63005

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES LILLE - FLANDRES - ARTOIS

Nº d'ordre 484

THESE

Présentée par

STANISLAS TOMAVO

Pour l'obtention du

DOCTORAT DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

De l'Université de Lille - Flandres - Artois

Caractérisation biochimique des modifications post-traductionnelles

des antigènes majeurs de surface de Toxoplasma gondii



Soutenue le 24 janvier 1990 devant le jury composé de :

MM.

CAMUS Daniei DUBREMETZ Jean-François SAUTIERE Pierre SCHWARZ Raiph VERBERT André VERNES Alain

Unité de Biologie et de Biochimie Parasitaires et Fongiques INSERM U 42, Villeneuve d'Ascq

AVANT-PROPOS

Monsieur le Docteur Dubremetz

Ce travail est le fruit de ton inspiration et de l'encadrement dont j'ai pu bénéficier sans relâche. Je tiens à t'exprimer ma plus profonde gratitude.

Monsieur le Professeur Alain Vernes

Je tiens à vous remercier pour m'avoir accueilli à l'Unité Inserm 42 où ce travail a été réalisé. Vous avez porté une attention constante à ce travail et je vous remercie pour avoir accepté de juger cette thèse.

Monsieur le Professeur Daniel Camus

J'ai été particulièrement sensible au soutien que vous m'avez constamment apporté pendant ces trois années et qu'il me soit permis de vous exprimer ma profonde reconnaissance.

Monsieur le Professeur Ralph Schwarz

J'ai apprécié les encouragements et les conseils prodigués au cours de ce travail et je vous en remercie vivement.

Monsieurs les Professeurs André Verbert et Pierre Sautière

Vous avez accepté d'analyser et de juger ce travail; je vous en suis très reconnaissant.

Je tiens particulièrement à remercier tout ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Je remercie la fondation Mérieux pour m'avoir soutenu pendant la durée de ce travail, et les membres du groupe Toxoplasme de Biomérieux pour leur intérêt et leurs conseils. CARACTERISATION BIOCHIMIQUE DES MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES DES ANTIGENES MAJEURS DE SURFACE DE *TOXOPLASMA GONDII*

.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	9
I- GENERALITES	11
I-1. HISTORIQUE	11
I-2. CYCLE BIOLOGIQUE	11
II- ORGANISATION MORPHOLOGIQUE DES ZOITES	12
III- INVASION DES CELLULES HOTES	13
III-1. Reconnaissance et attachement	13
III-2. Invasion	15
III-3. Installation dans la cellule hôte	16
IV- LA MOTILITE	17
IV-1. Interaction des zoïtes avec les hématies	17
IV-2. Interaction des zoïtes avec des ligands	18
IV-3. Les facteurs influençant la motilité	18
IV-3.1. Effet de la température	18
IV-3.2. Effet de la cytochalasine	19
IV-3.3. Relation existant entre la motilité, le capping et l'invasion:	
rôle de la pellicule parasitaire	19

V- CARACTERISATION DES MOLECULES DE SURFACE 21

2

	3
VI- GENERALITES SUR LA TOPOLOGIE DES PROTEINES SUPERFICIELLES	23
VII- PHOSPHORYLATIONS	26
VIII- PLAN DU TRAVAIL	27
MATERIELS ET METHODES	28
I- MATERIELS BIOLOGIQUES	29
I-1. ANIMAUX	29
I-2. TOXOPLASMES	29
I-2.1. Entretien des tachyzoïtes	29
I-2.2. Production massive de tachyzoïtes sur sarcome TG 180	29
I-3. CULTURES CELLULAIRES	30
I-3.1. Cellules hôtes utilisées pour la multiplication in vitro des	
toxoplasmes	30
I-3.2. Repiquage	30
I-3.3. Multiplication des toxoplasmes à partir de culture	
cellulaire	31
I-3.4. Isolement des tachyzoïtes à partir de cellules en culture	31
I-3.5. Isolement et purification des sporozoïtes d'Eimeria	
nieschulzi	32
I-3.6. Culture in vitro de Leishmania donovani	32
I-4. PRODUCTION DES ANTICORPS MONOCLONAUX	32
II- METHODES	33
II-1. RADIOIODATION DES PROTEINES SUPERFICIELLES PAR LA	
LACTOPEROXIDASE	33

II-2. MARQUAGES METABOLIQUES DES TACHYZOITES	
INTRACELLULAIRES	33
II-2.1. Utilisation d'acides aminés radiomarqués	33
II-2.2. Marquage court et chasse	34
II-2.3. Marquage long	34
II-2.4. Marquage par les acides gras	34
II-2.5. Les sucres	35
II-2.6. Ethanolamine	35
II-2.7. Phosphore-32	36
II-3. MARQUAGES METABOLIQUES DES TACHYZOITES	
EXTRACELLULAIRES	36
II-4. SOLUBILISATION DES PROTEINES CELLULAIRES ET	
PARASITAIRES	37
II-4.1. Solubilisation in situ des AMS de tachyzoïtes par des	
protéases	37
II-4.2. Traitement des tachyzoïtes par des phospholipases	37
II-4.2.1. Phosphatidylcholine phospholipase C (PLC)	37
II-4.2.2. Phosphatidylinositol phospholipase C (PI-PLC)	38
II-5. Extraction des protéines de surface des tachyzoïtes par des	
détergents	38
II-6. Sensibilité aux enzymes des protéines parasitaires solubilisées par	
un détergent	40
II-6.1. Traitement par la PIPLC	40
II-6.2. Traitement par la phosphatase alcaline	40
II-7. TECHNIQUES IMMUNOCHIMIQUES	41
II-7.1. Immunoprécipitations	41
II-7.1.1. Capture directe des immuncomplexes	41

II-7.1.2. Préparation d'immunoadsorbant par fixation	
d'immunoglobulines de lapin anti-souris sur la	
protéine A	4î
II-7.1.3. Préparation d'immunoadsorbant avec la sépharose	
4B-CNBR	42
II-7.1.4. Purification des antigènes radiomarqués par les	
immunoadsorbants	43
II-8. TECHNIQUE D'HYDROLYSE ACIDE DES PROTEINES	
RADIOMARQUEES	45
II-9. TECHNIQUES ELECTROPHORETIQUES	45
II-9.1. Analyse monodimensionnelle des protéines par	
électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS (SDS-PAGE).	45
II-9.2. Analyse bidimensionnelle des protéines par	
isoélectrofocalisation et SDS-PAGE	46
II-9.3. Electrophorèse des acides aminés phosphorylés	46
II-9.4. Détection des protéines ou acides aminés marqués après	
électrophorèse	47
II-9.4.1. Autoradiographie	47
II-9.4.2. Fluorographie	47
II-9.4.3. Détection des protéines par immunoélectrotransfert	
(Western Blotting)	48
II-9.4.4. Détection des protéines par coloration au nitrate	
d'argent	49
II-10. PURIFICATION PAR AFFINITE DE DEUX ANTIGENES MAJEURS DE	
SURFACE P43 ET P23	49
II-10.1. Immunoadsorption par chromatographie d'affinité	49
II-10.2. Electroélution	51
II-10.3. Production des sérums polyclonaux monospécifiques	51

	6
II-10.4. Contrôle de la spécificité des sérums immuns	51
RESULTATS	52
I- CARACTERISATION DES ANTIGENES DE SURFACE ET MARQUAGE	
RADIOACTIF METABOLIQUE DES TACHYZOITES INTRACELLULAIRES	53
I-1. Caractérisation immunochimique.	53
I-2. Marquage métabolique par les acides aminés tritiés	54
I-3. Acylation.	55
I-4. Incorporation d'éthanolamine	55
I-5. Incorporation de sucres radioactifs	55
I-6. Phosphorylation et identification des acides aminés	
phosphorylés	56
I-7. Essai de déphosphorylation enzymatique des AMS	57
II- PRODUCTION DES SERUMS MONOSPECIFIQUES ANTI-P43 & ANTI-P23	58
II-1. Purification des deux protéines	58
II-2. Caractéristiques des sérums polyclonaux monospécifiques	58
III- SENSIBILITE DES ANTIGENES DE SURFACE A LA PIPLC	59
III-1. Traitement des toxoplasmes vivants par la PIPLC	59
III-2. Comparaison de la migration électrophorétique des AMS traités	
et non traités à la PIPLC	60
III-3. Désacylation des antigènes majeurs de surface par la PIPLC	60
III-4. Mise en évidence de déterminants antigéniques communs sur les	
antigènes de surface	61
III-4.1. Réactivité des sérums polyclonaux anti-P43 vis à vis des	
antigènes de surface clivés par la PIPLC	61

III-4.2. Réactivité d'un sérum polyclonal anti-VSG de Trypanosome	
vis à vis des antigènes du toxoplasme	62
IV- ESSAI PRELIMINAIRE DE NEOSYNTHESE OU D'INVASION APRES CLIVAGE	
A LA PIPLC	62
IV-1. Cinétique de clivage des AMS	62
IV-2. Néosynthèse des AMS	63
IV-3. Essai préliminaire d'invasion après le clivage des AMS	63
DIGGUOGON	64
DISCUSSION	04
I- Caractérisation des antigènes majeurs de surface	65
II- Spécificité des anticorps polyclonaux anti-AMS	69
III- Etude de la maturation des AMS	69
IV- Mise en évidence d'un GPI-ancrage sur les AMS	71
V- Acylation	72
	17 A
VI- Incorporation d'ethanolamine dans les AMS	74
VII- Glycosylation	75
VIII- Phosphorylation	. 77

¢.

IX- Incorporation des métabolites radioactifs chez les tachyzoïtes	
extracellulaires	78
X- Réinvasion des cellules hôtes par des tachyzoïtes traités par la PIPLC $% \mathcal{A}$.	79
DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSIONS	81
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	85
PLANCHES	96

ABREVIATIONS

AMS: Antigènes Majeurs de Surface des tachyzoïtes CRD: Cross Reacting Determinant EDTA: Acide éthylène diamine tétraacétique GPI: Glycosyl-Phosphatidyl Inositol IEF: Isoélectrofocalisation NP-40: Nonidet P-40 PBS: tampon phosphate salin PIPLC: Phosphatidyl Inositol Phospholipase C PLC: Phospholipase C PLD: Phospholipase D PMSF: Phénylméthylsulfonyl fluoride

SDS: Sodium Dodécylsulfate

SDS-PAGE: Electrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS.

VSG: Glycoprotéine Variable de Surface de Trypanosome.

MOTS-CLES

TOXOPLASMA GONDII. MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES. ANTIGENES MAJEURS DE SURFACE. ANTICORPS MONOCLONAUX ET POLYCLONAUX. IMMUNOPRECIPITATIONS. ELECTROPHORESE MONO OU BIDIMENSIONNELLE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE.

INTRODUCTION

Au sein des protozoaires il existe un groupe d'organismes rassemblés dans le sous-embranchement des sporozoaires qui sont tous des parasites obligatoires et souvent intracellulaires. Ces parasites sont responsables de diverses affections humaines ou animales. Ainsi les *Plasmodium* et les *Toxoplasma* sont les agents du paludisme et de la toxoplasmose tandis que les *Eimeria* et les *Sarcocystis* sont responsables des coccidioses et des sarcosporidioses. A cause des retombées importantes pour la médecine humaine et vétérinaire, ces parasites sont l'objet de recherches actives visant à caractériser et isoler les antigènes intéressants pour le développement de nouvelles méthodes de diagnostic ainsi que pour la mise au point de vaccins. Mais cet intérêt pour les Sporozoaires concerne également les connaissances fondamentales sur le parasitisme car les mécanismes exacts de l'invasion des cellules cibles par ces parasites ainsi que les fonctions biologiques de leurs antigènes majeurs ne sont pas connus.

La toxoplasmose est une affection généralement asymptômatique chez les adultes mais elle est mortelle ou gravement débilitante chez les foetus ou les individus immunodéprimés tels que les patients atteints du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). La surface du stade infectieux (tachyzoïte) est une cible des défenses de l'hôte contre le parasite. Les antigènes de surface des tachyzoïtes présentent donc un intérêt important dans la lutte contre la toxoplasmose mais aussi dans la biologie du parasite. Pour ces raisons, plusieurs groupes de recherche ont entrepris la caractérisation des antigènes majeurs de surface (AMS) du tachyzoïte.

Notre travail a consisté en l'étude biochimique de ces antigènes depuis leur biosynthèse jusqu'à leur maturation et a en particulier permis de caractériser leur mode d'ancrage dans la pellicule parasitaire.

I- GENERALITES

1-1. HISTORIQUE

Le toxoplasme a été découvert chez un rongeur sauvage (*Ctenodactylus* gondi) en 1908 par Nicolle et Manceaux. Sa forme en "croissant" amena ces auteurs à le dénommer *Toxoplasma gondii* (du grec "toxon"=arc). C'est seulement vers 1965 que Hutchison découvrit que les formes infectieuses de *Toxoplasma* étaient transmises par le chat et son cycle biologique complet a été décrit par Work et Hutchison (1969), Hutchison *et al.* (1970) et Frenkel *et al.* (1970).

I-2. CYCLE BIOLOGIQUE

Le cycle évolutif (schéma 1) du toxoplasme peut être subdivisé en deux parties:

- un cycle direct se déroulant chez un félidé, en particulier le chat qui est l'hôte définitif.

- un cycle indirect chez divers vertébrés homéothermes représentant les hôtes intermédiaires.

Le cycle direct se déroule dans la muqueuse intestinale où une forme infectieuse (bradyzoïte ou sporozoïte) pénètre dans une cellule épithéliale de l'iléon puis subit plusieurs schizogonies produisant des mérozoïtes (multiplication asexuée). Ces mérozoïtes vont ensuite engendrer au cours de la gamétogenèse des microgamètes et des macrogamètes lesquels produiront un oocyste après fécondation (multiplication sexuée). Les oocystes sont excrétés dans le milieu extérieur et leur maturation produit deux sporocystes renfermant chacun 4 sporozoïtes. Cet oocyste sporulé très résistant aux agents physiques et chimiques peut être ingéré par le chat et dans ce cas les phases précédemment décrites se reproduiront, ou par un vertébré supérieur et le cycle indirect se développera. Chez l'hôte intermédiaire, les formes infectieuses (oocyste ou kyste tissulaire) issues d'un félidé ou d'autres hôtes intermédiaires sont ingérées et les parasites vont se multiplier par endogénèse dans les cellules des lignées réticulo-histocytaires et du tissu nerveux. Chez certains hôtes (tels que la souris) ou avec certaines souches particulièrement virulentes, la phase proliférative initiale (les tachyzoïtes) est rapidement mortelle: c'est la forme septicémique. Chez d'autres hôtes, au contraire, cette phase septicémique est transitoire, les formes végétatives vont disparaître et donner naissance à des kystes renfermant jusqu'à 1000 bradyzoïtes. Au laboratoire, la multiplication des tachyzoïtes peut être maintenue indéfiniment *in vitro* par infestation de tapis cellulaires avec des tachyzoïtes prélevés chez la souris.

Notre travail concerne uniquement la forme de dissémination du parasite qui est le tachyzoïte et en particulier l'organisation moléculaire des protéines majeures présentes à sa surface.

II- ORGANISATION MORPHOLOGIQUE DES ZOITES

Les études antérieures concernant les trois formes infectieuses du toxoplasme (tachyzoïte, bradyzoïte, sporozoïte) ont montré qu'elles ont la même organisation morphologique que les autres zoïtes des sporozoaires (Porchet-Hennere et Vivier, 1971). En effet, ces zoïtes sont des cellules hautement différenciées contenant à la fois des organites classiques (noyau, mitochondries, golgi, réticulum endoplasmique), et des organites très spécifiques (rhoptries, micronènes, conoïde, microtubules sous-pelliculaires) ainsi qu'une pellicule trimembranaire originale (schéma 2). Des études de cytologie ultrastructurale (Vivier et Petitprez, 1969) et de cryofracture (Porchet et Torpier, 1977; Dubremetz et Torpier, 1978) ont montré que cette pellicule est constituée d'un

plasmalemme continu doublé sur sa face interne par un complexe membranaire discontinu issu de la juxtaposition de vésicules aplaties comme le montre le schéma de reconstitution (schéma 3). De plus les observations en cryofracture du complexe membranaire interne ont montré un agencement spécial des particules intramembranaires. Ce complexe membranaire interne est interrompu au niveau de l'extrémité antérieure (ou apex) du zoïte où se trouve le conoïde délimité par les anneaux apicaux antérieurs et postérieurs. Un système de microtubules s'insère sur un anneau dense juxtaposé à l'interruption antérieure du complexe membranaire interne (schéma 4). Ces microtubules sont disposés à intervalles réguliers contre la face interne de la pellicule et ils s'étendent d'avant en arrière sur les deux tiers de la longueur du zoïte (schéma 5).

III- INVASION DES CELLULES HOTES

Tous les stades de multiplication du toxoplasme (tachyzoïte, bradyzoïte et sporozoïte) se développent obligatoirement à l'intérieur d'une cellule hôte capable d'assurer leur croissance. L'invasion de la cellule par les sporozoaires est classiquement subdivisée en 3 étapes successives:

- Reconnaissance et attachement du parasite à la cellule hôte
- Formation de la jonction mobile et pénétration
- Installation dans la cellule hôte

III-1. Reconnaissance et attachement

L'initiation de l'invasion est réalisée par un contact entre la cellule hôte et le parasite. Le mécanisme régissant l'établissement du contact initial varie d'une espèce à l'autre.

- Chez les coccidies, les zoïtes sont capables d'infester presque tous les types de cellules *in vitro* et ne semblent pas exiger une spécificité étroite de reconnaissance. C'est le cas de *Toxoplasma gondii, Eimeria, Sarcocystis* et *Besnoitia*.

- Chez d'autres sporozoaires (les Hémosporidies et les Piroplasmes) la spécificité d'interaction est extrêmement étroite. L'exemple le mieux étudié est le *Plasmodium falciparum* qui n'envahit que les globules rouges humains, de chimpanzé et de quelques primates. Dans ce cas, il existe une interaction spécifique entre les récepteurs et les ligands superficiels des plasmalemmes du parasite et de l'hématie.

A- Les ligands érythrocytaires

Certaines des protéines de surface des hématies sont impliquées dans l'invasion par les *Plasmodium*; il semble que les ligands diffèrent entre les espèces. Ainsi l'antigène Duffy semble jouer un rôle pour *P. knowlesi* (Miller et al., 1975) alors que pour *Plasmodium falciparum*, l'attention des chercheurs a été surtout retenue par les glycophorines (Pasvol et al., 1982; Perkins 1981, Deas et Lee, 1981; Ridgwell et al., 1983; Jungery et al., 1983; Schulman et al., 1984). Par ailleurs, la bande 3 est probablement impliquée à la fois pour *P. knowlesi* et *P. falciparum* (revue par Mitchell et Bannister, 1988).

B- Les récepteurs parasitaires

L'identification d'antigènes parasitaires capables de se fixer aux ligands érythrocytaires a été réalisée par Perkins (1984), Camus et Hadley (1985), Miller

et al., (1988). Les mérozoïtes du Plasmodium pourraient donc utiliser ces antigènes de surface pour s'attacher aux globules rouges en n'importe quelle position; puis une réorientation met en contact la partie apicale du parasite et la membrane de l'hématie (Dvorak *et al.*, 1975; Aïkawa *et al.*, 1978).

Contrairement aux *Plasmodium*, l'attachement du toxoplasme aux cellules hôtes ne montre pas une reconnaissance à spécificité stricte à cause de la variété des types cellulaires qu'il est capable d'infecter expérimentalement. Mais nous ne pouvons exclure une reconnaissance par les protéines superficielles du toxoplasme de structures oligosaccharidiques ou lectiniques ubiquistes de la surface des cellules hôtes. De plus Fuhrman *et al.*, (1989) viennent de montrer que la laminine augmente l'attachement des toxoplasmes aux cellules et l'infectivité. Cette molécule se lierait spécifiquement à des protéines de surface de 60 et 67 kDa des tachyzoïtes et ce processus pourrait être assimilé à une reconnaissance par récepteur. Quel que soit le type de reconnaissance responsable du contact initial, la poursuite de l'interaction avec la cellule hôte, caractérisée par l'invasion proprement dite est comparable chez tous les sporozoaires.

III-2. Invasion

L'invasion commence par le contact entre l'apex du parasite et le plasmalemme de la cellule hôte. Il s'établit alors une petite dépression dans le plasmalemme de la cellule hôte et un épaississement au point de contact entre l'apex du parasite et la cellule. Ceci a été décrit la première fois chez *Plasmodium knowlesi* par Aikawa *et al.*, (1978). Cette jonction a été également décrite chez *Toxoplasma* (Michel *et al.*, 1979; Dubremetz, 1981; Porchet-Hennere et Torpier, 1983), chez *Babesia* (Rudzinska *et al.*, 1976), Sarcocystis (Dubremetz, 1981; Entzeroth, 1985). Cette jonction est au début une calotte sphérique puis un anneau qui coulisse le long du parasite et l'englobe progressivement lors de la pénétration. Sa progression antéro-postérieure conduit à l'isolement du parasite dans une vacuole parasitophore et la cryofracture a permis de montrer que la membrane de cette vacuole est très différente du plasmalemme de la cellule hôte (Aikawa, 1978). L'origine morphologique et moléculaire de la vacuole parasitophore n'est pas encore connue. La membrane de la cellule hôte et les produits d'exocytose provenant des organites du complexe apical sont probablement impliqués dans l'invasion et dans l'établissement de cette vacuole. Ces organites apicaux qui sont les rhoptries et les micronènes, pourraient ajouter des composants membranaires, libérer des protéases ou phospholipides qui modifieraient la membrane de la cellule cible.

