

50376
1994
235

N° d'ordre : 1383

Université des Sciences et Technologies de Lille

50376
1994
235

Thèse

présentée par

Françoise Routier

pour l'obtention du grade de

Docteur de l'Université

Spécialité : Biochimie

Etude structurale des glycoinositolphospholipides de parasites de la famille des Trypanosomatidae

Soutenance le 14 Octobre 1994 devant la commission d'examen

Président : Professeur André VERBERT

Rapporteurs : Professeur Heinz EGGE
Docteur Christopher JONES

Examineurs : Professeur Bruno DOMON
Docteur Daniel POULAIN
Docteur Gérard STRECKER



030 054732 1

A la mémoire du Professeur Bernard FOURNET

Ces travaux ont été réalisés dans le Laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et Technologies de Lille (Relations structure-fonction des constituants membranaires, Unité Mixte de Recherche n°111 du C.N.R.S., Directeur : Professeur André VERBERT) sous la direction du Professeur Bernard FOURNET et dans le Département de Microbiologie Générale de l'Université de Rio de Janeiro sous la direction du Professeur Lucia MENDONCA-PREVIATO.

Nous avons bénéficié d'une allocation du Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur et d'une aide du C.N.P.q. (Conseho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

ATP	adénosine-triphosphate
Ara	arabinose
FAB	fast atom bombardment
Gal.....	galactose
Gal _f	galactofuranose
GC-MS	couplage chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse
GDP-Man	guanosine-diphosphate-mannose
GIPL.....	glycoinositolphospholipide
Glc	glucose
GlcNH ₂	glucosamine
GlcNAC	N-acétylglucosamine
GlcA.....	acide glucuronique
GPI.....	glycosyl-phosphatidylinositol
GPI-PLC	glycosyl-phosphatidylinositol phospholipase C
GPS	glycophosphosphingolipides
GTP	guanosine-triphosphate
HPAEC.....	chromatographie d'échange d'anions à haut pH
Ins	<i>myo</i> -inositol
LPG	lipophosphoglycane
LPPG.....	lipopeptidophosphoglycane
Man	mannose
MS-MS	spectrométrie de masse en tandem
PO ₄	phosphate
PI.....	phosphatidyl-inositol
PI-PLC	phosphatidylinositol phospholipase C
PKC	protéine kinase C
UDP-Gal	uridine-diphosphate-galactose
UDP-Glc.....	uridine-diphosphate-glucose
UDP-GlcNAC.....	uridine-diphosphate N-acétylglucosamine
RMN.....	résonance magnétique nucléaire

INTRODUCTION	8
GENERALITES	9
LES PARASITES DE LA FAMILLE DES TRYPANOSOMATIDAE	9
I. Morphologie des parasites	9
A. Les leishmanies	10
B. Les trypanosomes	11
II. Cycles des parasites et mode de contamination	12
A. Cycle évolutif des leishmanies	12
B. Cycle évolutif de <i>Trypanosoma cruzi</i>	13
C. Cycle évolutif de <i>Trypanosoma brucei</i>	14
III. Leishmanioses et Trypanosomiases	15
A. Les leishmanioses	15
B. Les trypanosomiases	16
LES GLYCOSYL-PHOSPHATIDYLINOSITOLS ANCRANT LES PROTEINES	18
I. Structures des glycosyl-phosphatidylinositols	18
A. Glycosyl-phosphatidylinositols d'origine parasitaire	18
1. Partie glycanique	18
2. Partie lipidique	20
B. Comparaison avec les glycosyl-phosphatidylinositols d'autres origines	21
1. Partie glycanique	21
2. Partie lipidique	22

II. Fonctions des glycosyl-phosphatidylinositols	24
A. Fonctions des glycosyl-phosphatidylinositols communes aux eucaryotes inférieurs et supérieurs	24
1. <i>Fixation stable des protéines à la membrane</i>	24
2. <i>Internalisation dans des puits dépourvus de chlatrines</i>	24
3. <i>Influence de l'ancrage sur la location cellulaire et la fonction de la protéine</i>	25
4. <i>Libération sélective par des enzymes spécifiques</i>	25
B. Fonctions des glycosyl-phosphatidylinositols chez les parasites	25
C. Fonctions des glycosyl-phosphatidylinositols chez les eucaryotes supérieurs	28
III. Biosynthèse des glycosyl-phosphatidylinositols	28
A. Fixation du glycosyl-phosphatidylinositol à la protéine	28
B. Biosynthèse du noyau structural des glycosyl-phosphatidylinositols	29
C. Biosynthèse des glycosyl-phosphatidylinositols chez <i>Trypanosoma brucei</i>	31
1. <i>Ancrage de l'antigène variable</i>	31
2. <i>Ancrage de la procycline</i>	33
D. Biosynthèse des glycosyl-phosphatidylinositols chez d'autres organismes	33

LES LIPOPHOSPHOGLYCANNES **35**

I. Structures des lipophosphoglycannes	35
A. Description des structures des lipophosphoglycannes extraits de promastigotes procycliques	35
1. <i>Le phosphoglycanne</i>	35
1. <i>L'ancrage de glycosyl-phosphatidylinositol.</i>	38
B. Modifications structurales des lipophosphoglycannes au cours du développement du parasite	39
1. <i>Au cours de la métacyclogenèse</i>	39
2. <i>Au cours de la différenciation des promastigotes en amastigotes</i>	42
C. Structure tridimensionnelle des lipophosphoglycannes	42
D. Relation entre le facteur excrété et les lipophosphoglycannes	43

II. Fonctions des lipophosphoglycannes	45
A. Fonctions des lipophosphoglycannes chez l'insecte vecteur	45
1. <i>Protection des parasites contre les attaques enzymatiques</i>	45
2. <i>Rôle dans la colonisation de l'insecte vecteur et dans la migration des parasites</i>	46
B. Fonctions des lipophosphoglycannes chez l'hôte mammifère	46
1. <i>Résistance à la lyse par le système du complément</i>	47
2. <i>Activation du complément</i>	47
3. <i>Interaction promastigotes - macrophages</i>	48
4. <i>Survie intracellulaire</i>	49
III. Biosynthèse des lipophosphoglycannes	51

LES GLYCOINOSITOLPHOSPHOLIPIDES **52**

I. Parasites du genre <i>Leishmania</i>	52
A. Structures des glycoinositolphospholipides	52
1. <i>Description des structures des glycoinositolphospholipides extraits de différentes espèces de <i>Leishmania</i></i>	52
2. <i>Modifications structurales des glycoinositolphospholipides au cours du développement du parasite</i>	57
B. Fonctions des glycoinositolphospholipides	59
1. <i>Précurseurs biosynthétiques des lipophosphoglycannes</i>	59
2. <i>Précurseurs biosynthétiques des glycosyl-phosphatidylinositols ancrant les protéines</i>	60
3. <i>Protection du parasite</i>	60
4. <i>Intéactions hôte-parasite</i>	61
C. Biosynthèse des glycosyl-phosphatidylinositols libres	61
1. <i>Biosynthèse des glycoinositolphospholipides</i>	61
2. <i>Biosynthèse des lipophosphoglycannes</i>	62
II. Autres parasites de la famille des Trypanosomatidae	64
A. <i>Trypanosoma cruzi</i>	64
B. <i>Leptomonas samueli</i> et <i>Endotrypanum schaudinii</i>	65

OBJECTIFS DE TRAVAIL	68
<i>MATERIELS ET METHODES</i>	69
<i>TRAVAUX PERSONNELS</i>	73
GLYCOSYLINOSITOLPHOSPHOLIPIDS FROM MEMBERS OF THE TRYPANOSOMATIDAE FAMILY: INVESTIGATION ON THE LIPID MOIETY	73
CHEMICAL CHARACTERIZATION OF GLYCOSYLINOSITOLPHOSPHOLIPDS OF <i>HERPETOMONAS SAMUELPESSOAI</i>	79
STRUCTURES OF FOUR OLIGOSACCHARIDES DERIVED FROM THE GLYCOINOSITOLPHOSPHOLIPID OF <i>LEISHMANIA ADLERI</i>	117
CONCLUSION	143
<i>BIBLIOGRAPHIE</i>	147

FIGURES

Figure 1 :	Classification de la famille des Trypanosomatidae	9
Figure 2 :	Morphologie des leishmanies	10
Figure 3 :	Morphologie des trypanosomes	11
Figure 4 :	Cycle évolutif des leishmanies	13
Figure 5 :	Cycle évolutif de <i>Trypanosoma cruzi</i>	14
Figure 6 :	Distribution géographique des trypanosomiasés	17
Figure 7 :	Structures des GPI ancrant l'antigène variable et la procycline de <i>Trypanosoma brucei brucei</i>	19
Figure 8 :	Structure du GPI ancrant les protéines de <i>Leishmania major</i>	20
Figure 9 :	Structure du GPI ancrant les protéines de <i>Trypanosoma cruzi</i>	20
Figure 10 :	Structures des GPI ancrant les protéines de différentes origines	23
Figure 11 :	Représentation schématique de la surface cellulaire à différents stades du développement de <i>Trypanosoma brucei</i> et <i>Leishmania spp.</i>	27
Figure 12 :	Shéma de biosynthèse des GPI ancrant les protéines chez les trypanosomatides et les mammifères	30
Figure 13 :	Structures des lipophosphoglycannes de trois espèces de <i>Leishmania</i> : Structure générale et variations spécifique de l'espèce.	36
Figure 14 :	Structures des GIPL extraits d'une souche de <i>Leishmania major</i> naturellement déficiente en LPG	53
Figure 15 :	Structures des principaux GIPL extraits de promastigotes de <i>Leishmania</i>	54
Figure 16 :	Structures des principaux GIPL extraits des promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i>	56
Figure 17 :	Structures des GIPL extraits des amastigotes de <i>Leishmania donovani</i>	59
Figure 18 :	Shéma de biosynthèse des GPI chez les leishmanies	63
Figure 19 :	Structures des GIPL de <i>Trypanosoma cruzi</i>	65
Figure 20 :	Structure des GIPL d' <i>Endotrypanum schaudinii</i>	66
Figure 21 :	Structures des GIPL de <i>Leptomonas samueli</i>	66
Figure 22 :	Stratégie pour l'isolement et l'étude structurale des GIPL	72

TABLEAUX

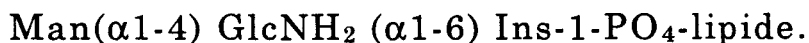
Tableau I :	Structures et abondance des coiffes des lipophosphoglycannes de trois espèces de <i>Leishmania</i>	38
Tableau II :	Principales modifications structurales du lipophosphoglycanne au cours du développement du parasite.	42
Tableau III :	Fonctions des lipophosphoglycannes	51
Tableau IV :	Comparaison de l'abondance des GIPL dans les deux principaux stades du développement de <i>L. major</i>	59

INTRODUCTION

Les parasites de la famille des Trypanosomatidae sont responsables de parasitoses communes à l'Homme et certains animaux, telles que la maladie de Chagas, la maladie du sommeil ou les leishmanioses. Ils infectent un grand nombre d'individus et posent un important problème de santé publique, notamment dans les pays tropicaux.

La surface de ces parasites est couverte d'un manteau riche en glycosyl-phosphatidylinositols (GPI) jouant un rôle déterminant dans les interactions hôte-parasite. Les recherches actuelles pour le contrôle des infections parasitaires sont donc essentiellement orientées vers la caractérisation de ces molécules potentiellement vaccinales.

Le terme GPI désigne une famille de molécules possédant le motif structural :



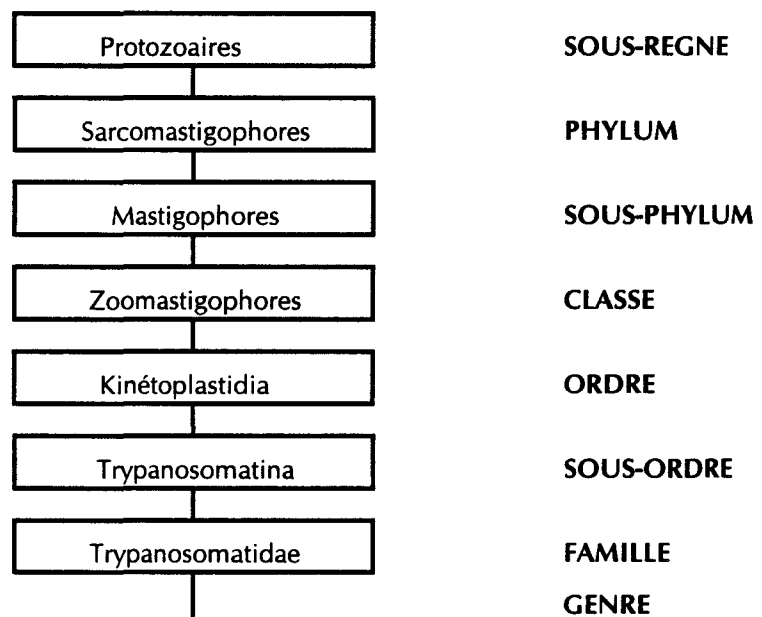
Elles peuvent être liées à l'extrémité carboxy-terminale de diverses protéines et permettre ainsi leur ancrage à la membrane cytoplasmique. En plus de ces GPI ancrant les protéines, de nombreux protozoaires synthétisent des GPI libres, c'est à dire non liés à une protéine. Ce sont d'une part les lipophosphoglycannes (LPG) principalement rencontrés chez les leishmanies, et d'autre part les glycoinositolphospholipides (GIPL) présents chez divers parasites de la famille des Trypanosomatidae. Notre connaissance des GPI s'est considérablement accrue ces dernières années. Toutefois de nombreuses questions restent posées concernant notamment les fonctions biologiques de ces molécules. De même, les études ayant trait aux GIPL ne font que débuter, et actuellement notre connaissance de cette dernière classe de GPI est extrêmement limitée.

Après une brève présentation des parasites de la famille des Trypanosomatidae, les structures, fonctions et mécanismes de biosynthèse des différentes classes de GPI seront abordées. Puis nos travaux concernant l'étude structurale des GIPL de plusieurs trypanosomatides seront présentés.

GENERALITES

LES PARASITES DE LA FAMILLE DES TRYPANOSOMATIDAE

Les parasites de la famille des Trypanosomatidae comportent un grand nombre de protozoaires flagellés (Figure 1) pouvant être répartis en deux grands groupes selon leur cycle biologique. Les parasites polyxènes (ou hétéroïques) alternent entre un insecte vecteur et un hôte vertébré (*Leishmania*, *Trypanosoma*, *Endotrypanum*) ou une plante (*Phytomonas*). Tandis que les trypanosomatides monoxènes (ou autoïques) (*Herpetomonas*, *Leptomonas*, *Crithidia*, *Blastocrithidia*, *Rhyncoïdomonas*) sont restreints à un seul hôte invertébré, le plus souvent un insecte ou un arachnide. Seuls les parasites des genres *Leishmania* et *Trypanosoma* sont pathogènes pour l'Homme et ont, en conséquence, fait l'objet de recherches intensives. Ces deux genres sont ici présentés brièvement.



Crithidia *Leptomonas* *Herpetomonas* *Blastocrithidia* *Rhyncoïdomonas* *Trypanosoma* *Phytomonas* *Leishmania* *Endotrypanum*

Figure 1 : Classification de la famille des Trypanosomatidae

I. Morphologie des parasites

Certains parasites s'adaptent au milieu dans lequel ils évoluent, en changeant de forme (pléomorphisme). Chaque forme est définie par des critères tel que l'aspect général de la cellule, la position du kinétoplaste et du blépharoplaste par rapport au noyau.

A. Les leishmanies

Les leishmanies sont des organismes flagellés, existant sous deux formes : les amastigotes et les promastigotes (Figure 2).

Les premiers correspondent à la forme intracellulaire présente chez l'homme et certains vertébrés. Ce sont des cellules ovoïdes, mesurant de 3 à 5 μm . Chaque cellule contient un noyau pourvu d'un gros caryosome central, un kinétoplaste, et un appareil flagellaire rudimentaire composé d'un blépharoplaste d'où se détache une racine flagellaire. Le kinétoplaste est un organite spécifique aux kinétoplastides, correspondant à une région spécialisée de l'unique mitochondrie de ces protozoaires et étroitement associé au blépharoplaste. Les promastigotes apparaissent dans les cultures, chez l'insecte vecteur et dans le sang de l'hôte vertébré. Ils ont une forme allongée et sont mobiles grâce à un flagelle antérieur. Aucuns critères morphologiques ne permet de distinguer les promastigotes procycliques, formes de reproduction, des promastigotes métacycliques, formes infectieuses.

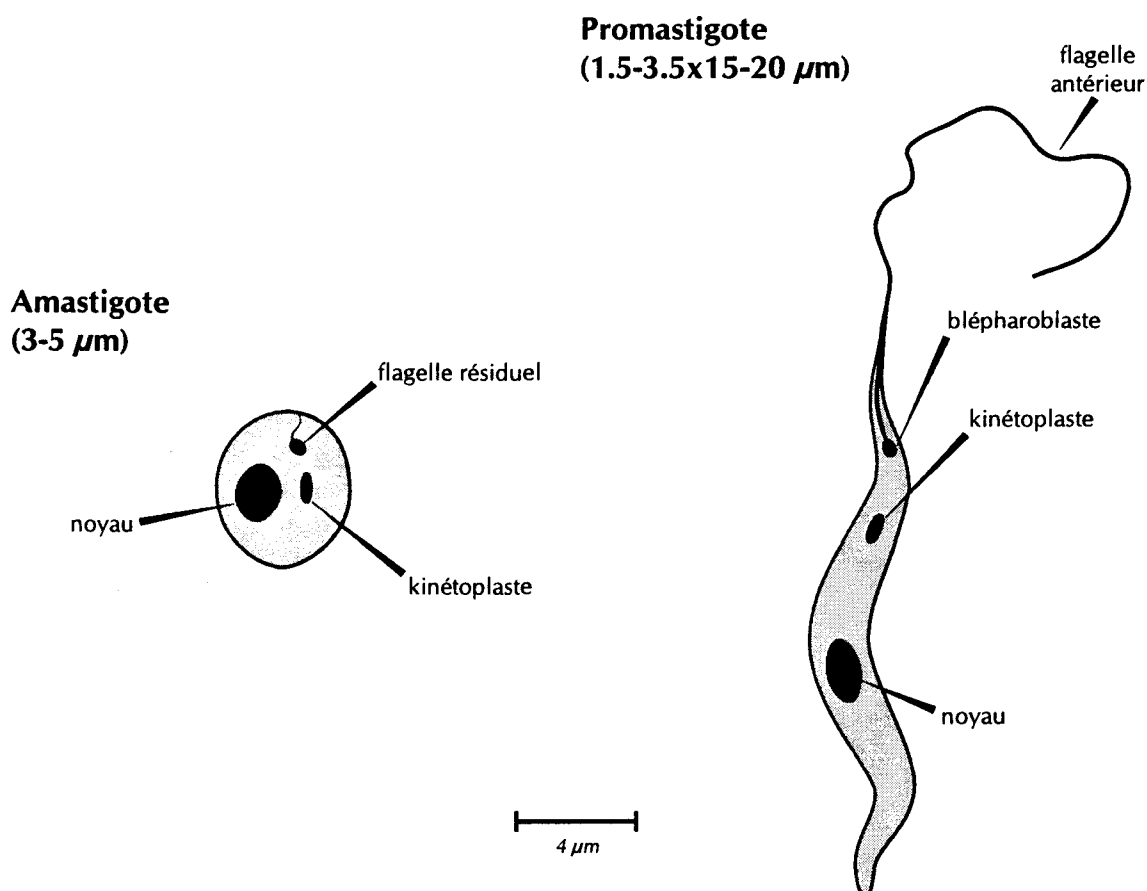


Figure 2 : Morphologie des leishmanies

B. Les trypanosomes

Les parasites du genre *Trypanosoma* sont décrits sous trois formes (Figure 3). Les amastigotes correspondent à la forme intracellulaire présente chez l'hôte mammifère. Chez *Trypanosoma brucei brucei*, parasite extracellulaire, ils ont été décrits dans le liquide cérébro-spinal. Les épimastigotes, formes non infectieuses du parasite, sont eux rencontrés dans l'appareil digestif de l'insecte vecteur et les cultures axéniques. Ces formes assurent la reproduction des parasites. Enfin, la forme trypomastigote est la forme infectieuse du parasite. Elle est présente dans le tube digestif de l'insecte et dans les cultures axéniques.

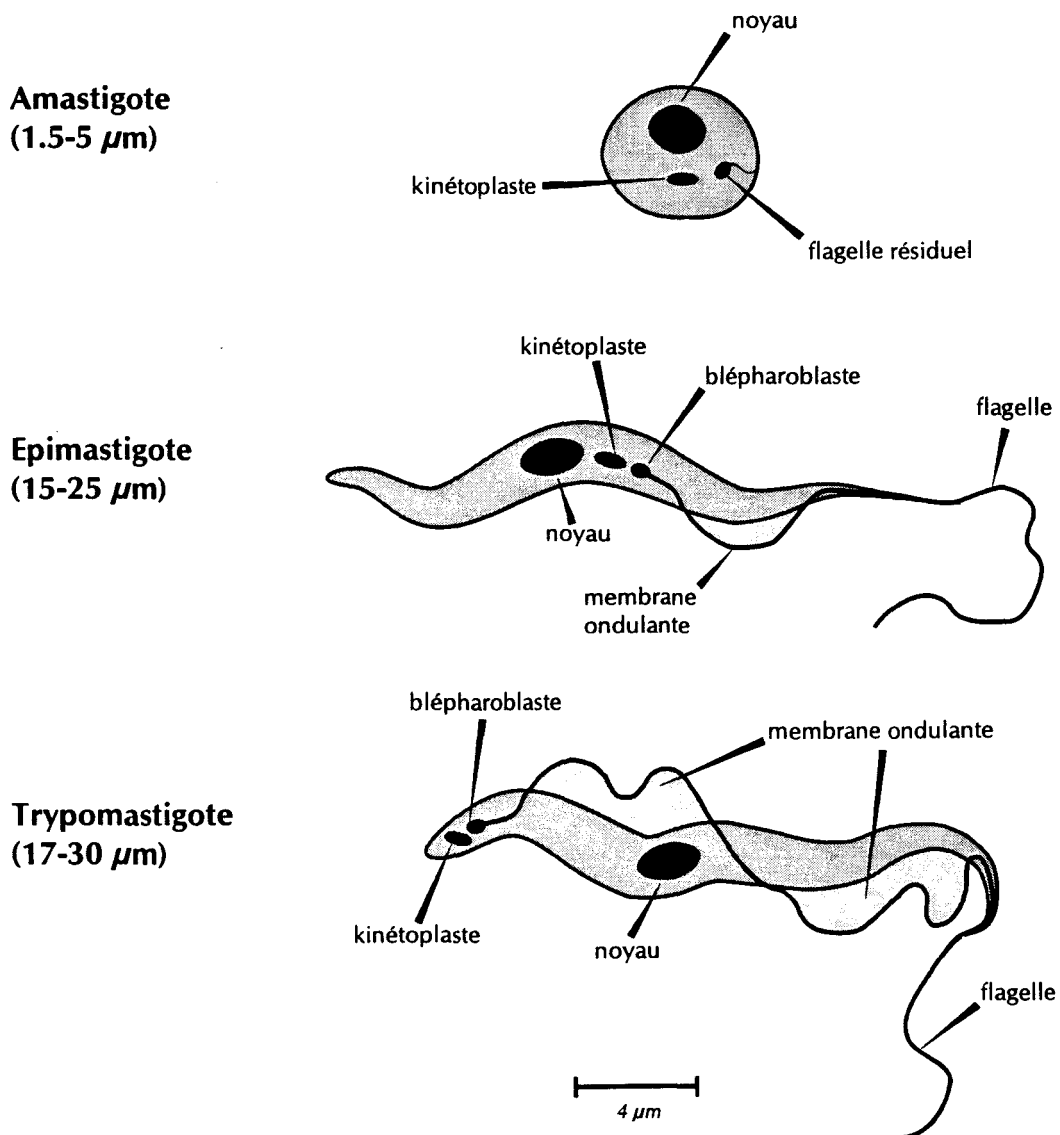


Figure 3 : Morphologie des trypanosomes

II. Cycles des parasites et mode de contamination

Les protozoaires sont de plus grande taille que les autres agents infectieux. Cependant, certains parasites sont suffisamment petits pour pénétrer à l'intérieur des cellules humaines et s'y développer. D'autres possèdent un cycle de vie entièrement extracellulaire. Quelques exemples sont décrits ci-dessous.

A. Cycle évolutif des leishmanies

Les insectes vecteurs de leishmanies, les phlébotomes (genres *phlebotomus* et *lutzomya*) s'infectent en piquant un homme ou un animal malade et en absorbant ainsi des monocytes ou des histiocytes parasités. Les amastigotes ingérés se transforment rapidement en promastigotes procycliques qui se multiplient activement dans le tube digestif de l'insecte. Après un période d'environ une semaine, les promastigotes deviennent infectieux (promastigotes métacycliques) et migrent vers le proboscis. La contamination humaine est alors assurée par la piqûre de phlébotome qui régurgite les parasites dans la plaie lors des efforts de succion. Seule la femelle est hématophage.

Les promastigotes métacycliques sont ensuite phagocytés par les macrophages et se différencient en amastigotes. Ceux-ci se multiplient dans les macrophages jusqu'à ce que la cellule hôte éclate, libérant les parasites qui pénètrent aussitôt dans d'autres macrophages ou dans des monocytes (Figure 4).

