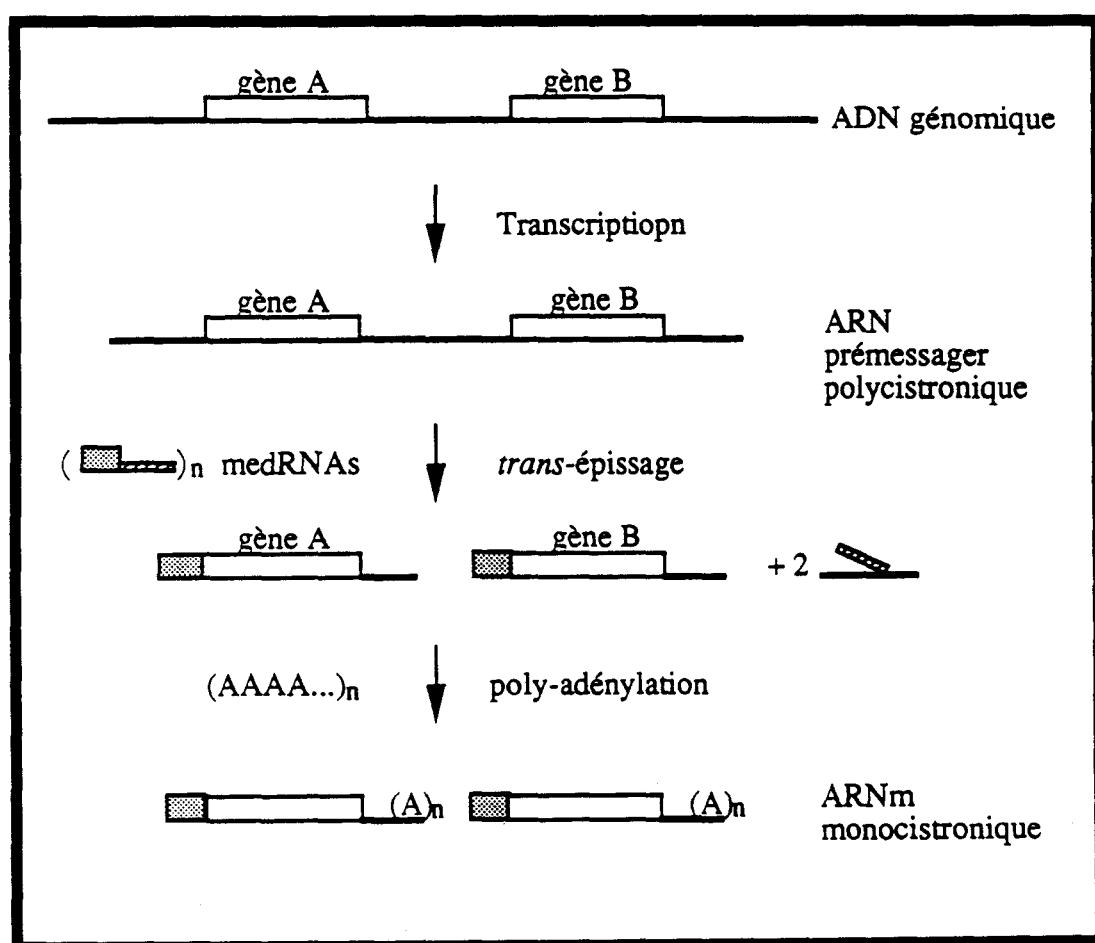
### 3. Génétique de *T. cruzi*

*T. cruzi* est un organisme diploïde dont le génome a une complexité d'environ  $2.5 \cdot 10^8$  paires de bases, tandis que l'ADNk en contient  $4.9 \cdot 10^7$  (LANAR et coll., 1981). 9 % du génome est représenté par des régions répétitives, 51 % correspond à des éléments faiblement répétés et 23 % à des structures "uni-copies". 68 % de ces dernières sont représentées dans l'ARN polysomal. Cet ARN comprendrait 12000 espèces différentes dont 9000 seraient polyadénylés. *T. cruzi* contient 250 chromosomes (125 paires) qui ne sont pas classiquement condensés pendant la mitose (SOLARI, 1980). La raison de cette particularité n'est pas connue car la présence de l'histone H1, normalement impliqué dans la condensation des chromosomes, a été montrée récemment (TORO et coll., 1993). *T. cruzi* est supposé être un des plus anciens eucaryote (MC LAUGHLIN et DAYHOFF, 1973) et la particularité de sa chromatine peut être interprétée comme étant un modèle intermédiaire d'adaptation de l'organisation génétique qui a été testé durant l'évolution des eucaryotes et qui a été conservé jusqu'à ce jour.

Les trypanosomatidés, et *T. cruzi* en particulier possèdent une particularité intéressante qui est la maturation des ARN pré-messagers codés par le génome. En effet, chez la plupart des organismes eucaryotes, les transcrits sont modifiés (addition de 7'-methylguanoside ou "coiffe" en 5' et poly A en 3') avant d'être traduits en protéines. La "coiffe" existe chez *T. cruzi*, mais elle est fournie avec 39 bases appelées "Spliced Leader" (SL). De plus, la plupart des gènes codant pour des protéines sont organisés en tandem et sont transcrits sous forme de longs et multigéniques ARN pré-messagers nommés ARN polycistroniques contrairement à l'ARN des autres eucaryotes qui est monocistronique. Après transcription, les ARN pré-messagers sont modifiés dans un premier temps au niveau de leur extrémité 5' où s'ajoute le SL (McCARTHY-BURKE et coll., 1989) ce qui permet la séparation des différents transcrits. Cette réaction est appelée *trans*

épissage. Puis dans un deuxième temps, une queue poly A est ajoutée à leur extrémité 3' (Fig. 3). Le SL se trouve sur un transcrit ARNm (pour mini-exon derived RNA) d'environ 110 bases.

Jusqu'à maintenant, il n'y a aucune évidence montrant l'existence du phénomène de *cis* épissage chez les kinétoplastidés. En effet, il semblerait qu'aucun des gènes étudiés ne contienne d'introns ce qui est une autre particularité chez ce parasite. D'une façon intéressante, les procaryotes possèdent aussi des ARN polycistroniques et n'ont pas d'intron, ni de phénomène d'épissage.



*Fig. 3: Le trans-épissage chez les trypanosomes*

## ***II . Le facteur d'elongation EF-1 de la synthèse protéique***

Dans le laboratoire, la recherche d'antigènes parasitaires pouvant avoir une activité enzymatique et immunoprotectrice a eu comme résultat la purification de trois molécules fixant le glutathion (PLUMAS-MARTY et coll., 1992). Curieusement, ces molécules ne possèdent pas d'homologies avec des glutathion S-transférases (GSTs), du moins pour deux d'entre elles, mais sont homologues les sous-unités  $\beta$  et  $\delta$  du facteur d'elongation EF-1 (PLUMAS-MARTY et coll., 1994). L'étude de la troisième molécule fait l'objet d'une partie de cette thèse, ainsi que la sous-unité  $\alpha$  du facteur EF-1 de la synthèse protéique.

## A. La synthèse protéique

Les cellules nécessitent une machinerie élaborée pour synthétiser leurs protéines (Fig. 4). La traduction chez *T. cruzi* est identique à celle des cellules eucaryotiques, exceptée dans la composition des ARN ribosomaux (ARNr). Quelques centaines de macromolécules, incluant les ribosomes, les ARN messagers (ARNm), les ARNt de transfert (ARNt) et des facteurs protéiques sont impliqués dans la traduction des 4 lettres de l'alphabet de l'ARNm en 20 lettres de l'alphabet des protéines, l'actuel dictionnaire résidant dans les molécules d'aminoacyl-ARNt. Ce dictionnaire est dicté par la haute spécificité des aminoacyl-ARNt synthétase dont chacune lie un seul acide aminé à un seul ou à plusieurs ARNt correspondants.

La synthèse protéique s'effectue sur le ribosome cytosolique 80 S (S étant la constante de sédimentation en ultracentrifugation) qui est composé d'une petite sous-unité (40 S) et d'une grande (60 S) (MOLDAVE, 1985). Chez les eucaryotes supérieurs la sous-unité 40 S comporte un seul ARNr (18 S) et 30 à 35 protéines tandis que la sous-unité 60 S contient 3 chaînes d'ARNr (5 S, 5.8 S et 28 S) et 45 à 50 protéines. Les ARN ribosomaux des kinétoplastidés sont différents quant à leur taille. L'ARNr 18 S de la petite sous-unité est remplacé par l'ARNr 21 S, de même que l'ARNr 28 S devient deux ARNr d'environ 18 S et 15 S. Ce profil des 3 ARNr est caractéristique chez *T. cruzi*.

On trouve les ribosomes sous deux formes dans les cellules eucaryotes: libres ou liés aux membranes. Les protéines destinées à certains organites et au cytosol (portion soluble aqueuse du cytoplasme) sont synthétisées sur des ribosomes libres. Les protéines qui aboutissent dans les lysosomes, l'appareil de golgi et la membrane plasmique sont synthétisées par des ribosomes associés au réticulum endoplasmique rugueux. La plupart des protéines mitochondrielles et nucléaires sont

Groupes de composants	nombre de composants	nombre de fois utilisé <sup>a</sup>	fonction
Protéines ribosomales RNAs ribosomaux	70-80 4	continuellement un ribosome	site de la synthèse protéique
les ARNs messagers	quelques centaines <sup>b</sup>	continuellement un ARNm	message génétique
aminoacyl-ARNts	environ 20	500 fois 1 des 20	molécule adaptatrice
aminoacyl-ARNt synthétase	20	500 fois 1 des 20	chargement des ARNt
facteurs d'initiation	30	1 fois chacun des 30	initiation de la synthèse protéique
facteurs d'elongation	5	500 fois chacun des 5	élongation de la chaîne
facteur de terminaison	1	1 fois	terminaison de la chaîne
ATP,GTP		environ 1500	apport d'énergie

a: nombre de fois utilisé pour la synthèse d'une protéine de 500 acides aminés

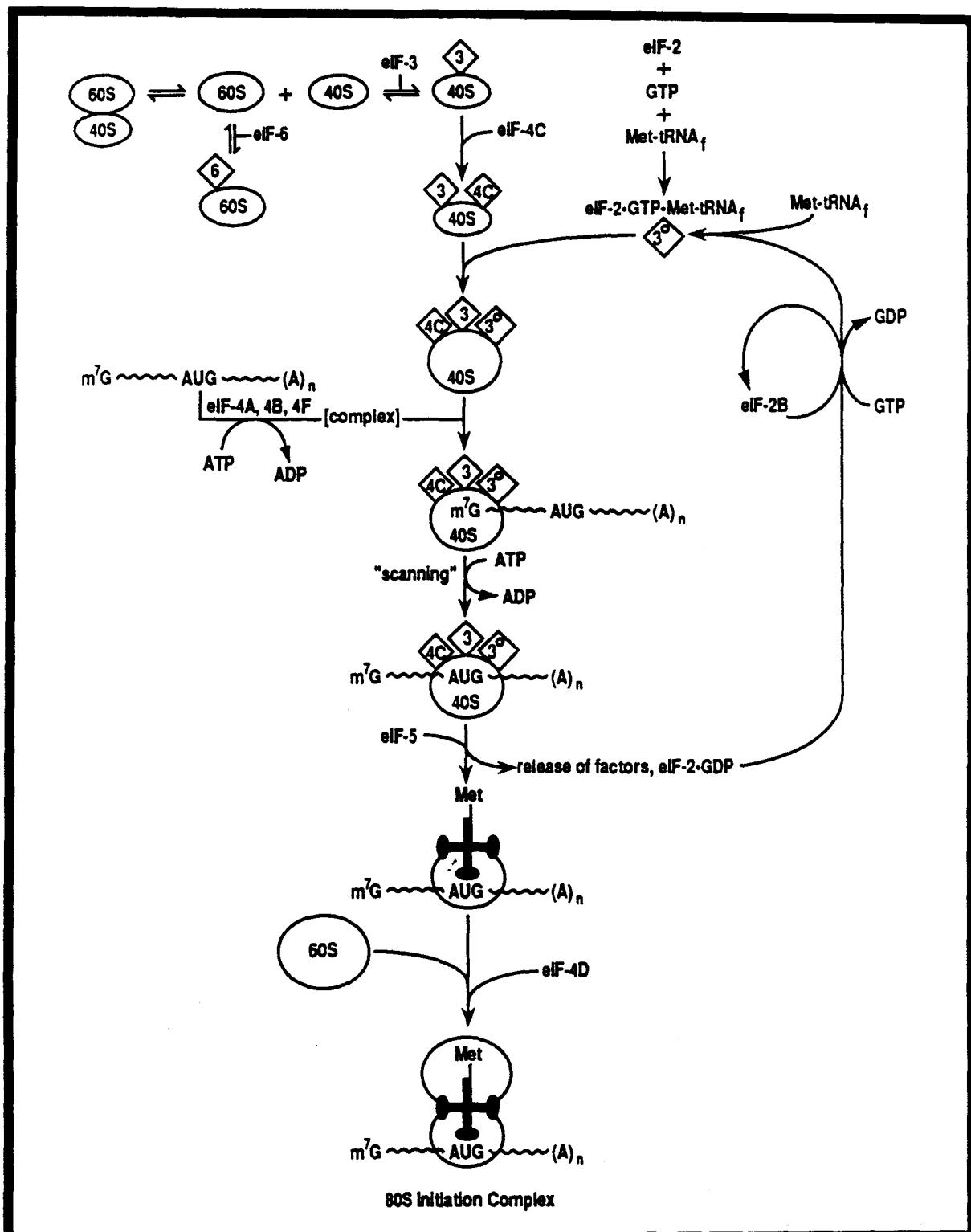
b: dépend du type de cellule

*Fig. 4: Tableau des différents composants de la synthèse protéique*

synthétisées par des ribosomes cytoplasmiques sous forme de protéines matures et sont ensuite absorbées par les organites appropriés. D'autres protéines mitochondrielles sont codées par de l'ADN mitochondrial et traduites dans la mitochondrie par un système de synthèse des protéines analogue au système cytoplasmique eucaryotique. Cependant, les ribosomes sont différents quant à leur taille, ils sont plus petits et contiennent moins de protéines et d'ARNr. Par ailleurs, le facteur d'elongation 1 $\alpha$  mitochondrial est plus proche de EF-Tu des procaryotes que de EF-1 $\alpha$  du cytoplasme des eucaryotes (KUHLMAN et PALMER, 1995). Il est donc appelé EF-Tu mt.

## **1. Initiation**

La synthèse protéique est classiquement divisée en trois phases consécutives qui sont l'initiation, l'elongation et la terminaison. L'initiation conduit à la formation du complexe d'initiation 80 S composé de l'ARNm, de l'ARNt initiateur (ARNt-Méthionine) et des deux sous-unités ribosomales réunies (Fig. 5), à travers la formation séquentielle d'un nombre de complexes intermédiaires de pré-initiation (HERSHEY, 1991). L'initiation propre requiert une dizaine de facteurs d'initiation (eIF pour facteur d'initiation eucaryotique) et peut être décrite brièvement en 3 étapes. Tout d'abord, la formation d'un complexe de préinitiation comprenant la sous-unité 40 S, les facteurs eIF-4C (appelé aussi eIF-1A) et eIF-3 et le complexe ternaire eIF-2-GTP-ARNt-Met. Ensuite, l'ARNm se fixe au complexe de pré-initiation par l'intermédiaire du facteur eIF-4F lié à la 7 methyl guanosine (coiffe) en 5' terminale ( $m^7G$ ) de l'ARNm ainsi que des facteurs eIF-4A et eIF-4B. Enfin, la fixation de la sous-unité 60 S est concomitante avec le largage des facteurs d'initiation et l'hydrolyse du GTP pour former le complexe 80 S contenant l'ARNt-met sur le site P du ribosome.



*Fig. 5: Représentation schématique de la formation du complexe d'initiation 80 S de la synthèse protéique (d'après MERRICK, 1992)*

## **2. Elongation**

La phase d'elongation est un processus cyclique qui ajoute un acide aminé à l'extrémité C-terminale de la chaîne polypeptidique naissante jusqu'à la rencontre du codon de terminaison. Les facteurs d'elongation ou eEF sont impliqués dans cette phase qui comporte 4 étapes principales (Fig. 6).

1) La fixation de l'aminoacyl-ARNt sur le site A du ribosome est catalysée par eEF-1 $\alpha$ -GTP. L'anti-codon de l'ARNt permet une haute spécificité en étant complémentaire au codon de l'ARNm situé dans le site A.

2) Le GTP est hydrolysé et eEF-1 $\alpha$ -GDP quitte le ribosome.

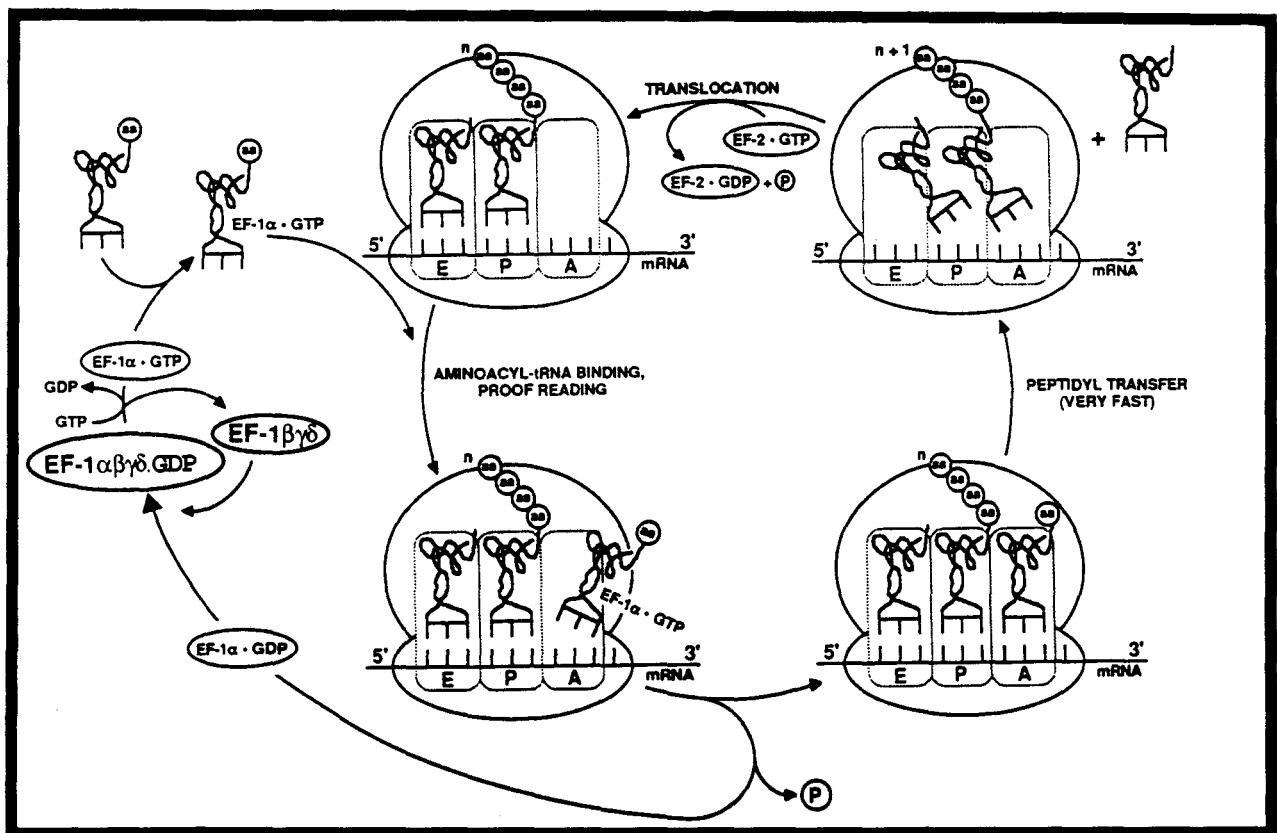
3) La formation de la liaison peptidique entre le groupe carboxyl de l'acide aminé du site P et le groupe amine de l'acide aminé du site A est catalysée par une enzyme de la sous-unité 60 S, la peptidyl transférase. Ceci conduit au transfert du peptide du site P sur l'aminoacyl-ARNt du site A, tandis que l'ARNt non chargé quitte le site E.

4) Afin de finir le cycle, EF-2 induit le mouvement du messager d'un codon ce qui libère le site A qui peut alors recevoir un nouvel aminoacyl-ARNt.

## **3. Terminaison**

Le cycle d'elongation est répété aussi souvent qu'il y a d'acides aminés à être polymérisés et avant que les codons « stop » UAA, UAG ou UGA n'entrent dans le site A. Il n'existe pas d'ARNt complémentaires avec ces codons mais ceux-ci permettent la fixation d'un facteur de libération (release factor, ou RF) qui induit le clivage du pont peptidyl-ARNt par l'activité peptidyl transférase du ribosome.

A la fin du cycle ribosomal, l'ARNm a été traduit en protéine et tous les composants impliqués dans ce processus sont de nouveau prêts pour d'autres synthèses protéiques.



**Fig. 6: Représentation schématique du cycle d'elongation de la synthèse protéique eucaryotique (d'après RIIS, 1990)**

## **B. Le facteur d'elongation EF-1**

EF-1 est composé de deux parties fonctionnelles distinctes, EF-1 $\alpha$  et EF-1 $\beta\gamma\delta$ . EF-1 $\alpha$  est responsable de la fixation de l'aminoacyl-ARNt sur le site A du ribosome avec l'hydrolyse du GTP en GDP. EF-1 $\beta\gamma\delta$  permet le recyclage de EF-1 $\alpha$ -GDP inactif en EF-1 $\alpha$ -GTP actif (Fig. 6).

### **1. EF-1 $\alpha$**

EF-1 $\alpha$  est peut-être le facteur de traduction le plus étudié dans le système eucaryotique. Ceci est probablement le fait de l'extrême intérêt que présentent les protéines fixant le GTP, du fait de leur importance dans les processus de transduction des signaux et dans l'oncogenèse, mais également parce que EF-1 $\alpha$  est l'une des protéines cytoplasmiques les plus abondantes, constituant entre 3 et 10 % des protéines solubles.

Un très grand nombre de séquences codantes pour EF-1 $\alpha$  est connu avec un degré d'identité élevé (supérieur à 76 % d'identité en acide aminé) ce qui démontre que EF-1 $\alpha$  est l'une des protéines les plus conservées durant l'évolution. Par exemple, la séquence protéique de EF-1 $\alpha$  humain est 100 % identique avec celle du lapin, tandis qu'elle ne diffère que d'un seul acide aminé avec celle de la souris et du hamster. Cette forte identité est interprétée comme la conservation des sites actifs. En effet, en comparant EF-1 $\alpha$  humain avec d'autres espèces, le plus haut degré d'identité est confiné dans le domaine fixant le GTP. La comparaison la plus extrême est celle de EF-1 $\alpha$  humain avec la séquence du facteur d'elongation EF-Tu *d'Escherichia coli* qui est l'espèce la plus distante. EF-Tu possède la même fonction chez les procaryotes que EF-1 $\alpha$  chez les eucaryotes. Bien que le pourcentage d'identité soit de 33 % sur toute la séquence protéique, il atteint 62 % (75 % d'homologie) dans les régions fixant le GTP (RIIS, 1990).

Une autre caractéristique de la protéine EF-1 $\alpha$  est qu'elle est codée par plusieurs gènes dans de nombreuses espèces. Ces gènes codent pour des protéines identiques chez les procaryotes (HUGHES, 1990) et chez les eucaryotes inférieurs (SCHIRMAIER et PHILIPPSEN, 1984; SUNDSTROM et coll., 1990; LINZ et SYPERD, 1987), mais pour des protéines légèrement différentes dans les organismes supérieurs comme la drosophile (HOVEMANN et coll., 1988; WALLDORF et coll., 1985), le xénope (DJE et coll., 1990) ou le rat (LEE et coll., 1993). Dans ces trois dernières espèces, les différents gènes EF-1 $\alpha$  subissent une expression spécifique de stade durant le développement (HOVEMANN et coll., 1988; DJE et coll., 1990), mais également une expression spécifique de certains tissus chez le rat, la souris ou l'homme (LEE et coll., 1995).

Par ailleurs, de nombreuses observations semblent indiquer que, en plus de sa fonction dans l'élongation de la synthèse protéique, EF-1 $\alpha$  pourrait jouer un rôle dans d'autres aspects de la régulation cellulaire. En particulier, EF-1 $\alpha$  est un composant du complexe valyl-ARNt synthétase-EF-1 $\beta\gamma\delta$ , il est associé aux particules mRNP ou lié au réticulum endoplasmique et participe à la dégradation des protéines et à l'association des ribosomes (MERRICK, 1992). EF-1 $\alpha$  a été également trouvé en association avec l'appareil mitotique, avec les complexes multiprotéiques qui peuvent être précurseurs des centrosomes mitotiques et avec les filaments d'actine (SHIINA et coll., 1995). Ces associations suggèrent que EF-1 $\alpha$  peut être impliqué dans l'organisation du cytosquelette et il a été montré qu'il peut jouer un rôle dans la désorganisation des microtubules pendant la phase M du cycle cellulaire.

Enfin, des études ont montré la localisation de EF-1 $\alpha$  dans le noyau de certaines cellules (COLLING et coll., 1994; BARBARES et coll., 1995; JANSSEN et coll., 1994). Ceci suggère que EF-1 $\alpha$  nucléaire peut posséder une fonction distincte de EF-1 $\alpha$  cytoplasmique. Cette

possibilité est supportée par le fait que l'enzyme Q $\beta$  répliqueuse, responsable de la réPLICATION de l'ARN du phage Q $\beta$  d'*E. coli*, est complexée avec EF-Tu et EF-Ts qui sont l'équivalent de EF-1 $\alpha$  et EF-1 $\beta$  chez les procaryotes (BLUMENTHAL et coll., 1972). De plus, le complexe EF-Tu-EF-Ts semble stimuler quatre fois la synthèse d'ARN ribosomaux (TRAVERS, 1973). Ainsi, ces observations indiquent que EF-1 $\alpha$  peut également avoir un rôle dans la régulation de la transcription.

Parmi les diverses fonctions possibles de EF-1 $\alpha$ , celle qui semble être la plus intéressante serait son implication dans le contrôle de la prolifération cellulaire et dans le vieillissement des eucaryotes supérieurs. En effet, sa surexpression semble augmenter la longévité chez *Drosophila melanogaster* (SHEPHERD et coll., 1989), tandis qu'elle rend plus susceptible à la transformation les fibroblastes de mammifères par des agents chimiques ou par ultra violet (TATSUKA et coll., 1992). Par ailleurs, il a été observé que la protéine EF-1 $\alpha$  ainsi que son activité catalytique baissent dans les fibroblastes âgés mais restent constantes dans les fibroblastes immortalisés par transformation avec le virus SV 40 (CAVALLIUS et coll., 1986). De plus, l'augmentation de l'expression de EF-1 $\alpha$  chez la levure affecte la fidélité de la traduction (SONG et coll., 1989). Il est difficile de savoir si la modification de la fidélité de la traduction ou l'une des autres fonctions supposées de EF-1 $\alpha$  est responsable de l'augmentation de la durée de vie des drosophiles et de la susceptibilité à la transformation des fibroblastes.

## 2. EF-1 $\beta\gamma\delta$

EF-1 $\beta\gamma\delta$  permet le recyclage de EF-1 $\alpha$ -GDP en EF-1 $\alpha$ -GTP. L'activité d'échange du nucléotide réside à la fois dans EF-1 $\beta$  (équivalent à EF-Ts chez les procaryotes) et EF-1 $\delta$ , qui sont deux protéines de structure et de fonction homologue (IWASAKI et coll., 1976; JANSSEN et MÖLLER, 1988a), dont les régions C terminales possèdent l'activité enzymatique (VAN DAMME et coll., 1990).

Le rôle de EF-1 $\gamma$  n'est pas encore clairement établi. Il possède un effet stimulant sur l'activité d'échange de EF-1 $\beta$ , et il montre *in vitro* une affinité pour les structures membranaires et pour la tubuline du cytosquelette, ce qui pourrait permettre l'ancrage de EF-1 sur le site de la synthèse protéique dans la cellule (JANSSEN et MÖLLER, 1988b). Par ailleurs, EF-1 $\gamma$  est phosphorylé par la p34<sup>cdc2</sup>, qui est la kinase du MPF, le facteur promoteur de la phase M (BELLE et coll., 1989). Le MPF est un régulateur de la mitose et de la progression dans le cycle cellulaire des eucaryotes, ce qui suggère la possibilité de l'implication du facteur EF-1 $\gamma$  dans la régulation du cycle cellulaire.

Enfin, une surexpression de EF-1 $\gamma$  dans des tumeurs du pancréas, dans des adénocarcinomes et adénomes du colon ainsi que dans des carcinomes gastriques et oesophagiens a été rapporté (MIMORI et coll., 1996). La surexpression de EF-1 $\gamma$  et son implication éventuelle dans la régulation du cycle cellulaire pourrait être la conséquence de la prolifération anarchique des cellules cancéreuses.

## **C. Régulation de l'élongation**

Le contrôle de la traduction est définie comme la régulation du niveau d'expression des ARNm. Ce type de contrôle agit aussi bien sur les ARNm en général que sur un groupe d'ARNm spécifiques. Le contrôle de la traduction peut s'effectuer à travers les composants de la synthèse protéique ou à travers l'ARNm lui même. La plupart des études concernant la régulation de la synthèse protéique chez les eucaryotes sont faites au niveau du stade de l'initiation. Cependant, de nombreuses études offrent une évidence claire de l'existence d'un mécanisme de régulation de l'élongation et qui peut être un point de contrôle majeur pour la synthèse protéique dans les cellules eucaryotes.

### **1. Exemples de régulation du taux d'élongation**

Le taux d'élongation polypeptidique peut varier suivant la concentration en sérum, un choc thermique, un traitement hormonal ou le stade de développement. Quelques exemples où le changement dans le taux d'élongation est clairement démontré sont présentés avec l'évidence que EF-1 est le composant limitant.

Tout d'abord, l'addition de sérum frais à une culture de cellule Hela entraîne l'augmentation du taux global de l'élongation d'un facteur 2 à 3 (NIELSEN et McCONKEY, 1980), mesuré par le temps du transit ribosomal (FAN et PENMANN, 1970). Ce temps est la durée nécessaire au ribosome afin de traverser l'ARNm pour le traduire et relâcher la chaîne polypeptidique complète. Le taux d'élongation est égal au nombre d'acides aminés du polypeptide codé par l'ARNm, divisé par le temps de transit ribosomal.

Par ailleurs, la fertilisation des oeufs d'oursin de mer s'accompagne d'une augmentation de 2 fois du taux d'élongation total (BRANDIS et RAFF, 1979; HILLE et ALBERS, 1979). De même, ce taux augmente graduellement d'environ 4 fois pendant la morphogenèse du stade levure au stade hyphe chez le champignon *Mucor Racemosus* (ORLOWSKI et SYPHERD, 1978).

D'autres exemples montrent que le taux d'élongation est modifié sur un ARNm spécifique, bien qu'un changement relativement faible du taux d'élongation global soit observé. Ainsi, un effet extrêmement sélectif a été montré dans les cultures de cellules hépatiques où l'élongation de la tyrosine aminotransférase est accélérée par un analogue de l'AMP cyclique d'un facteur 5, tandis que l'élongation des autres protéines reste inchangée (ROPER et WICKS, 1978). Enfin, l'exemple le mieux documenté d'une régulation au niveau de l'élongation concerne la traduction de l'ARNm codant pour l'HSP 70, dans les réticulocytes de poulet. Dans ce cas, l'ARNm de l'HSP 70 des cellules non stressées est présent dans les polysomes, mais est traduit très lentement, tandis qu'après un choc thermique, le blocage de l'élongation est levé afin d'augmenter l'efficacité de la synthèse de l'HSP 70 (THEODORAKIS et coll., 1988).

## **2. Mécanismes pouvant réguler le taux d'élongation**

Des évidences directes qui montrent que EF-1 est impliqué dans le contrôle de la traduction dérivent de l'étude des cellules CHO en division où le taux d'élongation est considérablement plus élevé que dans les cellules en phase stationnaire. Une augmentation de 5 fois du taux d'élongation est accompagnée par une élévation de 2.5 fois de l'activité de EF-1, aussi bien qu'une augmentation de la quantité des polysomes associés à l'ARNm traduisible (FISCHER et coll., 1980). L'activité de EF-2, des facteurs d'initiation et de terminaison, dans les extraits bruts des cellules CHO, reste cependant constante pendant cette transition

(FISCHER et coll., 1980). De plus, le retrait du sérum du milieu de culture de cellules Véro en division entraîne le déclin immédiat du taux de l'elongation, en même temps que le déclin de l'activité de EF-1, tandis que l'activité de la peptidyl transférase n'est pas altérée par la privation du sérum (HASSEL et ENGELHARDT, 1976).

En théorie, le taux d'elongation peut être régulé par des modifications ou des altérations de la concentration des composants participant au cycle de l'elongation, comme les ribosomes, les aminoacyl-ARNt synthétase, les ARNt, les facteurs d'elongation ou encore le GTP. En réalité, il y a plus d'évidence en faveur des facteurs d'elongation comme cible principale pour la régulation du taux d'elongation. Ce contrôle semble principalement s'effectuer par des réactions de phosphorylation-déphosphorylation. En effet, l'existence de quelques modifications covalentes au niveau du facteur EF-1 a été rapportée.

Les trois sous-unité  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$  sont sujets à des phosphorylations spécifiques par des kinases bien définies. EF-1 $\beta$  et EF-1 $\delta$  sont phosphorylés par la caseine kinase II (BELLE et coll, 1989; CHEN et TRAUGH, 1995). La phosphorylation de EF-1 $\beta$  chez *Artémia salina* est localisée sur la sérine 89 et a pour conséquence la baisse de l'activité d'échange du GDP sur EF-1 $\alpha$  (JANSSEN et coll., 1988c). Cette sérine est conservée dans toutes les protéines EF-1 $\beta$  et EF-1 $\delta$  séquencées jusqu'à présent appartenant au règne animal, mais n'est pas retrouvée dans les séquences de EF-1 $\beta$  et EF-1 $\delta$  des plantes. Ainsi, il semblerait, à l'exception des plantes, que la nature ait préservé la faculté aux facteurs d'échange du GDP, à être phosphorylés par la caseine kinase II, afin de servir de mécanisme de régulation au niveau du cycle d'elongation.

La sous-unité  $\gamma$ , quant à elle, est phosphorylée *in vivo* et *in vitro* chez l'ovocyte de xénophage ou chez des cellules isolées du foie de lapin, par la p34<sup>cdc2</sup>, kinase du MPF (BELLE et coll., 1989). La p34<sup>cdc2</sup> phosphoryle également la caséine kinase II et augmente ainsi son activité

*in vitro* (MULNER-LORILLON et coll., 1990). Récemment, il a été montré que EF-1 $\delta$  était lui aussi phosphorylé par la p34<sup>cdc2</sup> (MULNER-LORILLON et coll., 1994).

Ainsi, au cours de la maturation de l'ovocyte de xénope, mais également lors des divisions mitotiques des cellules somatiques de vertébrés supérieurs, le complexe EF-1 $\beta\gamma\delta$  est la cible de plusieurs kinases qui peuvent alors modifier son activité et réguler le taux d'élongation de la synthèse protéique.

Bien que EF-1 $\alpha$  soit modifié post-traductionnellement sur quelques sites, le rôle de ses modifications dans la modulation de l'activité de EF-1 $\alpha$  n'est pas encore bien établi. EF-1 $\alpha$  peut être méthylé sur différentes lysines par un ou plusieurs groupes méthyl et subit l'addition de glycerylphosphorylénthanolamine (MERRICK, 1992). L'expression de EF-1 $\alpha$  dans le cycle d'élongation semble être déterminée d'un part par le niveau de ses substrats naturels, les aminoacyl-ARNt et le GTP et d'autre part par le degré de phosphorylation des facteurs d'échanges (EF-1 $\beta\delta$ ).

En conclusion, il devient de plus en plus claire que l'étape d'élongation de la synthèse protéique est impliquée dans la régulation de la traduction. Que les facteurs d'élongation peuvent être les protéines limitantes dans ce processus devient également évident.

## CADRE ET OBJECTIFS DU TRAVAIL

Des travaux antérieurs ont permis la purification de trois protéines de *Trypanosoma cruzi* de masse moléculaire 25, 30 et 45 kDa en utilisant la chromatographie d'affinité sur colonne de glutathion agarose (PLUMAS-MARTY et coll., 1992). Le clonage moléculaire des ADNc codant pour les polypeptides de 25 et 30 kDa a montré que ces composants ne sont pas homologues avec des protéines fixant le glutathion, mais avec le facteur d'elongation 1 $\beta$  du complexe EF-1 $\beta\gamma\delta$ .

Le premier objectif de notre recherche a été de poursuivre la caractérisation de la protéine de 30 kDa et de montrer comment des molécules qui n'ont apparemment aucun lien avec le glutathion ont pu être purifiées à partir d'une colonne de glutathion agarose. La caractérisation moléculaire du polypeptide 45 kDa permettra de répondre à cette question. Par ailleurs, l'approche fonctionnelle, en utilisant les techniques de transfection chez le parasite, apporte un éclairage nouveau sur les potentialités d'action de cette protéine de 45 kDa qui s'est avérée être homologue à la sous-unité  $\gamma$  du complexe EF-1. Ceci fera l'objet de la première partie des résultats.

Le deuxième objectif portait sur la caractérisation moléculaire du gène codant pour la sous unité  $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ). L'obtention d'un anticorps anti-TcEF-1 $\alpha$  nous a permis d'aborder la localisation cellulaire de cette molécule au cours de la différenciation et de la mort cellulaire des parasites *in vitro*.

# *RESULTS*

## ARTICLE 1

**Clonage moléculaire de l'ADNc de *Trypanosoma cruzi* codant pour une protéine homologue au facteur d'elongation EF-1 $\beta$  des mammifères**

Après le passage d'un extrait parasitaire du stade épimastigote à travers une colonne de glutathion agarose, trois protéines de 25, 30 et 45 kDa ont été co-purifiées. Ces protéines ont été nommées TcGBP pour "T. cruzi glutathione binding proteins".

Un sérum de souris anti-TcGBP a été utilisé pour cribler une banque d'ADNc d'épimastigote. Plusieurs clones ont été obtenus contenant des inserts d'environ 900 pb à 1100 pb. Le séquençage de l'insert de 900 pb a indiqué la présence d'un cadre de lecture ouvert de 222 acides aminés correspondant à un polypeptide de masse moléculaire théorique de 24.4 kDa. L'interrogation des banques de données a montré une identité de 40 % avec les facteurs d'elongation EF-1 $\beta$  humain et d'*Artémia salina*. La protéine de 25 kDa a donc été appelée TcEF-1 $\beta$ .

L'insert fut sous-cloné dans le vecteur d'expression pGEX-2T ce qui a permis d'obtenir une protéine de fusion et de produire un sérum de souris anti-TcEF-1 $\beta$ . Ce sérum réagit contre deux protéines de 25 et 30 kDa sur un lysat de *T. cruzi* des formes épimastigotes et trypomastigotes. La protéine de 25 kDa correspond à TcEF-1 $\beta$  d'après la masse moléculaire déduite de la séquence en acide aminé. Les protéines de 30 et 25 kDa possèdent des épitopes communs puisqu'elles sont reconnues par le même sérum. En effet, le clone de 1100 pb a également été sequencé et a montré 89 % d'homologie avec la séquence de TcEF-1 $\beta$ . Ce clone pourrait correspondre à la molécule de 30 kDa reconnue par le sérum anti-TcEF-1 $\beta$ . Cette protéine pourrait correspondre à la sous-unité  $\delta$  du complexe EF-1 $\beta\gamma\delta$ . En effet, les auteurs qui ont purifié les facteurs EF-1 $\beta$  et  $\gamma$  d'*Artémia salina* (JANSSEN et coll., 1988b) ou de xénope (JANSSEN et coll., 1991) mentionnaient l'existence d'une troisième protéine. Le séquençage de celle-ci dans les deux espèces, montre qu'elle est très homologue dans son extrémité C-terminale à EF-1 $\beta$  et elle possède une masse moléculaire plus grande. Elle fut nommée EF-1 $\delta$ .

Dans le cas de *T. cruzi*, les régions C-terminales des protéines de 25 et 30 kDa présentent de fortes homologies. Ces observations nous incitent donc à penser que la protéine de 30 kDa pourrait être la sous-unité  $\delta$ .

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons comparé la réactivité de l'anticorps anti-TcEF-1 $\beta$  à celle de l'anti-EF-1 $\beta\gamma\delta$  de xénope vis-à-vis d'un extrait d'ovocyte de xénope. Les résultats montrent que le sérum anti-TcEF-1 $\beta$  reconnaît les bandes de 30 et 36 kDa correspondant aux sous unité  $\beta$  et  $\delta$  de xénope révélées par l'anticorps homologue. Ces résultats sont en faveur de l'hypothèse que la protéine de 30 kDa de *T. cruzi* correspond à la sous-unité  $\delta$  du complexe EF-1 $\beta\gamma\delta$ , alors que le polypeptide de 25 kDa est l'équivalent de la sous-unité  $\beta$ .

## SHORT COMMUNICATION

B. Plumas-Marty · R. Schöneck · O. Billaut-Mulot  
A. Taibi · A. Capron · M.A. Ouaissi

## Molecular cloning of a *Trypanosoma cruzi* cDNA encoding a protein homologous with mammalian elongation factor 1 $\beta$

Received: 21 December 1993 / Accepted: 20 March 1994

Elongation factors (EF) are involved in protein synthesis (Riis et al. 1990). Indeed, EF1, a major complex present in eukaryotic cells, exists as a heterooligomer consisting of subunits  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  and  $\delta$  (Merrick 1992). cDNAs corresponding to EF1 $\beta$  from human (HuEF1 $\beta$ ) and from *Artemia salina* (AsEF1 $\beta$ ) have been fully sequenced (Maessen et al. 1986; Von der Kammer et al. 1991). Moreover, sequences of *Xenopus* oocytes EF1 $\beta$  and EF1 $\delta$  have been reported (Cormier et al. 1993, Morales et al. 1992). Comparison of the amino acid sequences for *Artemia*, *Xenopus* and human EF1 $\beta\gamma$  shows that EF1 $\beta\gamma$  are highly conserved in animals.

In previous studies we reported the characterization of three *Trypanosoma cruzi* (a protozoan parasite that causes Chagas' disease) proteins (apparent molecular mass, 25, 30 and 45 kDa respectively) named TcGBP (glutathione-binding proteins; Plumas-Marty et al. 1992). For cloning of these proteins, a  $\lambda$  ZAPII cDNA library was constructed from epimastigote mRNA (Ouaissi et al. 1992) and screened after amplification with a mouse anti-TcGBP serum, permitting the molecular cloning of a parasite protein homologous to mammalian EF1 $\gamma$  (Billaut-Mulot et al. 1993). In the present paper, we report the molecular cloning and sequencing of a cDNA encoding a parasite protein homologous to mammalian EF1 $\beta$ .

The *T. cruzi* Y strain was used throughout this study. Parasite lysates were prepared as reported elsewhere (Plumas-Marty et al. 1992). Total *Xenopus* oocyte extracts were a gift from Prof. S. Guilbaut (Département de Physiologie, Université de Lille I, France). Mouse antisera directed against native TcGBP antigens and fusion protein were prepared following the immunization protocols reported elsewhere (Plumas-Marty et al. 1992). Rabbit antibodies to the EF1- $\gamma\beta\delta$  complex were kindly provided by Dr. R. Bellé (Université Pierre et Marie Curie, Paris, France).

B. Plumas-Marty · R. Schöneck · O. Billaut-Mulot  
A. Taibi · A. Capron · M.A. Ouaissi (✉)  
Laboratoire de Recherche sur les Trypanosomatidae, INSERM  
U415, Institut Pasteur, 1 rue du Pr. Calmette.  
F-59019 Lille, France

Immunoscreening of the cDNA library allowed the isolation of ten clones containing inserts of approximately 1100 bp for one of the clones, and inserts of approximately 900 bp for the others. One of the latter clones (Tc1) was selected for further study.

Nucleotide sequences were determined by the chain termination method of Sanger et al. (1977). Sequence analyses were performed using programs purchased from DNASTAR (Madison, Wis., USA). pBLUESCRIPT Tc1 cDNA was ligated into the *Sma*I site of the pGEX-2T vector (Pharmacia, Uppsala, Sweden). After transformation, selection was performed on appropriate selective media plates. Positive clones were then screened for expression and the fusion protein was purified as described elsewhere (Smith and Johnson 1988). Reactive proteins were detected by Western blotting.

The complete sequence of Tc1 is indicated in Fig. 1A. Computer analysis detected a single open reading frame of 222 amino acids. The predicted molecular mass of the parasite polypeptide is 24.4 kDa. Comparison with amino acid sequences in several data banks revealed about 40% identity with human and *A. salina* EF1 $\beta$ , mainly localized at the C-terminal domain of the proteins (Fig. 1B).

The parasite polypeptide was expressed using the pGEX-2T vector system for protein expression and purification. When lysates of *T. cruzi* epimastigotes and tryptomastigotes were used as antigens, antibodies against the fusion protein reacted with two polypeptides of 30 and 25 kDa (Fig. 2A; lanes a and b, epimastigotes and tryptomastigotes, respectively). The band of 75 kDa was considered to be non-specific, since it reacted with the control serum (Fig. 2, lane a).