III-3. Installation dans la cellule hôte

La fin de l'invasion est déterminée par un pincement et la fermeture de la vacuole qui en se séparant du plasmalemme de la cellule hôte, isole le parasite dans la vacuole parasitophore. Après cette invasion, les granules denses du parasite viennent s'attacher à la pellicule dans la région antérieure et déversent leur contenu dans la vacuole parasitophore par exocytose (Entzeroth, 1984; 1985; Entzeroth *et al.*, 1986; Cesbron *et al.*, 1989; Leriche, 1989; Torii *et al.*, 1989). Sibley *et al.*, (1988) décrivent l'exocytose des granules denses et des antigènes majeurs de surface vers un réseau tubulovésiculaire localisé dans la vacuole. Ces mêmes auteurs suggèrent que ces formations sont impliquées dans le mécanisme de défense du parasite envers son hôte ou dans l'augmentation de la surface d'échanges avec le milieu environnant.

IV- LA MOTILITE

Pendant le temps bref que les sporozoaires passent en milieu extracellulaire, des observations au microscope révèlent qu'ils sont doués de mouvements. L'interaction des zoïtes avec des cellules ou divers substrats a permis d'observer le caractère superficiel de la motilité des parasites et de décrire deux types de mouvements: le glissement sur le substrat d'une part et la flexion d'autre part. Les mouvements de glissement des zoïtes se terminent parfois en position redressée sur leur extrémité postérieure qui reste en contact avec le support. Dans ce cas ils peuvent pivoter sur eux-même et réaliser des rotations complètes.

Russel et Sinden (1981) ont décrit la motilité par glissement comme une translocation d'avant en arrière c'est à dire qu'il existe une polarité. Cette polarité antéro-postérieure est mise en évidence par plusieurs types d'interactions :

IV-1. Interaction des zoïtes avec les hématies

Les sporozoïtes d'*Eimeria nieschulzi* incubés avec des hématies sont capables de déplacer ces dernières le long de leur corps vers l'extrémité postérieure. Le contact entre le zoïte et le globule rouge pouvant s'établir soit par la partie antérieure, soit par un point quelconque de la pellicule (Dubremetz, 1981). Ce phénomène a une vitesse comparable à celle du mouvement par glissement. Cette vitesse est généralement comprise entre 1 et 10 µm/s. Par exemples, les sporozoïtes d'*Eimeria*, de *Plasmodium*, et les trophozoïtes de *Gregarina* se déplacent à des vitesses respectives de 4-8 µm/s (Russel et Sinden, 1981), de 1-2 µm/s (Vanderberg, 1974) et de 1-10 µm/s (King, 1988).

IV-2. Interaction des zoïtes avec des ligands

L'incubation des parasites avec de la ferritine cationisée (Dubremetz et Ferreira, 1978), des billes de latex ou des anticorps spécifiques conduit dans un premier temps à un marquage uniforme du plasmalemme. Ce marquage peut subir une redistribution (formation d'une "cape") sur l'extrémité postérieure du zoïte. Ce phénomène connu sous le nom de "capping" peut être assimilé à la motilité par glissement, caractéristique de ces organismes. L'utilisation de sérums multivalents a permis d'observer le "capping" chez *Toxoplasma gondii* (Dzbenski et Zielinska, 1976; Dzbenski *et al.*, 1976) et chez les sporozoïtes de *Plasmodium* (Cochrane *et al.*, 1976). Ces premières expériences montraient que les sérums polyclonaux spécifiques et le deuxième conjugué spécifique des anticorps du sérum étaient nécessaires pour observer le "capping" mais récemment ce phénomène a été induit à l'aide d'un anticorps monoclonal spécifique d'un antigène de surface des sporozoïtes d'*Eimeria nieschulzi* (Tomavo *et al.*, 1989).

IV-3. Les facteurs influençant la motilité

IV-3.1. Effet de la température

La motilité des zoïtes est sous la dépendance de la température. En effet, elle se déroule normalement à 37°C et est fortement ralentie ou inexistante à 20°C ou 4°C. Le réchauffement des zoïtes incubés à 4°C fait redémarrer le mouvement des parasites viables.

IV-3.2. Effet de la cytochalasine

La motilité antéro-postérieure, le capping, et l'invasion sont inhibés par les phénothiazines et les cytochalasines B (Schwartzman et Pfefferkorn, 1983) et D (Ryning et Remington, 1978), drogues qui provoquent une perturbation dans le réseau microfilamenteux suggérant ainsi l'implication probable de l'actine dans les mouvements des zoïtes. Par ailleurs l'actine (Endo *et al.*, 1988; Yasuda *et al.*, 1988) mais aussi la myosine (Schwartzman et Pfefferkorn, 1983) ont été localisées chez le toxoplasme. Ces auteurs proposent alors une interaction actine-myosine comme le moteur de la motilité.

> IV-3.3. Relation existant entre la motilité, le capping et l'invasion: rôle de la pellicule parasitaire

Tous les inhibiteurs de la motilité (basse température, cytochalasine) entravent l'invasion (Sinden, 1985) mais également le "capping". Il semble donc que la motilité, le "capping" et l'invasion pourraient être dirigé par un système commun. Plusieurs hypothèses ont alors été évoquées pour expliquer les mécanismes dirigeant ces trois éléments importants de la physiologie du parasite:

1. La démonstration par Sheetz et Spudich (1983) que la myosine recouverte ("coatée") par des billes de latex peut induire une translocation unidirectionnelle des filaments d'actine constitue un modèle possible d'explication de la motilité par glissement. L'énergie indispensable pour l'interaction actinemyosine est fournie par l'ATP. La critique portée à l'égard de ce modèle est basée sur la résistance de la membrane plasmique au mécanisme fonctionnant par un glissement antéro-postérieur des ligands lors du "capping". Mais la bicouche lipidique des membranes avec sa nature fluide pourrait supporter le fonctionnement de ce mécanisme.

2. Russel et Sinden (1981) ont aussi proposé un système contractile basé sur les microfilaments du cytosquelette sous-pelliculaire. Chez tous les stades mobiles des sporozoaires le cytosquelette sous-pelliculaire montre un alignement des microtubules selon l'axe antéro-postérieur (décrit dans le chapitre II). L'orientation antéro-postérieure du mouvement des zoïtes coïncide avec celle des microtubules sous-pelliculaires et des alignements de particules du complexe membranaire interne. Ces éléments structuraux pourraient servir de guide ou d'axe de référence au mécanisme et à l'orientation du mouvement des zoïtes.

3. L'homologie mécanique est évidente entre la motilité par glissement et la pénétration dans la cellule hôte. De plus, Aikawa *et al.* (1981) ont montré que les inhibiteurs de la motilité ou du "capping" étaient capables d'inhiber l'invasion même si l'initiation de la jonction mobile est réalisée et que des vésicules apparaissent dans le cytoplasme de la cellule hôte. King (1988) propose que le contact initial s'établissant entre les molécules de surface du parasite et de la cellule hôte provoquerait un flux local qui pourrait être responsable du déclenchement de la dynamique du glissement ou du "capping" et donc de l'invasion. Mais la différence entre le mouvement par glissement et l'invasion est que le premier se fait par la jonction du zoïte à un substrat donc un seul site de contact suffit alors que le second nécessite l'existence de plusieurs sites ou d'un anneau permettant aux parasites de coulisser dans la cellule hôte.

Notons que les mécanismes réels de la motilité, du "capping" et de l'invasion restent à élucider mais quel que soit le système impliqué il apparaît d'une part que la pellicule avec ses composants moléculaires et d'autre part que le cytosquelette sous-pelliculaire sont les supports structuraux et fonctionnels importants dans la biologie du parasite.

V- CARACTERISATION DES MOLECULES DE SURFACE

Handman et al., (1980) ont été les premiers à identifier les protéines majeures des tachyzoïtes de Toxoplasma gondii accessibles à l'iodination enzymatique par immunoprécipitation à l'aide d'anticorps monoclonaux et de sérums immuns. Leurs travaux ont conclu à l'existence de 4 antigènes majeurs de surface de masse moléculaire apparente 43, 35, 27 et 14 kDa. Avec la même méthodologie, Kasper et al., (1982, 1983) ont obtenu des anticorps monoclonaux spécifiques d'antigènes majeurs de 22 et 30 kDa. La comparaison des différents travaux sur les antigènes de surface ne permettait pas une corrélation précise entre les antigènes superficiels décrits. L'obtention d'anticorps monoclonaux spécifiques de tous les antigènes majeurs de surface a permis à Couvreur et al., (1988) de réaliser une étude comparative de leurs migrations électrophorétiques en SDS-PAGE et de préciser que les 4 antigènes majeurs ont respectivement pour poids moléculaires apparents 41, 35, 32, et 21 kDa lorsque l'électrophorèse est réalisée en conditions réductrices. En conditions non réductrices ces protéines de surface ont respectivement pour poids moléculaires 38, 31, 31, et 21 kDa. Un cinquième antigène de surface faiblement iodable de poids moléculaire 23 kDa a été également identifié. Les 4 antigènes majeurs sont désignés par P43, P35, P30, P22. Cette nomenclature fondée sur les masses moléculaires mesurées lors des premières descriptions est la plus généralement admise.

Les deux protéines P30 & P22 ont été l'objet de nombreux travaux visant à la mise au point de réactifs de diagnostic ou à des applications vaccinales. Ces travaux ont également apporté des informations sur la biologie du parasite. La protéine P30 a été purifiée par affinité (Kasper et al., 1983) et elle a été utilisée dans des essais de protection chez des souris (Kasper et al., 1985). La même équipe a obtenu des mutants viables dépourvus de la P22 ou de l'épitope P30 reconnu par un anticorps monoclonal anti P30 en utilisant des techniques de mutagenèse chimique (Kasper et al. 1982, Kasper, 1987). Les travaux de Johnson et al., (1983) ont montré que l'injection intrapéritonéale d'un anticorps monoclonal réputé spécifique de l'antigène de surface P35 à des souris, entraîne une protection significative contre la toxoplasmose induite par T. gondii virulent, mais compte tenu des résultats de Couvreur et al. (1988) démontrant que les protéines P35 & P30 présentent une migration électrophorétique identique en conditions non réductrices, il est difficile de savoir avec quelle molécule ces auteurs ont travaillé. Cesbron et al. (1985) ainsi que Santoro et al. (1985) ont montré que les sérums des patients souffrant de toxoplasmose évolutive et chronique contiennent respectivement des anticorps IgM et IgG capables de se fixer sur la protéine P30 purifiée par affinité. Dubremetz et al. (1985) ont analysé l'interaction de l'anticorps monoclonal anti-P30 avec la surface des tachyzoïtes lors de l'invasion tandis que Sibley et al. (1986, 1988) ont montré que la P30 ainsi que les autres antigènes de surface sont retrouvés dans le réseau tubulovésiculaire qui forme l'interface entre la cellule hôte et le parasite intravacuolaire. La formation de ce réseau intravacuolaire implique la redistribution des antigènes à la surface du parasite. Récemment Burg et al. (1988) ont séquencé le gène de la protéine de surface P30.

Jusqu'à présent les études biochimiques mentionnées ont conduit à l'identification des antigènes majeurs de surface. Il n'existe actuellement aucune information précise dans la littérature sur la synthèse protéique de ces antigènes et les modifications post-traductionnelles éventuelles conduisant à leur maturation. Des résultats très sommaires et contradictoires indiquent que ces antigènes pourraient porter des motifs glycanniques sur la copule protéique

(Handman *et al.*, 1980; Johnson *et al.*, 1981; Mauras *et al.*, 1980). D'autre part, hormis les travaux de Kasper *et al.*, (1983) qui concluaient que la protéine P30 est une protéine membranaire intégrale parce qu'elle a un comportement électrophorétique particulier (charge-shift electrophoresis) dû à la présence d'une région hydrophobe, la caractérisation biochimique des interactions moléculaires de ces protéines de surface avec la pellicule n'a jamais été l'objet de recherches approfondies. Le but de notre travail a donc été d'étudier les modifications post-traductionnelles que subissent ces protéines et d'essayer d'identifier leur mode d'insertion dans la pellicule.

VI- GENERALITES SUR LA TOPOLOGIE DES PROTEINES SUPERFICIELLES

Bien que la pellicule des tachyzoïtes soit complexe, les trois couches successives qui la constituent répondent chacune à la définition cytologique d'une membrane biologique c'est à dire une bicouche lipidique à laquelle sont associées des protéines. L'ancrage des protéines membranaires se fait selon plusieurs mécanismes:

1- une portion substantielle de la protéine est insérée dans la bicouche lipidique : c'est le cas pour la rhodopsine (Capaldi, 1982).

2- deux domaines hydrophiles de la protéine membranaire peuvent être reliés par un domaine transmembranaire hydrophobe: c'est l'exemple du récepteur de la lipoprotéine LDL (Südhof *et al.*, 1985).

3- des protéines membranaires sont liées covalemment à un acide gras de la bicouche lipidique (acylation directe). Deux types différents sont rencontrés:

* le glycocolle à l'extrémité N-terminale est lié à un acide myristique par une liaison amide: NADH-cytochrome b5 réductase (Ozols *et al.*, 1984)

* l'acide aminé en position N-terminale peut être la cystéine et dans ce cas la liaison avec l'acide gras (palmitique ou myristique) est un thioester: c'est le cas pour la lipoprotéine d'*Escherichia coli* (Hantke & Braun, 1973).

4- contrairement aux deux premiers cas d'acylation directe, il existe une acylation indirecte où c'est l'acide aminé en position C-terminale qui est impliqué dans la liaison covalente avec un résidu éthanolamine-phosphate. Ce dernier est relié à une structure complexe comprenant un motif glycannique qui est attaché covalemment à une molécule de phosphatidylinositol laquelle est liée à un diacylglycérol se trouvant dans la bicouche membranaire (schéma 6, voir au verso). De nombreuses molécules membranaires portent un complexe glycosylphosphatidylinositol (GPI). Quelques exemples de ces molécules sont résumés dans le tableau (ci-contre) en fonction de leurs rôles biologiques.

Ce tableau ne représente qu'un résumé simplifié des molécules ancrées par le GPI. Des informations plus détaillées sont rassemblées dans deux revues générales publiées par Low (1987) et Ferguson & Williams (1988).

L'acide aminé C-terminal impliqué dans la liaison avec le GPI varie d'une molécule à l'autre sans qu'une règle générale puisse être définie. Ces protéines sont d'abord synthétisées avec une séquence C-terminale d'environ 20 à 30 résidus supplémentaires, de caractère hydrophobe, qui est clivée et remplacée par la structure d'ancrage glycolipidique (Boothroyd *et al.*, 1980; Berger *et al.*, 1988; Caras *et al.*, 1989^{a,b}). Les études de la bicsynthèse du glycolipide montrent que le transfert du motif d'ancrage sur la protéine VSG de trypanosome est extrêmement rapide (moins d'une minute), ce qui suggère l'existence d'un glycophospholipide préformé qui serait rajouté en bloc (Bangs *et al.*, 1985; Ferguson *et al.*, 1986).

La caractéristique des molécules GPI ancrées est en règle générale leur sensibilité à la phospholipase C spécifique du phosphatidylinositol (PIPLC) qui

les détache de la cellule sans altérer la membrane (schéma 6). Le premier travail concernant cette enzyme a été rapporté par Slein et al. (1960) et montre qu'un facteur soluble extrait d'une préparation de toxine de Bacilius anthracis injecté dans un animal induit l'augmentation prononcée et rapide de l'ATPase du sérum. Ce facteur a été partiellement purifié chez Bacillus cereus et dénommé PIPLC (Slein et al., 1963, 1965). Ikezawa et al., (1976) ont repris les travaux de Slein et confirmé les résultats précédemment obtenus sur Bacillus cereus en purifiant totalement la PIPLC. La même enzyme a été isolée chez Clostridium novyi (Taguchi et Ikezawa, 1978), chez Bacillus thuringiensis (Taguchi et al., 1980) chez Staphylococcus aureus (Low, 1981). Quelle que soit son origine, cette enzyme est capable d'hydrolyser l'ATPase sérique. Depuis lors, il a été montré par plusieurs équipes que d'autres protéines membranaires d'origines diverses sont sensibles à ces PIPLC bactériennes. Des PIPLC d'origines eucaryotiques (Trypanosoma brucei et cellules hépatiques) ont également été isolées par Fox et al. (1986, 1987). Le gène de la PIPLC de Trypanosoma brucei a été simultanément séquencé par Hereld et al. (1988) et Carrington et al. (1989). La séquence primaire de la PIPLC de trypanosome ne présente aucune homologie avec celle des cellules de mammifère (Suh et al., 1988). D'autres auteurs ont montré que chez le trypanosome, cette lipase est localisée dans la poche flagellaire du parasite (Grab et al., 1987). Elle pourrait donc intervenir dans le recyclage de la glycoprotéine variable de surface (VSG) qui est la protéine majeure de surface GPI-ancrée de ce protozoaire responsable de la maladie du sommeil.

De manière concomittante à l'hydrolyse des protéines GPI-ancrées, la PIPLC a la propriété de rendre accessible aux anticorps trois épitopes situés à proximité du site d'ancrage. Ces épitopes sont appelés "des déterminants communs" parce qu'ils sont responsables d'une réactivité croisée (CRD, crossreacting determinant) qui peut être homologue ou hétérologue. La réactivité homologue signifie par exemple qu'un sérum polyclonal spécifique de la forme

soluble de la VSG de trypanosome (clivée par la PIPLC) peut reconnaître les VSG sur d'autres souches de trypanosome (Cross, 1979; Cardoso de Almeida et Turner, 1983). Le même sérum anti-CRD de trypanosome peut aussi reconnaître des protéines GPI-ancrées de cellules eucaryotes telles que la protéine Gp 63 de la *Leishmania* (Bordier *et al.*, 1986), les antigènes de surface de *Paramecium* (Capdeville *et al.*, 1986), et le DAF (Davitz et al., 1987^a). Dans ce cas, il s'agit d'une réactivité croisée hétérologue. Zamze *et al.* (1988) ont montré que la séquence oligosaccharidique est toujours impliquée dans la réactivité des trois épitopes CRD se trouvant à l'extrémité C-terminale de la protéine GPI-ancrée.

Il existe également une phospholipase D (GPI-PLD; schéma 6) capable d'hydrolyser des protéines GPI-ancrées en éliminant le groupement diacylglycérol-phosphate-inositol (Davitz *et al.*, 1987^b; Low et Prasad, 1988^a). D'origine sérique cette enzyme est active uniquement sur les protéines membranaires solubilisées et elle est par conséquent incapable de décrocher les protéines de surface.

VII- PHOSPHORYLATIONS

La phosphorylation des protéines joue un rôle crucial dans la régulation de diverses fonctions physiologiques chez les cellules en croissance, en prolifération ou en différenciation. Les sites potentiels de phosphorylation dans une protéine sont les fonctions alcools des résidus de sérine/thréonine/tyrosine ou les résidus amines des acides aminés basiques (lysine, histidine ou arginine) et la phosphorylation est réalisée par l'intermédiaire de différentes kinases. En dehors de la présence des acides aminés phosphorylés dans les protéines, l'existence de mannoses phosphorylés dans les motifs glycanniques des enzymes lysosomiaux a été décrite par Kornfeld et Kornfeld (1985). Cette phosphorylation

phosphotransférase (réaction I) et N-acétylglucosamine-1-phosphodiester-a-Nacétylglucosaminidase (réaction II) au niveau du cis-golgi. La première enzyme transfère le groupe N-acétylglucosamine 1-phosphate de l'UDP-GlcNAc sur le mannose et la deuxième enlève le N-acétylglucosamine en exposant donc le groupement phosphomannosyl qui est le ligand physiologique du récepteur lysosomial. L'ensemble des réactions se déroule au cours de la maturation et de l'orientation des N-glycoprotéines vers le compartiment lysosomial.

Un troisième exemple de sites phosphorylés, découvert par l'étude de la structure primaire du complexe GPI (VSG et THY-1: Homans *et al.*, 1988) montre l'existence d'inositol-phosphate et d'éthanolamine-phosphate. Les kinases qui sont impliquées dans la phosphorylation de ces deux dernières molécules de la structure GPI ne sont pas connues.

VIII- PLAN DU TRAVAIL

Notre travail a consisté en l'étude des modifications co- ou posttraductionnelles des antigènes de surface du toxoplasme. Nous avons mis en évidence l'incorporation métabolique de monosaccharides, d'acides gras, d'éthanolamine, et de phosphate radioactifs dans ces antigènes puis démontré qu'ils sont ancrés par une structure glycosyl-phosphatidylinositol dans la pellicule parasitaire.

MATERIELS ET METHODES

I- MATERIELS BIOLOGIQUES

I-1. ANIMAUX

Pour l'entretien régulier et la production massive des toxoplasmes nous avons utilisé des souris Swiss. La production des sérums polyclonaux monospécifiques a été réalisée chez des lapins (hybrides Néozélandais-Californiens issus d'un élevage local).

I-2. TOXOPLASMES

I-2.1. Entretien des tachyzoïtes

Les tachyzoïtes utilisés proviennent de la souche virulente RH (Sabin, 1941). Cette souche RH est entretenue par passage bihebdomadaire chez la souris Swiss: 2.10⁶ tachyzoïtes en suspension dans du DMEM (Milieu de Eagle modifié par Dulbecco, SEROMED) sont injectés par voie intrapéritonéale aux animaux. Au bout de trois jours, les souris infectées sont tuées par dislocation des vertèbres cervicales et après une incision de la peau du ventre les parasites sont récupérés dans 5 ml de DMEM par lavage intrapéritonéal.