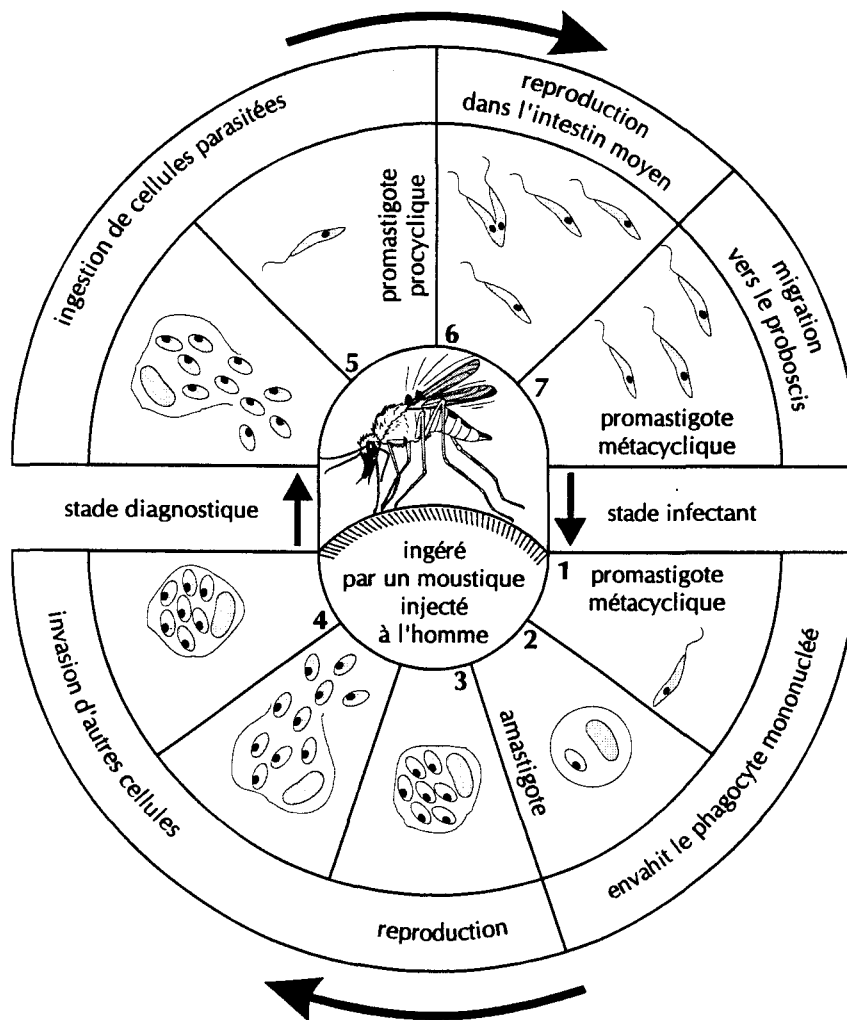


Figure 4 : cycle évolutif des leishmanies

B. Cycle évolutif de *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi est transmis à l'homme par piqûre d'insectes de la famille des Reduviidae (principaux genres *Triatoma*, *Rhodnius* et *Panstrongylus*). Ils transmettent le parasite à la faveur d'un repas sanguin par leurs contaminations fécales et non par inoculation. Les trypomastigotes métacycliques déposés sur la peau entrent dans la circulation sanguine en pénétrant par des plaies. Les formes circulantes pénètrent ensuite dans les tissus, comme le muscle cardiaque ou les muscles lisses de l'intestin, où ils se multiplient sous forme d'amastigotes. Dans la cellule hôte, les amastigotes se différencient en trypomastigotes qui sont libérés dans la circulation sanguine lors de la lyse cellulaire. Ces derniers peuvent soit envahir de nouvelles cellules ou infecter les insectes vecteurs lors d'un repas sanguin.

Les trypomastigotes ingérés par l'insecte se transforment en épimastigotes dans l'intestin antérieur. Puis, après plusieurs divisions cellulaires les parasites se différencient à nouveau en trypomastigotes métacycliques infectieux (Figure 5).

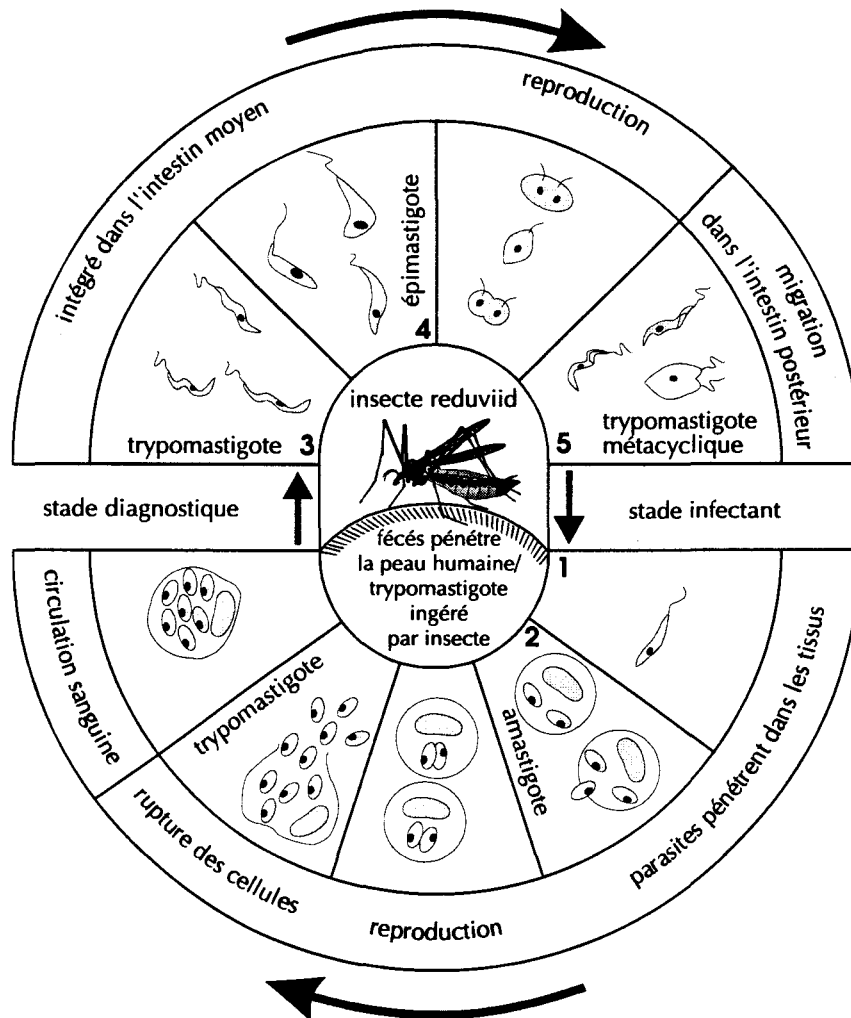


Figure 5 : cycle évolutif de *Trypanosoma cruzi*

C. Cycle évolutif de *Trypanosoma brucei*

Trypanosoma brucei, contrairement aux deux parasites précédents, possède un cycle entièrement extracellulaire. Son mode de transmission est semblable à celui des leishmanies. Les trypomastigotes métacycliques sont inoculés dans le sang par piqûre de l'insecte vecteur : la glossine ou mouche tsé tsé (*Glossina palpalis*, *Glossina morsitans*). Ils se développent en une population pléomorphique composée d'une part de formes courtes et

épaisses, incapables de se diviser, et d'autre part de formes longues et fines assurant la reproduction des parasites par fission binaire. Les formes longues subissent continuellement un processus de variation antigénique responsable des différentes vagues de parasitémie. En d'autres termes, les parasites modifient les antigènes variables de leur revêtement superficiel pour échapper aux mécanismes de défense de l'hôte. Ces mêmes formes entrent dans le fluide cérébro-spinal ou elles se différencient en amastigotes. A partir de ces amastigotes, de nouveaux trypomastigotes peuvent se former et retourner dans la circulation sanguine. Ils s'y multiplient et se différencient en trypomastigotes courts et épais, infectieux pour l'insecte.

Les trypomastigotes ingérés par l'insecte au cours d'un repas de sang entrent par le canal digestif. Ils se transforment en épimastigotes qui se multiplient et migrent vers la valve proventriculaire et les glandes salivaires.

Pour tous ces parasites, d'autres voies de transmission sont possibles, mais restent rares. Des cas exceptionnels de transmission interhumaine directe notamment transfusionnelle ou vénérienne ont été rapportés. De même, il est possible qu'une mère transmette le parasite à son enfant.

III. Leishmanioses et Trypanosomiasés

A. Les leishmanioses

Les leishmanioses sont des infections possédant une répartition mondiale (seule l'Australie semble épargné). Approximativement 350 millions d'individus vivent actuellement dans des régions endémiques et risquent donc d'être contaminés. Trois types de leishmanioses sont distinguées : les leishmanioses viscérales (*Leishmania donovani*, *Leishmania infantum*, *Leishmania chagasi*, etc.), les leishmanioses cutanées (*Leishmania major*, *Leishmania infantum*, *Leishmania tropica*, etc.) et les leishmanioses mucocutanées (*Leishmania mexicana*, *Leishmania braziliensis*, etc.). Les réservoirs des diverses espèces de *Leishmania* diffèrent selon les régions. Dans les foyers primaires, ce sont des animaux

sauvages : rongeurs ou canidés. Dans ces foyers, l'endémie leishmanienne se maintient chez l'animal et les cas humains sont accidentels. Dans les foyers secondaires, les animaux domestiques, notamment les chiens, représentent les principaux réservoirs. La contamination humaine y est plus fréquente. Enfin, dans les foyers tertiaires, l'homme constitue le réservoir principal.

B. Les trypanosomiasés

La maladie de Chagas ou Trypanosomiase américaine est une infection créée par le parasite *Trypanosoma cruzi*. Cette maladie sévit essentiellement à Mexico, en Amérique du sud et en Amérique centrale (Figure 6). 16 à 18 millions de sujets sont infectés par ce parasite et environ 90 millions d'individus habitent dans des zones à risque. Les réservoirs de parasites sont des animaux sauvages (rongeurs, opossums, chauve-souris) ou des animaux domestiques (chiens, chats, bovidés).

La trypanosomiase africaine, plus connu sous le nom de maladie du sommeil, est causée par deux sous espèces de *T. brucei* (*T. brucei gambiense* et *T. brucei rhodesiense*). Le nombre de patients atteints par cette maladie est estimé à 25 millions et environ 50 millions de personnes vivent dans des régions d'endémie (Figure 6). Comme pour *T. cruzi*, les réservoirs de parasites peuvent être des animaux sauvages (antilopes) ou domestiques.

A l'heure actuelle, l'éradication de toutes ces maladies est impossible. Le dépistage et le traitement des malades n'ont d'importance que lorsque l'Homme est le principal réservoir de parasites. Le réservoir sauvage est hors d'atteinte. La destruction des insectes vecteurs par des pesticides peut également aider à la lutte contre ces maladies. Mais il ne s'agit là que de solutions partielles. L'une des plus grandes difficultés pour l'obtention de vaccin est liée au polymorphisme et aux variations antigéniques des parasites, tout particulièrement dans le cas des trypanosomes.

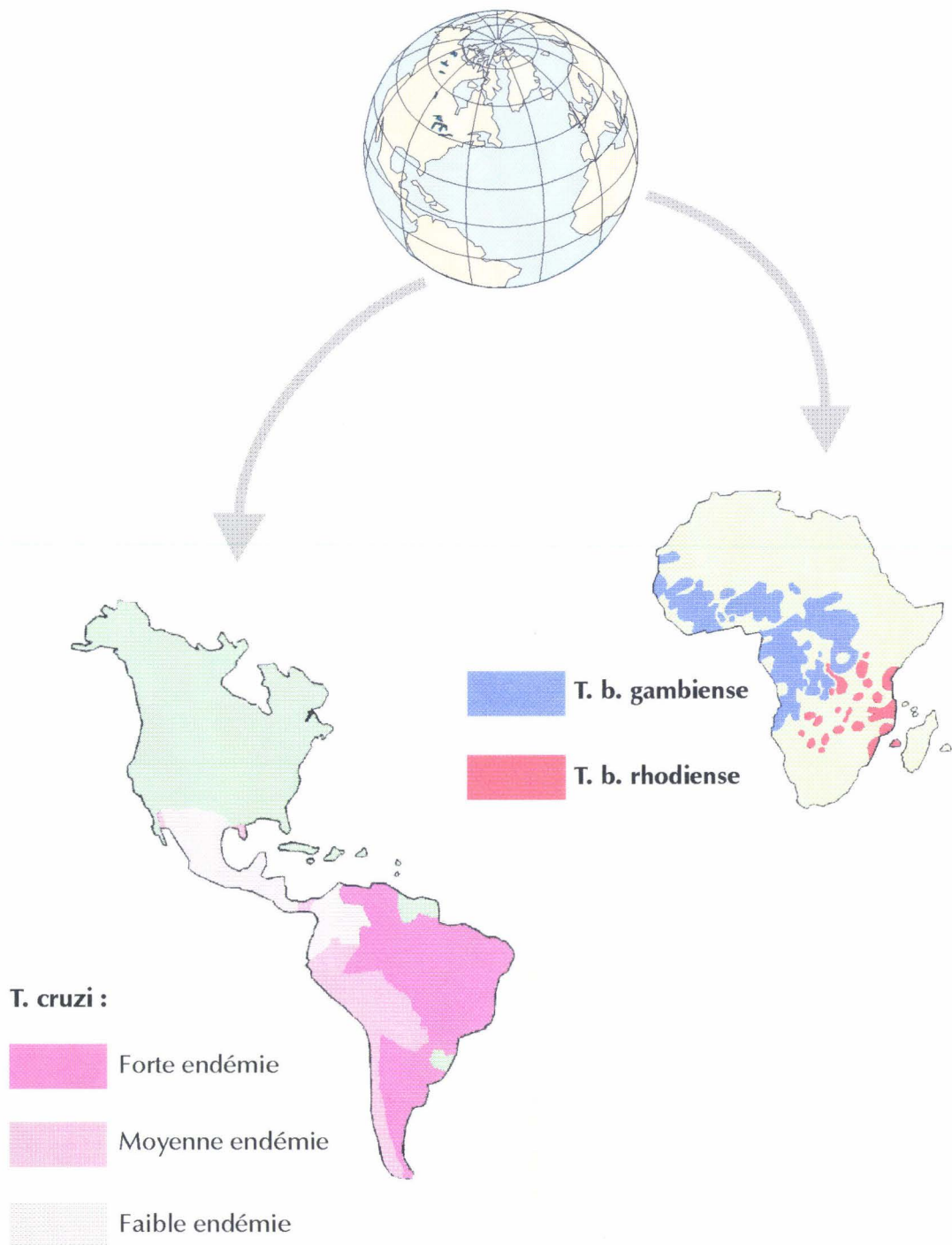


Figure 6 : Distribution géographique des trypanosomiasis

LES GLYCOSYL-PHOSPHATIDYLINOSITOLS ANCRANT LES PROTEINES

Dans les cellules eucaryotes, de nombreuses protéines sont ancrées dans le feuillet externe de la membrane plasmique par l'intermédiaire d'un GPI. Ces glycolipides sont particulièrement abondants chez les parasites de la famille des Trypanosomatidae. Une grande diversité de protéines sont ainsi liées à la membrane : protéines du manteau, enzymes, antigènes, etc (Ferguson, 1992b; McConville et Ferguson, 1993; Englund, 1993).

I. Structures des glycosyl-phosphatidylinositols

Le trypanosome africain *Trypanosoma brucei brucei* (*T. b. brucei*) a joué un rôle déterminant dans la découverte et l'étude des GPI. La surface de ce parasite est couverte d'antigènes glycoprotéiques variables ancrés dans la membrane plasmique par des GPI. Un trypanosome donné n'exprime qu'un seul type d'antigène à la fois, mais possède plusieurs centaines de gènes codant des antigènes immunologiquement différents. L'expression séquentielle de ces différents antigènes permet au parasite d'échapper au système immunitaire de l'hôte. L'abondance des antigènes à la surface du parasite a facilité la purification et l'analyse structurale des ancrages. La structure complète du GPI ancrant l'un de ces antigènes a été décrite en 1988, par Ferguson et ses collaborateurs. Depuis les structures de GPI de diverses origines ont été élucidées (McConville et Ferguson, 1993; Englund, 1993; Menon, 1994).

A. Glycosyl-phosphatidylinositols d'origine parasitaire

Dans toutes les molécules étudiées, l'acide aminé carboxy-terminal de la protéine est lié par l'intermédiaire d'une éthanolamine phosphate au tétrasaccharide $\text{Man}(\alpha 1-2)\text{Man}(\alpha 1-6)\text{Man}(\alpha 1-4)\text{GlcNH}_2$. Ce tétrasaccharide est lui-même fixé par une liaison glycosidique à un inositol-phospholipide. La présence d'un résidu de glucosamine non acétylé est une caractéristique des molécules de la famille des GPI. Ce résidu est tout à fait inhabituel dans les autres glycoconjugués des parasites.

1. Partie glycannique

Le squelette décrit précédemment peut être substitué par des monosaccharides ou des oligosaccharides. La nature des substituants varie

selon l'espèce parasitaire considérée, mais aussi selon le stade du développement du parasite.

Les ancrages des antigènes variables de *T. b. brucei* possèdent des chaînes latérales d' α -galactose (Figure 7) dont la taille diffère selon la sous-classe de glycoprotéine considérée. Ces sous-classes sont basées sur l'homologie de séquence de l'extrémité carboxy-terminale. Les GPI fixant les protéines de la première sous classe contiennent environ 4 résidus de galactose par molécule, ceux fixant celles de la seconde sous classe en contiennent environ 8, les autres n'en contiennent aucun. D'autre part, une variation de la taille des chaînes latérales est également observée à partir d'une préparation homogène de glycoprotéine (Ferguson *et al.*, 1988).

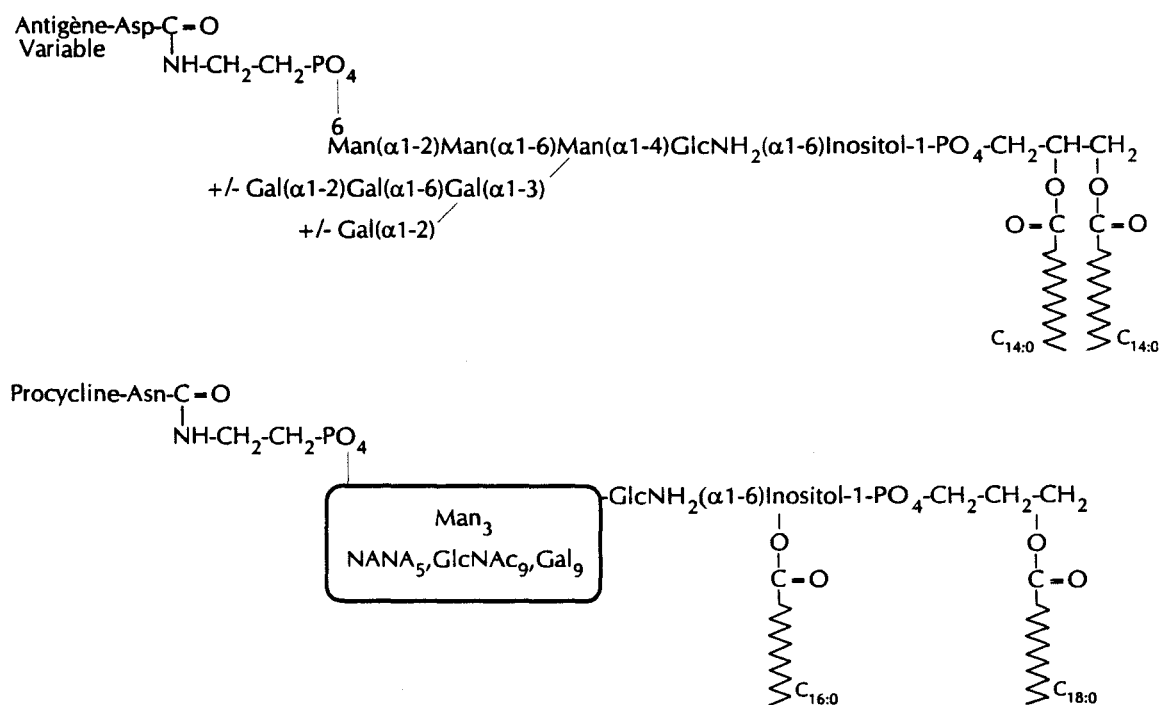


Figure 7 : Structures des GPI ancrant l'antigène variable et la procycline de *Trypanosoma brucei* (Ferguson *et al.*, 1988; Ferguson *et al.*, 1993; McConville et Ferguson, 1993)

La forme procyclique de *T. b. brucei* (forme présente chez l'insecte) exprime une autre glycoprotéine de surface : la procycline encore appelée PARP (procyclic acidic repetitive protein). Cette glycoprotéine est également ancrée dans la membrane par l'intermédiaire d'un GPI dont la structure a été partiellement caractérisée (Figure 7). La composition en monosaccharide de ce dernier est extrêmement inhabituelle. Les chaînes latérales

effet, l'attache glycolipidique de l'antigène variable possède exclusivement du dimyristylglycérol. De même, celle de la procycline contient uniquement du 1-stéaryl-2-*lyso* glycérol (Field *et al.*, 1991).

Les GPI ancrant les protéines peuvent également posséder un acide gras estérifiant l'inositol. Cet acide gras est le plus souvent de l'acide palmitique (C16:0). Le site de substitution de l'inositol n'a été étudié que pour l'ancrage de la procycline. Pour celui-ci, le palmitate est fixé sur l'hydroxyl en position 2 ou en 3 de l'inositol (Ferguson, 1992a). Toutefois, il est probable qu'une seule position soit estérifiée *in vivo*. L'hétérogénéité de position observée serait dans ce cas liée à la migration de l'acide gras lors de l'analyse du GPI. L'acylation de l'inositol confère généralement une résistance à la phosphatidylinositol phospholipase C d'origine bactérienne (PI-PLC), ainsi qu'à la phospholipase spécifique des GPI extraite de *T. b. brucei* (GPI-PLC).

B. Comparaison avec les glycosyl-phosphatidylinositols d'autres origines

Des GPI ancrant les protéines extraits de levures, de champignons, de poissons ou de divers mammifères ont également fait l'objet d'analyses structurales. Ces analyses révèlent que la séquence éthanolamine-PO₄-Man(α1-2)Man(α1-6)Man(α1-4)GlcNH₂(α1-6)Ins-PO₄-lipide est conservée dans toutes les molécules de GPI étudiées jusqu'à présent (Figure 10).

1. Partie glycanique

Dans les GPI ancrant les protéines d'eucaryotes inférieurs et supérieurs, un résidu de mannose peut substituer l'extrémité non réductrice du noyau glycanique Man(α1-2)Man(α1-6)Man(α1-4)GlcNH₂. Cette substitution déjà décrite pour l'antigène 1G7 de *T. cruzi*, est rencontrée dans les ancrages de quelques protéines extraites de levures, de champignons, ou de mammifères (Fankhauser *et al.*, 1993; Haynes *et al.*, 1993; Homans *et al.*, 1988) (Figure 10). D'autres oses neutres ou aminés peuvent également être portés par le noyau glycanique. Par exemple, l'ancrage de l'acétyl-choline estérase extraite de l'organe électrique du poisson *Torpedo californica* possède un résidu de glucose (Mehlert *et al.*, 1993). Les ancrages peuvent aussi présenter des chaînes latérales

complexes. C'est le cas du GPI fixant la protéine du prion (Stahl *et al.*, 1992). Par contre, aucun de ces GPI ne possède de chaînes latérales de galactose similaires à celles rencontrées chez *T. b. brucei* (Figure 10).

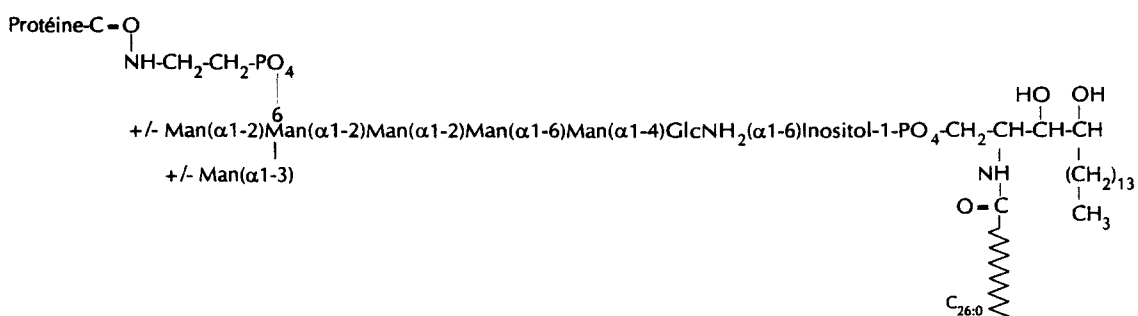
En plus de ces substituants de nature saccharidique, les organismes multicellulaires (y compris *Dictyostelium discoideum*) peuvent posséder des résidus de phosphoéthanolamine. Par exemple, l'ancrage de l'acétyl-choline estérase humaine présente un ou deux résidus de phosphoéthanolamine, en plus de celui permettant la fixation de la protéine au glycanne (Figure 10) (Roberts *et al.*, 1988b; Deeg *et al.*, 1992).

2. Partie lipidique

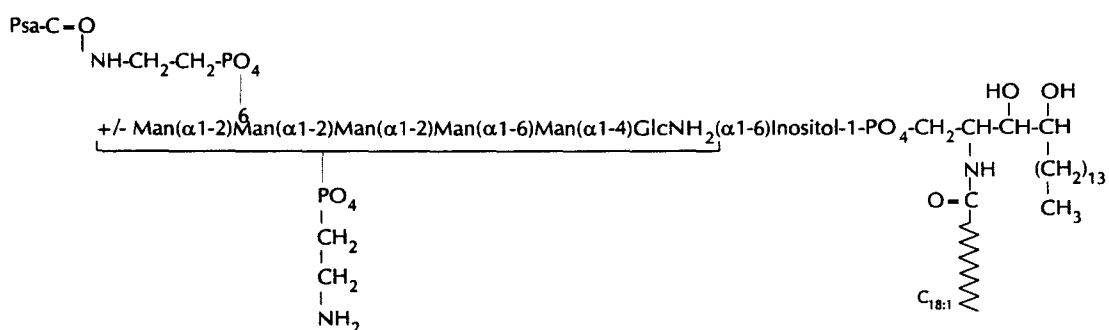
Comme dans les GPI d'origine parasitaire, la partie lipidique de l'ancrage est un diacyl-PI ou un alkylacyl-PI (Bütikofer *et al.*, 1990; Roberts *et al.*, 1988a; Luhrs et Slomiany, 1989). Des céramides ont également été caractérisés dans les ancrages présents chez *Saccharomyces cerevisiae* (Conzelmann *et al.*, 1992) et *Dictyostelium discoideum* (Figure 10) (Haynes *et al.*, 1993). Ces ancrages ne sont pas à proprement parler des GPI et peuvent être dénommés glycophosphosphingolipides (GPS). Toutefois, ils sont généralement classés dans la famille des GPI.

La présence d'acide gras estérifiant l'inositol a également été soulignée dans divers GPI de mammifères. Cette acylation de l'inositol gêne l'action de la PI-PLC. Cependant l'ancrage de la protéine liant le folate (rencontrée dans différents tissus et milieux biologiques) constitue une exception puisqu'il est sensible à la PI-PLC bien que l'inositol soit estérifié (Luhrs et slomiany, 1989; Lee *et al.*, 1992).