It is noteworthy that the predicted molecular mass of the encoded protein is 24.4 kDa. Thus, it is likely that this polypeptide corresponds to the 25-kDa native protein revealed by the antibodies to the fusion peptide. The reactivity of antibodies with the 30-kDa polypeptide could have been due to shared epitopes between the 25- and 30-kDa proteins. This hypothesis is supported by the observation that partial sequencing of the 1100-bp clone

**Fig. 1.** **A** Nucleotide sequence of the TcEF1 $\beta$ -25 cDNA clone. Predicted stop codon is indicated by an asterisk. This sequence has been submitted to the GenBank Data library and has been assigned accession numbers L12584. **B** Comparison of amino acid sequences of TcEF1 $\beta$ -25 with those of human elongation factor 1 $\beta$  (*HuEF1 $\beta$* ) and elongation factor  $\beta$  from *Artemia salina* (*AsEF1 $\beta$* ). Alignment was done employing the program Clustal from PC GENE

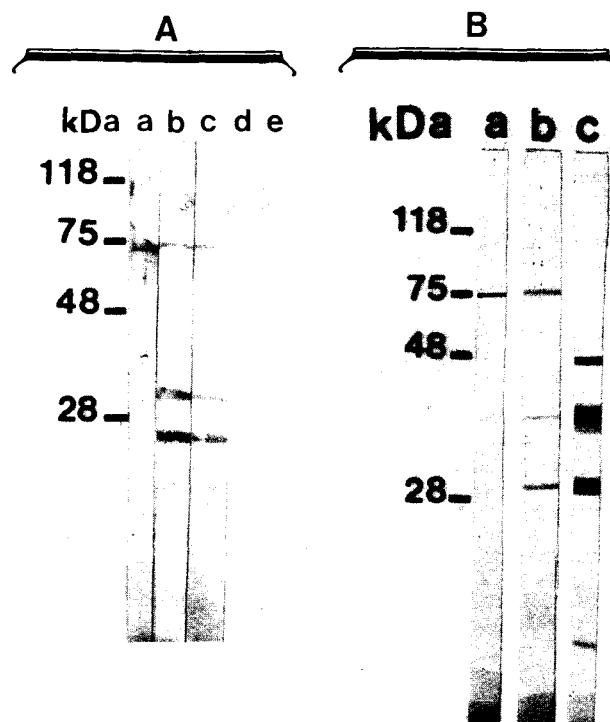
A)		
GAAAAAAAAGCCA	ATG TCT GTT AAG GAC GTC AAC AAG AGG AGC GGT GAG CTG GAG GGC AAG	
M S V K D V N K R S G E L E G K	62 16	
CTG AAG GGC AAG CTT TTT TTG GGC GGC ACA AAG CCT TCC AAA GAG GAC GTG AAG CTG TTC	122	
L K G K L F L G G T K P S K E D V K L F	36	
AAC GAC TTG CTG GGC GGC GAA AAC ACA TCC TTG TAC CTG TGG GTG AAG CAT ATG ACC TCC	182	
N D L L G A E N T S L Y L W V K H M T S	56	
TTC ACG GAG GCG GAG CCC AAC GCG TGG GGG GCC CCT GTG AAG GTT ACA GCT ACC ACT TCG	242	
F T E A E R K A W G A P V K V T A T T S	76	
GCT TCC GCT CCC GCA AAG CAG GCA CCA AAG GCG GCG TCT GCC CCC CCC AAG CAA GCC	302	
A S A P A K Q A P K K A A S A P A K Q A	96	
GAT GAA GAC GAG GAA ATT GAC CTC TTC GGG GAA GCG AGC GAG GAG GAG ACG GCT GCT CTT	362	
D E D E E I D L F G E A T E E E T A A L	116	
GAG GCC AAG AAG AAG GAC ACT GAC GCC AAG GCA AAG AAG GAG GTT ATC GCC AAA	422	
E A K K K D T D A K K A A K K E V I A K	136	
TCC TCT ATC CTG TTC GAC GTC AAG CCG TGG GAC ACC GTG GAT TTG CAG GCT CTG GCG	482	
S S I L F D V K P W D D T V D L Q A L A	156	
AAT AAG CTG CAT GCC GTT AAG CGC GAC GGC CTG CTG TGG GGC GAC CAC AAG CTG GTG CCT	542	
N K L H A V K R D G L L W G D H K L V P	176	
GTG GCA TTC GGC GTC AAG ATG CTG CAG CAG CTT ATC GTC ATT GAG GAC GAC AAG GTC TCC	602	
V A F G V K K L Q L I V I E D D K V S	196	
AGT GAT GAT TTG GAG GAA TTG ATC ATG TCG TTT GAG GAC GAA GTG CAG TCC ATG GAC ATC	662	
S D D L E E L I M S F E D E V Q S M D I	216	
GTT GCC TTG AAT AAG ATC TGA GCCTCACTGTTTCGAAAGAAAAATAAATAAATGAAAGCAA	734	
V A W N K I *	222	
AAATAAAAGTAAAGAGCAGAGTCGAGGGCTTCTGCGGATCGATGTCGTGCTCTTTTTTTTTGTTATTGAAGGCAA	813	
AAACAATTGGTCACGAAACCACCATGAGAGGGAAATATGCGCTCTGGGAAAAAA	883	
B)		
TcEF1 $\beta$	MSVKDV--NKRSGELEGKIKGKLFLIGGTKP SKEDVVL FNDLILGAENTSI-	47
HuEF1 $\beta$	MGF GDLKSPKGLQVLNDYLAIKSYI EG YVPSQADVAVFEAVSSPPPAIC	50
AsEF1 $\beta$	MANIDLKAEGKQEQLNELLANKSYILOGYEPSQEDVAAFNQLNKA PSDKF P	50
TcEF1 $\beta$	YL--WVKHMISFTEAERIKAWGAHFKVVIATT SASAPAKQAPKKAA5APAKQ	95
HuEF1 $\beta$	HALRWYNIHKSY-EKE-KASLFGVKIKALGKYGPADVEDTTGSGA-----TD	94
AsEF1 $\beta$	YLLRWYKHISSFSDAEKKG-FPGIPTSASK-----	79
TcEF1 $\beta$	ADEDDEEIDLFGEATEEEA---IPEAKKKKD TDAAKKK-EVIAKSSIIIF	141
HuEF1 $\beta$	SKDDDDIDLFGSTTEEESEEAKRLREERLAQYESKKAKKPAIVAKSSYLL	144
AsEF1 $\beta$	-EEDDDVDLFGS--DEDEEEAKIKAAERMKAYSDKKSKKPAIVAKSSVII	126
TcEF1 $\beta$	DVKPWDDTVLQLQALANKLHAVKRDGLI WGDHLKVLPVAEGVKLQOLIVIE	191
HuEF1 $\beta$	DVKPWDDDETDMAKLBECSVRSITQADGLVWGSSKLVPVCYGIKKLQIQC VVE	194
AsEF1 $\beta$	DTPKPWDDDETDMAEMEKLIVRSVQMDGLIVWGAAKLIPLAYGIKKLISIMCVVE	176
TcEF1 $\beta$	DDKVSSDILEELIIMSFEDEVQSMDINWNIKI	222
HuEF1 $\beta$	DDKVGTDMLEEQITTAFAEDYIVQSMDVAAFNKI	225
AsEF1 $\beta$	DDKVSSDILEQEKIUSEFEDFVQSVDIAAFNKV	207

revealed 89% homology to the Tc1 clone sequence over 143 amino acids (data not shown).

We further explored whether antibodies to the fusion peptide reacted against *Xenopus* oocyte extracts. As shown in Fig. 2B, (lane b), two polypeptides with an apparent molecular mass of 30 and 36 kDa, respectively, were identified. Moreover, antibodies against the *Xenopus* EF1 $\gamma$  $\beta$  $\delta$  complex revealed three components with a molecular mass of 45, 30 and 36 kDa, respectively, when they reacted with total *Xenopus* oocyte extracts (Fig. 2B, lane c). These polypeptides correspond to EF1 $\gamma$ ,  $\beta$  and  $\delta$ , respectively. These results clearly indicate that the 25- and 30-kDa parasite polypeptides share common structural domains with EF1 $\beta$  and EF1 $\delta$  subunits.

*Xenopus* EF1 $\beta$  (molecular mass, 30 kDa) and EF1 $\delta$  (molecular mass, 36 kDa) have been cloned and sequenced (Cormier et al. 1993; Morales et al. 1992). The sequences of these factors are strongly homologous and share the same function of nucleotide exchange. In the present study we identified two EF1 $\beta$ -like molecules; the 25-kDa protein could correspond to the EF1 $\beta$  subunit, whereas the 30-kDa molecule could represent the EF1 $\delta$  subunit. The reactivity of our anti-fusion protein antibodies against *Xenopus* oocyte polypeptides defined by the anti-EF1 $\gamma$  $\beta$  $\delta$  complex from *Xenopus* strongly supports this possibility. Therefore, the encoded Tc1 protein was termed TcEF1 $\beta$ -25.

The C-terminal region of TcEF1 $\beta$ -25 was homologous with the C-terminal domain from HuEF1 $\beta$  and



**Fig. 2** **A** Reactivity analysis of mouse antisera directed against fusion protein using Western blotting on epimastigote (*lanes a, b, d*) and trypomastigote (*lanes c, e*) lysate (20 µg/lane). Mouse antisera directed against fusion proteins were obtained by immunization of mice. The animals were intraperitoneally inoculated at 15 day intervals three times with 40 µg of fusion protein, in the presence of 30 µl of *Bordetella pertussis* plus alum (BpAl; Vaxicoq, Institut Mérieux, France; 4 I.U. of *B. pertussis* and 1.25 mg of aluminium hydroxide). Control sera were obtained from mice injected with BpAl alone or with *Schistosoma japonicum* 26-kDa GST (Sj26) plus BpAl (*lane a*). Serum from mice injected with BpAl alone, (*lanes b, c*), serum directed against TcEF1β-25, (*lanes d, e*) serum directed against Sj26 GST and BpAl. **B** Reactivity of antibodies to TcEF1β-25 fusion peptide (*lane b*) and rabbit polyclonal antibodies to *Xenopus* EF1-βδ complex (*lane c*) with *Xenopus* oocytes lysate (*lane a*), serum from mice immunized with BpAl alone.

AsEF1β, whereas the N-terminal regions of these proteins were non-homologous (approximately 20% homology on the overall sequences). Recent studies have demonstrated that the catalytic domain of AsEF1β resides in the C-terminal domain of the molecule (Van Damme et al. 1990). These regions are therefore expected to be more highly conserved. Phosphorylation of AsEF1β by an endogenous kinase affects its catalytic activity. The target for phosphorylation is residue serine 89 located in the DFLGS<sub>89</sub>DEEDEE motif containing a critical sequence for casein kinase II type substrate recognition (Janssen et al. 1988). The corresponding region of TcEF1β-25 shares homology with this motif, but no serine was found in this region. However, in the case of EF1β from wheat embryos, a threonine is supposed to be phosphorylated. The two threonine residues, located in positions 109 and 113 for TcEF1β-25, could be candidates for such phosphorylation.

TcEF1β-25 did not share any significant homology with glutathione S-transferases. However, in a recent

study we cloned and sequenced the 45-kDa component comprising TcGBP and found that the protein was homologous to mammalian EF1γ (Billaut-Mulot et al. 1993). Moreover, the alignment of certain GST sequences with that of TcEF1γ clearly shows conserved amino acid residues within the N-terminal domain of the protein, including those playing a role in glutathione (GSH) binding (Shöneck et al. manuscript in preparation). This shared homology between TcEF1γ and GSTs may account for the binding of the TcGBP complex to GSH columns.

In the present work we obtained and expressed a novel *T. cruzi* protein corresponding to the 25-kDa molecule named TcEF1β, which is expected to be the elongation factor implicated in the elongation step of the protein synthesis. Further studies are needed to characterize the 30-kDa component and to analyse the functional properties of these molecules.

**Acknowledgements** This work was supported by INSERM, the European Economic Community and the Mérieux Foundation.

## References

- Billaut-Mulot O, Pommier V, Schöneck R, Plumas-Marty B, Taibi A, Loyens M, Capron A, Ouaissi MA (1993) Nucleotide sequence of a *Trypanosoma cruzi* cDNA encoding a protein homologous to mammalian EF1γ. *Nucleic Acids Res* 21: 16
- Cormier P, Osborne HB, Morales J, Bassez T, Minella O, Poulhe R, Bellé R, Mulner-Lorillon O (1993) Elongation factor 1 contains two homologous guanine-nucleotide exchange proteins as shown from the molecular cloning of beta and delta subunits. *Nucleic Acids Res* 21: 743
- Janssen GMC, Maessen GDF, Amons R, Möller W (1988) Phosphorylation of elongation factor 1beta by an endogenous kinase affects its catalytic exchange activity. *J Biol Chem* 263: 11063–11065
- Maessen GDF, Amons R, Maassen JA, Möller W (1986) Primary structure of elongation factor 1β from *Artemia*. *FEBS Lett* 208: 77–83
- Merrick W (1992) Mechanisms and regulation of eukaryotic protein synthesis. *Microbiol Rev* 56: 291–315
- Morales J, Cormier P, Mulner-Lorillon O, Poulhe R, Bellé R (1992) Molecular cloning of a new guanine nucleotide-exchange protein, EF1δ. *Nucleic Acids Res* 20: 4091
- Ouaissi MA, Aguirre T, Plumas-Marty B, Piras M, Schöneck R, Gras-Masse H, Taibi A, Loyens M, Tartar A, Capron A, Piras R (1992) Cloning and sequencing of a 24 kDa *Trypanosoma cruzi* specific antigen release in association with membrane vesicles and defined by a monoclonal antibody. *Biol Cell* 75: 11–17
- Plumas-Marty B, Verweerde C, Loyens M, Velge P, Taibi A, Cesbron MF, Capron A, Ouaissi MA (1992) *Trypanosoma cruzi* glutathione-binding proteins: immunogenicity during human and experimental Chagas' disease. *Parasitology* 104: 87–98
- Riis B, Rattan SIS, Clark BFC, Merrick WC (1990) Eukaryotic protein elongation factors. *TIBS* 15: 420–424
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463–5467
- Smith DB, Johnson KS (1988) Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* 67: 31–38
- Van Damme HTF, Amons R, Karssies R, Timmers CJ, Janssen GMC, Möller W (1990) Elongation factor 1β in *Artemia*: localization of functional sites and homology to elongation factor 1δ. *Biochim Biophys Acta* 1050: 241–247
- Von der Kammer H, Klaudiny J, Zimmer M, Scheit KH (1991) Human elongation factor 1β: cDNA and derived amino acid sequence. *Biochem Biophys Res Commun* 177: 312–317

## **ARTICLE 2**

**Séquence nucléotidique de l'ADNc de *Trypanosoma cruzi*  
codant pour une protéine homologue au facteur d'elongation  
1 $\gamma$  des mammifères.**

Parmi les trois protéines parasitaires initialement co-purifiées sur colonne de glutathion-agarose, deux ont été identifiées, celle de 25 kDa correspond au facteur d'elongation 1 $\beta$  et celle de 30 kDa à la sous-unité  $\delta$  du complexe EF-1 $\beta\gamma\delta$ .

Afin d'identifier le troisième composant de masse moléculaire 45 kDa, un double criblage de la banque d'ADNc d'épimastigote a été réalisé. Tout d'abord, le sérum anti-TcGBP qui reconnaît les trois protéines de 25, 30 et 45 kDa a permis d'obtenir 17 clones positifs. Parmi ces clones, un seul clone était négatif vis-à-vis d'un immunsérum anti-protéine de fusion 25 et 30 kDa. Ce clone pouvait donc correspondre à la protéine de 45 kDa.

Le séquençage complet de ce clone de 1400 pb indique un cadre de lecture ouvert de 411 acides aminés correspondant à un polypeptide d'une masse moléculaire théorique de 46.6 kDa. L'interrogation de la banque de donnée a montré une homologie d'environ 60 % et une identité de 30 % avec la sous-unité  $\gamma$  de EF-1 humain et d'*Artémia salina*. Cette homologie n'est pas vraiment surprenante étant donné que les protéines co-purifiées sont homologues aux sous-unité  $\beta$  et  $\delta$  du facteur d'elongation EF-1 qui est présent dans le cytoplasme sous forme de complexe EF-1 $\beta\gamma\delta$ .

Ainsi, les trois protéines parasitaires co-purifiées sur colonne de glutathion-agarose correspondent au complexe EF-1 $\beta\gamma\delta$  du cycle d'elongation de la synthèse protéique.

## Nucleotide sequence of a *Trypanosoma cruzi* cDNA encoding a protein homologous to mammalian EF1 $\gamma$

O.Billaud-Mulot, V.Pommier, R.Schöneck, B.Plumas-Marty, A.Taibi, M.Loyens, A.Capron and M.A.Ouaissi\*

Research Laboratory on Trypanosomatids, INSERM U167 Institut Pasteur, 1 rue du Pr. Calmette, 59019, Lille, France

Received June 7, 1993; Accepted June 11, 1993

GenBank accession no. L17307

Elongation factor (EF1) participates in protein synthesis by binding aminoacyl-tRNA to 80S ribosomes with the hydrolysis of GTP. EF1 is a major complex in eukaryotic cells. It is composed of subunits  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  of molecular mass 50 kDa, 30 kDa and 48 kDa respectively (1). Following an immunoscreening of a lambda ZAPII *Trypanosoma cruzi* epimastigote cDNA library, using antibodies against three parasite proteins of molecular mass 45, 30 and 25 kDa eluted from glutathione-agarose column (Tc GBP), we could identify two cDNA clones, corresponding to the 30 and 25 kDa proteins, highly homologous in both their nucleic acid and amino acid sequences. Sequence analysis of the clones revealed 40% homology with elongation factor  $\beta$  from both *Artemia Salina* and human (2). Both cloned proteins were expressed by *T.cruzi* developmental stages and each was translated by a different length mRNA. Therefore, the proteins were termed TcEF-1 $\beta$ 25 and TcEF-1 $\beta$ 30. The nature of the 45 kDa protein comprising TcGBP remains unknown. In order to identify the cDNA clones corresponding to this protein, we used a double immunoscreening strategy that allowed us to isolate a cDNA clone corresponding to the 45 kDa protein.

The cDNA expression library was screened, first using anti-TcGBP immunoserum which reacted against three major components of molecular mass 45, 30 (TcEF-1 $\beta$ 30) and 25 kDa (TcEF-1 $\beta$ 25). We could isolate 17 positive clones which were further reacted with anti-TcEF-1 $\beta$  25/30 immune sera. One clone which did not react with anti-TcEF-1 $\beta$ 25/30 was selected and sequenced by Automated Laser Fluorescent ALF DNA Sequencer (Pharmacia) using Auto Read™ sequencing kit.

Computer analysis detected a single open reading frame of 419 amino acids beginning by the initiation codon ATG at nucleotide 25 and terminating by TGA at nucleotide 1258. The predicted molecular mass of the 411 amino acids parasite polypeptide is 46.6 kDa.

Screening of GeneBank database for sequences related to that of the clone under study revealed that the gene was not previously identified and that the encoded protein shares significant homology with *Artemia* (3) and human EF-1 $\gamma$  (4). The degree of identity of TcEF-1 $\gamma$  polypeptide to human EF-1 $\gamma$  is 31.3% and 29.3% with *Artemia* EF-1 $\gamma$ . When conservative replacements are included in the calculation, the similarity is 62.4% and 60.2%, respectively. The overall homology is of the same order as that observed between EF-1 $\beta$  proteins of different species and

TcEF-1 $\beta$  25 and 30 (2). The homology in the latter is mainly observed in the C-terminal domain, whereas in EF-1 $\gamma$ , the homology is spread over the sequence.

In some species, EF-1 $\gamma$  is phosphorylated by a cell division-controlled protein kinase, p34<sup>cdc2</sup> (5). The recognition sequence for p34<sup>cdc2</sup> kinase is a proline residue immediately following a serine or threonine residue (6). Three putative phosphorylation sites at position 51 (CSPC), at position 90 (RTPL) and at position 265 (PSPF) were found in TcEF-1 $\gamma$  sequence.

The single methionine at position 1 is preceded by nucleotides (ACGCCATG) that conform well to the general translation initiation consensus sequence (CCA/GCCATG) established by Kozak for eukaryotes (7). In yeast, many of the genes encoding transcription and translation factors possess conserved sequences in their 5' untranslated regions (8, 9) which are thought to function as transcriptional promoters and enhancers. Two such consensus sequences derived from ribosomal protein genes have been defined: HOMOLI (AACATCC/TG/ATA/GCA) (10) and RPG (ACCCATACATT/CT/A) (11). Careful examination of the 5' non-coding region of TcEF-1 $\gamma$  indicates the presence of a potential RPG sequence (ATACACA) at position 2 of the nucleic acid sequence. Further biochemical and immunological characterization of TcEF-1 $\gamma$  protein is currently under investigation.

## REFERENCES

- Moldave,K. (1985) *Annu. Rev. Biochem.* **54**, 1109–1149.
- Plumas-Marty,B., Schöneck,R., Taibi,A., Plumas,J., Verwaerde,C., Pommier,V., Gras-Masse,H., Diesis,E., Tartar,A., Capron,A. and Ouaissi,M.A. (unpublished). L12583 and L12584.
- Maessen,G.D.F., Amons,R., Zeelen,J.P. and Moller,W. (1987) *FEBS Lett.* **223**, 181–186.
- Sanders,J.J., Maassen,T.J. and Moller,W.W. (unpublished). Z11531.
- Janssen,G.M.C., Morales,J., Schipper,A., Labbes,J.C., Mulner-Lorillon,O., Belle,R. and Moller,W. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 14855–14888.
- Draette,G. (1990) *Trends Biochem. Sci.* **15**, 378–383.
- Kozak,M. (1984) *Nucleic Acids Res.* **12**, 857–871.
- Rotenberg,M.O. and Woolford,J. (1986) *Mol. Cell. Biol.* **6**, 674–687.
- Huet,J., Cottrelle,P., Cool,M., Vignais,M., Thiele,D., Marck,C., Buhler,J., Sentenac,A. and Fromageot,P. (1985) *EMBO J.* **4**, 3539–3547.
- Teem,J., Abovich,N., Kaufer,N., Schwindinger,W., Warner,J., Levy,A., Woolford,J., Leer,R., Van Raamdonk-Duin,M., Mager,W., Planta,R., Schultz,L., Friesen,J., Fried,H. and Rosbash,M. (1984) *Nucleic Acids Res.* **12**, 8295–8311.
- Leer,R.J., Van Raamdonk-Duin,M., Mager,W. and Planta,R. (1985) *Curr. Genet.* **9**, 273–277.

\* To whom correspondence should be addressed

## ARTICLE 3

**Caractérisation moléculaire et immunologique d'une protéine de *Trypanosoma cruzi* homologue au facteur d'elongation 1 $\gamma$  des mammifères**

Nous avons complété l'étude du composant de 45 kDa homologue au facteur d'elongation EF-1 $\gamma$  (TcEF-1 $\gamma$ ) par des approches moléculaires et immunologiques.

Le profil d'hybridation de la sonde TcEF-1 $\gamma$  sur l'ADN génomique digéré par différentes enzymes de restriction suggère que cette protéine est codée par un seul gène. Par ailleurs, l'analyse en Northern blot a montré que le transcrit du gène *TcEF-1 $\gamma$*  est présent dans les trois stades de développement du parasite: épimastigote, amastigote et trypomastigote.

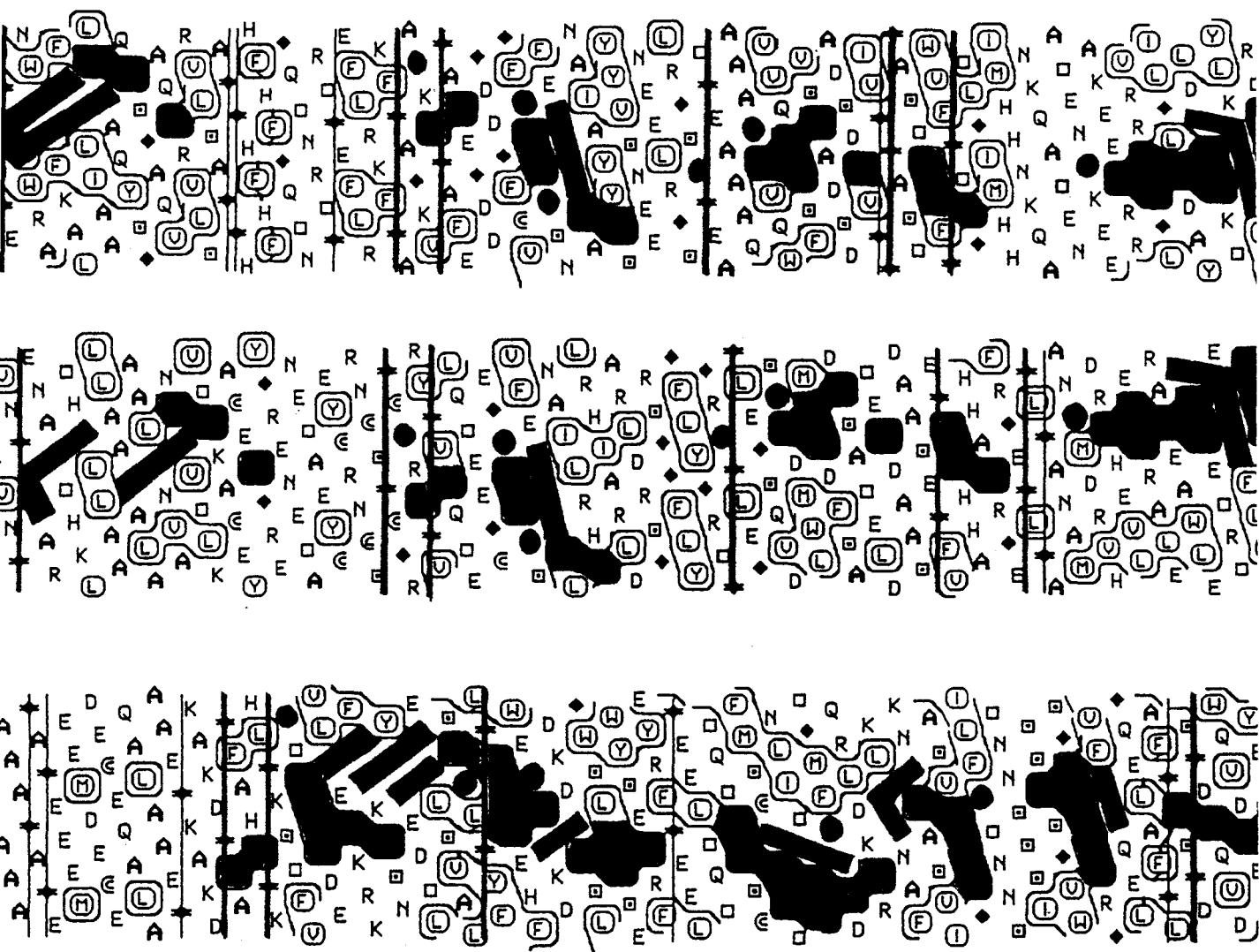
Afin d'obtenir une grande quantité de protéine TcEF-1 $\gamma$ , nous avons sous-cloné l'ADNc correspondant dans le vecteur d'expression pGEX-4T-3. La protéine de fusion Sj26/TcEF-1 $\gamma$  fut produite et injectée au lapin pour préparer un sérum spécifique. Ce sérum reconnaît en Western blot sur un extrait total d'épimastigote deux protéines, une à 48 kDa et une autre à 24.4 kDa. La bande à 48 kDa correspond à TcEF-1 $\gamma$  entière, tandis que celle de 24.4 kDa représente un produit de clivage. En effet, EF-1 $\gamma$  est très sensible à la protéolyse du fait de la présence d'un domaine hydrophile dans la région centrale de la protéine. Ce clivage a été observé dans le cas d'autres EF-1 $\gamma$  de différentes espèces et nous l'avons également retrouvé après avoir fait réagir en Western blot vis-à-vis d'un extrait total de macrophage J774 de souris notre sérum anti-TcEF-1 $\gamma$ . Ces résultats indiquent l'existence d'épitopes communs entre TcEF-1 $\gamma$  et EF-1 $\gamma$  murin.

L'élution des trois protéines TcEF-1 $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$  à partir d'un extrait parasitaire passé sur colonne de glutathion, nous a amené à rechercher un lien éventuel avec les protéines fixant le glutathion. Aucune homologie entre les molécules TcEF-1 $\beta$  (25 kDa) et  $\delta$  (30 kDa) et de telles protéines n'a été observée. En revanche, la protéine TcEF-1 $\gamma$

possède des homologies dans son extrémité N-terminale avec différentes GSTs (glutathione S-transferases). Il est en particulier intéressant de noter que les résidus impliqués dans la fonction enzymatique sont conservés. Ces observations ont également été rapportées pendant la même période, par d'autres auteurs qui par ailleurs, ont utilisé la séquence TcEF-1 $\gamma$  dans leur analyse comparative des séquences de EF-1 $\gamma$  de diverses espèces avec celles des GSTs (KOONIN et coll., 1994).

Ces résultats nous incitent à penser que la protéine TcEF-1 $\gamma$  a une affinité pour le glutathion et que les protéines TcEF-1 $\beta$  et  $\delta$  qui sont associées dans le complexe TcEF-1 $\beta\gamma\delta$  sont co-éluées sur colonne de glutathion-agarose.

# Biology of the Cell



EDITED BY THE SOCIETE FRANÇAISE DE  
MICROSCOPIE ELECTRONIQUE AND THE  
SOCIETE DE BIOLOGIE CELLULAIRE DE  
FRANCE, UNDER THE AUSPICES OF THE  
EUROPEAN CELL BIOLOGY ORGANIZATION.

# Molecular and immunological characterization of a *Trypanosoma cruzi* protein homologous to mammalian elongation factor 1 gamma

Odile Billaut-Mulot, Ralf Schöneck, Rodolfo Fernandez-Gomez,  
Ali Taibi, André Capron, Valérie Pommier,  
Béatrice Plumas-Marty, Marc Loyens, Ali Ouaissi\*

Laboratoire de Recherche sur les Trypanosomatidae, INSERM U 415, Institut Pasteur,  
1, rue du Pr Calmette, 59019 Lille, France

(Received 27 July 1994; accepted 26 October 1994)

**Summary** – In previous studies, we reported the characterization of three *Trypanosoma cruzi* proteins with molecular masses of 45, 30 and 25 kDa eluted from a glutathione agarose column (these proteins were named TcGBP). Using antibodies against TcGBP native proteins we could isolate from a lambda ZAPII epimastigote cDNA library cDNA clones encoding the 30 and 25 kDa proteins. Comparison of the two sequences with amino acid sequences in several data banks revealed that both protein sequences were highly homologous to human and *Artemia salina* elongation factor 1 $\beta$ . Thus, the proteins were named TcEF-1 $\beta$  25 and TcEF-1 $\beta$  30. In the present study we used a double immunoscreening strategy that allowed us to isolate a cDNA clone corresponding to the 45 kDa protein. The protein sequence revealed 31% identity and 61% homology with human and *Artemia salina* EF1 $\gamma$  and therefore was named TcEF-1 $\gamma$ . Moreover, three putative phosphorylation sites at position 51 (CSPC), at position 90 (RTPL) and at position 265 (PSPF) were found in the TcEF-1 $\gamma$  sequence. These sites are compatible with the notion that TcEF-1 $\gamma$  could be the target of phosphorylation by protein kinase(s). Random primed cDNA hybridized with a single 1.4 kb mRNA found in epimastigote, trypomastigote and amastigote forms. In addition, Southern blot analysis of genomic DNA suggested that the protein is encoded by a single gene. The TcEF-1 $\gamma$  cDNA was subcloned into the pGEX-4T-3 vector for expression in *Escherichia coli*. Antibodies against the fusion peptide allowed us to identify the weight sizes of the native protein (48 kDa) and its major degradation product (24.4 kDa) which are in close agreement with those of EF1 $\gamma$  from *Artemia salina* and *Schizosaccharomyces pombe*. These antibodies reacted against macrophage cell line J774 extracts which indicates that EF1 $\gamma$  epitopes were conserved throughout evolution.

*Trypanosoma cruzi* / elongation factor / EF-1 $\gamma$  / glutathione S-transferase

## Introduction

Elongation factor (EF-1) participates in protein synthesis by binding aminoacyl-tRNA to 80S ribosomes with hydrolysis of GTP [13]. EF-1 $\beta\gamma$  facilitates the nucleotide exchange of EF-1 $\alpha$ -GDP to EF-1 $\alpha$ -GTP. Moreover, biochemical studies have suggested that guanine nucleotide transferase activity is mediated by the  $\beta$  subunit [3, 6], whereas the  $\gamma$  subunit might function as a catalyst [7]. Other studies have shown that phosphorylation of EF-1 $\beta$  by casein kinase II leads to a decrease in GDP exchange rate of EF-1 [8]. In addition, phosphorylation of EF-1 $\gamma$  by p34<sup>cdc2</sup> kinase occurs at the entry of M-phase of the cell cycle in *Xenopus* oocytes [1, 9]. Furthermore, EF-1 $\gamma$  has been shown to be highly associated with membrane and cytoskeleton structures. This interaction raised the hypothesis that EF-1 $\gamma$  could be involved in directing components of the protein synthetis

apparatus towards the three-dimensional cytoplasmic structure of the cell [7].

The protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas' disease, replicates as epimastigote in the midgut of its insect vector and transforms into infective metacyclic trypomastigotes in the hindgut. In the mammalian host, the parasite cycles between intracellular reproductive amastigotes and the released infective trypomastigote forms. Apart from the preliminary observation of TcEF-1 $\gamma$  [2] and TcEF-1 $\beta$  [19], no evidence documenting the existence of either EF-1 $\beta$  or  $\gamma$  in Kinetoplastidae has yet been reported. In this paper we present detailed analysis of *T. cruzi* cDNA encoding TcEF-1 $\gamma$  homologue and show that antibodies to the fusion peptide reacted against macrophage cell line J774 extracts, suggesting therefore that the EF-1 $\gamma$  is highly conserved across evolution.

## Materials and methods

### Parasites and antigens

The *T. cruzi* Y strain was used throughout this study. *T. cruzi* trypomastigotes, extracellular amastigotes and epimastigotes were obtained according to previously described procedures [15, 24]. Parasite lysates and macrophage cell line J774 extracts were prepared as reported elsewhere [16].

\* Correspondence and reprints

Abbreviations: *T. cruzi*, *Trypanosoma cruzi*; EF, elongation factor; TcEF-1 $\gamma$ , *Trypanosoma cruzi* protein homologous to mammalian EF-1 $\gamma$ ; GST, glutathione S-transferase; TcGBP, *Trypanosoma cruzi* glutathione binding protein; Sj26, *Schistosoma japonicum* GST 26.

## Antibodies

Rat antibodies against a complex of three parasite proteins with molecular masses of 25, 30 and 45 kDa named TcGBP and rabbit antibodies to a mixture of 25 and 30 kDa proteins (TcEF-1 $\beta$  25- $\beta$  30), produced in pGEX-2T vector as fusion peptides with *Schistosoma japonicum* glutathione S-transferase (Sj26), were obtained as described [18, 19]. After the double immunoscreening strategy (see below), pBluescript inserts coding for the 45 kDa protein (TcEF-1 $\gamma$ ) were subcloned into *Eco*RI, *Xba*I restriction sites of pGEX-4T-3 (Pharmacia, Uppsala, Sweden) vector. The fusion proteins were purified as described [20]. Rabbits were inoculated intradermally by Vaitukaitis *et al*'s method [22] with 800  $\mu$ g of fusion protein in saline solution (500  $\mu$ l) mixed with Freund complete adjuvant (500  $\mu$ l). The animals were bled four weeks later. Control sera consisted of pre-immune rabbit serum and sera from rabbits immunized with Sj26 protein.

## Preparation of cDNA libraries and characterization of cDNA encoding the 45 kDa component

A cDNA expression library was constructed using lambda ZAP II cDNA cloning kit and Gigapack Gold Kit (Stratagene, La Jolla, CA) as described previously [17]. The cDNA library was first screened with anti-TcGBP immune serum. The positive clones were then re-screened using anti-TcEF-1 $\beta$  25- $\beta$  30 immune serum. Among 17 anti-TcGBP positive clones, one clone did not react with anti-TcEF-1 $\beta$  25- $\beta$  30 immune serum. This clone was excised *in vivo* directly into pBluescript by using the helper phage R408. After *Eco*RI and *Xba*I digestion, the size of the cDNA insert was determined in 1% agarose gel.

## RNA and DNA blot hybridization

RNA and DNA blot hybridization were carried out as described [17].

## Immunoblotting

Immunoblotting was performed using as antigens parasite and macrophage cell line J774 extracts. The antigens were fractionated by SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) electroblotted onto nitrocellulose, and then incubated with the immune or control sera. The detection was done using specific peroxidase-labeled anti-rabbit IgG (Diagnostics Pasteur, Marnes la Coquette, France) and 4-chloro-1-naphthol. In the case of macrophages, peroxidase activity was revealed by enhanced chemiluminescence (ECL) detection system according to the manufacturer's instruction (NEN, Dupont).

## Results and discussion

Figure 1 shows the deduced amino acid sequence of cDNA clone encoding TcEF-1 $\gamma$ . The predicted molecular mass of the 411 amino acid parasite polypeptide is about 46.6 kDa. Random primed DNA insert of the cDNA clone was used to probe a Northern blot of epimastigote, trypomastigote and amastigote RNA. A band of 1400 bp was detected in the three parasite forms (fig 2). The size of the positive transcript indicates that the sequenced cDNA is near a full-length clone.

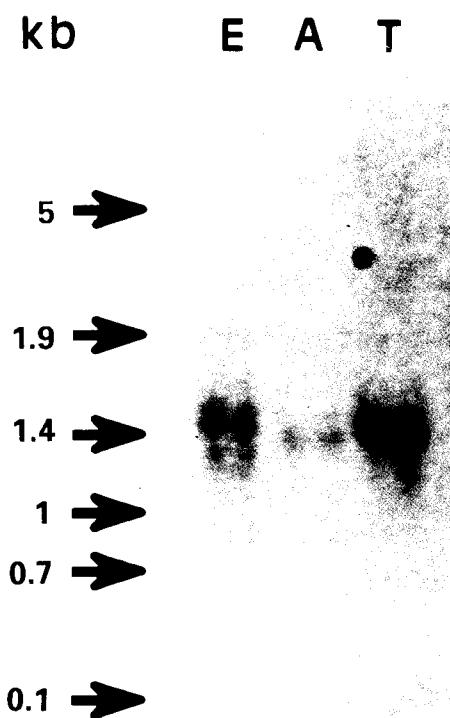
Epimastigote genomic DNA was digested with different restriction enzymes. The resulting fragments were then hybridized with labeled cDNA in order to determine if the cloned cDNA corresponds to a single-copy gene. As shown in figure 3, the cDNA hybridized to one fragment when using *Bam*H I (D), *Xba*I (E) and *Eco*RI (F) which did not cleave the insert. Two fragments were detected with *Bgl*I (C) and *Sma*I (A) for which a single restriction site was predicted by the cloned cDNA and three fragments

<del>AATACAC</del>	CAAGCACACATA	CGCCATGTCGCTCACGCTGTGGAGCGGTGTGAACCCCGAG	60
	M S L T L W S G V N P E	(12)	
AACGCACG	CACGCAACAGCTTCTGGCTGCTGGCCCTCGAACGGTGGCTGACGCTG	120	
N A R T H K L L A A A A A L A N V A V T L	(32)		
AAGGCCTGCGAGTACGGCCGCGAGAACGAGACGGGAGGACTGCTGCCAATCGCAGCCC	180		
K A C E Y G R E N E T A E Y C R N C S P	(52)		
TGCGCCGCTACCCCGTGCAGACGGAGGGCTGGCTGGAGTCCAACGCCATC	240		
C G R Y P V L Q T E E G C V F E S N A I	(72)		
CTGCGCACATCGCGCGCTTGACCGGAGCGGGCGCTCTGTACGGCCGACGCCG	300		
L R H I A R L D R S G G F L Y G R T P L	(92)		
GAGGGCAGCCAGGTGGACATGTCGACTTTGCACGGAGCTGGACGCTGCTCC	360		
E G S Q V P D M W L D F S A T E L D A S	(112)		
GAACCGTTCTGACCACGCCCTTCGGCTGGAGGCCGTGCCGCCAACCGATGGACGCC	420		
E P F V H H A P R G E P L P A N A M D R	(132)		
GTGACACGAGCTCTGGCTGGCTGGAGGACTGACGAAGACTACGGAAACGGTACCCGCTGTACAAC	480		
V H E V L R A L E A W L E T R T F L V G	(152)		
GAGCGCATGACGCTTGTGGACGTTGGCTTGGCTGCAATGGCACTACCGCTCTG	540		
E R M T V A D V A V A F A L Q W H Y R L	(172)		
AACGGCCGGAGGGAGAGGCACTGACGAAGACTACGGAAACGGTACCCGCTGTACAAC	600		
N G A E G E A L T K K Y R N A Y R L Y N	(192)		
ACGGTGTGACGAGCCGAAGACGGTGGAGGTGCTGGCTGCCAGGGTGCACGTTGGC	660		
T V M Q P K T V E V L R S Q G A T F G	(212)		
GCCCCGTGAAGCCGGAGCGAAAGGGCAAGGACCGCCGTGCCGCCGCCGGCAGAGAAGAA	720		
A R E G G A K G Q G R G C A R P G R E E	(232)		
GCCGAACGCCGCCCTGCTGTGTGATGGTGCAGGGAGGACGAGGCCGAGGGAG	780		
A E R A A A A A D G A E E E D E A P R E	(252)		
AAGAAGAAGCCGAACCCGCTGGACAGCTGGCCGCCAGCCCTTTCGTGCTGGACGATTTC	840		
K K K P N P L D E L P P S P F V L D A F	(272)		
AAGCGCAGTACAGCACACGGACACCCCGACGGTGTGCTGCCGTACTCTTCCACGAC	900		
K R E Y S N T D T R T V A A P Y F P Q H	(292)		
TACGACGCCGCCCTACAGACGCTTCTGCTGCGCTCACAACTACAGAACGAGAACAAAG	960		
Y D A A G Y T T F W C R Y K Y N E D N K	(312)		
ATGCAGTTCTGACGCCAACCTGATCCGGGTGTTCCAGCGCATGGACGCTGGC	1020		
M Q F M T A N L I R G W F Q R M E H V R	(332)		
AAAGTACCGCTTCCGGCTTGGACTCATCATTCGGGAGGAGGGCGCACAGCATGGTGGCG	1080		
K Y A F G V A L I I G E E R R H D I V A	(352)		
CTGTCGGTGTCTCCGGCCGGCATGCCGAGGCTGTGGCTGGAGGACGACGGAG	1140		
L W V F R G R G M P A I V E D V T E	(372)		
CTGTCGACTGGAGGGAGGTCGCTGACGTGCGGCCGAGCGGGAGGCCATCACGGACTAC	1200		
L F D W E E V A D V A A Q R E R I T D Y	(392)		
CTGTCGTCGGAGGGCCGACGATCCGGAGGCTGTGGCTGGAGGGCGTGTCAAGTCA	1260		
L S W E G P T I P R P V L E G R V F K *	(411)		
GCGTGGCGTGTGGTGGAGGGACGGACTAGAGAAAATAACGGTAATAGTAACTGTGGGGT	1320		
GTGAGGAACGGGACAAGGGCAGGGAGGACTCCTTTTTTTCTTTTAAAAAA	1380		
AAAAAAAAAAAAAA	1398		

**Fig 1.** Nucleotide and deduced amino acid sequences of TcEF-1 $\gamma$ . The ORF is shown in phase with  $\beta$ -galactosidase below the nucleotide sequence and the TGA termination codon is denoted by an asterisk (\*). The Kozak sequence and putative phosphorylation sites are underlined and the putative RPG consensus sequence is boxed. The nucleotide sequence was done by Automated Laser Fluorescent AFL. DNA Sequencer (Pharmacia) using Auto Read™ sequencing kit. The GeneBank accession number is L17307.

with *Apal* (B) for which two restriction sites were predicted by the cloned cDNA. Two restriction sites were predicted for *Pst*I (G) separated by 25 bp which explained the detection of only two fragments. These results strongly indicate that the cloned cDNA corresponds to a single-copy gene.

The overall similarity (about 61%; fig 4) shown between TcEF-1 $\gamma$  and mammalian EF-1 $\gamma$  is of the same order as that observed between EF-1 $\beta$  proteins of different species and a *T. cruzi* protein homologous to mammalian elongation factor 1 $\beta$  (TcEF-1 $\beta$ 25 and TcEF-1 $\beta$ 30) [19]. Moreover, three putative recognition sequences for p34<sup>cd2</sup> kinase were present in TcEF-1 $\gamma$ , respectively at positions 51 (CSPC), 90 (RTPL), and 265 (PSPF) (fig 1). However, the two internal repeats present in AsEF-1 $\gamma$  which could be part of a binding motif for EF-1 $\beta$  and EF-1 $\delta$  [23], were not observed in TcEF-1 $\gamma$ . Although the general translation initiation consensus sequence (CCA/GCCATG) established by Kozak [10] for eukaryotes is somehow controver-



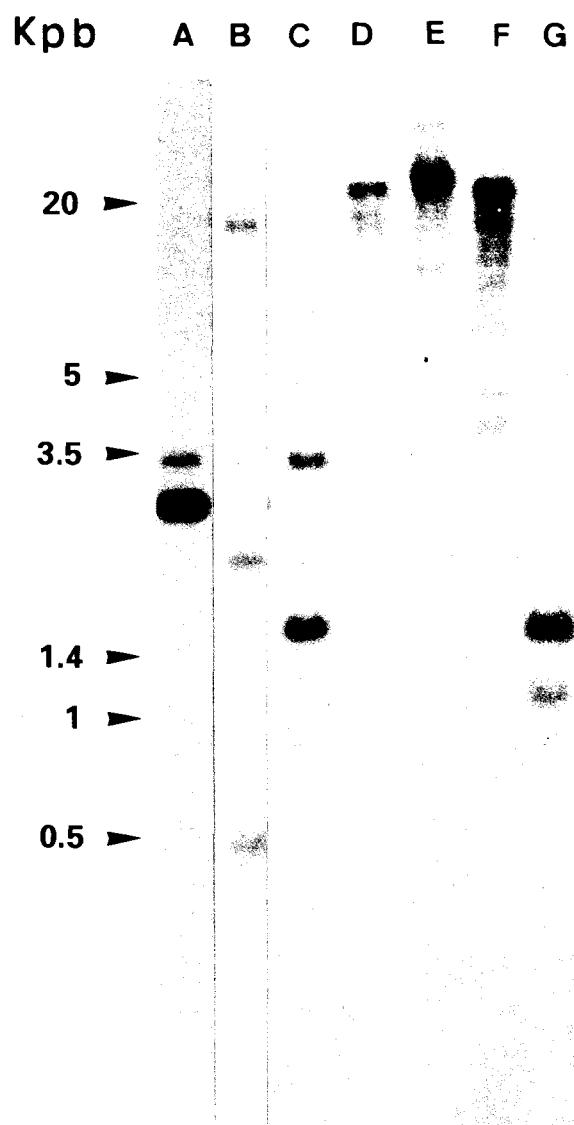
**Fig 2.** Total RNA (10  $\mu$ g) of trypomastigote (T), amastigote (A) and epimastigote (E) was hybridized with *TcEF-1 $\gamma$*  labeled cDNA.

sial, such a sequence (ACGCCATG) motif was found in *TcEF1- $\gamma$*  sequence. Moreover, the 5' non-coding region contains a potential ribosomal protein gene sequence (RPG) (ATACACA) [11] at position 2. This RPG sequence has been detected in the 5' untranslated region of most of the yeast ribosomal protein genes examined. Studies on yeast have shown the presence of DNA binding activity interacting specifically with RPG sequences [5]. Whether this sequence functions to exert control over *TcEF-1 $\gamma$*  gene expression is not known.

We further compared *TcEF-1 $\gamma$*  sequence with that of *HuEF-1 $\gamma$*  using the hydrophobic cluster analysis (HCA) [4]. Figure 5 shows a close correspondence of the arrangement of hydrophobic clusters and proline residues. Moreover, the hydrophilic region was clearly evidenced in the two sequences. In our original study, we have isolated *TcGBP* antigens using binding to glutathione matrix [19]. Comparison of *TcEF-1 $\gamma$*  sequence with available nucleotide or amino acid sequences corresponding to proteins related to the glutathione cycle including GSTs, revealed some limited similarity (30%) between *TcEF-1 $\gamma$*  and fruit fly GST27 (data not shown). This might be responsible for the complex binding to glutathione.