I-2 2. Production massive de tachyzoïtes sur sarcome TG 180

Une suspension de 12.10⁶ toxoplasmes et 10⁷ cellules de sarcome TG 180 est injectée aux souris (Couzineau et Beaufine-Ducrocq, 1969), ce qui permet d'obtenir entre 2.10⁸ et 10⁹ toxoplasmes par souris après 72 heures. Lorsque les toxoplasmes produits sont utilisés pour le passage en souris ou pour une infestation en culture cellulaire ils sont dilués dans du DMEM. Pour usage biochimique ils sont lavés 3 fois par du PBS puis récupérés par centrifugation à 600 g pendant 10 min avant d'être conservés à -20°C.

I-3. CULTURES CELLULAIRES

I-3.1. Cellules hôtes utilisées pour la multiplication *in vitro* des toxoplasmes

Nous avons utilisé des cellules Hela qui dérivent de la première lignée cellulaire épithéliale humaine établie à partir d'un cancer utérin. Des cellules Véro (singe vert africain) ont été également utilisées. Les cellules stockées dans l'azote liquide sont décongelées et mises en culture dans des boîtes plastiques de 25 ou 75 cm² contenant du milieu DMEM additionné de 5% de sérum de veau.

I-3.2. Repiquage

Une hotte à flux laminaire stérile et la proximité de la flamme d'un bec Bunsen sont indispensables pour les manipulations de culture. Le matériel utilisé est stérilisé à la chaleur sèche (1 heure à 160°C) ou à l'autoclave (20 min à 120°C). Les milieux sont stérilisés par autoclavage ou par ultrafiltration. La culture de cellules confluentes est décollée par une solution de trypsine (Difco 1:250, 0,5%), et d'EDTA (0,1%) en solution saline de Puck (Gibco, BRL). Le liquide est ensuite éliminé, les cellules sont détachées par chocs mécaniques et reprises immédiatement par du DMEM additionné de 5% de sérum de veau foetal, de glutamine (4 mM) et d'antibiotiques (Penicilline 50 U/ml-Streptomycine 50 µg/ml) puis de nouvelles boîtes sont ensemencées (type Falcon, Nunclon). Les boîtes sont placées dans une atmosphère contenant 5% de CO2 dans l'air.

I-3.3. Multiplication des toxoplasmes à partir de culture cellulaire

Les tachyzoïtes se développent en culture *in vitro*, sur des cellules Hela ou Véro. Une boîte de 75 cm² de cellules confluentes est inoculée par 6.10^7 tachyzoïtes d'ascite de souris. Vingt quatre heures plus tard, les cellules sont remplies de zoïtes qui seront ensuite libérés dans le milieu de culture par éclatement des cellules hôtes. Dans certains cas, nous utilisons des boîtes de 25 cm² et l'infestation est alors réalisée avec 2.10^7 tachyzoïtes.

Il existe aussi un système de production massive des tachyzoïtes en culture *in vitro* par infestation de bouteilles d'un litre couvertes sur leur face interne d'une monocouche confluente de cellules Véro avec 3.10⁷ tachyzoïtes.

I-3.4. Isolement des tachyzoïtes à partir de cellules en culture

Une boîte de 75 cm² confluente infestée par 6.10^7 tachyzoïtes 24 heures auparavant est raclée à l'aide d'un grattoir de caoutchouc dans le milieu de culture. La suspension ainsi obtenue est passée en homogénéiseur de Dounce pour libérer les parasites par action mécanique. La solution peut renfermer 3 à 4.10^8 zoïtes qui sont filtrés sur colonne de fibres de verre (Grimwood *et al.*, 1979). Le filtrat contenant les zoïtes purifiés est centrifugé à 600 g pendant 10 min, et lavé 2 fois au PBS. Cette méthode permet d'obtenir des suspensions de tachyzoïtes généralement dépourvues de contaminants cellulaires à l'observation au microscope optique. I-3.5. Isolement et purification des sporozoïtes d'Eimeria nieschulzi

Les sporozoïtes d'*Eimeria nieschulzi* de rat nous ont été fournis par le Docteur Entzeroth R. (Université de Bonn, RFA) qui les a purifiés à partir d'oocystes sporulés et excystés par un traitement enzymatique libérant les zoïtes. Ces derniers sont séparés des débris cytoplasmiques et des coques d'oocystes et de sporocystes par passage sur une colonne de fibres de nylon. Les sporozoïtes ainsi purifiés sont repris dans du PBS et marqués par iodation de surface (Tomavo *et al.*, 1989).

I-3.6. Culture in vitro de Leishmania donovani

Les promastigotes nous ont été fournis par le Docteur Ouaïssi A. (Laboratoire d'Immunologie et Parasitologie, Inserm U 167, Lille). Nous avons réalisé l'entretien de ces parasites par repiquage tous les 3 jours d'une culture en phase exponentielle dans un milieu HANK'S à 26°C. Ensuite, toutes les expériences avec les promastigotes (lavages, iodation de surface, traitement enzymatique) sont réalisées en solution saline de Puck.

I-4. PRODUCTION DES ANTICORPS MONOCLONAUX

La production d'anticorps monoclonaux a été réalisée par Couvreur et al. (1988) selon la technique de Khöler et Milstein (1975) au laboratoire. Le clonage des hybridomes positifs a permis d'obtenir plusieurs clones spécifiques des antigènes majeurs de surface.

Nous avons utilisé les anticorps monoclonaux $T_4 \ 1F_{12}1F_7$, $3F_{12}1D_7$, $1E_51D_3$, $2E_{12}2D_4$, $3G_{11}1G_{10}$ respectivement spécifiques des protéines de surface P43, P35, P30, P23, P22.

II- METHODES

II-1. RADIOIODATION DES PROTEINES SUPERFICIELLES PAR LA LACTOPEROXIDASE

Nous avons utilisé la méthode d'iodation superficielle décrite par Marchalonis *et al.* (1971). 10⁸ tachyzoïtes intracellulaires purifiés sont suspendus dans 200 µl de PBS. Cette suspension parasitaire est amenée successivement à:

-	Iodure de potassium (KI)	1,25	μМ
_	Eau oxygénée	. 40	μМ
-	Lactoperoxidase (EC 1.11.1.7; Sigma 93 U/mg)	5µg	/ml
	Iodure de sodium (Na 1251, carrier free,		

Amersham 3,7.10<9> Bq/ml) 10 µl/ml

La durée du marquage est de 10 min à 4°C sous agitation ménagée par intermittence. La réaction est arrêtée par addition de KI froid en amenant à une concentration finale de 1,25 mM et par 3 lavages rapides en PBS des zoïtes iodés.

II-2. MARQUAGES METABOLIQUES DES TACHYZOITES INTRACELLULAIRES

II-2.1. Utilisation d'acides aminés radiomarqués

Des essais préliminaires de marquage avec des acides aminés ont été réalisés avec de la méthionine marquée au soufre radioactif (Amersham L-³⁵S-méthionine, activité spécifique > 800 Ci/mmol), de l'isoleucine tritiée (Amersham L-4,5-³Hisoleucine, activité spécifique 80-120 Ci/mmol), de la leucine tritiée (CEA, L-3,4,5-³H-leucine, activité spécifique 40 Ci/mmol), ou un mélange de cinq acides aminés
tritiés (L-4,5-³H-leucine,140 Ci/mmol; L-4,5-³H-lysine, 80 Ci/mmol; L-2,3,4,5,6-³Hphénylalanine, 106 Ci/mmol; L-2,3,4,5-³H-proline,100 Ci/mmol; L-2,3,4,5,6-³Htyrosine, 110 Ci/mmol. Amersham 37 MBq/ml).

II-2.2. Marquage court et chasse

Deux boîtes de 25 cm² contenant des cellules Véro confluentes sont chacune infestées par 2.10⁷ tachyzoïtes. Vingt quatre heures plus tard, la culture est lavée avec 5 ml de milieu RPMI (Gibco Selectamine Kit) dépourvu des cinq acides aminés contenus dans le mélange; ensuite 100 µCi du mélange d'acides aminés sont introduits par boîte à une concentration de 20 µCi/ml. Le marquage est arrêté 20 minutes après, par prélèvement du milieu radioactif puis l'une des deux boîtes est congelée tandis que du milieu froid est remis dans la deuxième. Le temps de chasse est d'une heure. Les deux milieux de marquage sont rassemblés et utilisés pour un marquage long.

II-2.3. Marquage long

La même procédure de marquage que celle décrite ci-dessus est utilisée mais nous avons utilisé dans ce cas des boîtes de 75 cm² infestées par 6.10⁷ tachyzoïtes et le temps de marquage est de 6 heures.

II-2.4. Marquage par les acides gras

Deux boîtes de 75 cm² contenant des cellules Véro infestées vingt quatre heures plus tôt par 6.10^7 toxoplasmes sont lavées par du DMEM sans sérum. 500 µl d'acide palmitique (Amersham, (9-10 (n)³H) acide palmitique,40-60 Ci/mmol) ou d'acide myristique (Amersham, (9-10 (n)³H) acide myristique, 40-60 Ci/mmol) sont séchés à l'azote pour éliminer le toluène dans lequel ils sont conservés. Le matériel sec est repris par 200 µl d'éthanol Normapur (95%) et introduit sur la culture de parasite à la concentration finale de 25 µCi/ml. Le marquage dure 6 heures et après élimination du milieu radioactif les parasites sont purifiés comme nous l'avons décrit dans la sectior. I-3.4.

II-2.5. Les sucres

500 µl de glucosamine (Amersham, D-(6-³H) chlorhydrate de glucosamine,20-40 Ci/mmol), de mannose (Amersham, D-(2-³H) Mannose, 10-20 Ci/mmol), ou de galactose (Amersham,D-(6-³H) Galactose,20-40 Ci/mmol) sont ajoutés à 10 ml de milieu RPMI dépourvu de glucose mais supplémenté avec 22 mM de pyruvate de sodium. Ces milieux sont introduits sur des boîtes de culture parasitées de 75 cm^2 à la concentration finale de 50 µCi/ml. La durée du marquage est de 4 heures et les tachyzoïtes sont également purifiés en fin de marquage.

II-2.6. Ethanolamine

500 µl d'éthanolamine (Amersham, chlorhydrate $(1^{-3}H)$ ethan-1-ol-2 amine, 5-30 Ci/mmol) sont additionnés à 20 ml de milieu DMEM contenant 2% de sérum de veau foetal dialysé et 2% de glutamine. La concentration finale en éthanolamine radioactive est de 25 µCi/ml. Le marquage a été réalisé pendant 18 heures sur une boîte de cellules Véro de 75 cm² parasitée. Les tachyzoïtes ont également été purifiés après marquage.

II-2.7. Phosphore-32

Il est indispensable de disposer de portoirs et d'écrans en plexiglass pour toutes les manipulations du phosphore-32.

Une boîte de cellules Véro (75 cm²) infestée 24 heures auparavant avec 6.10⁷ tachyzoïtes est lavée avec du milieu RPMI dépourvu de phosphate (Na2HPO4 étant remplacé par NaCl). Le marquage est réalisé par addition de 500 µCi d'orthophosphate (Amersham, 1 mCi/ml) dans le même milieu pendant 6 heures à 37°C. A la fin du marquage le milieu est éliminé et les cellules parasitées sont cette fois-ci directement solubilisées par un détergent.

II-3. MARQUAGES METABOLIQUES DES TACHYZOITES EXTRACELLULAIRES

Les zoïtes intracellulaires sont purifiés comme nous l'avons décrit au chapitre I-3.4. Des tachyzoïtes (10⁸ zoïtes) ainsi purifiés sont lavés par les milieux de marquage identiques à ceux utilisés pour les marquages de parasites intracellulaires, puis incubés avec 100 µCi d'un mélange d'acides aminés ou de l'acide palmitique ou du glucosamine tritiés, ou du phosphore-32. Les marquages sont réalisés pendant 1 heure à 37°C. La viabilité des parasites est vérifiée par le test au bleu de trypan suivi de l'observation au microscope optique. Après un lavage au PBS les parasites sont lysés par détergent et le lysat est soit immunoprécipité par les anticorps monoclonaux anti-surface puis analyzé par SDS-PAGE soit utilisé pour le comptage de la radioactivité acido-précipitable en scintillation liquide.

II-4. SOLUBILISATION DES PROTEINES CELLULAIRES ET PARASITAIRES

II-4.1. Solubilisation *in situ* des AMS de tachyzoïtes par des protéases

10⁸ tachyzoïtes iodés ou froids sont incubés avec plusieurs enzymes protéolytiques de spécificités connues telles que la trypsine (traitée TPCK, EC 3.4.21.4; Sigma), la chymotrypsine (traitée TLCK, EC 3.4.21.1; Sigma), et la papaïne (EC 3.4.22.2; Boehringer) aux concentrations de 10 et 100 µg/ml.

Les incubations sont réalisées en PBS à 37°C pendant 1 heure pour la trypsine et la chymotrypsine ou 10 minutes pour la papaïne. Les réactions sont arrêtées par addition d'inhibiteurs:

- sérum humain 10% pour la trypsine

- PMSF 2 mM quand il s'agit de la chymotrypsine

- antipaïne 0,1 mg/ml pour la papaïne

Les parasites sont ensuite lavés deux fois au PBS. La viabilité des tachyzoïtes est vérifiée par le bleu de trypan.

II-4.2. Traitement des tachyzoïtes par des phospholipases

II-4.2.1. Phosphatidylcholine phospholipase C (PLC)

Nous avons utilisé l'enzyme de type III de *Bacillus Cereus* EC 3.1.4.3 (192 U/mg de protéine) possédant les spécifités lécithinase C et phosphatidylcholine phosphohydrolase.

Des tachyzoïtes purifiés (5.10⁷) sont incubés avec 50 µg/ml ou 500 µg/ml de PLC dans du PBS à 37°C pendant 1 heure. Après deux lavages au PBS la viabilité des tachyzoïtes est également vérifiée au bleu de trypan. II-4.2.2. Phosphatidylinositol phospholipase C (PI-PLC)

Cette lipase de spécificité phosphatidylinositol, purifiée à partir de *Bacillus thuringiensis* nous a été fournie par le Dr Martin Low (Columbia University, New York, USA), et le Dr Geneviève Rougon (UA 202 CNRS, Institut de Chimie Biologique, Marseille, FRANCE). Cette enzyme est actuellement commercialisée par Immunotech. Nous avons récemment utilisé la PIPLC de *Bacillus Cereus* (Boehringer) qui donne également des résultats satisfaisants.

Des tachyzoïtes iodés (25.10⁶) sont incubés à 37°C pendant 1 heure avec 2 UI/ml de PI-PLC dans du PBS contenant du dithiothréitol (10 mM). L'intégrité des parasites est vérifiée par leur incapacité à prendre le bleu de trypan et l'observation en microscopie photonique. Après une centrifugation à 10000 g pendant 30 minutes le surnageant d'incubation est séparé du culot parasitaire qui est lavé deux fois au PBS.

Nous avons également traité des promastigotes de *Leishmania donovani* et des sporozoïtes d'*Eimeria nieschulzi* iodés dans les mêmes conditions expérimentales que les toxoplasmes.

II-5. Extraction des protéines de surface des tachyzoïtes par des détergents

Nous avons utilisé quatre méthodes d'extraction:

* par le tampon de Laemmli (1970): 62,5 mM Tris.HCl pH 6,8 contenant 10% saccharose, 2% SDS, bleu de bromophénol et avec ou sans 0,1 M dithiotréitol pour l'analyse du profil total des antigènes de surface. C'est le cas après solubilisation avec les protéases et les phospholipases pour l'identification des protéines analysées par électrophorèse en SDS-PAGE suivie d'électrotransfert sur nitrocellulose. L'extraction se fait par chauffage à 95°C pendant 5 minutes.

* par un tampon PBS contenant 1% Nonidet-P40, 2 mM d'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA), 0,01 mg/ml leupeptine, 1 mM phénylméthylsulfonyl fluoride (PMSF) et 0,1 mg/ml aprotinine. Ce type de solubilisation a été utilisé pour les tachyzoïtes marqués par l'iode, les sucres, les acides gras, l'éthanolamine tritiée et le phosphore-32. Après agitation rotative à 4°C pendant 1 heure et centrifugation à 10000 g, 30 minutes, les différents lysats ont servi à l'immunoprécipitation par les anticorps monoclonaux.

* par un tampon 10 mM Tris.HCl pH 8 contenant 1 mM EDTA, 150 mM NaCl (NET), 1% SDS, 1% Triton X-100 et 1% Déoxycholate de sodium. C'est cette méthode qui nous a donné les meilleurs résultats pour l'immunoprécipitation des tachyzoïtes marqués par les acides aminés. En pratique, les toxoplasmes radioactifs sont repris dans 400 µl de NET auquel sont additionnés successivement 100 µl de 10% SDS, puis 500 µl de NET contenant 2% Triton X-100, 2% Déoxycholate, et les mêmes inhibiteurs d'enzymes que ceux décrits dans le paragraphe précédent. L'extraction dure 30 minutes à température ambiante par agitation de 15 secondes au vortex toutes les 5 minutes. Le lysat est séparé de la fraction insoluble par centrifugation à 13000 g, 5 minutes. Pour les immunoprécipitations la concentration du SDS est ramenée à 0,5%.

* par la méthode d'Erickson et Blobel (1979) qui consiste à solubiliser les tachyzoïtes radiomarqués par du 0,1 M Tris.HCl pH 7,4 contenant 1,2% SDS, 0,2 M NaCl, 4 mM EDTA, 0,2 mg/ml aprotinine, 10 µg/ml leupeptine. Le lysat est chauffé à 95°C pendant 10 minutes puis refroidi à température ambiante avant d'être ramené à 0,5% SDS, 2,5% Triton X-100 pour les immunoprécipitations. II-6. Sensibilité aux enzymes des protéines parasitaires solubilisées par un détergent

II-6.1. Traitement par la PIPLC

2.10⁸ tachyzoïtes intracellulaires marqués avec de l'acide palmitique tritié sont purifiés et lysés par du Nonidet P-40 comme décrit ci-dessus. La moitié de ce lysat est incubée avec la PIPLC à 37°C pendant 16 heures tandis que la deuxième moitié est incubée dans les mêmes conditions expérimentales mais sans PIPLC. Ensuite les deux échantillons traités sont immunoprécipités par tous les anticorps monoclonaux anti-surface puis analysés par SDS-PAGE.

II-6.2. Traitement par la phosphatase alcaline

Un lysat parasitaire NP-40 de tachyzoïtes marqués au phosphore-32 ou non radioactif est mis en contact avec différentes concentrations de phosphatase alcaline dans 100 mM Tris.HCl pH 8 contenant 50 mM MgCl2 et 0,1% de ZnCl2 pendant 16 heures à 37°C. Nous avons utilisé deux sources d'enzymes:

- phosphatase alcaline d'origine bactérienne (E. coli Type III EC 3.1.3.1. No P-4252, Sigma).

- phosphatase alcaline d'origine bovine (Boehringer).

Les échantillons traités sont soit analysés par immunoprécipitation soit par immunoempreinte après une électrophorèse SDS-PAGE ou bidimensionnelle.

Des immuncomplexes anticorps monoclonaux-antigènes superficiels correspondants réalisés par immunoprécipitations ont également été traités par les phosphatases alcalines dans les mêmes conditions que ci-dessus avant d'être élués puis analysés par électrophorèse mono ou bidimensionnelle.

II-7. TECHNIQUES IMMUNOCHIMIQUES

II-7.1. Immunoprécipitations

Trois procédures d'immunoadsorption ont été utilisées:

II-7.1.1. Capture directe des immuncomplexes

20 µl de protéine A-sépharose 4B (Pharmacia) préalablement gonflée dans du PBS sont utilisés pour adsorber les immuncomplexes réalisés à partir des sérums de lapins immuns.

II-7.1.2. Préparation d'immunoadsorbant par fixationd'immunoglobulines de lapin anti-souris sur la protéine-A(Staphyloccocus aureus)

460 mg de protéine A-sépharose CL-4B commerciale (Pharmacia) sont mis à gonfler dans 9 ml de PBS pendant 1 heure à température ambiante. Après centrifugation (200 g; 10 min), le surnageant est éliminé et les billes sont incubées pendant une nuit à 4°C avec 1,6 ml de sérum de lapin antiimmunoglobulines de souris (RAM: Anti-mouse IgG H + L, Miles Scientific) dans un volume final de 10 ml en PBS. L'adsorption est achevée par élimination du surnageant après centrifugation et deux lavages au PBS. Le gel est resuspendu à une dilution au 1/5^{ème} en PBS et cette matrice protéine A-IgG anti souris sera utilisée ultérieurement pour précipiter les immuncomplexes. II-7.1.3. Préparation d'immunoadsorbant avec la sépharose 4B-CNBR

Elle nécessite la purification des immunoglobulines à partir des ascites de souris selon la technique de Saint Blancard *et al.* (1982):

* Chromatographie d'exclusion sur gel

3 ml d'ascite centrifugée à 2000 g pendant 15 minutes ou filtrée sont déposés sur une colonne GF 05 de dimensions 12 cm x 1 cm². L'équilibration de la colonne avant son utilisation ainsi que l'élution des protéines de l'ascite sont réalisées avec du tampon 25 mM Tris-HCl, 35 mM NaCl à pH 8,8. Le premier pic d'absorption à 280 nm contient les protéines.

* Chromatographie d'échange d'ions

Les protéines éluées de la colonne GF 05 (équivalent de 3 fois le volume d'ascite déposé) sont passées sur une colonne DEAE-Trisacryl (Industrie Biologique Française) 12 cm x 1 cm². Les immunoglobulines sont éluées par le tampon 25 mM Tris-HCl, 35 mM NaCl à pH 8,8. Une fraction aliquote de l'éluat est analysée en gel de polyacrylamide SDS-PAGE dans des conditions réductrices pour vérifier la pureté des immunoglobulines. L'éluat est ensuite dialysé et concentré dans une cuve microprodicon (Bicblock) contre du PBS à 4°C pendant 48 heures dans un premier temps, puis contre du tampon bicarbonate salé (0,1 M NaHCO3 pH 8,6 contenant du 0,5 M NaCl). L'estimation de la quantité d'immunoglobuline purifiée est faite par mesure spectrophotométrique (densité optique à 280 nm).