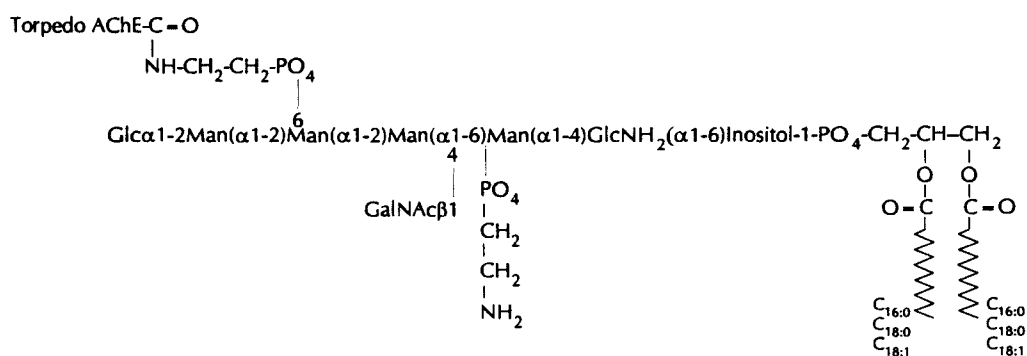
Levure



Dictyostelium discoideum



Protéines de poisson



Protéines mammifères

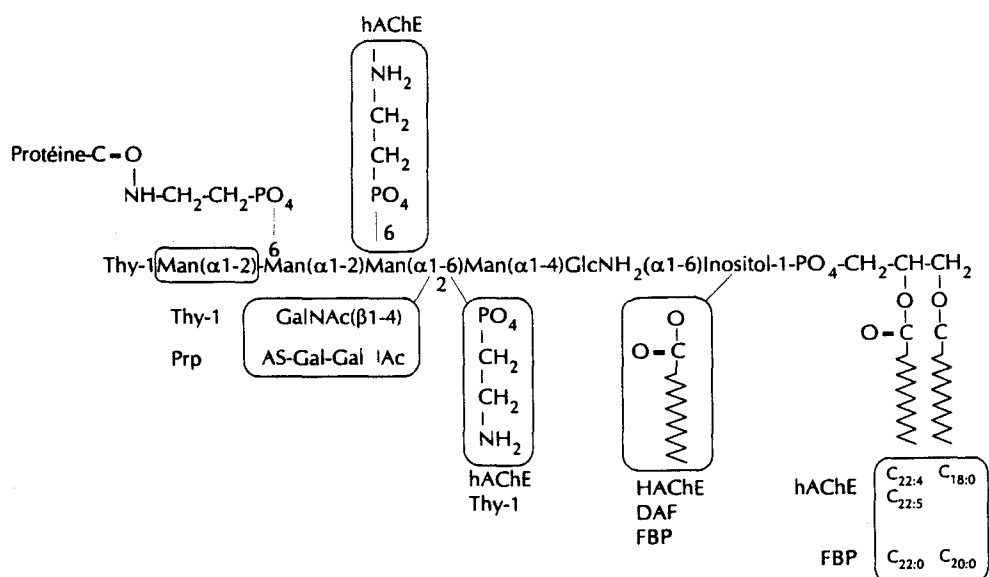


Figure 10 : Structures des GPI ancrant les protéines de différentes origines (Fankhauser *et al.*, 1993; Haynes *et al.*, 1993; Homans *et al.*, 1988; Mehlert *et al.*, 1993; Stahl *et al.*, 1992; Roberts *et al.*, 1988b; Deeg *et al.*, 1992; Roberts *et al.*, 1988b; Deeg *et al.*, 1992)

II. Fonctions des glycosyl-phosphatidylinositols

Certaines fonctions des GPI ancrant les protéines sont communes aux eucaryotes inférieurs et supérieurs. D'autres représenteraient des adaptations spécifiques avantageuses soit pour les organismes unicellulaires, soit pour les organismes pluricellulaires (Ferguson, 1991; 1994; Ferguson *et al.*, 1991).

A. Fonctions des glycosyl-phosphatidylinositols communes aux eucaryotes inférieurs et supérieurs

1. Fixation stable des protéines à la membrane

En 1972, le modèle membranaire de la mosaïque fluide faisait uniquement mention de protéines transmembranaires (Singer et Nicolson, 1972). Les interactions hydrophobes entre la bicouche lipidique et les acides aminés hydrophobes de la protéine étaient supposées être à la base de tout ancrage. Or des liaisons covalentes entre protéine et lipide peuvent également permettre l'ancrage des protéines à la membrane. Ces liaisons s'exercent par exemple entre un résidu de sérine et un groupement isoprenyl (Maltese *et al.*, 1990) ou encore entre l'acide aminé carboxy-terminal de la protéine et un GPI. La fonction première des GPI est donc de permettre une association stable entre les protéines et la bicouche lipidique.

Les protéines qui emploient un GPI sont extrêmement diverses (hydrolases, antigènes, molécules d'adhésion cellulaire, récepteurs, etc.). Il n'existe donc aucune corrélation entre la fonction de la protéine et l'utilisation de ce mode d'ancrage. Quel peut donc être l'avantage du GPI?

2. Internalisation dans des puits dépourvus de chlatrines

Les protéines glypiées, par définition, ne possèdent pas de domaine cytoplasmique et ne peuvent donc pas interagir directement avec les composants intracellulaires. L'endocytose par l'intermédiaire des puits recouverts de chlatrines nécessite un signal contenu dans le domaine cytoplasmique de la protéine. Elle ne permet donc pas l'internalisation des protéines glypiées. De plus, les protozoaires *T. cruzi* et *T. b. brucei* sont dépourvus de chlatrines. Les protéines sont endocytées dans des puits non recouverts. Ce mode d'internalisation pourrait en partie expliquer leur faible taux de renouvellement.

Chez les mammifères, un autre mécanisme appelé potocytose intervient. Il s'agit d'une pseudo-endocytose faisant appel à des puits recouverts de calvéoline (protéine de 22 kDa) (Anderson *et al.*, 1992; Rothberg *et al.*, 1992)

3. Influence de l'ancrage sur la location cellulaire et la fonction de la protéine

Certaines protéines glypiées peuvent également exister sous forme transmembranaire ou sous forme soluble. Lorsqu'elle est ancrée par un GPI, la protéine est totalement isolée du milieu intracellulaire. Au contraire, la forme transmembranaire de cette même protéine est capable d'interagir avec les composants cytoplasmiques. Ainsi, sa fonction peut être modifiée.

La métallo-protéase gp63 des leishmanies est un exemple de protéine existant à la fois sous forme glypiée et sous forme soluble. La surface du promastigote est couverte de métallo-protéases glypiées. Lors de la différenciation du parasite en amastigote, elles disparaissent de la surface et seules quelques enzymes solubles subsistent au niveau du lysosome (Bahr *et al.*, 1993). Ces observations suggèrent que le type d'ancrage puisse réguler la localisation cellulaire d'une protéine.

4. Libération sélective par des enzymes spécifiques

La présence d'un GPI pourrait permettre la libération sélective de la protéine qu'il porte par l'intervention d'une phospholipase endogène spécifique. Une phospholipase C spécifique des GPI (GPI-PLC) a en effet été identifiée dans les trypomastigotes de *T. b. brucei*. Cependant, des études de microscopie électronique indiquent que l'enzyme est située sur la face cytoplasmique des vésicules intracellulaires. Elle se trouve donc sur la face opposée de son substrat potentiel : l'antigène variable. Cette enzyme serait plutôt impliquée dans le catabolisme des précurseurs de GPI en excès. De plus, *in vitro*, la libération de l'antigène variable est réalisée par action d'une protéase (Ziegelbauer *et al.*, 1993)

B. Fonctions des glycosyl-phosphatidylinositols chez les parasites

Les GPI constituent le principal mode d'ancrage des protéines rencontré chez les parasites. Ils ont probablement été sélectionnés par ces organismes dans un but de protection. En effet, les GPI isolent le parasite

du milieu drastique où il évolue en permettant l'entassement des protéines à la surface cellulaire. D'autre part, ils renforcent la protection apportée par le manteau protéique, en formant eux-mêmes une barrière de diffusion.

Ceci est parfaitement illustré par l'ancrage de l'antigène variable de *T. b. brucei*. Dans cet organisme, dix millions de molécules d'antigène variable (d'environ 60 kDa) sont présentes à la surface de chaque cellule et apportent une protection contre le système immunitaire de l'hôte. La protection contre l'immunité non spécifique (voie alterne du complément) provient de l'entassement des antigènes à la surface du parasite. Ceux-ci créent une barrière de diffusion laissant passer les nutriments, mais gênant l'accès des macromolécules (> 20 kDa) à la membrane.

Par ailleurs, les chaînes oligosaccharidiques de l'ancrage participent à la formation du manteau cellulaire. Des études de la conformation tridimensionnelle du GPI suggèrent que la partie glycanique de celui-ci s'étende le long de la membrane couvrant ainsi une surface d'environ 6 nm² (Homans *et al.*, 1989).

D'autres observations supportent ce rôle de barrière des GPI. Il existe une corrélation entre la taille des chaînes latérales de galactose et la classe de glycoprotéines (cf. p. 19). Ceci suggère que la structure tridimensionnelle du domaine carboxy-terminal de la protéine puisse moduler l'accessibilité de l'ancrage aux galactosyl-transférases. Ces dernières peuvent être considérées comme des sondes spatiales capables d'étendre les chaînes de galactoses jusqu'à ce que l'encombrement stérique les en empêche. Ainsi les GPI et en particulier les chaînes latérales de galactose occupent l'espace proche de la membrane plasmique et maintiennent l'intégrité de la membrane.

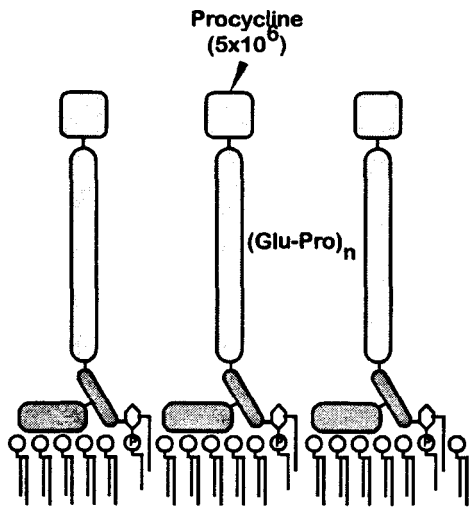
Un rôle semblable est proposé pour l'ancrage de la procycline qui lui aussi possède de grandes chaînes latérales. De plus, ces chaînes possèdent des résidus d'acide sialiques qui leur procurent une conformation étendue (Ferguson *et al.*, 1993). Ces résidus d'acides sialiques pourraient également empêcher l'activation de la voie alterne du complément lorsque le parasite est exposé à un repas de sang dans les glandes salivaires de l'insecte (Tomlison *et al.*, 1992).

Par ailleurs, il faut observer que contrairement aux leishmanies, *T. b. brucei* est dépourvu de GPI libres (LPG et GIPL) (Figure 11).

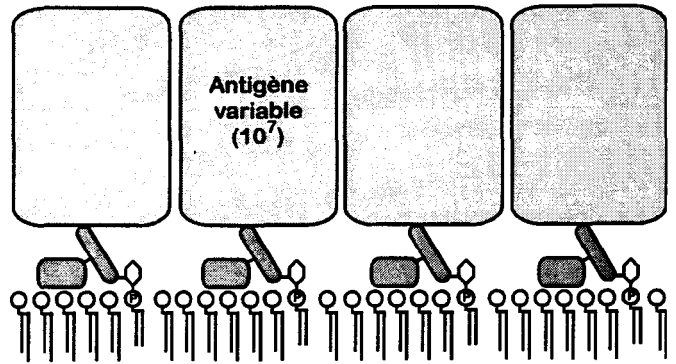
Or la procycline et son ancrage sont des molécules polyanioniques dont la densité de charge est similaire à celle du LPG. D'autre part, le nombre de molécules de procycline par trypanosome est d'environ $3,5 \cdot 10^6$, c'est à dire

Trypanosoma brucei

Epimastigote

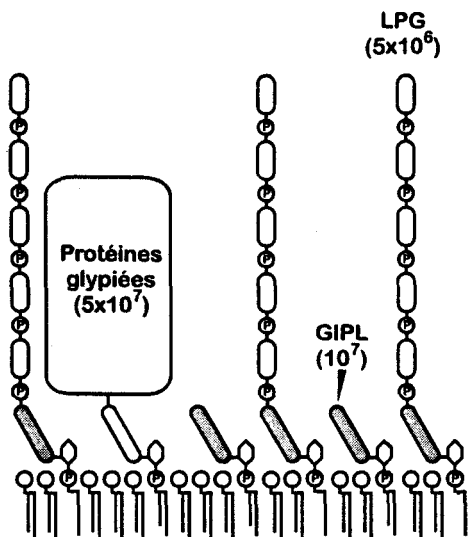


Trypomastigote



Leishmania spp.

Promastigote



Amastigote

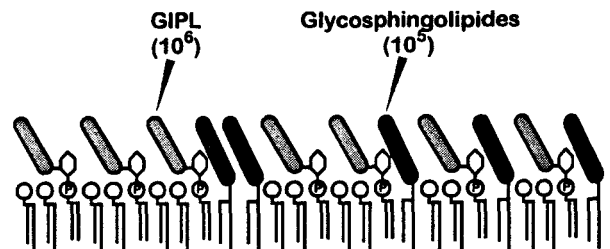


Figure 11: Représentation schématique de la surface cellulaire à différents stades du développement de *Trypanosoma brucei* et *Leishmania* spp.

comparable au nombre de molécules de LPG par parasite (Ferguson et al., 1993). Ces molécules procycline et LPG pourraient donc exercer des fonctions similaires dans la protection du parasite dans les glandes salivaires de l'insecte (cf. p. 46).

C. Fonctions des glycosyl-phosphatidylinositols chez les eucaryotes supérieurs

Chez les eucaryotes supérieurs, seule une minorité de protéines est ancrée dans la membrane par un GPI. Ces organismes nécessitent des systèmes de communication complexes. Ils privilégient de ce fait les protéines transmembranaires qui permettent une transmission directe de l'information, à travers la membrane cellulaire.

Comme chez les protozoaires, les GPI peuvent avoir un rôle de protection de la cellule vis à vis du milieu environnant. Les cellules telles que les cellules épithéliales de l'estomac situées dans un milieu drastique, sont effectivement riches en GPI. Les GPI interviennent également dans le transport vésiculaire des protéines qu'ils portent. Dans les cellules polarisées comme les cellules épithéliales, les protéines ancrées par un GPI sont assemblées dans des microdomaines et dirigées vers la membrane apicale. Enfin, les GPI ont été impliqués dans la potocytose (Rothberg et al., 1990; Anderson *et al.*, 1992) ou encore dans la signalisation transmembranaire dans les cellules lymphoïdes et myéloïdes. Toutes ces fonctions nécessitent l'association des protéines glypiées dans des microdomaines riches en sphingolipides et en cholestérol (Ferguson *et al.*, 1991; Ferguson, 1994).

III. Biosynthèse des glycosyl-phosphatidylinositols

Comme les études structurales, les études concernant la biosynthèse des GPI ont tout d'abord été menées sur les parasites, puis sur les levures et les mammifères. Les mécanismes de biosynthèse des GPI présentent de nombreuses similarités dans ces différents organismes (Englund, 1993).

A. Fixation du glycosyl-phosphatidylinositol à la protéine

L'extrémité carboxy-terminale d'une protéine destinée à recevoir un GPI doit comporter un signal pour la fixation de l'ancrage. Il comprend

généralement une séquence de 12 à 20 acides aminés hydrophobes. Le site de clivage et d'addition du GPI se situe légèrement en amont de cette séquence. La fixation du GPI sur la protéine a lieu sur la face luminale du réticulum endoplasmique, une à cinq minutes après l'achèvement de la synthèse peptidique (Ferguson *et al.*, 1986; Conzelmann *et al.*, 1988). La rapidité de ce processus suggère l'existence d'un GPI préassemblé. Celui-ci a tout d'abord été identifié chez les trypanosomes africains, puis chez les levures et les mammifères. L'addition du GPI se fait probablement par une réaction de transamidation au cours de laquelle l'extrémité carboxy-terminale de la protéine est clivée et remplacée par l'ancrage glycolipidique. Cette réaction ne nécessite aucun nucléotide triphosphate (Mayor *et al.*, 1991). Toutefois le GTP et l'ATP semblent requis pour une étape préalable à la transamidation elle-même.

B. Biosynthèse du noyau structural des glycosyl-phosphatidylinositols

Les premières informations concernant la biosynthèse des GPI proviennent de l'étude des trypanosomes africains. L'incubation de microsomes dérivés des formes sanguicoles de *T. b. brucei* avec des donneurs de monosaccharides radiomarqués tel que UDP-[³H]Glc ou GDP-[³H]Man a permis l'obtention d'intermédiaires biosynthétiques. La caractérisation de ces intermédiaires a rapidement conduit à l'élaboration d'un schéma de biosynthèse (Figure 12). Par la suite, d'autres études menées chez les mammifères ou les levures ont révélées le caractère universel de ce schéma de biosynthèse.

La première étape est le transfert de N-acétylglucosamine à partir de l'UDP-GlcNAC sur le phosphatidylinositol (PI). Le produit de cette réaction est immédiatement déacétylé pour former le glucosaminylnyl-PI (Doering *et al.*, 1989). Ensuite, trois résidus de mannose sont successivement ajoutés sur le chaînon GlcNH₂-PI. Dans ces trois étapes le donneur de mannose est le dolichol-phosphoryl-mannose (DolPMan) (Menon *et al.*, 1990a; 1990b).

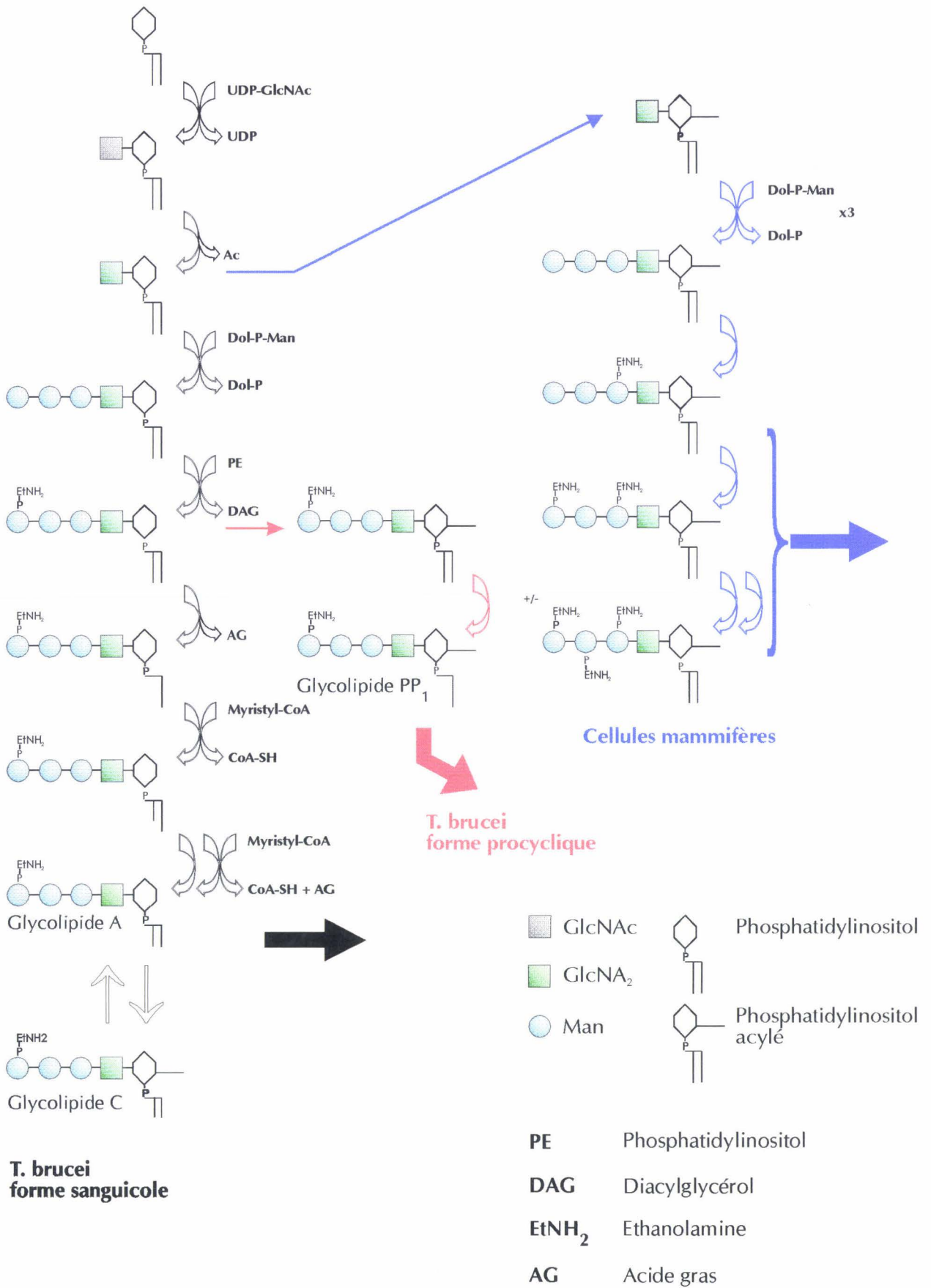


Figure 12 : Schéma de biosynthèse des GPI ancrant les protéines chez les trypanosomatides et les mammifères

Enfin, le noyau structural des GPI est complété par addition d'éthanolamine phosphate provenant de la phosphatidyl-éthanolamine (Menon *et al.*, 1993).

La formation du chaînon GlcNH₂-PI se déroule sur le feuillet cytoplasmique du réticulum endoplasmique (Vidugiriene et Menon, 1993; Menon et Vidugiriene, 1994) et nécessite les produits d'au moins trois gènes. Dernièrement l'enzyme responsable de la déacétylation de la glucosamine a été caractérisée (Milne *et al.*, 1994). Par contre, la topologie des étapes suivantes reste inconnue. Toutefois, le GPI qui sera fixé sur la protéine doit se trouver sur la face luminale du réticulum endoplasmique. Une translocation est donc nécessaire à un moment donné de la biosynthèse.

A ces différentes étapes de la biosynthèse viennent s'ajouter d'autres réactions spécifiques de l'organisme permettant, par exemple, l'acylation de l'inositol ou l'ornementation du noyau glycanique.

C. Biosynthèse des glycosyl-phosphatidylinositols chez *Trypanosoma brucei*

1. Ancrage de l'antigène variable

L'ancrage de l'antigène variable de *T. b. brucei* possède une structure lipidique particulière contenant exclusivement de l'acide myristique. La partie lipidique du GPI semble essentielle à la viabilité du trypanosome. En effet, la haute densité de protéine à la surface cellulaire serait liée à l'existence du dimyristyl-PI. Or, la voie biosynthétique décrite ci-dessus conduit à la formation d'un intermédiaire glycolipidique (glycolipide A') possédant de l'acide stéarique en position 1 du glycérol et divers acides gras en position 2. Différentes étapes de remaniement de la partie lipidique interviennent donc dans la biosynthèse du GPI.

Le processus de maturation de la partie lipidique intervient avant le transfert du GPI sur la protéine. Il débute par l'action de la phospholipase A₂ sur le glycolipide A'. L'acide gras ainsi éliminé est remplacé par de l'acide myristique (Figure 12). Puis l'acide stéarique en position 1 du glycérol est à son tour échangé contre de l'acide myristique. Le donneur d'acide myristique dans ces différentes étapes est le myristyl-coenzyme A. Le glycolipide A ainsi formé (encore appelé glycolipide P₂) peut alors être

transféré sur la protéine naissante (Materson *et al.*, 1990; Raper *et al.*, 1993).

Un autre mécanisme d'échange des acides gras a récemment été mis en évidence. Ce mécanisme s'opère sur des glycolipides possédant déjà un dimyristyl-PI (Glycolipide A et GPI portant la protéine) et permet l'échange d'un acide myristique contre un autre. Il pourrait s'agir d'un système de vérification de la nature des acides gras, ou encore d'un système de réparation de l'ancrage permettant le recyclage des glycoprotéines (Buxbaum, 1994).

Parallèlement à l'élaboration du glycolipide A, les formes sanguicoles de *T. b. brucei* synthétisent un autre glycoconjugué appelé glycolipide C (ou encore glycolipide P₃). Ce glycolipide est en fait une forme du glycolipide A dans laquelle l'inositol est estérifié par de l'acide palmitique (Figure 12) (Mayor *et al.*, 1990a; 1990b; Menon *et al.*, 1990b). *In vitro*, le glycolipide C peut être fixé sur la protéine naissante. Toutefois, l'existence d'un tel transfert n'a jamais été démontrée *in vivo*. Le glycolipide C ne semble pas être un intermédiaire obligé pour la synthèse du glycolipide A, mais plutôt un produit final du métabolisme (Güther *et al.*, 1994). Son rôle reste obscur. Il pourrait constituer une réserve glycolipidique pouvant être convertie en glycolipide A par déacylation. Il pourrait également représenter un excès de glycolipide A destiné pour le catabolisme.

Après la fixation du GPI, la protéine est acheminée du site de synthèse vers la membrane plasmique. La galactosylation du GPI intervient au cours de ce transport. Le premier résidu de galactose est probablement ajouté dans le réticulum endoplasmique (Mayor *et al.*, 1992). Quant aux résidus suivants, ils sont additionnés dix à quinze minutes plus tard, vraisemblablement dans l'appareil de Golgi (Bang *et al.*, 1988). Les galactosyl-transférases impliquées dans ce processus semblent caractéristiques des trypanosomes africains car les liaisons unissant les résidus de galactose sont inhabituelles (Pingel et Duszenko, 1992). Elles utilisent l'UDP-Gal comme donneur. C'est également au cours du transport vers la surface cellulaire que les glycoprotéines sont rassemblées afin de former le manteau cellulaire.

2. Ancrage de la procycline

Bien que les ancrages de la procycline et de l'antigène variable de *T. b. brucei* soient très différents, leurs précurseurs biosynthétiques ne diffèrent que par la partie lipidique. Le glycolipide PP1, précurseur de l'ancrage de la procycline, présente un 1-stéaryl-2-lyso-PI, dans lequel l'inositol est acylé (Field *et al.*, 1991). Comme dans les formes sanguicoles, ce nouveau PI pourrait provenir d'un processus de maturation lipidique. Les formes procycliques de *T. b. brucei* posséderaient une phospholipase A₂ capable d'initier ce processus. Toutefois, à ce stade du développement du parasite, le mécanisme serait immédiatement interrompu, probablement par absence de myristyl-transférases.

L'acylation de l'inositol intervient avant ce remaniement lipidique (Figure 12). En effet, tous les intermédiaires biosynthétiques contenant de l'éthanolamine phosphate (glycolipides PP1 et PP3) sont résistants à la PI-PLC suggérant qu'ils sont tous acylés (Field *et al.*, 1992). La chronologie des étapes de biosynthèse peut donc être modifiée au cours du développement de l'organisme.

Enfin, comme dans les formes sanguicoles, l'addition de la chaîne glycanique latérale s'effectue après le transfert du GPI sur la protéine.

D. Biosynthèse des glycosyl-phosphatidylinositols chez d'autres organismes

Les grandes lignes de la biosynthèse des GPI sont identiques chez les parasites, les levures ou les mammifères. Chaque organisme développe ensuite des mécanismes qui lui sont propres.

Ainsi, les levures semblent avoir développé un nouveau mécanisme de remaniement de la partie lipidique. Elles possèdent à la fois des glycosyl-phosphatidylinositols proprement dit et des glycophosphosphingolipides. Les mécanismes d'expression de ces deux types d'ancrage sont inconnus. Toutefois, l'étude des protéines glypiées néosynthétisées révèle une augmentation de leur résistance en milieu alcalin, au cours du temps. Les GPS étant labils en milieu alcalin et les GPI stables, ce phénomène pourrait correspondre à un échange du glycérolipide contre une céramide. Cet

échange interviendrait après le transfert de la protéine sur son ancrage (Conzelmann *et al.*, 1992).