The *TcEF-1 $\gamma$*  cDNA was subcloned into the pGEX-4T-3 expression vector. The *Schistosoma japonicum* 26 kDa glutathione S-transferase (Sj26) and the *TcEF-1 $\gamma$ /Sj26* fusion protein were produced and purified on glutathione-agarose beads.

Anti-*TcEF-1 $\gamma$*  rabbit immune serum strongly recog-



**Fig 3.** Genomic Southern-blots suggest a unique *TcEF-1 $\gamma$*  gene: 10  $\mu$ g DNA/lane digested with *Sma*I (A), *Apa*I (B), *Bgl*II (C), *Bam*HI (D), *Xba*I (E), *Eco*RI (F) and *Pst*I (G), and probed with labeled *TcEF-1 $\gamma$* cDNA.

nized the *TcEF-1 $\gamma$ /Sj26* fusion peptide (data not shown). Furthermore, antibodies to *TcEF-1 $\gamma$ /Sj26* fusion peptide, when reacted against epimastigote total extracts, revealed two bands with a molecular mass of 48 and 24.4 kDa (fig 6A, lane 2). Moreover, anti *TcEF-1 $\gamma$*  recognized in Western blot *Leishmania infantum* extracts (data not shown). In contrast, anti-Sj26 rabbit immune serum while reacting against Sj26 purified protein (fig 6B, lane 1), it did not recognize *T. cruzi* epimastigote extracts (fig 6B, lane 2) or macrophage antigens (fig 6B, lane 3).

We further explored whether antibodies to the *TcEF-1 $\gamma$ /Sj26* fusion protein reacted against host cell extracts (macrophage cell line J774). As shown in figure 6B, lane 4, two polypeptides of an apparent molecular mass of 42 and 29 kDa were identified. It is well known that EF-1 $\gamma$  is very sensitive to proteolysis and spontaneously undergoes inter-

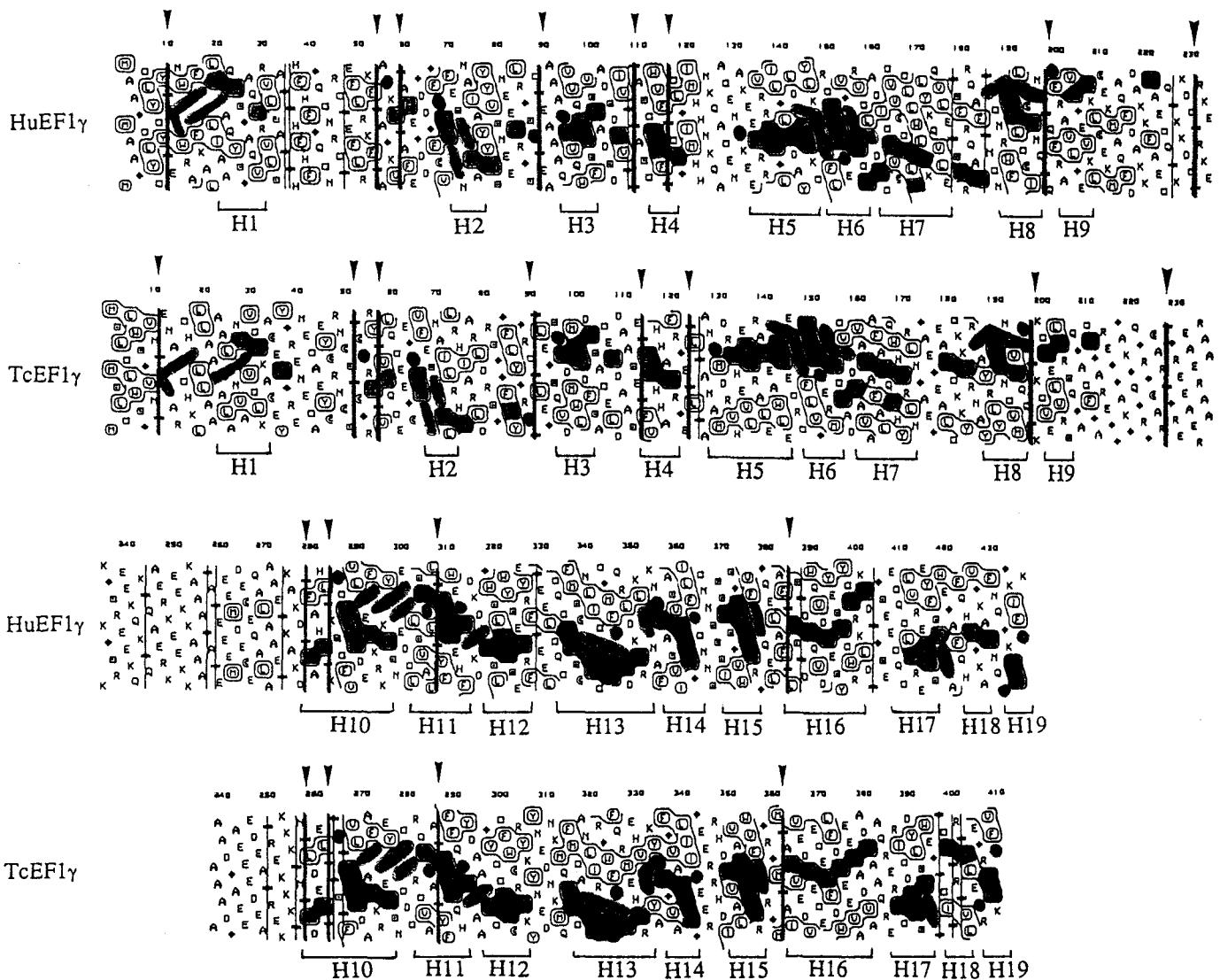
TcEF1 $\gamma$	MSL-TIWSGVNPEENARITHKLIAAAALANVAVT-L--KACEYGREENETAE	45
HuEF1 $\gamma$	MAAGTLYT--YPENWRAFKALIAAQYSGAQRVILSAPPHFHFGQTNRTP	48
AsEF1 $\gamma$	MVAGKLYT--YPENFRAFKALIAAQYSGAK--LEIAKSEVFGETNKSDA	45
TcEF1 $\gamma$	YCRNCSPCGRYPVLQDEEG-CVFESNAILRHIARLDRSGGFLYGRTPLEG	94
HuEF1 $\gamma$	FLRK-FPAGKVPFAFEGDDGFCVFESNAIAAYYVSNEE-----LRGSTPEAA	92
AsEF1 $\gamma$	FLKS-FPLGKVPFAFESADGHCTAESNAIAAYYVANET-----LRGSSSDLEK	89
TcEF1 $\gamma$	SQVDMWLDFAESATELDAASEPFVDHAF--RGEPLPA-NAMDRVHEVLRAL	140
HuEF1 $\gamma$	AQVVQWVFSFADSDITVPPASTWVFPILGIMHHNKQATENAKEEVRRILGIL	142
AsEF1 $\gamma$	AQIIIQWMTFADTEILPASCTWVFPVLGIMQFNKQATARAKEDIDKALQAL	139
TcEF1 $\gamma$	EAWLETRTFLVGERMTIVADVAVAFALQWHYRLNGAEGAELTKKYRNAYRL	190
HuEF1 $\gamma$	DAYLKTRTFLVGERVTLADIITVVCCTLWLWYK--QVLEPSFRQAFPMTNRW	190
AsEF1 $\gamma$	DDHLLTRTYLVGERITLADIVVICCTLHLWYQ--HVLDEAFRKSYVNTNRW	187
TcEF1 $\gamma$	YNIVMQQPKTVEV---IRSQGATEFGAR---E-----GGAKGOGRGCA	226
HuEF1 $\gamma$	FLTCINQPOFRAVLGEVKLCEKMAQFDACKFAETQPKKDTPRKEKGSRRE	240
AsEF1 $\gamma$	FITLNLINQKOVKAVIDGDFKLCEKAGEFDPKKKYAEFOAAIGSGEKKKTEKAP	237
TcEF1 $\gamma$	RPGREEAER-----AAAAADGAEEED-E-PREKKKPNNPLDELPPSPFV	268
HuEF1 $\gamma$	KQ-KPOAERKEEKKAAPAPEEEEMDECQALAAEPKAQDPFAHLPKSTFV	289
AsEF1 $\gamma$	KAVIKAKPEKKEVPKKE---QEEPADAEEFALAEEPKSKDPFDEMPPKGTFN	284
TcEF1 $\gamma$	LDAFKREYSNTDTRIVAAPYFFQHYDAAGYTTFWCRYKYNEDNKMQFMTH	318
HuEF1 $\gamma$	LDEFKRKYSNEDTLSVALPYFWEHFDKGWSLWYSEYRFPEELTQTFMSC	339
AsEF1 $\gamma$	MDDFKRFYSNNEE-TKSIPYFWEKFDKENYSIWYSEYKYQDELAKVYMSC	333
TcEF1 $\gamma$	NLIRGWQORMEHVRKYAFGVALIIGERRHDIVALWVFRGRGMPAIVEDV	368
HuEF1 $\gamma$	NLITGMFQRQLDKLRKNAFASVILFGTNSSSISGVWVFRGQELAFPLSPD	389
AsEF1 $\gamma$	NLITGMFQRIEKMRKCAFASVCVFGEDNDSSISGIWVWRGQDLAKFLSPD	383
TcEF1 $\gamma$	--EDTELFIDWEEV-ADVAAQRERITDYL-SWEGP--TIPRPVLEGRVFK	411
HuEF1 $\gamma$	WQVDYESYIWRKLDPGSEETQTLVREYFSWEGAFQHVGKAFNQGKIFK	437
AsEF1 $\gamma$	WQIDYESYDWKKLDPDAQETKDLVTQYFIWIGT-DKQGRKFNQGKIFK	430

Fig 4. Comparison of amino acid sequences of TcEF-1 $\gamma$  with other elongation factors: human elongation factor 1 $\gamma$  (HuEF1 $\gamma$ ) and elongation factor 1 $\gamma$  from *Artemia salina* (AsEF1 $\gamma$ ). Alignment was done employing the program Clustal from PC Gene.

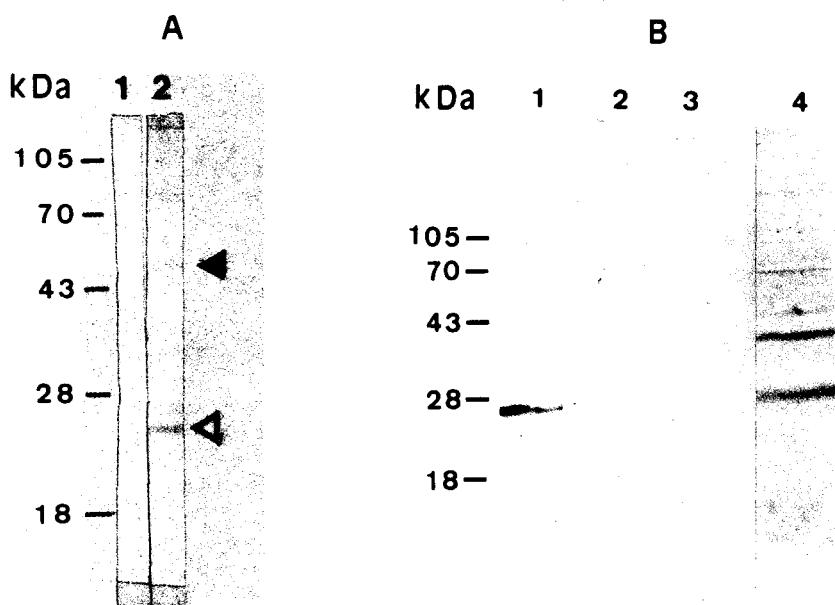
nal cleavage [7]. Moreover, it has been shown that during purification, the EF-1 $\gamma$  was occasionally split by an endogenous protease generating a 24 kDa cleavage fragment of EF-1 $\gamma$  from *Artemia salina* [12]. Furthermore, a complete sequence of *Schizosaccharomyces pombe* protein homologous to EF-1 $\gamma$  has been recently reported [14]. Interestingly, a major degradation product of *S pombe* EF-1 $\gamma$  with a molecular mass of 23 kDa has been identified and sequenced.

Our results also showed that anti-TcEF-1 $\gamma$  immune serum reacted against two polypeptides with a molecular

mass of 48 and 24.4 kDa. This finding is compatible with the above observations and suggests that the 24.4 kDa polypeptide is a degradation product of TcEF-1 $\gamma$  (48 kDa) protein. Taking together, these observations clearly indicate that the protozoan parasite *T cruzi* possesses a protein homologous to mammalian EF-1 $\gamma$ . Taking into account the early divergence of Trypanosomatids from the main branch of the eukaryotic lineage [21], the degree of sequence conservation between *T cruzi* and human EF-1 $\gamma$  is remarkable. Further studies will have to investigate the function of TcEF-1 $\gamma$  molecule.



**Fig 5.** Hydrophobic cluster analysis of the two elongation factors, TcEF1 $\gamma$  and HuEF1 $\gamma$ . Amino acids are represented by their standard 1-letter code with the exception of proline (asterisk with vertical line and arrowhead), glycine (closed rhomb), threonine (open square) and serine (open pointed square). Residue numbers are indicated above. Sets of adjacent hydrophobic amino acids (WYMFILV) are contoured and indicated by the letters H1–H19. Identical amino acids between TcEF1 $\gamma$  and HuEF1 $\gamma$  are reported in orange and important hydrophobic areas are coloured green. Identical prolines are represented by a red vertical line. Hydrophobic cluster analysis was done as described by Gaboriaud and Bissery [4].



**Fig 6.** Western blot analysis using rabbit polyclonal antisera against TcEF-1 $\gamma$  produced in the pGEX-4T-3 vector as fusion peptide with Sj26. **A.** Immunoblot of epimastigote lysate reacted with pre-immune serum (lane 1), anti-TcEF-1 $\gamma$ /Sj26 fusion protein (lane 2). **B.** Immunoblot of Sj26 (lane 1), epimastigote lysate (lane 2) and macrophage cell line J774 extracts (lane 3) reacted with anti-Sj26 rabbit serum. Lane 4 represent immunoblot of macrophage cell line J774 extracts reacted with anti-TcEF-1 $\gamma$ /Sj26 fusion peptide. The positions of 24.4 kDa protein and its intact form are indicated by the open and closed arrowhead, respectively.

## Notes added in proof

1. The predicted amino acid sequence of TcEF-1 $\gamma$  N-terminal domain showed significant homology to glutathione S-transferases (GSTs). This observation provides a possible explanation for the original isolation of TcEf-1 complex using binding to glutathione matrix.

2. In a previous study, we isolated TcGBP antigens using binding to glutathione matrix [19]. Comparison of TcEF-1 $\beta$ 25 and TcEF-1 $\beta$ 30 sequences with available nucleotide or amino acid sequences corresponding to proteins related to the glutathione cycle including GSTs did not reveal any significant homology. In contrast, alignment of the GSTs and TcEF-1 $\gamma$  sequences clearly showed conserved amino acid residues mainly within the N-terminal region. The degree of identity of TcEF-1 $\gamma$  polypeptide to fruit fly GST27 is 18%. When conservative replacements are included in the calculation, the similarity is 30%. Moreover, hydrophobic cluster analysis (HCA) showed very close correspondence of the arrangement of hydrophobic cluster and proline residues. These observations suggested that the shared homology between TcEF1 $\gamma$  and GSTs may account for the binding of TcGBP complex composed of TcEF-1 $\beta$ 25, TcEF-1 $\beta$ 30, and TcEF-1 $\gamma$  to glutathione matrix.

Recently, it has been found that the human valyl-tRNA synthetase presents an N-terminal extension of about 200 amino acid residues that has no counterpart in the yeast cytoplasmic enzyme, but, surprisingly, bears strong sequence similarity to the N-terminal region of EF-1 $\gamma$  from different organisms. Comparison with TcEF-1 $\gamma$  sequence confirms this similarity. This domain within the valyl-tRNA synthetase is required for complex formation by binding to the EF-1 $\delta$  subunit of the EF-1 $\beta$  $\gamma$  $\delta$ -valyl-tRNA synthetase complex, therefore suggesting that these N-terminal domains (GST-homologous) of these two proteins are implicated in protein/protein interactions. Indeed, a model of protein/protein interactions within mammalian valyl-tRNA synthetase-EF-1 complex clearly showed molecular contacts involving the N-terminal domains of EF-1 $\beta$ , EF-1 $\gamma$ , EF-1 $\delta$  and valyl-tRNA synthetase.

3. While this manuscript was in press, independent investigators have reported that eukaryotic translation elongation factor 1 gamma contains a glutathione S-transferase domain (Koonin *et al* (1994) *Protein Sci* 3, 2045–2054).

## Acknowledgments

This work was supported by INSERM U415 and U167. Odile Billaut-Mulot is a recipient of a fellowship from the French Ministry of Research and Education and Rodolfo Fernandez-Gomez is a recipient of a Venezuelan CONICIT-BID fellowship.

## References

- Bellé R, Derancourt J, Poulhe R, Capony JP, Ozon R, Mulner-Lorillon O (1989) A purified complex from *Xenopus* oocytes contains a p47 protein, an *in vivo* substrate of MPF, and a p30 protein respectively homologous to elongation factors EF-1 $\gamma$  and EF-1 $\beta$ . *FEBS Lett* 255, 101–104
- Billaut-Mulot O, Pommier V, Schöneck R, Plumas-Marty B, Taibi A, Loyens M, Capron A, Ouaissi MA (1993) Nucleotide sequence of a *Trypanosoma cruzi* cDNA encoding a protein homologous to mammalian EF1 $\gamma$ . *Nucleic Acids Res* 21, 3901
- Dasmahapatra B, Skogerson L, Chakraburty K (1981) Protein synthesis in yeast. Purification and properties of the elongation factor 1 from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 256, 10005–10011
- Gaboriaud C, Bissery Y (1987) Hydrophobic cluster analysis: an efficient new way to compare and analyse amino acid sequences. *FEBS Lett* 224, 149–155
- Huet J, Cottrelle P, Cool M, Vignais M, Thiele D, Marck C, Buhler J, Sentenac A, Fromageot P (1985) A general upstream binding factor for genes of the yeast translational apparatus. *EMBO J* 4, 3539–3547
- Janssen GMC, Möller WJ (1988) Kinetic studies on role of elongation factors 1 $\beta$  and 1 $\gamma$  in protein synthesis. *J Biol Chem* 263, 1773–1778
- Janssen GMC, Möller W (1988) Elongation factor 1 $\beta$  from *Artemia*. Purification and properties of its subunits. *Eur J Biochem* 171, 119–129
- Janssen GMC, Maessen GDF, Amons R, Möller W (1988) Phosphorylation of elongation factor 1 $\beta$  by an endogenous kinase affects its catalytic nucleotide exchange activity. *J Biol Chem* 266, 11063–11066
- Janssen GMC, Morales J, Schipper A, Labbé JC, Mulner-Lorillon O, Bellé R, Möller W (1991) A major substrate of maturation promoting factor identified as elongation factor 1 $\beta$  $\gamma$  $\delta$  in *Xenopus laevis*. *J Biol Chem* 266, 14885–14888
- Kozak M (1984) Compilation and analysis of sequences upstream from the translational start site in eukaryotic mRNAs. *Nucleic Acids Res* 12, 857–871
- Leer R, van Raamsdonk-Duin M, Mager W, Planta R (1985) Conserved sequences upstream of yeast ribosomal protein genes. *Curr Genet* 9, 273–277
- Maessen GDF, Amons R, Zeelen JP, Möller W (1987) Primary structure of elongation factor 1 $\gamma$  from *Artemia*. *FEBS Lett* 223, 181–186
- Moldave K (1985) Eukaryotic protein synthesis. *Annu Rev Biochem* 54, 1109–1149
- Momoi H, Yamada H, Ueguchi C, Mizuno T (1993) Sequence of a fission yeast gene encoding a protein with extensive homology to eukaryotic elongation factor 1 $\gamma$ . *Gene* 134, 119–122
- Ouaissi MA, Dubremetz JF, Kusnierz JP, Cornette J, Loyens M, Taibi A, Marty B, Velge P, Rizvi F, Capron A (1990) *Trypanosoma cruzi*: Differential expression and distribution of an 85 kDa polypeptide epitope by *in vitro* developmental stages. *Exp Parasitol* 71, 207–217
- Ouaissi MA, Taibi A, Cornette J, Velge P, Marty B, Loyens M, Esteva M, Rizvi F, Capron A (1990) Characterization of a major surface and excretory-secretory immunogen of *Trypanosoma cruzi* trypanastigotes and identification of potential protective antigen. *Parasitology* 100, 115–124
- Ouaissi MA, Aguirre T, Plumas-Marty B, Piras M, Schöneck R, Gras-Masse H, Taibi A, Loyens M, Tartar A, Capron A, Piras R (1992) Cloning and sequencing of a 24 kDa *Trypanosoma cruzi* specific antigen released in association with membrane vesicles and defined by a monoclonal antibody. *Biol Cell* 75, 11–17
- Plumas-Marty, Verwaerde C, Loyens M, Velge P, Taibi A, Cesbron MF, Capron A, Ouaissi MA (1992) *Trypanosoma cruzi* glutathione-binding proteins: immunogenicity during human and experimental Chagas' disease. *Parasitology* 104, 87–98
- Plumas-Marty B, Schöneck R, Billaut-Mulot O, Taibi A, Ouaissi MA (1994) Molecular cloning of a *Trypanosoma cruzi* cDNA encoding a protein homologous to mammalian EF-1 $\beta$ . *Parasitol Res* 80, 626–628
- Smith DB, Johnson KS (1988) Single purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* 67, 31–40
- Sogin ML, Elwood HJ, Gunderson JH (1986) Evolutionary diversity of eukaryotic small-subunit rRNA genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 83, 1383–1387
- Vaitukaitis J, Robbins JB, Neishag E, Ross TG (1971) A method for producing specific antisera with small doses of immunogen. *J Clin Endocr Metab* 3, 988–991
- van Damme H, Amons R, Janssen G, Möller W (1991) Mapping the functional domains of the eukaryotic elongation factor 1 $\beta$ . *Eur J Biochem* 197, 505–511
- Yahiaoui B, Loyens M, Taibi A, Schöneck R, Dubremetz JF, Ouaissi MA (1993) Characterization of a *Leishmania* antigen associated with cytoplasmic vesicles resembling endosomal-like structure. *Parasitology* 107, 497–507

## ARTICLE 4

**Phénotype des parasites recombinants chez *Trypanosoma cruzi* qui sur-expriment le facteur d'elongation 1 $\gamma$ : implication du domaine de type GST de EF-1 $\gamma$  dans la résistance aux drogues anti-parasitaires.**

Le rôle de EF-1 $\gamma$  des cellules de mammifères n'est pas encore bien défini. Dans le but de contribuer à une meilleure connaissance des propriétés biologiques de ce facteur, nous avons transfecté les formes épimastigotes de *T. cruzi* par un vecteur permettant la surproduction de la protéine TcEF-1 $\gamma$ .

Nous avons utilisé le vecteur pTEX dans lequel nous avons introduit le cDNA codant pour TcEF-1 $\gamma$  dans les sites *EcoRI* et *XhoI* afin d'obtenir le vecteur pTEX-TcEF-1 $\gamma$ . Les séquences promotrices du gène gGAPDH (glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase) placées en amont du site de clonage, permettent l'expression des gènes clonés. Les parasites ont été transfectés avec les vecteurs pTEX ou pTEX-TcEF-1 $\gamma$  par électroporation et sélectionnés par leur résistance à la génétidine (G418), celle-ci étant apportée par le gène de la néomycine phosphotransférase du vecteur pTEX. Les parasites résistants sont obtenus 1 mois après la transfection. Les clones, acquis après dilution limite, sont continuellement cultivés avec 200  $\mu$ g/ml de G418 pendant 2 mois, puis la concentration est progressivement augmentée jusqu'à 6000  $\mu$ g/ml pendant 6 mois.

La présence d'une forte concentration des vecteurs pTEX et pTEX-TcEF-1 $\gamma$  est vérifiée par la technique du Southern blot. Les techniques de Northern et de Western blot montrent la surproduction de la protéine TcEF-1 $\gamma$  qui peut être augmentée par la dose de G418.

Il n'y a pas d'intégration des vecteurs dans le génome, ceux-ci sont extrachromosomiques sous forme de larges éléments circulaires du vecteur répétés en tandems. Après 5 mois de culture sans G418, les parasites finissent par perdre le plasmide et ne sont plus résistants à la drogue. Les transfctions sont maintenues à travers le cycle des parasites. En effet, les trypomastigotes obtenus après la lyse des épimastigotes par le complément sont déposés sur un tapis de fibroblastes 3T3 afin

d'infecter les cellules. Les trypomastigotes issus de ces cellules contiennent encore les plasmides de transfection.

Nous avons analysé le phénotype des transfectants, en ce qui concerne tout d'abord leur croissance. Les taux de croissance des parasites normaux et ceux transfectés avec pTEX ou pTEX-TcEF-1 $\gamma$  sont sensiblement identiques. La surproduction de TcEF-1 $\gamma$  n'a donc pas d'influence sur la croissance des parasites.

Nous avons donc testé la résistance de ces parasites à différentes drogues, en particulier le nifurtimox, le benznidazole et la clomipramine. Les parasites normaux ou transfectés avec pTEX ou pTEX-TcEF-1 $\gamma$  sont sensibles aux nifurtimox et au benznidazole. L'utilisation de la clomipramine a permis de montrer que les parasites transfectés avec pTEX-TcEF-1 $\gamma$  sont résistants tandis que ceux transfectés avec pTEX et la souche sauvage sont sensibles. En effet, avec une dose de 50  $\mu$ M de clomipramine, on observe une inhibition de croissance de 90 % des parasites sensibles transfectés par pTEX ainsi que la souche sauvage. La mort de ces deux populations parasitaires survient après 2 jours de culture. En revanche, la croissance des parasites transfectés avec pTEX-TcEF-1 $\gamma$  est inhibée à 20 %, et après 8 jours de culture en présence de drogue, ces parasites reprennent une croissance normale s'ils sont inoculés dans un milieu frais. Ainsi, la surproduction de TcEF-1 $\gamma$  ne permet pas la résistance des parasites au nifurtimox et au benznidazole, drogues dont l'activité trypanocide réside dans la production de radicaux libres, tandis que cette surproduction entraîne la résistance des parasites à la clomipramine, composé lipophile, principal inhibiteur de la trypanothion reductase.

La protéine TcEF-1 $\gamma$  a été purifiée à partir d'une colonne de glutathion agarose et la moitié N-terminale de la molécule possède des homologies de séquence avec les GSTs. Il est donc vraisemblable que TcEF-1 $\gamma$  participe à la détoxication des composés lipophiles à travers

leur conjugaison au glutathion par le biais de son domaine de type GST. D'autres travaux complémentaires utilisant des transfections avec le vecteur pTEX comportant uniquement le domaine N-terminal de TcEF-1 $\gamma$  qui contient l'homologie de séquence avec les GSTs sont nécessaires pour valider cette hypothèse.

**Phenotype of recombinant *Trypanosoma cruzi* which over-express elongation factor 1 $\gamma$ : possible involvement of EF-1 $\gamma$  GST like domain in the resistance to anti-parasitic drugs.**

(soumis, 1996)

**O. Billaut-Mulot, R. Fernandez-Gomez and A. Ouaissi**

**ABSTRACT**

In previous studies, molecular and immunological approaches have been used to characterize *Trypanosoma cruzi* (a unicellular eukaryote) elongation factor 1 $\gamma$  (TcEF-1 $\gamma$ ). Primary sequence homology search revealed that TcEF-1 $\gamma$  N-terminal domain showed significant homology to glutathione S-transferases (GSTs). Subsequently, using motif search and structural modeling, independent investigators have reported similar observations in the case of a large number of EF-1 $\gamma$  sequences from different species. Although studies have suggested the involvement of EF-1 $\gamma$  in the protein synthesis machinery, the exact function of this protein, particularly the role of its GST-like domain, is not fully understood. Therefore, we have used the protozoan parasite *T.cruzi* as a model and a shuttle vector which allow overexpression of TcEF-1 $\gamma$  in order to gain insight into its biological function. The sensitivity of transformed parasites to drugs having different action pathways, was compared to that of organisms containing the empty control plasmid and the wild type parental strain. The growth of parasites which overexpress TcEF-1 $\gamma$  and control cells was equally sensitive to inhibition by nifurtimox and benznidazole which exert a trypanocidal activity through the production of free radicals. In contrast, a strong resistance of transformed organisms to the tricyclic antidepressant drug clomipramine, a lipophilic compound, was observed whereas control cells were highly sensitive. Our finding suggest that TcEF-1 $\gamma$  participates in the detoxification of lipophilic compounds likely by conjugation with glutathione through its GST-like domain. Recent

studies have shown increased transcription of EF-1 $\gamma$  gene in certain tumours. Moreover, correlation of drug resistance with overexpression of GST isozymes has been demonstrated in a variety of tumour cell lines. To our knowledge, this is the first report showing that the eukaryotic EF-1 $\gamma$  GST conserved enzymatic module could play a role in drug resistance. Furthermore, these results reinforce the notion that the aggressiveness of tumours could in part be linked to overexpression of EF-1 $\gamma$  and raised a central question regarding the GST as target for chemotherapeutic drug in cancer research.

## INTRODUCTION

Elongation factor 1 (EF-1) plays a central role in eukaryotic protein biosynthesis. EF-1 $\alpha$  binds aminoacyl-tRNAs to 80 S ribosome under the hydrolysis of GTP whereas EF-1 $\beta\gamma\delta$  facilitates the nucleotide exchange of EF-1 $\alpha$ -GDP to EF-1 $\alpha$ -GTP (Moldave, 1985). Moreover, biochemical studies have suggested that guanine nucleotide transferase activity is mediated by the  $\beta$  and  $\delta$  subunits, whereas the  $\gamma$  subunit might function as a catalyst (Janssen and möller, 1988a; 1988b). Furthermore, EF-1 $\gamma$  has been shown to be highly associated with membrane and cytoskeleton structures. This interaction raised the hypothesis that EF-1 $\gamma$  could be involved in directing components of the protein synthesis apparatus towards the three dimensional cytoplasmic structure of the cell (janssen and Möller, 1988b). In addition, phosphorylation of EF-1 $\gamma$  by p34<sup>cdc2</sup> kinase occurs at the entry of M-phase of the cell in *Xenopus* oocytes (Bellé et al., 1989). Although these observations suggest the involvement of EF-1 $\gamma$  in the protein synthesis machinery, its biological properties are not fully understood.

*Trypanosoma cruzi* is the causative agent of american trypanosomiasis (Chagas' disease). The parasite replicates as an epimastigote in the midgut of its insect vector and transforms to metacyclic infective trypomastigote in the hindgut. In the mammalian host cells, dividing

amastigotes are found which transform into infective trypomastigotes prior to release into the bloodstream.

In previous studies, we isolated three *T. cruzi* proteins using binding to glutathione matrix (Plumas-Marty et al., 1992), and reported the characterization of corresponding cDNAs (Plumas-Marty et al., 1994; Billaut-Mulot et al., 1993). Sequence analysis revealed that the encoded proteins are homologous to the subunits  $\beta\gamma\delta$  of eucaryotic elongation factor 1 (EF-1). Surprisingly, we found that TcEF-1 $\gamma$  N-terminal domain showed a significant homology to glutathione S-transferases (GSTs). Independent investigators reported similar observations in the case of a large number of eukaryotic EF-1 $\gamma$  subunits (Koonin et al., 1994). These observations provide a possible explanation for the original isolation of TcEF-1 complex using binding to glutathione matrix.

Glutathione S-transferases are a group of proteins with several roles in detoxification. These proteins may bind xenobiotic compounds and catalyse the conjugation of reduced glutathione (GSH) with a variety of toxic compounds (Mannervik et al., 1985). In order to gain insight into the function of TcEF-1 $\gamma$  GST-like domain, we used the shuttle vector pTEX (Kelly et al., 1992) and achieved overexpression of TcEF-1 $\gamma$  molecule which conferred tricyclic antidepressant drug resistance phenotype.

## MATERIALS AND METHODS

### Parasites

The Y strain of *T. cruzi* was used throughout this work. Culture form epimastigotes were grown at 28 °C as previously described (Ouaissi et al., 1990). Trypomastigotes were obtained after lysis of epimastigotes by incubation for 1 h at 37 °C in the presence of human unheated serum as a source of complement and were maintained in tissue culture by weekly infection of 3T3 fibroblasts.

### **Construction of vector pTEX-TcEF-1 $\gamma$**

We have previously obtained a full-length cDNA encoding TcEF-1 $\gamma$  (Billaut-Mulot et al., 1993). This 1400 bp cDNA was subcloned into the *Eco*RI / *Xho*I sites of pTEX vector (Kelly et al., 1992). Large scale preparations of pTEX-TcEF-1 $\gamma$  and pTEX vectors were performed using lysis by alkali and purification by equilibrium centrifugation in Cesium-Chlorure-Ethidium-Bromide gradients (Sambrook et al., 1989).

### **Transfection procedures**

*T. cruzi* epimastigotes were electroporated as described (Kelly et al., 1992). Epimastigotes were washed once with phosphate buffered saline and resuspended at  $10^8$  cells/ml in electroporation buffer (272 mM sucrose, 7 mM sodium phosphate, pH 7.2). After 10 minutes on ice,  $10^8$  cells were added to 100  $\mu$ g vector DNA and left for a further 20 minutes on ice. The cells were electroporated using an Easyject Plus (Eurogentec, Belgium) apparatus set at 900 volts and 400 ohms. 4 pulses have been used. The cells were left on ice for a further 3 minutes and then 1 ml aliquots were added to 4 ml of normal growth medium. Twenty four hours later, parasites were subcultured at  $10^6$  cells/ml in 10 ml of growth medium containing G418 (100  $\mu$ g/ml) and at 1-2  $10^6$  cells/ml after 3 days and then after a further 5 days in the continued presence of G418. Drug resistant cells were usually observed 15-20 days later. After establishment of transformed lines, clones were derived by limiting dilution in solid phase LB-agar containing 0.6 % glucose and 0.02 % haemoglobin.

### **Northern and Southern blot**

Epimastigotes RNA was prepared using RNazol (Bioprobe Systems, France) and DNA was isolated using the simple 'mini-prep' procedure described elsewhere (Medina-Acosta and Cross , 1993). RNA and DNA blot hybridization were carried out as described (Billaut-Mulot et al., 1994).

## **Immunoblotting**

Parasite extracts were prepared by direct lysis of cells with SDS-PAGE sample buffer (Laemli, 1970) and boiled for 5 mn before electrophoresis in denaturing 13 % polyacrylamide gel. Immunoblotting was carried out as described (Billaut-Mulot et al., 1994).

## **Drug sensitivity experiments**

Experiments were performed using the following compounds: nifurtimox, benznidazole and clomipramine. The growth inhibitory effects of these drugs were tested on the non transfected *T. cruzi* strain and on parasites which had been transformed with pTEX and pTEX-TcEF-1 $\gamma$ . Most experiments were carried out in 200  $\mu$ l volumes of growth medium containing the drug using 96-well microplates and pulsed with  $^3$ H-thymidine. Cells were seeded at  $1.5 \times 10^6$  ml $^{-1}$  into wells containing a range of drug concentrations and allowed to grow for 2 days. Control cultures consisted of parasites incubated in the presence of culture medium alone. After different incubation times, parasites were harvested in an automated sample harvester. The filter discs were dried, placed in scintillation fluid and counted in a scintillation counter. Results are expressed as percentage of growth inhibition.

## **RESULTS**

### **Transformation of *T. cruzi***

The full-length *T. cruzi* elongation 1 $\gamma$  cDNA was subcloned by ligation into the *Eco*RI-*Xba*I site of the expression vector pTEX (Fig. 1A) to yield the construct pTEX-TcEF-1 $\gamma$  (Fig. 1B). *T. cruzi* epimastigotes were transfected with circular pTEX-TcEF-1 $\gamma$  or pTEX vector using electroporation. Drug resistant *T. cruzi*, selected at 200  $\mu$ g ml $^{-1}$  G418, were obtained and clones were derived by limiting dilution after 3 weeks of culture. Parasites were continuously cultured in the presence of G418 at 200  $\mu$ g ml $^{-1}$  for 2 months and the concentration of G418 was progressively increased until 6000  $\mu$ g ml $^{-1}$  for 6 months

before drug sensitivity experiments. Transformed cells growth rates were not significantly different from the parental strain.

Southern analysis of DNA from transformed cells demonstrated that vector DNA was maintained at high copy number in agreement with the observations already reported (Kelly et al., 1992) (data not shown). Parasites DNA was digested with either *Eco*RI or *Eco*RI and *Xba*I and hybridized with TcEF-1 $\gamma$  probe (Fig. 2). Digestion with *Eco*RI revealed a 7 kb band corresponding to the linearized pTEX-TcEF-1 $\gamma$  vector in agreement with the presence of one restriction site for this enzyme in the vector sequence. Furthermore, TcEF-1 $\gamma$  cDNA hybridized to 1.4 kb band of *Eco*RI and *Xba*I digested DNA corresponding to TcEF-1 $\gamma$  insert. The signal for endogenous TcEF-1 $\gamma$  gene is very weak in wild type parasites and is not visible in transformed cells. Indeed, similar amounts of DNA from different parasite populations have been loaded on the gel, therefore the low ratio of genomic to plasmid DNA in transformed cells could explain the absence of positive signal on endogenous EF-1 $\gamma$ . Increasing the amount of total DNA from transformed cells allowed the visualization of the endogenous TcEF-1 $\gamma$  (data not shown). The same blot when dehybridized and hybridized with labelled neomycin probe allowed to show the presence of neo<sup>r</sup> gene in pTEX and pTEX-TcEF-1 $\gamma$  transformed parasites. Furthermore, Southern analysis of DNA from trypomastigotes originated from transformed epimastigotes demonstrated that the G418-resistant phenotype can be maintained throughout the *T. cruzi* cycle. Indeed, hybridization profils using TcEF-1 $\gamma$  and neo<sup>r</sup> probes were similar to those obtained with epimastigote DNA (data not shown).

### **Over-expression of elongation factor 1 $\gamma$ in transfected *T. cruzi***

Transcription of transfected gene has been analysed by Northern blotting using similar amounts of total RNA from different parasite populations (Fig. 3A upper panel) and TcEF-1 $\gamma$  labelled probe (Fig. 3A lower panel). The 1.4 kb band in each track corresponds to the

endogenous TcEF-1 $\gamma$  transcript whereas the 1.9 kb band is the transcript of the transfected Tc-EF-1 $\gamma$  gene. The size of the transfected gene transcript is consistent with the presence of the flanking sequences from the *T. cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes (gGAPDH) which were incorporated in pTEX vector being utilised for processing (Kelly et al., 1993). Moreover, the level of *TcEF-1 $\gamma$*  expression in transfected cells can be increased by raising the G418 concentration (Fig. 3B). Furthermore, in complementary experiments, the Northern blots were dehybridized and treated with labelled cDNA encoding either of the EF-1 $\alpha$  or  $\beta$  subunits (Billaut-Mulot et al., 1996; Plumass-Marty et al., 1994). No difference in the intensity of  $\alpha$  and  $\beta$  transcripts was observed between transformed and control cells (data not shown).

In parallel experiments we analysed the production of TcEF-1 $\gamma$  polypeptide by Western blotting using anti-TcEF-1 $\gamma$  rabbit serum. The antibodies when reacted against total extracts of non-transformed *T. cruzi* epimastigotes or epimastigotes transfected with pTEX vector revealed two polypeptides corresponding to TcEF-1 $\gamma$  and its degradation product (Fig. 4, lane 2, 3), in agreement with our previous data using wild type parasites (Billaut-Mulot et al., 1994). Interestingly, the intensity of reactive bands considerably increased in parasites transfected with pTEX-TcEF-1 $\gamma$  vector (Fig. 4, lane 1). An internal control consisting of an immune serum directed against a *T. cruzi* constitutive protein named Tc24 (Ouaissi et al., 1992) showed similar signal intensities for Tc24 reactive polypeptide in all the samples examined demonstrating therefore that equal quantities of total extracts were been analysed.

### Sensitivity of transformed parasites towards different drugs

The effect of increased production of TcEF-1 $\gamma$  on the sensitivity of parasites to drugs was performed. The growth of transformed and control cells is equally sensitive to inhibition by nifurtimox and benznidazole which are known to exert a trypanocidal activity through

the production of free radicals. In contrast, pTEX-TcEF-1 $\gamma$  transfected cells are much less susceptible to a lipophilic compound that is the tricyclic antidepressant clomipramine than normal and pTEX transfected parasites (Fig. 5). After 2 days, a 50  $\mu$ M concentration was lethal for control and pTEX transfected cells whereas only 20% growth inhibition of parasites which overexpress TcEF-1 $\gamma$  was observed. The IC<sub>50</sub> was determined by establishing the concentration of clomipramine which inhibited growth by 50 %. As shown in Fig.5, the IC<sub>50</sub> values for control and pTEX transfected cells were similar (18 and 23  $\mu$ M, respectively), whereas the IC<sub>50</sub> was two times greater for pTEX-TcEF-1 $\gamma$  transformed parasites (57  $\mu$ M). Interestingly, in contrast to pTEX transfected and wild type parasites which all died after 8 days exposure to 50  $\mu$ M clomipramine, the parasites which overexpressed TcEF-1 $\gamma$  when subcultured in fresh medium resumed a normal growth (data not shown).

## DISCUSSION

The production of recombinant *T. cruzi* clones that overexpress elongation factor 1 $\gamma$  have been produced and their corresponding phenotype analyzed. Transformed parasites were characterized by an increased level of expression of TcEF-1 $\gamma$  mRNA which is paralleled by an overproduction of the corresponding protein. The abundance of the transcripts could be increased by raising the G418 concentration which is correlated with an increase in the copy number of vector DNA. Transformed cells have been continuously cultured in the presence of G418 with no reduction in the copy number of vector molecules. However, after five months of culture in the absence of G418, drug-resistant organisms could not be rescued. This reflected the loss of detectable vector sequences within the parasite population. This is consistent with the transfected DNA being located extrachromosomally as large circular elements forming head-to-tail tandem repeats of the vector sequence (Kelly et al., 1992).

In order to assess the pTEX-TcEF-1 $\gamma$  transformed cells phenotype, the growth rate has been determined. The growth curves of transfected parasites were not significantly different from those of pTEX-transfected and wild type strain. This observation may suggest that there was no relation between overproduction of TcEF-1 $\gamma$  and the growth rate of the parasites. This is in agreement with the results already reported in the case of human fibroblast cultures (Sanders et al., 1992). Indeed, comparison of mRNA levels of actively dividing primary fibroblasts to those found in confluent cultures showed that the amount of EF-1 $\alpha$ , EF-1 $\beta$  and EF-1 $\gamma$  mRNA was not influenced by a temporary arrest of cell division. A similar invariance of these expression levels has been observed for EF-1 $\gamma$ . Indeed, it has been reported that cell lines sensitive to growth inhibition by retinoic acid did not exhibit a decreased EF-1 $\gamma$  expression after treatment with this compound. Furthermore, the expression of the different elongation factors is coordinated so as to achieve an optimal expression of each protein. Indeed, mRNA levels for EF-1 $\alpha$ , EF-1 $\beta$  and EF-1 $\gamma$  increased in parallel in cultured cell lines compared to those in the equivalent normal tissues (Sanders et al., 1992). However, it is noteworthy that our biological model differs from the above by the fact that we have introduced an extrachromosomal DNA which resulted in an overproduction of TcEF-1 $\gamma$  and this has no effect on the synthesis of the associated subunits  $\alpha$  and  $\beta$  comprising EF-1 complex.

In previous studies, TcEF-1 $\gamma$  has been purified from glutathione agarose columns together with TcEF-1 $\beta$  and  $\delta$ . Furthermore, the TcEF-1 $\gamma$  N-terminal sequence showed a significant homology to GSTs (Billaut-Mulot et al., 1994; Koonin et al., 1994). We have hypothesized that the GST-like domain could play a role in the detoxification of xenobiotics. In order to evaluate this concept, the drug sensitivity experiments were performed using transfected parasites. The growth of pTEX-TcEF-1 $\gamma$  transfected and control cells was equally sensitive to inhibition by nifurtimox and benznidazole. In contrast, the tricyclic antidepressant

drug clomipramine was lethal to the control cells whereas the parasites which over-express TcEF-1 $\gamma$  were resistant.

Nifurtimox appears to work by generating free radicals which promote the formation of toxic oxygen metabolites within the parasites (Docampo and Moreno, 1984). Free radical intermediates apparently not related to oxygen-reduction products have been found in the metabolic pathways of other trypanocidal drugs such as benznidazole. In contrast to the mammalian host, *T. cruzi* is partially deficient in the defense mechanisms against free radicals (Morello, 1988). *T. cruzi* is devoid of catalase and glutathione peroxidase and instead the trypanothione system with trypanothione reductase appears to be a central feature of the antioxidant defences in trypanosomatids (Fairlamb et al., 1985). The mechanism of cidal action of clomipramine is not known. Interaction with biomembranes is a likely key factor in the activity of this lipophilic compound against *T. cruzi* as suggested by the marked alteration in parasite morphology (Doyle and Weinbach, 1989). Furthermore, clomipramine is the most potent trypanothione reductase inhibitor reported to date (Benson et al., 1992).

The resistance of parasites which over-expressed TcEF-1 $\gamma$  to clomipramine uncovered a novel possible function for EF-1 $\gamma$  subunit. It is likely that the TcEF-1 $\gamma$  N-terminal domain homologous to GSTs plays a central role in this phenotype. Indeed, the main function of GSTs is the detoxification of xenobiotics by catalyzing the conjugation of glutathione (GSH) with a variety of toxic lipophilic compounds having an electrophilic center (Mannervik et al., 1985). The hypothesis that TcEF-1 $\gamma$  exhibits GST activity is reinforced by the fact that TcEF-1 $\gamma$  has been initially purified from glutathione agarose columns. Furthermore, tertiary structure modeling showed that the GST-related domain of eukaryotic TcEF-1 $\gamma$  is likely to form a fold very similar to that in the known structures of class a, m and p GSTs (Koonin et al., 1994).

This putative enzymatic function of EF-1 $\gamma$  could play a role in the drug resistance in human tumours. Indeed, increased transcription of

EF-1 $\gamma$  in pancreas malignant tissue in comparison with corresponding normal pancreatic tissue has been demonstrated (Lew et al., 1992). Similar findings were reported in the case of adenocarcinomas and adenomas of the colon and in gastric and oesophageal carcinomas (Mimori et al., 1996). Similarly, GSTs over-expression has also been observed in many clinical tumor specimens as compared to their normal tissue counterparts (Morgan et al., 1996).

The possible genetic manipulation of *T.cruzi* allowed us to disclose a new function for EF-1 $\gamma$  linked to drug resistance likely through its GST-like domain. This finding raised a central question regarding the GST as target for chemotherapeutic drug in cancer research.