* Couplage des immunoglobulines purifiées

10 mg d'anticorps monoclonal purifié contenus dans 5 ml de tampon bicarbonate sont mis en contact avec 300 mg de gel sépharose 4 B activé par le bromure de cyanogène, préalablement gonflé dans une solution 1 mM HCl et lavé par du tampon bicarbonate. La suspension est mise en agitation rotative pendant 2 heures à température ambiante ou une nuit à 4°C. L'excès de protéines non couplées est éliminé par lavage dans du tampon 100 mM Tris-HCl pH 8 puis les sites actifs libres du gel sont hydrolysés par ce même tampon à température ambiante pendant 2 heures. Le gel subit ensuite 3 lavages alternés dans un tampon acétate de sodium 0,1 M à pH 4 contenant 0,5 M NaCl et dans le tampon bicarbonate de couplage. Après lavage dans du PBS, l'immunoadsorbant ainsi préparé est dilué au 1/5^{ème} dans du PBS.

II-7.1.4. Purification des antigènes radiomarqués par les immunoadsorbants.

* Utilisation des immunoadsorbants protéine A-IgG de lapin antisouris

Elle nécessite la formation préalable d'immuncomplexes réalisés par l'incubation de 20 μ l d'ascite monoclonale avec le lysat détergent parasitaire radioactif pendant 4 heures à température ambiante ou une noit à 4°C. La quantité de lysat radioactif utilisée dépend du métabolite qui a servi pour le marquage des tachyzoïtes. Pour les marquages avec l'iode nous utilisons 100 000 cpm de lysat acido-précipitable pour 20 μ l d'anticorps monoclonal, tandis que 5.10⁶ cpm sont nécessaires pour les marquages par les acides aminés et le

43

phosphore, enfin nous prenons 1 à 2.10^6 cpm pour les marquages acides gras, éthanolamine, sucres.

Les immuncomplexes formés sont captés par 20 µl d'immunoadsorbant pendant 2 heures à température ambiante ou une nuit à 4°C.

* Utilisation des immunoadsorbants covalents

Dans ce cas la purification des antigènes radiomarqués se fait par incubation directe du lysat radioactif avec le gel. Les volumes de gel et les quantités de lysat radioactif que nous avons utilisés sont identiques à ceux décrits ci-dessus.

* Lavages et élutions des immuncomplexes ou des antigènes

Après la formation des immuncomplexes, les gels sont lavés par différents tampons:

- 3 lavages avec du tampon 50 mM Tris.HCl pH 8,3 contenant 1% NaCl,
0,5% NP-40 pour les immunoprécipitations avec du matériel iodé ou phosphorylé.

- 2 lavages avec du tampon 50 mM Tris.HCl pH 7,4 contenant 0,5% SDS, 100 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2,5% Triton puis 3 lavages par le précédent tampon pour les marquages avec les acides aminés.

- 3 lavages avec du 50 mM Tris.HCl pH 8,3 contenant 0,5% NaCl , 0,5% NP-40 , 1 mg/ml de sérum albumine bovine (SAB), 1 mM EDTA puis 2 lavages par le même tampon sans NaCl et SAB pour les acides gras ou sucres tritiés.

Tous les immuncomplexes sont lavés par du 5 mM Tris.HCl pH 6,8 puis élués en tampon Laemmli par chauffage à 95°C pendant 5 minutes.

II-8. TECHNIQUE D'HYDROLYSE ACIDE DES PROTEINES RADIOMARQUEES

Les antigènes de surface radiomarqués et purifiés par chromatographie d'affinité sont précipités par le chloroforme/méthanol (2v/1v) à froid et lavés deux fois par le même milieu organique pour éliminer les contaminants lipidiques adsorbés sur ces protéines. Les précipités sont ensuite séchés par centrifugation sous vide (Speed Vac) et repris dans l'acide chlorhydrique 5,6 N puis hydrolysés à 105°C sous vide pendant 2 heures. Les hydrolysats sont séchés comme décrit ci-dessus et repris dans du HCl centimolaire.

II-9. TECHNIQUES ELECTROPHORETIQUES

II-9.1. Analyse monodimensionnelle des protéines par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS (SDS-PAGE).

L'analyse électrophorétique des protéines de tachyzoïtes est effectuée selon la technique décrite par Laemmli (1970). Un gel de séparation de 12% en acrylamide dans un tampon Tris.HCl 375 mM pH 8,8 contenant 0,1% de SDS, est préparé à partir d'une solution mère de 30% acrylamide et 0,8% bis acrylamide. Le gel de concentration de 5% est préparé dans un tampon Tris.HCl 125 mM pH 6,8 contenant 0,1% de SDS.

Les échantillons sont repris dans du tampon Tris.HCl 62,5 mM contenant 2% SDS, 10% saccharose, 0,2% de bleu de bromophénol et selon les cas avec ou sans dithiothréitol (0,1 M). La séparation électrophorétique est réalisée par un courant électrique d'une intensité de 4 mA par plaque pendant la nuit. II-9.2. Analyse bidimensionnelle des protéines par isoélectrofocalisation et SDS-PAGE.

L'électrophorèse bidimensionnelle est réalisée selon la technique décrite par O'Ferrel (1975).

La première dimension est une isoélectrofocalisation où les protéines sont séparées dans un gel d'acrylamide à 4% contenant 9,5 M urée, 2% NP-40, 1,8% d'ampholytes pH 5-7 et 0,2% d'ampholyte pH 3,5-10 (Servalyt). Le gradient de pH est établi par une électrophorèse préliminaire à 200 V pendant 15 minutes, 300 V pendant 30 min, puis 400 V pendant 30 min. Les échantillons sont déposés dans le tampon utilisé pour préparer le gel mais additionné de 0,3% de SDS et l'électrophorèse est réalisée à 400 V pendant 18 heures puis terminée sous une tension de 800 V pendant 1 heure.

L'électrophorèse dans la deuxième dimension est un SDS-PAGE comme décrit ci-dessus.

II-9.3. Electrophorèse des acides aminés phosphorylés

Les hydrolysats acides sont déposés au milieu d'une plaque de silice (silica gel 60, Merck) de dimension 15,5cm x 10 cm. Des marqueurs témoins tels que la phosphosérine, phosphothréonine, phosphotyrosine à une concentration de 10 μ g/ml chacuns sont ajoutés à l'hydrolysat et déposés sur la plaque. L'électrophorèse se fait sur une cuve réfrigérée (LKB, multiphor) dans un tampon acide formique (98%)/ acide acétique / eau (1v/3,5v/35v) pH 1,9 pendant 3 heures à 400 volts. Les témoins sont colorés à la ninhydrine puis la plaque est autoradiographiée. Dans le cas d'hydrolyse de protéines tritiées, la plaque est soit découpées cm² par cm² et la radioactivité est mesurée au compteur Beta après addition d'un liquide scintillant, soit vaporisée à l'EnHance puis fluorographiée.

II-9.4. Détection des protéines ou acides aminés marqués après électrophorèse

II-9.4.1. Autoradiographie

Pour les échantillons marqués à l'iode et au phosphore, les gels d'acrylamide colorés au bleu de Coomassie R-250 (Merck) 0,02% dans 10% d'acide acétique et 25% d'isopropanol, puis décolorés dans 10% d'acide acétique sont séchés par évaporation sur un papier Whatman N°3 à l'aide d'un appareil de séchage (LKB). La visualisation est faite par révélation après exposition directe à -70°C des gels secs à un film X-OMAT AR Kodak entre 2 écrans renforçateurs (Dupont Cronex plus).

En ce qui concerne les acides aminés phosphorylés, la plaque de silice est séchée au sèche cheveux puis autoradiographiée comme les gels d'acrylamide.

II-9.4.2. Fluorographie

La détection des échantillons radiomarqués au tritium ou au soufre est réalisée par traitement des gels d'acrylamide ou des plaques de silice avec un agent scintillant (EnHance, NEN) pour pallier le faible pouvoir pénétrant des particules émises. Les gels sont ensuite exposés contre un film comme ci-dessus. II-9.4.3. Détection des protéines par immunoélectrotransfert (Western Blotting)

Un extrait détergent de toxoplasme est soumis à une électrophorèse en SDS-PAGE, puis transféré électriquement sur une feuille de nitrocellulose (Schleicher & Schuell, Céra-Labo) à l'aide d'un appareil de transfert semi-sec (LKB). Pour cette opération, le gel d'acrylamide et la feuille de nitrocellulose sont pris en sandwich entre 12 feuilles de Whatman N°3 imbibées d'une solution de transfert composée de 48 mM Tris pH 8,9 contenant 39 mM glycine, 0,0375% SDS, 20% méthanol. Le transfert est réalisé pendant 1 heure à ampérage constant (0,8 mA/cm²).

Après le transfert la feuille de nitrocellulose est colorée au rouge ponceau (0,2% dans TCA 3%) et décolorée à l'eau.

La révélation immunochimique consiste après une saturation d'une demi heure dans du lait gloria à 5% dans du tampon TNT (15 mM Tris.HCl pH 8 contenant du 140 mM NaCl et 0,05% Tween 20), à incuber la feuille de nitrocellulose avec une sonde monoclonale ou polyclonale pendant 1 heure dans le même tampon à température ambiante. Après 3 lavages successifs , la membrane est incubée dans les mêmes conditions avec une dilution d'immunoglobulines marquées à la phosphatase alcaline (Proméga) ou à la peroxydase (Sigma) spécifiques du premier anticorps. Une dernière série de lavages est réalisée puis la révélation est effectuée au Nitro blue tétrazolium/5bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (NTB/BCIP, Proméga) lorsque le marqueur du deuxième anticorps est la phosphatase alcaline. Le révélateur est le 3,3' diaminobenzidine (Sigma) quand le marqueur du deuxième anticorps est la peroxydase.

II-9.4.4. Détection des protéines par coloration au nitrate d'argent.

Après l'électrophorèse, les protéines séparées sont visualisées par coloration du gel d'acrylamide au nitrate d'argent selon la méthode de Morrissey (1981). Le gel est traité successivement pendant 30 minutes par les fixateurs suivants:

- méthanol distillé 50% et acide acétique pur 10%.

- méthanol 5% et acide acétique 10%.

- glutaraldéhyde 10%

Ensuite le gel est rincé abondamment par au moins deux litres d'eau pendant 2 à 3 heures. Les protéines sont réduites par du dithiothréitol (5 µg/ml) puis le gel est trempé dans une solution de nitrate d'argent 0,1%. Après un rapide lavage à l'eau, la coloration est développée par du carbonate de sodium 3% contenant du formaldéhyde 0,018%. La coloration est arrêtée par de l'acide citrique 2,3 M pendant 10 minutes et le gel est lavé plusieurs fois à l'eau puis séché.

II-10. PURIFICATION PAR AFFINITE DE DEUX ANTIGENES MAJEURS DE SURFACE P43 ET P23.

II-10.1. Immunoadsorption par chromatographie d'affinité

Les immunoglobulines des anticorps monoclonaux $(T_4 \ 1F_{12}, \ T_4 \ 2E_{12})$ spécifiques des antigènes de surface P43 et 23 sont purifiées par chromatographie d'échanges d'ions après dessalage comme décrit dans le paragraphe II-7.1.3. Nous avons préparé 10 ml d'immunoadsorbant pour chaque ascite purifiée et les deux colonnes d'affinité ont été montées en série. Au cours de la purification nous avons utilisé plusieurs tampons:

* tampon A: Tris.HCl 50 mM pH 8,3

NaCl 150 mM

NP-40 0,5%

EDTA 2 mM

* tampon B: Tris.HCl 50 mM pH 8,3

NaCl 150 mM

NP-40 0,5%

EDTA 2 mM

Aprotinine 0,1 mg/ml

PMSF 1 mM

* tampon C: Tris.HCl 50 mM pH 8,3 NaCl 1 M NP-40 0,5%

* tampon D: Tris.HCl 50 mM pH 8,3 Déoxycholate de Na (DOC) 0,5%

* tampon E: Diéthylamine.HCl 0,1 M pH 11,5 DOC 0,1%

200 ml d'un lysat parasitaire de 25.10⁹ zoïtes (lyse effectuée avec le tampon B) ont été passés sur les colonnes pré-équilibrées par le tampon A, pendant 24 heures avec recyclage. Les colonnes sont ensuite lavées par 300 ml de tampon C puis avec 50 ml du même tampon sans NaCl et enfin par 50 ml de tampon D. Ce dernier lavage est terminé à température ambiante et les colonnes sont éluées séparément par 2,5 volumes de tampon E. Les éluats sont directement dialysés et concentrés sous vide dans une cuve microprodicon.

II-10.2. Electroélution

Les éluats dialysés et concentrés sont déposés dans un gel d'acrylamide préparatif. Après électrophorèse, les antigènes P43 et P23 sont localisés par rapport aux marqueurs protéiques puis découpés. Ils sont électroélués du gel dans une cuve ISCO (ISCO electroelution cup, ISCO Inc, Lincoln, Ne 68 505) à une puissance constante de 3 watts pendant 3 heures.

La pureté de l'électroéluat est vérifiée en électrophorèse SDS-PAGE et coloration au nitrate d'argent.

II-10.3. Production des sérums polyclonaux monospécifiques

Après trois cycles de purification, les protéines P43 et P23 ont servi à immuniser deux lapins par injection sous cutanée selon la technique de Vaitukaitis *et al.*, (1971) en injections séparées chacunes par 4 semaines. Les sérums immuns ont été collectés 2 semaines après la dernière immunisation.

II-10.4. Contrôle de la spécificité des sérums immuns

Les deux sérums ont été testés par l'immunoempreinte d'antigènes toux de tachyzoïtes transférés sur nitrocellulose, par immunoprécipitations de tachyzoïtes iodés superficiellement et par immunofluorescence indirecte sur des tachyzoïtes fixés sur lame.

RESULTATS

I- CARACTERISATION DES ANTIGENES DE SURFACE ET MARQUAGE RADIOACTIF METABOLIQUE DES TACHYZOITES INTRACELLULAIRES

I-1. Caractérisation immunochimique.

Les cinq anticorps monoclonaux utilisés permettent d'identifier individuellement les AMS du tachyzoïte à partir de zoïtes superficiellement iodés et sur immunoempreinte (Couvreur *et al.* 1988). La comigration des protéines P30 et P35 en SDS-PAGE non réductrice est confirmée.

Nous montrons par immunoempreinte après électrophorèse monodimensionnelle que les protéines P23 et P22 constituent chacune une famille de molécules distinctes donnant respectivement 5 bandes protéiques (Pl. I: fig. A, pistes 4 & 6), et 3 bandes protéiques (pistes 5 & 7). L'antigène majeur P30 bien qu'étant formé d'une seule bande protéique dans ces conditions expérimentales (piste 3) se présente parfois sous la forme d'un doublet protéique (Pl. III: fig. B, piste 2). Les protéines P43 et P35 apparaissent toujours comme une bande protéique unique (Pl. I, fig. A, pistes 1, 2).

L'analyse d'un lysat de tachyzoïtes iodés superficiellement par électrophorèse bidimensionnelle permet d'identifier facilement la protéine P43 qui présente nettement 3 isoformes distinctes de pHi (6,23; 6,3 et 6,5: Pl. II, fig. A). Les deux dernières isoformes produisent un signal plus intense aussi bien après radioiodation qu'après immunoempreinte bidimensionnelle révélée avec l'anticorps monoclonal $1F_{12}$ (Pl. II, fig. B). Toutefois l'anticorps monoclonal anti-P43 révèle également deux autres isoformes à pHi 6,2 et 6,55 sur l'immunoempreinte. Malgré la faible intensité de l'isoforme à pHi 6,55, l'iodation superficielle et la révélation de l'immunoempreinte par l'anticorps monoclonal montre que la protéine P43 possède 5 isoformes distinctes. Alors que l'identification dans le lysat total de la protéine P43 iodée est aisée, celle des quatre autres AMS est difficile à cause de la complexité et la multiplicité des spots dans la région 30-35 kDa, de la comigration de la P30 & P35, et de la proximité des protéines P22 & P23. Mais grâce, à une double révélation de l'immunoempreinte bidimensionnelle utilisant la phosphatase alcaline pour les anticorps monoclonaux spécifiques des protéines P43, P30 & P22 et la peroxydase pour les protéines P35 & P23, nous avons pu localiser les différentes molécules. La protéine P30 se présente sous la forme d'un complexe de 6 spots répartis en 3 doublets de pHi 6,5; 6,75 et 6,95 tandis que la P35 montre une isoforme distincte et unique de pHi 5,9 (Pl. II, fig. B). Sur cette même figure la protéine P22 est séparée en deux isoformes de pHi 6,15 et 6,6 tandis que la protéine P23 forme une tache diffuse surplombant l'isoforme à pHi 6,15 de la P22. Ces résultats d'immunoempreinte permettent donc de localiser en électrophorèse bidimensionnelle, les cinq protéines majeures de surface des tachyzoïtes superficiellement iodés comme l'indique les flèches (Pl. II, fig. A).

I-2. Marquage métabolique par les acides aminés tritiés.

La figure B (Pl. I) correspond à l'incorporation des acides aminés tritiés dans les protéines du tachyzoïte. Les anticorps monoclonaux immunoprécipitent les protéines P43, P35, P30, P22, et P23 dans ce lysat parasitaire tritié (pistes 2, 3, 4, 5 et 6). Lorsque nous réalisons un marquage court suivi de chasse, les immunoprécipitations montrent que les protéines P43 et P30 biosynthétisées au cours du marquage court (Pl. I, fig. C, pistes 1 & 4) comigrent avec celles de la chasse (pistes 2 & 5) et du marquage long (pistes 3 & 6). La protéine P23 marquée pendant 20 minutes montre un précurseur correspondant à la première bande protéique inférieure de la famille (piste 7) et les autres bandes supérieures de la famille apparaissent pendant la chasse (piste 8). La cinétique de biosynthèse de la protéine P35 est identique à celle des protéines P43 & P30

54

tandis que la famille protéique P22 présente une biosynthèse similaire à la protéine P23.

I-3. Acylation.

L'incubation des tachyzoïtes intracellulaires avec de l'acide palmitique tritié (Pl. III, piste 1) ou de l'acide myristique tritié (Pl. III, piste 6) montre que les parasites incorporent ces deux acides gras dans un grand nombre de protéines. Les immunoprécipitations réalisées sur ces deux lysats à l'aide des anticorps monoclonaux anti-surface révèlent que les tachyzoïtes incorporent dans les 5 antigènes majeurs de surface de l'acide palmitique (les pistes 2, 3, 4, 5, et 12 correspondent respectivement aux protéines P30, P43, P35, P22, et P23 kDa) et de l'acide myristique (pistes 7, 8, 9, 10, 11). Les signaux radioactifs obtenus sont plus intenses pour l'acide palmitique.

I-4. Incorporation d'éthanolamine.

Quand les tachyzoïtes intracellulaires sont cultivés en présence d'éthanolamine tritiée les protéines de surface P43, P30, P22, P23 sont radiomarquées (Pl. III, fig.B, pistes 1, 2, 3 et 4). Ce fluorogramme est obtenu après deux mois d'exposition. Dans nos conditions expérimentales nous n'observons pas de marquage pour la protéine P35.

I-5. Incorporation de sucres radioactifs

Quand les zoïtes intracellulaires sont cultivés en présence de glucosamine, de mannose, ou de galactose tritiés, un grand nombre de protéines radioactives sont retrouvées dans les profils électrophorétiques totaux (Pl. IV, pistes 1, 6 & 11) montrant que les parasites incorporent les trois sucres. Les anticorps monoclonaux ont permis d'identifier dans les trois lysats, les antigènes majeurs de surface. Les pistes 2, 3, 4, 5, 16 correspondent aux protéines P3O, P43, P35, P22 et P23 radiomarquées par la glucosamine tritiée. Les protéines ayant incorporé le mannose sont analysées sur les pistes 7, 8, 9, 10, et 18 tandis que les immunoprécipitations correspondant au marquage avec du galactose sont déposées dans les pistes 12, 13, 14, 15, et 17. Le profil total ainsi que les immunoprécipitations montrent une très forte incorporation de la glucosamine par rapport aux deux autres sucres. La protéine P23 se caractérise par une incorporation particulièrement abondante de glucosamine (piste 16).

Afin d'identifier les structures glycanniques portées par les AMS nous les avons traités par l'endoglucosidase F (Boehringer) qui est capable d'éliminer les N-glycannes. Nous avons également réalisé des marquages métaboliques (utilisation d'acides aminés tritiés) en présence de la tunicamycine. Toutes ces tentatives de mise en évidence directe ou indirecte de N-glycannes se sont avérées infructueuses. Enfin, le traitement des AMS par l'acide trifluorométhane sulfonique (TFMS) qui est un agent chimique de déglycosylation des glycoprotéines (Edge *et al.*, 1981) nous a posé des problèmes de resolubilisation des protéines traitées. Nous n'avons donc pas réussi à les analyser en SDS-PAGE.

I-6. Phosphorylation et identification des acides aminés phosphorylés.