Chez les mammifères, la plupart des intermédiaires biosynthétiques de l'ancrage possèdent un inositol acylé. L'acylation intervient très tôt dans le processus de biosynthèse, avant même l'addition des résidus de mannoses. Toutefois, tous les ancrages décrits chez les mammifères ne possèdent pas d'acide gras estérifiant l'inositol. Dans certaines cellules, cet acide gras peut être éliminé après le transfert sur la protéine (McConville et Ferguson, 1993; Englund, 1993).

Une autre particularité de la biosynthèse des GPI chez les mammifères est l'addition de plusieurs groupements d'éthanolamine phosphate (Figure 12). Des précurseurs biosynthétiques contenant un, deux ou même trois résidus d'éthanolamine phosphate ont été caractérisés. Ils indiquent que l'addition de ces résidus intervient avant le transfert du GPI sur la protéine (Ueda *et al.*, 1993).

Depuis une dizaine d'années, de nombreuses protéines glypiées ont été identifiées aussi bien chez les eucaryotes supérieurs que chez les eucaryotes inférieurs. Les GPI constituent, en effet, le mode principal d'ancrage des protéines chez les protozoaires. Par contre, ils ne sont utilisés que par une minorité des protéines de surface dans les autres organismes. Quelque soit leur origine, les GPI ancrant les protéines possèdent la structure glycanique $\text{Man}(\alpha 1-2)\text{Man}(\alpha 1-6)\text{Man}(\alpha 1-4)\text{GlcNH}_2(\alpha 1-6)\text{Ins-1-PO}_4\text{-lipide}$. Ce noyau glycanique conservé au cours de l'évolution porte différents substituants dont la nature varie selon l'origine de la molécule. Chez les parasites, ils diffèrent également selon le stade du développement du parasite.

Les mécanismes de biosynthèse du noyau glycanique semblent également avoir été conservés au cours de l'évolution eucaryotique. Toutefois les étapes permettant l'ornementation de ce noyau ou le remaniement de la partie lipidique sont elles spécifiques de l'organisme. Tout comme les étapes de la biosynthèse, certaines fonctions des GPI ancrant les protéines sont communes aux divers organismes, alors que d'autres sont

spécialisées et répondent aux besoins des différents organismes. Ainsi, chez les parasites, ils sont impliqués dans la protection de la cellule contre le milieu extérieur.

LES LIPOPHOSPHOGLYCANNES

En plus des GPI ancrant les protéines, les parasites du genre *Leishmania* synthétisent des GPI libres qui sont les GIPL et les LPG. L'expression des ces derniers est limitée au stade présent chez l'insecte (stade promastigote) où ils représentent les principaux glycoconjugués de l'épais manteau cellulaire. Ces molécules complexes semblent très importantes pour la survie et l'infectivité du parasite (McConville, 1991; Turco et Descoteaux, 1992)

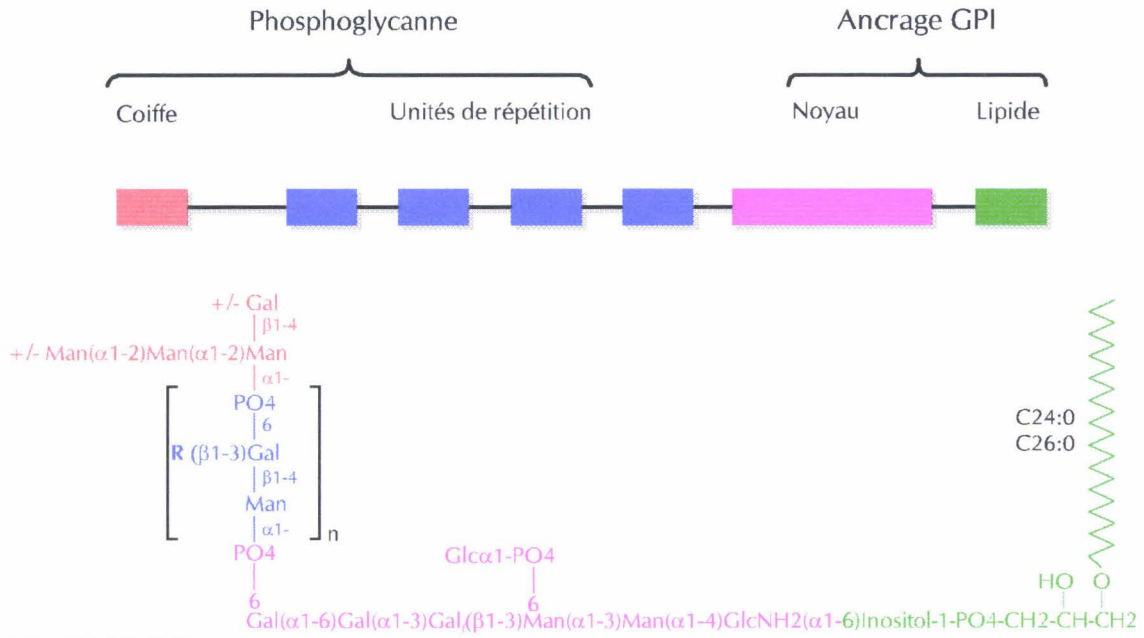
I. Structures des lipophosphoglycannes

A. Description des structures des lipophosphoglycannes extraits de promastigotes procycliques

Les structures des LPG de *L. donovani*, *L. major* et *L. mexicana* ont été élucidées. Toutes ces molécules sont constituées d'un polymère glucidique : le phosphoglycane lié par un noyau saccharidique, à un lysoalkyl-PI (Figure 13). L'ancrage de glycosyl-phosphatidylinositol, comprenant le noyau saccharidique et la partie lipidique, est hautement conservé entre les différentes espèces. Par contre, le phosphoglycane présente des variations de structure spécifiques de l'espèce.

1. Le phosphoglycane

Chez *L. donovani*, le phosphoglycane est formé par la polymérisation de l'unité disaccharidique de répétition suivante : $\text{PO}_4\text{-6-Gal}(\beta 1,4)\text{Man}(\alpha 1-$ (Turco *et al.*, 1987). Les chaînes linéaires ainsi formées sont coiffées par des oligosaccharides neutres contenant des résidus d' α -mannose et de β -galactose (Thomas *et al.*, 1992). La coiffe majoritairement représentée chez *L. donovani* est un trisaccharide branché de structure $\text{Man}(\alpha 1,2)[\text{Gal}(\beta 1,4)]\text{Man}(\alpha 1-$. D'autres coiffes peuvent cependant être rencontrées (Tableau I).



Chaînes latérales R	Souches (promastigotes procycliques)		
	<i>L. donovani</i>	<i>L. mexicana</i>	<i>L. major</i>
H	100%	70%	13%
Glc	/	30%	/
Gal	/	/	31%
Ara(β 1-2)Gal	/	/	29%
Glc(β 1-3)Gal	/	/	1%
Gal(β 1-3)Gal	/	/	13%
Ara(β 1-2)Gal(β 1-3)Gal	/	/	5%
Gal(β 1-3)Gal(β 1-3)Gal	/	/	3%
Ara(β 1-2)Gal(β 1-3)Gal(β 1-3)Gal	/	/	1%
Nombre moyen d'unités : n	16	28	14
Références	Turco <i>et al.</i> , 1987	Ilg <i>et al.</i> , 1992	McConville <i>et al.</i> , 1990

Figure 13 : Structures des lipophosphoglycannes de trois espèces de *Leishmania* : Structure générale et variations spécifique de l'espèce.



Chez *L. major* et *L. mexicana*, le squelette formé par l'enchaînement des unités de $\text{PO}_4\text{-6-Gal}(\beta 1\text{-}4)\text{Man}(\alpha 1\text{-}$ est conservé. Toutefois, la position en 3 du galactose de ce squelette peut être soit libre comme chez *L. donovani* (LPG de *L. mexicana*), soit substituée par des résidus de β -glucose (LPG de *L. mexicana*) (Ilg *et al.*, 1992) ou par des oligosaccharides contenant du β -galactose, du β -glucose et du β -arabinose (LPG de *L. major*) (McConville *et al.*, 1990b; McConville et Ferguson, 1993). Les structures des chaînes latérales, ainsi que leurs proportions respectives sont présentées dans la figure 13. Tout comme pour *L. donovani*, les chaînes de phosphoglycane de *L. mexicana* et *L. major* portent à leur extrémité terminale non réductrice une coiffe. Celle-ci possède au minimum la séquence $\text{Man}(\alpha 1\text{-}2)\text{Man}(\alpha 1\text{-}$. Ce motif disaccharidique constitue d'ailleurs la coiffe principale de ces deux souches (Tableau I) (McConville *et al.*, 1990b; Ilg *et al.*, 1992). De plus, il forme un épitope commun aux LPG.

Tableau I : Structures et abondance des coiffes des lipophosphoglycannes de trois espèces de *Leishmania*

Structures	Souches		
	<i>L. donovani</i>	<i>L. mexicana</i>	<i>L. major</i>
$\text{Man}(\alpha 1\text{-}2)\text{Man}(\alpha 1\text{-}$	20%	50%	100%
$\text{Man}(\alpha 1\text{-}2)\text{Man}(\alpha 1\text{-}2)\text{Man}(\alpha 1\text{-}$	6%	30%	/
$\text{Man}(\alpha 1\text{-}2)[\text{Gal}(\beta 1\text{-}4)]\text{Man}(\alpha 1\text{-}$	53%	20%	/
$\text{Man}(\alpha 1\text{-}2)\text{Man}(\alpha 1\text{-}2)[\text{Gal}(\beta 1\text{-}4)]\text{Man}(\alpha 1\text{-}$	5%	/	/
$\text{Gal}(\beta 1\text{-}4)\text{Man}(\alpha 1\text{-}$	16%	/	/
Références	Thomas <i>et al.</i> , 1992	Ilg <i>et al.</i> , 1992	McConville <i>et al.</i> , 1990

La taille moyenne des chaînes de phosphoglycane semble varier entre les espèces. Une molécule de phosphoglycane extraite de promastigote procyclique comporte en moyenne 16 unités de répétition chez *L. donovani*

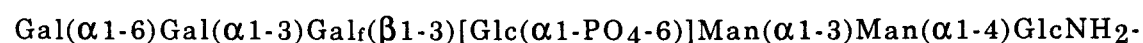
(Turco *et al.*, 1987) et 14 unités chez *L. major* (McConville *et al.*, 1992). Pour *L. mexicana*, le nombre moyen d'unités de répétition est estimé à 20 (Ilg *et al.*, 1992). Cependant, la provenance des LPG (promastigotes procycliques ou métacycliques) n'est pas précisé. Or, la taille d'une molécule de LPG se modifie au cours du développement du parasite (cf. p. 39 à 42). Ceci explique certainement les différentes valeurs trouvées dans la littérature.

1. L'ancrage de glycosyl-phosphatidylinositol.

L'ancrage membranaire des phosphoglycannes comprend d'une part un noyau heptasaccharidique, et d'autre part un 1-alkyl-2-*lyso*-PI. Il comporte la structure $\text{Man}(\alpha 1-4)\text{GlcNH}_2(\alpha 1-6)\text{Ins-PO}_4\text{-lipide}$ commune à toutes les molécules de la famille des GPI (Figure 13).

La partie lipidique est représentée en majorité par de l'acide lignocérique (C24:0) et de l'acide cérotique (C26:0) fixés par une liaison éther sur le carbone 1 du glycérol. Le *lysoalkyl*-PI est une figure constante du LPG. Toutefois, les pourcentages respectifs d'acide lignocérique et d'acide cérotique diffèrent d'une espèce à l'autre (Orlandi and Turco, 1987; Ilg *et al.*, 1992; McConville *et al.*, 1987).

Le noyau heptasaccharidique liant le phosphoglycanne au lipide possède la structure suivante (Turco *et al.*, 1989; Thomas *et al.*, 1992) :



La chaîne de phosphoglycanne est attachée sur le galactose terminal de ce noyau (McConville *et al.*, 1990b; Thomas *et al.*, 1992). L'existence de molécules en "Y", possédant une seconde chaîne de phosphoglycanne sur le mannose distal de la glucosamine, a tout d'abord été suggéré. Cependant, ce mannose est substitué, non pas par des unités de répétition, mais par un résidu de glucose-1-phosphate (Thomas *et al.*, 1992).

L'ensemble de ces données structurales a permis de dégager une structure générale du LPG présentée dans la figure 13. Cette figure montre également les variations spécifiques des espèces *L. donovani*, *L. mexicana* et *L. major*. La principale variation affectent la nature de l'unité de répétition du phosphoglycanne. La présence à la fois de parties communes (noyau

saccharidique, squelette de $\text{PO}_4\text{-6-Gal}(\beta 1\text{-4})\text{Man}(\alpha 1\text{-})$ et de parties variables (nature des chaînes latérales substituant le squelette) est reflétée par les études sérologiques (Tolson *et al.*, 1989). Ces études mettent en évidence la présence d'épitopes conservés entre les espèces et d'épitopes caractéristiques de l'espèce. D'autre part, les LPG présentent des variations de structure selon le stade du développement du parasite.

B. Modifications structurales des lipophosphoglycannes au cours du développement du parasite

Durant leur cycle de vie digénétique, les parasites du genre *Leishmania* évoluent dans différents environnements souvent hostiles (tube digestif de l'insecte vecteur, macrophage de l'hôte mammifère). Ils subissent divers changements, de manière notamment à survivre, et à infecter l'hôte mammifère. Certains changements s'effectuent au niveau des molécules de surface. Ainsi la structure des LPG évolue durant la métacyclogenèse (transformation des promastigotes procycliques non infectieux en promastigotes métacycliques infectieux). De même, la différenciation des promastigotes en amastigotes (forme du parasite dans les macrophages) s'accompagne d'une diminution du nombre des molécules de LPG et d'une modification de leur structure.

1. Au cours de la métacyclogenèse

Dans les intestins de l'insecte, les promastigotes subissent différents changements conduisant à une augmentation de leur infectivité. Ce processus appelé métacyclogenèse peut-être reproduit *in vitro* durant la croissance des parasites. La forme procyclique, non infectieuse, correspond aux parasites en phase exponentielle de croissance, et la forme métacyclique, infectieuse, aux parasites en phase stationnaire. Bien que la métacyclogenèse ne s'accompagne d'aucun changement morphologique manifeste, les promastigotes procycliques et métacycliques peuvent être différenciés. En effet, les formes infectieuses ne sont pas agglutinées par la lectine de cacahuète (PNA : peanut agglutinin) à des concentrations permettant l'agglutination des promastigotes procycliques. Ce phénomène,

observé chez *L. major*, suggère des modifications structurales des LPG (Sacks, 1989; Sacks, 1992).

De manière à préciser la nature des changements se produisant au cours de la métacyclogenèse, les structures des LPG extraits des formes procycliques et métacycliques de *L. major* ont été analysées et comparées (Sacks *et al.*, 1990; McConville *et al.*, 1992). Ces analyses révèlent une nette augmentation de la taille des molécules de phosphoglycane, durant le développement. Cette augmentation est liée à un doublement du nombre moyen des unités de répétition (14 unités/molécule pour les promastigotes procycliques; 30 unités/molécule pour les promastigotes métacycliques). D'autre part, les proportions des chaînes latérales substituant le squelette de $\text{PO}_4\text{-6-Gal}(\beta 1\text{-4})\text{Man}(\alpha 1\text{-}$ sont modifiées (Tableau II). Dans la forme infectieuse, les unités de répétition non substituées, ou substituées par des chaînes se terminant par un résidu de β -arabinose, sont plus fréquentes. Parallèlement, le nombre des chaînes possédant un résidu de β -galactose en position terminale non réductrice décroît. En ce qui concerne les coiffes, les deux formes de promastigotes sont relativement similaires. Enfin, les parties conservées entre les espèces (*lysoalkyl*-PI, noyau et squelette), le sont également au cours de la métacyclogenèse.

Ces modifications des LPG au cours de la métacyclogenèse, très bien décrites chez *L. major*, n'ont été que peu étudiées chez *L. mexicana* et *L. donovani*. Une élongation des molécules de LPG a été relatée pour *L. donovani*. Par contre, la taille de ces molécules semble à l'inverse décroître chez *L. mexicana* lors de ce processus (Ilg *et al.*, 1992).

Les LPG sont les macromolécules majeures du glycocalix couvrant la surface cellulaire des promastigotes. Leur nombre ne semble pas varier au cours de la métacyclogenèse (Pimenta *et al.*, 1991). Les modifications de ces macromolécules, et notamment l'augmentation de leur taille, se traduisent donc par un épaissement du manteau, associé à l'apparition de filaments denses (longueur : 44nm, largeur: 5nm) à la surface membranaire du parasite (Pimenta *et al.*, 1989).

Tableau II : Principales modifications structurales du lipophosphoglycane au cours du développement du parasite.

Structures des chaînes latérales	Stade du développement de <i>L. major</i>		
	Promastigotes Procycliques	Promastigotes métacycliques	Amastigotes
H	+	++	+++
Glc(β1-	-	-	+
Glc(β1-3)Gal(β1-	+	+	+
Glc(β1-3)Glc(β1-	-	-	+
Gal(β1-	+++	++	++
Gal(β1-3)Gal(β1-	++	+	+
Gal(β1-3)Gal(β1-3)Gal(β1-	+	+	+
Gal(β1-3)(Gal(β1-3)) ₂₋₉ Gal(β1-	-	-	+
Ara(β1-2)Gal(β1-	+	+++	-
Ara(β1-2)Gal(β1-3)Gal(β1-	+	+	-
Ara(β1-2)Gal(β1-3)Gal(β1-3)Gal(β1-	+	+	-
nombre moyen d'unités de répétition	14	30	36
Références	McConville <i>et al.</i> , 1990b	McConville <i>et al.</i> , 1992	Moody <i>et al.</i> , 1993

Quelle est la signification de ces changements structuraux? La modification des LPG permettrait tout d'abord au parasite de se détacher des cellules épithéliales de l'intestin de l'insecte, étape préalable à la migration et à la transmission du parasite à l'hôte mammifère. Puis lorsque le parasite se trouve dans l'hôte mammifère, les LPG joueraient un rôle dans la survie du parasite, en créant par exemple, une résistance à la lyse par le complément (cf. p. 45 à 51).

2. Au cours de la différenciation des promastigotes en amastigotes

Les LPG sont des molécules clés pour l'infectivité et la survie du promastigote. Par contre, chez les amastigotes, ils semblent avoir des rôles beaucoup moins importants. En effet, les quantités de LPG à ce stade du développement sont faibles, voire indécélables. Moins de 100 molécules de LPG subsistent à la surface des amastigotes de *L. donovani* (McConville et Blackwell, 1991). Ces molécules sont plus nombreuses à la surface des amastigotes de *L. major* (6.10^4 LPG/amastigote) (Moody et al., 1993).

Les LPG extraits des amastigotes de *L. major* comportent en moyenne 36 unités de répétition. La majorité d'entre-elles ne sont pas substituées (70%). Les autres portent des chaînes latérales constituées de β -galactose et de β -glucose. Les chaînes latérales comportant de 4 à 11 résidus de galactose sont spécifiques de ce stade du développement (Tableau II) (Moody et al., 1993). De même, l'absence totale d'arabinose différencie ces LPG de ceux extraits des promastigotes (Moody et al., 1991). Les chaînes de phosphoglycannes sont coiffés du disaccharide Gal(β 1-4)Man(α 1-. Cette coiffe est également présente dans les molécules extraites des promastigotes de *L. donovani*.

Enfin, les ancrages des molécules de phosphoglycanne sont similaires pour les amastigotes et les promastigotes. Toutefois, les principaux acides gras constituant le *lysoalkyl*-PI sont légèrement différents dans ces deux stades du développement. Les acides béhénique (C22:0) et lignocérique (C24:0) sont principalement rencontrés dans les LPG d'amastigote. Alors que les LPG de promastigote possèdent majoritairement de l'acide lignocérique (C24:0) et de l'acide cérotique (C26:0) (Moody et al., 1991; 1993).

C. Structure tridimensionnelle des lipophosphoglycannes

La structure tridimensionnelle de l'unité disaccharidique de répétition P-6-Gal(β 1,4)Man(α 1, de *L. donovani*, a été déterminée à l'aide de techniques de résonance magnétique homo- et hétéronucléaire associés à des études de dynamique moléculaire (Homans et al., 1992). Selon ces

de phosphoglycannes possèdent une conformation hélicoïdale étendue. En solution, la grande flexibilité des liaisons phosphodiester permet l'existence de plusieurs conformères stables qui s'interchangent continuellement, à des températures physiologiques. Ainsi, les chaînes de phosphoglycannes peuvent se contracter ou s'étendre, ce qui entraîne des variations de la longueur des molécules. Par exemple, la longueur d'une chaîne possédant 16 unités de répétition sera de 90 Angströms, sous forme contractée et de 160 Angströms, sous forme étendue. Le rôle de ce phénomène de contraction-extension est inconnu. Peut-être intervient-il pour faciliter les interactions du LPG avec différents récepteurs.

Dans chacun des conformères de basse énergie, le carbone 3 du galactose est rejeté à l'extérieur de l'hélice, et est donc facilement accessible. Ainsi, les chaînes latérales qui substituent ce galactose chez *L. mexicana* ou *L. major* n'entraînent probablement pas de changements conformationnels du squelette. Ces chaînes semblent être disposées perpendiculairement par rapport à l'axe de l'hélice, et augmenteraient donc la surface couverte par la molécule de LPG. Etant donné le nombre élevé de molécules par parasite, les LPG couvriraient la majorité de la membrane plasmique du promastigote, voire l'intégralité de cette membrane, et protégeraient, ainsi, le parasite du milieu dans lequel il se trouve (Turco et Descoteaux, 1992).

D. Relation entre le facteur excrété et les lipophosphoglycannes

Le milieu de culture des promastigotes de *Leishmania* renferment diverses molécules de structures apparentées à celle du LPG. Ces molécules, rassemblées sous le terme de facteur excrété, sont utilisées pour sérotyper les différentes espèces de *Leishmania*. Elles sont de trois types : des molécules de LPG amphiphiles, des molécules de phosphoglycannes solubles et des molécules de phosphatase acide (à l'exception de *L. major* qui ne sécrète pas de phosphatase acide).

Les LPG peuvent être libérés spontanément dans le milieu de culture, soit sous forme de monomères, soit sous forme de micelles, qui peuvent alors interagir avec la poche hydrophobe de la sérum albumine (King *et al.*, 1987).

Cette propriété est probablement le reflet de l'attache faible (par une seule chaîne aliphatique) du LPG au feuillet externe de la membrane plasmique. Il semble, en effet, que les molécules possédant des chaînes alkylées courtes (C24:0) soient préférentiellement libérées (Ilg *et al.*, 1992). L'analyse chimique des LPG extracellulaires de *L. mexicana* révèlent également une augmentation du nombre moyen d'unités de répétition par rapport aux LPG membranaires (28 unités de répétition/LPG extracellulaire au lieu de 20 unités/LPG cellulaire) (Ilg *et al.*, 1992). Or, les auteurs constatent, au cours de la croissance de ce parasite, une diminution de la taille des chaînes de phosphoglycannes. Le matériel libéré correspondrait, donc, à des molécules plus anciennement synthétisées. Ainsi, la libération non enzymatique des LPG permettrait un renouvellement rapide de ces glycoconjugués à la surface cellulaire.

Des molécules de phosphoglycannes solubles sont également présentes dans le milieu de culture des promastigotes de *Leishmania*. Leur structure, déterminée dans le cas de *L. donovani*, est identique à celle d'un LPG dans lequel le lipide, le noyau heptasaccharidique, et quelques unités de répétition seraient absents (Greis *et al.*, 1992). L'absence de noyau indique que ces substances ne proviennent pas du simple clivage des LPG par une phospholipase C. Ces molécules proviennent-elles de l'action enzymatique d'endoglycosidases ou de phosphodiesterases sur les LPG? Ou bien sont-elles des produits d'une voie biosynthétique distincte de celle des LPG? Ce point reste à être éclairci. Toutefois, la similitude entre les structures des coiffes et des chaînes de phosphoglycannes suggère fortement l'existence d'une voie biosynthétique commune pour les phosphoglycannes extracellulaire et les LPG. Cette hypothèse est confortée par le fait que des lignées de promastigotes synthétisant peu de LPG, produisent également peu de phosphoglycannes extracellulaires.

Les rôles de ces molécules extracellulaires sont inconnus. Cependant, puisqu'elles possèdent une structure très proche de celle des LPG cellulaires, elles pourraient jouer des rôles similaires dans la chélation du calcium ou dans l'élimination des produits de la voie oxydative du

complément. Elles pourraient aussi interagir avec les cellules épithéliales de l'intestin de l'insecte, et ainsi empêcher la fixation des promastigotes métacycliques de manière à faciliter leur transmission à l'hôte mammifère.

II. Fonctions des lipophosphoglycannes

Tout au long de leur cycle de vie, les parasites du genre *Leishmania* réussissent à éviter la destruction dans des milieux hostiles. Pour survivre, ils ont développés des molécules spécialisées, comme les LPG. Ceux-ci assurent un certain nombre de fonctions, aussi bien dans l'insecte vecteur, que dans l'hôte mammifère.

A. Fonctions des lipophosphoglycannes chez l'insecte vecteur

Après leur ingestion par l'insecte, les parasites du genre *Leishmania* se fixent sur les cellules épithéliales de l'intestin par des interactions de type lectiniques. Puis, au cours de la métacyclogenèse, ils subissent différentes modifications (cf. p. 39 à 41) conduisant à leur détachement des cellules épithéliales, et permettant leur migration vers l'intestin antérieur. Les parasites promastigotes seraient alors transmis à l'hôte mammifère par régurgitation, lors d'une piqûre (Davies *et al.*, 1990). Durant ces étapes, les LPG assurent la survie des parasites et favorisent la migration.

1. Protection des parasites contre les attaques enzymatiques

Une souche de *L. major* (LRC-L119) a été isolé à partir d'un rongeur, dans une région du Kenya, où étrangement les populations ne présentaient pas de leishmanioses cutanées. Cette souche déficiente en LPG est incapable de survivre dans *Phlebotomus papatasi* (insecte vecteur de *L. major*). Par contre, l'insertion de LPG dans la membrane plasmique de cette souche permet une augmentation de la viabilité des parasites dans l'insecte (Schlein *et al.*, 1990). Les LPG ont donc un rôle primordial dans la survie des parasites. De part leur nombre (2,5 à $5 \cdot 10^6$ molécules/promastigote) et leur structure particulière (Pimenta *et al.*, 1989; Homans *et al.*, 1992), ils couvriraient la totalité de la membrane plasmique des promastigotes. Cette barrière de LPG semble parfaitement isoler le parasite du milieu extérieur

(Pimenta *et al.*, 1991). De plus, il est possible que les LPG inhibent une ou plusieurs enzymes hydrolytiques (McConville *et al.*, 1990b).