## REFERENCES

- Moldave, K. (1985) Eukaryotic protein synthesis. Ann. Rev. Biochem. 54, 1109
- Janssen, G.M.C. and Möller, W. (1988a) Kinetic studies on role of elongation factors 1 $\beta$  and 1 $\gamma$  in protein synthesis. J. Biol. Chem. 263, 1773-1778.
- Janssen, G.M.C. and Möller, W. (1988b) Elongation factor 1 $\beta\gamma$  from Artemia. Purification and properties of its subunits. Eur. J. Biochem; 171, 119-129.
- Bellé, R., Derancourt, J., Poulhe, R., Capony, J.P., Ozon, R., Mulner-Lorillon, O. (1989) A purified complex from Xenopus oocytes contains a p47 protein, an in vivo substrate of MPF, and a p30 protein respectively homologous to elongation factors EF-1 $\gamma$  and EF-1 $\beta$ . FEBS Lett. 255, 101-104.
- Plumas-Marty, B., Verwaerde, C., Loyens, M., Velge, P., Taibi, A, Cesbron, M.F., Capron, A. et Ouaissi, A. (1992) *Trypanosoma cruzi*

glutathione-binding proteins: immunogenicity during human and experimental Chagas'disease. Parasitology 104, 87-98

Plumas-Marty B., Schöneck R., Billaut-Mulot O., Taibi A., Capron A. et Ouaissi A. (1994) Molecular cloning of a *Trypanosoma cruzi* cDNA encoding a protein homologous with mammalian elongation factor 1 $\beta$ . Parasitol. Res. 80, 626

Billaut-Mulot, O., Pommier,V., Schöneck, R., Plumas-Marty, B., Taibi, A., Loyens, M., Capron, A. and Ouaissi, A. (1993) Nucleotide sequence of a *Trypanosoma cruzi* cDNA encoding a protein homologous to mammalian EF-1 $\gamma$ . Nucleic Acids Res. 21, 3901-3901.

Koonin, E.V., Mushegian, A.R., Tatusov, R.L., Altschul, S.F., Bryant, S.H., Bork, P and Valencia A. (1994) Eukaryotic translation elongation factor 1 $\gamma$  contains a glutathione transferase domain-Study of a diverse, ancient protein superfamily using motif search and structural modeling. Protein Sci. 3, 2045-2054.

Mannervik, B., Alin, P., Guthenberg, C. Jensson, H., Tahir, M.K., Warhholm, M. and Jornvall, H. (1985) Identification of three classes of cytosolic glutathione transferases common to several mammalian species: correlation between structural data and enzymatic properties. Proc. Natl. Sci. USA. 82, 7202

Kelly, J.M., Ward H.M., Miles, M.A. and Kendall, G. (1992) A shuttle vector which facilitates the expression of transfected genes in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania*. Nucleic Acids Res. 20, 3963-3969.

Ouaissi, M.A., Dubremez, J.F., Kusnier J.P., Cornette, J., Loyens, M., Taibi, A., Marty, B., Velge, P., Rizvi, F. and Capron A. (1990) *Trypanosoma cruzi*: Differential expression and distribution of 85 kDa

polypeptide epitope by in vitro developmental stages. *Exp. Parasitol.* 71, 207-217.

Sambrook, J., Frisch, E.F. and Maniatis, T. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edn., 1.38-1.44.

Medina-Acosta, E. and Cross, G.A.M. (1993) Rapid isolation of DNA trypanosomatid protozoa using a simple 'mini-prep' procedure. *Mol. and Bioch. Parasitol.* 59, 327-330.

Billaut-Mulot, O., Schöneck, R., Fernandez-Gomez, R., Taibi, A., Capron, A. and Ouaissi, A. (1994) Molecular and immunological characterization of a *Trypanosoma cruzi* protein homologous to mammalian elongation 1 gamma. *Biol. Cell.* 82, 39-44.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

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

Sanders, J., Maassen, J.A. and Möller W. (1992) Elongation factor-1 messenger-RNA levels in cultured cells are high compared to tissue and are not drastically affected further by oncogenic transformation. *Nucleic Acids Res.* 20, 5907-5910.

Lew, Y., Jones, D.V., Mars, W.M., Evans, D., Byrd, D. And Frazier, M.L. (1992) Expression of elongation factor 1 gamma-related sequence in human pancreatic cancer. *Pancreas* 7, 144-152.

Docampo, R. and Moreno, S.N.J. (1984) Free radical metabolites in the mode of action of chemotherapeutic agents and phagocytic cells on *Trypanosoma cruzi*. Rev. Inf. Dis. 6, 223-238.

Morello, A. (1988) The biochemistry of the mode of action of drugs and the detoxication mechanism in *Trypanosoma cruzi*. Comp. Biochem. Physiol. 90, 1-12.

Fairlamb, A.H., Blackburn, P., Ulrich, P., Chait, B.T. and Cerami, A. (1985) Trypanothione: a novel bis (glutathionyl) spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids. Science 227, 1485-1487.

Doyle, P.S. and Weinbach E.C. (1989) The activity of tricyclic antidepressant drugs against *Trypanosoma cruzi*. Exp. Parasitol. 68, 230-234.

Benson T.J., Mckie J.H., Garforth J., Borges, A., Fairlamb, A.H. and Douglas, K.T. (1992) Rationally designed selective inhibitors of trypanothione reductase. Phenothiazines and related tricyclics as lead structures. Biochem. J. 286, 9-11.

Mimori K., Mori, M., Inoue, H., Ueo, H., Mafume, K., Akiyoshi, T. and Sugimachi, K. (1996) Elongation factor 1 $\gamma$  mRNA expression in oesophageal carcinoma. Gut 38, 66-70.

Morgan, A.S., Ciaccio, P.J., Kenneth, D.T. and Kauvar, L.M. (1996) Isozyme-specific glutathione S-transferase inhibitors potentiate drug sensitivity in cultured human tumor cell lines. Cancer Chemother Pharmacol 37, 363-370.

## FIGURE LEGENDS

Fig. 1: (A) Construct used to overexpress TcEF-1 $\gamma$  in *T. cruzi*. Restriction map of the pTEX expression vector (Kelly et al., 1992). (B) Construct pTEX-TcEF-1 $\gamma$  (linear map) in which the TcEF-1 $\gamma$  cDNA has been introduced into the *Eco*RI-*Xba*I sites of pTEX polylinker. Neor, neomycin phosphotransferase gene; Ampr,  $\beta$ -lactamase gene.

Fig. 2: Southern blot analysis of transformed *T. cruzi* DNA (5  $\mu$ g) digested with different restriction enzymes and hybridized with the TcEF-1 $\gamma$  cDNA probe labeled with  $\alpha^{32}\text{P}$ dCTP. DNA from pTEX (1, 2) or pTEX-TcEF-1 $\gamma$  (3, 4) transfected cells digested with *Eco*RI (1, 3) and *Eco*RI+*Xba*I (2, 4); DNA from non transfected cells digested with *Eco*RI (5) and *Eco*RI+*Xba*I (6).

Fig. 3: (A) Expression of transfected genes in *T. cruzi*. (1) RNA from non- transfected cells; (2, 3) *T. cruzi* epimastigote clones which had been transformed with pTEX and pTEX-TcEF-1 $\gamma$ , respectively. Equal quantity of total RNA was stained by ethidiumbromide (upper panel) and hybridized with TcEF-1 $\gamma$  probe (lower panel). rRNA indicates the position of ribosomal RNA. (B) Comparison between TcEF-1 $\gamma$  expression levels according to the G418 concentration. Northern blot of equal total RNA from non-transfected cells (1), pTEX (2, 4) or pTEX-TcEF-1 $\gamma$  (3, 5) transfected cells, hybridized with TcEF-1 $\gamma$  probe. Parasites were cultured with 200  $\mu$ g/ml G418 (2, 3) or 2000  $\mu$ g/ml (4, 5).

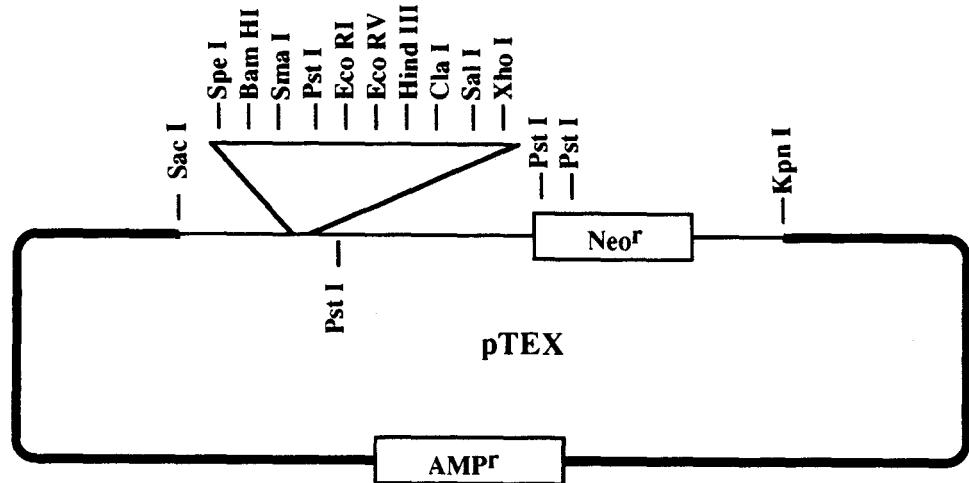
Fig. 4: Production of TcEF-1 $\gamma$  in transfected parasites. Total extracts from pTEX-TcEF-1 $\gamma$  (1, 2) or pTEX (3) transfected cells and non-transfected cells (4) reacted with normal rabbit serum (1) and a mixture of rabbit anti-TcEF-1 $\gamma$  and anti-Tc24 immune sera (2, 3, 4). Rabbit immune serum to a constitutive protein (Tc24) was used to control that equal amounts of antigens have been analysed for each parasite population. Tc24 is indicated by an arrow, TcEF-1 $\gamma$  and its degradation product are noted by an closed and open arrowhead, respectively.

Fig. 5: Effects of nifurtimox, benznidazole and clomipramine on the growth of transfected and control cells. The growth inhibition was determined as described under Materials and Methods section.

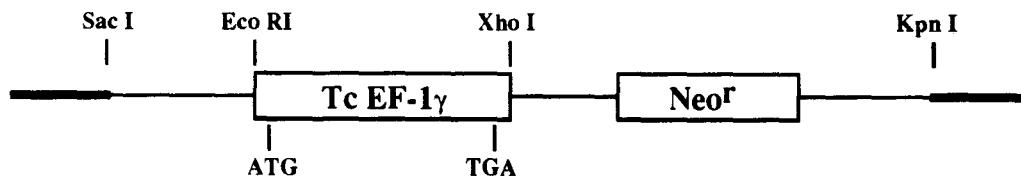
### Acknowledgements

We thank John Kelly for kindly providing the pTEX vector, Dr. Stanislas Tomavo for his precious help to transfect *T. cruzi* epimastigotes and M. Loyens for his technical assistance. Odile Billaut-Mulot is a recipient of a fellowship from the French Ministry of Research and Education and Rodolfo Fernandez-Gomez is a recipient of a Venezuelan CONICIT-BID fellowship.

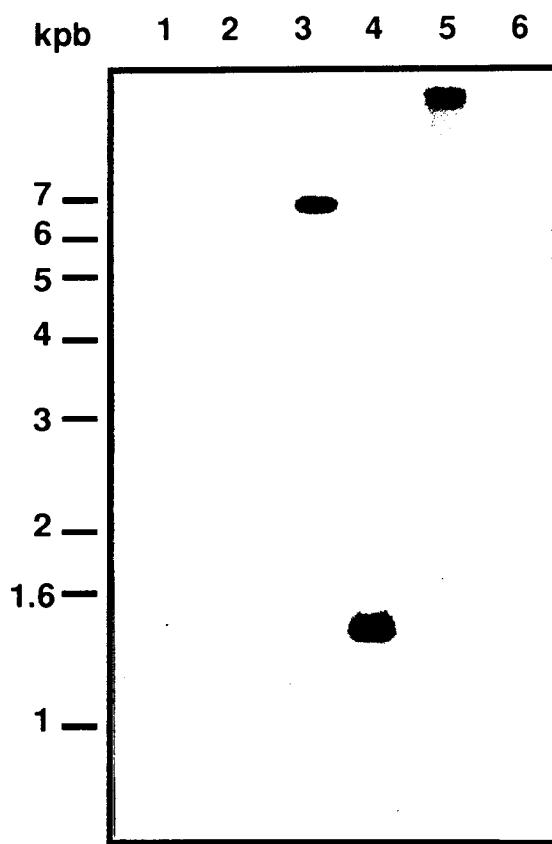
A



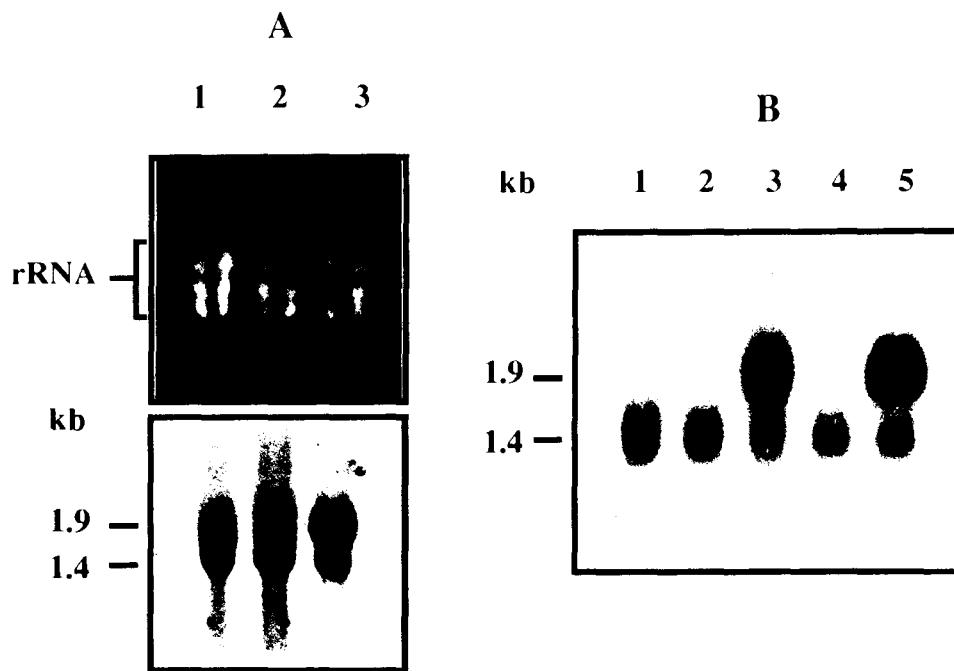
B



**Fig. 1 : Construction utilisée pour sur-exprimer le gène *TcEF-1 $\gamma$* . (A) Carte de restriction du vecteur d'expression pTEX (Kelly et al., 1992). (B) Portion du vecteur pTEX-TcEF-1 $\gamma$  obtenu après introduction de l'ADNc codant pour TcEF-1 $\gamma$  dans les sites EcoRI-XbaI du vecteur pTEX. Neo, gène de la néomycine phosphotransférase; Amp, gène de la  $\beta$ -lactamase.**

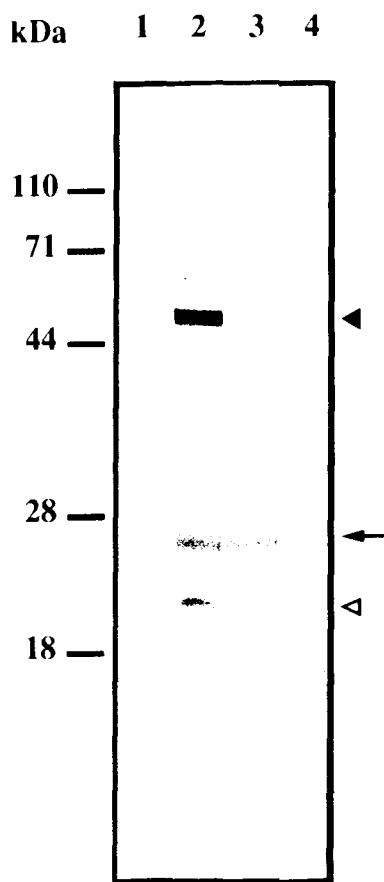


**Fig. 2 : Southern-blot de l'ADN génomique.** 5 µg d'ADN d'épimastigotes transfectés avec le vecteur pTEX, sont digérés par *EcoRI* (1) et *EcoRI + XhoI* (2) ou transfectés avec le vecteur pTEX-TcEF-1 $\gamma$  digérés par *EcoRI* (3) et *EcoRI + XhoI* (4), ainsi que l' ADN de parasites normaux digérés par *EcoRI* (5) et *EcoRI + XhoI* (6) sont hybridés avec la sonde TcEF-1 $\gamma$ .



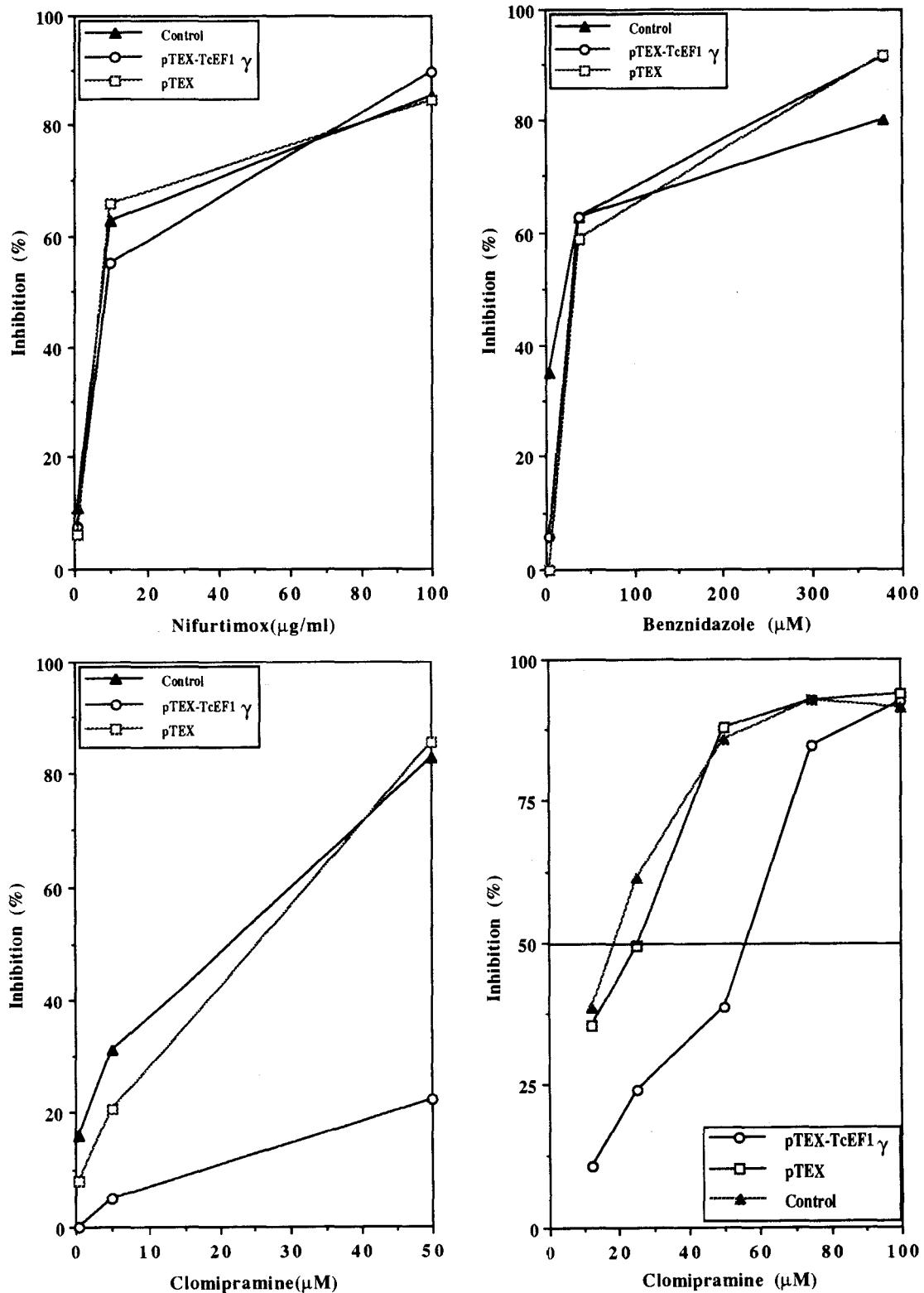
**Fig. 3** **A:** Comparaison du niveau d'expression du gène *TcEF-1 $\gamma$*  dans les épimastigotes de *T. cruzi*: (1) souche sauvage, (2, 3) clones obtenus après transfection avec les vecteurs pTEX et pTEX-TcEF-1 $\gamma$ , respectivement. La même quantité d'ARN totaux des différentes préparations parasitaires a été analysée en gel (partie supérieure) et hybridée avec la sonde TcEF-1 $\gamma$  (partie inférieure). rRNA indique la position des ARN ribosomaux.

**B:** Comparaison du niveau d'expression du gène *TcEF-1 $\gamma$*  en fonction de la dose de drogue G418. Le Northern-blot a été réalisé sur l'ARN total d'épimastigotes normaux (1), transfectés avec le vecteur pTEX (2, 4) ou pTEX-TcEF-1 $\gamma$  (3, 5), hybridé avec la sonde TcEF-1 $\gamma$ . Les parasites sont cultivés avec 200  $\mu$ g/ml de G418 (2, 3) ou 2000  $\mu$ g/ml (4, 5).



**Fig. 4: Comparaison du niveau d'expression du produit du gène *TcEF-1 $\gamma$*  par immunoblot sur l'antigène d'épimastigote de *T. cruzi*: Clones obtenus après transfection avec les vecteurs pTEX-TcEF-1 $\gamma$  (1, 2) et pTEX (3); (4) souche sauvage. Les différents extraits ont été révélés par un sérum de lapin normal (1), un mélange de deux sérums immuns (2, 3, 4): sérum de lapin anti-TcEF-1 $\gamma$  et sérum de lapin anti-Tc24. Le sérum immun dirigé contre le composant Tc24, qui est une protéine constitutive, a été utilisé comme témoin interne, ce qui permet de contrôler que les dépôts sont équivalents. La position de la Tc24 est indiquée par une flèche noire, celle de la protéine TcEF-1 $\gamma$  par une tête de flèche pleine, tandis que la tête de flèche vide indique le produit de dégradation de TcEF-1 $\gamma$ .**

**Fig.5: Effets du nifurtimox, du benznidazole et de la clomipramine sur la croissance des parasites transfectés et parasites sauvages.**



## **ARTICLE 5**

**Le facteur d'elongation 1 $\alpha$ : localisation nucléaire dans les parasites en apoptose**

Afin de compléter la caractérisation du complexe EF-1 de *T. cruzi*, nous avons recherché le gène codant pour la sous-unité  $\alpha$ . L'ADN génomique d'épimastigote fut tout d'abord amplifié en utilisant deux amorces spécifiques de l'ADNc codant pour EF-1 $\alpha$  de *Trypanosoma brucei*. Un produit de PCR de 900 pb a été cloné et séquencé. La séquence en acide nucléique de ce fragment de PCR présente 86.6 % d'identité avec celle de l'ADNc codant pour EF-1 $\alpha$  de *T. brucei*. Cette région d'identité concerne une zone allant de la méthionine à la valine en position 303.

Une banque génomique d'épimastigote a été construite, puis criblée par la technique d'hybridation sur filtres contenant l'ADN des phages, en utilisant comme sonde le fragment de PCR de 900 pb marqué au  $^{32}\text{P}$ . L'ADN génomique des clones positifs a été sous-cloné dans le vecteur PUC 18. Le sous-clonage a été vérifié par hybridation sur colonies. Un clone positif de 1960 pb a été sélectionné puis séquencé. Cette séquence montre la présence d'un cadre de lecture ouvert de 449 acides aminés d'une masse moléculaire théorique de 50 kDa. Le degré d'homologie entre cette séquence et celle des sous-unités  $\alpha$  d'autres espèces est très élevé. Il atteint 99.5 % avec EF-1 $\alpha$  de *T. brucei* (94 % d'identité) et 92 % avec EF-1 $\alpha$  de l'homme (77 % d'identité). D'autre part, les sites de modifications post-traductionnelles, ainsi que les domaines qui interagissent avec les composants cellulaires comme le GTP/GDP, les ARNt et la  $\beta$  actine sont conservés.

L'hybridation de la sonde marquée sur l'ARN a montré la présence d'un transcrit de 1700 b chez *T. cruzi*, mais également chez *T. rangeli*. Par ailleurs, le profil d'hybridation sur l'ADN génomique, digéré par différentes enzymes de restriction, indique la présence d'un seul gène codant pour la protéine TcEF-1 $\alpha$ .

La réactivité d'un sérum de lapin anti-EF-1 $\alpha$  d'*Artemia salina* vis-à-vis d'un extrait total d'épimastigote révèle une bande à 54 kDa qui pouvait correspondre à TcEF-1 $\alpha$ . Afin d'obtenir un sérum anti-TcEF-1 $\alpha$ , le produit de PRC de 900 pb codant pour les 303 acides aminés N-terminaux a été sous-cloné dans le vecteur pQ32. La protéine recombinante (TcEF-1 $\alpha$ Nt) est reconnue par le sérum anti-EF-1 $\alpha$  d'*Artemia salina*. Un sérum de souris a été obtenu après immunisation avec la protéine de fusion TcEF-1 $\alpha$ Nt. Ce sérum révèle une protéine sur l'antigène total d'épimastigote de même masse moléculaire que celle reconnue par le sérum anti-EF-1 $\alpha$  d'*Artemia salina*. L'ensemble de ces résultats indique que le polypeptide de 54 kDa correspond à TcEF-1 $\alpha$ .

Enfin, nous avons étudié la localisation de la protéine TcEF-1 $\alpha$  au cours de la croissance du parasite *in vitro*. La courbe de croissance présente deux phases, une phase logarithmique avec une multiplication exponentielle des parasites et une phase stationnaire où les parasites ne se divisent plus. Lors de cette dernière phase, une fraction des épimastigotes se différencient en trypomastigotes métacycliques tandis que la plupart des parasites meurent. Les caractéristiques morphologiques et biochimiques de ces épimastigotes en fin de vie, ressemblent à ceux observés lors de l'apoptose qui est le phénotype le plus fréquent de la mort cellulaire programmée (Détaillé dans l'article 6 suivant).

L'étude par immunofluorescence, en utilisant le sérum anti-EF-1 $\alpha$ , montre un changement de localisation de TcEF-1 $\alpha$  durant la croissance. En effet, la réactivité des anticorps est localisée dans le cytoplasme des formes jeunes, alors qu'elle décroît dans le cytoplasme des formes vieillissantes de la phase stationnaire. De façon inattendue, TcEF-1 $\alpha$  montre une localisation préférentiellement nucléaire dans le cas des parasites de la phase stationnaire dont les aspects morphologiques rappellent ceux de l'apoptose. Afin de vérifier que la localisation nucléaire de TcEF-1 $\alpha$  est liée à la mort des parasites,

l'immunofluorescence a été réalisée sur des épimastigotes traités avec la généticine (G418) qui induit 100 % de mort par apoptose. Dans ces conditions, la localisation de TcEF-1 $\alpha$  est nucléaire chez toutes les formes parasitaires.

De nombreux travaux ont suggéré que EF-1 $\alpha$  pouvait avoir d'autres fonctions que celle de l'élongation de la synthèse protéique. En particulier, il a été avancé que EF-1 $\alpha$  peut jouer un rôle au niveau de la transcription, et qu'il agirait également sur la longévité des cellules.

Nos résultats montrant une localisation nucléaire de TcEF-1 $\alpha$  dans les parasites âgés en voie de mort par apoptose, pourraient être en faveur d'un rôle de EF-1 $\alpha$  dans le contrôle des phénomènes de division et de mort cellulaire chez les parasites.

***Trypanosoma cruzi* elongation factor 1- $\alpha$  : Nuclear  
localization in parasites undergoing apoptosis  
(Gene, sous press)**

Key words: genomic library, fusion protein, antibodies to *Artemia salina* EF-1 $\alpha$ , programmed cell death, immunodetection

Odile Billaut-Mulot, Rodolfo Fernandez-Gomez, Marc Loyens and Ali Ouaissi

*Laboratoire de recherche sur les Trypanosomatidae, Institut Pasteur, 1 rue du Pr. Calmette, 59019 Lille, France.*

*Correspondance to:* Dr. M.A. Ouaissi. Laboratoire de parasitologie. Faculté de Médecine. Université de Montpellier I. Tel: 33 67 33 69 60 Fax: 33 67 63 00 49.

Abbreviations: aa, amino acid(s); *A. salina*, *Artemia salina*; bp, base pair(s); cDNA, DNA complementary to RNA; EF, elongation factor; G418, geneticin; kb, kilobase(s); kDa, kilodalton(s); mRNA, messenger RNA; mRNP, messenger ribonucleoprotein particle; nt, nucleotide(s); PAGE, polyacrylamide-gel electrophoresis; PCR, polymerase chain reaction; SDS, sodium dodecyl sulfate; *T. cruzi*, *Trypanosoma cruzi*; TcEF-1 $\alpha$ , *T. cruzi* protein homologous to EF-1 $\alpha$ ; TcEF-1 $\alpha$ Nt, TcEF-1 $\alpha$  NH2-terminal fusion protein; tRNA, transfert RNA.

## SUMMARY

The cloning and sequencing of the gene coding for *Trypanosoma cruzi* elongation factor 1 $\alpha$  (TcEF-1 $\alpha$ ) was performed by screening a *T. cruzi* genomic library with a probe obtained through the polymerase chain reaction (PCR) amplification of *T. cruzi* DNA using two oligonucleotides deduced from the sequence of *T. brucei* EF-1 $\alpha$ . Southern blot analysis of *T. cruzi* digested genomic DNA and Northern blot hybridized with the labeled probe revealed that one copy of TcEF-1 $\alpha$  exist in the genome of the parasite. Indirect immunofluorescence technique using anti-EF-1 $\alpha$  antibodies and epimastigotes harvested after different days of *in vitro* culture showed that EF-1 $\alpha$  is localised in the cytoplasm of the parasites from the exponential growth phase. Surprisingly, during the stationnary phase (ageing parasites), EF-1 $\alpha$  was found in the nucleus. Furthermore, treatment of parasites with the antibiotic drug geneticin (G418) which induces the death of epimastigotes by apoptosis showed selective localization of EF-1 $\alpha$  in the nucleus of dying parasites. This observation supports the notion already reported in the case of mammalian cells that EF-1 $\alpha$  could participate in the transcription processes and possibly in the case of *T. cruzi*, in the expression regulation of genes involved in the control of cell death. The possible transfection and genomic manipulation of *T. cruzi* may provide a model to study the role of TcEF-1 $\alpha$  in this phenomenon.

## INTRODUCTION

Elongation factor 1 $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ) plays a central role in eukaryotic protein biosynthesis. It consists of two functionally distinct parts, EF-1 $\alpha$  and EF-1 $\beta\gamma\delta$ . EF-1 $\alpha$  binds aminoacyl-tRNAs in the acceptor site of 80S ribosome under the hydrolysis of GTP (Moazed and Noller, 1989). EF-1 $\beta\gamma\delta$  catalyses the exchange of GDP in the binary complex EF-1 $\alpha$ GDP for free GTP (Janssen and Möller, 1988). EF-1 $\alpha$  is an exceptionally abundant protein comprising 3-10% of the soluble proteins in most cells and it appears to have a number of other functions. Indeed, EF-1 $\alpha$  has been found in association with mammalian valyl-tRNA synthetase together with EF-1 $\beta\gamma\delta$ , complexed to mRNP particles, bound to the actin cytoskeleton of the cell, linked to the endoplasmic reticulum or the mitotic apparatus, being involved in protein degradation or ribosome association (Merrick, 1992). EF-1 $\alpha$  has also been implicated in a variety of processes, as diverse as embryogenesis, cell division, cell proliferation, ageing, oncogenic transformation, (Janssen et al., 1994). Furthermore, a considerable amount of EF-1 $\alpha$  has been localized in the nucleus of several type of cells (Colling et al., 1994; Barbarese et al., 1995). The possibility also remains that EF-1 $\alpha$  could have a role in the regulation of transcription (Blumenthal et al., 1972).

*Trypanosoma cruzi* is an intracellular pathogen that causes Chagas' disease. This protozoan parasite has a complex life cycle that includes different stages in the insect vector (triatomine bug) and vertebrate hosts. There are two parasite stages in the vector: epimastigote and metacyclic trypomastigote, whereas the vertebrate stages are blood stream trypomastigote and intracellular amastigote. The morphological transformation of epimastigotes to metacyclic trypomastigotes is named metacyclogenesis process and could be observed *in vitro* during the stationnary growth phase of epimastigotes in a cell free medium.

In previous studies, we reported the characterization of cDNA encoding *T. cruzi* EF-1 $\gamma$  and  $\beta$  subunits (Billaut-Mulot et al., 1993;

Plumas-Marty et al., 1992; 1994). Surprisingly, we found that TcEF-1 $\gamma$  N-terminal domain exhibited a significant homology to glutathione S transferases (GSTs) (Billaut-Mulot et al., 1994). Independent investigators reported similar observations in the case of eukaryotic EF-1 $\gamma$  (Koonin et al., 1994), suggesting therefore, that the GST-like domain may be involved in the formation and assembly of multimolecular complexes containing EF-1 and aminoacyl-tRNA synthetases (Bec et al., 1989) through the transfer of thiol groups between glutathione, disulfide glutathione, cysteines and protein disulfide bonds. In the present study, we have extended our approach towards the characterization of the *T. cruzi* EF-1 complex, through the cloning and sequencing of the *T. cruzi* gene encoding the EF-1 $\alpha$  subunit. The immunofluorescence studies using anti-TcEF-1 $\alpha$  antibodies allowed to show a striking pattern of cell distribution, that is cytoplasmic or nuclear localization according to the growth phase of epimastigote. Moreover, nuclear localization seems to be a marker of parasites undergoing apoptosis (Ameisen et al., 1995). These observations may support the notion of EF-1 $\alpha$  having functions in genetic control of cell death in these pathogenic organisms and in a more general term nuclear processes like transcription.

## EXPERIMENTAL AND DISCUSSION

### (a) Cloning and sequencing of *EF-1 $\alpha$* gene of *T. cruzi*

In order to isolate the *TcEF-1 $\alpha$*  gene, we constructed and screened a *T. cruzi* genomic library using a 0.9 kbp *T. cruzi* PCR product (see legend to Fig. 1). The nucleotide (nt) and deduced amino acid (aa) sequence of *TcEF-1 $\alpha$*  gene is indicated in Fig. 1. Computer analysis detected a single open reading frame of 449 aa with a predicted molecular mass of 50 kDa. Alignment of TcEF-1 $\alpha$  with EF-1 $\alpha$  sequences from other species revealed a high degree of conservation which seems to be characteristic of EF-1 $\alpha$  (Table I). Indeed, in mammals, human and rabbit EF-1 $\alpha$  amino acid sequence are 100 % identical, whereas mouse and hamster sequences differ from the human

sequence by only a single amino acid. This high degree of identity is interpreted as a conservation of active sites that interact with large substrates (tRNA or mRNA) or other factors and ribosomes (Riis et al., 1990). Comparison of the protein domains interacting with cellular components (GTP/GDP, tRNAs and  $\beta$ -actin) (Wang et al., 1994) reveals that they are highly conserved in species belonging to the four traditional eukaryotic kingdoms (Fig. 1). Moreover, sites for post-translation modifications are also conserved in *T. cruzi* EF-1 $\alpha$  (Merrick, 1992). Indeed, 6 lysine residues (Lys-30, Lys-36, Lys-55, Lys-79, Lys-306, Lys-380) that undergo post-translational methylation in Rabbit EF-1 $\alpha$  were present in TcEF-1 $\alpha$ . Furthermore, addition of glycerylphosphorylethanolamine occurs at residues Glu-301 and Glu-374 of the rabbit EF-1 $\alpha$ . These sites were found to be conserved in the TcEF-1 $\alpha$  sequence in position 289 and 362. The 5' part of TcEF-1 $\alpha$  sequence contains a dinucleotide 'AG' and an upstream polypyrimidine-rich stretches. The AG doublet is likely the *trans*-splicing acceptor site (Borst, 1986).

Further examination of the 5' and 3' untranslated region revealed the presence of a stretch of repeat nucleotide sequence at positions 247 to 289 and 1853 to 1893, respectively (Fig. 1). These repeat sequences are composed in part of dinucleotides (T-C)7 and (T-G)7 thus resembling DNA regions having Z-DNA-forming properties (Wang et al., 1979). This alternative conformation has been suggested to play a role in the regulation of gene expression (Nordheim and Rich, 1983). Furthermore, the (T-G) $n$  is postulated to act as a hot spot for recombination (Borst, 1986). Whether these sequences function to exert control over *TcEF-1 $\alpha$*  gene expression is not known. Further studies will be needed to prove the biological function of these gene flanking sequences.

### **(b) Transcript of *TcEF-1 $\alpha$* and genes number analysis**

The TcEF-1 $\alpha$  coding sequence was labeled with  $\alpha^{32}\text{P}$ dCTP and used to probe a Northern blot of total RNA of *T. cruzi* and *T. rangeli* epimastigotes. A band of about 1.7 kb was detected in the case of *T.*

*cruzi* RNA, large enough to code for a polypeptide chain of 449 residues (Fig. 2B, lane 1). Moreover, a transcript of similar molecular size was observed in the case of *T. rangeli* (Fig. 2B, lane 2).

An estimation of the number of *EF-1 $\alpha$*  genes in the *T. cruzi* genome was made by Southern blot analysis with the same probe as that used in the Northern blot hybridization. Epimastigote genomic DNA was digested with different restriction enzymes. As shown in Figure 2A, the probe hybridized to one fragment when using *Hind*III (4) and *Eco*RI (5) which did not cleave the insert. Two fragments were detected with *Dra*II (1) and *Apa*I (2) in agreement with the presence of a single restriction site for the enzymes in *TcEF-1 $\alpha$*  gene sequence. Furthermore, the labeled probe hybridized with three bands in the case of *Bcl*II (3) for which two restriction sites were predicted by the cloned gene. This pattern of hybridization indicates that one single copy of the *TcEF-1 $\alpha$*  gene per haploid genome is present in *T. cruzi*. The presence of a single *EF-1 $\alpha$*  gene has also been observed in the case of other eukaryotes such as chicken (Wang et al., 1994) or *Neurospora crassa* (Ichi-Ishi and Inoue, 1995). In contrast, there are other species where *EF-1 $\alpha$*  gene appeared to be present in more than one copy (Merrick, 1992). This reflects the relative abundance of EF-1 $\alpha$  which constitutes between 3 and 10 % of the soluble proteins.

### (c) Immunological characterization of TcEF-1 $\alpha$

A rabbit immune serum against *Artemia salina* EF-1 $\alpha$  when reacted against epimastigote total extracts revealed one band with molecular mass of 54 kDa (Fig. 3A, lane 2). In order to obtain an antiserum against EF-1 $\alpha$  of *T. cruzi*, the 0.9 kbp amplified product coding for the N-terminal 303 amino acids (TcEF-1 $\alpha$ Nt), was cloned in frame into pQE-32. This vector system allows the production of TcEF-1 $\alpha$ Nt fused with 6 histidine residues and its purification using an Ni-NTA resin according to the manufacturer's instructions. The eluted product was analyzed by SDS-PAGE. A recombinant protein of molecular mass 42 kDa recognized by the anti-*A. Salina* EF-1 $\alpha$  rabbit serum (Fig. 3B, lane 4)

and sera from TcEF-1 $\alpha$ -immunized mice (Fig. 3B, lane 2) was isolated. The band at molecular mass 23 kDa could be degradation product of TcEF-1 $\alpha$ Nt reacting with mouse antibodies (Fig. 3B, lane 2). Furthermore, mouse immune serum to TcEF-1 $\alpha$ Nt when reacted against epimastigote extracts recognized a band of molecular mass similar to that reacting with anti-*A. Salina* rabbit serum (Fig. 3A, lane 4 and lane 2, respectively). Moreover, anti-TcEF-1 $\alpha$ Nt mouse serum revealed a polypeptide of molecular mass 54 kDa when reacted in western blot against *T. cruzi* trypomastigote, amastigote and *Leishmania donovani* total extracts (data not shown). Control tests using pre-immune mouse serum (Fig. 3A, lane 3; Fig. 3B, lane 1) and normal rabbit serum (Fig. 3A, lane 1; Fig. 3B, lane 3) showed negative reactions.

#### **(d) Immunolocalization of TcEF-1 $\alpha$ during parasite growth**

The epimastigotes were cultivated in a monophasic medium, they remained in the active dividing phase (logarithmic) up to the 6th day and in the non-dividing phase (stationary) for the 6<sup>th</sup> to the 9<sup>th</sup> day (Fig. 4). During the stationary growth phase, a proportion of epimastigotes differentiate to metacyclic trypomastigotes which are the vertebrate infective form. Similar changes occur during the growth of *T. cruzi* epimastigotes in the triatomine vector. This suggests that the nutrient-depleted environment, resembling that of stationary cultures, exerts a selective pressure on the epimastigotes, thereby giving rise to an infective form. In a recent study, we reported for the first time that in the absence of medium renewal, while a proportion of epimastigotes differentiate to infective metacyclic trypomastigotes, a significant number of epimastigotes die. Dead parasites appear as spheroid shaped cells with a long flagellum and showed cytoplasmic and nuclear morphological features and DNA fragmentation pattern typical of apoptosis, the most frequent phenotype of programmed cell death (PCD) (Ameisen et al., 1995).

Using rabbit anti-EF-1 $\alpha$  antibodies, an immunofluorescence study was conducted in order to localize TcEF-1 $\alpha$  during cell growth. As shown in

Fig. 5A, the anti-EF-1 $\alpha$  antibodies revealed reactive material associated with the cytoplasm of young epimastigotes harvested during the logarithmic phase of growth. Similar pattern of fluorescence was observed during the first days of stationnary phase (Fig. 5B). Surprisingly, old epimastigotes harvested at late periods (13 days or more), when reacted with anti-EF-1 $\alpha$  antibodies showed positive signals in the nuclei (Fig. 5C). These parasites appeared as spheroid shaped cells, a morphological feature already observed in the case of epimastigotes undergoing apoptosis (Ameisen et al., 1995) and binucleated cells indicated arrest at cytokinesis. Similar patterns of fluorescence were obtained using anti-TcEF-1 $\alpha$  mouse serum (data not shown). We have previously reported that epimastigotes responded to G418-mediated agression by undergoing apoptosis (Ameisen et al., 1995). In order to ascertain that the nuclear localization of EF-1 $\alpha$  is preferentially linked to the death of epimastigotes, we conducted immunofluorescence experiments using anti-EF-1 $\alpha$  antibodies and epimastigotes treated with the G418 drug. As shown in Fig. 5D, a strong positive signal was observed in the nuclei of G418 treated parasites. Control tests using preimmune serum showed negative reactions (Fig. 5E, F).

A number of studies have shown that high amounts of EF-1 $\alpha$  could be localized in the nuclei of several type of cells (Colling et al., 1994; Barbarese et al., 1995; Janssen et al., 1994). This might suggest that the nuclear EF-1 $\alpha$  is functionally distinct from the cytoplasmic component. This possibility is supported by the fact that the enzyme, Q $\beta$  replicase, responsible for the replication of the RNA of *Escherichia coli* phage Q $\beta$ , is complexed with EF-Tu and EF-Ts which is the prokaryotic counterpart of EF-1 $\alpha$  and EF-1 $\beta$  respectively (Blumenthal et al., 1972). Moreover, the EF-Tu-EF-Ts complex has been found to stimulate ribosomal RNA synthesis four-fold (Travers, 1973). Taken together, these observations and our data showing the selective nuclear localization of TcEF-1 $\alpha$  in aged non proliferating senescent epimastigotes and/or those undergoing apoptosis pointed to the need of studying the possible involvement of TcEF-1 $\alpha$  in transcription processes.

### (e) Concluding remarks

We have for the first time isolated and characterized a *T. cruzi* gene encoding EF-1 $\alpha$ . The antibodies against *A. salina* EF-1 $\alpha$  or TcEF-1 $\alpha$ Nt fusion protein revealed a striking cell distribution of EF-1 $\alpha$  being mainly localized in the cytoplasm of exponential growing epimastigotes and in the nuclei of parasites undergoing apoptosis. This novel finding may suggest that the nuclear TcEF-1 $\alpha$  participates alone or in combination with other cellular factors to coordinate the cell cycle in *T. cruzi*. The possible genetic manipulation of *T. cruzi* by means of transfection offers a tool to investigate the possible role of EF-1 $\alpha$  in transcription processes.