Les tachyzoïtes intracellulaires sont cultivés en présence d'orthophosphate radioactif (³²P), puis les cinq antigènes de surface radiomarqués sont immunoprécipités par les anticorps monoclonaux (Pl. V, fig. A: les pistes 1, 2, 3, 4 et 5 correspondent respectivement aux protéines P43, P35, P30, P23, et P22). Les protéines P30 et P22 (pistes 3 & 5) sont nettement plus phosphorylées que les trois autres antigènes pour lesquels un signal n'apparaît qu'après un long temps d'exposition. L'analyse en électrophorèse bidimensionnelle des éluats d'immunoprécipitation montre que la protéine P43 possède 3 isoformes (pHi 6,3; 6,5; 6,55) phosphorylées dont la plus intense est l'isoforme à pHi 6,5 (Pl. V, fig. B). L'analyse de la protéine P30 dans les mêm-3 conditions expérimentales montre que ses deux isoformes à pHi 6,75 et 6,95 sont également phosphorylées (Pl. V, fig. C). En ce qui concerne la protéine P22 c'est l'isoforme à pHi 6,15 qui est la plus phosphorylée.

Après un long temps d'exposition, l'autoradiogramme de la figure A (Pl. V) révèle des bandes contaminantes dans les pistes 3 et 5 correspondant aux protéines P30 & P22 phosphorylées. Nous avons donc repurifié ces molécules par électroélution après immunoprécipitation et séparation électrophorétique avant d'entreprendre l'analyse des phosphoaminoacides. La pureté des électroéluats est contrôlée par électrophorèse et le reste est traité comme nous l'avons indiqué dans le paragraphe II-8. L'autoradiographie de l'électrophorèse sur plaque de silice des protéines P30 et P22 hydrolysées, montre dans les deux cas une tache majeure comigrant avec le témoin phosphosérine et une tache plus faible au niveau de la phosphothréonine (Pl. V, fig. D, pistes 1 et 2). La même autoradiographie montre une bande radioactive migrant à l'opposé des acides aminés phosphorylés. La nature de cette molécule sera discutée plus loin.

I-7. Essai de déphosphorylation enzymatique des AMS

Le traitement par la phosphatase alcaline des protéines de surface P43, P30, P22 phosphorylées montre une diminution importante du signal radioactif par rapport aux témoins non traités. Cette déphosphorylation visible en électrophorèse mono ou bidimensionnelle, est aussi quantifiable par comptage du

57

phosphore-32 libéré en scintillation liquide, ce qui nous a permis de l'estimer à environ 50%.

Lorsque les protéines de surface traitées à la phosphatase alcaline sont analysées par immunoempreinte avec les anticorps monoclonaux nous n'observons aucune différence de migration électrophorétique entre les AMS traités et leurs formes natives.

II- PRODUCTION DES SERUMS MONOSPECIFIQUES ANTI-P43 & ANTI-P23

II-1. Purification des deux protéines

Des fractions enrichies en protéines P43 & P23 ont été obtenues par chromatographie d'affinité. Ces éluats sont séparés par électrophorèse en gel d'acrylamide et les bandes correspondantes sont découpées puis électroéluées. Les pistes 1 et 2 de la planche VI correspondent à la coloration au nitrate d'argent des protéines P43 et P23 de surface des tachyzoïtes, purifiées par affinité.

II-2. Caractéristiques des sérums polyclonaux monospécifiques

Les protéines P43 & P23 précédemment purifiées sont utilisées pour immuniser deux lapins. Les sérums immuns anti-P43 et anti-P23 testés en immunofluorescence indirecte, sont très réactifs contre la membrane des tachyzoïtes. En immunoempreinte le sérum anti-P23 ne reconnaît qu'une molécule de 23 kDa (Pl. VI, piste 6) tandis que le sérum anti-P43 reconnaît une molécule de 41 kDa (comigrant avec la protéine P43) et plus faiblement une autre protéine de 42 kDa (Pl. VI, piste 3). La démonstration de la réactivité anti-surface du sérum anti P43 est apportée par sa capacité à immunoprécipiter l'antigène P43 (Pl. VI, piste 4) à partir d'un lysat de tachyzoïtes superficiellement iodés. Sur ce dernier point le sérum polyclonal anti-P23 est identique au sérum anti-P43.

III- SENSIBILITE DES ANTIGENES DE SURFACE A LA PIPLC

III-1. Traitement des toxoplasmes vivants par la PIPLC

L'incubation de toxoplasmes iodés avec la PIPLC entraîne la solubilisation des quatre antigènes majeurs de surface (Pl. VII, fig. A, piste 5) dans le surnageant, alors que les zoïtes ne montrent plus que des protéines mineures (piste 4). Lorsque les zoïtes iodés sont incubés sans la PIPLC la totalité des protéines majeures de surface demeure sur les parasites (piste 2) et le surnageant d'incubation correspondant (piste 3) montre une protéine de 66 kDa qui pourrait être de l'albumine adsorbée sur les parasites. Contrairement à la PIPLC le traitement des tachyzoïtes par la phospholipase C (PLC: lécithine spécifique) ne solubilise aucun antigène de surface.

Nous avons également analysé l'action de la PIPLC sur des promastigotes de *Leishmania donovani* (Pl. VII, fig. B) et sur des sporozoïtes d'*Eimeria nieschulzi* (Pl. VII, fig. C) superficiellement iodés. Les promastigotes de Leishmania incubés avec la PIPLC et le surnageant correspondant montrent une seule protéine iodée de 67 kDa (Pl. VII, fig. B, pistes 4 et 5). Les promastigotes incubés sans la PIPLC présentent trois antigènes majeurs de surface de poids moléculaires 67, 50, et 23 kDa (piste 2) et le surnageant correspondant, renferme une faible quantité de protéine de 67 kDa (piste 3).

Les protéines de surface des sporozoïtes d'Eimeria sont pratiquement insensibles à la PIPLC (Pl. VII, fig. C, piste 4). On observe cependant une faible quantité du doublet protéique 23 et 25 kDa dans le surnageant d'incubation (Pl. VII, fig. C, piste 5). III-2. Comparaison de la migration électrophorétique des AMS traités et non traités à la PIPLC

Les AMS solubilisés par la PIPLC et leurs formes natives non traitées sont analysés en parallèle par SDS-PAGE. Les protéines P43, P30 & P22 décrochées des tachyzoïtes superficiellement iodés migrent légèrement plus vite (Pl. VIII, fig. A, piste 2) que les formes natives correspondantes (piste 1). Ce comportement électrophorétique particulier des protéines solubilisées par la PIPLC est confirmé par les immunoprécipitations réalisées avec les anticorps monoclonaux (Pl. VIII, fig. A, pistes 4, 6, et 8) par rapport aux protéines natives (pistes 3, 5, et 7). Les immunoprécipitations à l'aide de l'anticorps monoclonal $2E_{12}$ nous ont permis de constater que, contrairement aux trois protéines de surface décrites ci-dessus, la protéine de surface P23 traitée par la PIPLC a une migration électrophorétique plus lente que la forme native (Pl. VIII, fig. A, pistes 9 et 10). La protéine de surface P35 possède à cet égard un comportement identique à celui de la protéine P23 ainsi que celà peut être observé dans le profil total (pistes 1 et 2).

III-3. Désacylation des antigènes majeurs de surface par la PIPLC

La PIPLC hydrolyse le groupement inositol-phosphatidyl en éliminant le diacylglycérol des protéines GPI-ancrées (schéma 6). Nous avons donc incubé un lysat parasitaire marqué à l'acide palmitique avec cette lipase et réalisé des immunoprécipitations avec les différents anticorps monoclonaux. Le fluorogramme (Pl. VIII, fig. B) montre que les 5 antigènes de surface ont complètement perdu le signal radioactif (pistes 2, 4, 6, 8, et 10) qui est détecté dans les immunoprécipitations de lysat incubé sans enzyme dans les mêmes conditions expérimentales (pistes 1, 3, 5, 7, et 9).

III-4. Mise en évidence de déterminants antigéniques communs sur les antigènes de surface.

III-4.1. Réactivité des sérums polyclonaux anti-P43 vis à vis des antigènes de surface clivés par la PIPLC

En règle générale, les protéines ayant un GPI-ancrage et sensibles à la PIPLC présentent des réactions antigéniques croisées (CRD: cross-reacting determinant) dues à l'existence de déterminants communs existant dans le domaine d'ancrage et qui ne sont réactifs que lorsqu'ils sont démasqués par la PIPLC.

Nous avons donc étudié la réactivité du sérum polyclonal anti-P43 sur les quatre antigènes de surface des tachyzoïtes traités à la PIPLC. La figure C (Planche VIII) montre que le sérum anti-P43 reconnaît dans le lysat PIPLC trois antigènes de 35, 32, et 22 kDa (piste 10) en plus du doublet 41-42 kDa qu'il reconnaît dans les tachyzoïtes non traités (piste 6). Le surnageant d'incubation des tachyzoïtes sans PIPLC ne montre qu'une légère réactivité au niveau de ce doublet (piste 8).

Comme la révélation de l'immunoempreinte a été réalisé avec des tachyzoïtes superficiellement iodés, l'autoradiographie correspondante démontre que les trois protéines supplémentaires reconnues dans le lysat PIPLC par le sérum anti-P43 comigrent avec les trois autres antigènes majeurs de surface des tachyzoïtes (Pl. VIII, fig. C, piste 5). Les protéines révélées par le sérum de lapin anti-P43 sur les pistes 6, 7, 8, 9, et 10 sont superposables à l'autoradiogramme des molécules radioiodées des pistes 1, 2, 3, 4, et 5. Le sérum polyclonal anti-P23 possède les mêmes propriétés que le sérum anti-P43 mais avec une intensité de réaction plus faible.

> III-4.2. Réactivité d'un sérum polyclonal anti-VSG de Trypanosome vis à vis des antigènes du toxoplasme

Les antigènes de surface solubilisés par la PIPLC sont analysés en immunoempreinte avec un sérum anti-CRD spécifique de l'antigène variable de surface (VSG: variable surface antigen) de Trypanosome. Ce sérum nous a été fourni par le Docteur Baltz T. (Université de Bordeaux) qui l'a préparé à partir de la forme soluble du VSG de *Trypanosoma brucei* relarguée par la PIPLC endogène dans des conditions de cultures appropriées (Capdeville *et al.*, 1986). En comparaison avec le sérum anti-P43 (Pl. VIII, fig. C, piste 11) la piste 12 montre que le sérum anti-VSG a une réactivité intense vis à vis de la protéine P30 et une réactivité plus faible envers les trois autres protéines. D'autres protéines mineures reconnues par le sérum anti-P43 sont également reconnues par le sérum anti-VSG.

IV- ESSAI PRELIMINAIRE DE NEOSYNTHESE OU D'INVASION APRES CLIVAGE A LA PIPLC

IV-1. Cinétique de clivage des AMS

Des échantillons de tachyzoïtes superficiellement iodés sont incubés avec la PIPLC pendant des durées variables allant de 15 minutes à 1 heure. La figure A (Pl. IX, piste 7) montre que l'incubation des tachyzoïtes pendant 15 minutes à 37°C suffit à solubiliser tous les antigènes majeurs de surface y compris l'antigène de surface de 23 kDa visible sur cette autoradiographie. IV-2. Néosynthèse des AMS

Des tachyzoïtes radioiodés sont traités par la PIPLC pendant 30 minutes, puis resuspendus dans le milieu de culture normal et incubés à 37°C pendant 15 ou 30 minutes. Ils sont ensuite iodés à nouveau et les protéines totales sont analysées par électrophorèse SDS-PAGE. Après 15 minutes, l'iodation des zoïtes préalablement traités par la PIPLC donne un profil difficilement lisible correspondant surtout à un bruit de fond sur toute la piste (Pl. IX, fig.B, piste 4). Après une demi heure, un léger signal est détecté au niveau des AMS, mais un bruit de fond important est également présent (piste 5). La piste 1 correspond aux protéines de surface initiales des tachyzoïtes superficiellement iodés. Les pistes 2 et 3 correspondent respectivement aux tachyzoïtes initialement traités par la PIPLC pendant 30 minutes et au surnageant d'incubation correspondant.

IV-3. Essai préliminaire d'invasion après le clivage des AMS

Des tachyzoïtes traités à la PIPLC pendant 15 minutes sont mis en présence d'un tapis cellulaire confluent de cellules Véro dans les conditions utilisées au laboratoire pour quantifier l'invasion. Une même quantité de zoïtes traités au PBS pendant 15 minutes est déposée sur une surface égale de tapis cellulaire. Après 4 heures les deux cultures sont fixées et les tachyzoïtes intracellulaires numérés au miscroscope.

Aucune différence n'a été observée entre les deux lots quant à leur capacité d'invasion.

63

DISCUSSION

I- Caractérisation des antigènes majeurs de surface

Les quatre antigènes majeurs de surface (P43, P35, P30, P22) ont été identifiés auparavant par d'autres auteurs (Handman *et al.*, 1980; Kasper *et al.*, 1982; 1983). L'obtention d'anticorps monoclonaux spécifiques de tous ces antigènes et d'un nouvel antigène de surface (P23) a permis à Couvreur G. *et al.* (1988) de mieux les caractériser. Les résultats obtenus au cours de notre étude apportent des précisions sur ces molécules.

Ainsi la révélation d'immunoempreinte après SDS-PAGE montre que:

1. Les AMS décrits comme des molécules de 22 kDa et 23 kDa sont en fait des familles protéiques. Ceci n'avait pas été observé antérieurement car la surcharge ou la surrévélation des immunoempreintes ou autoradiographies produit une tache unique où les bandes ne sont pas individualisées. La filiation précise entre les différents composants des familles P22 et P23 reste à établir.

Les électrophorèses bidimensionnelles précisent que la famille P22 est composée de 2 familles d'isoformes jumelles alors que la protéine P23 est une famille unique. L'une des isoformes de la protéine P22 est plus représentée à la surface des tachyzoïtes. Cette observation a également été mentionnée par Kasper *et al.* (1982) qui a publié pour cette molécule une isoforme fortement iodée à pHi 5,6 et une deuxième plus faiblement iodée à pHi 6,4. En achors du fait qu'il précise que ces deux isoformes iodées ont un poids moléculaire de 22 kDa en SDS-PAGE, il n'a pas identifié leur parenté immunologique que nous montrons par l'immunoempreinte de la figure B (planche II). Mais les isoformes P22 que nous avons obtenues ont des pHi de 6,15 et 6,6. De plus nous confirmons également en IEF dans le lysat de tachyzoïte superficiellement iodé et aussi par immunoempreinte avec l'anticorps monoclonal $2E_{12}$, l'existence distincte par rapport à la protéine P22, de la protéine P23 de surface.

La protéine P30 montre fréquemment un doublet protéique dont 2. chaque élément est constitué de trois isoformes distinctes iodées dont les deux plus intenses sont révélées par l'anticorps monoclonal. Ce doublet protéique est parfois observé par l'immunoprécipitation de la protéine P30 suivie de SDS-PAGE et fluorographie: c'est le cas avec le marquage à l'éthanolamine (Pl. III, fig. B, piste 2). L'existence de ce doublet protéique P30 n'a jamais été rapportée antérieurement. Il est également possible que l'intensité de la révélation en immunoempreinte ait masqué ce doublet dans les travaux antérieurs. L'une des deux protéines pourrait être le précurseur métabolique de la protéine P30 que nous n'avons pas réussi à mettre en évidence par le marquage court suivi de chasse. Ce doublet pourrait aussi représenter deux formes distinctes de la même molécule d'autant plus que ces deux formes sont effectivement iodées à la surface des tachyzoïtes. Toutefois nous n'observons pas ces deux formes après la solubilisation par la PIPLC. De plus la séquence primaire déduite du gène (Burg et al., 1988) n'apporte pas d'éléments suggérant l'existence de deux formes de la protéine P30. Enfin, nous ne pouvons exclure une dégradation protéasique de la protéine P30 originelle puisque l'analyse des isoformes phosphorylées en IEF fait apparaître surtout les molécules supérieures du doublet protéique avec une phosphorylation légèrement plus forte pour l'isoforme à pHi 6,95 par rapport à l'isoforme à pHi 6,75.

Les travaux de Kasper (1987) montrent aussi à partir des tachyzoïtes superficiellement iodés que la protéine P30 possède trois isoformes de pHi 4,7; 5,3; 5,6 alors que nous avons identifié un doublet protéique avec six isoformes ayant par binôme des pHi de 6,5; 6,75; 6,95. Ces différences seront discutées plus loin. 3. La protéine P35 montre une intensité relativement plus faible en toutes circonstances par rapport aux quatre autres protéines de surface. Sa faible abondance à la surface des parasites pourrait expliquer ces résultats. Par ailleurs nous n'avons pas réalisé au cours de ce travail une quantification réelle des quatres AMS et comme nous avons utilisé des anticorps monoclonaux et polyclonaux, nos comparaisons quantitatives sont également le reflet de l'affinité et de l'avidité de ces sondes pour leurs antigènes respectifs. Au vu des différences relatives observées entre les intensités radioactives des AMS, le problème de la quantification précise de ces antigènes est également posé.

Kasper *et al.* n'ont jamais mentionné dans leurs travaux le pHi de la protéine P35 en IEF. En revanche, les résultats de Handman *et al.* (1980) permettent d'identifier cette molécule mais ces auteurs n'ont pas obtenu une bonne résolution des AMS au cours de la première dimension et n'ont donc pas indiqué leurs valeurs de pHi.

4. La protéine P43 est représentée par une bande unique en SDS-PAGE monodimensionnelle mais en analyse bidimensionnelle, contrairement à la protéine P35, elle possède cinq isoformes identifiables. L'iodation de surface des tachyzoïtes révèle que les deux isoformes de pHi 6,3 & 6,5 de la protéine P43, sont les plus abondantes à la surface du zoïte vivant tandis que l'immunoempreinte réalisée avec l'anticorps monoclonal $1F_{12}$ indique que cette même molécule possède 5 isoformes immunologiquement apparentées. La cinquième isoforme (pHi 6,55) est faible sur l'immunoempreinte (Pl.II, fig. B) mais elle apparaît nettement lorsque la quantité de protéines analysées est plus importante. L'étude en IEF de la protéine P43 phosphorylée montre que c'est l'isoforme de pHi 6,5 qui est la plus phosphorylée.

La publication de Kasper *et al.* (1984) mentionne deux isoformes iodées de pHi 5,4 et 5,6 pour la protéine P43. Ces deux isoformes sont probablement celles

67

que nous avons identifiées à pHi 6,3 et 6,5 et une surexposition de l'autoradiogramme de cet auteur aurait pu faire apparaître la troisième isoforme qui est plus faiblement iodée.

Handman et al., (1980) et Kasper et al., (1982, 1984, 1987) ont étudié en IEF les AMS à partir d'un lysat de tachyzoïtes superficiellement iodés ou biotinylés tandis que nous avons analysé simultanément des AMS obtenus par iodation superficielle des tachyzoïtes, par immunoempreinte à l'aide des anticorps monoclonaux, et par immunoprécipitation sur le matériel parasitaire phosphorylé. Ces trois techniques nous ont donc permis de caractériser et d'attribuer sans ambiguité les isoformes appartenant à chaque protéine de surface des tachyzoïtes. Dans l'ensemble, la comparaison de nos résultats et ceux de Kasper et al. fait apparaître des différences sensibles sur les pHi des AMS. Ces différences pourraient être expliquées par la présence de SDS dans nos échantillons analysés en IEF. Dans un souci d'homogénéité, nous avons utilisé ce détergent dans toutes nos conditions expérimentales car il a servi à éluer les protéines radioactives immunoprécipitées par les anticorps monoclonaux.

Hormis ces différences concernant les pHi et l'existence de certaines isoformes, il apparaît dans les deux travaux que les protéines de surface P43, P30 et P22 possèdent plusieurs isoformes biochimiquement distinctes mais immunologiquement apparentées. Nos études n'ont pas permis d'obtenir des informations sur les altérations biochimiques responsables des différences entre les isoformes de chaque protéine, ni sur les filiations éventuelles des AMS en cours de biosynthèse. Nous pensons cependant que le génèse des différentes isoformes doit être liée aux modifications post-traductionnelles que subissent ces antigènes.

Enfin, nous ne pouvons pas exclure l'existence d'isoformes artéfactuelles provenant de la dégradation des protéines originelles en présence d'urée qui est utilisée lors des électrophorèses bidimensionnelles.

II- Spécificité des anticorps polyclonaux anti-AMS

Des anticorps polyclonaux de lapins ont été produits respectivement contre les protéines de surface P43 et P23. Le sérum polyclonal anti-P23 ne reconnaît que cette molécule en immunoempreinte et en immunoprécipitation. Par contre, le sérum anti-P43 reconnaît deux bandes en immunoempreinte: une bande majeure à 41 kDa et une bande mineure d'environ 42 kDa. La superposition d'immunoempreinte et d'autoradiographie d'AMS iodés montre que la bande à 41 kDa est la protéine majeure de surface P43. L'autre molécule reconnue étant probablement un contaminant copurifié et électroélué avec la protéine P43 lors de la purification de cette dernière molécule. L'analyse de la réactivité de ce sérum en conditions non réductrices montre que les deux molécules sont mieux séparées dans ces conditions, la bande mineure 42 kDa migrant à 66 kDa. Il semble ainsi qu'une préparation plus pure de la protéine P43 pourraît être obtenue si l'électroélution était réalisée après électrophorèse en conditions non réductrices, bien que celà n'excluerait pas la présence possible d'autres contaminants. Ce défaut de spécificité du sérum polyclonal anti-P43 n'a pas empêché son exploitation car seule la protéine P43 est iodable et décrochée par la PIPLC. Cette protéine P43 peut donc être identifiée individuellement par ce sérum.