2. Rôle dans la colonisation de l'insecte vecteur et dans la migration des parasites

L'initiation de l'infection de l'insecte par les leishmanies nécessite l'adhésion des parasites aux cellules épithéliales de l'intestin. Cette adhésion est réalisée par l'interaction spécifique entre les LPG et des récepteurs situés sur les microvillosités des cellules épithéliales de l'intestin. Dans le cas de *L. major*, ces récepteurs reconnaissent les résidus de galactose se trouvant à l'extrémité des chaînes latérales des phosphoglycannes (Pimenta *et al.*, 1992). La fixation des parasites est une propriété inhérente aux promastigotes non infectieux. En effet, les LPG des formes procycliques peuvent inhiber cette fixation. Par contre, ceux des formes métacycliques infectieuses en sont incapables (Pimenta *et al.*, 1992). Les modifications structurales affectant les chaînes latérales des LPG, lors de la métacyclogenèse (Tableau II), semblent donc indispensables à la libération des parasites. De plus, les molécules de LPG solubles présentes dans la lumière intestinale (facteur excrété) (Davies *et al.*, 1990) pourraient favoriser cette libération ou prévenir la refixation des promastigotes métacycliques (McConville *et al.*, 1992). Cependant, les chaînes latérales de galactose et d'arabinose sont spécifiques de *L. major*. Leurs modifications représenteraient donc une adaptation particulière permettant à cette espèce de coloniser *Phlebotomus papatasi* qui n'est pas un vecteur courant pour les leishmanies.

B. Fonctions des lipophosphoglycannes chez l'hôte mammifère

Après avoir été introduit dans le sang de l'hôte mammifère, les promastigotes doivent échapper à la lyse par le système du complément, avant de se lier aux macrophages pour y entrer. Là encore, les LPG jouent des rôles essentiels.

1. Résistance à la lyse par le système du complément

La résistance des parasites à la lyse par le système du complément varie selon le stade du développement. Seules les formes infectieuses résistent à cette lyse. Les modifications du parasite durant la métacyclogenèse correspondraient donc, à un mécanisme de préadaptation pour la résistance contre le sérum. Chez les trypanosomes, la protection du parasite est assurée soit par à une limitation de l'activation du complément (cas de *T. cruzi*), soit par l'absence de formation du complexe lytique final C5b-9 (cas de *T. b. brucei*). Par contre, le mécanisme de défense développé par les parasites du genre *Leishmania* est différent. En effet, ils sont capables d'activer le système du complément et aussi de former le complexe lytique C5b-9. Cependant, alors que les promastigotes procycliques insèrent ce complexe dans leur membrane et sont lysés, les promastigotes métacycliques le libèrent sous forme soluble dans le milieu environnant. Cette propriété semble dépendre de la taille des LPG présents à la surface du parasite. Les longues chaînes de phosphoglycannes caractéristiques des promastigotes infectieux gênent l'insertion du complexe lytique final et préviennent ainsi la lyse membranaire. Par contre, les promastigotes non infectieux, qui possédant des chaînes de phosphoglycannes plus courtes, sont susceptibles à cette lyse (Puentes *et al.*, 1990).

En plus de ce mécanisme de défense, le manteau de LPG protège le parasite des anticorps, en masquant les protéines ou les glycannes situés à la surface du promastigote (Karp *et al.*, 1991).

2. Activation du complément

Les LPG sont donc à l'origine de la résistance à la lyse par le système du complément. Paradoxalement, ils sont aussi les principaux activateurs du complément. Ce composé est capable d'activer le complément à la fois par la voie alterne (immunité non spécifique) et par la voie classique (immunité spécifique). La voie choisie dépend du stade du développement du parasite. Ainsi, les promastigotes procycliques de *L. major* activent le complément par la voie alterne. Alors que les promastigotes métacycliques utilisent la voie classique (Puentes *et al.*, 1988). Le système du complément semble

interagir de différentes manières avec les différentes espèces et les différents stades de croissance du parasite. Ces différences pourraient influencer le choix du récepteur du macrophage.

3. Interaction promastigotes - macrophages

Le rôle des LPG dans les interactions promastigotes-macrophages a tout d'abord été démontré par Handman et Goding (1985). Ces auteurs ont préincubé les promastigotes de *L. major* avec un anticorps monoclonal anti-LPG (WIC 79.3) et ont constaté que dans ce cas la fixation aux macrophages était inhibée. Des souches de *L. major* (Handman *et al.*, 1986; Elhay *et al.*, 1990) ou *L. donovani* (McNeely et Turco, 1990) déficientes en LPG peuvent cependant être phagocytées par le macrophage. Toutefois, ces souches sont rapidement détruites dans les phagolysosomes. Leur viabilité peut être considérablement augmentée par le transfert passif de LPG dans la membrane plasmique (Handman *et al.*, 1986; McNeely et Turco, 1990). Les souches déficientes en LPG et les souches sauvages semblent utiliser des récepteurs du macrophage différents, les dirigeant vers des compartiments intracellulaires différents. La présence de LPG et la nature du récepteur utilisé serait donc déterminants pour la survie du parasite.

Le choix de ce récepteur semble déterminé par le stade du développement du parasite et par la présence éventuelle du complément. Les promastigotes procycliques n'exigent pas la présence du complément pour se fixer aux macrophages. Par contre, la phagocytose des formes métacycliques nécessite l'opsonisation par le complément. La fixation de ces formes infectieuses en absence de sérum est négligeable (Da Silva *et al.*, 1989).

En absence de complément, la fixation des promastigotes de *L. major* peut se faire par l'intermédiaire des intégrines du complexe CD18, notamment par le récepteur CR3 et p150,95. Le LPG interagit directement avec un domaine de ces récepteurs différent de celui reconnaissant le composant C3b (Da Silva *et al.*, 1989; Talamas-Rohana *et al.*, 1990). D'autres études suggèrent que ces récepteurs reconnaissent les chaînes latérales

spécifiques du LPG de *L. major*. En particulier, l'adhésion des promastigotes de cette souche aux macrophages peut être inhiber par les unités de répétition contenant Gal(β 1-3)R ou Gal(β 1-3)Gal(β 1-3)R ou R est l'unité disaccharidique de répétition (Keheller *et al.*, 1992).

En présence des composants du complément, la fixation aux macrophages se fait principalement par les récepteurs CR1 et CR3 (Da Silva *et al.*, 1989; Mosser *et al.*, 1992). La phagocytose par l'intermédiaire du récepteur CR1 peut être avantageuse pour le parasite dans la mesure où cette voie n'active pas la voie oxydative microbicide.

Le LPG permet donc la phagocytose du parasite par les macrophages en interagissant avec différents récepteurs par des mécanismes distincts.

4. Survie intracellulaire

A la suite de leur internalisation dans le macrophage, les promastigotes tentent de détériorer la réponse immunitaire, pour permettre leur survie intracellulaire. Puisque de nombreuses fonctions permettant cette réponse sont dépendantes de la protéine kinase C (PKC), cette enzyme représente une cible idéale pour le parasite.

Les LPG sont, en effet, des inhibiteurs puissants de la PKC *in vitro* et *in vivo* (McNeely *et al.*, 1989; Descoteaux *et al.*, 1992). Ils ne semblent pas affecter la translocation et l'association membranaire de l'enzyme, mais son activité de phosphorylation des protéines. Leur mécanisme d'action est toujours inconnu. Ils pourraient interagir avec le domaine de régulation de la PKC et agir comme un inhibiteur compétitif vis à vis du diacylglycérol (cofacteur de l'enzyme), ou encore inhiber indirectement la PKC en chélatant le calcium (autre cofacteur de la PKC) (Descoteaux et Turco, 1993).

L'une des conséquences de l'inhibition de la PKC est de prévenir l'activation de la voie oxydative du macrophage. En effet, la phosphorylation et l'association membranaire des composants de la NADPH oxydase, première étape de cette voie, est réalisée par la PKC. D'autres événements dépendants de l'activité de la PKC, comme la locomotion chimiotactique, ou

Tableau III : Fonctions des lipophosphoglycannes (McConville et Ferguson, 1993)

Fonctions	Partie du LPG impliquée	Références
Formation d'un manteau à la surface cellulaire		
Protection contre la lyse par le complément		Puentes <i>et al.</i> , 1990
Protection contre les hydrolases de l'insecte et du macrophage		Schlein <i>et al.</i> , 1990
Masquage des antigènes protéiques		Karp <i>et al.</i> , 1991
Reconnaissance cellule - cellule		
Fixation aux récepteurs de l'intestin de l'insecte	Chaînes latérales de l'unité de répétition	Pimenta <i>et al.</i> , 1992
Fixation aux récepteurs du macrophage	Chaînes latérales de l'unité de répétition	Handman et Goding, 1985; Talamas-Rohana <i>et al.</i> , 1990; Kelleher <i>et al.</i> , 1992
Activation du complément et fixation aux récepteurs CR1 et CR3 du macrophage	Unités de répétition et mannose des coiffes	Puentes <i>et al.</i> , 1988; Da Silva <i>et al.</i> , 1989; Mosser <i>et al.</i> , 1992
Survie dans le macrophage		
Élimination des radicaux oxygénés	Unités de répétition	Chan <i>et al.</i> , 1989
Chélation du calcium	Unités de répétition	
Modulation des fonctions du macrophage		
<i>Inhibition de la protéine kinase C</i>	Lipide et unités de répétition	McNeely <i>et al.</i> , 1989; Descoteaux <i>et al.</i> , 1992; 1993
<i>Inhibition de la voie oxydative</i>	Lipide et unités de répétition	McNeely <i>et al.</i> , 1990
<i>Inhibition de la locomotion chimiotactique</i>		Descoteaux <i>et al.</i> , 1993

l'expression du gène *c-fos* sont également affectés (Descoteaux et Turco, 1993).

Bien que l'inhibition de la PKC soit nécessaire à la survie intracellulaire, elle ne semble pas suffisante (Descoteaux et Turco, 1993). Toutefois, en plus du mécanisme décrit ci-dessus, les LPG apportent une protection contre les enzymes lysosomiques et les produits de la voie oxydative (Chan *et al.*, 1989).

III. Biosynthèse des lipophosphoglycannes

A l'heure actuelle, les mécanismes de biosynthèse des LPG sont inconnus. Seule la polymérisation des unités de répétition a été étudiée. Celle-ci est réalisée dans l'appareil de golgi par transferts successifs de mannose-1-phosphate et de galactose à partir du GDP-Man et de l'UDP-Gal (Carver et Turco, 1992).

De nombreuses hypothèses concernant la biosynthèse des LPG ont été élaborées à partir des structures des GIPL. Ces hypothèses sont présentées dans le chapitre suivant.

Tous les LPG étudiés jusqu'à présent, possèdent une architecture en quatre parties: 1) un *lysoalkyl-PI*, 2) un noyau glycanique, 3) un polymère glucidique possédant une unité de répétition plus ou moins complexe selon les espèces et 4) une coiffe oligosaccharidique. Ces molécules possèdent des éléments structuraux spécifiques de l'espèce considérée et du stade du développement du parasite. Grâce à cette structure très inhabituelle, les LPG assurent de nombreuses fonctions qui permettent au parasite de vivre en toute impunité dans des milieux souvent très hostiles.

Aucun LPG n'a été décrit dans d'autres parasites de l'ordre des Kinetoplastida. Cependant l'expression de ces molécules ne semble pas restreinte aux seuls parasites du genre *Leishmania*. En effet, une molécule possédant une structure très semblable a été identifiée chez le protozoaire *Entamoeba histolytica* (Bhattacharya *et al.*, 1992).

LES GLYCOINOSITOLPHOSPHOLIPIDES

La dernière classe de la famille des GPI est celle des glycoinositolphospholipides (GIPL). Ces molécules de faible poids moléculaire ne portent ni protéine, ni polysaccharide. Ils sont synthétisés par les leishmanies, mais aussi par d'autres parasites de la famille des Trypanosomatidae.

I. Parasites du genre *Leishmania*

Les GIPL constituent la principale classe de glycolipides chez les parasites du genre *Leishmania*. Contrairement aux LPG dont l'expression est restreinte au stade promastigote, les GIPL sont abondants à la fois dans les stades promastigote et amastigote (environ 10^7 molécules/cellule) (McConville et Bacic, 1990; McConville et Blackwell, 1991).

A. Structures des glycoinositolphospholipides

Trois types de GIPL peuvent être distingués selon la structure glycannique de la molécule. Les molécules de type 1 possèdent un résidu de mannose lié en (α 1-6) sur le mannose du noyau conservé des GPI et sont donc similaires au GPI ancrant les protéines (Figure 17). Celles du type 2 sont apparentées à l'ancrage des LPG. Elles présentent un résidu de mannose lié en (α 1-3) sur le noyau des GPI (Figure 15; Figure 14). Enfin, les molécules de type hybride présentent une partie glycannique branchée possédant les séquences caractéristiques des deux types précédents (Figure 16). La partie lipidique de ces GIPL est constituée d'alkylacyl-PI ou de lysoalkyl-PI.

1. Description des structures des glycoinositolphospholipides extraits de différentes espèces de *Leishmania*

Les structures des GIPL varient d'une espèce de *Leishmania* à l'autre. Le protozoaire *L. major* possède exclusivement des GIPL de type 2. En revanche, les promastigotes de *L. donovani* et *L. mexicana* synthétisent des GIPL de type 2 et de type hybride.

a) *Leishmania major*

La figure 15 présente les principaux GIPL extraits des promastigotes de *L. major* (souche V121) (Rosen *et al.*, 1989; McConville et Bacic, 1990; McConville *et al.*, 1990a). Ces glycolipides sont similaires à l'ancrage des LPG, mais ils en diffèrent par la présence d'un alkylacyl-PI dont les chaînes alkylées comportent de 18 à 26 atomes de carbone. Le *lyso*GIPL-3 constitue toutefois une exception puisqu'il présente un *lyso*alkyl-PI possédant principalement de longues chaînes alkylées (C24:0) (McConville *et al.*, 1990a). La forte homologie structurale entre l'ancrage du LPG et ce glycolipide suggère, pour ce dernier, un rôle de précurseur biosynthétique du LPG.

Les glycolipides GIPL-1, GIPL-2 et GIPL-3 (Figure 15) ont également été identifiés dans des souches de *L. major* déficientes en LPG. Ces souches produisent aussi différents GIPL polaires qui semblent correspondre à des formes tronquées du LPG (Figure 14) (McConville et Bacic, 1989; 1990; McConville *et al.*, 1990a; McConville et Homans, 1992; Elhay *et al.*, 1993).

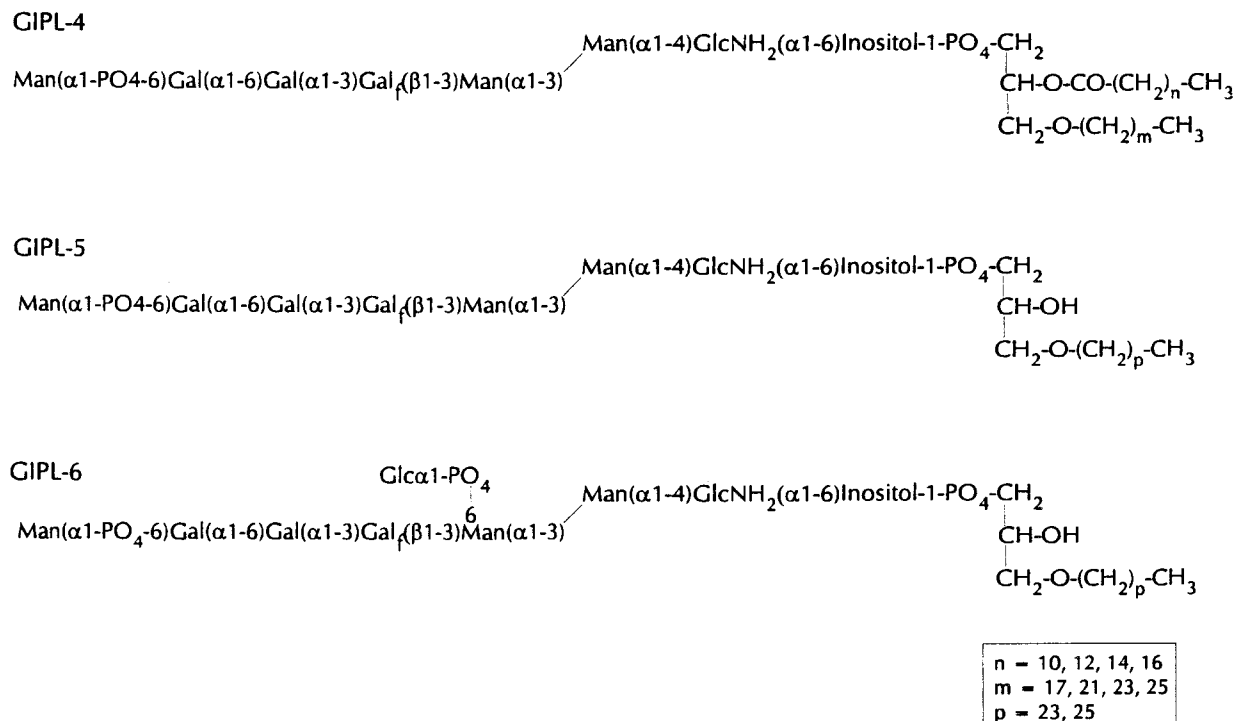


Figure 14 : Structures des GIPL extraits d'une souche de *Leishmania major* naturellement déficiente en LPG (McConville et Homans, 1992)

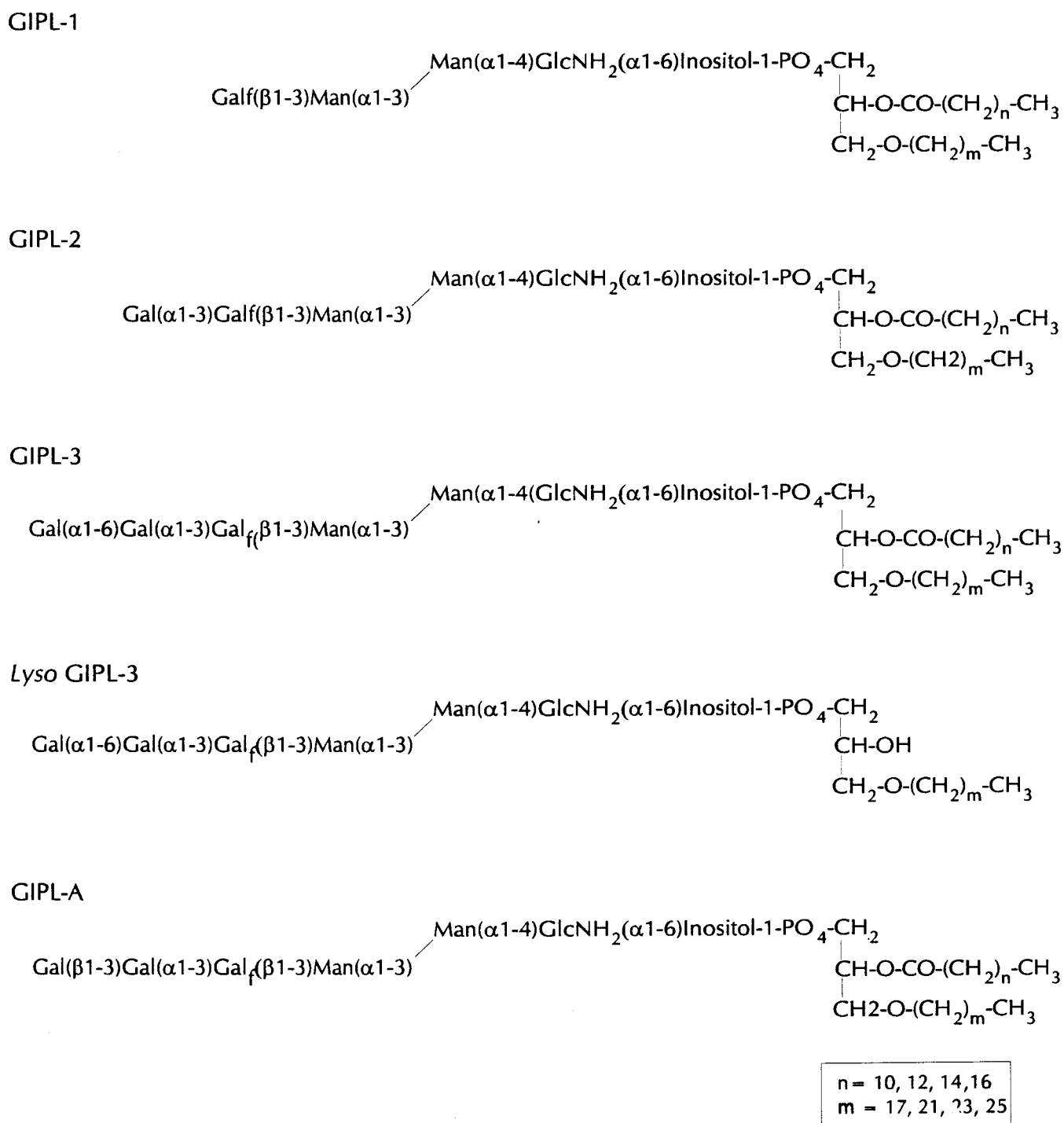


Figure 15 : Structures des principaux GIPL extraits de promastigotes de *Leishmania major* (McConville *et al.*, 1990a)

b) *Leishmania mexicana*

L. mexicana synthétisent des GIPL de type hybride et de type 2 (Figure 16). Les GIPL de type hybride, ainsi dénommés parce qu'ils possèdent un glycanne similaire à la fois au noyau des GPI ancrant les protéines et à celui des LPG, sont les plus abondants (environ 90%). Ils possèdent un alkylacyl-PI de composition relativement homogène dont les chaînes alkylées comportent presque exclusivement 18 carbones (McConville *et al.*, 1993).

Une partie des glycolipides iM3 et iM4 (respectivement 32% et 4%) possède un résidu d'éthanolamine phosphate substituant la glucosamine (EPiM3, EPiM4) (Figure 16) (McConville *et al.*, 1993). La présence de ce substituant est commune dans les GPI ancrant les protéines (en plus du résidu permettant l'attache de la protéine). Cependant, dans ce cas, il est fixé, sur un résidu de mannose (Deeg *et al.*, 1992). Chez d'autres parasites, la glucosamine des GIPL est substituée par du 2-aminoéthylphosphonate (Previato *et al.*, 1990; 1992; 1994) ou de l'éthanolamine phosphate (Previato *et al.*, 1993).

Quelques GIPL de type 2 sont également présents chez *L. mexicana* (environ 10%). Ainsi, cette espèce possède des molécules de GIPL-2 et de GIPL-3 identiques à celles de *L. major*, ainsi qu'un GIPL possédant les propriétés attendues d'un précurseur de LPG et appelé de ce fait LPGp (Figure 16) (McConville *et al.*, 1993). La partie glycanne de ce dernier est identique au noyau heptasaccharidique des LPG. De plus, il contient un lysoalkyl-PI comportant principalement de longues chaînes alkylées (C24:0, C26:0). LPGp est donc en tout point identique à l'ancrage du LPG (Ilg *et al.*, 1992).

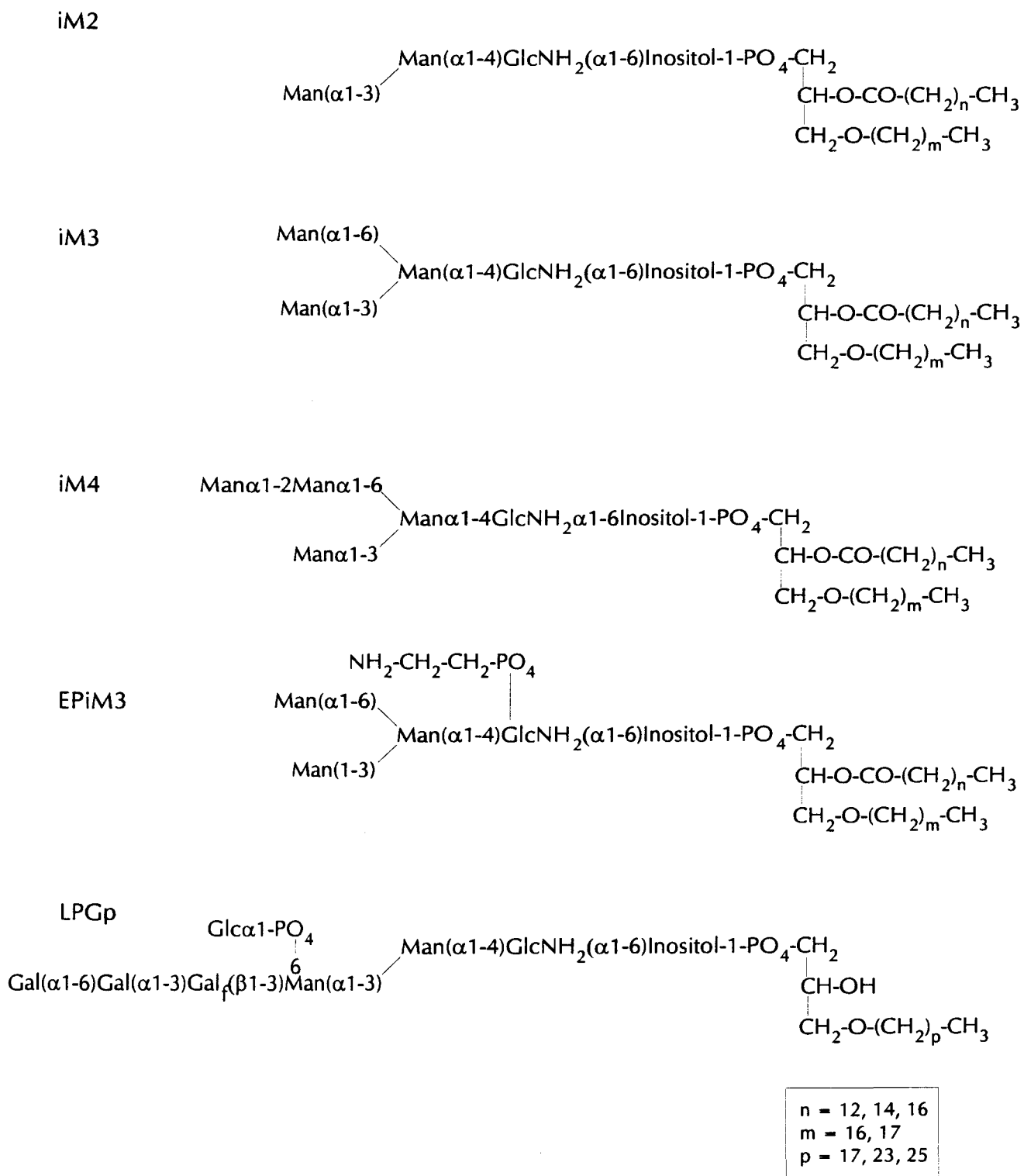


Figure 16 : Structures des principaux GIPL extraits des promastigotes de *Leishmania mexicana* (McConville *et al.*, 1993)

c) *Leishmania donovani*

L. donovani possède trois GIPL principaux nommés iM2, iM3 et iM4, identiques à ceux décrits chez *L. mexicana*. Comme dans cette espèce, la partie lipidique est un alkylacyl-PI comportant de courtes chaînes alkylées (C18:0) (Sevlever *et al.*, 1991; McConville et Blackwell, 1991). Chez *L. donovani*, l'existence d'un glycoposphosphingolipide (GIPL ancré dans la membrane par une céramide) a également été relatée (De Majumdar, 1992).