## References

- Ameisen, J.C., Idziorek, T., Billaut-Mulot, O., Loyens, M., Tissier, J.P., Potentier, A. and Ouaissi, A. Apoptosis in a unicellular eukaryote (*Trypanosoma cruzi*): implications for the evolutionary origin and role of programmed cell death in the control of cell proliferation, differentiation and survival. *Cell Death and Differentiation* 2 (1995) 285-300
- Barbarese, E., Koppel, D.E., Deutscher, M.P., Smith, C. L., Ainger, K., Morgan, F. and Carson, J.H.: Protein translation components are colocalized in granules in oligodendrocytes. *J. Cell Sci.* 108 (1995) 2781-2790
- Bec, G., Kerjan, P., Zha, X.D. and Waller, J.P.: Valyl-tRNA synthetase from a rabbit liver. I. Purification as a heterotypic complex in association with elongation factor 1. *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 21131-2137
- Billaut-Mulot, O., Pommier, V., Schöneck, R., Plumas-Marty, B., Taibi, A., Loyens, M., Capron, A. and Ouaissi, A.: Nucleotide sequence of a *Trypanosoma cruzi* cDNA encoding a protein homologous to mammalian EF-1 $\gamma$ . *Nucleic Acids Res.* 21 (1993) 3901
- Billaut-Mulot, O., Schöneck, R., Fernandez-Gomez, R., Taibi, A., Capron, A., Pommier, V., Plumas-Marty, B., Loyens, M. and Ouaissi, A.: Molecular and immunological characterization of a *Trypanosoma cruzi* protein homologous to mammalian elongation 1 gamma. *Biol. Cell.* 82 (1994) 39-44

Blumenthal, T., Landers, T.A. and Weber, K.: Bacteriophage Q $\beta$  replicase contains the protein biosynthesis elongation factor EF Tu and EF Ts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69 (1972) 3113-1317

Borst, P.: Discontinuous transcription and antigenic variation in Trypanosomes. Ann. Rev. Biochem. 55 (1986) 701-732

Colling, D.A., Wastenays, G.O., Miyazaki, M. and Williamson, R.E.: Elongation factor 1 $\alpha$  is a component of the subcortical actin bundles of characean algae. Cell. Biol. Int. 18 (1994) 1019-1024

Ichi-Ishi, A. and Inoue, H.: Cloning, nucleotide sequence, and expression of tef-1, the gene encoding translation elongation factor 1  $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ) of *Neurospora crassa*. Jpn. J. Genet. 70 (1995) 273-287

Janssen, G.M.C. and Möller, W.: Elongation factor 1  $\beta\gamma$  from *Artemia*. Purification and properties of its subunits. Eur. J. Biochem. 171 (1988) 119-129

Janssen, G.M.C., Van Damme H.T.F., Kriek, J., Amons R. And Möller W.: The subunit structure of elongation factor 1 from *Artemia salina*; Why two  $\alpha$ -chains in this complex? J. Biol. Chem. 269 (1994) 1-8

Kaur, K.J. and Rubens L.: Protein translation elongation factor-1 $\alpha$  from *Trypanosoma brucei* binds calmodulin. J. Biol. Chem. 269 (1994) 23045-23050

Koonin, E.V., Mushegian, A.R., Tatusov, R.L., Altschul, S.F., Bryant, S.H., Bork, P and Valencia A.: Eukaryotic translation elongation factor 1 $\gamma$  contains a glutathione transferase domain-Study of a diverse, ancient protein superfamily using motif search and structural modeling. Protein Sci. 3 (1994) 2045-2054

Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (1970) 680-685

Merrick, W.C.: Mechanism and regulation of eukaryotic protein synthesis *Microbiol. Rev.* 56 (1992) 291-315

Moazed, D. and Noller, H.T.: Intermediate states in the movement of transfer RNA in the ribosome. *Nature* 342 (1989) 142-148

Nordheim, A. And Rich, A.: Negatively supercoiled simian virus 40 DNA contains Z-DNA segments within transcriptional enhancer sequences. *Nature* 303 (1983) 674-679

Ouaissi, M.A., Dubremez, J.F., Kusnier, J.P., Cornette, J., Loyens, M., Taibi, A., Marty, B., Velge, P., Rizvi, F., and Capron, A.: *Trypanosoma cruzi*: Differential expression and distribution of 85 kDa polypeptide epitope by in vitro developmental stages. *Exp. Parasitol.* 71 (1990) 207-217

Plumas-Marty, B., Verwaerde, C., Loyens, M., Velge, P., Taibi, A., Cesbron, M.F., Capron, A. and Ouaissi, A.: *Trypanosoma cruzi* glutathione-binding proteins: immunogenicity during human and experimental Chagas' disease. *Parasitology* 104 (1992) 87-98

Plumas-Marty, B., Schöneck, R., Billaut-Mulot, O., Taibi, A. and Ouaissi, A.: Molecular cloning of a *Trypanosoma cruzi* cDNA encoding a protein homologous to mammalian EF-1 $\beta$ . *Parasitol. Res.* 80 (1994) 626-628

Riis, B., Rattan, S.I.S., Clark, B.F.C. and Merrick, W.C.: Eukaryotic protein elongation factors. *Trends Biochem Sci.* 15 (1990) 420-424

Sambrook, J., Frisch, E.F. Maniatis, T., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edn., 1989, pp. 1.92

Travers, A.: Control of Ribosomal RNA synthesis in vitro. Nature 244 (1973) 15-18

Wang, A.H.J., Quigley, G.J., Kolpak, F.J., Crawford, J.L., van Boom, J.H., van der Marel, G. And Rich, A.: Molecular structure of a left-handed double helical DNA fragment at atomic resolution. Nature 282 (1979) 680-686

Wang, H., Parent, M. and Morais, R. Cloning and characterization of a cDNA encoding elongation factor 1 $\alpha$  from chicken cells devoid of mitochondrial DNA. Gene, 140 (1994) 155-161

### Acknowledgements

We thank Pr. W. Möller and Dr. Janssen from the Laboratory for Medical Biochemistry, Sylvius Laboratories, State University of Leiden in the Netherlands for providing us with anti-*A. salina* EF-1 $\alpha$  rabbit immune serum. Odile Billaut-Mulot is a recipient of a fellowship from the French Ministry of Research and Education and Rodolfo Fernandez-Gomez is a recipient of a Venezuelan CONICIT-BID fellowship.

## FIGURE LEGENDS

Fig. 1. *T. cruzi EF-1 $\alpha$*  gene cloning and sequencing. The deduced aa are aligned with the second nt of each codon. The underlined aa represent the conserved sequences involved in GTP-binding regions (aa 14-21, 91-94, 153-156), actin binding domain (162-181) and tRNA binding domain (230-266). The stop codon is marked with an asterisk. The 5' and 3' nt sequence repeat are underlined. The pyrimidine-rich stretches upstream from the splice acceptor 'AG' dinucleotide (marked by two asterisk in position 359-360) are underlined by dashes. **Methods:** In order to isolate *TcEF-1 $\alpha$*  gene, the genomic DNA was amplified by PCR using two primers specific of *T. brucei* cDNA (Kaur and Rubens, 1994), a sense primer (5' GCCATGGGAAAGGAAAAGGTGCAC 3') and an anti-sense primer (5'AACGTTCAACA-CGTTAAAGCCGAC 3'). A 0.9 kbp amplified product was obtained and cloned using TA cloning kit (Invitrogen corporation, San Diego). Sequencing of this PCR fragment showed 86.6 % identity with *T. brucei* cDNA corresponding to amino acid 1 (Methionine) to 303 (Valine). A *T. cruzi* genomic library was constructed as follow: high molecular weight genomic DNA was prepared from epimastigotes and partially digested by SAU3A. The DNA fragments were ligated into *Bam*HI site of the phage vector EMBL3 (Stratagene, La Jolla, CA). Recombinant DNA was *in vitro* packaged into phage particles with the "Gigapack II" kit (Stratagene, La Jolla, CA) and lysis plaques were obtained after transfection into *E. coli*, strain XL1blue MRA (p2). The 0.9 kbp PCR fragment was  $\alpha^{32}\text{P}$ dCTP radiolabeled by DNA labelling system (Amersham, England) and used to screen the *T. cruzi* genomic library by plaque filter hybridization according to the manufacturer's instructions (Stratagene, La Jolla, CA). Genomic DNA fragments from positive clones were subcloned into PUC 18 plasmid vector (Pharmacia, Uppsala, Sweden) and controlled by colony hybridization (Sambrook et al., 1989). Sequence was determined from double-stranded plasmid subclones using Automated Laser

Fluorescence AFL DNA Sequencer (Pharmacia, Uppsala, Sweden) and Auto Read™ sequencing kit. The sequence data described here has been submitted to GenBank under accession No L76077.

Fig. 2. **A:** Southern blot analysis of *T. cruzi* genomic DNA (5 µg) digested with different restriction enzymes and probed with the complete coding sequence of TcEF-1 $\alpha$  labeled with  $\alpha^{32}\text{P}$  dCTP; lane 1 (*Dra*II), lane 2 (*Apal*), lane 3 (*Bcl*II), lane 4 (*Hind*III), lane 5 (*Eco*RI). **B:** Northern blot of *T. cruzi* (lane 1) and *T. rangeli* (lane 2) epimastigote total RNA (10 µg) hybridized with the same probe as that used in the Southern blot. RNA and DNA blot hybridization were carried out as previously described (Billaut-Mulot et al., 1994).

Fig. 3. **A:** Western blot of *T. cruzi* epimastigote antigens reacted with rabbit immune serum to *A. salina* EF-1 $\alpha$  and anti-TcEF-1 $\alpha$ Nt serum. Lane 1: Normal rabbit serum, Lane 2: anti-*A. salina* EF-1 $\alpha$  rabbit serum, Lane 3: Pre-immune mouse serum, Lane 4: anti-TcEF-1 $\alpha$ Nt mouse serum. **B:** Western blot of TcEF-1 $\alpha$ Nt fusion protein reacted with rabbit immune serum to *A. salina* EF-1 $\alpha$  and anti-TcEF-1 $\alpha$ Nt mouse serum. Lane 1: Pre-immune mouse serum, Lane 2: anti-TcEF-1 $\alpha$ Nt mouse serum, Lane 3: Normal rabbit serum, Lane 4: anti-*A. salina* EF-1 $\alpha$  rabbit serum. **Methods:** **A:** *T. cruzi* Y strain epimastigotes were obtained according to previously described procedures (Ouaissi et al., 1990). Parasite extracts were prepared by direct lysis of cells with SDS-PAGE sample buffer (Laemli, 1970) and boiled for 5 mn before electrophoresis in denaturing 13 % polyacrylamide gel. **B:** The 0.9 kbp amplified product coding for the N-terminal 303 aa, was cloned into pQE-32 vector vector (Qiaexpress system, Qiagen, Coger, France). The protein fused with 6 histidine residues (TcEF-1 $\alpha$ Nt) was purified on Ni-NTA resin (immobilized metal chelate affinity: the chelating ligand, nitrilo-tri-acetic acid, is charged with Ni<sup>2+</sup> metal ions) and analysed by 13 % polyacrylamide gel. Immunoblotting was carried out as described (Billaut-Mulot et al., 1994).

Fig. 4. A typical *in vitro* growth curve of *T. cruzi* epimastigotes.

**Methods:** Epimastigotes ( $10^6$ /ml) were incubated in conditioned medium GLSH supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum and maintained for 15 days in the same medium at 28°C. Numbers of epimastigotes were assessed under the light microscope as reported elsewhere (Ouaissi et al., 1990).

Fig. 5. Immunofluorescence studies using anti-EF-1 $\alpha$  antibodies and

epimastigote forms harvested at different days of *in vitro* culture. **A,E:** epimastigotes from days 3 of culture (logarithmic growth phase). **B:** epimastigotes from the first days (5-6) of stationnary phase. **C:** epimastigotes from day 12 of culture (stationnary growth phase). **D,F:** epimastogotes were harvested from parasites cultured for one week at

28°C in the presence of G418 (1.5 mg/ml, Sigma, France). **A-B-C-D:** Rabbit anti-EF-1 $\alpha$  immune serum. **E-F:** Normal rabbit serum.

**Methods:** Binding assays were performed using formaldehyde 4%-fixed parasites as described in previous reports (Ouaissi et al., 1990). Briefly, the slides were treated with anti-EF-1 $\alpha$  immune serum diluted 1/100 in phosphate buffer saline (PBS) for 30 mn at room temperature followed by three washes in PBS then incubated with fluorescein conjugated anti-rabbit IgG (Diagnostics Pasteur, Marnes la Coquette, France) diluted 1/100 in Evans blue 1/10000 in PBS. The slides were washed three times in PBS and mounted in glycerol-PBS solution (1:1).

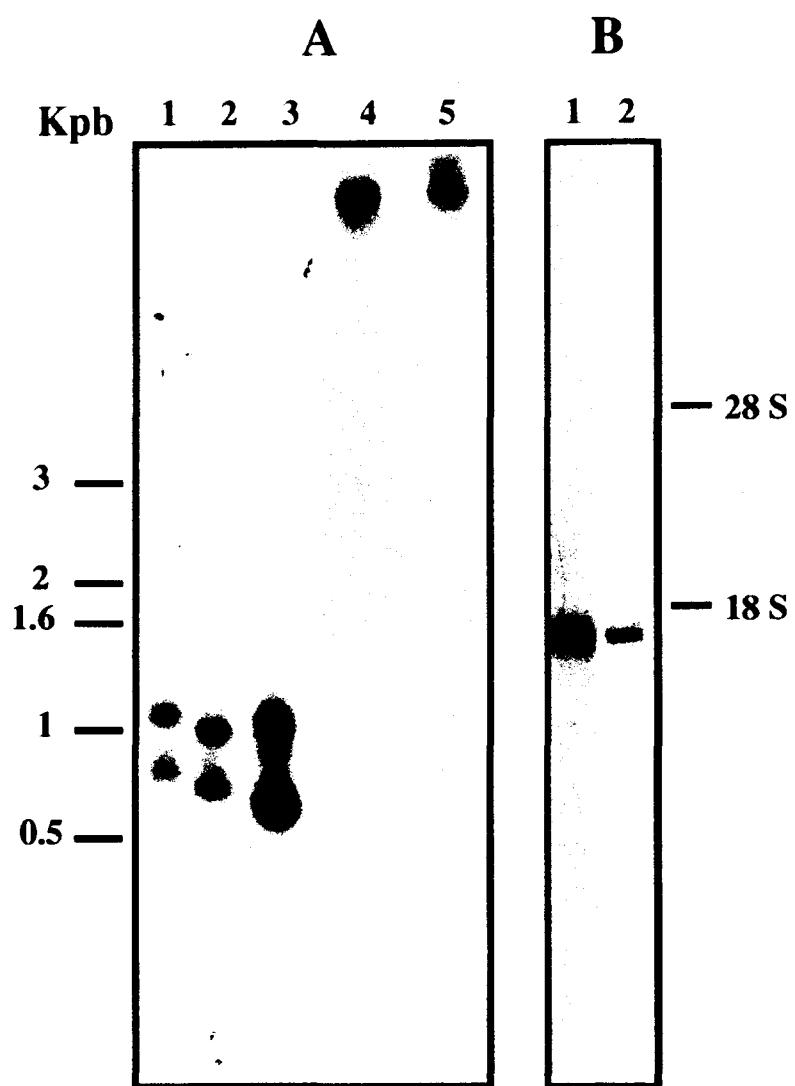
CAAAGCCGCTAAGAAGTATGACGTAATGTATGATATAAGCAAAATATGTCTTGT 60  
 TTGGTTTTTTTTTCATTTCGTTTTTCGTTGCTGCGCTGCTGCGACTAAAAAGTGAAGCCTT 120  
 TGTCTGTGTTCTGTGTCGGCTGCTGCGATTGCCGGTCACTAAAAAGTGAAGCCTT 180  
 AAGAATAGTAATTAGGACTTTGCTAACCTGTGGAGAGAGAATCGCGCTGTGGCGGTGTG 240  
TTTTTCTGTCTTCTCTCTCTCTGTGTGTGTGTCTATACATCG 300  
 TGCGCTGGCCCCGTGATGTCTTCCGCCCCACACACGTTTCTCTGACGCTAG 360  
 GTTCTGCTACACAGTTTATTGTTTTCAATCCCGCAAGGTAACACGCTAATGG 420  
 M 1  
 GGAAGGAAAAGGTGCACATGAACCTCGTGGTGGTCGGCACGTCATGCCGGCAAGTCCA 480  
 G K E K V H M N L V V V G H V D A G K S 21  
 CAGCCACTGGCACCTCATCACAAGTGGGAGGCATTGACAAGCGGACGATTGAGAAGT 540  
 T A T G H L I Y K C G G I D K R T I E K 41  
 TCGAGAAGGAGGCGGCTGAAATCGCAAGTCTCTTCAAGTACGCGTGGTCTGGACA 600  
 F E K E A A E I G K S S F K Y A W V L D 61  
 AGCTGAAGGCTGAGCGCAGCCGGCATCACGATCGACATCGCGCTTGGAAAGTTCGAGT 660  
 K L K A E R E P G I T I D I A L W K F E 81  
 CGCCAAGTCTGTGTTACGATCATCGACGCCCGGCCACCGCAGCTTCAAGAACAA 720  
 S P K S V F T I I D A P G H R D F I K N 101  
 TGATCACGGCACGCCCTAGCGGATGCCCGTCTGTCAATTGCGTCATCGCAGGGTG 780  
 M I T G T P Q A D A A V L V I A S S Q G 121  
 AGTTGAGGCGGCATCTGAAGGACGGCAGACACGCGAGCACGCGCTGCTGCCCTCA 840  
 E F E A G I S K D G Q T R E H A L L A F 141  
 CGCTCGCGTGAAGCAGATGGTTGTGCTGCAACAAAGATGGACGACAAGTCGGTGAAC 900  
 T L G V K Q M V V C C N K M D D K S V N 161  
 TTGCCAGGAGCGCTACGATGAGATTGTGAAGGAGGTGCGCTACCTGAAGAAGGTTG 960  
F A O E R Y D E I V K E V S A Y L K K V 181  
 GGTACAACGTGGAGAAGGTGCGCTTCATCCCCATCTCCGGCTGGCAGGGCGACAACATGA 1020  
 G Y N V E K V R F I P I S G W Q G D N M 201  
 TTGACAAGTCGAAAATATGCCGTGGTACAAGGGCCCCACGCTGCTGGAGGCACCGACA 1080  
 I D K S E N M P W Y K G P T L L E A L D 221  
 TGCTGGAGCCCCCGGTGCCCGCACCGACAAGCCCTGCCCTGCCCTGCAGGATGTGT 1140  
 M L E P P V R P S D K P L R L P L O D V 241  
 ACAAGATCGGCGGTATCGGCACTGTGCCGGTGGCGTGGAGACGGGACGATGAAGC 1200  
Y K I G G I G T V P V G R V E T G T M K 261  
 CCGCGACGTGGTACGTTGCCCGCCAACGTGACGACGGAGGTGAAGTCGATTGAGA 1260  
P G D V V T F A P A N V T T E V K S I E 281  
 TGCACCACGAGCAGCTGGCGAGGCCACGCCGGCGACACGTCGGCTCAACGTGAAGA 1320  
 M H H E Q L A E A T P G D N V G F N V K 301  
 ACGTGTCCGTGAAGGACATCCGCCGTGGCAACGTGTGCGCAACTCGAAGAACGATCCC 1380  
 N V S V K D I R R G N V C G N S K N D P 321  
 CAAAGGAGGCGCCGACTTCACGGCGCAAGTATCATCTGAACCACCCCGGCCAGATCG 1440  
 P K E A A D F T A Q V I I L N H P G Q I 341  
 GCAACGGTTATGCCGGTGCTTGACTGCCACACCTGCCACATCGCGTGCAGTTGCCG 1500  
 G N G Y A P V L D C H T C H I A C K F A 361  
 AGATCGAGTCAAAGATCGACCGCCGCTCCGGCAAGGAGCTTGAGAAGAACCCAAAGTCGA 1560  
 E I E S K I D R R S G K E L E K N P K S 381  
 TCAAGTCCGGTACGCCGCATGGTGCATGGTGCAGAACGCCATGTGCGTGGAGG 1620  
 I K S G D A A M V R M V P Q K P M C V E 401  
 TGTTCAACGACTACGCTCTTGGCCGCTTGCCGTGCGTACATGCCACGGTCAAGT 1680  
 V F N D Y A P L G R F A V R D M R Q T V 421  
 CCGTCGGCATCATCAAGGCGGTGACGAAGAAGGATGGCGGTGCCGGCAAGGTACCAAGG 1740  
 A V G I I K A V T K K D G G A G K V T K 441  
 CCGCCGAAAGCCGCTAAGAAGTATGACGTAATTGTTGTGAGCAAGACCTTTT 1800  
 A A A K A A K K \* 449  
 TTGTTTTGTTTTATGATTGTTGGGATTGTAATTAGTGTGCGTGTCTGTCTT 1860  
CTTTGTCTCTCTCTCTGTGTGTGTGCCCCGTGCGCATCTGCTGTTGACCGA 1920  
 GCAGGAGGGCGTCTGAGGGATAACCCCCACACCCGG 1960

**Fig. 1**

Table I  
Comparison of TcEF-1 $\alpha$  with subunit  $\alpha$  from other species.

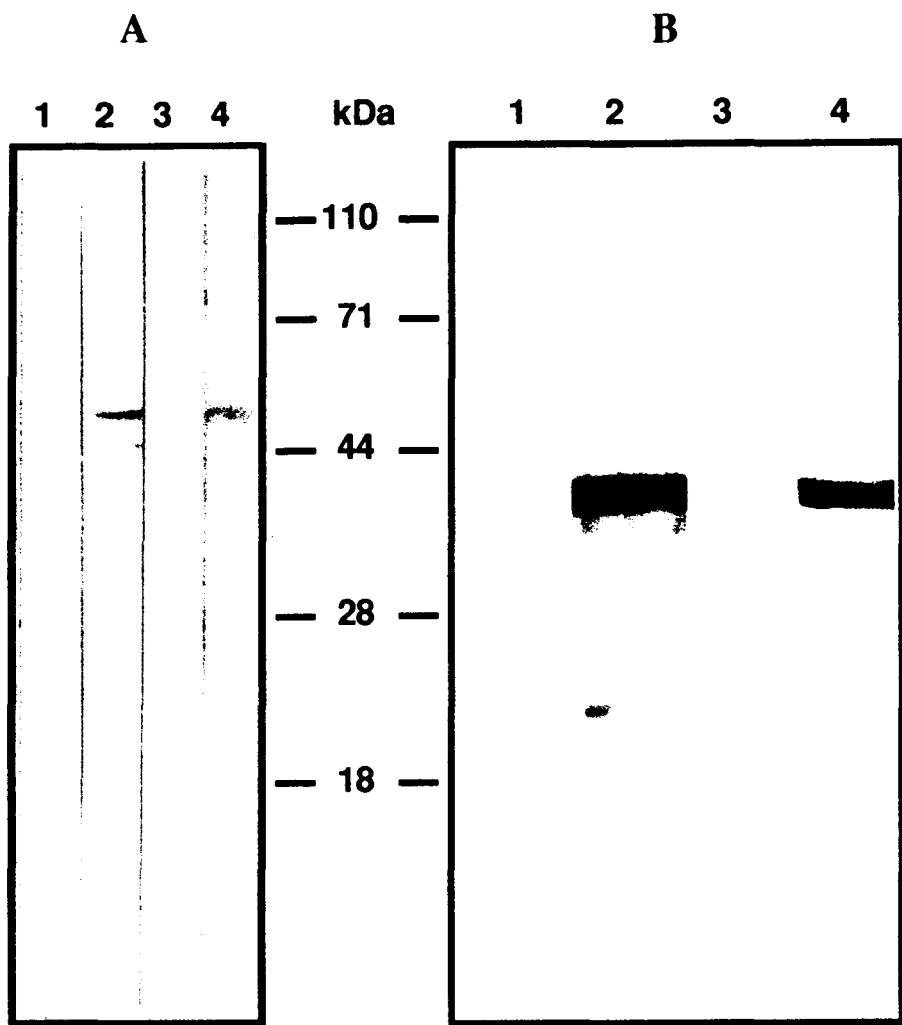
species	% identity with TcEF-1 $\alpha$
<i>Trypanosoma brucei</i> (U10562)*	94
<i>Euglena gracilis</i> (X16890)	82
<i>Homo sapiens</i> (X62245)	77
<i>Xenopus laevis</i> (X55324)	77
<i>Dictyostelium discoideum</i> (S11665)	74
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (X00779)	74
<i>Artemia salina</i> (P02993)	73
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i> (X52382)	52
<i>Escherichia coli</i> (P02990)	27

\*: The numbers in brackets represent the accession number. Alignments were obtained using the program MegAlign from DNASTAR.



**Fig. 2.** **A:** Southern-blot génomique. 5 µg sont digérés par *Dra*II (1), *Apa*I (2), *Bc*II (3), *Hind*III (4) et *Eco*RI (5) puis hybridés avec la sonde *TcEF-1α*.

**B:** Northen-blot sur l'ARN total d'épimastigote de *T. cruzi* (1) et de *T. rangeli* (2) hybridé avec la sonde *TcEF-1α*.



**Fig. 3.** A: Immunoblot sur l'antigène d'épimastigote de *T. cruzi* réagissant avec un sérum de lapin normal (1), sérum de lapin anti-*A. salina* EF-1 $\alpha$  (2), sérum pré-immun de souris (3), et sérum de souris anti-TcEF-1 $\alpha$ Nt (4).  
 B: Immunoblot sur la protéine de fusion TcEF-1 $\alpha$ Nt réagissant avec un sérum pré-immun de souris (1), sérum de souris anti-TcEF-1 $\alpha$ Nt (2), sérum de lapin normal (3) et sérum de lapin anti *A. salina* EF-1 $\alpha$  (4).

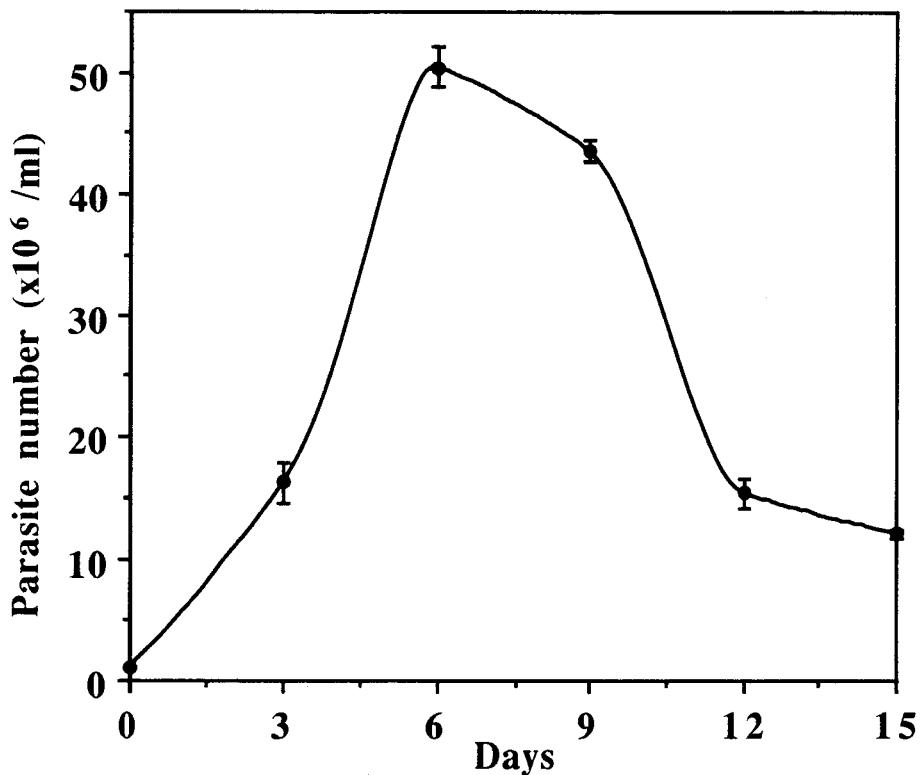
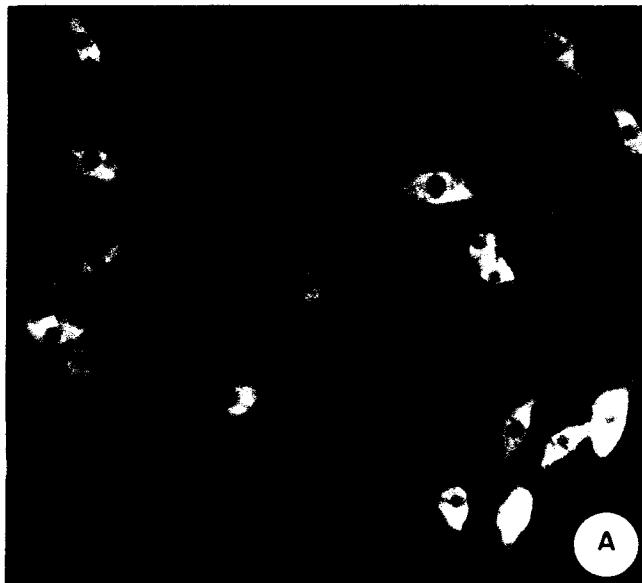
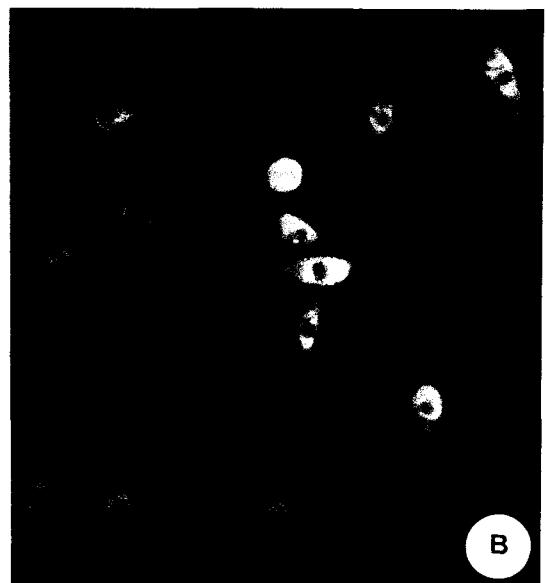


Fig. 4: Courbe de croissance *in vitro* des épimastigotes de *T. cruzi*.



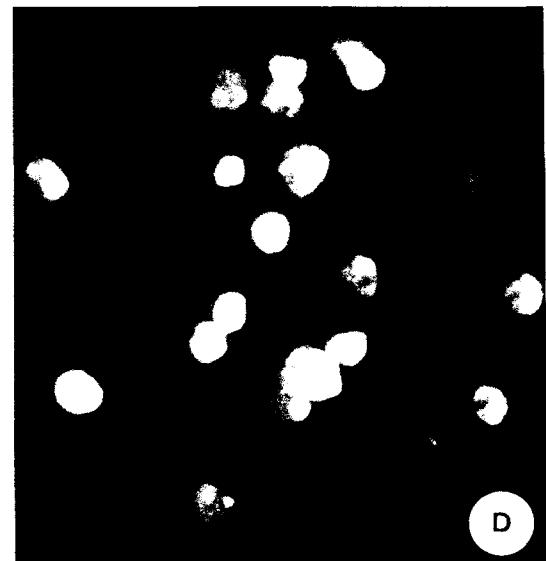
A



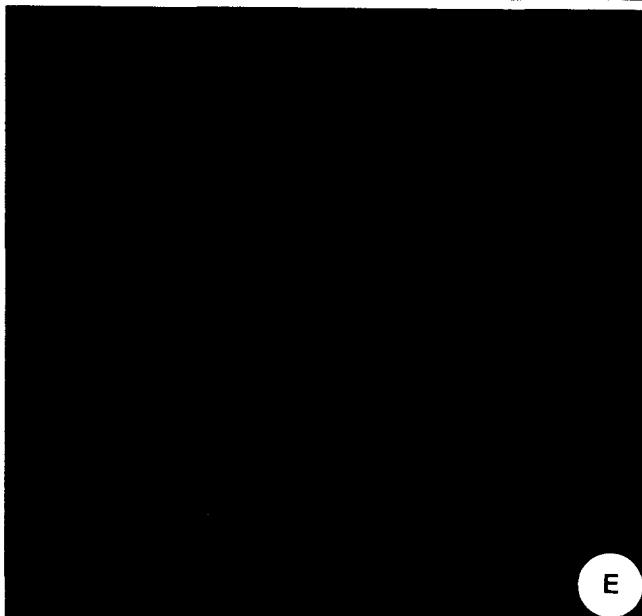
B



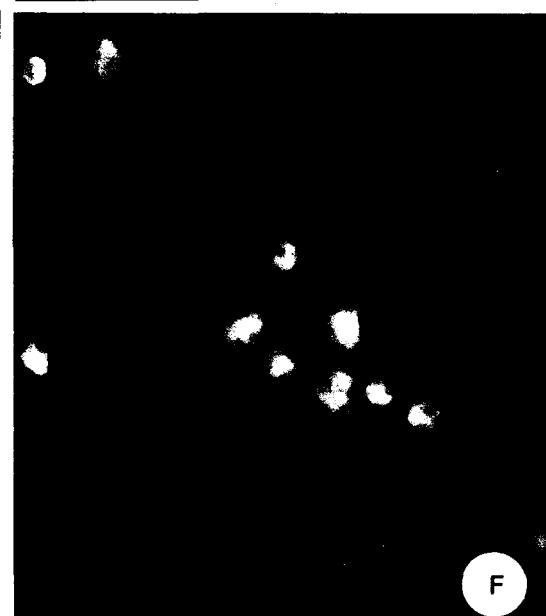
C



D



E



F

Fig. 5

## ARTICLE 6

**Apoptose chez un eucaryote unicellulaire *Trypanosoma cruzi*:  
implication pour l'origine évolutive et le rôle de la mort  
cellulaire programmée dans le contrôle de la prolifération  
cellulaire, la différenciation et la survie**

La mort cellulaire programmée est un processus physiologique génétiquement régulé qui permet l'élimination active de cellules pendant l'embryogenèse et la vie adulte des organismes multicellulaires. L'apoptose est une forme particulière de mort programmée, qui s'accompagne de modifications morphologiques et biochimiques caractéristiques. La mort programmée remplit de multiples fonctions. Elle a notamment un rôle morphogénétique et un rôle homéostatique. Elle élimine les cellules qui peuvent nuire à l'organisme, comme celles dont l'ADN est endommagé, celles qui deviennent tumorales et les lymphocytes qui produisent des auto-anticorps. La différenciation ou l'arrêt de la croissance des cellules, qui sont régulées par la mort cellulaire programmée (MCP) dans les organismes multicellulaires, sont des caractéristiques essentielles du cycle de vie de plusieurs eucaryotes unicellulaires et en particulier chez *T. cruzi*. Nous nous sommes donc intéressés à la définition des caractéristiques morphologiques et biochimiques qui accompagnent la mort de ce parasite au cours de la culture *in vitro*.

Durant son cycle de vie, *T. cruzi* subit trois changements dans son développement qui impliquent des modifications majeures de la morphologie, de l'expression de gènes et dans le cycle cellulaire, qui conduisent à la différenciation en trois stades distincts, les épimastigotes, les trypomastigotes et les amastigotes. La différenciation *in vitro* des épimastigotes (stade prolifique) en trypomastigotes métacycliques (non prolifique, bloqué en G0/G1) pendant la phase stationnaire de la culture est associée avec la mort massive des épimastigotes.

Plusieurs techniques ont été utilisées pour étudier le phénomène de mort cellulaire chez les épimastigotes de *T. cruzi* en phase stationnaire: l'analyse en microscopie électronique à transmission et à balayage, le cytofluoromètre en flux, la technique du TUNEL et l'électrophorèse en gel d'ADN. Ces techniques indiquent que la mort des

épimastigotes présente l'ensemble des caractéristiques morphologiques et biochimiques de l'apoptose observée chez les cellules d'organismes pluricellulaires.

L'apoptose des épimastigotes peut être accélérée ou prévenue en modifiant les conditions de culture ou la densité cellulaire, ce qui indique que la mort des épimastigotes est régulée par des signaux extracellulaires y compris ceux provenants des épimastigotes avoisinants. Cette caractéristique est également observée dans le cas de la MCP chez les organismes pluricellulaires.

Par ailleurs, la mort par apoptose est également observée lorsque les épimastigotes sont soumis à une agression immunologique médiée par le complément. Ce type de mort cellulaire est aussi induit, à la fois sur les lymphocytes T et les épimastigotes, lorsqu'ils sont soumis à un traitement par la généticine (G418), drogue qui interfère avec la synthèse protéique. En revanche, le traitement par la saponine, agent non physiologique, induit la nécrose des épimastigotes.

Ces résultats indiquent que deux formes distinctes de mort cellulaire peuvent être induites chez *T. cruzi*: la MCP qui présente les caractéristiques typiques de l'apoptose, et une forme de mort accidentelle présentant les caractéristiques de la nécrose.

L'existence chez *T. cruzi* d'un phénotype de mort cellulaire de type apoptose, pose le problème de l'origine et de la nature des gènes impliqués dans ce programme de MCP. Une autre implication importante de cette observation, est que l'induction de la MCP pourrait représenter une cible pour le développement de stratégies thérapeutiques vis-à-vis de cet organisme pathogène.

# Apoptosis in a unicellular eukaryote (*Trypanosoma cruzi*): implications for the evolutionary origin and role of programmed cell death in the control of cell proliferation, differentiation and survival\*

Jean Claude Ameisen<sup>1,2,5</sup>, Thierry Idziorek<sup>1,4</sup>, Odile Billaut-Mulot<sup>1,4</sup>, Marc Loyens<sup>1</sup>, Jean-Pierre Tissier<sup>3</sup>, Arnaud Potentier<sup>1</sup> and Ali Ouaissi<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Pathogenesis of AIDS and Infectious Diseases of the Immune and Nervous Systems, INSERM U415, Institut Pasteur, Lille, France

<sup>2</sup> Lille II University School of Medicine, Lille, France

<sup>3</sup> INRA, LGPTA, 59651 Villeneuve d'Ascq, France

<sup>4</sup> Both authors contributed equally to this work

<sup>5</sup> Corresponding author: Jean Claude Ameisen, INSERM U415, Institut Pasteur, 1, rue du Pr. A. Calmette, 59019 Lille, France. tel: +33 20 87 77 87; fax: +33 20 87 79 06; Phone/fax: +33 20 52 32 39

Received 20.7.95; Accepted 31.7.95

Edited by G. Melino

## Abstract

The origin of programmed cell death (PCD) has been linked to the emergence of multicellular organisms. *Trypanosoma cruzi*, a member of one of the earliest diverging eukaryotes, is a protozoan unicellular parasite that undergoes three major differentiation changes and requires two different hosts. We report that the *in vitro* differentiation of the proliferating epimastigote stage into the G0/G1 arrested trypomastigote stage is associated with massive epimastigote death that shows the cytoplasmic and nuclear morphological features and DNA fragmentation pattern of apoptosis, the most frequent phenotype of PCD in multicellular organisms. Apoptosis could be accelerated or prevented by modifying culture conditions or cell density, indicating that extracellular signals influenced the epimastigote decision between life and death. Epimastigotes responded to complement-mediated immunological aggression by undergoing apoptosis, while undergoing necrosis in response to nonphysiological saponin-mediated damage. PCD may participate into the optimal adaptation of *T. cruzi* to its different hosts, and the avoidance of a local competition between a G0/G1 arrested stage and its proliferating progenitor. The existence of a regulated cell death programme inducing an apoptotic phenotype in a unicellular eukaryote provides a paradigm for a widespread role for PCD in the control of cell survival, which extends beyond the evolutionary constraints that may be specific to multicellular organisms and raises the question of the origin and nature of the genes involved. Another implication is that PCD induction could represent a target for therapeutic strategies against unicellular pathogens.

\* This work was presented in part at the Gordon Conference on Cell Death, New London, NH, USA, 2–7 July 1995.

**Keywords:** Apoptosis; programmed cell death; cell death; cell proliferation; cell differentiation; evolution; unicellular eukaryote; protozoan parasite; *Trypanosoma cruzi*; epimastigote; trypomastigote; regulation; complement; necrosis; survival signals; extracellular signals; Chagas disease; kinetoplastids

## Introduction

Programmed cell death (PCD) is a genetically regulated physiological process of cell suicide that is of central importance for the development and the homeostasis of multicellular organisms (reviewed in Duvall and Wyllie, 1986; Ucker, 1991; Ellis *et al.*, 1991; Raff, 1992; Cohen, 1993; Vaux, 1993; Steller, 1995). PCD plays an essential role in morphogenesis, in the removal of useless, harmful or abnormal cells, in the regulation of cell numbers and the matching of the numbers of different cell-types in a given tissue, in the maturation of the immune and nervous systems and in protection against infection (Glucksman, 1951; Lockshin and Williams, 1965; Tata, 1966; Saunders, 1966; Cowan *et al.*, 1984; Oppenheim, 1991; Green and Scott, 1994; Vaux *et al.*, 1994). Conversely, PCD dysregulation participates in the pathogenesis of several human diseases, ranging from cancer and autoimmunity to AIDS and neurodegenerative disorders (reviewed in Williams, 1991; Ameisen *et al.*, 1994; Nagata and Golstein, 1995; Thompson, 1995). Most – if not all – cells from multicellular organisms have the ability to self-destruct by activating an intrinsic cell-suicide programme when they are no longer needed or have become damaged (reviewed in Raff, 1992). Despite the recently recognised widespread importance of PCD, its molecular mechanisms remain poorly understood. The genetic regulation of this programme may, in some cases, strictly depend on cell lineage information, as in the worm *Caenorhabditis elegans* (Ellis *et al.*, 1991); in most animals, however, and in particular in mammals, the cell decision between life and death is influenced in a stochastic way by extracellular signals that either suppress or promote the induction of the death programme (reviewed in Duvall and Wyllie, 1986; Ucker, 1991; Raff, 1992; Cohen, 1993; Vaux, 1993; Williams and Smith, 1993; Ameisen, 1994; Green and Scott, 1994).

In worms (*C. elegans*), insects (the fruitfly *Drosophila*) and vertebrates, the basic machinery carrying out PCD appears to be present in all cells, at all times, and crucial features of PCD appear to have been highly conserved at the levels of both the genes involved in its regulation, and the morphological and biochemical features of its phenotype (Duvall and Wyllie, 1986; Kerr *et al.*, 1972; Ellis *et al.*, 1991; Schwartz and Osborne, 1993; Vaux, 1993; Steller, 1995). Apoptosis, the most usual phenotype of PCD (Kerr *et al.*, 1972; Wyllie *et al.*, 1980), radically differs from necrosis, the accidental, pathological and passive form of cell death that can be induced in

any cell by severe injury. During necrosis, cells swell and lyse, and the rupture of the cell membrane leads to the release of toxic cytoplasmic enzymes, causing the death of bystander cells, an inflammatory reaction, and a scarring process that disorganises the architecture of the tissue or organ affected. In contrast, apoptosis involves a stereotypic pattern of morphological changes that include shrinkage of the cell and the nucleus, condensation and fragmentation of the nuclear chromatin, margination of chromatin along the inner lining of the nuclear envelope, initial maintenance of organelle and plasma membrane integrity, extensive surface blebbing or pitting, cytoplasmic vacuolisation, and production of apoptotic bodies, that are rapidly ingested by neighbouring phagocytic or epithelial cells (Kerr et al., 1972; Wyllie et al., 1980; Morris et al., 1984; Cohen, 1993; Savill et al., 1993). Nuclear changes are associated with the regular fragmentation by an endogenous endonuclease of the entire genomic DNA, first into large (50 to 300 kb) fragments (Oberhammer et al., 1993), then into regular multiples of an oligonucleosome-length unit of 180 bp (Wyllie, 1980).

The recently recognised crucial role of PCD in multicellular organisms raises important questions relating to the evolutionary origin of this process (Ellis et al., 1991; Ucker, 1991; Raff, 1992; Vaux et al., 1994). Natural selection, sanctioned by death, a central feature of species evolution, has been essentially viewed as operating at the level of genetically heterogeneous individuals. The existence in multicellular organisms of a physiological cell death programme allowing the continuous competition for the survival of the fittest cell in a given individual implies however that natural selection sanctioned by death also operates at the level of interaction between cells with the same genome. The requirements for the evolutionary emergence of such an 'altruistic' or 'social' form of genetically regulated death programme has been attributed to the selective pressure that specifically applies to multicellular organisms (Ellis et al., 1991; Ucker, 1991; Raff, 1992; Vaux et al., 1994). Even when considered in the context of unicellular prokaryotes (*Myxobacteria*) or eukaryotes (*Dictyostelium*), the existence of primitive forms of 'altruistic' or programmed cell death have been related to the capacity of these cells in certain conditions to form multicellular organisms, linking the requirement for cell death programmes to the several evolutionary attempts at multicellularity (Wittingham and Raper, 1960; Wireman and Dworkin, 1975; Kaiser, 1986; Cornillon et al., 1994).

We reasoned however that there could be several theoretical reasons for the emergence and conservation of a regulated cell death programme and machinery in unicellular organisms independently of the evolutionary constraints specific to the emergence of multicellularity. The first reason pertains to the yet unknown nature of both the death programme and the death machinery. Since apoptosis exhibits several features reminiscent of those involved in mitosis, it has been proposed that PCD may represent in multicellular organisms a form of abortive mitosis (Ucker, 1991), and that some of the cell cycle components that drive cells into mitosis may also be responsible for inducing apoptosis (Harrington et al., 1994; Shi et al., 1994). The finding that cdc2 kinase (a protein that is essential for entry into mitosis of all mammalian cells and that appears highly conserved in eukaryotes) can induce apoptosis when prematurely activated (Shi et al., 1994), suggests the possibility that cell cycle control check points may represent common endpoints of the various signals that influence the cell decision between life and death (Harrington

et al., 1994). If the effector machinery of PCD is linked to – or shares components with – the effector machinery of the cell cycle, an extreme implication is that the effectors of the intrinsic death machinery may be present in all cells endowed with the capacity to proliferate, namely in all unicellular organisms. The second reason does not pertain to the potential nature of the death programme and machinery, but to the possible role of PCD. Although such a view may appear counterintuitive, some of the evolutionary constraints that favour regulated death of cells at the level of multicellular organisms could also apply to unicellular organisms at the level of the multicellular colony that they obligatorily constitute. Several features that are regulated by PCD in multicellular organisms (i.e. cell numbers, cell differentiation, cell growth arrest) are essential features of the life cycle of several unicellular eukaryotes, and a process of continuous selection of the fittest cell could therefore in theory be similarly optimised by such a stringent control mechanism.

We have explored this hypothesis by investigating a unicellular haploid protist, *Trypanosoma cruzi*, belonging to one of the most ancient diverging branches of the eukaryotic phylogenetic tree, which precedes by a long period the more recently and almost simultaneously derived evolutionary groups that include red algae, fungi, ciliated protozoans, and multicellular plants and animals (Sogin, 1991).

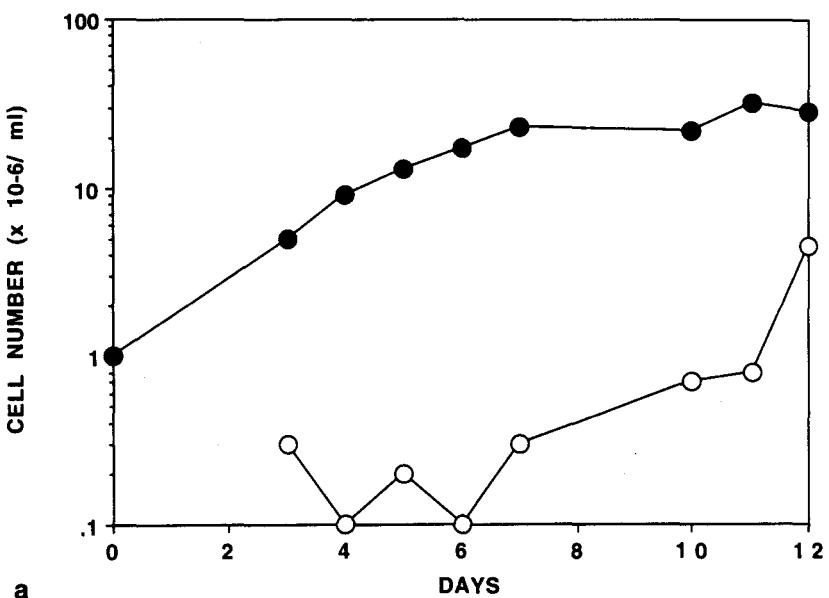
*T. cruzi*, a flagellated protozoan parasite, is one of the more than 700 members of the kinetoplastidae family which are among the first mitochondrial eukaryotes and contain one giant mitochondrion, the kinetoplast (Maslov and Simpson, 1995). The life cycle of *T. cruzi* involves an obligate passage into two different hosts, the *Triatomid haematophagous arthropod insect vector*, and a vertebrate, including humans, in which *T. cruzi* causes Chagas disease (reviewed in Brener, 1973; De Souza, 1984; Williams, 1985; Schaub, 1994). During his life cycle, *T. cruzi* undergoes three developmental changes that involve major modifications in morphology, gene expression, and cell cycle, and lead to differentiation into three distinct stages, the epimastigotes, the trypomastigotes and the amastigotes. The extracellular replicating epimastigotes proliferate in the gut of the insect vector, at a temperature of 27°C and differentiate into the non-dividing metacyclic trypomastigotes, that are excreted in the vector feces on the skin of a vertebrate host during the vector blood meal. The trypomastigotes then enter the vertebrate cells, in which they differentiate into the proliferating intracellular amastigotes, that come out of the cells as non-dividing trypomastigotes. Once in the blood stream, these non-dividing trypomastigotes either enter new cells, or pursue their life cycle by being ingested by an insect vector during his blood meal. The non-dividing trypomastigotes then differentiate in the vector gut into the proliferating epimastigotes.