III- Etude de la maturation des AMS

Des essais préliminaires de marquages métaboliques des tachyzoïtes avec plusieurs acides aminés radioactifs pris individuellement ont donné des signaux d'intensités relatives très variables pour les cinq AMS. Nous avons utilisé un mélange de cinq acides aminés tritiés afin d'obtenir simultanément des marquages
exploitables pour les cinq AMS. Les marquages métaboliques courts suivi de chasse nous ont donc permis d'identifier pour les protéines P22 et P23 un précurseur correspondant à l'un des composants de la famille. La diminution relative d'intensité de ce précurseur lors de la chasse suggère qu'il est à l'origine des autres membres de la famille, de masse moléculaire plus élevée. Pour les trois autres AMS (P43, P35, P30) nous n'avons pas pu mettre en évidence de précurseur par différence de masse moléculaire. Ces deux comportements diffèrent de ceux décrits pour des molécules contenues dans les organites des tachyzoïtes et en particulier dans les rhoptries. Sadak et al. (1988) ont en effet décrit la biosynthèse de précurseurs de protéines de rhoptries dont la maturation en cours de chasse conduisait à des produits de masse moléculaire plus faible. Dans ce cas il semblait donc s'agir d'une maturation par protéolyse.

Par ailleurs, la totalité des précurseurs était rapidement convertie en protéines matures. En ce qui concerne les protéines P22 et P23, cette conversion semble plus lente et incomplète pendant une heure de chasse. La maturation se traduit en outre par une augmentation de poids moléculaire, qui évoque par exemple l'addition de résidus glycanniques. Une analyse plus fine de la maturation des protéines P22 et P23 reste donc à réaliser pour expliquer les résultats obtenus.

Dans le cas des protéines P43, P35, P30, la démonstration de l'ancrage GPI laissait penser qu'il serait possible d'observer transitoirement un précurseur comportant le signal peptidique hydrophobe classiquement remplacé par la structure d'ancrage lors de la maturation co-traductionnelle (Low, 1987; Ferguson et Williams, 1988). Cependant, le fait que d'une part, il est souvent nécessaire de réaliser des marquages extrêmement courts (environ 1 minute) pour observer le précurseur (Bangs et al., 1985; Ferguson et al., 1986) peut expliquer l'absence de précurseur identifiable dans nos expériences. D'autre

part la substitution du GPI au peptide hydrophobe clivé pourrait également compenser la différence de masse moléculaire.

IV- Mise en évidence d'un GPI-ancrage sur les AMS

De nombreux travaux antérieurs ont montré qu'un grand nombre de protéines membranaires subissent des modifications co- ou post-traductionnelles conduisant à leur ancrage GPI dans la membrane. L'une des caractéristiques de ce type d'ancrage est sa sensibilité à l'action de la phosphatidyl-inositol phospholipase C (PIPLC). Nous avons donc analysé l'effet de la PIPLC sur les AMS des tachyzoïtes.

Nos résultats démontrent que tous les AMS des tachyzoïtes de *T. gondii* superficiellement iodés sont décrochés par la PIPLC. La démonstration de la spécificité de cette solubilisation repose sur 2 observations:

1. il ne s'agit pas de l'action de protéases qui auraient pu contaminer la préparation PIPLC car les AMS sont insensibles *in situ* aux protéases telles que la trypsine, la chymotrypsine et la papaïne, mais ils sont complètement dégradés par ces protéases lorsqu'ils sont solubilisés par un détergent. Comme les AMS ne sont pas protéolysés après leur décrochage par la PIPLC, il semble possible d'exclure une activité protéolytique dans la préparation de PIPLC. Ceci a par ailleurs été établit par Jean *et al.*, (1988) et Taguchi *et al.*, (1978). L'étude comparative des migrations électrophorétiques des AMS traités par la FIPLC et de leurs formes natives, montre des différences de mobilité électrophorétique déjà signalées dans la littérature. En effet sur d'autres modèles de protéines GPI-ancrées l'élimination du diacylglycérol entraîne une migration soit plus lente (Cardoso de Almeida *et al.*, 1983; P43, P30 et P22 dans notre cas), soit plus rapide (Davitz *et al.*, 1986; P35 et P23 pour les tachyzoïtes). 2. il existe sur les AMS des déterminants antigéniques communs (CRD) démasqués par la PIPLC et révélés par le sérum hétérologue anti-CRD de *Trypanosoma brucei* (anti-VSG soluble) ainsi que par le sérum homologue anti-P43 de *Toxoplasma gondii* (anti-surface P43 des tachyzoïtes). La protéine majeure de surface P30 montre une réactivité anti-CRD plus forte que les trois autres.

Nagel *et al.* (1989) ont indépendamment démontré que la protéine majeure de surface P30 est sensible au glycosyl-phosphatidylinositol phospholipase C (GPI-PLC) de trypanosome qui est une lipase de la même famille que la PIPLC mais avec une spécificité plus étroite pour le groupement glycosyl, suggérant ainsi qu'une structure glycannique serait bien présente dans l'ancrage GPI des AMS comme c'est le cas pour toutes les protéines de cette famille. Cette équipe a également montré que cette protéine majeure est sensible à la PIPLC. Nos résultats confirment ceux de ces auteurs pour la protéine P30 et nous démontrons le même type d'ancrage pour les quatre autres antigènes de surface.

Les molécules d'éthanolamine, d'acide gras, de sucre, et de phosphate sont les éléments constamment rencontrés dans les motifs d'ancrage des protéines GPI ancrées. Ceci a justifié notre étude de l'incorporation de ces molécules dans les AMS.

V- Acylation

Les tachyzoïtes intracellulaires incorporent *in vitro* les acides palmitique et myristique radioactifs dans tous les antigènes majeurs. De plus le signal radioactif des AMS marqués avec de l'acide palmitique est éliminé par la PIPLC tandis que le même signal n'est pas affecté par un traitement à l'hydroxylamine qui est reputé décrocher les acides gras attachés aux protéines par une liaison thioester (Olson *et al.*, 1985). Ces derniers résultats apportent des arguments supplémentaires en faveur de l'existence de l'ancrage GPI des AMS. Les acides palmitique et myristique sont les deux acides gras les plus fréquemment rencontrés au cours de l'acylation des protéines membranaires. Chez le tachyzoïte le signal radioactif correspondant à l'incorporation d'acide palmitique est beaucoup plus intense que celui de l'acide myristique. Cette constatation est valable pour les protéines totales et les AMS du parasite. Nos résultats actuels ne permettent pas de savoir si les deux acides gras sont simultanément incorporés dans les protéines, ce qui serait inhabituel bien que l'incorporation simultanée des deux acides gras ait été également décrite pour la phosphatase alcaline des cellules Hela (Jemmerson et al., 1987) qui est aussi une protéine GPIancrée. Le parasite pourrait également réaliser une interconversion entre les deux acides gras aboutissant à une forme unique pouvant être soit l'un des deux acides gras, soit une autre forme de conversion qui serait incorporée dans les AMS. Ce phénomène d'interconversion a été observé chez les cellules eucaryotes par Olson et al. (1985) qui ont démontré une élongation et une incorporation de l'acide myristique (C14) dans les protéines sous la forme d'acide palmitique (C16). La faible incorporation de l'acide myristique dans les AMS pourrait donc s'expliquer par une interconversion faible en acide palmitique, mais nous ne pouvons écarter l'existence d'une acylation utilisant indifféremment les deux acides gras.

Nagel *et al.* (1989) ont aussi montré que de l'acide palmitique est incorporé dans la protéine P30 par marquage métabolique des tachyzoïtes. Ces auteurs ont ensuite analysé les produits de clivage de la protéine P30 par la PIPLC et la phospholipase A2. Cette dernière lipase décroche spécifiquement l'acide gras en position sn-2 du diacylglycérol. Leurs résultats démontrent que l'ancrage glycolipidique de la protéine P30 renferme une molécule de structure 1,2-diacylglycérol qui ne migre pas comme un dipalmitique-glycérol. De même, leurs tentatives de caractérisation précise de l'acide gras présent dans cette molécule

suggèrent que l'acide gras serait transformé et secondairement transféré dans l'ancrage. Ces résultats pourraient expliquer l'incorporation simultanée des acides palmitique et myristique que nous obtenons au cours de nos expériences de marquage métabolique et sont aussi en faveur d'interconversion entre l'acide gras fourni aux parasites et celui qui est réellement incorporé dans l'ancrage.

La mise en évidence de l'ancrage GPI nous a conduit à nous interroger sur l'existence possible d'une PIPLC, comme c'est le cas chez *Trypanosoma brucei* (Cardoso de Almeida et Turner, 1983). Une telle enzyme aurait pu être impliquée dans la translocation superficielle des AMS décrite par certains auteurs (Dubremetz *et al.*, 1985; Sibley *et al.*, 1988). Nous n'avons pas été capable de mettre en évidence une telle activité chez *Toxoplasma gondii* dans les conditions où elle est révélée chez *Trypanosoma brucei*. Ce résultat négatif ne permet toutefois pas de conclure à son absence, car elle peut être très peu abondante ou exprimée dans des conditions particulières ou dans des périodes très limitées.

VI- Incorporation d'éthanolamine dans les AMS

Nous avons montré que les parasites incorporent de l'éthanolamine dans les protéines P43, P30, P22, et P23. Dans nos conditions expérimentales nous n'observons pas de marquage pour la protéine P35 mais cette molécule est probablement moins abondante que les autres protéines de surface des tachyzoïtes et par conséquent elle produit généralement un signal radioactif plus faible par rapport aux autres. Le fluorogramme correspondant à l'incorporation d'éthanolamine par les zoïtes étant obtenu après deux mois d'exposition, la visualisation de la protéine P35 nécessiterait probablement un temps d'exposition beaucoup plus long.

La structure complète du motif d'ancrage montre généralement la présence d'une ou de deux molécules d'éthanolamine (Homans et al, 1988). La visualisation

du marquage des protéines GPI-ancrées marquées par cette molécule se heurte à deux difficultés:

- longue durée du marquage métabolique des cellules (18 heures).

- très longue durée d'exposition des fluorogrammes (2 à 6 mois).

L'importance de ces difficultés dépend du matériel !·iologique et des protéines membranaires étudiées. C'est le cas de la phosphatase alcaline des cellules Hela pour laquelle Jemmerson *et al.* (1987) ont eu recours au butyrate de sodium pour augmenter la quantité protéique cellulaire globale synthétisée. En effet le traitement des cellules eucaryotes par cet acide gras à courte chaîne de carbones, inhibe les désacétylases (Sealy et Chalkley, 1978) et provoque donc une augmentation de l'acétylation des histones se traduisant dans un premier temps, par une augmentation de la transcription de l'ADN et secondairement par une traduction plus élévée. Ainsi, en augmentant le métabolisme global des cellules Hela, ces auteurs ont réalisé des marquages à l'éthanolamine pendant 4 heures et obtenu plus rapidement les fluorogrammes. Nos essais d'utilisation de butyrate de sodium sur les cellules infestées par le toxoplasme n'ont pas donné des résultats satisfaisants.

VII- Glycosylation

Les zoïtes intracellulaires incorporent des monosaccharides tritiés tels que la glucosamine, le mannose et le galactose dans un grand nombre de protéines parasitaires ainsi que dans les AMS comme le cémontre la planche IV. Nous avons choisi ces trois sucres car ils font partie de ceux qui sont fréquemment rencontrés dans les copules N- ou O-glycanniques.

Bien que ces sucres soient incorporés dans tous les AMS, la protéine P23 se distingue nettement des autres par une très forte incorporation de glucosamine alors qu'elle est difficilement iodable et que les acides aminés, les acides gras et le phosphore y sont faiblement incorporés. Une analyse plus approfondie sera nécessaire pour expliquer cette différence entre la protéine P23 "glucosamine-riche" et les autres AMS.

Jusqu'à présent, nous n'avons aucune donnée sur la nature exacte des glycannes portés par les AMS. Dans ce domaine la littérature a fourni des résultats imprécis et contradictoires (Handman et al., 1980; Mauras et al., 1980). Nos résultats montrent que les tachyzoïtes incorporent les monosaccharides tritiés dans les AMS mais nous ignorons si les signaux radioactifs obtenus proviennent uniquement de l'ancrage ou d'autres structures oligosaccharidiques telles que les O- ou N-glycannes. Les essais préliminaires de perturbation de la biosynthèse par l'utilisation de la tunicamycine pendant les marquages métaboliques sont restés infructueux. Mais nous ne savons pas si les conditions actuelles d'utilisation de cette drogue sont efficaces sur le toxoplasme. D'autre part, la déglycosylation chimique par utilisation de d'acide trifluorométhane sulfonique n'a pas donné de résultats, faute de pouvoir resolubiliser les protéines dans du SDS et analyser l'action de ce produit sur les antigènes de surface en SDS-PAGE. Ces tentatives de caractérisation des glycannes devront être poursuivies par des études ultérieures plus approfondies pour identifier et caractériser les glycannes des AMS du tachyzoïte. La distinction entre les structures oligosaccharidiques de l'ancrage et de la copule protéique demande un choix judicieux des techniques à utiliser pour l'étude de la glycosylation des AMS. Des expériences ultérieures plus fines par l'analyse des cartes peptidiques (CNBR, protéases) permettront de localiser les différents actifs glycanniques afin de pouvoir les caractériser. Ces études apporteront des informations originales sur la glycosylation chez les sporozoaires car ce domaine est quasi inexploré.

VIII- Phosphorylation

La recherche d'autres types de modifications post-traductionnelles nous a conduit à étudier la phosphorylation des AMS. Nous avons ainsi montré que les tachyzoïtes incorporent intensément l'orthophosphate (³² P) dans les protéines P30 et P22 et moyennement dans la protéine P43. Une exposition plus longue est nécessaire pour observer le signal radioactif des protéines P35 et P23. Le site d'hydrolyse de la PIPLC étant le groupement phosphatidylinositol la phosphorylation des AMS reflète très probablement l'existence d'une ou plusieurs molécules de phosphore dans l'ancrage. Mais l'intensité du marquage des protéines P30 et P22 suggère qu'elles pourraient incorporer du phosphate en dehors de l'ancrage. Nous avons donc étudié la présence éventuelle de résidus d'acides aminés phosphorylés dans ces deux AMS. Nos résultats montrent que les protéines P30 et P22 contiennent majoritairement de la phosphosérine. Mais nous avons également découvert un composé migrant en sens opposé aux acides aminés phosphorylés. Nous pensons qu'il s'agit du composé phosphorylé de l'ancrage. De plus nous avons aussi observé que les protéines P30 et P22 marquées à la glucosamine puis hydrolysées et analysées dans les mêmes conditions expérimentales que les protéines phosphorylées, ne présentent que le composé migrant dans le sens opposé aux témoins d'acides aminés phosphorylés. Le sens de migration de ce composé pourrait être expliqué par sa composition probable en glucosamine et en éthanolamine lui conférant à pH 1,9 une charge positive, ce qui entraîne une migration vers la cathode. La présence de phosphate sur les acides aminés et dans l'ancrage suggère que la phosphorylation des AMS se réalise sur deux accepteurs différents (ancrage et acides aminés) et par conséquent deux types de kinases pourraient être impliqués dans ce phénomène. D'après la structure primaire de la protéine P30 (Burg et al., 1988) il y a autant de sérines que de thréonines dans cette molécule et nos résultats suggèrent que la phosphorylation serait plutôt à attribuer à une sérine kinase. La phosphorylation des AMS en dehors de l'ancrage est une donnée nouvelle puisque les protéines membranaires phosphorylées sont généralement transmembranaires et que le site phosphorylable est localisé du côté cytoplasmique. L'ancrage GPI des protéines leur impose une localisation extracellulaire et les sites phosphorylés des AMS sont donc très probablement extracellulaires. La phosphorylation pourrait être un marqueur de la maturation et du transit intraparasitaire de ces AMS vers la pellicule. Toutefois la glycosylation des AMS pourrait être aussi impliquée dans ce processus de maturation en association avec la phosphorylation. Des investigations ultérieures seront nécessaires pour étudier plus finement les modifications posttraductionnelles subies par ces AMS ainsi que le rôle biologique de ces altérations.

IX- Incorporation des métabolites radioactifs chez les tachyzoïtes extracellulaires

Nous ignorons quelles modifications post-traductionnelles interviennent chez les tachyzoïtes extracellulaires. Lorsque les tachyzoïtes extracellulaires sont incubés pendant un temps variable avec les métabolites cités plus haut et pouvant être utilisés au cours des altérations post-traductionnelles, nous n'avons obtenu aucun signal radioactif tandis que dans les mêmes conditions ces zoïtes continuent d'incorporer les acides aminés tritiés. Nous ignorons si les tachyzoïtes hors des cellules hôtes peuvent éventuellement utiliser un stock de précurseurs préexistants pour réaliser la maturation des AMS lors de leur biosynthèse. Le traitement des protéines synthétisées par les toxoplasmes extracellulaires avec la PIPLC, devrait donc permettre de savoir si ces parasites acheminent les AMS à leur surface en dépit de l'absence d'incorporation d'acide

gras quand ils sont en dehors des cellules hôtes. Bien que Krug et al. (1989) aient montré que les tachyzoïtes extracellulaires étaient capables de synthétiser de l'ARN et de l'ADN et qu'ils étaient encore viables au bout de 16 heures dans certaines conditions de milieu, le tachyzoïte en situation extracellulaire est dans un état relativement artificiel. En effet, la destinée du tachyzoïte est l'invasion et il ne peut se multiplier hors d'une cellule. Le métabolisme du tachyzoïte extracellulaire est donc sans doute la persistance momentanée des activités intracellulaires, mais sans que l'on sache s'il est le reflet exact de la situation intracellulaire, et pour combien de temps. S'il semble persister une biosynthèse protéique (et même quelques processus de maturation : Dubremetz, communication personnelle), le trafic intracellulaire dans ces conditions est inconnu. Ainsi les modifications post-traductionnelles (GPI) et l'expression des AMS ne sont pas connues chez les tachyzoïtes extracellulaires. Ces études pourraient permettre d'avoir des informations utiles sur la dépendance ou l'indépendance de ces parasites envers certains métabolites ou des intermédiaires métaboliques issus de la cellule hôte.

X- Réinvasion des cellules hôtes par des tachyzoïtes traités par la PIPLC

L'étude de la cinétique d'hydrolyse des protéines de surface des tachyzoïtes par la PIPLC nous a permis de déterminer le temps minimal pour solubiliser la totalité des AMS. Notre but étant de préserver la viabilité des tachyzoïtes afin d'entreprendre les expériences de néosynthèse. Nous avons observé la réapparition d'antigènes de surface iodables sur les tachyzoïtes traités une fois par la PIPLC. Mais comme le montre l'autoradiographie, la quantité de protéines majeures de surface à nouveau iodables étant faible, nous n'avons pas la certitude de l'intégrité des parasites ayant subit une première

iodation, l'incubation avec la PIPLC puis une réiodation. Nous ne pouvons exclure l'iodation des formes cytoplasmiques des protéines majeures de surface d'autant plus que le nombre de protéines mineures iodables est beaucoup plus élévé dans ce cas. Les essais préliminaires de réinvasion avec les tachyzoïtes traités par la PIPLC montrent que les parasites étaient capables d'envahir les cellules hôtes mais nous ne savons pas s'ils sont capables de se développer et de plus nous pensons que ces essais doivent être répétés et les conditions expérimentales améliorées. Il est donc difficile de définir l'implication réelle des AMS dans l'invasion car il semble que les protéines majeurs de surface peuvent réapparaître après leur décrochage par la PIPLC.

DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSIONS

Nos études expérimentales ont ainsi permis de caractériser l'ancrage des cinq antigènes majeurs de surface des tachyzoïtes dans la pellicule parasitaire via la structure GPI (Tomavo et al., 1989). L'observation d'un tel ancrage pour les cinq AMS des tachyzoïtes est un fait inhabituel car chez les cellules eucaryotes coexistent généralement des protéines de surface GPI ancrées et transmembranaires. Notre description des protéines superficielles n'est pas exhaustive car nous nous sommes surtout intéressé aux protéines majeures iodables. Le tachyzoïte de Toxoplasma gondii possède également des protéines mineures faiblement iodables qu'il sera intéressant d'analyser d'autant plus que les récents travaux de Fuhrman *et al.*, 1989 indiquent que deux protéines superficielles mineures de 60 et 67 kDa se lient à la laminine et potentialisent l'invasion des cellules hôtes par les tachyzoïtes. Il faudra en particulier déterminer le mode d'insertion de ces protéines. Notons que la dénomination de protéines majeures et mineures est basée sur des intensités d'iodation sur les tachyzoïtes vivants ou de leur immunogénicité chez l'hôte infesté et ne témoigne pas de leur réelle abondance. La biotinylation des tachyzoïtes vivants met en évidence des protéines de surface non détectées par l'iodation de surface (Kasper, 1987). Des études quantitatives sont nécessaires pour appréhender l'abondance relative des protéines de surface les unes par rappport aux autres. Ces données quantitatives ne préjugeraient toutefois pas de leur importance biologique, une protéine mineure pouvant avoir de ce point de vue un rôle aussi capital qu'une molécule abondamment représentée.

L'ancrage GPI est donc le mode majeur d'insertion des AMS dans la pellicule du tachyzoïte; nous ignorons si ce type d'ancrage a une signification biologique. Les protéines GPI ancrées déjà décrites présentent une telle diversité de fonctions biologiques que ce seul élément ne permet pas de déduire des hypothèses quant à leur fonction. En revanche il semblerait que ce type d'ancrage confère aux protéines de surface une mobilité plus grande dans la

bicouche membranaire (Low, 1987; 1988^b). Ces propriétés de mobilité pourraient intervenir lors de l'invasion quand s'établit la jonction mobile ou pendant le "capping" et le "shedding" des AMS par le tachyzoïte (Dubremetz et al., 1985; Sibley et al., 1988). Le rôle biologique des antigènes majeurs de surface des tachyzoïtes de Toxoplasma gondii demeure inconnu comme c'est le cas pour toutes les molécules de surface des sporozoaires. Les expériences de mutagenèse ont montré que les mutants P22 de tachyzoïte sont encore viables alors que la protéine P30 serait indispensable pour le parasite. Les essais de caractérisation des protéines superficielles des deux autres stades du toxoplasme (bradyzoïte, sporozoïte) ont montré qu'ils possèdent des AMS différents de ceux du tachyzoïte. Notre connaissance de la biologie de ces différents stades est trop sommaire pour en tirer des conclusions; il semble cependant que le tachyzoïte soit la forme qui présente les activités métaboliques les plus intenses, et ses AMS pourraient y jouer, par exemple, un rôle de transporteurs de divers métabolites. Sibley et al., (1986, 1988) ont observé des AMS dans le réseau tubulovésiculaire ("network") existant dans la vacuole parasitophore et pensent que ces molécules de surface présentes en dehors du parasite, augmenteraient leur surface d'échange avec le milieu extérieur. Mais ces hypothèses sont à vérifier et il est aussi possible que les AMS présents dans ces "network" soient des protéines de surface modifiées.