2. Modifications structurales des glycoinositolphospholipides au cours du développement du parasite

La différenciation des promastigotes en amastigotes s'accompagne de la disparition de l'épais manteau qui couvre la surface du promastigote. Ce phénomène est lié à la diminution du nombre des LPG et des protéines glypiées tel que la métalloprotéase gp63. Contrairement à ces molécules, les GIPL sont abondants à la fois dans les promastigotes et les amastigotes (McConville et Blackwell, 1991). Seule une légère diminution du nombre de GIPL peut être notée, reflétant probablement la réduction de la taille de la cellule. Toutefois, les structures de ces GIPL sont légèrement modifiées durant le développement du parasite.

Les amastigotes de *L. major* synthétisent des GIPL de type 2, dont la plupart sont également exprimés dans les promastigotes. L'abondance relative de ces glycolipides diffère toutefois dans ces deux stades du développement. La forme intracellulaire du parasite semble, en effet, favoriser les GIPL possédant de courtes chaînes glycaniques (M1, iM2, GIPL-1) (Tableau IV). Les GIPL des amastigotes diffèrent aussi de ceux des promastigotes par leur partie lipidique représentée par un lysoalkyl-PI ou un alkylacyl-PI (Schneider *et al.*, 1993). En revanche, les GIPL des promastigotes contiennent uniquement des alkylacyl-PI, à l'exception de lysoGIPL-3 (McConville *et al.*, 1990a). Enfin, les molécules de lysoGIPL-3 extraites des amastigotes contiennent principalement de l'acide stéarique

(C18:0) et ne seraient donc pas des précurseurs biosynthétiques des LPG des amastigotes (Schneider *et al.*, 1993).

Tableau IV : Comparaison de l'abondance des GIPL dans les deux principaux stades du développement de *L. major*

Nom du GIPL	Stade du développement de <i>Leishmania major</i>	
	Promastigotes	Amastigotes
M1*	+	++
iM2	+	++
GIPL-1	++	++
GIPL-2	++	++
GIPL-3	++	+
GIPL-A	++	+
Références	McConville <i>et al.</i> , 1990a	Schneider <i>et al.</i> , 1993

* M1 = Man α 1-4GlcNH α 1-6Inositol-PO $_4$ -lipide

+ : espèces minoritaires < 5%

++ : espèces majoritaires

Chez *L. donovani*, la transformation des promastigotes en amastigotes s'accompagne d'une simplification des structures glycaniques des GIPL. Les amastigotes produisent, en effet, deux GIPL principaux (M2, M3) possédant un glycanne linéaire formé de deux ou trois résidus de mannoses (Figure 17). La partie lipidique de ces GIPL ne semble pas différente de celle des GIPL de type hybride présents dans les promastigotes (McConville et Blackwell, 1991).

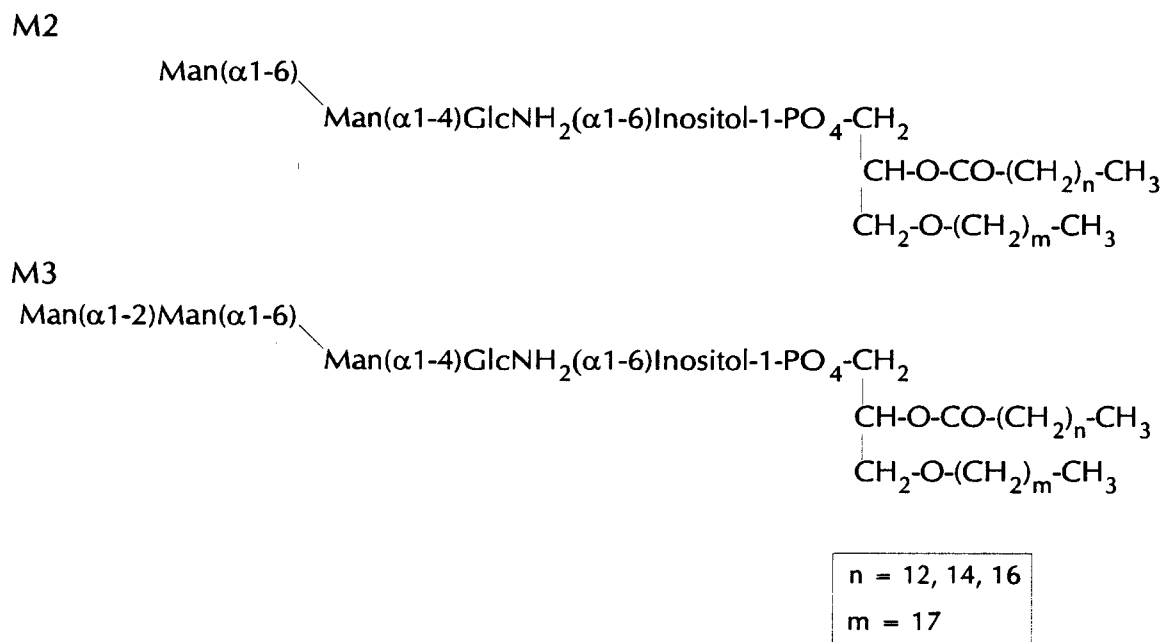


Figure 17 : Structures des GIPL extraits des amastigotes de *Leishmania donovani* (McConville et Blackwell, 1991)

B. Fonctions des glycoinositolphospholipides

A l'heure actuelle, les rôles des GIPL restent obscures. Ces molécules pourraient intervenir dans la synthèse des LPG, dans la protection du parasite, ou encore dans les interactions hôte-parasite.

1. Précurseurs biosynthétiques des lipophosphoglycannes

Certains GIPL de type 2 pourraient être des précurseurs biosynthétiques des LPG. Cette hypothèse s'appuie notamment sur l'homologie structurale existant entre quelques GIPL (en particulier LPGp) et l'ancrage membranaire du LPG. De plus, la localisation intracellulaire de quelques GIPL est parfaitement en accord avec ce rôle (McConville et Bacic, 1990).

Toutefois, seule une faible proportion (inférieure à 1%) des GIPL de type 2 interviendrait dans la biosynthèse des LPG (McConville *et al.*, 1994). En effet, les quantités de GIPL de type 2 varient énormément dans les différentes espèces de *Leishmania* (*L. donovani* : 10³ molécules/cellule, *L. mexicana* : 10⁵ molécules/cellule, *L. major* : 10⁷ molécules /cellule). Or, les quantités de LPG synthétisées dans ces espèces sont comparables

(McConville et Blackwell, 1991; McConville *et al.*, 1990b; 1993). Le rôle de précurseurs des LPG serait donc un rôle mineur des GIPL.

2. Précurseurs biosynthétiques des glycosyl-phosphatidylinositols ancrant les protéines

L'intervention des GIPL de type 1 dans la biosynthèse des GPI ancrant les protéines a également été suggéré par de nombreux auteurs. Cependant, les parties lipidiques de ces deux classes de GPI diffèrent (McConville et blackwell, 1991). De plus, aucun de ces GIPL ne possèdent de résidu d'éthanolamine phosphate, nécessaire à la liaison entre le noyau glycanique et le groupement carboxy-terminal de la protéine. Il est donc peu probable que les GIPL soient des précurseurs immédiat des GPI ancrant les protéines.

3. Protection du parasite

Les amastigotes de *L. major* peuvent être considérés comme des cellules ellipsoïdes de 4 μm de long et 2 μm de diamètre, possédant 4.10^6 GIPL à leur surface. En estimant la taille moyenne des glycannes de ces GIPL entre 2,4 et 3,2 nm^2 , ces structures pourraient couvrir de 45 à 60% de la membrane plasmique des amastigotes (Schneider *et al.*, 1993). Ce manteau de GIPL permettrait de masquer les protéines qui subsistent à la surface de l'amastigote et qui sont nécessaires aux fonctions cellulaires.

Certains GIPL pourraient inhiber les signaux de transduction dépendants de la PKC (McNeely et Turco, 1989), et de ce fait inhiber l'activation de la voie oxydative par les macrophages activés, comme il l'a été suggéré pour le LPG. Toutefois, le mécanisme d'inhibition de la PKC par les GIPL serait distinct de celui des LPG. Les amastigotes semblent, en effet, perturber la translocation de l'enzyme du cytosol vers la membrane plasmique (Descoteaux et Turco, 1993).

Par ces différents mécanismes, le manteau de GIPL contribue probablement à la survie du parasite dans les macrophages de l'hôte et dans le tube digestif de l'insecte.

4. Interactions hôte-parasite

Des anticorps dirigés contre les GIPL de type 2 sont présents dans le sérum des patients atteints de leishmanioses cutanées, indiquant que ces molécules sont fortement immunogéniques. Par ailleurs, ces anticorps peuvent être détectés en faible quantité dans des individus non infectés (McConville *et al.*, 1990a). Ils pourraient correspondre aux anticorps anti-galactose qui sont dirigés contre les épitopes Gal(α 1,3)Gal-, représentant près de 1% des IgG du sérum humain. Lorsqu'ils sont libérés dans le sang, les amastigotes pourraient être opsonisés par ces anticorps. Cette opsonisation faciliterait alors l'invasion des macrophages non infectés par l'intermédiaire des récepteurs du complément ou encore par les récepteurs Fc. Toutefois, les amastigotes de *L. donovani* n'expriment à leur surface que des GIPL de type 1, non reconnus par ces anticorps. Or, ces cellules semblent capables d'utiliser les récepteurs mannose-fucose du macrophage. Ainsi, le type de GIPL présents à la surface du parasite pourrait être à l'origine du choix des récepteurs du macrophage utilisés.

L'abondance des GIPL à la surface des parasites suggère des rôles importants pour ces molécules. En particulier dans les amastigotes, puisque à ce stade du développement, les LPG et les protéines glypiées ont pratiquement disparu. Ces rôles restent cependant à déterminer.

C. Biosynthèse des glycosyl-phosphatidylinositols libres

L'élucidation des structures des GIPL a permis certaines hypothèses concernant la biosynthèse des GPI libres, chez les leishmanies.

1. Biosynthèse des glycoinositolphospholipides

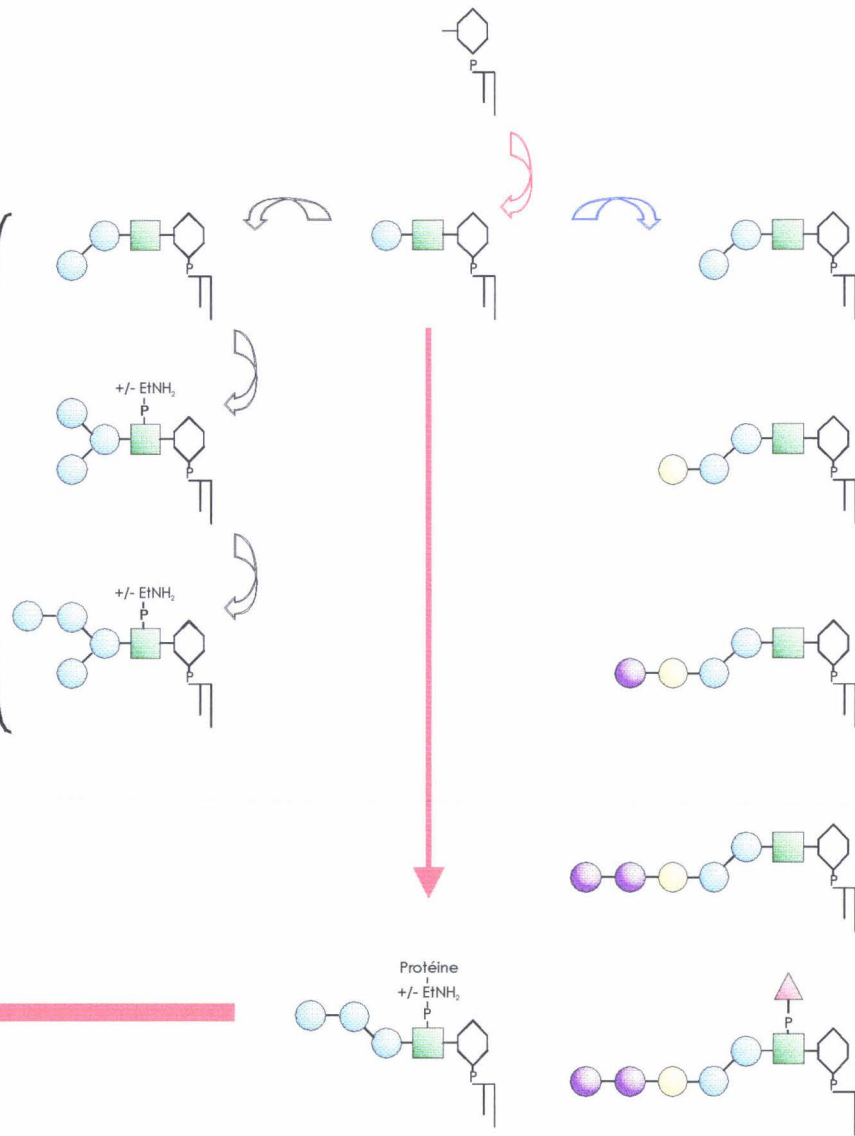
Comme les GPI ancrant les protéines, les GIPL semblent formés par l'addition séquentielle de monosaccharides sur un précurseur lipidique. Trois voies de biosynthèse peuvent être distinguées conduisant chacune à la formation d'un type de GIPL (Figure 18). Ces différentes voies peuvent être exprimées dans la même cellule, puisque les promastigotes de *L. mexicana* possèdent des GIPL de chaque type (McConville *et al.*, 1993).

Les études structurales révèlent que les différents types de GIPL possèdent des parties lipidiques distinctes. Les GIPL de type hybride possèdent exclusivement des chaînes alkylées ayant 18 atomes de carbones (McConville *et al.*, 1993). Par contre, celles des GIPL de type 2 comportent souvent 18, 24 ou 26 atomes de carbones (McConville *et al.*, 1990a). Ceci suggère que les enzymes des différentes voies de biosynthèse sélectionnent ou ont accès seulement à une population donnée d'alkylacyl-PI. Cette dernière hypothèse implique l'existence d'une compartimentation cellulaire des trois voies de biosynthèse (McConville *et al.*, 1993; 1994). Un mécanisme d'élongation ou d'échange des chaînes alkylées pourraient encore expliquer ces observations. Cependant de tels mécanismes n'ont jamais été décrits auparavant.

2. Biosynthèse des lipophosphoglycannes

Les précurseurs potentiels des LPG (lysoGIPL-3, LPGp) présentent des lysoalkyl-PI hautement enrichis en longues chaînes alkylées (C24:0, C26:0). En revanche, les GIPL dont ils dérivent possèdent des alkylacyl-PI dont la composition en chaînes alkylées est plus hétérogène (C18:0, C22:0, C24:0, C26:0) (McConville *et al.*, 1990a). Une étape de déacylation par une phospholipase endogène interviendrait donc dans le processus de biosynthèse. Un tel mécanisme a déjà été décrit chez *T. brucei* dans la biosynthèse de l'ancrage de l'antigène variable (Materson *et al.*, 1990). D'autre part, comme précédemment une compartimentation cellulaire des populations d'alkylacyl-PI peut être envisagée.

GIPL de type hybride



GIPL de type 2

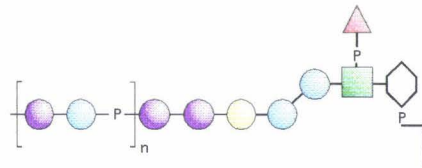
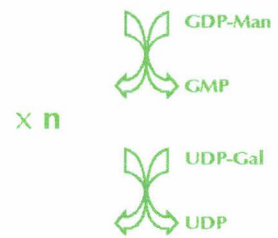
GPI d'ancrage protéique

● Mannose

● Galactopyranose

● Galactofuranose

▲ Glucose



LPG

L'existence du précurseur LPGp suggère que l'ancrage glycolipidique du LPG soit totalement achevé avant l'addition des unités de répétition. Toutefois, la glucosylation du noyau saccharidique ne semble pas nécessaire à l'initiation de la chaîne de phosphoglycane, puisque des formes tronquées de LPG ne possédant pas de glucose phosphate ont été caractérisées (McConville et Homans, 1992; Elhay *et al.*, 1993). A l'inverse, le transfert du premier résidu de galactose ne semble pas nécessaire à la glucosylation du mannose distal de la glucosamine. En effet, des GIPL ayant la structure $\text{Glc}(\alpha 1\text{-PO}_4\text{-6})\text{Man}(\alpha 1\text{-3})\text{Man}(\alpha 1\text{-4})\text{GlcNH}_2\text{-PI}$ ont été identifiés dans des souches déficientes en LPG de *L. donovani* (Huang et Turco, 1993).

Toutefois, il faut rappeler que le rôle des GIPL dans la biosynthèse des LPG est probablement mineur. En conséquence, ces quelques remarques doivent être considérées avec prudence.

II. Autres parasites de la famille des Trypanosomatidae

Contrairement aux LPG, les GIPL ne sont pas l'apanage des parasites du genre *Leishmania*. Ces glycoconjugués sont également synthétisés par d'autres parasites de la famille des Trypanosomatidae.

A. *Trypanosoma cruzi*

T. cruzi, le parasite responsable de la maladie de Chagas, exprime à sa surface un lipopeptidophosphoglycane (LPPG) hétérogène (Lederkremer *et al.*, 1976), dont l'expression semble restreinte au stade épimastigote (forme non infectieuse présente dans l'insecte) (Zingales *et al.*, 1982). La structure de ce glycolipide extrait des parasites en phase stationnaire de croissance a été décrite par Previato *et al.*, en 1990. Il possède la séquence $\text{Man}(\alpha 1\text{-2})\text{Man}(\alpha 1\text{-2})\text{Man}(\alpha 1\text{-6})\text{Man}(\alpha 1\text{-4})\text{GlcNH}_2$ également présente dans l'ancrage de l'antigène 1G7 de cette même espèce (Güther *et al.*, 1992). Il diffère cependant de celui-ci par la présence d'un ou deux résidus de galactofuranose, d'un résidu de 2-aminoéthylphosphonate, et d'une céramide (Figure 19) (Previato *et al.*, 1990; Lederkremer *et al.*, 1991). Ces deux derniers composés sont également rencontrés dans le

lipophosphoglycane du protozoaire *Acanthamoeba castellanii* (Dearborn *et al.*, 1976) et dans les GPS de *Leptomonas samueli* (Previato *et al.*, 1992; 1994). Une faible quantité de peptide est présente dans les fractions purifiées de LPPG. Cependant ils ne sont probablement pas liés covalentiellement au glycanne (Previato *et al.*, 1990; Lederkremer *et al.*, 1991). Enfin, il faut souligner le caractère antigénique du LPPG. La séquence Gal β (1-3)Man(α 1- serait responsable de cette antigénicité (Mendonça-Previato *et al.*, 1983).

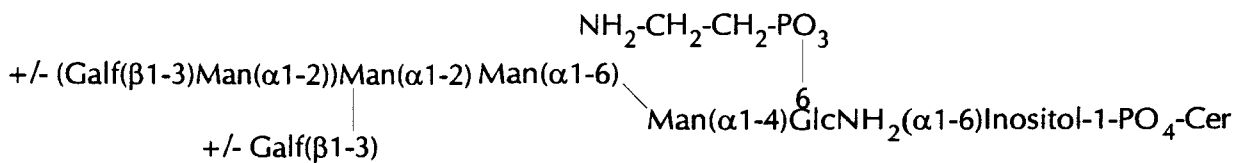


Figure 19 : Structures des GIPL de *Trypanosoma cruzi* (Previato *et al.*, 1990; Lederkremer *et al.*, 1991)

Récemment, deux GIPL similaires au LPPG ont été caractérisés chez *T. cruzi*. Ces molécules extraites des parasites en phase exponentielle de croissance possèdent une partie glycanne identique au LPPG, mais liée cette fois à un alkylacylglycérol (Lederkremer *et al.*, 1993). Les auteurs soulèvent l'hypothèse d'un échange de la partie lipidique au cours de la croissance du parasite. Un tel mécanisme a déjà été suggéré pour les GPI ancrant les protéines de *Saccharomyces cerevisiae* (Conzelman *et al.*, 1992).

B. *Leptomonas samueli* et *Endotrypanum schaudinii*

Dernièrement, des GIPL ont également été caractérisés chez les parasites *Leptomonas samueli* (Previato *et al.*, 1992; 1994) (Figure 20) et *Endotrypanum schaudinii* (stade promastigote) (Previato *et al.*, 1993) (Figure 21). Ces deux organismes synthétisent un ensemble de GPS comparables aux GIPL de type 2 des leishmanies, de part l'existence de la séquence Man(α 1-3)Man(α 1-4)GlcNH $_2$ (α 1-6)Ins-PO $_4$ -lipide.

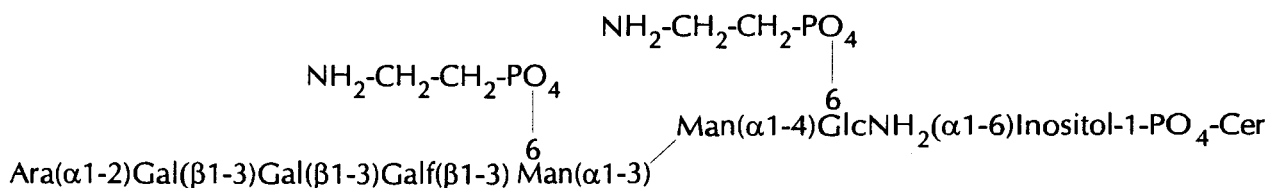


Figure 20 : Structure des GIPL d'*Endotrypanum schaudinii* (Previato *et al.*, 1993)

Ces glycolipides sont substitués par deux résidus de 2 aminoéthylphosphonate (*Leptomonas samueli*) ou d'éthanolamine phosphate (*Endotrypanum schaudinii*).

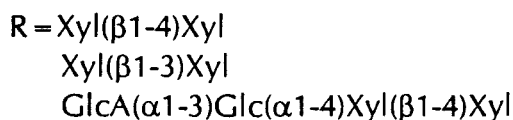
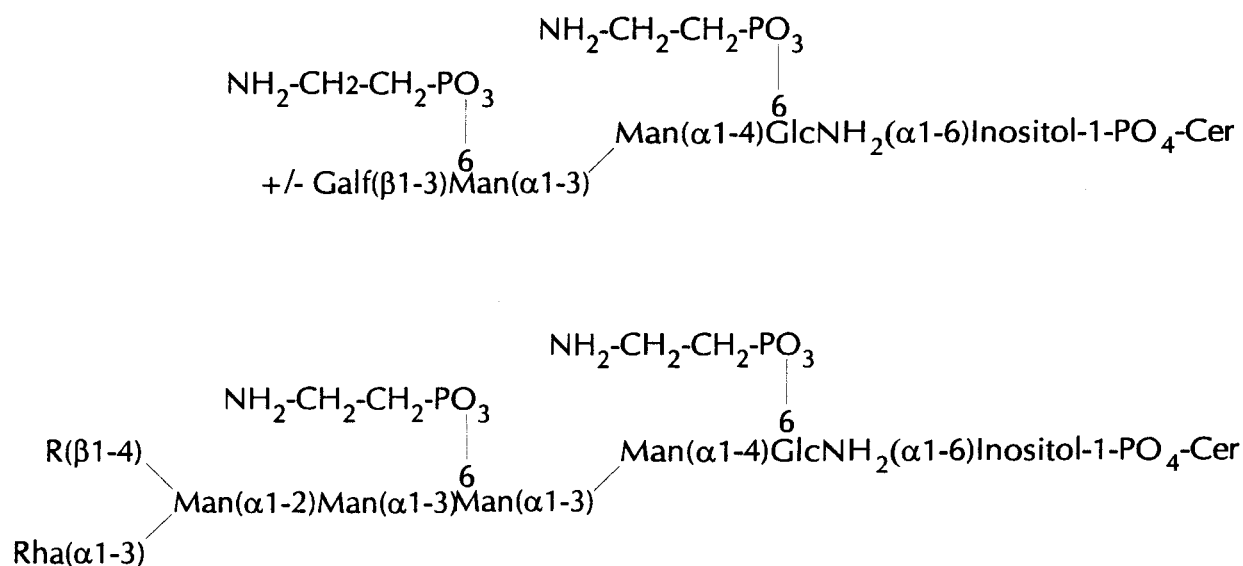


Figure 21 : Structures des GIPL de *Leptomonas samueli* (Previato *et al.*, 1992; 1994)

Une telle substitution a déjà été décrite dans le LPPG de *T. cruzi* (aminoéthylphosphonate), ou dans quelques GIPL de *L. mexicana* (éthanolamine phosphate) (McConville *et al.*, 1993). La partie glycannique des GIPL de *L. samueli* et *E. schaudinii* est constituée de mannose, de galactose, comme dans l'ensemble des GIPL décrits auparavant, mais aussi

de xylose, de glucose, d'acide glucuronique, ou encore d'arabinose (Figure 20; Figure 21). Enfin, la partie lipidique de ces molécules permet de les rapprocher du LPPG de *T. cruzi*. Cependant, la base constituant la céramide est une phytosphingosine dans un cas (*Leptomonas samueli*, *Endotrypanum schaudinii*), et une sphinganine dans l'autre (*T. cruzi*).

La découverte des GIPL est très récente et seules des données structurales concernant ces molécules sont actuellement disponibles dans la littérature. Selon leur structure, les GIPL peuvent être divisés en trois groupes désignés type 1, type 2 et type hybride. Les structures des GIPL de type 1 et de type 2 sont apparentées respectivement aux noyaux des GPI ancrant les protéines et des LPG. Alors que les GIPL de type hybride présentent les caractéristiques de ces deux premiers groupes. Cette classification adoptée pour les GIPL extraits des leishmanies, où ils ont été décrits en premier lieu, est également applicable aux autres parasites de la famille des Trypanosomatidae.

Les fonctions ou les mécanismes de biosynthèse de ces molécules sont totalement inconnus. Toutefois quelques suggestions ont été faites sur la base des structures déterminées. Ainsi, des rôles dans la protection du parasite ou dans les interactions de celui-ci avec son hôte sont généralement attribués à ces molécules. Il faut à ce titre remarquer que la plupart des GIPL portent des résidus d'aminoethylphosphonate ou d'éthanolamine phosphate. Cette charge serait-elle importante pour les fonctions de la molécule? Bien que leurs rôles ne soient pas définis, les GIPL semblent importants pour le parasite comme en témoigne leur abondance à chacun des stades évolutifs du parasite.

OBJECTIFS DE TRAVAIL

L'important rôle joué par la surface cellulaire dans divers processus tel que la communication cellule-cellule, les interactions ligand-recepteur, justifie l'intensité des recherches sur les composants membranaires des parasites. Le présent rapport fait le bilan des découvertes sur les GPI, principaux glycoconjugués du manteau cellulaire des trypanosomatides, en matière de structure et de biosynthèse. Il présente également les dernières avancées concernant les fonctions de ces molécules. Ces travaux montrent l'importance des molécules de la famille des GPI pour la survie et l'infectivité du parasite et ne font que renforcer l'intérêt qui leur est porté.