The nonproliferating trypomastigotes are the differentiation stages of *T. cruzi* which migrate between the two different hosts, and are pre-adapted for survival in their new host. Therefore, the *T. cruzi* life cycle can be viewed as a continuous alternation between proliferative forms in stable environments and non-proliferative forms pre-adapted to a new and different environment (Mottram, 1994). For example, one of the striking differences between the metacyclic trypomastigote and its epimastigote progenitor pertains to sensitivity to mammalian complement-mediated immune aggression. Epimastigotes are killed by complement, whereas metacyclic trypomastigotes express enzymes that inactivate complement (Nogueira et al., 1975; Hall and Joiner, 1993).

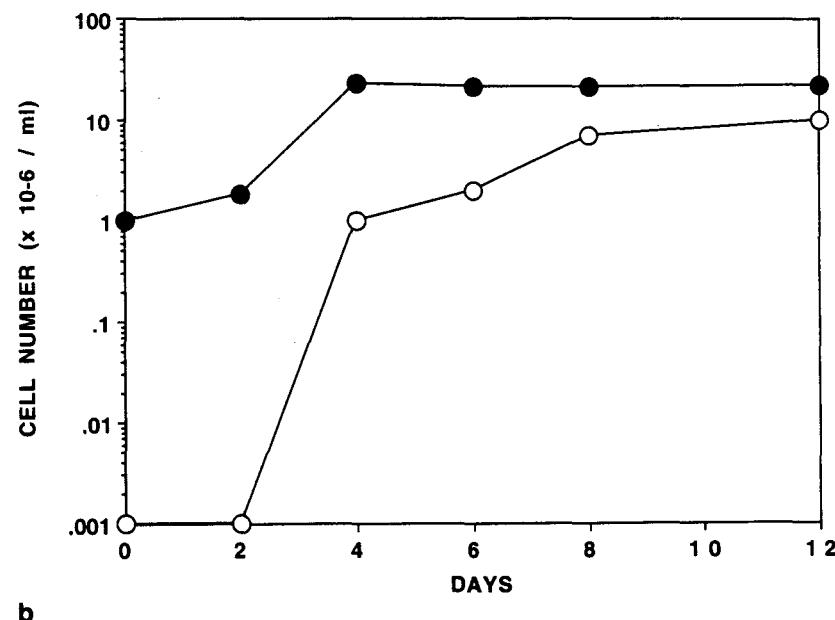
The differentiation of epimastigotes into metacyclic trypomastigotes, a crucial step in the life cycle of *T. cruzi*, can also be achieved *in vitro* in axenic cultures of epimastigotes. In conditioned a-cellular medium, at 27°C (the temperature of the insect vector gut), epimastigotes proliferate and progressively differentiate into non-dividing metacyclic trypomastigotes (Camargo, 1964). The standard *in vitro* culture of epimastigotes, in the absence of medium renewal, allows the maximal recovery of differentiated trypomastigotes after one to two weeks, a period in which the replication curve of the epimastigote becomes stationary (Camargo, 1964; Castellani *et al.*, 1967; Chiari, 1975; Dusanic, 1980; Sullivan, 1983). It has also been reported that metacyclogenesis can be accelerated and/or enhanced when epimastigotes are cultured in particular chemically defined media (Contreras *et al.*, 1985b). *In vitro*-differentiated metacyclic trypomastigotes can enter mammalian cells both *in vitro* and *in vivo* at 37°C and then differentiate into intracellular replicating amastigotes, and

are indistinguishable from trypomastigotes that have differentiated *in vivo* in the gut of the insect vector and have been excreted in their feces (De Souza, 1984).

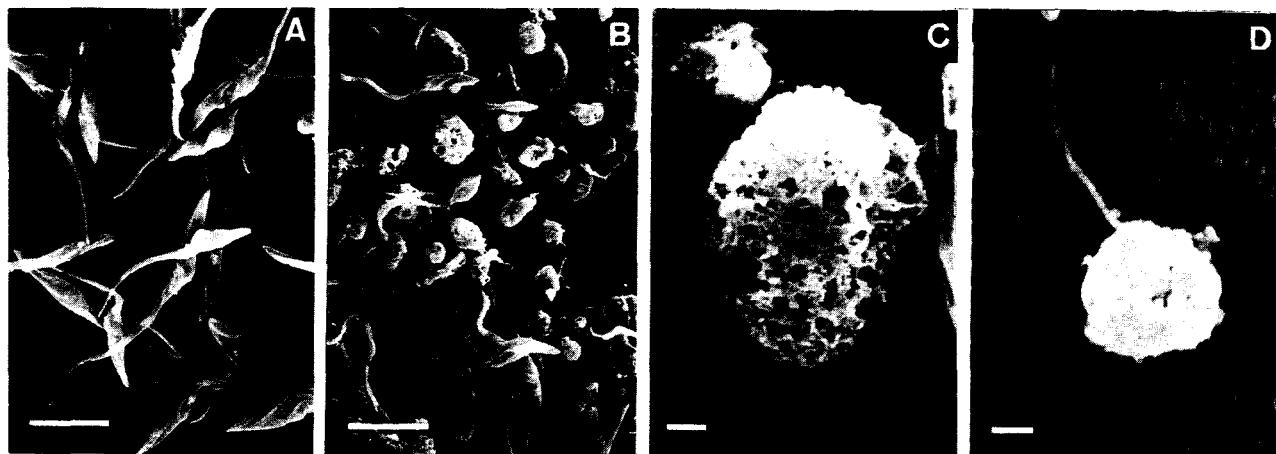
Here, we report that the *in vitro* differentiation of epimastigotes into metacyclic trypomastigotes is associated with epimastigote death, which is maximal after two-week culture and accounts for the previously called stationary stage of the culture. Epimastigote death has all the morphological features of apoptosis, the most usual phenotype of programmed cell death in multicellular organisms. As in cells from multicellular organisms, epimastigote death appears to be regulated by extracellular survival signals. Together, these findings indicate that the cell death programme and machinery required to induce apoptosis are present and operational in a unicellular eukaryote of very ancient origin. This suggests that PCD is a widespread and crucial feature of the eukaryote world, and that the requirement for adaptation of a unicellular organism to different environments may represent an



**Figure 1a** Epimastigote death by apoptosis in culture conditions leading to epimastigote growth arrest and differentiation into trypomastigotes. **a** Growth arrest and differentiation. Epimastigotes ( $10^6$ /ml) were incubated in conditioned medium (GLSH plus mediaser) and maintained in culture for 12 days in the same medium at 27°C. Numbers of epimastigotes (●) and trypanosomes (○) were assessed under the light microscope.



**Figure 1b** Epimastigote death by apoptosis in culture conditions leading to epimastigote growth arrest and differentiation into trypomastigotes. Growth arrest and death. Numbers of living (●) and dead (○) (spheroid, nonmotile) epimastigotes assessed under the light microscope in culture conditions similar to Figure 1a. These results are from one representative experiment out of seven.



**Figure 1c** Epimastigote death by apoptosis in culture conditions leading to epimastigote growth arrest and differentiation into trypomastigotes. Scanning electron microscopy analysis. Epimastigotes from day 3 (A) day 13 (B to D)

cultures similar to those in Figures 1a and b were analysed. Bars represent 10 µm in A and B and 1 µm in C and D. Changes typical of apoptosis are shown in panels C (surface pitting) and D (surface blebbing).

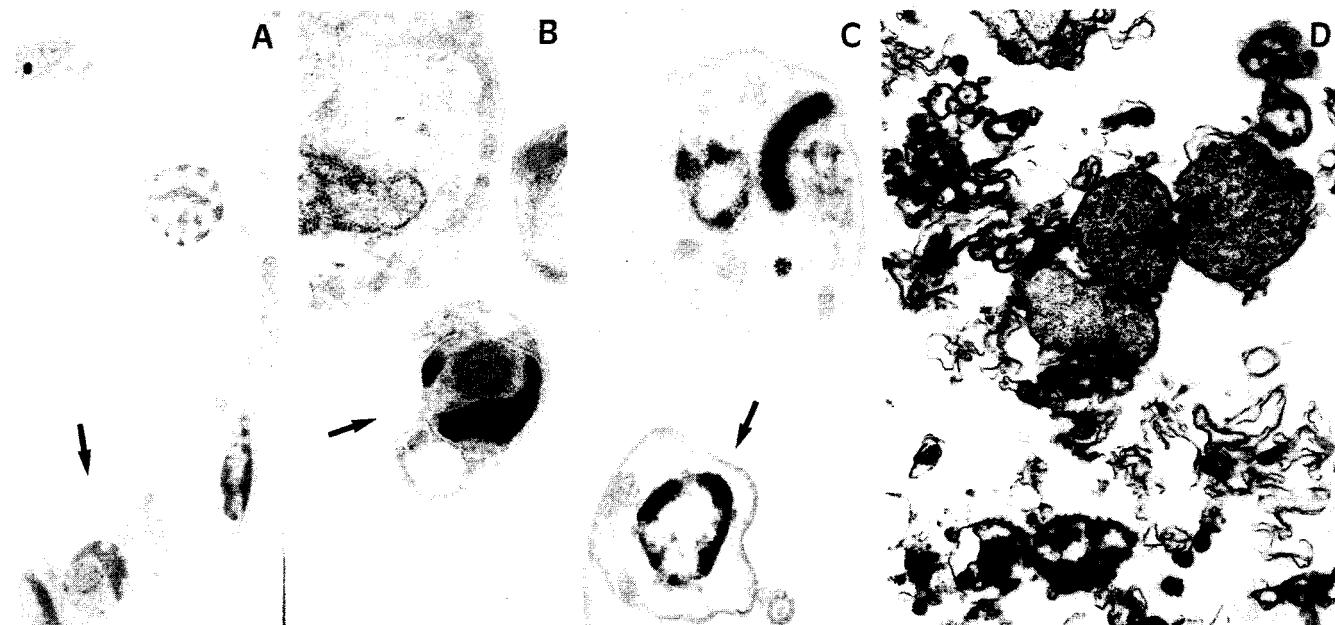
evolutionary constraint akin to those that apply to cells from multicellular organisms.

## Results

### *In vitro* differentiation of epimastigotes into trypomastigotes is associated with epimastigote death by apoptosis

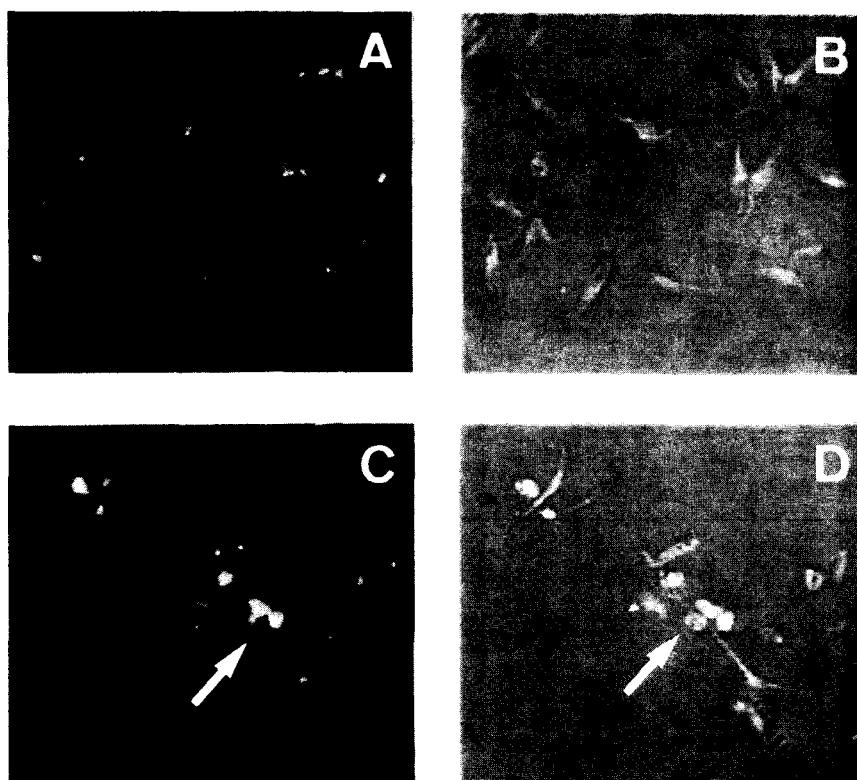
When re-suspended *in vitro* in conditioned medium at a concentration of  $10^6$ /ml and at a temperature of 27°C, epimastigotes proliferate, leading to an exponential increase in epimastigote numbers that is followed one or two weeks later by a plateau, the stationary stage of the culture. During this one to two week period, in the absence of medium

renewal, differentiation of epimastigotes into the non-dividing trypomastigotes progressively increases, and becomes maximal during the stationary phase of epimastigote growth (Figure 1a). Figure 1b shows that during the same period there is a progressive increase in dead epimastigotes that represent, after two weeks, a significant proportion of the epimastigotes present in the culture. Under a light microscope, dead epimastigotes appear as spheroid shaped cells (Figure 1e) that have lost motility. Scanning and transmission electron microscopy analysis shows that these spheroid epimastigotes are undergoing morphological changes typical of apoptosis. These include extensive membrane blebbing (Figure 1c, panels B and D) or pitting (Figure 1c, panels B and C), cytoplasmic vacuolisation, and margination and condensation of nuclear chromatin (Figure 1d). As also shown in Figure



**Figure 1d** Epimastigote death by apoptosis in culture conditions leading to epimastigote growth arrest and differentiation into trypomastigotes. Transmission electron microscopy analysis. Epimastigotes from day 13 cultures (A-C) similar to Figures 1a and b were analysed. Arrows show nuclear chromatin and

cytoplasmic features typical of apoptosis. Panel D shows a different form of cell death induced in epimastigotes from day 3 cultures by a 10 min incubation with the membrane damaging agent saponin.



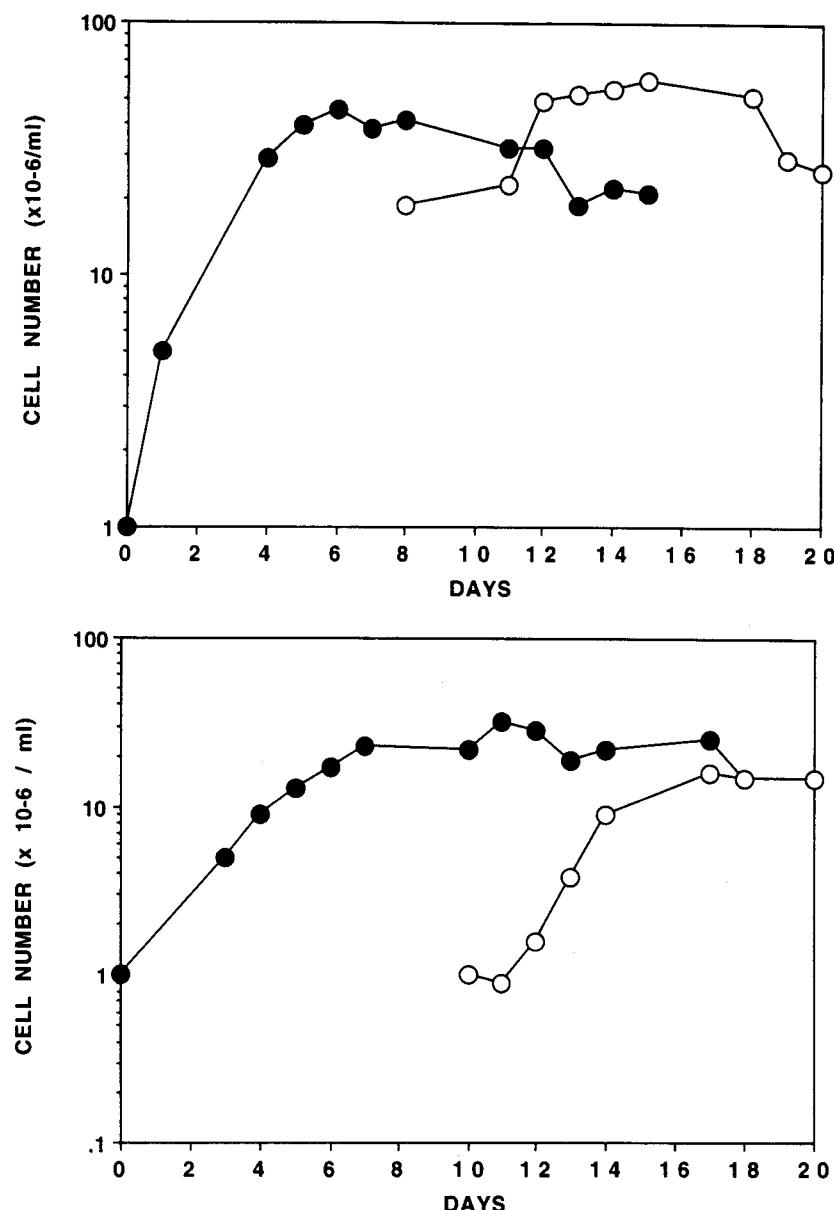
**Figure 1e** Epimastigote death by apoptosis in culture conditions leading to epimastigote growth arrest and differentiation into trypomastigotes. DNA fragmentation analysis. Epimastigotes from day 3 (A and B) or day 18 (C and D) cultures similar to Figures 1a and b were processed by the TUNEL technique, and analysed under the fluorescent microscope. Panels B and D show the same samples as panels A and C, after counter-colouration with visible light in order to

analyse epimastigote morphology. Arrows indicate spheroid shape and global fluorescence typical of apoptotic epimastigotes. The very localised fluorescence seen in each living epimastigote corresponds to the staining of the mitochondrion (kinetoplast) (see Results section). These results are from one representative experiment out of five.

1c, the flagellum of the epimastigotes undergoes the same phenomenon of membrane boiling and blebbing. The co-existence of apoptotic cells with either a blebbing or a deeply pitted surface seen in Figure 1c is similar to previous observations of apoptosis in mammals (Morris *et al.*, 1984) or in the chicken (Wyllie *et al.*, 1980). The use of the *in situ* terminal deoxytransferase-mediated dUTP nick end labelling (TUNEL) technique shows that apoptosis of the spheroid epimastigote is associated with extensive DNA fragmentation (Figure 1e). In all living epimastigotes (Figure 1e, B), a background TUNEL fluorescence is detected, but this fluorescence is strictly localised at the level of the mitochondrion (the kinetoplast), a feature that may be due to the fact that the kinetoplast contains numerous replicating DNA minicircles (Simpson, 1987). In contrast, DNA fragments in the dying epimastigote are detected all over the cell (Figure 1e D), a feature typical of apoptosis in cells from multicellular organisms (Gavrieli *et al.*, 1992). DNA gel electrophoresis did not allow the detection of a clear DNA fragmentation pattern in multiples of oligonucleosomal length units (not shown). This was probably related to the long incubation time and asynchronous induction of apoptosis during these two-week cultures, since a DNA ladder typical of apoptosis could be observed in other conditions that allowed rapid and synchronous induction of epimastigote apoptosis (see later, Figure 3b and 4d).

#### Epimastigote apoptosis can be accelerated or delayed by modifications in culture conditions

At the onset of the stationary stage of epimastigote growth, after eight day culture in the absence of medium renewal, epimastigotes were re-suspended at concentrations equal to – or higher than –  $10^6$ /ml in fresh conditioned medium. This led to a re-growth of the epimastigote culture and a further one-week delay in the occurrence of the stationary growth phase (Figure 2a) that was also associated with a delay in the onset of significant apoptosis (not shown). Re-suspension of epimastigotes in new conditioned medium after one week culture was repeated up to four consecutive times, leading to the maintenance of a continuous growth curve and to an absence of significant induction of both trypomastigote differentiation and epimastigote apoptosis (data not shown). Experiments are under way to assess whether this effect is mainly related to the addition of factors contained in the fresh conditioned medium, to the withdrawal of factors contained in the old medium, and/or to the re-suspension of the epimastigotes at a cell concentration lower than that of the stationary growth curve. Differentiation of epimastigotes into trypomastigotes has been reported to depend on various extracellular signals, including a certain degree of stress and starvation that may mimic the *in vivo* conditions in the insect vector gut and is provided *in vitro* by the absence of renewal of the conditioned medium. Our results strongly suggest that the extracellular signals that allow epimastigote self-renewal and prevent optimal trypomastigote differentiation also have a preventive effect on the induction of epimastigote apoptosis.



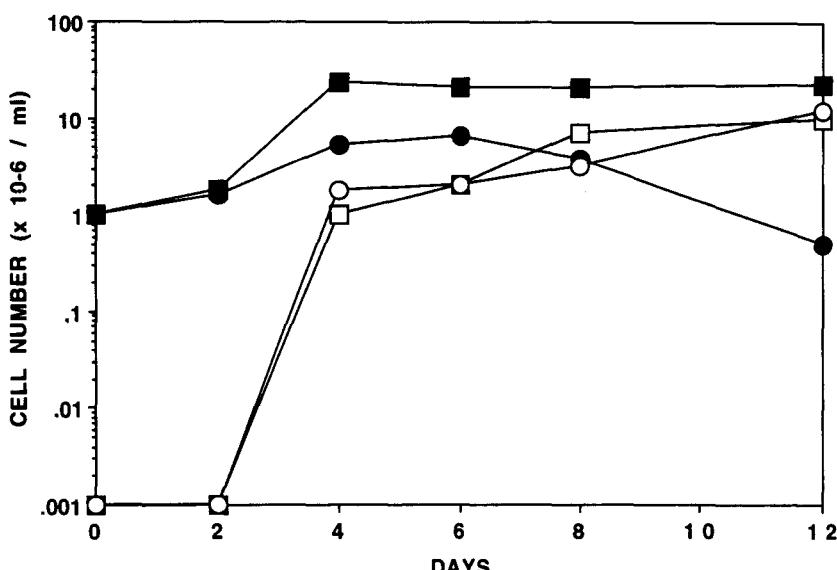
**Figure 2a** Influence of culture conditions on epimastigote proliferation and death. **a** Re-suspension in fresh medium. Epimastigotes (●) that had been cultured for 8 (top) or 10 (bottom) days in the same conditioned medium as in Figure 1, were re-suspended, at the onset of the stationary growth phase, in fresh conditioned medium (○) at a concentration of  $10^6/\text{ml}$  (top) or  $2 \times 10^7/\text{ml}$  (bottom) and further cultured in the same medium for ten additional days. Numbers of living epimastigotes were assessed under the light microscope

Conversely, growth arrest and death could be induced in epimastigotes, as it can be induced in all mammalian cells (Raff, 1992), by culturing the parasite at very low densities. This effect was enhanced when parasites were cultured in poor medium. As shown in Table I, culturing epimastigotes at a cell density of 900/ml, either in the usual conditioned medium or in poor medium, led to their rapid disappearance in 48 h. Culturing epimastigotes in poor medium led to cell growth arrest at all the parasite concentrations tested, including

$9 \times 10^5/\text{ml}$ , while cultures in rich conditioned medium only showed growth arrest (and progressive epimastigote disappearance) at parasite densities of  $9 \times 10^3/\text{ml}$  and below. In all the conditions that induced epimastigote death, no trypanomastigote differentiation was observed (not shown). These data strongly suggest that epimastigote continuously requires extracellular signals to prevent PCD induction, and indicate that these survival signals include signals provided by neighbouring epimastigotes. However, particular culture conditions (solid

**Table I** Low epimastigote density and/or poor culture medium induce epimastigote growth arrest and death. Epimastigotes at various cell concentrations, were cultured for 4 days at 27°C in conventional conditioned culture medium (GLSH + FCS) or in poor medium (RPMI). Numbers represent the concentration of epimastigotes in the culture medium (epimastigote number/ml). These results are from one representative experiment out of two

Time	GLSH + FCS					RPMI			
	900 000	90 000	9000	900		900 000	90 000	9000	900
0	900 000	90 000	9000	900		900 000	90 000	9000	900
48	1 300 000	130 000	20	0		800 000	24 000	15	0
96	1 800 000	210 000	20	0		850 000	33 000	0	0

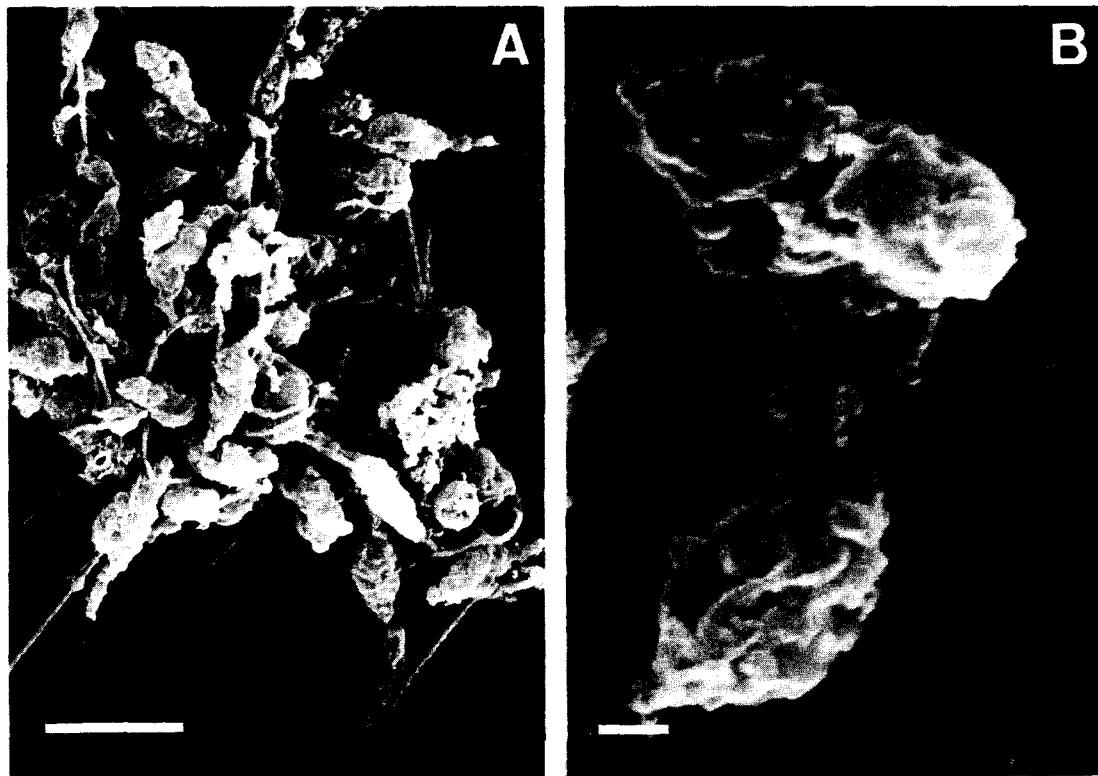


**Figure 2b** Influence of culture conditions on epimastigote proliferation and death. **b** Influence of temperature. Epimastigotes ( $10^6$ /ml) were cultured in conditioned medium at 27°C (same culture as in Figure 1b) or at 37°C during 12 days. Symbols represent respectively living (■) and dead (□) epimastigotes in 27°C cultures, and living (●) and dead (○) epimastigotes in 37°C cultures. These results are from one representative experiment out of two.

phase agar with glucose and haemoglobin) provided survival signals sufficient to allow epimastigote cloning in limiting dilutions (O. B-M., unpublished data).

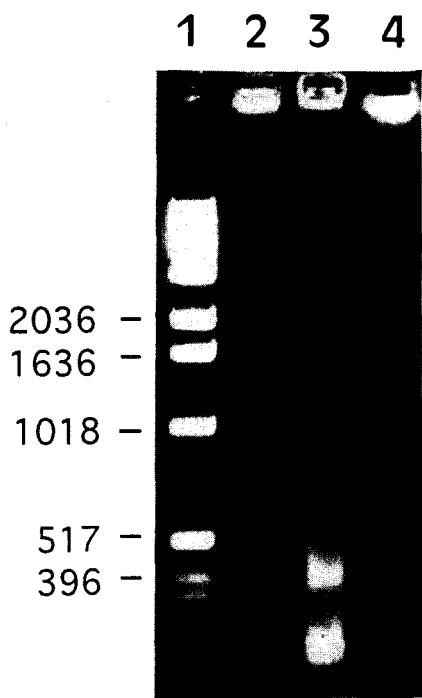
We then investigated the response of epimastigotes that had been recently incubated at optimal concentration ( $10^6$ /ml) in new conditioned medium to modifications in culture parameters that may mimic features of the mammalian host, to which the trypomastigote is preadapted, but not the epimastigote (Hall and Joiner, 1993). Such parameters included switching the culture temperature from 27°C to 37°C, or incubating the epimastigotes in the presence of human

complement. Culturing the epimastigotes at 37°C led to the accelerated induction of both epimastigote growth arrest and death (Figure 2b), and to an absence of significant trypomastigote differentiation (not shown). When incubated with unheated human serum as a source of complement, epimastigotes responded, as previously described (Nogueira *et al.*, 1975; Hall and Joiner, 1993), by undergoing massive death in less than one hour. As shown in Figure 3 (a and c), scanning electron microscopy and flow cytometry analysis of complement-treated epimastigotes revealed features typical of apoptosis in almost all the epimastigotes. Although the



**Figure 3a** Complement-induced epimastigote apoptosis. **a** Scanning electron microscopy analysis. Epimastigotes ( $2 \times 10^8$  parasites) from conventional 3-day cultures (GLSH plus FCS) were incubated for 1 h with culture medium in the

presence or in the absence of fresh unheated human serum and then analyzed. Panels A and B show complement-treated epimastigotes at two different magnitudes. Bars represent 10  $\mu\text{m}$  (A) and 1  $\mu\text{m}$  (B).



**Figure 3b** Complement-induced epimastigote apoptosis. **b** DNA fragmentation. Agarose gel electrophoresis of DNA extracted from  $2 \times 10^8$  epimastigotes from 3-day cultures similar to those in **Figure 3a** after 1 h incubation with medium (lane 2), or complement (lane 3) or after 10 min incubation with saponine (lane 4). Lane 1 shows molecular weight markers.

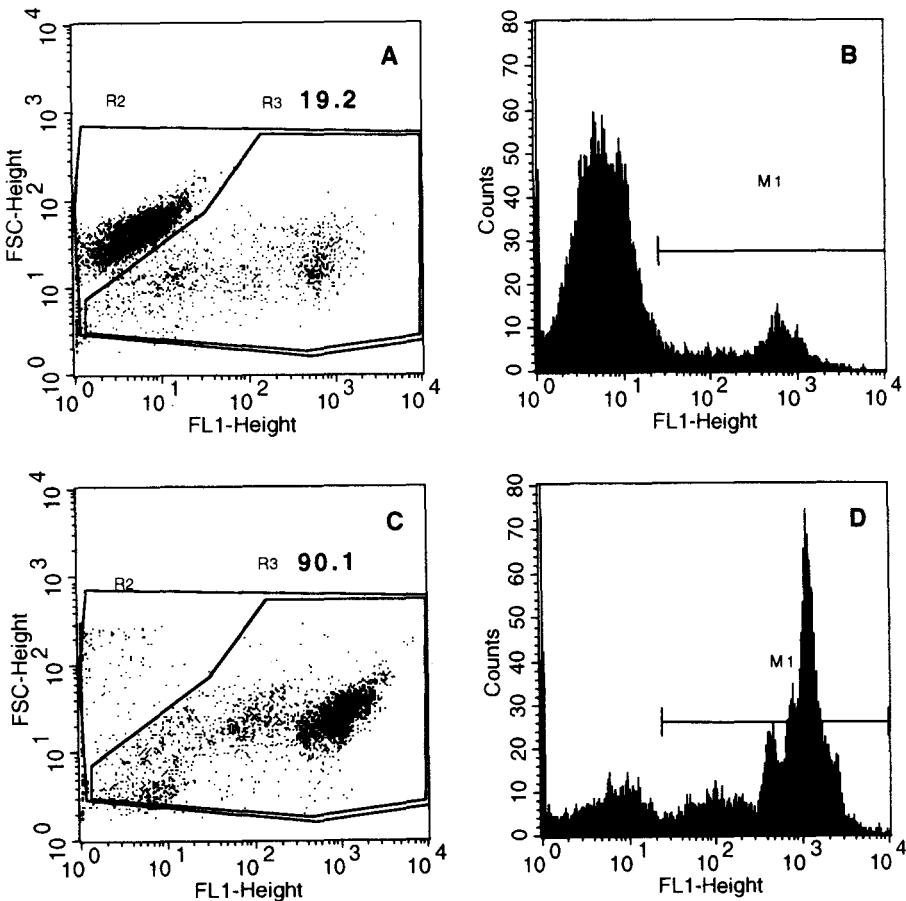
chromatin organisation in *T. cruzi* is not identical to that in higher eukaryotes, the number of base pairs per nucleosomal and linker DNA has been reported to be the same in *T. cruzi* and in mammalian cells (Hecker et al., 1994). In this instance of complement treatment, in which cells could be analysed a very short time after the synchronous induction of apoptosis, an apoptotic fragmentation pattern of DNA into regular multiples of oligonucleosome length fragments of around 200 bp could be detected (Figure 3b). Also, in this instance in which very rapid apoptosis was induced, scanning electron microscopy (Figure 3a) showed the sole presence of apoptotic cells with surface blebbing, suggesting the possibility that the cell surface pitting observed in the two-week cultures of epimastigotes (Figure 1c) may represent a secondary feature of apoptosis that follows surface blebbing.

In contrast to epimastigotes, tryomastigotes survived incubation with complement, and remained infection-competent when subsequently incubated with human cells at 37°C (not shown). Our findings that epimastigote death in response to complement occurs by apoptosis instead of necrosis is consistent with the observed absence of bystander death of tryomastigotes in these circumstances, a feature that allows the *in vitro* purification of tryomastigotes from epimastigote cultures (Nogueira et al., 1975) even when they contain less than 5% tryomastigotes prior to complement treatment (not shown).

#### Epimastigotes respond to different aggressions by undergoing either apoptosis or necrosis

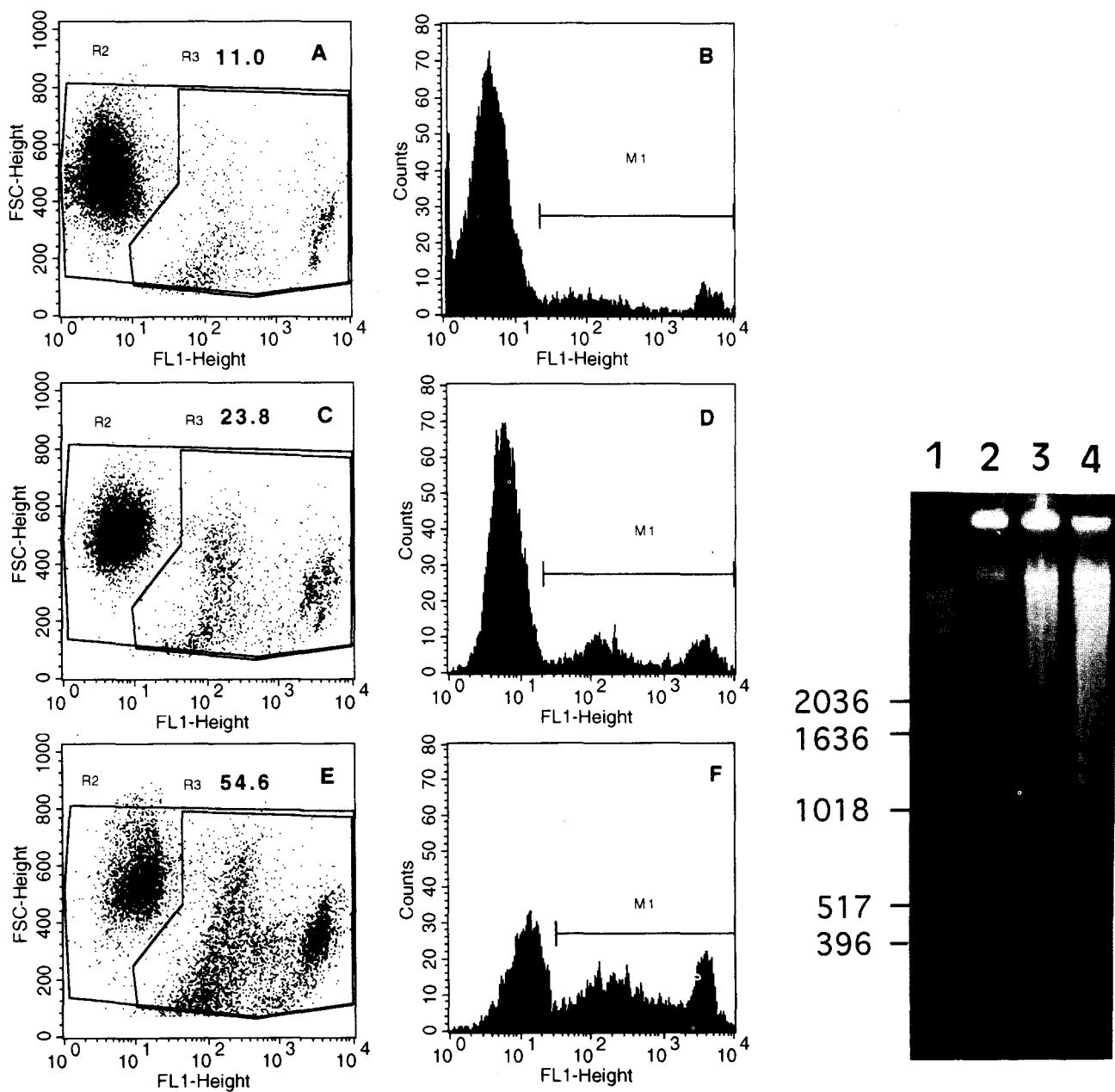
In any cell from multicellular organisms, mild damage can result in the triggering of the physiological apoptotic death

**Figure 3c** Complement-induced epimastigote apoptosis. **c** Flow cytometry analysis. Epimastigotes from 3-day cultures similar to those in **Figure 3a** and b were incubated for 1 h with medium in the absence (A and B) or in the presence of complement (C and D) and apoptosis was assessed using flow cytometry after YOPRO1 staining for 10 min. The percentage of apoptotic cells, corresponding to both reduced forward scatter and high fluorescence intensity (R3, panels A and C), are indicated in each experimental condition. M1 (panels B and D) represents the peak of fluorescence intensity.



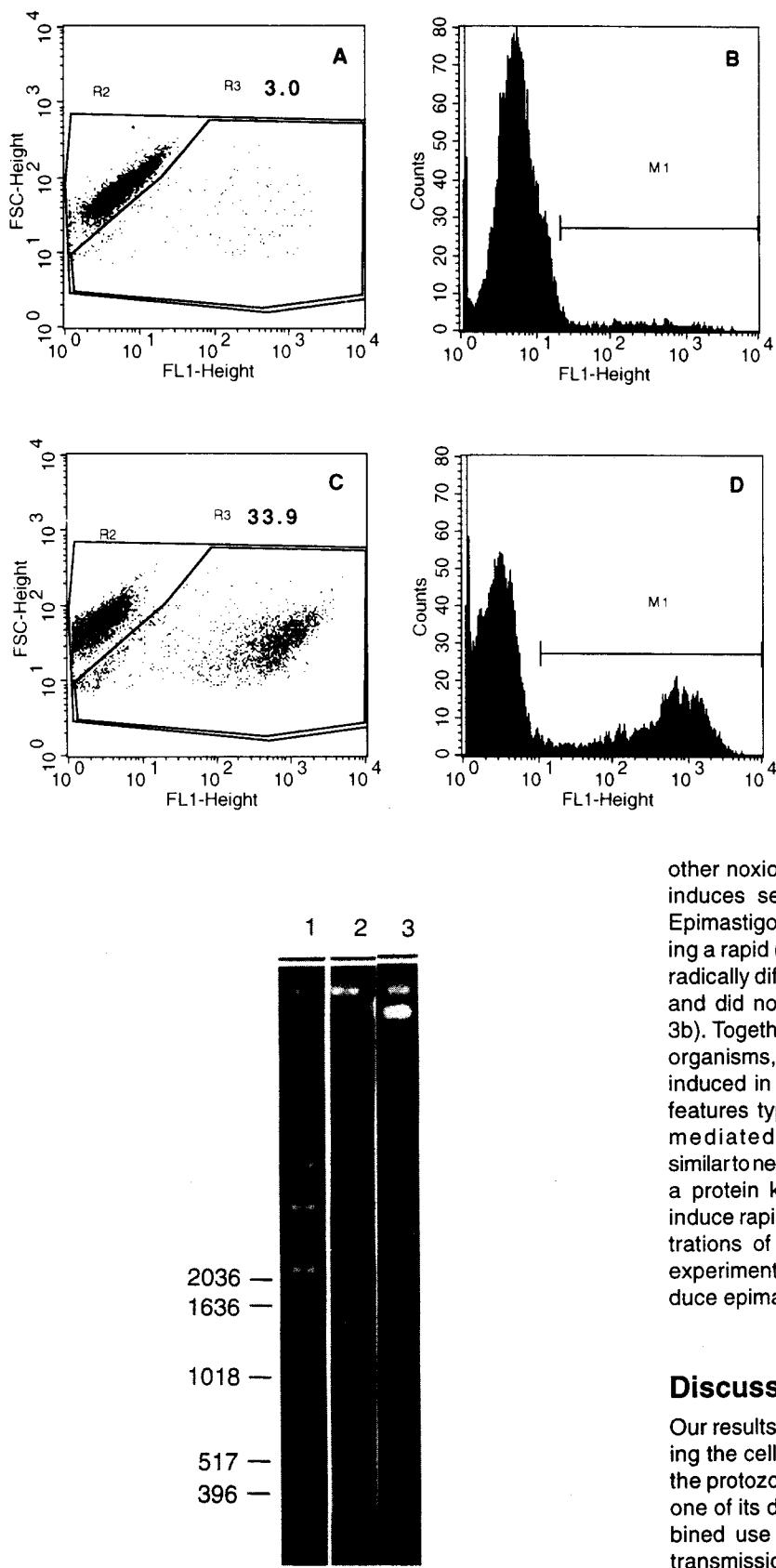
programme, while severe injury will lead to dysregulated death by necrosis (Cohen, 1993; Vaux, 1993; Steller, 1995). We investigated the response of epimastigotes to two different forms of aggression. The first one is an antibiotic drug, geneticin or G418, that induces the death of mammalian cells, and whose effect can be prevented by transfection of the neomycin phosphotransferase (*neo*) gene that confers G418 resistance, a procedure that is routinely used in order to select for gene transfectants in mammalian cell lines. Although the type of cell death (apoptosis or necrosis) that G418 induces in mammalian cells was not known, we reasoned that necrosis was an unlikely possibility, since bystander cell death would be incompatible with the selection of

resistant transfected cells. As shown in Figure 4 (a and b), G418-induced death in the human T-cell line MOLT 4 indeed exhibited the flow cytometry features and the regular DNA fragmentation pattern of apoptosis that were similar to those induced by low dose irradiation. In epimastigotes, the drug also induced a death process with flow cytometry features and a regular DNA fragmentation pattern in multiples of around 200 bp, typical of apoptosis (Figures 4 c and d). Apoptosis was due to a selective effect of the drug on epimastigote metabolism, and not to unrelated non-specific damages, since the drug did not induce death in epimastigotes that were transfected with the *T. cruzi* expression vector that contained *neo* gene as a selectable marker (Figure 4d). The



**Figure 4a** G418-induced apoptosis in human cells and in epimastigotes.  
**a** Flow cytometry analysis of human cell apoptosis. The Molt 4 human T-cell line was cultured during 2 days in the absence (A and B) or presence (C and D) of the G418 drug geneticin, or after irradiation (E and F), and the percentage of apoptotic cells was assessed using flow cytometry as in Figure 3c.

**Figure 4b** G418-induced apoptosis in human cells and in epimastigotes. **b** DNA fragmentation in human cells. Agarose gel electrophoresis of DNA extracted from  $2 \times 10^6$  Molt 4 T cells after two day culture in the absence (lane 2) or presence of G418 (lane 3) or two days after irradiation. Lane 1 shows molecular weight markers.



**Figure 4d** G418-induced apoptosis in human cells and in epimastigotes.  
**d** DNA fragmentation in epimastigotes. Agarose gel electrophoresis of DNA extracted from  $7 \times 10^7$  untransfected epimastigotes (lane 2) or from  $7 \times 10^7$  epimastigotes transfected with the neo<sup>r</sup> gene (lane 3) after six day culture in conventional conditioned culture conditions in the presence of G418. Lane 1 shows molecular weight markers.

**Figure 4c** G418-induced apoptosis in human cells and in epimastigotes. **c** Flow cyt fluorometry analysis of epimastigote apoptosis. Epimastigotes were cultured for 6 days in conventional culture conditions in the absence (**A** and **B**) or presence (**C** and **D**) of G418, and percentage of apoptotic cells was assessed as in **Figure 3c**.

other noxious agent that we used was saponin, a drug that induces severe injury by damaging the cell membrane. Epimastigotes responded to saponin treatment by undergoing a rapid (10 min) and catastrophic form of cell death that radically differed from the apoptosis morphology (Figure 1d), and did not induce detectable DNA fragmentation (Figure 3b). Together, these findings indicate that, as in multicellular organisms, two major distinct forms of cell death can be induced in *T. cruzi*: a form of programmed cell death, with features typical of apoptosis, and a form of severe injury-mediated accidental death, with features similar to necrosis. Finally, we explored the effect of Staurosporin, a protein kinase inhibitor drug that has been reported to induce rapid apoptosis in various human cell lines at concentrations of 1  $\mu$ M (Jacobson *et al.*, 1994). In two distinct experiments, incubation with 1  $\mu$ M staurosporin did not induce epimastigote death (not shown).