La biosynthèse de l'ancrage des AMS et les sites d'accrochage reste aussi à étudier. Ceci pourrait apporter des informations sur les voies de synthèse métabolique du tachyzoïte. Par ailleurs nous avons trouvé que les protéines P30 et P22 sont également phosphorylées sur des résidus de sérine et que la protéine P23 présente des différences sensibles par rapport aux autres car à l'exception de l'incorporation des sucres elle est très faiblement marquée par les autres précurseurs radioactifs. Ces résultats suggèrent une hétérogénéité dans la biosynthèse de ces protéines de surface. Les autres modifications post-

traductionnelles que peuvent subir les AMS restent à préciser. Nous ignorons par exemple s'ils sont N- ou O-glycosylés. Des recherches plus approfondies sur les modifications post-transcriptionnelles sont donc nécessaires et elles pourraient apporter des informations utiles sur l'acheminement de ces protéines vers la pellicule et les sites de maturation qu'elles traversent, car chez les sporozoaires, ces données de la biologie sont totalement inconnues. L'ancrage GPI a été décrit ou fortement suggéré chez *Plasmodium falciparum*: la protéase P76 (Braun Breton *et al.*, 1988), le circumsporozoïte antigène (CSP) des sporozoïtes et la protéine majeure P195 des schizontes de Plasmodium falciparum (Haldar *et al.*, 1985). La facilité d'obtention du toxoplasme ainsi que l'isolement et la purification des formes rapides de dissémination (tachyzoïte) font de ce sporozoaire un bon modèle pour étudier la biologie et la biochimie des protéines de surface dans ce groupe.

Les antigènes majeurs de surface des tachyzoïtes de Toxoplasma gondii sont également impliqués dans la réponse immune de l'hôte et pourraient être des outils potentiels pour la mise au point de vaccin et de réactifs de diagnostic. Une meilleure connaissance des propriétés immunochimiques pourrait guider le choix des fragments intéressants par recombinaisons génétiques d'autant plus que Burg et al. (1988) après avoir séquençé le gène de la protéine majeure de surface, ont montré que la reconnaissance de cette molécule par les anticorps ne dépend pas uniquement de la chaîne peptidique mais aussi probablement de ses modifications post-traductionnelles. Dans ce domaine, la détermination des cartes peptidiques immunoréactives, de la part jouée par les modifications posttraductionnelles que portent les fragments et \mathbf{par} conséquent leur immunogénicité permettraient d'élaborer des outils efficaces pour la protection et le diagnostic. Il est donc capital tant pour l'intérêt fondamental que pour les applications potentielles thérapeutiques, d'explorer plus avant le domaine de recherches que nous avons abordé au cours de ce travail.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Aikawa M., Miller L.H., Johnson J., Rabbege J. (1978) Erythrocyte entry by malarial parasites. A moving junction between erythrocyte and parasite. J. Cell Biol. 77: 72-82.

Aikawa M., Miller L.H., Rabbege J., Epstein N. (1981) Freeze-fracture study of the erythrocyte membrane during malarial parasite invasion. J. Cell Biol. 92: 55-62.

Bangs J. D., Hereld D., Krakow J. L., Hart G. W., England P. T. (1985) Rapid processing of the carboxyl terminus of a trypanosome variant surface glycoprotein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82: 3207-3211.

Berger J., Howard A.D., Brink L., Gerber L., Hauber J., Cullen B.R., Udenfriend S. (1988) COOH-terminal requirements for the correct processing of a phosphatidylinositol-glycan anchored membrane protein. J. Biol. Chem. 263: 10016-10021.

Boothroyd J.C., Cross G.A.M., Hoeijmakers J.H.J., Borst P. (1980) A variant surface glycoprotein of *Trypanosoma brucei* synthesized with a C-terminal hydrophobic "tail" absent from purified glycoprotein. Nature (Lond) 288: 624-626.

Bordier C., Etges R.J., Ward J., Turner M.J., Cardoso de Almeida M.L. (1986) Leishmania and Trypanosoma surface glycoproteins have a commun glycophospholipid membrane anchor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83: 5988-5991.

Braun-Breton C., Rosenberry T.L., da Silva L.P. (1988) Induction of the proteolytic activity of a membrane protein in *Plasmodium falciparum* by phosphatidylinositol-specific phospholipase C. Nature 332:457-459.

Burg J. L., Perelman D., Kasper L. H., Ware P. L., Boothroyd J. C. (1988) Molecular analysis of the gene encoding the major surface antigen of *Toxoplasma gondii*. J. Immunol. 141: 3584-3591.

Camus D., Hadley T.J. (1985) A *Plasmodium falciparum* antigen that binds to host erythrocytes and merozoïtes. Science 230: 553-556.

Capaldi R. A. (1982) Structure of intrinsic membrane proteins. Trends Biochem. Sci. 7: 292-295.

Capdeville Y., Baltz T., Deregnaucourt C., Keller A N. (1986) Immunological evidence of a commun structure between *Paramecium* surface antigens and *Trypanosoma* variant surface glycoproteins. Exp. Cell Res. 167: 75-86.

Capdeville Y., Cardoso de Almeida M. L., Deregnaucourt C. (1987) The membrane-anchor of *Paramecium* temperature-specific surface antigens is a glycosylinositol phospholipid. Biochem. Biophys. Res. Commun. 147: 1219-1225.

Caras I. W., Weddell G. N., Williams S. R. (1989^a) Analysis of the signal for attachment of a glycophospholipid membrane anchor. J. Cell Biol. 108: 1387-1396.

Caras I. W., Weddell G. N. (1989^b) Signal peptide for protein secretion directing glycophospholipid membrane anchor attachment. Science. 243: 1196-1198.

Cardoso de Almeida M.L., Turner M.J. (1983) The membrane form of variant surface glycoproteins of *Trypanosoma brucei*. Nature (Lond) **302**: 349-352.

Carrington M., Bülow R., Reinke H., Overath P. (1989) Sequence and expression of the glycosyl-phosphatidylinositol-specific phospholipase C of *Trypanosoma* brucei. Mol. Biochem. Parasitol. 33: 289-296.

Cesbron, J.Y., Capron, A., Ovlaque, G., Santoro, F., (1985) Use of a monoclonal antibody in a double-sandwich ELISA for detection of IgM antibodies to *Toxoplasma gondii* major surface protein (P30). J. Immunol. Methods. 83: 151-158.

Cesbron-Delauw M.F., Guy B., Torpier G., Pierce R.J., Lenzen G., Cesbron J.Y., Charif H., Lepage P., Darcy F., Lecocq J.P., Capron A. (1989) Molecular characterization of a 23-kilodalton major antigen secreted by *Toxoplasma gondii*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86: 7537-7541.

Cochrane A.H., Aikawa M., Jeng M., Nussenzweig R.S. (1976) Antibody-induced ultrastructural changes of malaria sporozoites. J. Immunol. 116: 859-867.

Couvreur G., Sadak A., Fortier B., Dubremetz J.F. (1988) Surface antigens of *Toxoplasma gondii*. Parasitology. 97: 1-10.

Couzineau P., Beaufine-Ducrocq H. (1969) Etude des possibilités du sarcome TG180 de la souris. Application à la toxoplasmose. Ann. Parasitol. Hum. Comp. 44: 217-222.

Cross G.A.M. (1979) Crossreacting determinants in the C-terminal region of trypanosome variant surface antigens. Nature (Lond) 277: 310-312.

Davitz M.A., Low M.G., Nussenzweig V. (1986) Release of decay-accelerating factor (DAF) from the cell membrane by phosphatidylinositol-specific phospholipase C (PIPLC). Selective modification of a complement regulatory protein. J. Exp. Med. 163: 1150-1161.

Davitz M. A., Gurnett A. M., Low M. G., Turner M. J., Nussenzweig V. (1987^a) Decay-accelerating factor (DAF) shares a commun carbohydrate determinant with the variant surface glycoprotein (VSG) of the African *Trypanosoma brucei*. J. Immunol. 138: 520-523.

Davitz M. A., Hereld D., Shak S., Krakow J., Englund P. T., Nussenzweig V. (1987^b) A glycan-phosphatidylinositol-specific phospholipase D in human serum. Science 238: 81-84.

Deas J.E., Lee L.T. (1981) Competitive inhibition by soluble erythrocyte glycoproteins of penetration by *Plasmodium falciparum*. Am. J. Med. Hyg. 30: 1164-1167.

Dubremetz J.F., Ferreira E. (1978) Capping of cationized ferritin by coccidian zoites. J. Protozool. 25: 9B.

Dubremetz J.F., Torpier G. (1978) Freeze fracture study of the pellicle of an *Eimerian* sporozoite (Protozoa, Coccidia). J. Ultrastruct. Res. 62: 94-109.

Dubremetz J.F. (1981) Le zoïte des coccidies: cytologie, biochimie, physiologie et interactions avec la cellule hôte. Thèse de Doctorat N° 515. Université de Lille I.

Dubremetz J.F., Rodriguez C., Ferreira E. (1985) *Toxoplasma gondii*: redistribution of monoclonal antibodies on tachyzoites during host cell invasion. Exp. Parasitol. 59: 24-32.

Dvorak J.A., Miller L.H., Whitehouse W.C., Shiroishi T. (1975) Invasion of erythrocytes by malaria merozoites. Science 187: 748-750.

Dzbenski T.H., Zielinska E. (1976) Antibody-induced formation of caps in *Toxoplasma gondii*. Experientia 32: 454-455.

Dzbenski TH., Michalak T., Plonka WS. (1976) Electron Microscopic and Radioisotopic Studies on Cap Formation in *Toxoplasma gondii*. Infect. Immun. 14: 1196-1201.

Edge A.S.B., Faltynek C.R., Hof L., Reichert L.E.Jr, Weber P. (1981) Deglycosylation of glycoproteins by trifluoromethanesulfonic acid. Anal. Biochem. 118: 131-137.

Endo T., Yagita K., Yasuda T., Nakamura T. (1988) Detection and localization of actin in *Toxoplasma gondii*. Parasitol. Res. 75: 102-106.

Entzeroth R. (1984) Electron microscope study of host-parasite interactions of *Sarcocystis muris* (Protozoa, coccidia) in tissue culture and *in vivo*. Z. Parasitenkd. 70: 131-134.

Entzeroth R. (1985) Invasion and early development of *Sarcocytis muris* (Apicomplexa, Sarcocystidae) in tissue cultures. J. Protozool. 32: 446-453.

Entzeroth R., Dubremetz J.F., Hodick D., Ferreira E. (1986) Immunoelectronmicroscopic demonstration of the exocytosis of dense granules contents into the secondary parasitophorous vacuole of *Sarcocystis muris* (Protozoa, Apicomplexa). Eur. J. Cell Biol. 41: 182-188.

Erickson A.H., Blobel G. (1979) Early events in the biosynthesis of the lysosomal enzyme cathepsin D. J. Biol. Chem. 254: 11771-11774.

Etges R., Bouvier J., Bordier C. (1986) The major surface protein of *Leishmania* promastigotes is a protease. J. Biol. Chem. 261: 9098-9101.

Ferguson M. A. J., Haldar K., Cross G. A. M. (1985^a) *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein has a sn-1,2-dimyristyl glycerol membrane anchor at its COOH terminus. J. Biol. Chem. **260**: 4963-4968.

Ferguson M.A.J., Low M.G., Cross G.A.M. (1985^b) Glycosyl-sn-1,2-dimyristylphosphatidylinositol is covalently linked to *Try panosoma brucei* variant surface glycoprotein. J. Biol. Chem. 260: 14547-14555.

Ferguson M.A.J., Duszenko M., Lamont G.S., Overath P., Cross G.A.M. (1986) Biosynthesis of Trypanosoma brucei variant surface glycoproteins: Nglycosylation and addition of a phosphatidylinositol membrane anchor. J. Biol. Chem. 261: 356-362.

Ferguson M.A.J., Williams A.F. (1988) Cell-surface anchoring of proteins via glycosyl-phosphatidylinositol structures. Ann. Rev. Biochem. 57: 285-320.

Fox J.A., Duszenko M., Ferguson M.A.J., Low M.G., Cross G.A.M. (1986) Purification and characterization of a novel glycanphosphatidylinositol-specific phospholipase C from *Trypanosoma brucei*. J. Biol. Chem. **261**: 15767-15771.

Fox J.A., Soliz N.M., Saltiel A.R. (1987) Purification of a phosphatidylinositolglycan-specific phosphalipase C from liver plasma membranes: a possible target of insulin action. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84: 2663-2667.

Frenkel J.K., Dubey J.P., Miller N.L. (1970) Toxoplasma gondii in cats: Fecal stages identified as coccidian oocysts. Science 167: 893-896.

Freyre A., Dubey J.P., Smith D.D., Frenkel J.K. (1989) Oocyst-induced Toxoplasma gondii infections in cats. J. Parasitol. 75: 750-755.

Fuhrman S.A., Furtado G.C., Kleinman H., Joiner K.A. (1989) Surface-exposed membrane proteins of *Toxoplasma gondii* and their interaction with laminin. Abstract n° 422, UCLA.

Grab D.J., Webster P., Ito S., Fish W.R., Verjee Y., Lonsdale-Eccles J.D. (1987) Subcellular localization of a variable surface glycoprotein phosphatidylinositol-specific phospholipase-C in African Trypanosomes. J. Cell Biol. 105: 737-746.

Grimwood B.G., Hechemy K., Stevens R.W. (1979) *Toxoplasma gondii*: purification of trophozoïtes propagated in cell culture. Exp. Parasitol. 48: 282-286.

Haas R., Brandt P.T., Knight J., Rosenberry T.L. (1986) Identification of amine components in a glycolipid membrane-binding domain at the C-terminus of human erythrocyte acetylcholinesterase. Biochemistry. 25: 3098-3105.

Haldar K., Ferguson M.A.J., Cross G.A.M. (1985) Acylation of a *Plasmodium* falciparum merozoïte surface antigen via sn-1,2-diacyl glycerol. J. Biol. Chem. 260: 4969-4974.

Hammelburger J.W., Palfree R.G., Sirlin S., Hämmerling U. (1987) Demonstration of Phosphatidylinositol anchors on Ly-6 molecules by specific phospholipase C digestion and gel electrophoresis in octylglucoside. Biochem. Biophys. Res. Commun. 148: 1304-1311.

Handman E., Goding J.W., Remington J.S. (1980) Detection and characterization of membrane antigens of *Toxoplasma gondii*. J. Immunol. 124: 2578-2583.

Hantke K., Braun V. (1973) Covalent binding of lipid to protein: diglyceride and amide-linked fatty acid at the N-terminal end of the murein-lipoprotein of the Escherichia coli outer membrane. Eur. J. Biochem. 34: 284-296.

He HT., Finne J., Goridis C. (1987) Biosynthesis, membrane association, and release of N-CAM-120, a phosphatidylinositol-linked form of the neural cell adhesion molecule. J. Cell Biol. 105: 2489-2500.

Hefta S.A., Hefta L.J.F., Lee T.D., Paxton R.J., Shively J.E. (1988) Carcinoembryonic antigen is anchored to membranes by covalent attachement to a glycosylphosphatidylinositol moiety: identification of the ethanolamine linkage site. Proc. Natl. Acad.Sci. USA. 85: 4648-4652. Hereld D., Hart G. W., Englund P.T. (1988) cDNA encoding the glycosyl-phosphatidylinositol-specific phospholipase C of *Trypanosoma brucei*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85: 8914-8918.

Homans W.S., Ferguson M.A.J., Dwek R.A., Rademacher T.W., Anand R., Williams A.F. (1988) Complete structure of the glycosylphosphatidylinositol membrane anchor of rat brain Thy-1 glycoprotein. Nature (Lond) 333: 269-272.

Hutchison, W. M. (1965) Experimental transmission of *Toxoplasma gondii*. Nature (Lond) 206: 961-962.

Hutchison, W.M., Dunachie, J.F., Siim J. C., Work, K. (1970) Coccidian-like nature of *Toxoplasma gondii*. Brit. Med. J. 1: 142-144.

Ikezawa H., Yamanegi M., Taguchi R., Miyashita T., Ohyabu T. (1976) Studies on phosphatidylinositol phosphodiesterase (phospholipase C type) of *Baccilus cereus:* purification, properties and phosphatase-releasing activity. Biochim. Biophys. Acta. 450: 154-164.

Jean F., Malapert P., Rougon G., Barbet J. (1988) Cell membrane, but not circulating, carcinoembryonic antigen is linked to a phosphatidylinositol-containing hydrophobic domain. Biochem. Biophys. Res. Commun. 155: 794-800.

Jemmerson R., Low M. G. (1987) Phosphatidylinositol anchor of Hela Cell alkaline phosphatase. Biochemistry. 26: 5703-5709.

Johnson A.M., McDonald P.J., Neoh S.H. (1981) Molecular weight analysis of the major polypeptides and glycopeptides of Toxoplasma gondii. Biochem. Biophys. Res. Commun. 100: 934-943.

Johnson A.M., McDonald P.J., Neoh S.H. (1983) Monoclonal antibodies to *Toxoplasma* cell membrane surface antigens protect mice from Toxoplasmosis. J. Protozool. 30: 351-356.

Jungery M., Pasvol G., Newbold C.I., Weatherall D.J. (1983) A lectin-like receptor is involved in invasion of erythrocytes by *Plasmodium falciparum*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80: 1018-1022.

Kasper L.H., Crabb J.H., Pfefferkorn E.R. (1982) Isolation and characterization of a monoclonal antibody-resistant antigenic mutant of *Toxoplasma gondii*. J. Immunol. 129: 1694-1699.

Kasper L.H., Crabb, J.H., Pfefferkorn, E.R. (1983) Purification of a major membrane protein of *Toxoplasma gondii* by immunoabsorption with a monoclonal antibody J. Immunol. 130: 2407-2412.

Kasper L.H., Bradley M.S., Pfefferkorn E.R. (1984) Identification of stage-specific sporozoïte antigens of *Toxoplasma gondii* by monoclonal antibodies. J. Immunol. 132: 443-449.

Kasper L.H., Currie K.M., Bradley M.S. (1985) An unexpected response to vaccination with a purified major membrane tachyzoite antigen (P 30) of *Toxoplasma gondii*. J. Immunol. 134: 3426-3431.

Kasper LH. (1987) Isolation and characterization of a monoclonal anti-P30 antibody resistant mutant of *Toxoplasma gondii*, Parasite Immunol. 9: 433-445.

King C. A. (1988) Cell motility of Sporozoan protozoa. Parasitol. today. 4: 315-319.

Khöler G., Milstein C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature (Lond) 256: 495-497.

Kornfeld R., Kornfeld S. (1985) Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. Ann. Rev. Biochem. 54: 631-664.

Krug E.C., Marr J.J., Berens R.L. (1989) Purine metabolism in *Toxoplasma gondii*. J. Biol. Chem. 264: 10601-10607.

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

Leriche M.A. (1989) Caractérisation du contenu protéique des rhoptries et des granules denses du tachyzoïte de Toxoplasma gondii. Thèse de doctorat. Université des Sciences et Techniques du Languedoc.

Low M.G., Finean J.B. (1977) Non-lytic release of acetylcholinesterase from erythrocytes by a phosphatidylinositol-specific phospholipase C. FEBS-Lett. 82: 143-146.

Low M. G., Finean J.B. (1978) Specific release of plasma membrane enzymes by a phosphatidylinositol-specific phospholipase C. Biochim. Biophys. Acta. 508:565-570.

Low M.G. (1981) Phosphatidylinositol-specific phospholipase C from Staphylococcus aureus. Methods in Enzymology. 71: 741-746.

Low M. G., Kincade P. W. (1985) Phosphatidylinositol is the membrane-anchoring domain of the Thy-1 glycoprotein. Nature (Lond) 318: 62-63.

Low M.G. (1987) Biochemistry of the glycosyl-phosphatidylinositol membrane protein anchors Biochem. J. 244: 1-13.

Low M. G., Prasad A. R. (1988^a) A phospholipase D specific for the phosphatidylinositol anchor of cell-surface proteins is abundant in plasma. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85: 980-984.

Low M.G., Saltiel R.A. (1988^b) Structural and functional roles of glycosyl-pho-phatidylinositol in membranes. Science. 239: 268-275.

Marchalonis J.J., Cone R.E., Santer V. (1971) Enzyme iodination: a probe for accessible surface proteins of normal and neoplastic lymphocytes J. Biochem. 124: 921-927.

Mauras G., Dodeur M., Laget P., Senet JM., Bourrillon R. (1980) Partial resolution of the sugar content of *Toxoplasma gondii* membrane. Biochem. Biophys. Res. Commun. 97: 906-912.

McConville M. J., Bacic A., Mitchell G. F., Handman E. (1987) Lipophosphoglycan of *Leishmania major* that vaccinates against cutaneous leishmaniasis contains an alkylglycerophosphoinositol lipid anchor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84 8941-8940.