Parmi les GPI, c'est indubitablement la classe des GIPL la moins bien caractérisée. Pourtant l'abondance de ces derniers à la surface cellulaire suggère des rôles importants pour ces glycolipides. Leur récente mise en évidence chez *Leptomonas samueli* (parasite monoxène) semble indiquer que leur fonction première est relative à la survie chez l'insecte. D'autre part, alors que des mutagenèses chimiques ont été réalisées, aucun mutant déficient en GIPL n'a été décrit. Posons la question de la létalité de ces mutations pour le parasite.

L'étude structurale des GIPL extraits de parasites de la famille des Trypanosomatidae peut apporter une meilleure compréhension des fonctions biologiques de ces glycoconjugués. Notre étude peut également contribuer à la taxonomie de ces parasites, dont les critères biochimiques font encore défaut et apporter de nouveaux éléments concernant l'évolution des parasites de la famille des Trypanosomatidae.

MATERIELS ET METHODES

L'ensemble des matériels et méthodes étant décrit dans les articles présentés par la suite, il n'est pas détaillé dans ce chapitre. Nous présentons ci-dessous la stratégie développée pour l'analyse structurale des glycoinositolphospholipides (GIPL).

Les molécules de la famille des Glycosyl-phosphatidylinositols (GPI) présentent fréquemment des composants assez inhabituels tel que des hexofuranoses, des pentoses, ou encore des substituants d'aminoéthylphosphonate ou d'éthanolamine phosphate. Pour élucider la structure de telles molécules, il nous faut déterminer :

- La composition en monosaccharides
- La configuration des résidus monosaccharidiques
- Les liaisons unissant ces monosaccharides
- La présence éventuelle de substituants de nature non saccharidique
- La localisation de ces substituants

Nous avons pour cela développé une stratégie utilisant des techniques de séparation et de spectroscopie modernes et performantes telles que la chromatographie d'échange d'anions à haut pH (HPAEC), la spectrométrie de masse (SM) et la résonance magnétique nucléaire (RMN). Nous nous sommes efforcés d'éviter l'emploi de méthodes dégradatives décrites dans la littérature (désamination nitreuse, déphosphorylation par l'acide fluorhydrique aqueux) car elles conduisent à la perte d'informations telles que la présence de substituants d'aminoéthylphosphonate ou d'éthanolamine phosphate. De plus, les hexofuranoses sont sensibles à ces méthodes.

Les GIPL possèdent la structure $R\text{-Man}(\alpha 1-4)\text{GlcNH}_2(\alpha 1-6)\text{Ins-PO}_4$ -lipide ou R correspond à différents oligosaccharides. Les parties lipidique et glucidique ont été analysées séparément (Figure 22). L'hydrolyse alcaline ménagée des GIPL (KOH 1M, 37°C, 72h) permet l'obtention d'alkylglycérols ou de céramides selon la nature de la partie lipidique et de PI-oligosaccharides. L'étude de mélange d'oligosaccharides par RMN ou spectrométrie de masse en tandem (MS-MS) étant complexe, une étape de séparation des molécules est presque toujours nécessaire préalablement à

l'analyse structurale proprement dite. La chromatographie d'échange d'anions à haut pH est ici appliquée à la séparation des PI-oligosaccharides. Les fractions obtenues sont ensuite soumises à plusieurs analyses :

- Analyse de la composition en monosaccharides par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) des méthylglycosides triméthylsilylés
- Analyse des liaisons par GC-MS des alditols acétates perméthylés et des méthyl glycosides partiellement méthylés et acétylés
- Analyse des PI-oligosaccharides natifs et perméthylés par spectrométrie de masse en mode FAB (Fast atom bombardment)
- Analyse des PI-oligosaccharides natifs et perméthylés en MS-MS
- Analyse des PI-oligosaccharides natifs par spectroscopie RMN monodimensionnelle (^1H et ^{31}P)
- Analyse des PI-oligosaccharides natifs par spectroscopie RMN bidimensionnelle (expériences TOCSY, ROESY, HMQC, dqCOSY)

La spectrométrie de masse FAB permet d'établir la masse moléculaire et d'en déduire la composition en monosaccharides (nombre d'hexoses, de pentoses, etc.) et la présence de substituants. La séquence des résidus, la position des chaînes latérales et la localisation des substituants non saccharidiques peuvent être déduites des ions fragments observés dans les spectres de masse en mode FAB. Toutefois, la faible intensité de ces signaux, nous a incité à recourir à la spectrométrie de masse en tandem qui permet la fragmentation par collision des ions moléculaires avec des atomes de gaz neutres tel que l'hélium.

Les informations ainsi obtenues sont confirmées et complétées par différentes expériences de RMN. Les spectres monodimensionnel du proton permettent d'établir la configuration anomérique des résidus monosaccharidiques. Les méthodes de corrélation homonucléaires intra-résidu (par exemple TOCSY) permettent d'assigner les résonances des atomes d'hydrogène et précisent la nature des résidus. Les expériences de corrélation inter-résidu (par exemple ROESY), quant à elles, indiquent la

séquence et le type des liaisons. Enfin, la présence de résidus d'éthanolamine phosphate, d'aminoéthylphosphonate et phosphore inorganique est visible sur les spectres 1D du phosphore.

La combinaison des ces différentes techniques permet la détermination des structures complètes des PI-oligosaccharides.

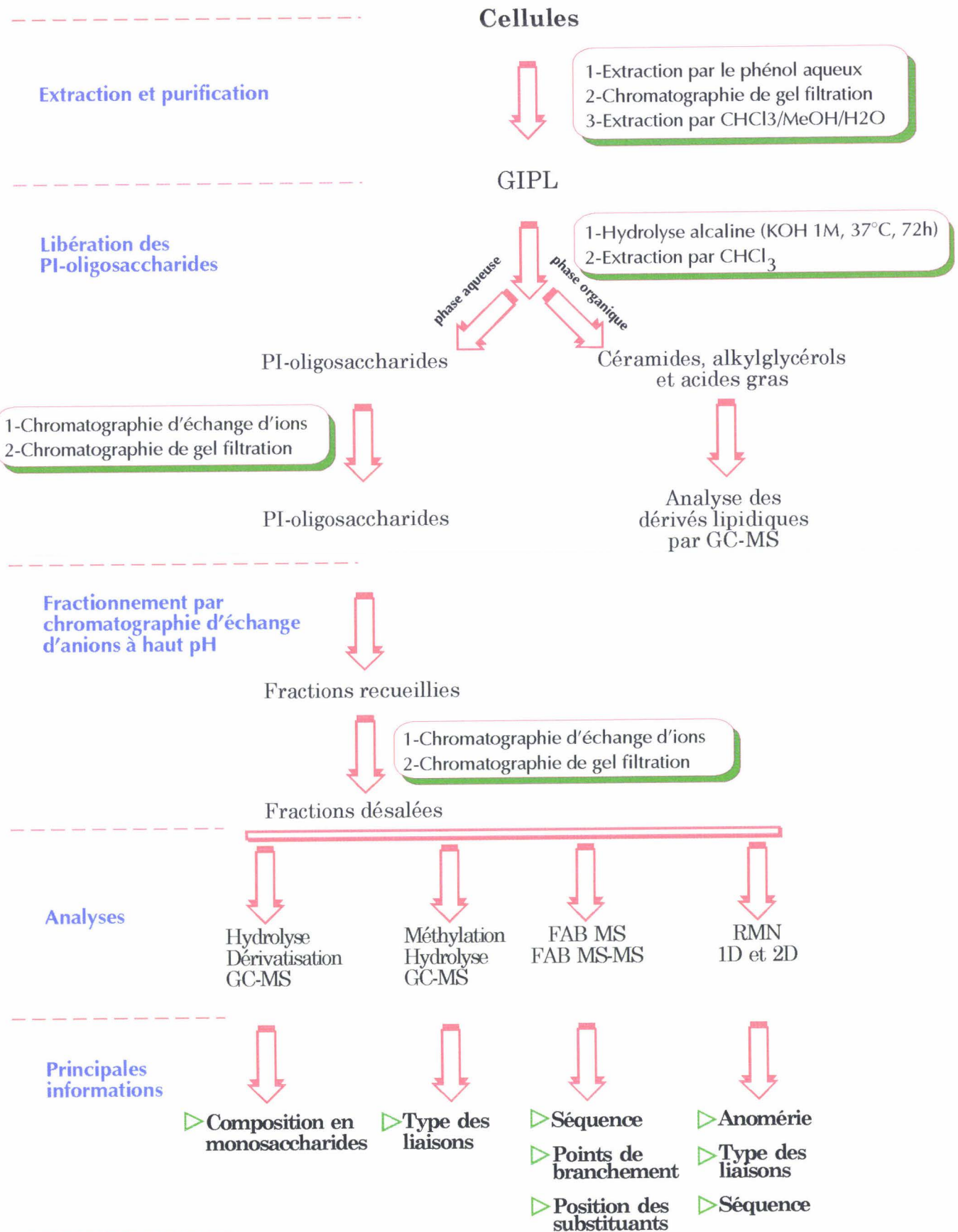


Figure 22 : Stratégie employée pour l'isolement et l'étude structurale des GIPL

TRAVAUX PERSONNELS

**Glycosylinositolphospholipids from
members of the trypanosomatidae family:
Investigation on the lipid moiety**

**F. Routier, J.O. Previato, C. Jones,
R. Wait and L. Mendonça-Previato**

Ciencia e Cultura 45(1): 66-68

Le premier membre de la famille des Trypanosomatidae fût découvert au début de ce siècle, en Guinée française. Il appartenait au genre *Endotrypanum* (Shaw, 1992). Cette même année 1908, Chagas découvrait le premier cas de trypanosomiase américaine, appelée par la suite maladie de Chagas, et caractérisé une année plus tard le parasite responsable de cette maladie : *Trypanosoma cruzi*. Dès lors, de nombreuses espèces ont été décrites, agrandissant sans cesse cette famille de parasites. Du fait de leur importance médicale, les parasites du genre *Leishmania* et *Trypanosoma* ont fait l'objet de recherches intensives. Toutefois, ils ne représentent qu'une partie de la famille des Trypanosomatidae. D'autres parasites peuvent infecter des arthropodes, des plantes, des reptiles ou des mammifères (Vickerman, 1976). A l'heure actuelle, la littérature concernant ces parasites non pathogènes pour l'Homme est extrêmement limitée.

De nombreuses théories concernant l'évolution de ces parasites se sont succédées (Baker, 1963; Molyneux, 1984). Il est généralement accepté que les parasites pathogènes pour l'Homme aient évolué à partir des trypanosomatides monoxènes d'insectes encore appelés trypanosomatides inférieurs. Ainsi, au cours de l'évolution, le parasite monoxène a dû répondre à plusieurs exigences de manière à coloniser un nouvel hôte, puis à survivre et se développer dans celui-ci. Quelles sont les modifications qui ont permis la colonisation d'un nouvel habitat et le développement d'un cycle infectieux. L'étude et la comparaison de trypanosomatides monoxènes et polyxènes, pathogène ou non pour leur hôte, peuvent apporter des éléments de réponse. Nous avons donc choisi d'étudier des parasites provenant d'arthropodes (*Herpetomonas samuelpessoai*, *Crithidia luciliae*), de plantes (*Phytomonas serpens*), de reptiles (*Leishmania adleri*, *Leishmania tarentolae*) ou de mammifères (*Endotrypanum schaudinii*) représentants divers stades de l'évolution de la famille des Trypanosomatidae.

Le rôle capital des composants membranaires dans les interactions hôte-parasite, indispensables à l'initiation de l'infection, a orienté nos recherches vers les glycoconjugués et plus particulièrement les GIPL. En premier lieu, nous avons analysé la partie lipidique de ces molécules.

..... Carbohydrate Research in Brazil

Glycosylinositolphospholipids from members of the trypanosomatidae family: Investigation on the lipid moiety

FRANÇOISE ROUTIER¹, JOSÉ O. PREVIATO², CHRISTOPHER JONES³,
ROBIN WAIT⁴, LUCIA MENDONÇA-PREVIATO²

¹Laboratoire de Chimie Biologique, USTL 59655, Villeneuve D'Ascq, France,

²Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ 21944, Brasil,

³Laboratory of Molecular Structure, NJBSC, Potters Bar, EN63QG, UK

and ⁴Division of Pathology, PHLS, Salisbury, SP40JG, UK

Glycosylinositolphospholipids (GIPLs) which are not linked to either protein or polysaccharide are present in monogenetic trypanosomatids *Crithidia luciliae* and *Herpetomonas samuelpessoai* and in digenetic trypanosomatids *Endotrypanum schaudinii*, *Leishmania adleri*, *L. tarentolae* and *Phytomonas serpens*. All these GIPLs fall within the glycosylated phosphatidylinositol (GPI) family since they contain the core structure Man α (1-4)GlcNH $_2$ α (1-6)inositol-phosphate. Two different lipid moieties can be found in the GIPLs of these trypanosomatids. The species *C. luciliae*, *H. samuelpessoai* and *E. schaudinii* synthesize phosphosphingolipids containing as the long chain base phytosphingosine, whereas *L. adleri*, *L. tarentolae*, and *P. serpens* synthesize glycerophospholipids. *Leishmania adleri* and *L. tarentolae* contain predominantly C_{22:0}, C_{24:0} and C_{26:0} alkyl chains, while a hexadecylacylglycerol (C_{16:0}) is present in *P. serpens*.

*Glicosilinositolfosfolípidios (GIPLs) que não estão ligados a proteína ou polissacarídeos estão presentes em tripanosomatídeos monogênicos *Crithidia luciliae* e *Herpetomonas samuelpessoai* e em tripanosomatídeos digenéticos *Endotrypanum schaudinii*, *Leishmania adleri*, *L. tarentolae* e *Phytomonas serpens*. Todos esses GIPLs pertencem à família dos fosfatidilinositol glicosilados (GPI), pois contêm a estrutura core Man α (1-4)GlcNH $_2$ α (1-6)inositol-fosfato. Duas porções lipídicas diferentes são encontradas nos GIPLs desses tripanosomatídeos. As espécies *C. luciliae*, *H. samuelpessoai* e *E. schaudinii* sintetizam fosfosfingolípídios contendo como base de cadeia longa fitoesfingosina, enquanto *L. adleri*, *L. tarentolae* e *P. serpens* sintetizam glicero-fosfolípidios. *Leishmania adleri* e *L. tarentolae* contêm predominantemente cadeias alquílicas C_{22:0}, C_{24:0} e C_{26:0}, enquanto um hexadecilacilglicérol (C_{16:0}) está presente em *P. serpens*.*

Glycosylinositolphospholipids (GIPLs) which are not linked to either protein or polysaccharide are present on the cell surface of different species of *Leishmania* (1), *Trypanosoma cruzi* (2,3) and *Leptomonas samueli* (4). Although they are present in a very high number of copies their function is still unknown. In *Leishmania* they may be precursors of the GPI-anchor of lipophosphoglycan (LPG), and may be involved in host-parasite cellular interactions (1).

Interestingly, the GIPLs of the digenetic protozoan *Leishmania* and the monogenetic species *L. samueli* bear considerable structural homology in their glycan moieties, whereas the lipopeptidophosphoglycan (LPPG) of *T. cruzi* shows some divergence in this respect. Although *L. samueli* cells are able to synthesize a phosphosphingolipid that is similar to the lipid portion of *T. cruzi* LPPG, the *Leishmania* GIPLs contain glycerophospholipids. To understand the importance of these structures in the evolutionary process of the Trypanosomatidae Family and to clarify the biological significance of these molecules, we compared the lipid moieties of the glycosylinositolphospholipids from other monogenetic and digenetic genera and species of this family. The organisms investigated included *Crithidia luciliae*, *Herpetomonas samuelpessoai*, *Leishmania adleri*, *L. tarentolae*, *Endotrypanum schaudinii* and *Phytomonas serpens*.

The cells of these trypanosomatids were obtained as follows: the monogenetic species (*C. luciliae*, *H. samuelpessoai*) were grown in a medium containing (g/L): sucrose, 20; yeast extract, 3; trypticase, 3; KCl, 20; folic acid, 0.02; hemin, 0.01 (5). They were incubated for 3 days at 28°C with shaking (80 rpm). Cells of digenetic species (*L. adleri*, *L. tarentolae*, *E. schaudinii* and *P. serpens*) were obtained from a 4-day old culture in Brain Heart Infusion medium, supplemented with 10% fetal calf serum and 0.001% hemin (2).

Glycosylinositolphospholipids were isolated by the method described by Previato et al (4). Briefly, frozen cells of trypanosomatids were thawed and extracted with cold water three times. The residue remaining after the last cen-

Correspondence to: Lucia Mendonça Previato, Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, CCS, Bloco I, Cidade Universitária, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, RJ 21944, Brasil.

Carbohydrate Research in Brazil

trifugation was extracted with 45% (v/v) aqueous phenol at 75°C. The aqueous layer was dialyzed, freeze-dried, dissolved in water, and applied to a Bio-Gel P-100 column (2 x 100 cm). The excluded material was lyophilized and the dry residue shaken several times with chloroform/methanol/water (10:10:3), for GIPL extraction.

For analysis of fatty acid composition the GIPLs were transesterified with 0.5 M methanolic HCl for 18 h at 80°C. The fatty acid methyl esters were extracted into hexane and analyzed by gas chromatography (GC) using an OV-101 capillary column, with temperature programming from 180 to 310°C/5°C min⁻¹.

Mild alkaline hydrolysis (1 M KOH, 37°C for 48 h) of GIPLs liberated a phosphoinositol-oligosaccharide (PI-oligosaccharide) and a chloroform soluble lipid moiety. The lipid components recovered by chloroform extraction were degraded by acid methanolysis, which resulted in the release of either long chain bases or alkylglycerols, depending on the structure of the GIPL. These were characterized by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The long chain bases were analyzed after *N*-acetylation and *O*-trimethylsilylation. Alkylglycerols were converted to *O*-trimethylsilyl derivatives. GC-MS was performed using a 25 m vitreous silica column coated with the methylsilicone stationary phase DB-1, which was temperature programmed from 180°C to 310°C/5°C min⁻¹. Both electron impact (EI) and chemical ionization (CI) spectra (using ammonium as reagent gas) were recorded.

For ¹H-Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (¹H-NMR) the samples were exchanged by repeated lyophilization from deuterium oxide before final solubilization in

Table 1 — Long chain base and fatty acid compositions of GIPLs from *C. luciliae*, *H. samuelpeessoai* and *E. schaudinii*.

	Trypanosomatids		
	<i>C. luciliae</i>	<i>H. samuelpeessoai</i>	<i>E. schaudinii</i>
	mol%		
Long chain base			
C ₂₀ -Phytosphingosine	62		35
C ₂₁ -Phytosphingosine	38	87	65
C ₂₂ -Phytosphingosine		13	
Fatty acid			
18:0	10.0	2.0	
18:0(2-hydroxy)	33.9	10.7	12.6
24:0	56.1	4.3	80.6
25:0		52.0	6.9
26:0		18.8	
27:0		12.2	

Table 2 — Alkylacylglycerol composition of GIPLs from *L. adleri*, *L. tarentolae* and *P. serpens*.

	Trypanosomatids		
	<i>L. adleri</i>	<i>L. tarentolae</i>	<i>P. serpens</i>
	mol%		
Alkyl of alkylglycerol			
16:0			100
22:0	30.3	6.9	
24:0	59.6	67.0	
26:0	4.1	26.1	
Fatty acid			
14:0	29.4	27.7	5.0
16:0	12.8	10.6	52.1
18:0	57.8	61.7	42.9

0.5 mL of D₂O. All spectra were obtained at 30°C in 5 mm tubes and probes. The spectra were obtained using a Bruker AM 500 Mz spectrometer. Proton chemical shifts were referenced to internal 3-(trimethylsilyl) propionic 2,2,3,3-d₄ acid, at 0 ppm.

Examination of the ¹H-NMR spectra of the PI-oligosaccharides revealed (in all strains except that from *P. serpens*), an intense pair of low field resonances, typically at δ 5.769 and 5.581 (Fig. 1), showing a 3.5 Hz coupling, which could be assigned to H-1 of glucosamine (4). The presence of two signals results from partial phosphate migration from C-1 to C-2 of the inositol ring during alkaline cleavage. These signals are characteristic of the conserved core of all hitherto described members of the glycosylphosphatidylinositol (GPI) family (6). The failure to observe these signals from the inositol phosphate terminus, in the material from *P. serpens*, may be due to the high molecular weight of the oligosaccharide portion of the PI-oligosaccharide from this species (7).

Long chain bases (LCB) were recovered from methanolysates of the chloroform-soluble lipid components after alkaline treatment of GIPLs from *C. luciliae*, *H. samuelpeessoai* and *E. schaudinii*, whereas *L. adleri*, *L. tarentolae* and *P. serpens* contained alkylglycerols.

The major LCB in *C. luciliae* was identified as a C₂₀-phytosphingosine from the EI and CI mass spectra of its *N*-acetyl *O*-TMS ether derivatives. On ammonium-CI, a protonated molecule was obtained at m/z 604, while the EI spectrum contained a prominent fragment at m/z 429 (M-174) (4). This compound comprised about 62% of the total LCB,

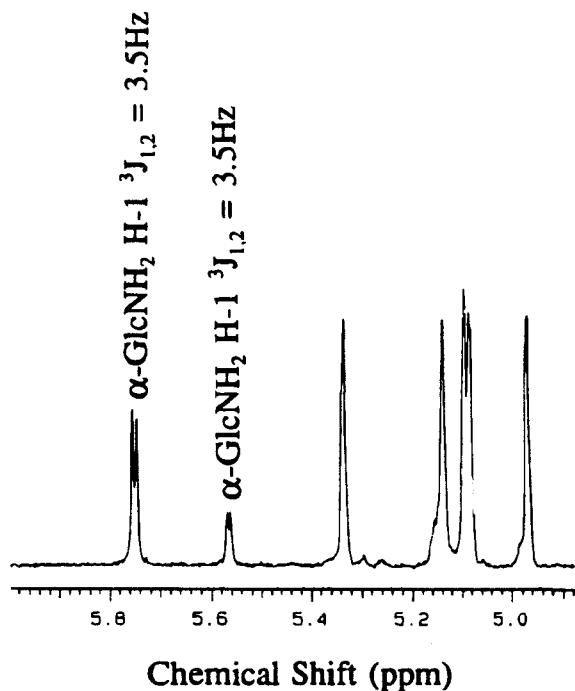


Figure 1. Partial ¹H-NMR spectrum of a PI-oligosaccharide from *L. samueli*. The doublet of signals 5.769 (major) and 5.581 (minor), attributable to H-1 of α-GlcNH₂ (4) one characteristic of the sequence Man α (1-4)GlcNH₂ α (1-6) inositol-phosphate.

Carbohydrate Research in Brazil

the remaining 38% consisting of two isomeric compounds that were identified by GC-MS as C₂₁-phytosphingosine (Table 1). Using the same procedure *H. samuelpessoai* and *E. schaudinii* were shown to contain mainly C₂₁-phytosphingosine.

Table 2 lists the alkylglycerols liberated from *L. adleri*, *L. tarentolae* and *P. serpens*. *Leishmania adleri* contained predominantly a C_{24:0} and C_{22:0} alkyl groups, much less of the C_{26:0} homologue, while *L. tarentolae*, contained C_{24:0} and C_{26:0} alkyl chains as major components. *P. serpens* was quite distinct in its alkyl chain composition, containing exclusively a C_{16:0} compound.

Tables 1 and 2 summarize the fatty acid compositions of the GPI lipids. The materials from *L. tarentolae* and *L. adleri* were very similar, containing predominantly stearic acid with smaller amounts of myristic and palmitic acids. The composition of *P. serpens* was qualitatively similar, but the proportions of palmitic and stearic acids were roughly equivalent.

Criethidia luciliae contained stearic and lignoceric acids, and a third component identified as 2-hydroxystearic acid on the basis of its mass spectral fragments (8). This compound had a molecular ion at m/z 314, and an intense ion at m/z 255 (M-59), a fragmentation characteristic of 2-hydroxy fatty acids. On trimethylsilylation, the molecular ion shifted to m/z 386, consistent with the presence of a single hydroxyl group, while cleavage on the carboxyl side of hydroxyl bearing carbon atom produced an intense ion at m/z 327. A compound with retention characteristics and mass spectral behavior identical to the 2-hydroxystearic acid was also present in the fatty acid profile of *H. samuelpessoai*. The major compound was C_{25:0} (pentacanoic) saturated acid, the remaining components being two isomeric C_{26:0} and C_{27:0} acids.

Endotrypanum schaudinii contained predominantly lignoceric acid together with 2-hydroxystearic acid and a small amount of pentacanoic acid (C_{25:0}).

The present data show that two different lipid moieties can be found in the GIPLs of trypanosomatids. The species *C. luciliae*, *H. samuelpessoai* and *E. schaudinii* synthesize phosphosphingolipids, whereas *L. adleri*, *L. tarentolae* and *P. serpens* synthesize glycerophospholipids. The structural similarities of the GIPL-lipid portion of two reptilian *Leishmania* with mammalian *Leishmania* species (1), permit the speculation that glycolipids containing alkylacylglycerols are characteristic of the genus *Leishmania*. A hexadecylacylglycerol was nevertheless found in *P. serpens* GIPL.

All species that synthesize phosphosphingolipids contain as the LCB only phytosphingosine (C_{20:22}). In contrast, *T. cruzi* contains sphinganine (2,8) rather than phytosphingosine. In evolutionary terms *T. cruzi*, a mammalian parasite, represents a stage of further adaptation in which sphinganine is the final LCB product.

While lignoceric acid is the major fatty acid present in all phosphosphingolipids isolated from trypanosomatids, except that from *H. samuelpessoai*, other fatty acids are quantitatively important as 2-hydroxystearic acid in *C. luciliae* and an unusual pentacanoic acid in *H. samuelpessoai*.

The presence of glycerophospholipids in *Leishmania*

and *P. serpens* and of phosphosphingolipids in *T. cruzi*, *L. samueli*, *C. luciliae*, *H. samuelpessoai* and *E. schaudinii* could suggest that specific structures on the cell surface may be involved in specific host-parasite interaction. Such differences in structure may however, not be functionally significant, and may reflect an expansion of the enzymatic system for the synthesis of either ceramide-PI or glycerolipid-PI. In turn, the stepwise addition of carbohydrate units to the lipid moiety could use the same glycosyltransferases.

In yeast, a conversion from glycerophospholipid to ceramide has been suggested to occur (10) in GPI-anchored membrane proteins. Such remodeling would not occur in the GIPL molecules of trypanosomatids which seem to have specific lipid moieties. In *T. brucei* the remodeling was restricted to replacement of the fatty acid constituent (11).