## Discussion

Our results indicate that an intrinsic death programme allowing the cell to kill itself is present in a unicellular eukaryote, the protozoan *T. cruzi*, and operational at the level of at least one of its differentiating stages, the epimastigote. The combined use of several techniques, including scanning and transmission electron microscopy, flow cyt fluorometry, the TUNEL technique, and DNA gel electrophoresis, indicated that this form of programmed cell death has the morphological and biochemical features of apoptosis, the most frequent phenotype of PCD in multicellular organisms, particularly in mammals (Wyllie *et al.*, 1980; Duvall and Wyllie, 1986; Vaux, 1993; Steller, 1995). As PCD in cells from multicellular

organisms (Ucker, 1991; Raff, 1992), PCD in epimastigotes is regulated by extracellular signals, including signals provided by neighbouring epimastigote cells. As in cells from multicellular organisms (Duvall and Wyllie, 1986; Cohen, 1993), a very different form of unregulated accidental cell death, similar to necrosis, could be rapidly induced by severe cell membrane injury, such as saponin-mediated membrane damage. One of the most dramatic inductions of the epimastigote apoptotic machinery was achieved by a component of the vertebrate immune system, complement, that led to apoptosis in less than one hour, suggesting that complement bypassed some of the regulatory pathways of the death programme. This observation is reminiscent of findings in mammalian cells, in which other components of the immune system, such as fragmentin, perforin and granzymes, or the CD95 (Fas/Apo-1) ligand are also able to bypass regulatory check points of PCD to achieve apoptosis of target cells in around one hour (reviewed in Ameisen, 1994; Green and Scott, 1994; Nagata and Golstein, 1995). Our observation that staurosporin, a protein kinase inhibitor that has been reported to induce PCD in various mammalian cells (Jacobson *et al.*, 1994) failed to induce death in the epimastigotes, at least at the concentrations optimal in human cells, suggests that some of the cellular second messengers involved in the control of PCD in *T. cruzi* may be particular to this species. We are currently investigating whether cAMP, that may play an important role in the differentiation of epimastigotes into G0/G1-arrested trypomastigotes (Gonzales-Perdomo *et al.*, 1988), also plays a role in epimastigote apoptosis induction. During the course of our study, we did not detect significant death of trypomastigotes in conditions that induced epimastigote apoptosis. Experiments are in progress in order to try to specifically induce and analyse trypomastigote death and to explore whether trypomastigote survival also depends on the presence of selective extracellular signals able to suppress PCD.

Our findings raise the important question of the nature of the genes that may be involved in the control of PCD in the unicellular eukaryote *T. cruzi*. In multicellular organisms, some of the essential gene families that regulate the induction or prevention of PCD have been highly conserved from worms (*ced3* and *ced9*) to humans (*ICE* and *bcl-2*), and some of these gene products, such as human Bcl-2 or baculovirus p35 remain functional when introduced in very distant multicellular species (reviewed in Vaux *et al.*, 1994). Several gene products have been characterised in *T. cruzi* that either control the cell cycle, such as the conserved cdc2-related kinases (Mottram, 1994), or play a role in the differentiation of epimastigote into trypomastigote, such as cAMP-responsive genes (Heath *et al.*, 1990). The recently available possibility of transfecting genes into *T. cruzi* (Kelly *et al.*, 1992) and of achieving gene knock-out should help in identifying functional genes involved in the regulation of *T. cruzi* PCD, and in exploring whether genes from mammals, worms, insects or viruses, that control PCD in multicellular organisms, may be able to exert a similar function in *T. cruzi*. Finally, our findings suggest the possibility of using the inducible endogenous death machinery of *T. cruzi* as a target for therapeutic strategies. The kinetoplastid protozoa family includes some of the most pathogenic protozoa, such as *T. cruzi*, *T. brucei*, and *Leishmania*, that cause Chagas disease, human sleeping sickness and visceral Kala Azar, respectively. Experiments are under way in our laboratory to explore whether PCD also exists in other strains of *T. cruzi*, in other members of the kinetoplastid family, as well as in other

unicellular eukaryotes that cause infectious diseases; and whether drugs already used to kill these organisms act by inducing apoptosis.

The identification in a unicellular eukaryote of an intrinsic and regulated cell death programme that is coupled to a death machinery able to carry out apoptosis raises a series of important questions about the nature of the death machinery, its role and its evolutionary origin. A possible and extreme interpretation of our findings in *T. cruzi* is that they may represent only one particular example of a general mechanism that operates in most – if not all – unicellular organisms. If this were shown to be true, the much-debated question of the nature of the evolutionary constraints involved in the emergence of PCD (Ellis *et al.*, 1991; Ucker, 1991; Raff, 1992; Vaux *et al.*, 1994) may be resolved in the following way: the genetically regulated ability to self-destruct in response to activation signals would simply represent an obligatory and inescapable consequence of the genetically regulated ability to undergo the nuclear and cytoplasmic processes that allow mitosis. In such a perspective, the evolutionary origin of PCD would equate with the very evolutionary origin of the cell, and the only remaining question about PCD would concern the extent to which this regulated death machinery has been used and refined along time in the various diverging branches of the prokaryotic and eukaryotic phylogenetic tree. The various extents to which PCD may have been used and refined during evolution could result from a balance between the contradictory evolutionary constraints represented by the potential benefits of allowing stringent regulation of cell numbers, differentiation, and selection of the fittest cell, and the potential disadvantage, in terms of competition, of allowing a growth advantage to a mutant endowed with a less operational or inducible death programme. In this respect, the reported clonal population structure of the members of the kinetoplastid family (Tibayrenc *et al.*, 1990) may have favoured strategies tipping the balance towards the use of PCD, although evidence for sexual reproduction has also been provided (Tait, 1980; Kreutzer *et al.*, 1994).

During the course of our study, a publication indicated that the interaction between bacteriophage viruses and infected bacteria may involve, in some instances, the setting by the virus of a regulation of the survival and death of the infected bacteria (Naito *et al.*, 1995), suggesting the possibility of a form of viral gene-mediated regulation of programmed bacterial death, favouring the persistence of infection in bacteria (Yarmolinsky, 1995). Conversely, instances of bacterial 'altruistic' death response to viral infection have been reported (Shub, 1994). These findings could be consistent with the alternate possibility that the evolutionary origin of PCD post-dates that of the first prokaryotic cells, and is specifically related to the progressive appearance of endogenous and/or exogenous genes involved in a form of host/pathogen co-evolutionary arms race.

Another question pertains to the evolutionary origin of the apoptotic phenotype of the death programme. Because both the cytoskeleton and the nucleus emerged in eukaryotes, only eukaryotic cells can express the morphological and biochemical features that define the apoptotic phenotype. During the course of our study, a publication reported the existence of a regulated cell death programme in the unicellular eukaryote *Dictyostelium*, that was triggered by the conditions that lead to the formation by *Dictyostelium* of a multicellular organism (Cornillon *et al.*, 1994). Since this death programme did not have the typical features of apoptosis,

it was proposed that such non-apoptotic cell deaths may represent the primordial form of eukaryotic programmed cell death, prior to the emergence of stable multicellular organisms. Consistent with this view of the existence of both evolutionary ancient and more recent phenotypes of eukaryotic PCD is the observation that PCD in multicellular organisms does not always display the morphological and biochemical features of apoptosis (Clarke, 1990), i.e. the PCD of intersegmental muscles of the moth *Manduca sexta*, that occurs in the absence of membrane blebbing, chromatin condensation and DNA fragmentation (Schwartz *et al.*, 1993). It has been shown however that while neurons normally dying during development of the chick ciliary ganglion show a non-apoptotic phenotype, they can undergo typical apoptosis if afferent cells are removed (Schwartz, 1995). Therefore, the absence of an apoptotic phenotype in a given cell can be related to the type of signals that are inducing PCD, rather than to an intrinsic absence of an apoptosis effector machinery. Similarly, the reported absence of a typical apoptotic phenotype during *Dictyostelium* PCD could simply be related to the particular *in vitro* differentiating treatments that were experimentally used in order to induce death. Such an hypothesis is partly supported by the previously published observation that the machinery able to carry out the nuclear components of apoptosis in multicellular organisms, namely the nuclear chromatin condensation and the DNA fragmentation into multiples of oligonucleosome-length fragments, appears also to be present in a unicellular ciliated protozoan eukaryote, *Tetrahymena* (Davis *et al.*, 1992). Although no evidence has been provided that it also plays a role in cell death, this nuclear destruction programme is functional and is involved in the elimination of supernumerary old macronuclei during *Tetrahymena* conjugation (Davis *et al.*, 1992).

It is still possible, however, that only some – and not all – unicellular eukaryotes have evolved effector molecules able to carry out apoptosis. An implication of this view is that there may have been several independent and parallel evolutionary attempts towards the emergence of the components of the apoptosis machinery in highly divergent eukaryotes. In this respect, *T. cruzi*, as well as the other digenic members of the kinetoplastid family that are obligate parasites of two different hosts, have several particular features. Although their kinetoplastid ancestors appear to have diverged long before the emergence of red algae (around one billion years ago), of fungi, and of the first multicellular organisms (around 0.7 billion years ago) (reviewed in Kaiser, 1986; Field *et al.*, 1988; Sogin, 1991), the present form of *T. cruzi*, adapted to both its vertebrate and insect vector hosts, may only be 200 million years old. Indeed, this is the period in which the first Diptera vector insects have been identified, 300 million years after the emergence of the vertebrates (Maslov and Simpson, 1995). Therefore, even if apoptosis emerged separately in *T. cruzi* and in the more recent putative ancestors of multicellular animals, it is still possible that the origin of apoptosis in *T. cruzi* does not precede the origin of apoptosis in its vertebrate and insect hosts, but is a consequence of the evolutionary pressures involved in the establishment of the complex interactions between unicellular and multicellular organisms that allowed the emergence of parasitism. The important and elusive question as to whether the emergence of an apoptotic death programme in *T. cruzi* is directly related to its obligate parasite nature, could be addressed by exploring the closely related kinetoplastid Bodonids that include both parasites and free-living organisms (Maslov and Simpson, 1995).

Whatever the answer to the question of the origin of an apoptotic death programme in *T. cruzi* might be, its existence raises the question of its possible role in a unicellular eukaryote. Our findings do not allow, at the present time, to predict to what extent this death programme is used *in vivo* by the parasite. Several theoretical evolutionary advantages can however be envisioned for the possession by *T. cruzi* of such a program, and for its regulation by extracellular signals. The first could be a process of limitation of epimastigote numbers in the insect gut akin to a form of cooperative evolution, allowing to minimise fitness impairment of the vector, and hence the interruption of parasite life cycle. Such a possibility would be consistent with the observation that *T. cruzi* has minimal adverse effect on its insect vector (Schaub, 1994). In addition to the possible matching of the number of epimastigote cells to their environment, it is possible that an apoptotic death program in epimastigotes could lead to engulfment of epimastigote corpses by the vector cells present in the gut, thereby preventing an inflammatory response that could be harmful for both the host and the parasite. Although previously published scanning electron microscopy pictures of *in vivo* *T. cruzi* infected insect gut show *T. cruzi* features that may possibly be reinterpreted in terms of apoptosis (Böker and Schaub, 1984; Zeledon *et al.*, 1984), no inference can be made from these pictures as to the fate of the epimastigote cell corpses. Another potential benefit of PCD in *T. cruzi* might be to allow a stringent regulation of cell differentiation into a reversible arrested stage. This process of differentiation in *T. cruzi* is similar to that of lineage commitment in vertebrate progenitor cells, with the important difference that in multicellular organisms such a commitment is often irreversible, and represents a form of terminal differentiation. Usually, self-renewal of vertebrate progenitor cells occurs in the absence of lineage commitment, and differentiation occurs at the expense of self-renewal. Distinct survival factors are involved in ensuring the proliferation of the progenitor and the survival of the differentiating cell (Raff *et al.*, 1993; Linette and Korsmeyer, 1994). The selective survival factors that repress the induction of the cell death programme in the differentiated cell act by coupling survival to the developmentally regulated expression of defined genes and allow, in some instances by themselves, differentiation to proceed in the absence of additional inductive signals (Fairbairn *et al.*, 1993; Linette and Korsmeyer, 1994). During epimastigote differentiation, expression of genes specific for the trypomastigote stage precedes by several days the morphological changes associated with differentiation (Contreras *et al.*, 1985a). The possible association of these processes of early gene expression with selective switches in survival factor requirements may ensure that only the fittest differentiating cell, expressing the correct and coordinate set of genes required for infection of the vertebrate host, will be allowed to survive. The concomitant presence, in the insect gut, of the vertebrate preadapted G0/G1 arrested forms and of their proliferating progenitors may raise complex problems of competition and of adequate respective localisation in order for the infective form to optimise the possibility of being selectively excreted by the vector and continuing its life cycle in the vertebrate host. In this context, the coupling of PCD induction to a failure of epimastigote to properly differentiate in response to signals specific for a particular insect gut environment may allow the exclusion of epimastigotes from the regions of the gut in which metacyclic trypomastigotes accumulate before being excreted. Published results from

scanning electron microscopy of *T. cruzi* infected insect vector gut are consistent with this hypothesis, by suggesting the existence of local compartmentalisation between trypomastigotes and epimastigotes (Böker and Schaub, 1984). Finally, it is not impossible that the apoptotic response of epimastigote to vertebrate complement attack may have evolved in order to benefit the invading trypomastigote. It has been reported that the insect vector occasionally excretes epimastigotes in addition to the trypomastigotes (Zeledon *et al.*, 1984). Epimastigote apoptosis in response to complement upon penetration in the vertebrate blood may prevent the extracellular spilling of epimastigote enzymes and antigens, and the triggering of an early inflammatory response that could target the complement-resistant trypomastigote for other inflammatory and immune effector mechanisms. It remains to be tested whether the consequence of apoptotic epimastigote ingestion by mammalian macrophages is the same as that of apoptotic mammalian-cell ingestion (Cohen, 1993; Savill *et al.*, 1993), namely the maintenance of an immunologically silent state of the macrophages.

In summary, we have proposed the hypothesis that one of the crucial roles of PCD in both the unicellular and multicellular worlds may be the tight regulation of the processes of growth arrest and differentiation in cells with the same genome, as well as the regulation of the coexistence or mutual exclusions of cells in distinct differentiated stages. The potential consequences of the outgrowth of – and competition with – PCD-defective mutants may also share some similarities in unicellular and multicellular organisms. In multicellular organisms, one of the several benefits that have been attributed to the evolutionary conservation of regulated cell death programmes is the prevention of the development of tumours. Mutations which allow cells to escape the environmental regulation of their inducible death programme also allow these cells to escape the environmental regulation of growth and differentiation, causing the death of the organism to which they belong (Williams, 1991; Vaux, 1993; Harrington *et al.*, 1994). Such mutations represent evolutionary dead ends only if they occur before reproduction of the organism has been achieved, namely before the soma becomes disposable. In the unicellular *T. cruzi*, if death of proliferating epimastigotes is the obligatory 'default' outcome of a failure to adequately differentiate into its G0/G1-arrested trypomastigote progeny in response to appropriate inductive signals, the theoretical advantage in terms of outgrowth that could be conferred to an early epimastigote mutant that would escape environmental regulation of its inducible death programme may prove to be counterselective in a similar way: the inability of such a proliferating epimastigote mutant to differentiate into the vertebrate pre-adapted trypomastigotes will lead to an interruption of the parasite life cycle, and therefore to an evolutionary dead end. Once trypomastigotes have been generated and have invaded their vertebrate host, however, the loss of growth control in a late epimastigote PCD-defective mutant may lead to the death of the insect vector but, at that stage, epimastigotes may be viewed as a form of disposable soma, and the possible late occurrence of such mutations may then represent, as in multicellular organisms, an evolutionary neutral accident.

Further investigations on the origin, regulation and role of PCD and of the apoptotic death machinery in the unicellular world should have profound implications for our understanding of the basic mechanisms underlying cell survival, proliferation, and differentiation. They should also provide

insights into the evolutionary role of regulated death programmes in the process of natural selection, and into the complex interactions between unicellular and multicellular organisms that have allowed the establishment of parasitism.

## Materials and Methods

### Cells and culture conditions

#### *T. cruzi* epimastigotes

The Y strain of *T. cruzi* was used throughout this work as previously described (Ouaissi *et al.*, 1986). Epimastigotes were cultured in glucose-lactalbumin serum-hemoglobin (GLSH) (Ouaissi *et al.*, 1990) supplemented either with 10% Mediaser (Institut J. Boy, Reims, France) or 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS, Boehringer Mannheim, Meylan, France) where indicated, and 1% gentamycin (Gentalline, Shering-Plough, Dardilly, France) at 27°C and were maintained by weekly re-suspension (10<sup>6</sup> cells/ml) in fresh medium. In some experiments, epimastigotes were transfected as previously described with an expression vector containing the gene coding for neomycin phosphotransferase (*neo*) that confers resistance to geneticine (G418) (Kelly *et al.*, 1992) and were used as controls in experiments involving G418 treatment of epimastigotes.

Epimastigote survival and death was explored in various culture conditions. First, epimastigotes were maintained for two or three weeks at 27°C in the absence of medium renewal, a procedure known to allow the spontaneous differentiation of the proliferating epimastigotes into the metacyclic trypomastigotes (Camargo, 1964; Chiari, 1975; Sullivan, 1983); second, epimastigotes were cultured for two weeks, either at 27°C or at 37°C; third, epimastigotes were cultured for one week at 27°C in the presence or absence of G418 (1.5 mg/ml, Sigma, La Verpillière, France), or for two days at 27°C in the presence or absence of staurosporin (1 µM, Sigma); fourth, epimastigotes were incubated for 1 h at 37°C, in the presence or absence of human unheated serum as a source of complement or for 10 min at room temperature in the presence or the absence of saponin (0.1%, ICN, Aurora, OH, USA). Finally, serial dilutions of epimastigotes (ranging from 10<sup>6</sup> to 10<sup>3</sup> cells/ml) either in GLSH supplemented with 10% FCS or in RPMI alone (GIBCO, Grand Island, NY, USA) were performed and each concentration of epimastigotes was maintained at 27°C for four days in the absence of medium renewal. Every two days, the numbers of living and dead epimastigotes were counted in an haemocytometer.

#### Cells

The MOLT 4 T-cell line (ATCC, Bethesda MD, USA) was cultured at 37°C in RPMI 1640 supplemented with 10% FCS, 2 mM glutamine, 1% gentamycin and passaged every three days. When so indicated, cells were either incubated with G418 (1 mg/ml) or irradiated at 10 Grays, and analysed two days later.

### Analysis of cell death

Six distinct methods were used in order to explore cell death.

#### Optical analysis

Epimastigotes were counted at the indicated times points in a haemocytometer under the light microscope. Spheroid shaped epimastigotes that had lost motility were counted as dead.

#### Scanning Electron Microscopy

Epimastigote suspensions were fixed in glutaraldehyde, then in osmium tetroxide medium. 100 to 300 µl of the suspensions were filtered on a 0.2 µm Anopore mineral membrane. The fine mesh of the membrane filter acts as a firm base for the fixation of micro-organisms which can be easily handled, processed and observed in a Scanning Electron Microscope (SEM) (Sevior *et al.*, 1984). The preparations were dehydrated through increasing concentrations of ethanol, soaked in an intermediate amyl acetate medium before the final critical point drying in CO<sub>2</sub> medium

(Goldstein *et al.*, 1981). After sputter coating with gold, samples were examined in a 35-CF JEOL SEM at 15 kV.

### Transmission Electron Microscopy

*T. cruzi* epimastigotes were washed twice in cacodylate buffer and then fixed sequentially in each of the following three fixatives: (a) 1% glutaraldehyde in 0.05 M sodium cacodylate buffer, pH 7.2 for 1 h at 4°C followed by three washes in buffer; (b) 1% osmium tetroxide solution for 1 h at 4°C and then three washes in distilled water; (c) a 0.5% aqueous solution of uranyl acetate pH 5.0, containing 50 mg/ml of sucrose, for 1 h at 4°C with a final wash in distilled water. The specimens were dehydrated in acetone and embedded in araldite. Sections were cut with a diamond knife, stained with uranyl acetate and lead citrate, and examined with a Hitachi electron microscope.

### In situ terminal deoxytransferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL technique)

DNA fragmentation was analysed *in situ* as previously described (Gavrieli *et al.*, 1992) with minor modifications. Briefly, epimastigotes were settled on a slide, air-dried and fixed for 10 min with paraformaldehyde (4%, Sigma), washed with water and dehydrated with increasing concentrations of methanol. Slides were finally stored at -20°C until use. The TUNEL protocol involves a 10-min preincubation period with Terminal transferase (TdT) buffer (Boehringer Mannheim, France). Nick-end translation was carried out in 20 µl final volume with Terminal transferase (1 µl, Boehringer Mannheim), biotin-16-dUTP (0.5 µl, Boehringer Mannheim) in TdT buffer containing CoCl<sub>2</sub> (Boehringer Mannheim). After a 30-min incubation period at 37°C in a humidified chamber, parasite preparations were washed with RPMI supplemented with 10% FCS and incubated with streptavidin-fluoresceine (10 µg/ml in RPMI plus FCS, Boehringer Mannheim) for 30 min in the dark at 37°C. After an extensive washing in PBS, preparations were mounted using an anti-fading reagent (Vector, CA, USA) and analysed using a fluorescent microscope (Leica, Rueil-Malmaison, France).

### Flow cytofluorometry analysis

The percentage of apoptotic cells was quantitated by flow cytofluorometry analysis using the impermeant DNA intercalant YOPRO-1 (YP) as previously described (Idziorek *et al.*, in press). Briefly, 10<sup>6</sup> human cells (MOLT 4) or *T. cruzi* epimastigotes were incubated with YP (10 µM) for 10 min. Cells were immediately analyzed on a Facscan™ flow cytometer (Becton Dickinson, Ivry, France) using an argon-ion laser tuned to 488 nm. Green cell fluorescence, gated on forward and side-light scatter, was collected using a 525 ± 10 nm band-pass filter and displayed using a logarithmic amplification.

### DNA agarose gel electrophoresis

Qualitative analysis of DNA fragmentation was performed as previously described (Estaqueier *et al.*, 1994) by agarose gel electrophoresis of DNA extracted from 2 × 10<sup>6</sup> human MOLT 4 cells or 2 × 10<sup>8</sup> *T. cruzi* epimastigotes to correct for genomic DNA size differences. Cell pellets were incubated in lysis buffer (10 mM Tris, 10 mM EDTA, 1% Triton X-100, pH 7.4) for 30 min at 4°C. The mixtures were then submitted to proteolysis (Proteinase K, 2 µg/ml final concentration, Boehringer Mannheim) for 2 h at 50°C and lysates centrifuged at 18000 × g for 30 min at 4°C. DNA from supernatants, purified by the phenol-chloroform extraction method, was precipitated in the presence of 0.5 M NaCl (final concentration) and one volume isopropanol. After washing by 70% ethanol, DNA was air-dried, dissolved in 10 µl distilled water and electrophoresed in the presence of 1 µl migration buffer (40 mM Tris, 20 mM Natrium acetate, 1 mM EDTA, pH 8.0 (TAE), 50% glycerol) on 2% agarose gel in TAE buffer for 2 h at 100 V. In another experiment, whose results are shown in Figure 4d, DNA was extracted from 7 × 10<sup>7</sup> *T. cruzi* epimastigotes by using the protocol of Medina-Acosta (Medina-Acosta and Cross, 1993). In all cases, DNA was then visualised under the UV light after gel staining with ethidium bromide.

### Acknowledgements

Jean Claude Ameisen thanks Fabienne Ameisen, Douglas Green and Françoise Russo-Marie for insightful discussions about the hypothesis of a possible existence and role for programmed cell death in unicellular organisms, Andrew Wyllie for insightful discussions on the significance of our experimental findings, and Pierre Golstein and Douglas Green for sharing unpublished results. We thank Jérôme Estaquier for participating in the interpretation of our results, and John Kelly for kindly providing the *T. cruzi* expression vector.

This work was supported by institutional grants from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Institut Pasteur de Lille, and Université Lille II.

### References

- Ameisen JC (1994) Programmed cell death (apoptosis) and cell survival regulation: relevance to AIDS and cancer. AIDS 8: 1197-1213
- Ameisen JC, Estaquier J and Idziorek T (1994) From AIDS to parasite infection: pathogen-mediated subversion of programmed cell death as a mechanism for immune dysregulation. Immunological Reviews 142: 9-51
- Böker CA and Schaub GA (1984) Scanning electron microscopic studies of *T. cruzi* in the rectum of its vector *Triatomina infestans*. Z. Parasitenkd 70: 459-469
- Brener Z (1973) Biology of *T. cruzi*. Annu. Rev. Microbiol. 27: 347-382
- Camargo EP (1964) Growth and differentiation in *T. cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo 6: 93-100
- Castellani O, Ribeiro LV and Fernandes JF (1967) Differentiation of *T. cruzi* in culture. J. Protozool. 14: 447-451
- Chiari E (1975) Differentiation of *T. cruzi* in culture. In: American Trypanosomiasis Research. Proceedings of an International Symposium. (Washington, DC Scientific Publications, PAHO/WHO) pp. 144-145
- Clarke PG (1990) Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. Anal. Embryol. 181: 195-213
- Cohen JJ (1993) Apoptosis. Immunol. Today 14: 126-130
- Contreras VT, Morel CM and Goldenberg S (1985a) Stage specific gene expression precedes morphological changes during *T. cruzi* metacyclogenesis. Molecular and Biochemical Parasitology 14: 83-96
- Contreras VT, Salles JM, Thomas N, Morel CM and Goldenberg S (1985b) *In vitro* differentiation of *T. cruzi* under chemically defined conditions. Molecular and Biochemical Parasitology 16: 315-327
- Cornillon S, Foa C, Davoust J, Buonavista N, Gross JD and Golstein P (1994) Programmed cell death in *Dictyostelium*. Journal of Cell Science 107: 2691-2704
- Cowan WM, Fawcett JW, O'Leary DDM and Stanfield BB (1984) Regressive events in neurogenesis. Science 225:
- Davis MC, Ward JG, Herrick G and Allis CD (1992) Programmed nuclear death: apoptotic-like degradation of specific nuclei in conjugating *Tetrahymena*. Dev. Biol. 154: 419-432
- De Souza W (1984) Cell biology of *T. cruzi*. Annu. Rev. Cytol. 86: 197-283
- Dusanic DG (1980) *In vitro* production of metacyclic trypanomastigotes of *T. cruzi*. J. Parasitol. 66: 1046-1049
- Duvall E and Wyllie AH (1986) Death and the cell. Immunol. Today 7: 115-119
- Ellis RE, Yuan J and Horvitz HR (1991) Mechanisms and functions of cell death. Annual Review of Cell Biology 7: 663-698
- Estaquier J, Idziorek T, De Bels F, Barré-Sinoussi F, Hurtrel B, Aubertin AM, Venet A, Mehtali M, Muchmore E, Michel P, Mouton Y, Girard M and Ameisen JC (1994) Programmed cell death and AIDS: the significance of T-cell apoptosis in pathogenic and non pathogenic primate lentiviral infections. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 9431-9435

- Fairbairn LJ, Cowling GJ, Reipert BM and Dexter TM (1993) Suppression of apoptosis allows differentiation and development of a multipotent hemopoietic cell line in the absence of added growth factors. *Cell* 74: 823–832
- Field KG, Olsen GJ, Lane DJ, Giovannoni SJ, Ghiselin MT, Raff EC, Pace NR and Raff RA (1988) Molecular phylogeny of the animal kingdom. *Science* 239: 748–753
- Gavrieli Y, Sherman Y and Ben-Sasson SA (1992) Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell. Biol.* 119: 493–501
- Glucksman A (1951) Cell deaths in normal vertebrate ontogeny. *Biol. Rev.* 26: 59–86
- Goldstein JL, Newbury DE, Echlin P, Joy DC, Flori C and Lifshin E (1981) Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis. (New York, London. Plenum Press) pp. 525–529
- Gonzales-Perdomo M, Romero P and Goldenberg S (1988) Cyclic AMP and adenylyl cyclase activators stimulate *T. cruzi* differentiation. *Exp. Parasitol.* 66: 205–212
- Green DR and Scott DW (1994) Activation-induced apoptosis in lymphocytes. *Cur. Op. Immunol.* 6: 476–487
- Hall BF and Joiner KA (1993) Developmentally-regulated virulence factors of *T. cruzi* and their relationship to evasion of host defences. *J. Euk. Microbiol.* 40: 207–213
- Harrington EA, Fanidi A and Evan GI (1994) Oncogenes and cell death. *Cur. Op. Gen. Dev.* 4: 120–129
- Heath S, Hieny S and Sher A (1990) A cyclic AMP inducible gene expressed during the development of infective stages of *T. cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 43: 133–142
- Hecker H, Betschart B, Bender K, Burri M and Schlimme W (1994) The chromatin of trypanosomes. *International Journal for Parasitology* 24: 809–819
- Idziorek T, Estaquier J, De Bels F and Ameisen JC (1995) YOPRO-1 permits cytofluorometric analysis of programmed cell death (apoptosis) without interfering with cell viability. *J. Immunol. Methods* (in press)
- Jacobson MD, Burne JF and Raff MC (1994) Programmed cell death and Bcl-2 protection in the absence of a nucleus. *EMBO J.* 13: 1899–1910
- Kaiser D (1986) Control of multicellular development: *Dictyostelium* and *myxococcus*. *Ann. Rev. Genet.* 20: 536–566
- Kelly JM, Ward HM, Miles MA and Kendall G (1992) A shuttle vector which facilitates the expression of transfected genes in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania*. *Nucleic Acid Research* 20: 3963–3969
- Kerr JFR, Willie AH and Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26: 239–257
- Kreutzer RD, Yemma JJ, Grogl M, Tesh RB and Martin TI (1994) Evidence of sexual reproduction in the protozoan parasite *Leishmania* (kinetoplastida: trypanosomatidae). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 51: 301–307
- Linette GP and Korsmeyer SJ (1994) Differentiation and cell death: lessons from the immune system. *Current Opinion in Cell Biology* 6: 809–815
- Lockshin RA and Williams CM (1965) Programmed cell death: cytology of degeneration in the intersegmental muscles of the silkworm. *J. Insect. Physiol.* 11: 123–133
- Maslov DA and Simpson L (1995) Evolution of parasitism in kinetoplastid protozoa. *Parasitology Today* 11: 30–32
- Medina-Acosta E and Cross GAM (1993) Rapid isolation of DNA from trypanosomatid protozoa using a simple "miniprep" procedure. *Mol. & Biochem. Parasitol.* 59: 327–330
- Morris RG, Hargreaves AD, Duvall E and Wyllie AH (1984) Hormone-induced cell death. 2. Surface changes in thymocytes undergoing apoptosis. *Am. J. Pathol.* 115: 426–436
- Mottram JC (1994) cdc2-related protein kinases and cell cycle control in trypanosomatids. *Parasitol. Today* 10: 253–257
- Nagata S and Golstein P (1995) The Fas death factor. *Science* 267: 1449–1456
- Naito T, Kusano K and Kobayashi I (1995) Selfish behavior of restriction-modification systems. *Science* 267: 897–901
- Nogueira N, Bianco C and Cohn Z (1975) Studies on the selective lysis and purification of *T. cruzi*. *J. Exp. Med.* 142: 225–229
- Oberhammer F, Wilson JW, Dive C, Morris ID, Hickman JA, Wakeling AE, Walker PR and Sikorska M (1993) Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. *EMBO J.* 12: 3679–3684
- Oppenheim RW (1991) Cell death during development of the nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 14: 453–501
- Ouaissi MA, Cornette J and Capron A (1986) Identification and isolation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote cell surface protein with properties expected of a fibronectin receptor. *Molecular and Biochemical Parasitology* 19: 201–211
- Ouaissi MA, Dubremetz JF, Kusnierz JP, Cornette J, Loyens M, Taibi A, Marty B, Velge P, Rizvi F and Capron A (1990) *Trypanosoma cruzi*: differential expression and distribution of an 85-kDa polypeptide epitope by *in vitro* developmental stages. *Exp. Parasitol.* 71: 207–217
- Raff MC (1992) Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 356: 397–400
- Raff MC, Barres BA, Burne JF, Coles HS, Ishizaki Y and Jacobson MD (1993) Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system. *Science* 262: 695–700
- Saunders JWJ (1966) Death in the embryonic systems. *Science* 154: 604–612
- Savill J, Fadok V, Henson P and Haslett C (1993) Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunol. Today* 14: 131–136
- Schaub GA (1994) Pathogenicity of trypanosomatids on insects. *Parasitol. Today* 10: 463–468
- Schwartz LM (1995) The faces of death. *Cell Death and Differentiation* 2: 83–85
- Schwartz LM and Osborne BA (1993) Programmed cell death, apoptosis, and killer genes. *Immunol. Today* 14: 582–590
- Schwartz LM, Smith S, Jones MEE and Osborne BA (1993) Do all programmed cell deaths occur via apoptosis? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 980–984
- Sevior RJ et al. (1984) A simplified modified procedure for preparing microbial cells for scanning electron microscopy. *J. Microbiol. Meth.* 3: 1–5
- Shi L, Nishioka WK, Th'ng J, Bradbury EM, Litchfield DW and Greenberg AH (1994) Premature p34<sup>cdc2</sup> activation required for apoptosis. *Science* 263: 1143–1145
- Shub DA (1994) Bacterial altruism? *Current Biology* 4: 555–556
- Simpson L (1987) The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication, and evolution. *Ann. Rev. Microbiol.* 41: 363–382
- Sogin ML (1991) Early evolution and the origin of eukaryotes. *Cur. Op. Gen. Dev.* 1: 457–463
- Steller H (1995) Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 267: 1445–1449
- Sullivan JJ (1983) Metacyclogenesis of *T. cruzi* *in vitro*: a simplified procedure. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 76: 300–302
- Tait A (1980) Evidence for diploidy and mating in trypanosomes. *Nature* 287: 536–538
- Tata JR (1966) Requirement for RNA and protein synthesis for induced regression of the tadpole tail in organ culture. *Dev. Biol.* 13: 77–94
- Thompson CB (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267: 1456–1462
- Tibayrenc M, Kjellberg F and Ayala FJ (1990) A clonal theory of parasitic protozoa: the population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas*, and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 2414–2418
- Ucker DS (1991) Death by suicide: one way to go in mammalian cellular development? *The New Biologist* 3: 103–109
- Vaux DL (1993) Towards an understanding of the molecular mechanisms of physiological cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 786–789

- Vaux DL, Haeker G and Strasser A (1994) An evolutionary perspective on apoptosis. *Cell* 76: 777–779
- Williams GT (1985) Control of differentiation in *T. cruzi*. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* 117: 1–22
- Williams GT (1991) Programmed cell death: apoptosis and oncogenesis. *Cell* 65: 1097–1098
- Williams GT and Smith CT (1993) Molecular regulation of apoptosis: genetic controls on cell death. *Cell* 74: 777–779
- Wireman J and Dworkin M (1975) Morphogenesis and developmental interaction in Myxobacteria. *Science* 189: 516–523
- Wittingham WF and Raper KB (1960) Non-viability of stalk cells in *Dictyostelium discoideum*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 46: 642–649
- Wyllie AH (1980) Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284: 555–556
- Wyllie AH, Kerr JFR and Currie AR (1980) Cell death: the significance of apoptosis. *International Review of Cytology* 68: 251–306
- Yarmolinsky MB (1995) Programmed cell death in bacterial populations. *Science* 267: 836–837
- Zeledon R, Bolanos R and Rojas M (1984) Scanning electron microscopy of the final phase of the life cycle of *T. cruzi* in the insect vector. *Acta Tropica* 41: 39–43

# ***DISCUSSION CONCLUSION***

La maladie de Chagas est une parasitose due à *Trypanosoma cruzi*, protozoaire flagellé transmis par des triatomidés hématophages. Elle reste encore un problème majeur de santé publique dans les pays d'endémie et hors zone d'endémie puisqu'elle affecte plus de 20 millions de personnes. Les moyens utilisés pour lutter contre la maladie, que ce soit l'élimination de l'insecte vecteur, les approches thérapeutiques ou l'élaboration d'un vaccin n'ont pas donné de résultats satisfaisants à ce jour.

Nous avons axé notre recherche sur certains aspects de la biologie cellulaire de *T. cruzi*, plus particulièrement la caractérisation des molécules qui interviennent dans la phase d'elongation de la synthèse protéique. Une connaissance plus approfondie du mécanisme et du contrôle de la synthèse protéique est indispensable pour comprendre des processus aussi divers que la division cellulaire, la différenciation ou le vieillissement. Ces approches sont un préalable à l'établissement d'une stratégie de lutte contre le parasite qui consisterait à inhiber sa multiplication ou accélérer les processus conduisant à sa mort.

Notre recherche a consisté à poursuivre la caractérisation de protéines précédemment purifiées sur colonne de glutathion agarose (PLUMAS-MARTY et coll., 1992). Ce travail a conduit à l'identification et au clonage moléculaire des gènes codant pour les sous-unités composant le complexe EF-1. En utilisant la technique de transfection chez le parasite, nous avons essayé d'aborder les aspects fonctionnels, en particulier de la sous-unité EF-1 $\gamma$ . Les résultats obtenus peuvent être discutés en trois parties: la première concerne le complexe EF-1 $\beta\gamma\delta$ , la deuxième le facteur EF-1 $\alpha$  et la troisième la mort du parasite par apoptose.

## Le complexe EF-1 $\beta\gamma\delta$

Le passage d'un extrait total d'épimastigote à travers une colonne de glutathion-agarose a permis la purification de trois protéines de masse moléculaire 25, 30 et 45 kDa, nommées TcGBP. Les ADNc codant pour les protéines de 25 et 30 kDa ont été obtenus par criblage de la banque d'ADNc d'épimastigote à l'aide d'un sérum anti-TcGBP. L'analyse comparative des séquences de ces clones, ainsi qu'une caractérisation immunologique ont révélé une correspondance avec les facteurs d'elongation EF-1 $\beta$  pour la protéine de 25 kDa et EF-1 $\delta$  pour la protéine de 30 kDa.

Un criblage différentiel en utilisant le sérum anti-TcGBP et un sérum anti-protéine de fusion 25 et 30 kDa a conduit à l'identification de l'ADNc codant pour le troisième composant de 45 kDa. L'interrogation de la banque de donnée a montré que cette protéine correspond à la sous unité EF-1 $\gamma$ . Ainsi, les protéines co-purifiées sur colonne de glutathion-agarose sont homologues aux sous-unités  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$  du facteur d'elongation EF-1 qui est présent dans le cytoplasme sous forme de complexe EF-1 $\beta\gamma\delta$  d'une part et EF-1 $\alpha$  d'autre part. Il est surprenant que ce complexe ait été purifié sur colonne de glutathion étant donné qu'il n'existe, jusqu'à présent, aucun lien décrit dans la littérature entre le complexe EF-1 $\beta\gamma\delta$  et les protéines fixant le glutathion.

Cependant, l'interrogation de la banque de donnée en utilisant des paramètres moins stringents, a montré l'existence d'une homologie de séquence entre la moitié N-terminale de TcEF-1 $\gamma$  et certaines glutathion S-transférases (GSTs). Bien que le pourcentage d'homologie ne soit pas très élevé (30% environ) en structure primaire, il apparaît que les résidus impliqués dans la fixation du glutathion sont conservés. De plus, la comparaison des structures secondaires par analyse des "clusters" hydrophobes (HCA) montre une bonne correspondance entre les domaines hydrophobes du domaine Nt de TcEF-1 $\gamma$  et les GSTs. Ces

observations ont également été rapportées pendant la même période par d'autres auteurs, qui par ailleurs, ont utilisé la séquence TcEF-1 $\gamma$  dans leur analyse comparative des séquences de EF-1 $\gamma$  de diverses espèces avec celles des GSTs (KOONIN et coll., 1994). Il ressort de cette étude que le modèle de structure tertiaire permet de mettre en évidence, qu'en dépit d'un pourcentage de similarité relativement faible, le domaine de type GST de EF-1 $\gamma$  est capable de former une "crevasse" similaire à celle connue dans les structures des GSTs des différentes classes.

Quel peut être le rôle de ce domaine GST du facteur d'elongation 1 $\gamma$ ? Il a été démontré que le complexe EF-1 $\alpha\beta\gamma\delta$  peut s'associer à la valyl-tRNA synthétase. Il est vraisemblable que le domaine GST de EF-1 $\gamma$  peut réguler l'assemblage de ce complexe multiprotéique en déplaçant l'équilibre entre le glutathion (GSH), le glutathion disulfure (GSSG), les groupes thiols des cystéines et les ponts disulfures des protéines. Il convient de rappeler que le rôle de EF-1 $\gamma$  n'est pas clairement établi. En effet, EF-1 $\alpha$  fixe l'aminoacyl-ARNt sur le site A du ribosome avec hydrolyse du GTP en GDP, tandis que EF-1 $\beta\gamma\delta$  facilite l'échange de EF-1 $\alpha$ -GDP en EF-1 $\alpha$ -GTP. Des études biochimiques ont montré que l'activité d'échange du nucléotide réside à la fois dans EF-1 $\beta$  et EF-1 $\delta$ . EF-1 $\gamma$  possède un effet catalyseur de l'échange et il présente *in vitro* une affinité pour les structures membranaires et la tubuline du cytosquelette, ce qui pourrait permettre l'ancrage de EF-1 sur le site de la synthèse protéique dans la cellule. L'ensemble de ces observations suggère que EF-1 $\gamma$  pourrait avoir d'autres fonctions biologiques en plus de son rôle dans l'elongation.

L'homologie de la partie N-terminale de EF-1 $\gamma$  avec les GSTs peut apporter de nouvelles indications sur sa fonction éventuelle. Afin d'étudier cette fonction, nous avons transfété les formes épimastigotes de *T. cruzi* par un vecteur permettant la surproduction de la protéine TcEF-1 $\gamma$ . Le cDNA codant pour TcEF-1 $\gamma$  a été introduit dans le vecteur pTEX afin d'obtenir le vecteur pTEX-TcEF-1 $\gamma$ . Les parasites ont été

transfектés par électroporation puis sélectionnés par leur résistance à la génétidine. La présence du vecteur a été montrée par Southern blot, tandis que la surproduction de TcEF-1 $\gamma$  a été montrée par Northern et Western blot. Le niveau d'expression du gène TcEF-1 $\gamma$  augmente de façon significative en utilisant des concentrations croissantes de drogue G418. Cette augmentation est corrélée avec celle du nombre de copies du vecteur.

Nous avons tout d'abord analysé le taux de croissance des parasites transfectés *in vitro*. Les résultats obtenus montrent qu'il n'y a pas de différence significative en terme de croissance entre les parasites de la souche sauvage et les parasites transfectés avec pTEX-TcEF-1 $\gamma$ . Ces observations suggèrent qu'il n'y a pas de relation entre la surproduction de TcEF-1 $\gamma$  et le taux de croissance des parasites. Ceci est en accord avec les résultats rapportés dans le cas des cultures de fibroblastes humains (SANDERS et coll., 1992). En effet, la comparaison du niveau des ARNm des fibroblastes en division avec ceux des cultures à confluence a montré que le taux des ARNm de EF-1 $\alpha$ , EF-1 $\beta$  et EF-1 $\gamma$  n'est pas influencé par un arrêt temporaire de la division cellulaire. Un niveau similaire de production des transcrits de EF-1 a également été rapportée au niveau des lignées cellulaires sensibles à l'inhibition de croissance par l'acide rétinoïque. En effet, l'expression du gène *EF-1 $\gamma$*  n'est pas diminuée au niveau des cellules traitées avec cet inhibiteur.

L'expression des différents facteurs d'elongation est coordonnée pour obtenir une expression optimale de chaque protéine. En effet, les niveaux des ARNm de EF-1 $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  augmentent en parallèle dans les cultures de lignées cellulaires en comparaison avec ceux des cellules au sein des tissus correspondants (SANDERS et coll., 1992). Dans notre modèle biologique, nous n'avons introduit que l'ADNc codant pour TcEF-1 $\gamma$  ce qui a comme conséquence une surproduction de TcEF-1 $\gamma$  sans effet sur la synthèse des sous-unités associées  $\alpha$  et  $\beta$  du complexe EF-1.

Etant donné que TcEF-1 $\gamma$  a une affinité pour le glutathion et que son extrémité N-terminale possède des homologies avec les GSTs, nous avons recherché un phénotype éventuel en relation avec l'activité GST en particulier dans la détoxication des xénobiotiques. Nous avons donc testé la résistance des parasites transfectés vis à vis de différentes drogues. Les parasites transfectés avec pTEX-TcEF-1 $\gamma$  et les contrôles sont sensibles à l'inhibition de croissance par le nifurtimox et le benznidazole. Par contre, l'utilisation de la clomipramine provoque la mort des parasites contrôles, tandis que les parasites qui surproduisent TcEF-1 $\gamma$  résistent et se multiplient.

Le mode d'action de ces différentes drogues est différent. Le nifurtimox et le benznidazole génèrent des radicaux libres qui induisent la formation de métabolites de l'oxygène qui sont toxiques pour le parasite (DOCAMPO et MORENO, 1984). *T. cruzi* est partiellement déficient en ce qui concerne les mécanismes de défense contre les radicaux libres (MORELLO, 1988), ce qui le rend sensible aux drogues utilisées dans le traitement de la maladie de Chagas. En effet, bien que le parasite possède une superoxyde dismutase, il semble qu'il ne possède ni catalase, ni glutathion peroxidase. Le trypanothion constitue l'une des possibilités pour lutter contre le stress oxydatif. La surproduction de TcEF-1 $\gamma$  ne permet pas la résistance des parasites ce qui indique que l'activité éventuelle du domaine de type GST de TcEF-1 $\gamma$  n'intervient pas dans la défense contre les radicaux libres. Il est à noter que la surproduction de la trypanothion réductase chez *T. cruzi*, en utilisant le vecteur pTEX, ne permet pas la résistance des parasites au nifurtimox, bien que cette enzyme soit impliquée dans la résistance au stress oxydatif (KELLY et coll., 1993).

Le mode d'action de la clomipramine n'est pas bien connu. Il semblerait que ce composé lipophile interagisse avec les biomembranes ce qui altérerait la morphologie du parasite (DOYLE et WEINBACH,

1989). La clomipramine est également un inhibiteur très puissant de la trypanothion réductase (BENSON et coll., 1992). Les parasites qui surproduisent TcEF-1 $\gamma$  résistent à l'action de la clomipramine, probablement par le domaine de type GST. En effet, la principale fonction des GSTs est la détoxication des xénobiotiques en catalysant la fixation du glutathion (GSH) sur une variété de composés lipophiles toxiques possédant un centre électrophile (MANNERVIK et coll., 1985). Les glutathion S-conjugués sont alors moins réactifs et plus polaires que les électrophiles initiaux. Cette meilleure hydrosolubilité leur permet d'être plus facilement exportés hors de la cellule. Le domaine de type GST de TcEF-1 $\gamma$  pourrait conjuguer le GSH avec la clomipramine la rendant plus hydrosoluble, ce qui permet aux parasites transfectés de résister à cette drogue.