Medof M. E., Walter E. I., Roberts W. L., Haas R., Rosenberry T. L. (1986) Decay accelerating factor of complement is anchored to cells by a C-terminal glycolipid. Biochemistry. 25: 6740-6747.

Michel R., Schupp K., Raether W., Bierther F.W., (1980) Formation of a close junction during invasion of erythrocytes by *Toxoplasma gondii in vitro*. Int. J. Parasitol. 10: 309-313.

Miller L.H., Masc. S.J., Dvorak J.A., McGinniss M.H., Rothman, I.K. (1975) Erythrocyte receptors for (*Plasmodium knowlesi*) malaria: Duffy blood group determinants. Science. 189: 561-563.

Miller L.H., Hudson D., Haynes J.D. (1988) Identification of *Plasmodium knowlesi* erythrocyte binding proteins. Mol. Biochem. Parasitol. 31: 217-222.

Mitchell G. H., Bannister L. H. (1988) Malaria parasite invasion: interactions with the red cell membrane. CRC Critical Reviews in Oncology/Hematology. 8:225-310. Morrissey J.H. (1981) Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. Anal. Biochem. 117: 307-310.

Nagel S. D., Boothroyd J. C. (1989) The major surface antigen, P30, of *Toxoplasma* gondii is anchored by a glycolipid. J. Biol. Chem. 264: 5569-5574.

Nichols B.A., Chiappino M.L. (1987) Cytoskelton of *Toxoplasma gondii*. J. Protozool. 34: 217-226.

Nicolle C., Manceaux L. (1908) Sur une infection à corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondii. C. R. Acad. Sci. 147: 763-766.

O'Farrel P. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J. Biol.Chem. 250: 4007-4021.

Olson E.N., Towler D.A., Glaser L. (1985) Specificity of fatty acid acylation of cellular proteins. J: Biol. Chem. 260: 3784-3790.

Ozols J., Carr S. A., Strittmatter P. (1984) Identification of the NH2-terminal blocking group of NADH-Cytochrome b5 reductase as myristic acid and the complete amino acid sequence of the membrane-binding domain. J. Biol. Chem. 259: 13349-13354.

Pasvol G., Wainscoat J.S., Weatherall D.J. (1982) Erythrocytes deficient in glycophorin resist invasion by the malarial parasite Plasmodium falciparum. Nature (Lond) 297: 64.

Perkins M. (1981) Inhibitory effects of erythrocyte membrane proteins on the in vitro invasion of human malarial parasite (*Plasmodium falciparum*) into nost cell. J. Cell Biol. 90: 563-567.

Perkins M.E. (1984) Binding of glycophorins to *Plasmodium falciparum* merozoites. Mol. Biochem. Parasitol. 10: 67-78. Porchet-Hennere E., Vivier E. (1971) Ultrastructure comparée des germes infectieux (sporozoïtes, mérozoïtes, schizozoïtes, endozoïtes, etc) chez les sporozoaires. Ann. Biol. 10: 77-113.

Porchet E., Torpier G. (1977) Etude du germe infectieux de *Sarcocystis tenella* et *Toxoplasma gondii* par la technique du cryodécapage. Z. Parasitenkd. 54: 101-124.

Porchet E., Torpier G., Richard A. (1982) Etude après cryofracture du mérozoïte de la coccidie Aggregata eberthi. Z. Parasitenkd. 66: 257-271.

Porchet-Hennere E., Torpier G. (1983) Relations entre *Toxoplasma* et sa cellule-hote. Protistologica 19: 357-370.

Ridgwell K., Tanner M.J.A., Anstee D.J. (1983) The Wrb antigen, a receptor for *Plasmodium falciparum* malaria, is located on a helical region of the major membrane sialoglycoprotein of human red blood cells. Biochem. J. 209: 273-276.

Rudzinska M.A., Trager W., Lewengrub S.J., Gubert, E. (1976) An electron microscopic study of *Babesia microti* invading erythrocytes. Cell Tiss. Res. 169: 323-334.

Russell D.G., Sinden R.E. (1981) The role of cytoskeleton in the motility of Coccidian sporozoites. J. Cell Science. 50: 345-359.

Ryning F.W., Remington J.S. (1978) Effect of cytochalasin D on *Toxoplasma gondii* cell entry. Infect. Immun. 20: 739-743.

Sabin A.B. (1941) Toxoplasmic encephalitis in children. J. Am. Med. Assoc. 116: 801-807.

Sadak A., Taghy Z., Fortier B., Dubremetz J.F. (1988) Characterization of a familly of rhoptry proteins of *Toxoplasma gondii*. Mol. Biochem. Parasitol. 29: 203-211.

Sadeghi H., Da Silva A.M., Klein C. (1988) Evidence that a glycolipid tail anchors antigen 117 to the plasma membrane of *Dictyostelium discoideum* cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85: 5512-5515.

Saint Blancard J., Kirzin J.M, Riberon P., Petit F., Fourcart J., Girot P., Boschetti E. (1982) A simple and rapid procedure for large scale preparation of IgGs and albumin from human plasma by ion exchange and affinity chromatography. In: Affinity Chromatography and Related Techniques. Elsevier, Amsterdam. pp. 305-312.

Santoro F., Afchain D., Pierce R., Cesbron Y., Ovlaque G., Capron A. (1985) serodiagnosis of *Toxoplasma* infection using a purified parasite protein(P30). Clin. Exp. Immunol. 62: 262-269.

Schulman S., Lee Y.C., Vanderberg J.P. (1984) Effects of neoglycoproteins on penetration of *Plasmodium falciparum* merozoites into erythrocytes *in vitro*. J. Parasit. 70: 213-216.

Schwartzman J.D., Pfefferkorn E.R. (1983) Immunofluorescent localization of myosin at the anterior pole of the Coccidian *Toxoplasma gondii*. J. Protozool. 30: 657-661.

Sealy L., Chalkley R. (1978) The effect of sodium butyrate on histone modification. Cell. 14: 115-121.

Sheetz M.P., Spudich J.A. (1983) Movement of myosin-coated fluorescent beads on actin cables in vitro. Nature (Lond) 303: 31-35.

Sibley L.D., Krahenbuhl J.L., Adams G.M.W., Weidner E. (1986) *Toxoplasma* modifies macrophage phagosomes by secretion of a vesicular network rich in surface Proteins. J. Cell. Biol. 103: 867-874.

Sibley, LD., Krahenbuhl, JL. (1988) Modification of host cell phagosomes by *Toxoplasma gondii* involves redistribution of surface proteins and secretion of a 32 kDa protein. Eur. J. Cell Biol. 47: 81-87.

Sinden R.E. (1985) A cell biologist's view of host cell recognition and invasion by malarial parasites. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 79: 598-605.

Slein M. W., Logan JR G. F. (1960) Mecanism of action of the toxin of *Bacillus* anthracis: effect in vivo on some blood serum components. J. Bacteriol. 60: 77-85.

Slein M. W., Logan JR G. F. (1963) Partial purification and properties of two phospholipases of *Bacillus cereus*. J. Bacteriol. 85: 369-381.

Slein M. W., Logan JR G. F. (1965) Characterization of the phospholipases of *Bacillus cereus* and their effects on erythrocytes, bone, and kidney cells. J. Bacteriol. 90: 69-81.

Stadler J., Keenan T.W., Bauer G., Gerisch G. (1989) The contact site A glycoprotein of *Dictyostelium discodeum* carries a phospholipid anchor of a novel type. EMBO J. 8: 371-377.

Südhof T. C., Goldstein J. L., Brown M. S., Russell D. W. (1985) The LDL receptor gene: a mosaic of exons shared with different proteins. Science 228: 815-822.

Suh P.G., Ryu S.H., Moon K.H., Suh H.W., Sue G.R. (1988) Inositol phospholipidspecific phospholipase C: complete cDNA and protein sequences and sequence homology to tyrosine kinase-related oncogene products. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85: 5419-5423.

Taguchi R., Ikezawa H. (1978) Phosphatidyl inositol-specific phospholipase C from *Clostridium novyi* type A. Arch. Biochem. Biophys. 186: 196-201.

Taguchi R., Asahi Y., Ikezawa H. (1980) Purification and properties of phosphatidylinositol-specific phospholipase C of *Bacillus thuringiensis*. Biochim. Biophys. Acta. **619**: 48-57.

Tomavo S., Dubremetz J.F., Entzeroth R. (1989) Characterization of a surface antigen of *Eimeria nieschulzi* (Apicomplexa, Eimeriidae) sporozoites. Parasitol. Res. 75: 343-347.

Tomavo S., Schwarz R.T., Dubremetz JF. (1989) Evidence for Glycosylphosphatidylinositol anchoring of *Toxoplasma gondii* major surface antigens. Mol. Cell. Biol. 9: 4576-4580. Torii M., Matsumoto Y., Kamboj K.K., Maracic M., Guo S.Q., Nussenzweig R.S., Aikawa M., Cochrane A.H. (1989) Association of microneme antigens of *Plasmodium brasilianum* merozoites with knobs and other parasite-induced structures in host erythrocytes. Infect. Immun. 57: 596-601.

Tse A.G.D., Barclay A.N., Watts A., Williams A.F. (1985) A glycophospholipid tail at the carboxyl terminus of the Thy-1 glycoprotein of neurons and thymocytes. Science 230: 1003-1008.

Vaitukaitis J., Robbins J.B., Nieschlag E., Ross T.G. (1971) A method for producing specific antisera with small doses of immunogen. J. Clin. Endocrinol. Metabol. 33: 988-991.

Vanderberg JP. (1974) Studies on the motility of *Plasmodium* Sporozoites. J. Protozool. 21: 527-537.

Vivier E., Petitprez A.J. (1969) Le complexe membranaire et son évolution lors de l'élaboration des individus-fils de *Toxoplasma gondii*. J. Cell. Biol. 43: 329-342.

Work K., Hutchison, W. M. (1969) The new cyst of *Toxoplasma gondii*. Acta Pathol. Microbiol. Scand. 75: 414.

Yasuda T., Yagita K., Nakamura T., Endo T. (1988) Immunocytochemical localization of actin in *Toxoplasma gondii*. Parasitol. Res. 75: 107-113.

Zamze S.E., Ferguson M.A.J., Collins R., Dwek R.A., and Rademacher T.W. (1988) Characterization of the cross-reacting determinant (CRD) of the glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchor of *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein. Eur. J. Biochem. 176: 527-534.

PLANCHES

PLANCHE I:

IDENTIFICATION DES AMS DES TACHYZOITES DE Toxoplasma gondii.

Figure A: Révélation des AMS par les anticorps monoclonaux après électrophorèse en gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) et transfert sur nitrocellulose:

1- P43 (1F12)

2- P35 (3F12)

3- P30 (1E5)

4- P23 (2E12)

5- P22 (3G11)

Les pistes 6 et 7 sont identiques aux immunoempreintes des protéines P23 et P22 (pistes 4 & 5) mais des dépôts protéiques moins importants sont réalisés, permettant de distinguer les familles protéiques.

Figure B: Analyse électrophorétique de l'incorporation métabolique des acides aminés radioactifs par les tachyzoïtes:

1- Protéines totales radiomarquées.

2, 3, 4, 5, 6: Immunoprécipitation des protéines de surface P43, P35, P30, P22, P23 radiomarquées par les anticorps monoclonaux.

Figure C: Biosynthèse des AMS par marquage court suivi de chasse

1, 2, 3: Immunoprécipitation de la protéine P43

4, 5, 6: Immunoprécipitation de la protéine P30

7, 8, 9: Immunoprécipitation de la protéine P23

1, 4, 7: Protéines immunoprécipitées après le marquage court de 15 minutes

2, 5, 8: marquage court de 15 minutes suivi d'une heure de chasse.

3, 6, 9: marquage long de 6 heures.





ELECTROPHORESE BIDIMENSIONNELLE DES AMS

1^{ère} dimension: Isoélectrofocalisation selon O'Farrel (1975)
Le dépc: est réalisé du côté de la cathode (-) et la migration se fait vers l'anode
(+) dans le sens de la flèche.

2^{ème} dimension: Electrophorèse en gel polyacrylamide-SDS (gel de concentration à 12%) en conditions non réductrices.

Figure A: Autoradiogramme des AMS superficiellement iodés sur les tachyzoïtes vivants par l'utilisation de la lactoperoxydase.

Les cinq antigènes majeurs de surface sont indiqués par les flèches.

Figure B: Immunoempreinte des AMS analysés en IEF et la révélation des anticorps monoclonaux est réalisée par une double coloration.

* NTB/BCIP (phosphatase alcaline): pour l'identification des isoformes appartenant aux protéines P43, P30 et P22.

* Diaminobenzidine (peroxydase): pour les protéines P35 et P23.



PLANCHE III

FLUOROGRAPHIE DES PROTEINES PARASITAIRES MARQUEES AVEC DEUX ACIDES GRAS ET DE L'ETHANOLAMINE

Figure A: Marquage métabolique des tachyzoïtes intracellulaires par les acides gras et immunoprécipitations des AMS acylés.

1 et 6: Les protéines totales des tachyzoïtes qui sont respectivement marqués à l'acide palmitique et à l'acide myristique.

2, 3, 4, 5, 12: Immunoprécipitations des protéines de surface P30, P43, P35, P22 et P23 incorporant de l'acide palmitique.

7, 8, 9, 10, et 11: Immunoprécipitations des protéines de surface marquées avec de l'acide myristique. L'ordre des dépôts protéiques est identique à celui des marquages avec l'acide palmitique.

Dans ce fluorogramme, la protéine P23 (pistes 11 et 12) a été analysée par électrophorèse dans un gel de polyacrylamide 15%. Dans ces conditions elle apparaît sous la forme d'un doublet protéique.

Figure B: Incorporation d'éthanolamine tritiée dans les AMS par marquage métabolique.

Pistes 1, 2, 3, 4: Les protéines P43, P30, P22 et P23 radiomarquées et immunoprécipitées par les anticorps monoclonaux.





B

MARQUAGE METABOLIQUE DES TACHYZOITES INTRACELLULAIRES AVEC DES MONOSACCHARIDES TRITRIES

Pistes 1, 6, et 11: Les protéines totales des tachyzoïtes respectivement incubés avec de la glucosamine, du mannose et du galactose.

2, 3, 4, 5, 16: Incorporation de la glucosamine dans les protéines P30, P43, P35, P22 et P23 immunoprécipitées par les différents anticorps monoclonaux.

7, 8, 9, 10, 18: Immunoprécipitations des cinq protéines de surface marquées avec du mannose par les anticorps monoclonaux.

12, 13, 14, 15, 17: Incorporation de galactose et immunoprécipitations des protéines cinq de surface par les anticorps monoclonaux.



PLANCHE V

ETUDE DE LA PHOSPHORYLATION DES AMS

Figure A: Immunoprécipitations et autoradiogramme des protéines de surface radiomarquées métaboliquement à l'orthophosphate (³²P).

Les pistes 1, 2, 3, 4, et 5 correspondent aux immunoprécipitations des protéines P43, P35, 30, 23, et 22 phosphorylées.

Figures B et C: Analyse en électrophorèse bidimensionnelle des protéines P43 et P30 phosphorylées.

Figure D: Electrophorèse monodimensionnelle sur couche mince (gel de silice) des phosphoaminoacides des protéines P30 et P22.

* Pistes 1 et 2: Hydrolysats acides partiels des protéines P30 et P22 phosphorylées.

* La migration des standards d'acides aminés phosphorylés mélangés et déposés avec les hydrolysats radioactifs permet d'identifier majoritairement la phosphosérine dans ces deux AMS.




PRODUCTION DES SERUMS POLYCLONAUX ANTI-P43 ET ANTI-P23

Pistes 1 et 2: Coloration au nitrate d'argent des protéines P43 et P23 purifiées par affinité et électroéluées d'un gel de polyacrylamide.

3: Immunoempreinte d'un lysat parasitaire révélée par le sérum de lapin anti-P43.

4: Immunoprécipitation de la protéine P43 par le sérum anti-P43 à partir d'un lysat de tachyzoïtes iodés superficiellement.

5: Protéine P43 immunoprécipitée par l'anticorps monoclonal 1F12.

6: Immunoempreinte d'un lysat parasitaire révélée par le sérum de lapin anti-P23.

7: Révélation de la même immunoempreinte par l'anticorps monoclonal 2E12.



ETUDE COMPARATIVE DE LA SOLUBILISATION D'ANTIGENES DE SURFACE DE TOXOPLASMA GONDII, DE LEISHMANIA DONOVANI ET D'EIMERIA NIESCHULZI PAR LA PIPLC

Figure A: Tachyzoïtes vivants iodés et traités par la PIPLC

1- Profil des AMS après radioiodation superficielle.

2- Zoïtes incubés sans la lipase.

3- Surnageant correspondant aux zoïtes incubés sans enzyme.

4- Tachyzoïtes traités par la PIPLC

5- Surnageant correspondant aux zoïtes incubés avec la PIPLC.

Cette piste 5 montre que les cinq antigènes majeurs de surface sont décrochés des zoïtes par la PIPLC et retrouvés dans le milieu d'incubation.

Figures B et C: Promastigotes de Leishmania et les sporozoïtes d'Eimeria sont traités dans les mêmes conditions expérimentales que les tachyzoïtes.



PLANCHE VIII

Figure A: Analyse simultanée des migrations électrophorétiques des AMS de tachyzoïtes vivants traités par la PIPLC et des AMS non traités

1- Lysat des AMS iodés non traités.

2- AMS traités par la PIPLC.

Pistes 3, 5, 7, 9: Immunoprécipitations des protéines P43, P30, P22 et P23 iodées à partir du lysat analysé sur la piste 1.

Pistes 4, 6, 8, 10: Immunoprécipitations des cinq protéines de surface à partir du lysat parasitaire traité par la PIPLC et analysé sur la piste 2.

Figure B: Décrochage par la PIPLC du signal radioactif des AMS marqués à l'acide palmitique tritié

Pistes 1, 3, 5, 7, 9: Immunoprécipitations des protéines P43, P35, P30, P22 et P23 à partir du lysat parasitaire acylé et incubé sans enzyme.

Pistes 2, 4, 6, 8, 10: Immunoprécipitations des cinq protéines de surface à partir d'un lysat parasitaire contenant des protéines marquées à l'acide palmitique et

traitées à la PIPLC. Absence complète de signal radioactif sur tous les AMS.

Figure C: Mise en évidence de déterminants communs entre la protéine P43 et les trois autres AMS puis entre les AMS et la VSG de Trypanosoma brucei

Pistes 6, 7, 8, 9, 10 : Le matériel identique à celui de la planche VII-A est déposé en SDS-PAGE et révélé après électrotransfert sur nitrocellulose par le sérum de lapin anti-P43. La piste 10 montre que le sérum anti-P43 reconnaît en plus de la protéine P43, trois protéines de poids moléculaires 35, 32, et 22 kDa dans le surnageant d'incubation des zoïtes superficiellement iodés.

Pistes 1, 2, 3, 4, 5: Autoradiogramme de l'immunoempreinte décrite cidessus montrant que les trois protéines de poids moléculaires 35, 32 et 22 kDa présentant une réactivité croisée vis à vis du sérum anti-P43 correspondent aux trois autres antigènes de surface clivés par la PIPLC.

Pistes 11 et 12 : Immunoempreintes des AMS traités par la PIPLC et révélées par le sérum anti-CRD de Trypanosoma brucei (piste 12) et le sérum anti-P43 (piste 11).



PLANCHE IX

Figure A: Cinétique d'hydrolyse des AMS de tachyzoïtes superficiellement iodés par la PIPLC

Pistes 1, 2, 3, 4, 5: zoïtes récupérés après 0, 15, 30, 45, 60 minutes d'incubation enzymatique.

Pistes 6, 7, 8, 9, 10: surnageant d'incubation correspondant aux différents temps d'incubation enzymatique.

Figure B: Essai de réexpression des AMS par des tachyzoïtes vivants iodés puis traités par la PIPLC

1- Profil des AMS après radioiodation superficielle.

2- Zoïtes traités après PIPLC.

3- Surnageant d'incubation correspondant à la piste 2 montrant que tous les AMS sont décrochés.

4 et 5: Après élimination de la PIPLC, les zoïtes sont réincubés dans un milieu de culture normal pendant 15 minutes (piste 4) et 30 minutes (piste 5) puis iodés superficiellement une deuxième fois.





CARACTERISATION BIOCHIMIQUE DES MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES DES ANTIGENES MAJEURS DE SURFACE DE TOXOPLASMA GONDII

Toxoplasma gondii est un protozoaire parasite intracellulaire obligatoire qui infeste tous les vertébrés homéothermes. Ce parasite responsable de la toxoplasmose chez l'homme est l'objet de nombreuses recherches visant à la mise au point de réactifs de diagnostic et de vaccins. La forme infectieuse ou tachyzoîte possède 5 antigènes majeurs superficiels (P43, P35, P30, P23 & P22). Nous avons, au moyen d'anticorps monoclonaux spécifiques, caractérisé ces protéines par électrophorèse mono- et bidimensionnelle et étudié leur biosynthèse ainsi que leur mode d'ancrage dans la membrane du parasite.

Cette étude a permis de mettre en évidence l'incorporation métabolique de monosaccharides, d'acides gras, d'éthanolamine et de phosphate radioactifs dans les cinq antigènes majeurs de surface. La solubilisation de ces molécules par la phosphatidylinositol spécifique phospholipase C (PIPLC) ainsi que la présence d'un déterminant croisé avec la VSG de Trypanosoma ont permis d'établir que ces antigènes sont ancrés par une structure glycosylphosphatidylinositol dans la pellicule du zoïte.

L'analyse par électrophorèse en couche mince des hydrolysats acides de protéines purifiées a montré que les protéines P30 et P22 sont également phor horylées sur la sérine.