Afin de vérifier que le domaine de type GST induit la résistance des parasites transfectés, nous avons cloné dans un vecteur pTEX la moitié N-terminale de TcEF-1 $\gamma$  contenant ce domaine. Cette construction sera utilisée pour transfecter des parasites afin de tester leur résistance à la clomipramine. Il se peut cependant qu'aucune résistance ne soit constatée, car le domaine N-terminal de type GST nécessite peut-être la présence de la moitié C-terminale pour être fonctionnel. Cependant, une observation intéressante a été faite chez le champignon *Emericella nidulans*. En effet, le facteur EF-1 $\gamma$  d' *E. nidulans* consiste en une protéine de 215 acides aminés qui correspond à la taille des GSTs, contrairement aux autres cellules eucaryotes où le polypeptide EF-1 $\gamma$  est composé de 411 a.a.. Ce polypeptide de 215 a.a. est par ailleurs très homologue aux GSTs (KOONIN et coll., 1994). Ce champignon n'a donc pas besoin de la moitié C-terminale pour que EF-1 $\gamma$  soit fonctionnelle, que ce soit au niveau de la synthèse protéique ou pour une autre fonction éventuelle comme l'activité GST. Il a également été observé par d'autres auteurs et par nous même que EF-1 $\gamma$  est très sensible aux attaques protéolytiques au niveau de sa large zone centrale polaire et qu'il se fragmente spontanément (JANSSEN et MÖLLER, 1988b; MOMOI et

coll., 1993; MAESSEN et coll., 1987). Ceci pourrait permettre la libération des extrémités N-terminales qui formeraient des dimères à l'image de ce qui est observé dans le cas des sous-unités monomériques des GSTs (REINEMER et coll., 1992).

L'activité GSTs a été testée sur le mélange élué à partir de la colonne de glutathion agarose contenant les sous-unité  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  de EF-1 (PLUMAS-MARTY et coll., 1992). Une faible activité a été démontrée (70 nmoles/min/mg) en utilisant comme substrat le 1-chloro 2, 4-dinitrobenzène (CDNB). Cette activité est similaire à celle obtenue par YAWETZ et AGOSIN (1981) avec une protéine de 37 kDa purifiée après différentes étapes chromatographiques et qui reste la seule donnée concernant les GSTs chez *T. cruzi*. Afin de vérifier l'activité enzymatique de TcEF-1 $\gamma$  en relation avec l'activité GST, nous avons sous-cloné le cDNA correspondant dans un vecteur d'expression fort (vecteur pQ). Ce vecteur permet d'obtenir la protéine TcEF-1 $\gamma$  contenant 6 histidines en partie Nt ce qui permet sa purification sur colonne de nickel. Malheureusement, la protéine TcEF-1 $\gamma$  obtenue précipite dans les tampons aqueux habituels. Elle n'est soluble que sous forme dénaturée dans un tampon contenant différents détergents, ce qui rend impossible les tests d'activité enzymatique. EF-1 $\gamma$  d'*Artemia salina* possède les mêmes propriétés hydrophobes et ne peut être obtenue soluble qu'en présence de détergents ou en association avec EF-1 $\beta$  (JANSSEN et MÖLLER, 1998b). Ce dernier moyen pourra être utilisé pour tester l'activité GST en mélangeant TcEF-1 $\gamma$  et TcEF-1 $\beta$ , avec pour témoin de réaction TcEF-1 $\beta$  seul.

Cette fonction GST éventuelle de EF-1 $\gamma$  pourrait jouer un rôle dans la résistance des tumeurs humaines. En effet, une augmentation de la transcription de EF-1 $\gamma$  dans les tissus cancéreux du pancréas en comparaison avec les tissus normaux a été observée (LEW et coll., 1992). Des résultats similaires ont été rapportés dans le cas de l'adénome et le carcinome du colon, ainsi que dans les carcinomes gastriques et

oesophagiens (MIMORI et coll., 1996). Parallèlement, une surproduction des GSTs a été observée dans quelques tumeurs cliniques comparées aux tissus seins environnant (MORGAN et coll., 1996). Une corrélation entre la résistance aux drogues et la surproduction des GSTs a été démontrée dans divers types cellulaires, en particulier les cellules de carcinome du colon (PETER et ROELOFS, 1992). La surproduction de EF-1 $\gamma$  qui exprimerait une activité GST dans les cellules tumorales est susceptible d'augmenter la résistance de ces cellules aux drogues anti-tumorales. Ainsi, la recherche d'inhibiteurs d'enzymes intervenant dans les mécanismes de détoxication doit non seulement prendre comme cible les GSTs, mais devrait tenir compte de l'existence de cette cible potentielle que représente TcEF-1 $\gamma$ .

### Le facteur EF-1 $\alpha$

Nous avons complété la caractérisation de EF-1 par l'étude de la sous-unité  $\alpha$ . Le clonage du gène codant pour EF-1 $\alpha$  a été réalisé en criblant la banque génomique à l'aide d'une sonde obtenue après amplification par PCR de l'ADN génomique de *T. cruzi* en utilisant deux oligonucléotides spécifiques de EF-1 $\alpha$  de *Trypanosoma brucei*. L'ADN génomique des clones positifs a été sous-cloné dans le vecteur PUC 18 puis séquencé. L'alignement de TcEF-1 $\alpha$  avec les séquences EF-1 $\alpha$  d'autres espèces a révélé un très haut degré de conservation. En effet, l'homologie est de 99,5 % avec EF-1 $\alpha$  de *T. brucei* et 92 % avec EF-1 $\alpha$  humain. Le facteur d'elongation EF-1 $\alpha$  est l'une des protéines les plus conservées et est souvent utilisée dans les études phylogénétiques. Par exemple, chez les mammifères, EF-1 $\alpha$  humain est identique à EF-1 $\alpha$  du lapin et ne diffère que d'un seul acide aminé avec EF-1 $\alpha$  de la souris et du hamster. Cette identité importante s'explique par la conservation des sites actifs en particulier les sites de fixation du GTP/GDP, les domaines d'interaction avec l'ARNt et la  $\beta$ -actine (RIIS, 1990) ainsi que les sites de modifications post-traductionnelles (MERRICK, 1992).

La séquence de TcEF-1 $\alpha$  possède en outre dans ces extrémités 5' et 3' non-codantes une séquence nucléotidique répétée qui se compose d'une série de 7 (T-C) et 7 (T-G). Nous ne connaissons pas le rôle de ces séquences chez *T. cruzi*. Cette succession de bases pyrimidine et purine stabilise la conformation Z de l'ADN (WANG et coll., 1979). Ces conformations peuvent jouer un rôle dans la régulation de l'expression des gènes (NORDHEIM et RICH, 1983).

Nous avons testé la réactivité d'un sérum de lapin anti-EF-1 $\alpha$  d'*Artémia salina* sur un extrait total d'épimastigote. Ce sérum reconnaît une bande à 54 kDa. Afin d'obtenir un sérum anti-TcEF-1 $\alpha$ , nous avons sous-cloné le produit de PCR de 900 pb codant pour les 303 acides aminés N-terminaux de TcEF-1 $\alpha$  dans le vecteur pQ32. Le sérum anti-EF-1 $\alpha$  d'*Artemia salina* reconnaît la protéine de fusion correspondante. Nous avons obtenu un sérum anti-TcEF-1 $\alpha$ Nt après immunisation de souris avec la protéine de fusion. Ce sérum révèle une protéine de même masse moléculaire que celle reconnue par le sérum anti-TcEF-1 $\alpha$  d'*Artemia salina*, à la fois sur l'extrait total d'épimastigotes, de trypomastigotes et d'amastigotes et également sur l'antigène de *Leishmania donovani*.

Par ailleurs, nous avons recherché l'existence d'une éventuelle réaction croisée entre TcEF-1 $\alpha$  et EF-1 $\alpha$  humain. Ainsi, des sérums de patients chagasiques en phase aiguë, testés par la technique du Western blot, montrent une réactivité vis à vis de la protéine de fusion TcEF-1 $\alpha$ Nt. Ces résultats préliminaires montrent la présence d'anticorps anti-TcEF-1 $\alpha$  dans les sérums des malades. La contribution éventuelle de ces anticorps dans les phénomènes auto-immuns observés dans la maladie de Chagas nécessite d'autres investigations.

Les épimastigotes en culture présentent une phase de croissance logarithmique avec une multiplication exponentielle des parasites suivie d'une phase stationnaire où les parasites ne se divisent plus. Cette

dernière phase s'accompagne de la différenciation d'une fraction des épimastigotes en trypomastigotes métacycliques infectants tandis que la majorité des épimastigotes meurent. Nous avons montré que la mort des parasites possède les caractéristiques biochimiques et morphologiques de l'apoptose observée chez les organismes pluricellulaires. La localisation de TcEF1- $\alpha$  au cours de la croissance du parasite *in vitro* a été étudiée par immunofluorescence en utilisant le sérum anti-EF-1 $\alpha$ . Cette localisation est cytoplasmique dans les formes jeunes de la phase logarithmique avec une intensité de fluorescence importante qui diminue en fonction de l'âge des parasites. La synthèse protéique ayant lieu dans le cytoplasme des cellules, la localisation cytophysique de TcEF-1 $\alpha$  n'est pas surprenante.

En revanche, dans le cas des épimastigotes de la phase stationnaire dont l'aspect morphologique ressemble à des parasites en apoptose, la localisation de TcEF-1 $\alpha$  est nucléaire. De plus, ces formes sont souvent binucléées ce qui indique l'arrêt de la cytokinèse. Afin de confirmer que la localisation nucléaire est bien en relation avec les processus d'apoptose, les parasites ont été traités avec la génétidine qui induit 100 % de mort. Dans ce cas, un fort signal est observé dans les noyaux parasitaires. Cette localisation nucléaire est surprenante compte tenu du lieu de la synthèse protéique, mais a déjà été observée dans d'autres modèles, comme les oligodendrocytes de souris, des cellules de l'algue *Nitella pseudoflobellata* ou des cellules d'*Artemia salina* (COLLING et coll., 1994; BARBARES et coll., 1995; JANSSEN et coll., 1994). Cependant, aucune corrélation entre la localisation nucléaire et la sénescence n'a été observée auparavant. La fonction de EF-1 $\alpha$  nucléaire n'est pas déterminée, mais nous pouvons envisager qu'elle interviendrait dans la transcription des gènes. En effet, les équivalents de EF-1 $\alpha$  et EF-1 $\beta$  chez les procaryotes, EF-Tu et EF-Ts forment des complexes avec la réplique Q $\beta$  responsable de la réPLICATION de l'ARN du phage Q $\beta$  d'*E. coli* (BLUMENTHAL et coll., 1972). De plus, ce complexe stimule la synthèse des ARNr (TRAVERS, 1973). Ces résultats et nos observations sont en faveur d'un rôle possible pour EF-1 $\alpha$  au niveau de la régulation

de la transcription. Dans le cas de *T. cruzi*, cette régulation pourrait intervenir dans l'expression de certains gènes qui seraient impliqués dans le contrôle de la mort cellulaire programmée.

L'implication de EF-1 $\alpha$  dans le vieillissement des cellules eucaryotes a été rapportée au niveau des fibroblastes humains en culture. En effet, il a été observé que la quantité de EF-1 $\alpha$  ainsi que son activité catalytique baissent dans le cas des fibroblastes âgés, alors que ces deux paramètres restent constants chez les fibroblastes immortalisés (CAVALLIUS et coll., 1986). D'autre part, la surexpression de EF-1 $\alpha$  chez la drosophile augmente sa longévité (SHEPHERD et coll., 1989) et rend plus susceptible à la transformation les fibroblastes de mammifères (TATSUKA et coll., 1992). Si l'hypothèse d'un rôle éventuel de EF-1 $\alpha$  dans le contrôle de l'expression des gènes impliqués dans la mort cellulaire est vérifiée, il est raisonnable de penser qu'un dérèglement du mécanisme de contrôle pourrait entraîner l'immortalisation des cellules. Ceci pourrait être rapproché des expériences de transfection de EF-1 $\alpha$  qui entraîne une augmentation de la longévité chez la drosophile ou la transformation des fibroblastes. Des expériences de transfection des épimastigotes avec le vecteur pTEX contenant le gène TcEF-1 $\alpha$  pourraient constituer un modèle intéressant pour étudier le rôle de TcEF-1 $\alpha$  dans le contrôle de la mort des parasites par apoptose.

### La mort cellulaire programmée

Le cycle de *T. cruzi* passe par trois stades distincts, les épimastigotes, les trypomastigotes et les amastigotes et par deux hôtes différents l'homme et l'insecte vecteur. Nous avons décrit pour la première fois que la différenciation *in vitro* pendant la phase stationnaire du stade épimastigote prolifique en trypomastigote non prolifique s'accompagne de la mort massive des épimastigotes. Cette mort cellulaire possède les caractéristiques morphologiques nucléaire et cytoplasmique de l'apoptose. La mort des épimastigotes peut être accélérée ou inhibée

suivant les conditions de culture ou la densité de parasite, ce qui indique que des signaux extracellulaires interviennent dans ce phénomène. Ces signaux peuvent provenir des parasites eux-mêmes puisqu'une culture à faible densité entraîne la mort des parasites, mais également du milieu de culture. En effet, dans certaines conditions de culture sur phase solide, contenant du glucose et de l'hémoglobine, les signaux provenants du milieu sont suffisants pour permettre le clonage par dilution limite d'un seul parasite qui se multiplie ensuite.

La mort par apoptose n'est pas systématiquement corrélée avec la différenciation en trypomastigote. Elle peut être induite par une agression immunologique médiée par le complément ou par la génétidine, inhibiteur de la synthèse protéique. L'utilisation d'un agent non physiologique tel que la saponine, induit la mort des parasites non plus par apoptose, mais par nécrose qui est une mort accidentelle ou pathologique.

La signification du processus de mort cellulaire programmée (MCP) chez un eucaryote unicellulaire doit être élucider. La MCP est principalement liée aux organismes multicellulaires. L'apoptose est une forme particulière de MCP qui s'accompagne de modifications caractéristiques de la morphologie et de la physiologie cellulaire (lobulation de l'enveloppe nucléaire, condensation et dégradation de la chromatine par attaque des liens internucléosomiques, fragmentation du noyau, puis de la cellule) (SOLARY et coll., 1993). La MCP remplit de multiples fonctions. Elle a notamment un rôle morphogénétique et un rôle homéostatique. Chez le nématode *Caenorhabditis*, un nombre fixe de cellules meurt pendant le développement d'un hermaphrodite. De nombreuses cellules périssent pendant la métamorphose des insectes et des amphibiens (ELLIS et coll., 1991). Chez les vertébrés, la MCP contribue au modelage des membres ainsi qu'à la maturation du système nerveux. Elle élimine ainsi les cellules qui peuvent nuire à l'organisme,

comme celles dont l'ADN est endommagé, celles qui deviennent tumorales et les lymphocytes qui produisent des auto-anticorps.

La nature de la MCP n'est pas encore connue, mais une hypothèse consiste à considérer la MCP comme une mitose avortée (UCKER, 1991). Dans beaucoup de cas, le choix entre mitose ou suicide se fait après que la cellule a franchi un point du cycle mitotique que l'on appelle point de restriction ou point R. Une fois franchi ce point, la cellule prépare activement la division, à moins que des facteurs internes ou externes ne l'obligent à réaliser une mitose abortive qui provoque sa destruction. Cette hypothèse est renforcée par le fait que l'apoptose peut être induite par certains gènes qui interviennent dans le contrôle de la mitose des cellules de mammifères. Ainsi, si les effecteurs de la MCP ont en commun des composants du cycle cellulaire, toute cellule ayant la capacité de proliférer possède en elle les effecteurs de la mort et il serait de même pour les organismes unicellulaires comme *T. cruzi*.

Chez ce parasite, la différenciation *in vitro* des épimastigotes en trypomastigotes qui s'accompagne de la mort par apoptose des épimastigotes non différenciés pourrait mimer le cycle de développement du parasite chez l'insecte vecteur. Une étude plus fine des stades de développement chez le vecteur permettra de confirmer l'existence de la MCP des épimastigotes *in vivo*. Le rôle de l'apoptose des épimastigotes *in vivo* pourrait être la limitation du nombre de parasite chez l'hôte vecteur afin de ne pas le fragiliser. En effet, si le vecteur venait à mourir ceci pourrait interrompre le cycle de vie du parasite. Pendant la différenciation des épimastigotes, l'expression de gènes spécifiques pour le stade trypomastigote précède de quelques jours les changements morphologiques associés à la différenciation (CONTRERAS et coll., 1985). Les épimastigotes reçoivent donc des signaux qui leur donnent le choix entre la mort ou la différenciation. La mort des épimastigotes permettrait la survie des trypomastigotes qui expriment les gènes

nécessaires à l'infection de l'hôte vertébré et les gènes inhibiteurs de l'apoptose.

Si l'apoptose est une mitose avortée qui fait intervenir le cycle cellulaire, les trypomastigotes, formes non répliquatives, ne peuvent pas recevoir les mêmes signaux qui induisent la mort des épimastigotes. Les trypomastigotes se retrouvent dans les déjections de l'insecte, déposées sur la peau. Quelques épimastigotes peuvent être présents parmi les trypomastigotes, mais ils pourraient alors être éliminés une fois dans la circulation sanguine par le complément, alors que les formes trypomastigotes qui sont résistantes peuvent envahir les tissus de l'hôte. Nous avons montré *in vitro* que le complément induit également l'apoptose des formes épimastigotes sans affecter les trypomastigotes. L'apoptose *in vivo* en réponse au complément pourrait prévenir la libération d'enzymes et d'antigènes d'épimastigotes et ainsi éviter une réponse inflammatoire précoce qui pourrait alors prendre pour cible les trypomastigotes par d'autres mécanismes effecteurs de l'immunité. Il reste cependant à tester si l'ingestion d'épimastigotes apoptotiques par les macrophages de mammifères présente les mêmes conséquences que l'ingestion de cellules apoptotiques, à savoir le maintien des macrophages dans un état immunologiquement silencieux (SAVILL et coll., 1993). La MCP pourrait participer à l'adaptation optimale de *T. cruzi* aux différents hôtes en établissant un équilibre subtil qui permettrait de conserver la vie de ses hôtes le plus longtemps possible.

La MCP n'est donc pas un phénomène spécifique des organismes multicellulaires. Elle a également été décrite chez d'autres organismes unicellulaires: Le parasite kinétoplastidé *T. brucei rhodensiense* chez le champignon *Dictyostelium discoïdeum* et chez le protozoaire cilié *Tetrahymena thermophila* (AMEISEN, 1996). L'origine de la MCP est donc plus ancienne que l'apparition des organismes multicellulaires. Une hypothèse simple consiste à supposer que l'apoptose pourrait dériver de la mort nucléaire programmée mise en oeuvre par les protistes (DENIS

and MIGNOTTE, 1994). En effet, pendant la phase sexuée de leur cycle, certains protistes détruisent un ou plusieurs de leurs noyaux par un processus qui possède quelques traits communs avec l'apoptose, comme la condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN au niveau des liens entre les nucléosomes, ainsi que la lobulation de l'enveloppe nucléaire. Bien qu'aucune évidence ne prouve qu'il joue un rôle dans la mort de la cellule, ce programme de destruction nucléaire est fonctionnel et est impliqué dans l'élimination des macronuclei surnuméraires durant la conjugaison chez *Tetrahymena* (DAVIS et coll., 1992).

Ainsi, chez un même organisme unicellulaire, *Tetrahymena*, l'existence des deux types de mort nucléaire et cellulaire a été démontrée. La recherche de gènes impliqués dans les deux processus de mort chez ce protiste apporterait une réponse sur l'origine de la mort cellulaire programmée et en particulier l'apoptose. A ce point de vu, *T. cruzi* est également un modèle biologique intéressant pour rechercher des gènes qui contrôlent la MCP. La faisabilité des expériences de transfection chez ces microorganismes est un outil puissant qui pourrait élucider les phénomènes au niveau moléculaire et en particulier répondre à certaines questions que soulèvent nos observations notamment le rôle possible de EF-1 $\alpha$  dans les phénomènes de transcription.

***REFERENCES  
BIBLIOGRAPHIQUES***

Ameisen J.C. (1996) The origin of Programmed Cell Death. *Science*, 272, 1278

Andrews N. and Whitlow M. (1989) Secretion by *Trypanosoma cruzi* of a hemeolysin active at low pH. *Cell*. 67, 1277

Barbarese E., Koppel D.E., Deutscher M.P., Smith C.L., Ainger K., Morgan F. and Carson J.H. (1995) Protein translation components are colocalized in granules in oligodendrocytes. *J. of Cell Science* 108, 2781

Bellé R., Derancourt J., Poulhe R., Capony J.P., Ozon R. and Mulner-Lorillon O. (1989) A purified complex from Xenopus oocytes contains a p47 protein, an *in vivo* substrate of MPF, and a p30 protein respectively homologous to elongation factors EF-1 $\gamma$  and EF-1 $\beta$ . *FEBS* 255, 101

Benne R. (1994) RNA editing in trypanosomes. *Eur. J. Biochem.* 221, 9

Benson T.J., Mckie J.H., Garforth J., Borges, A., Fairlamb, A.H. and Douglas, K.T. (1992) Rationally designed selective inhibitors of trypanothione reductase. Phenothiazines and related tricyclics as lead structures. *Biochem. J.* 286, 9

Blumenthal T., Landers T.A. and Weber K. (1972) Bacteriophage Q $\beta$  replicase contains the protein biosynthesis elongation factor EF-Tu and EF-Ts. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 69, 1313

Bonaldo M.C., Souto-Pardon T., De Souza W. and Goldenberg S. (1988) Cell-substrate adhesion during *Trypanosoma cruzi* differentiation. *J. Cell. Biol.* 106, 1349

Brandis J. W. and Raff R.A. (1979) Elevation of protein synthesis is a complex response to fertilisation. *Nature* 278, 467

Brener Z. (1973) Biology of *Trypanosoma cruzi*. Ann. Rev. Microbiol. 27, 347

Brumpt E. (1912) Pénétration du *S. cruzi* à travers la muqueuse oculaire saine. Bull. Soc. Path. Exot. Filiale 5, 723

Cavalius J., Rattan S.I.S. and Clark B.F.C. (1986) Changes in activity and amount of active elongation factor 1 $\alpha$  in aging and immortal human fibroblast cultures. Exp. Gerontol. 21, 149

Chagas C. (1909) Nova Trypanosomiase humana. Mem. Inst. Osw. Cruz. 1, 159

Charles D. (1987) Maladie de Chagas. Encycl. Med. Chir. (Paris, France), Maladies infectieuses 8095C10 7, 1

Chen C.J. and Traugh J.A. (1995) Expression of recombinant elongation factor 1 beta from rabbit in *Escherichia coli*. Phosphorylation by casein kinase II. Biochimica et Biophysica Acta 1264, 303

Chess Q., Acosta A.M., Sethi J.K. and Santos-Buch C.A. (1983) Reversible acquisition of host surface membrane antigen by *Trypanosoma cruzi*. Inf. et Immun. 40, 299

Collings D.A., Wasteneys G.O., Miyazaki M. and Williamson R.E. (1994) Elongation factor 1 $\alpha$  is a component of the subcortical actin bundles of chatacean algae. Cell Biol. Inter. 18, 1019

Contreras V.T., Morel C.M. and Goldenberg S. (1985) Stage specific gene expression precedes morphological changes during *T. cruzi* metacyclogenesis. Mol. Bioch. Paras. 14, 83

Davis M.C., Ward J.G., Herrick G. and Allis C.D. (1992) Programmed nuclear death:apoptotic-like degradation of specific nuclei in conjugating *Tetrahymena*. Dev. Biol. 154, 419

De Cassia Ruiz R., Rigoni V.L., Gonzalez J. and Yoshida N. (1993) The 35/50 kDa surface antigen of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes, an adhesion molecule involved in host cell invasion. Parasite Immunol. 15, 121

Denis H. and Mignotte B. (1994) L'apoptose dérive-t-elle de la mort nucléaire programmée mise en oeuvre par les protistes? M/S 10, 687

Djé M.K., Mazabraud A., Viel A., le Maire M., Denis H., Crawford E. and Brown D.D. (1990) Three genes under different developmental control encode elongation factor 1- $\alpha$  in *Xenopus laevis*. N.A.R. 18, 3489

Docampo, R. and Moreno, S.N.J. (1984) Free radical metabolites in the mode of action of chemotherapeutic agents and phagocytic cells on *Trypanosoma cruzi*. Rev. Inf. Dis. 6, 223-238.

Doyle, P.S. and Weinbach E.C. (1989) The activity of tricyclic antidepressant drugs against *Trypanosoma cruzi*. Exp. Parasitol. 68, 230-234.

Dujardin J.P. (1992) La lutte contre les vecteurs de la maladie de Chagas. Bulletin de la Société Française de Parasitologie 10, 249

Ellis R.E., Yuan J. and Horvitz H.R. (1991) Mechanisms and functions of cell death. Annu. Rev. Cell. Biol. 7, 663

Fan H. and Penman S. (1970) Regulation of protein synthesis in mammalian cells . Inhibition of protein synthesis at the level of initiation during mitosis. J. Mol. Biol. 50, 655

Fischer E., Ouaissi M.A., Velge P., Cornette J. and Kazatchkine M. (1988) gp 58/68, a parasite component that contributes to the escape of trypomastigote form on *T. cruzi* from damage by the human alternative pathway . Immunology 65, 99

Fischer I., Arfin S.M. and Moldave K. (1980) Regulation of translation. Analysis of intermediary reactions in protein synthesis in exponentially growing and stationary phase chinese hamster ovary cells in culture. Biochemistry 19, 1417

Goldenberg S., Contreras V.T., Bonaldo M.C., Salles J.M., Lima Franco C.M., Lafaille J., Gonzales Perdoms M., Linss J. and Morel C.M. (1987) *In vitro* differentiating systems for the study of differential gene expression during *Trypanosoma cruzi* development. In Molecular Strategies of Parasite Invasion. UCLA Symposium on molecular and cellular biology. Agabian H., Goodman H. Et Nogueira N., Editors. Alan R. Liss, Inc, New York. 42, 203

Gonzales-Perdomo M., Romero P. and Goldenberg S. (1988) Cyclic AMP and adenylate cyclase activators stimulate *Trypanosoma cruzi* differentiation. Exp. Parasitol. 66, 205

Guevara-Espinoza A., Taibi A., Billaut-Mulot O. and Ouaissi A. (1996) A polymerase chain reaction-based detection of *Trypanosoma cruzi* useful for specific diagnosis of human Chagas' disease. *J. Clin. Microbiol.* 34, 485.

Hadjuk S.L., Harris M.E. and Pollard V.W. (1993) RNA editing in kinetoplastid mitochondria. FASEB J. 7, 5463

Hassel J.A. and Engelhardt D.L. (1976) The regulation of protein synthesis in animal cells by serum factors. Biochemistry 15, 1375

Heath S., Hieny S. and Sher A. (1990) A cyclic AMP inducible gene expressed during the development of infective stages of *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol. 43, 133

Hershey J.W.B. (1991) Translational control in mammalian cells. Annu. Rev. Biochem. 60, 717

Hille M.B. and Albers A.A. (1979) Efficiency of protein synthesis after fertilisation of sea urchin eggs. Nature 278, 469

Hughes D. (1990) Both genes for EF-Tu in *Salmonelle typhimurium* are individually dispensable for growth. J. Mol. Biol. 215, 41

Hovemann B., Richter S., Walldorf U. and Cziepluch C. (1998) Two genes encode related cytoplasmic elongation factors 1 $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ) in *Drosophila melanogaster* with continuous and stage specific expression. N.A.R. 16, 3175

Iwasaki K., Motoyoshi K., Nagata S. and Kaziro Y. (1976) Purification of a new polypeptide chain elongation factor, EF-1 $\beta$ , from liver. J. of Biol. Chem. 251, 1843

Janssen G.M.C. and Möller W. (1988a) Kinetic studies on the role of elongation factors 1 $\beta$  and 1 $\gamma$  in protein synthesis. J. of Biol. Chem. 263, 1773

Janssen G.M.C. and Möller W. (1988b) Elongation factor 1 $\beta\gamma$  from *Artemia*, purification and properties of its subunits. Eur. J. Biochem. 171, 119

Janssen G.M.C., Maessen G.D.F., Amons R. and Möller W. (1988c) Phosphorylation of elongation factor 1 $\beta$  by an endogenous kinase affects its catalytic nucleotide exchange activity. J. of Biol. Chem. 263, 11063

Janssen G.M.C., Van Damme H.T.F., Kriek J., Amons R. and Möller W. (1994) The subunit structure of elongation factor 1 from *Artemia*. Why two  $\alpha$ -chains in this complex? *J. of Biol. Chem.* 269, 31410

Joskowicz M. (1985) Maladie de Chagas et autoimmunité. *M/S* 8, 412

Kelly J.M., Taylor M.C., Smith K., Hunter K.J. and Fairlamb A.H. (1993) Phenotype of recombinant *Leishmania donovani* and *Trypanosoma cruzi* which over-express trypanothione reductase. Sensitivity towards agents that are thought to induce oxidative stress. *Eur. J. Biochem.* 218, 29

Kierszenbaum F., Ivanyi J. and Budzko D.B. (1976) Mechanism of natural resistance to trypanosomal infection. *Immunol.* 30, 1

Kierszenbaum F. and Pienkowski M.M. (1979) Thymus-dependent control of host defense mechanisms against *Trypanosoma cruzi* infection. *Infection and Immunity* 24, 117

Kierszenbaum F., Majumder H., Lopez M. and Sztein M.B. (1995) Differential effects of *Trypanosoma cruzi* on the transcription of the p55 IL-2R, c-fos, c-myc and CD69 genes in activated human lymphocytes. *Parasite Immunol.* 17, 197

Koonin, E.V., Mushegian, A.R., Tatusov, R.L., Altschul, S.F., Bryant, S.H., Bork, P and Valencia A. (1994) Eukaryotic translation elongation factor 1 $\gamma$  contains a glutathione transferase domain-Study of a diverse, ancient protein superfamily using motif search and structural modeling. *Protein Sci.* 3, 2045

Kuhlman P. And Palmer J.D. (1995) Isolation, expression, and evolution of the gene encoding mitochondrial elongation factor Tu in *Arabidopsis thaliana*. Plant Molecular Biology 29, 1057

Lanar D.E., Levy L.S. and Manning J.E. (1981) Complexity and content of the DNA and RNA in *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biol. Parasitol. 3, 327

Lee S., Wolfram L.A. and Wang E. (1993) Differential expression of S1 and elongation factor-1 $\alpha$  during rat development. J. Biol. Chem. 268, 24453

Lee S., Leblanc A., Duttaroy A. and Wang E. (1995) Terminal differentiation-dependent alteration in the expression of translation elongation factor-1 $\alpha$  and its sister gene, S1, in neurons. Exp. Cell Res. 219, 589

Lew, Y., Jones, D.V., Mars, W.M., Evans, D., Byrd, D. and Frazier, M.L. (1992) Expression of elongation factor 1 gamma-related sequence in human pancreatic cancer. Pancreas 7, 144-152.

Liew F.W., Schmidt J.A., Sheng Liu D., Millott S.M., Scott M.T., Dhaliwal J.S. and Croft S.L. (1988) Suppressive substance produced by T cells from mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. II:Partial biochemical characterization. J. Immunol. 140, 969

Linz J.E. and Sypherd P.S. (1987) Expression of three genes for elongation factor 1 $\alpha$  during morphogenesis of *Mucor racemosus*. Mol. and Cell. Biol. 7, 1925

Maessen G.D.F., Amens R., Zeelen J.P., and Möller W. (1987) Primary structure of elongation factor 1 $\gamma$  from *Artemia*. FEBS Lett. 223, 181

Mannervik, B., Alin, P., Guthenberg, C. Jensson, H., Tahir, M.K., Warhholm, M. and Jornvall, H. (1985) Identification of three classes of cytosolic glutathione transferases common to several mammalian species: correlation between structural data and enzymatic properties. Proc. Natl. Sci. USA. 82, 7202

Marr J.J. and Docampo R. (1986) Chemotherapy of Chagas' disease: a perspective of current therapy and considerations for future research. Rev. Inf. Diseases 8, 884

Ming M., Ewen M.E. and Pereira M.E.A. (1995) Trypanosome invasion of mammalian cells requires activation of the TGF $\beta$  signaling pathway. Cell 82, 287

McCarthy-Burke C., Taylor Z.A. and Buck A.G. (1989) Characterization of the spliced leader genes and transcripts in *Trypanosoma cruzi*. Gene 82, 177

McLaughlin P.J. and Dayhoff M.O. (1973) Eukaryote evolution: a view based on cytochrome c sequence data. J. Mol. Evol. 2, 99

Merrick W.C. (1992) Mechanism and regulation of eukaryotic protein synthesis. Microbiological Reviews 56, 291

Mimori K., Mori M., Inoue H., Ueo H., Mafune K., Akiyoshi T. and Sugimachi K. (1996) Elongation factor 1 $\gamma$  mRNA expression in oesophageal carcinoma. Gut 38, 66

Minoprio P., Eisen H., Forni L., D'Imperio Lima M.R., Joskowicz M. and Coutinho A. (1986) Polyclonal lymphocyte responses to murine *Trypanosoma cruzi* infection. I- Quantitation of both T and B cell responses. Scand. J. Immunol. 24, 661

Momoi H., Yamada H., Ueguchi C. and Mizuno T. (1993) Sequence of a fission yeast gene encoding a protein with extensive homology to eukaryotic elongation factor-1 $\gamma$ . Gene 134, 119

Moldave, K. (1985) Eukaryotic protein synthesis. Ann. Rev. Biochem. 54, 1109

Morello, A. (1988) The biochemistry of the mode of action of drugs and the detoxication mechanism in *Trypanosoma cruzi*. Comp. Biochem. Physiol. 90, 1-12.

Morgan, A.S., Ciaccio, P.J., Kenneth, D.T. and Kauvar, L.M. (1996) Isozyme-specific glutathione S-transferase inhibitors potentiate drug sensitivity in cultured human tumor cell lines. Cancer Chemother Pharmacol 37, 363-370.

Mulner-Lorillon O., Cormier P., Labbe J.C., Dorée M., Poulhe R., Osborne H. and Bellé R. (1990) M-phase-specific cdc2 protein kinase phosphorylates the  $\beta$  subunit of casein kinase II and increases casein kinase II activity. Eur. J. Biochem. 193, 529

Mulner-Lorillon O., Minella O., Cormier P., Capony J.P., Cavadores J.C., Morales J., Poulhe R. and Bellé R. (1994) Elongation factor EF-1 $\delta$ , a new target for maturation-promoting factor in Xenopus oocytes. J. Biol. Chem. 269, 20201

Nickell S.P., Stryker G.A. and Arevalo C. (1993) Isolation from *Trypanosoma cruzi*-infected mice of CD8+, MHC-restricted cytotoxic T cells that lyse parasite-infected target cells. J. Immunol. 150, 1446

Nielsen P.J. and McConkey E.H. (1980) Evidence for control of protein synthesis in hela cells via the elongation rate. J. Cell. Physiol. 104, 269

Nogueira N., Ellis J., Chaplan S. and Cohn Z. (1981) *Trypanosoma cruzi* *in vivo* and *in vitro* correlation between T cell activation and susceptibility in inbred strains of mice. *Exp. Parasitol.* 51, 325

Nordheim A. and Rich A.: Negatively supercoiled simian virus 40 DNA contains Z-DNA segments within transcriptional enhancer sequences. *Nature* 303 (1983) 674

Opperdoes F.R. and Michels P.A.M. (1993) The glycosomes of Kinetoplastida. *Biochemie* 75, 231

Orlowski M. and Sypherd P. (1978) Regulation of translation rate during morphogenesis in the fungus *Mucor*. *Biochemistry* 17, 569

Ortega-Barria E. and Pereira M.E.A. (1991) A novel *T. cruzi* heparin-binding protein promotes adhesion and penetration of engineered bacteria and trypanosomes into mammalian cells. *Cell* 67, 411

Ouaissi M.A., Afchain D., Capron A. and Grimaud J.A. (1984) Fibronectin receptors on *Trypanosoma cruzi* and their biological function. *Nature* 308, 380

Ouaissi M.A. (1988) Role of the RGD sequence in parasite adhesion to host cells. *Parasitology today* 4, 169

Ouaissi M.A., Cornette J., Schöneck R., Plumass-Marty B., Taibi A., Loyens M. and Capron A. (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

Ouaissi M.A. (1993) *Trypanosoma cruzi*, Maladie de chagas: Aspects cliniques. Encycl. Med. Chir. (Paris, France), Maladie infectieuses 8-505-A-20, 1

Ouaissi M.A., Guevara-Espinoza A., Chabé F., Gomez-Corvera R. and Taibi A. (1995) A novel and basic mechanism of immunosuppression in Chagas'disease: *Trypanosoma cruzi* releases in vitro and in vivo a protein which induces T cell unresponsiveness trough specific interaction with cysteine and glutathione. Immunology Letters 48, 221

Peter W.H.M. and Roelofs H.M.J. (1992) Biochemical characterization of resistance to mitoxantrone and adriamycin in Caco-2 human colon adenocarcinoma cells: a possible role for glutathione S-transferase. Cancer Res. 52, 1886

Plumas-Marty B., Verwaerde C., Loyens M., Velge P., Taibi A, Cesbron M.F., Capron A. and Ouaissi A. (1992) *Trypanosoma cruzi* glutathione-binding proteins: immunogenicity during human and experimental Chagas'disease. Parasitology 104, 87

Plumas-Marty B., Schöneck R., Billaut-Mulot O., Taibi A., Capron A. and Ouaissi A. (1994) Molecular cloning of a *Trypanosoma cruzi* cDNA encoding a protein homologous with mammalian elongation factor 1 $\beta$ . Parasitol. Res. 80, 626

Ramirez M.I., De Cassia Ruiz R., Araya J.E., Da Silveira J. F. and Yoshida N. (1993) Involvement of the stage-specific 82-kilodalton adhesion molecule of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes in host cell invasion. Infection and Immunity 61, 3636

Reed S.G. (1980) Adoptive transfert of resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection with T-lymphocyte-enriched spleen cells. Infection and Immunity 28, 404

Reinemeyer P., Dirr H.W., Ladenstein R., Huber R., Lobello M.L., Federici G., and Parker M.W. (1992) Three-dimensional structure of class pi glutathione S-transferase from human placenta in complex with S-hexylglutathione at 2.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 227, 214

Riis B., Rattan S. I.S., Clark B. F.C. and Merrick W.C. (1990) Eukaryotic protein elongation factors. *TIBS* 15, 420

Roper M.D. and Wicks W.D. (1978) Evidence for acceleration of the rate of elongation of tyrosine aminotransferase nascent chains by dibutyryl cyclic AMP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 140

Sanders, J., Maassen, J.A. and Möller W. (1992) Elongation factor-1 messenger-RNA levels in cultured cells are high compared to tissue and are not drastically affected further by oncogenic transformation. *Nucleic Acids Res.* 20, 5907-5910.

Schirmaier F. and Philippse P. (1984) Identification of two genes coding for the translation elongation factor EF-1 $\alpha$  of *S. Cerevisiae*. *EMBO J.* 3, 3311

Segura E.L., Bua J., Rosenstein A., Subias E., Esteva M., Moreno M. and Ruiz A.M. (1986) Monoclonal antibodies against the flagellar fraction of epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*: complement-mediated lytic activity against trypomastigotes and passive immunoprotection in mice. *Immunol. Lett.* 13, 165

Shepherd J.C.W., Walldorf U., Hug P. and Gehring W.J. (1989) Fruit flies with additional expression of the elongation factor EF-1 $\alpha$  live longer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 7520

Shiina N., Gotoh Y. and Nishida E. (1995) Microtubule-severing activity in M phase. Trends in Cell Biology 5, 283

Solari A.J. (1980) The 3-dimensional fine structure of the mitotic spindle in *Trypanosoma cruzi*. Chromosoma 78, 239

Solary E., Bertrand R. and Pommier Y. (1994) Le rôle de l'apoptose dans la genèse et le traitement du cancer. M/S 9, 667

Song J.M., Picologlou S., Grant C.M., Firoozan M., Tuite M.F. and Liebman S. (1989) Elongation factor EF-1 $\alpha$  gene dosage alters translational fidelity in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. And Cell. Biol. 9, 4571

Sundstrom P., Smith D. and Sypherd P. (1990) Sequence analysis and expression of the two genes for elongation factor 1 $\alpha$  from the dimorphic yeast *candida albicans*. J. Of Bacteriology 172, 2036

Tarleton R.L. (1990) Depletion of CD8+ T cells increases susceptibility and reverses vaccine-induced immunity in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. J. Immunol. 144, 717

Tarleton R.L., Koller B.H., Latour A. and Postan M. (1992) Susceptibility of b2 microglobulin-deficient mice to *Trypanosoma cruzi* infection. Nature 356, 338

Tatsuka M., Mitsui H., Wada M., Nagata A., Nojima H. and Okayama H. (1992) Elongation factor 1 $\alpha$  gene determines susceptibility to transformation. Nature 359, 333

Thertulien R., Harth G. and Haidaris C.G. (1991) Evidence that the entire length of a kinetoplast DNA minicircle is transcribed in *Trypanosoma cruzi*. Mol. Microbiol. 5, 207

Theodorakis N.G., Barnerji S.S. and Morimoto R.I. (1988) HSP70 mRNA Translation in chicken reticulocytes is regulated at the level of elongation. *J. of Biol. Chem.* 263, 14579

Tibayrenc M. and Le Ray D. (1984) General classification of the isoenzymic strains of *Trypanosoma cruzi* and comparison with *T. cruzi marinkellei* and *T. rangeli*. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.* 64, 239

Toro G.C., Galanti N., Hellman U. and Wernstedt C. (1993) Unambiguous identification of histone H1 in *Trypanosoma cruzi*. *J. Cell. Biochem.* 52, 431

Travers A. (1973) Control of ribosomal RNA synthesis in vitro. *Nature* 244, 15

Trischmann T., Tanowitz H., Wittner M. and Bloom B. (1978) *Trypanosoma cruzi* : role of the immune response in the natural resistance of inbred strains of mice. *Exp. Parasitol.* 45, 160

Ucker, D.S. (1991) Death by suicide: one way to go in mammalian cellular development. *New Biol.* 3, 103

Van Damme H.T.F., Amons R., Karssies R., Timmers C.J., Janssen G.M.C. and Möller W. (1990) Elongation factor 1 $\beta$  of artemia: localization of functional sites and homology to elongation factor 1 $\delta$ . *Biochimica et Biophysica Acta* 1050, 241

Walldorf U., Hovemann B. and Bautz E.K.F. (1985) F1 and F2: Two similar genes regulated differently during development of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 5795

Wang A.H.J., Quigley G.J., Kolpak F.J., Crawford J.L., van Boom J.H., van der Mare, G. and Rich A.: (1979) Molecular structure of a left-handed double helical DNA fragment at atomic resolution. *Nature* 282 680

Yawetz A. and Agosin M. (1981) Purification of the glutathione S-transferase of *Trypanosoma cruzi*. *Comp. Bioch. Phys.* 68, 237

Yoshida N., Blanco S.A., Araguth M.F., Russo M. and Gonzales J. (1990) The stage-specific 90 kilodalton surface antigen of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. and Bioch. Parasitol.* 39, 39

***TABLE DES  
MATIERES***

<b>PUBLICATIONS</b>	<b>5</b>
<b>RESUME</b>	<b>7</b>
<b>ABREVIATIONS</b>	<b>9</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>10</b>
<b>I. La maladie de Chagas</b>	<b>13</b>
<b>A. Le parasite</b>	<b>14</b>
1. Cycle évolutif	14
2. Souches de <i>T. cruzi</i>	17
<b>B. Transmission de la maladie</b>	<b>17</b>
1. Contamination par l'insecte vecteur	18
2. Autres modes de transmission	18
<b>C. Aspects cliniques de la maladie</b>	<b>19</b>
1. Phase aiguë	19
2. Phase de latence ou phase indéterminée	20
3. Phase chronique	20
3.1. Forme cardiaque	20
3.2. Forme digestive	21
3.3. Forme nerveuse	21
4. Diagnostic	21
4.1. Méthodes parasitologiques	21
4.2. Méthodes sérologiques	22
4.3. Méthodes moléculaires	23

5. Lutte contre la maladie de Chagas	<b>23</b>
5.1. Moyens thérapeutiques	<b>23</b>
5.2. Lutte antivectorielle	<b>24</b>
 D. Immunologie de l'infection Chagasiq	<b>25</b>
1. Résistance naturelle	<b>25</b>
2. Réponse immunitaire	<b>25</b>
2.1. Immunité à médiation cellulaire	<b>25</b>
2.2 Immunité à médiation humorale	<b>27</b>
3. Mécanismes d'évasion	<b>27</b>
4. Manifestations pathologiques	<b>28</b>
4.1. Immunopathologie de la phase aiguë	<b>29</b>
4.2. Immunopathologie de la phase chronique	<b>30</b>
 E. Biologie cellulaire de <i>T. cruzi</i>	<b>31</b>
1. Différenciation du parasite	<b>31</b>
1.1. Chez l'hôte vecteur	<b>31</b>
1.2. Chez l'hôte vertébré	<b>32</b>
2. Organisation cellulaire	<b>33</b>
3. Génétique de <i>T. cruzi</i>	<b>35</b>
 <b><i>II. Le facteur d'elongation EF-1 de la synthèse protéique</i></b>	<b>37</b>
 A. La synthèse protéique	<b>38</b>
1. Initiation	<b>40</b>
2. Elongation	<b>42</b>
3. Terminaison	<b>43</b>
 B. Le facteur d'elongation EF-1	<b>44</b>
1. EF-1 $\alpha$	<b>44</b>
2. EF-1 $\beta\gamma\delta$	<b>47</b>

<b>C. Régulation de l'elongation</b>	<b>48</b>
1. Exemples de régulation du taux d'elongation	48
2. Mécanismes pouvant réguler le taux d'elongation	49
<b>CADRE ET OBJECTIFS DU TRAVAIL</b>	<b>52</b>
<b>RESULTATS</b>	<b>53</b>
<b>Article 1</b>	<b>54</b>
Clonage moléculaire de l'ADNc de <i>Trypanosoma cruzi</i> codant pour une protéine homologue au facteur d'elongation EF-1 $\beta$ des mammifères.	
<b>Article 2</b>	<b>60</b>
Séquence nucléotidique de l'ADNc de <i>Trypanosoma cruzi</i> codant pour une protéine homologue au facteur d'elongation 1 $\gamma$ des mammifères.	
<b>Article 3</b>	<b>63</b>
Caractérisation moléculaire et immunologique d'une protéine de <i>Trypanosoma cruzi</i> homologue au facteur d'elongation 1 $\gamma$ des mammifères.	
<b>Article 4</b>	<b>72</b>
Phenotype des parasites recombinants chez <i>Trypanosoma cruzi</i> qui sur-expriment le facteur d'elongation 1 $\gamma$ : implication du domaine GST-like de EF-1 $\gamma$ dans la résistance aux drogues anti-parasitaires.	
<b>Article 5</b>	<b>97</b>
Le facteur d'elongation 1 $\alpha$ : localisation nucléaire dans les parasites en apoptose.	

**Article 6****123**

Apoptose chez un eucaryote unicellulaire *Trypanosoma cruzi*: implication pour l'origine et le rôle de la mort cellulaire programmée dans le contrôle de la prolifération cellulaire, la différenciation et la survie.

***DISCUSSION-CONCLUSION*****142**

Le complexe EF-1 $\beta\gamma\delta$

**144**

Le facteur EF-1 $\alpha$

**150**

La mort cellulaire programmée

**153*****REFERENCES******BIBLIOGRAPHIQUES*****158**