Further studies to correlate GIPL lipid moiety structures in trypanosomatids aiming at a phylogenetic trait, must include a greater number of species and isolates. ■

References and notes

1. Mc Conville M 1991 Glycosylated-phosphatidylinositols as virulence factors in *Leishmania*. *Cell Biol Intern Rep* 15: 779-798
2. Previato JO, PAJ Gorin, M Mazurek, MT Xavier, B Fournet, JM Wieruszek, L Mendonça-Previato 1990 Primary structure of the oligosaccharide chain of lipopeptidophosphoglycan of epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem* 255: 2518-2526
3. Lederkremer RM, C Lima, MI Ramirez, MAJ Ferguson, SW Homans, J Thomas-Oates 1991 Complete structure of the glycan of lipopeptidophosphoglycan from *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *J Biol Chem* 266: 23670-23675
4. Previato JO, L Mendonça-Previato, C Jones, R Wait, B Fournet 1992 Structural characterization of a novel class of glycerophosphosphingolipids from the protozoan *Leptomonas samueli*. *J Biol Chem* 267: 24279-24286
5. Mendonça-Previato L, PAJ Gorin, JO Previato 1979 Investigation on polysaccharide components of cells of *Herpetomonas samuelpessoai* grown on various media. *Biochemistry* 18: 149-154
6. Ferguson MAJ, WJ Masterson, SW Homans, MJ Mc Conville 1991 Evolutionary aspects of GPI metabolism in kinetoplastid parasites. *Cell Biol Intern Rep* 15: 991-1005
7. Previato JO, L Mendonça-Previato, F Routier, C Jones, R Wait 1993 Glycosylinositolphospholipids from *Phytomonas serpens* - Manuscript in preparation
8. Odham G, E Stenhagen 1972 Fatty acids, p 211-228. In *Biochemical applications of mass spectrometry*. GR Walter ed., John Wiley & Sons, NY
9. Lederkremer RM, C Lima, MI Ramirez, OL Casal 1990 Structural features of the lipopeptidophosphoglycan from *Trypanosoma cruzi* common with the glyco-phosphatidylinositol anchors. *Eur J Biochem* 192: 337-345
10. Conzelmann A, A Puoti, RL Lester, C Desponds 1992 Two different types of lipid moieties are present in glycerophosphoinositol-anchored membrane proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* 11: 457-466
11. Masterson WJ, J Raper, TI Doering, GW Hart, PT Englund 1990 Fatty acid remodeling: A novel reaction sequence in the biosynthesis of trypanosome glycosyl phosphatidylinositol membrane anchors. *Cell* 62: 73-80
12. *Acknowledgments*. The authors are grateful to LR Travassos for continued advice.
13. This contribution is dedicated to the memory of Prof. João Batista Chaves Corrêa.

CONCLUSIONS

Six espèces appartenant à différents genres de la famille des Trypanosomatidae et représentant différents stades de l'évolution de cette famille ont été choisies. Des GIPL ont été isolés à partir de chacune de ces espèces suggérant que l'expression de ces molécules soit commune chez les parasites de la famille des Trypanosomatidae. La partie lipidique de ces glycoconjugués est très importante puisqu'elle permet l'insertion dans la membrane plasmique du parasite. Comme dans les GPI d'ancrage protéique, deux types de lipides peuvent être trouvés : les phosphosphingolipides et les glycérophospholipides.

Des glycérophosphosphingolipides ont été identifiés dans les parasites monoxènes *Crithidia luciliae*, *Herpetomonas samuelpessoai*, *Leptomonas samueli* et le parasite polyxène *Endotrypanum schaudinii*. La partie lipidique de ces molécules est formée par l'association de phytosphingosine ayant 20, 21 ou 22 atomes de carbone et de divers acides gras. Parmi les molécules de la famille des GPI déjà décrites, seuls les GPI d'ancrage protéique de levures (Conzelmann *et al.*, 1992; Fankhauser *et al.*, 1993), ou du champignon *Dictyostelium discoideum* (Haynes *et al.*, 1993) et le LPPG de *T. cruzi* possèdent une céramide. Cependant l'ancrage lipidique du LPPG de *T. cruzi* comporte une sphinganine (Previato *et al.*, 1990) et se différencie ainsi des autres céramides. La présence de phytosphingosine dans les GPI semble donc être une caractéristique des parasites les moins évolués.

Leishmania adleri et *Leishmania tarentolae* synthétisent des alkylacylglycérols identiques. Seules quelques variations dans l'abondance relative des acides gras et des alkylglycérols peuvent être notées. Par ailleurs, la partie lipidique des GIPL de ces deux leishmanies de lézards est similaire à celle des GIPL des leishmanies de mammifères (figures...). Ces résultats sont en accord avec l'hypothèse selon laquelle les leishmanies de mammifères ont évolué à partir des leishmanies de lézards (Wilson and Southgate, 1979). Cette homologie existant entre GIPL isolés de leishmanies de reptiles et de mammifères s'étend-elle à la partie glycannique de ces molécules?

Les glycérolipides ne sont cependant pas spécifiques aux GIPL des parasites du genre *Leishmania*. En effet, les GIPL extraits de *Phytomonas serpens* (parasite hétéroxène alternant entre un insecte et une plante) présentent également des alkylacylglycérols. Ces lipides sont formés par l'association d'hexadecylglycérol et d'acide palmitique ou d'acide stéarique. Ils diffèrent donc de ceux rencontrés chez les leishmanies où les chaînes alkylées sont plus longues. Ces résultats sont en accord avec ceux de Redman et Ferguson (communication personnelle) qui ont identifié ces mêmes alkylacylglycérols dans des glycolipides de *Phytomonas*.

Contrairement à ce qui est observé chez la plupart des trypanosomatides, les formes infectieuses des parasites du genre *Phytomonas* sont localisées dans les parties antérieures de l'intestin de l'insecte et sont transmises à la plante par piqûre. Ce cycle de transmission est identique à celui des parasites du genre *Leishmania*, dont *Phytomonas* peut-être rapproché. Cependant, il faut noter que *Endotrypanum schaudinii*, qui possède un cycle de transmission semblable, synthétise des glycoposphosphingolipides. D'autre part, *Phytomonas serpens* étant un pathogène de plante, son étude présente un intérêt économique et écologique.

**Chemical characterization of
glycosylinositolphospholipids of
*Herpetomonas samuelpessoai***

**Françoise H. Routier^a, E. Xavier da Silveira^b, Robin
Wait^c, Christopher Jones^d, José O. Previato^b,
L.Mendonça-Previato^{b*}**

***Soumis à publication dans
« Molecular and Biochemical Parasitology »***

Comme nous l'avons déjà souligné, c'est probablement parmi les trypanosomatides monoxènes qu'il faut rechercher l'origine des parasites pathogènes pour l'Homme (Wallace, 1979). Ainsi, la comparaison des trypanosomatides monoxènes et polyxènes peut permettre de distinguer les adaptations requises pour la survie dans l'insecte de celles développées pour la colonisation de l'hôte vertébré.

Les parasites montrent une grande spécificité pour leur hôte vecteur. Cette spécificité concerne l'espèce mais aussi la localisation à l'intérieur des intestins de l'insecte (Schlein *et al.*, 1990). Toutefois, les bases moléculaires de l'interaction permettant l'établissement du parasite dans l'insecte sont totalement inconnues. La possibilité d'une interaction lectinique mettant en jeu les GIPL, nous a conduit à étudier *Herpetomonas samuelpeessoai*, parasite monoxène colonisant le même insecte vecteur *Zelus leucogrammus* (famille des Reduviidae) que *Leptomonas samueli*, parasite dont les GIPL ont été récemment décrits (Previato *et al.*, 1992, 1994). Si tel est le cas, bien qu'étant de genres différents, ces deux parasites pourraient synthétiser des molécules ayant des structures apparentées.

D'autre part, l'immunisation de souris par le flagellé *Herpetomonas samuelpeessoai* apporte une protection partielle contre des inoculations létales de *Trypanosoma cruzi* (De Souza *et al.*, 1974). Ce fait suggère l'existence d'antigènes communs aux deux parasites. De plus, une étude réalisée à partir de 500 sérums humains révèle que *Herpetomonas muscarum muscarum* peut remplacer *Trypanosoma cruzi* dans le diagnostic par immunofluorescence indirecte de la maladie de Chagas (Lopes *et al.*, 1981). Toutefois la nature des antigènes communs à *Herpetomonas* et *T. cruzi* est inconnue.

Nous avons donc entrepris la caractérisation chimique des GIPL extraits des promastigotes de *Herpetomonas samuelpeessoai*, afin de comparer ces molécules à celles de *Leptomonas samueli* et *Trypanosoma cruzi*.

**Chemical characterization of
glycosylinositolphospholipids of *Herpetomonas
samuelpeSSOai***

**Françoise H. Routier^a, E. Xavier da Silveira^b, Robin Wait^c,
Christopher Jones^d, José O. Previato^b, L. Mendonça-
Previato^{b*}**

^a Laboratoire de Chimie Biologique, UMR-CNRS 111, 59655 Villeneuve D'Ascq, France; ^bInstituto de Microbiologia, Centro de Ciências da Saúde, Bloco I, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21994 970 - Cidade Universitária, Rio de Janeiro, Brasil; ^cCentre for Applied Microbiology & Research, Salisbury, Wiltshire SP40 JG, UK; ^dNIBSC, Potters Bar, Hertfordshire EN63QG, UK

Dedicated to the memory of Dr. Bernard Fournet, our friend and advisor.

* Corresponding author Tel: 021 5903093, Fax: 021 2708447

Abbreviations: AEP, aminoethylphosphonate; Arap, arabinopyranose; DQFCOSY, double-quantum-filtered correlation spectroscopy; FAB, fast-atom bombardment; Galf, galactofuranose; Galp, galactopyranose; GC, gas chromatography; GPI, glycosylphosphatidylinositol; GIPL, glycoinositolphospholipids; Glc, glucose; GlcA, glucuronic acid; GlcN, glucosamine; HPAE, high pH anion exchange; Ins, inositol; LPPG, lipopeptidophosphoglycan; LSIMS, liquid secondary ionization mass spectra; Man, mannose; MS, mass spectrometry; NMR, nuclear magnetic resonance; PI, phosphoinositol; Rha, rhamnose; ROESY, rotating frame nuclear Overhauser enhancement spectroscopy; TOCSY, total correlation spectroscopy; Xyl, xylose.

Abstract

The structure of two glycosylinositolphospholipids of the cell surface of the monoxenic protozoan *Herpetomonas samuelpeessoai* have been deduced by methylation analysis, fast-atom bombardment mass spectrometry and two dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy. These glycolipids have features in common with the glycoinositolphospholipids of both *Leishmania* and *T. cruzi*, resembling the former by the presence of the hybrid type core sequence Man α 1-3(Man α 1-6)Man α 1-4GlcNAc α 1-6 myo-inositol-1-PO₄-lipid, while the 2-aminoethylphosphonate substituent on O-6 of glucosamine and the presence of ceramide in place of glycerol lipids is more reminiscent of *T. cruzi*. Possible phylogenetic implications of these observations are discussed.

Key words glycoinositolphospholipids; *Herpetomonas samuelpeessoai*; trypanosomatids; NMR-Spectroscopy; FAB-Mass Spectrometry.

1. Introduction

Glycoinositolphospholipids (GIPLs) that are not linked to either protein or polysaccharide are major cell surface glycolipids in all trypanosomatids investigated to date. These glycolipids differ from those found in plants, yeasts and other fungi, in that their glycan moieties contain the highly conserved core motif $\text{Man}\alpha(1\rightarrow4)\text{GlcN}$, linked to either inositol phosphosphingolipids or to inositol phosphoglycerolipids. Ceramide linked GIPLs have been found in *Trypanosoma cruzi* [1] and members of *Crithidia*, *Herpetomonas*, *Leptomonas* and *Endotrypanum* [2], whereas glycerol linked GIPLs appear to be more characteristic of *Leishmania* [3] (including the reptilian parasites *L. tarentolae* and *L. adleri*) and *Phytomonas* [2]. In *Leishmania* species pathogenic to humans the conserved glycan core structure is further modified by the addition of mannose or mannose and galactose residues, to form three distinct lineages of GIPLs, designated type 1, type 2 and hybrid, which are expressed to varying extents in different species and developmental stages [4]. In type 1 GIPLs the mannose of the conserved core is substituted by a (1→6) linked mannose, whereas in type 2 it is substituted by (1→3) linked mannose. The hybrid type is a branched structure in which 2 mannose substituents are present, linked (1→3) and (1→6). In *L. major*, and to some extent in *L. mexicana*, though not in *L. donovani*, the cores of type 2 GIPLs contain a galactofuranosyl residue, and are capped by varying numbers of α and β galactopyranosyl units. The glycan portions of type 1 and type 2 GIPLs are homologous to the GPI protein anchors and the lipophosphoglycan anchor respectively [5]. It seems likely that this classification of GIPLs is not restricted to *Leishmania*, since glycoconjugates from several other parasites appear to conform to the same architecture.

In *Trypanosoma cruzi* (the causative agent of Chagas' disease in humans), the major cell-surface glycoconjugate of epimastigote forms is a glycolipid, the so called lipopeptidophosphoglycan (LPPG), the glycan core of

which is similar to type 1 GIPLs of *Leishmania* [6]. The main chain of this glycan contains a tetramannose structure in which the mannosyl units are linked in a sequence similar to the protein linked anchors of *T. cruzi* [7]. The glycan core of LPPG is further substituted by two nonreducing galactofuranosyl end units and 2-aminoethylphosphonate (AEP) at O-6 of glucosamine, and is linked to a ceramide rather than to an alkylacyl glycerol lipid moiety.

We have recently characterized a novel family of GIPLs in the monoxenous trypanosomatid *Leptomonas samueli* [8]. The glycan portions of these compounds are related to type 2 GIPLs of *Leishmania*, but their lipid moieties have a closer affinity to those found in *T. cruzi*. Surprisingly, apart from the presence of two AEP substituents, the oligosaccharide chains of *L. samueli* glycolipids A and B were identical to type two GIPLs of *Leishmania* designated iM2 and GIPL-1 respectively [8]. Although (as in *Leishmania major*) the type 2 core of *L. samueli* oligosaccharide B was capped with a Galf residue, oligosaccharides containing additional galactose residues were not detected. A more complex family of *L. samueli* glycolipids was subsequently characterized, which did not contain galactofuranose, but had a monorhamnosyl sidechain 3-O linked to the fourth mannose distal to inositol, and showed also further substitutions by xylose, glucose and glucuronic acid-containing saccharide chains [9].

The biological significance of the structural diversity of glycoinositolphospholipids that share the same core structure is unknown. It is possible that these glycolipids enable the parasite to colonize the insect gut, presumably by mediating attachment to the gut epithelium. Some of the structural variation in the glycolipids of these parasites may be specific adaptations required for survival in the harsh environment of the insect digestive tract, the nature of which will be host dependent and will vary from species to species. This possibility prompted us to investigate the glycoinositolphospholipids of *Herpetomonas samuelpessoai*, a monoxenous trypanosomatid that parasitizes the same insect (*Zelus leucogrammus*) as does *Leptomonas samueli* [10]. According to our hypothesis we would predict

that similar selective pressures in the host habitat would lead to the development of structurally and functionally related GIPLs in both organisms.

2. Materials and methods

Isolation of glycoinositolphospholipids (GIPLs). *Herpetomonas samuelpeessoai* promastigotes were cultured as described by Palatnik *et al.* [11], and harvested cells (2×10^{11}) were extracted with 45% aqueous phenol at 80 °C. After dialysis and lyophilization, the aqueous phase was redissolved in distilled water and applied to a column of Bio-Gel P-100, and the excluded fraction collected and freeze dried. GIPLs were recovered by extraction with chloroform/methanol/water (10:10:3), as previously described [8].

Isolation of phosphoinositol oligosaccharides (PI-oligosaccharides). PI-oligosaccharides were isolated from the intact GIPLs by hydrolysis with 1M KOH (72 h at 37 °C) [12]. After neutralization with acetic acid, non-polar material was removed by chloroform extraction and the aqueous layer was treated with Dowex 50W-X8 (H^+) resin, and the PI-oligosaccharides were eluted from the resin with water, desalted on a column of TSK HW 40, using as eluent 0.5% acetic acid at a flow rate of 1 ml min^{-1} . The material eluting in the void volume was concentrated, passed through a C_{18} Sep-Pak cartridge (Millipore), and recovered by lyophilization.

High pH anion exchange chromatography. The PI-oligosaccharides were fractionated by HPAE chromatography on a Dionex model BioLC carbohydrate analyser equipped with a pulsed amperometric detector (pulse potential $E_1 = 0.05 \text{ V}$) using a CarboPac PA-1 column ($0.9 \times 250 \text{ cm}$; Dionex, Sunnyville, CA). The flow rate was 4 ml min^{-1} , and the initial solvent comprised 87% 100 mM NaOH (Solvent A) and 13% 1M sodium acetate in 100 mM NaOH (solvent B), maintained isocratically for 30 min.

The proportion of solvent B was then increased to 21% over a 10 min

period, maintained at that proportion for a further 20 min, before being increased to 50% by means of a 10 min linear gradient. Fractions were collected, immediately neutralized with acetic acid, concentrated and desalted by passage through a column of Sephadex G-10 (Pharmacia).

Analytical procedures. Neutral and acidic sugars were determined after methanolysis (0.5M methanolic HCl, 24 h at 80 °C) by gas chromatography (GC) of their trimethylsilyl ethers as previously described [8]. The absolute configurations of the neutral monosaccharides were determined by GC of their trimethylsilylated 2-butyl glycosides [13]. Inositol and glucosamine were quantitated by GC after methanolysis (3M methanolic HCl, 18 h at 80°C), borohydride reduction and acetylation. Fatty acids and long chain bases were identified by GC and GC-MS after methanolysis as described by Gaver and Sweeley [14]. Total neutral sugars were quantitated by the phenol/sulfuric acid procedure [15]. Total and acid hydrolysable phosphorus was determined by the methods of Ames [16] and Bartlett [17] respectively. Long chain bases in the methanolysates of GIPLs were quantitated by the procedure of Lauter and Trams [18] using C₁₈ phytosphingosine as standard.

Methylation analysis. Prior to methylation, the PI-oligosaccharides were converted to their triethylamine salts by passage through a column of Dowex 50W-X2 resin in the triethylamine form, so as to increase their solubility in dimethylsulfoxide. After freeze drying the PI-oligosaccharides were methylated with lithium methylsulfinylmethanide anion according to the procedure of Parente *et al.* [19]. The methylated oligosaccharides were hydrolysed with 4M trifluoroacetic acid (4 h, 100 °C), reduced, acetylated and the partially methylated alditol acetates were analysed by GC-MS as previously described [20]. *O*-methylated, *O*-acetylated methylglycosides were prepared by methanolysis of the permethylated oligosaccharides (0.5 M HCl, 24 h, 80 °C), then acetylated, and characterized by GC-MS [21].

Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. Proton NMR spectra were obtained as previously described [9] at 500 MHz using a Varian Unity 500 spectrometer. Proton spectra were referenced to internal acetate anion at

1.908 ppm. The TOCSY and ROESY spectra were obtained with mixing times of 80 ms and 150 ms respectively. The one-dimensional ^{31}P NMR spectrum was obtained at 202 MHz on the same spectrometer using a 5 mm broadband probe with broadband proton decoupling.

Fast atom bombardment mass spectrometry. Liquid secondary ionization mass spectra (LSIMS) were obtained on a Kratos concept II HH spectrometer (Kratos Analytical, Manchester, UK) equipped with a Kratos LSIMS source and a caesium ion gun operated at 13.5 kV bombarding energy. Thioglycerol or glycerol were used as liquid matrices, and the instrument was operated at 8 kV accelerating voltage at low (1000) resolution. Native materials were analysed in the negative ion mode and permethylated samples in the positive. The magnet was scanned at 30 s per decade of mass and several scans were accumulated and averaged using the DS90 data system. The positive ion collision-induced dissociation spectrum of permethylated PI-oligosaccharide A was obtained on a Finnigan TSQ 70 triple stage quadrupole instrument. Protonated molecules generated by fast atom bombardment ionization underwent low energy collisions with the helium target gas in the second (radiofrequency only) quadrupole, and the daughter ions were analysed by scanning the third quadrupole.

3. Results

Chemical composition of GIPLs from Herpetomonas samuelpeessoai cells. Sugar analysis of the GIPLs obtained from of *H. samuelpeessoai* promastigotes revealed the presence of rhamnose (Rha), xylose (Xyl), mannose (Man), glucose (Glc), glucosamine (GlcN), glucuronic acid (GlcA) and inositol (Ins) in the molar ratio 1.0:1.6:3.7:0.6:0.9:0.2:1.0. Mild alkaline hydrolysis resulted in a mixture of PI-oligosaccharides and a chloroform-soluble lipid moiety. The sugar composition of the water soluble PI-oligosaccharides was similar to that of the intact GIPL.

Characterization of the lipid moiety. Methanolysis of the chloroform-soluble material produced a mixture of fatty acid methyl esters and long chain bases, which were characterized by GC and GC-MS as summarized in Table

1. The major fatty acid was eicosapentanoic acid ($\approx 42\%$). Other quantitatively significant components were 2-hydroxyoctadecanoic acid ($\approx 19\%$) and a branched eicosahexadecanoic acid ($\approx 16\%$). The remaining components were saturated fatty acids of 18 to 27 carbon atoms. The long-chain bases were identified by electron ionization and chemical ionization mass spectrometry, and comprised a C_{22} phytosphingosine, and two isomeric C_{21} phytosphingosines. The C_{21} phytosphingosines have been identified in several other lower trypanosomatids, including *Crithidia luciliae*, *Leptomonas samueli* and *Endotrypanum schaudinni* [2], but in lower concentrations. No alkylglycerols were detected.

HPLC chromatography of the liberated PI-oligosaccharides. Separation by HPLC chromatography resulted in four main carbohydrate fractions which were designated A, B, C and D which represented respectively 63%, 20%, 12% and 5% of the total. Fraction B was a mixture of at least three components. Fractions A, C and D by contrast appeared to represent relatively homogenous PI-oligosaccharides as judged by FAB MS and NMR data. The monosaccharide compositions of the Dionex fractions determined by sugar analysis are summarized in Table 2. In this paper we report the structure determination of the PI-oligosaccharides A and C.

Characterization of PI-oligosaccharide A. On negative ion FAB MS of the native PI-oligosaccharide A a deprotonated molecule ($[M-H]^-$) was observed at m/z 1615 (nominal), consistent with a composition of five residues of hexose, one each of pentose, deoxyhexose, non-acetylated glucosamine and inositol phosphate together with a single aminoethylphosphonate (AEP) substituent (calculated $[M-H]^- = 1615.4685$ (mono-isotopic)). Abundant fragment ions at m/z 527 and 555 ($^{1,5} X_2$ and Y_2 in the Domon and Costello system of nomenclature) [22], suggested a terminal glucosamine-inositol phosphate structure with an AEP substituent located on the glucosamine residue [6, 8, 9]. Other signals were too similar in intensity to the matrix derived chemical background to be confidently assigned as fragment ions. On permethylation, a protonated molecule was observed in the positive ion

FAB spectrum at m/z 1931. The expected molecular mass of the protonated permethylated PI-oligosaccharide is 2094, which suggests that the AEP substituent is lost under the conditions of the methylation. This was confirmed by a second experiment, in which the PI-oligosaccharide was *N*-acetylated prior to methylation, which resulted in an intense protonated molecule at the expected m/z of 2094. Facile cleavage was observed distal to the glucosamine, which produced the fragments m/z 562 and 590 (Y_2 and Z_2); other fragments were difficult to assign unambiguously because of the high background produced by the ionization of the liquid matrix. Collisional activation of the protonated molecule at m/z 1931 using a triple quadrupole instrument provided some evidence of the sequence of residues. Four major reducing terminal-containing fragments were observed in the daughter ion spectrum (for clarity the measured values have been rounded to monoisotopic nominal values) (Fig. 1); the ion at m/z 1378 was consistent with the loss of the combined residue masses of hexose, pentose and deoxyhexose by a Y type process (ion $Y_{4\alpha}$), which together with m/z 1742 (loss of a terminal deoxyhexose by a Y type mechanism, $Y_{5\alpha}$), suggested the presence of a hexose substituted with both deoxyhexose and pentose at the reducing terminal. A further cleavage producing m/z 1174 ($Y_{3\alpha}$) shows that this structure is attached to another hexose residue. The mass increment between m/z 562 (already assigned as the Y_2 cleavage at hexosamine) and m/z 1174 provides tentative evidence of a dihexosyl branch on the remaining hexose. Because this experiment was performed at low collision energy, it is unsurprising that ring cleavage fragments were not observed.

A portion of the permethylated PI-oligosaccharide A was hydrolysed, reduced and acetylated and the partially methylated alditol acetates were characterized by GC-MS. This data is summarized in Table 3. Three terminal residues were identified: rhamnose, xylose and glucose. The proportion of 3,4,6-tri-*O*-methyl-1,2,5-tri-*O*-acetyl mannitol suggested that two internal mannose residues were present, both monosubstituted in position *O*-2. Two further mannose derivatives were detected, disubstituted

respectively in positions 3, 4 and 3, 6. The methylation analysis is thus consistent with the pattern of branching deduced from the FAB MS data.

NMR Spectroscopy of PI-oligosaccharide A. Two signals were observed in the one-dimensional 202 MHz ^{31}P spectrum of PI-oligosaccharide A, one at highfield assigned as a phosphomonoester and one at lowfield attributed to the single AEP residue. The one dimensional proton NMR spectrum of this PI-oligosaccharide confirmed the presence of an AEP residue (N-CH₂ at δ 3.23; $^3\text{J}_{\text{PCCH}} = 13$ Hz and P-CH₂ at δ 2.03; $^2\text{J}_{\text{PCH}} = 22$ Hz), and also contained a resonance characteristic of the methyl group of a 6-deoxyhexose (δ 1.266). In the anomeric region, resonances were observed for a glucosamine (at lowfield), five manno residues, one residue with α -glucopyranose or galactopyranose configuration and one residue with β -glucopyranose or galactopyranose configuration. Assignments were obtained by the application of DQFCOSY [23, 24] and TOCSY methods [25], and are summarised in Table 4. The β -glucopyranose residue was shown to be xylopyranose by the observation of a lowfield H-5e and the α -glucopyranose residue to be glucopyranose. The configuration of the sugars were established from the patterns of inter-proton coupling constants. The chemical shifts of the β -xylopyranose, α -rhamnopyranose and α -glucopyranose are very similar to those of the xylose and rhamnose found in the PI-oligosaccharide A of *Leptomonas samueli* [9] and with those of methyl glycoside model systems [26, 27, 28], indicating nonreducing terminal locations, in agreement with the methylation analysis results (Table 3).

The sequence and linkages of the sugar residues were established from a ROESY experiment [25] obtained at 500 MHz and with a spinlocked mixing time of 150 msec. These data are summarised in Table 5. The Rha H-1 showed inter-residue n.O.e.s to Man(4) H-2 and H-3 and although the inter-residue n.O.e.s from the β -Xyl H-1 could not be unambiguously assigned because of spectral crowding, the data are consistent with the presence of a nonreducing trisaccharide branch Rha(α 1 \rightarrow 3)[Xyl(β 1 \rightarrow 4)]Man(4) similar to that found in *Leptomonas samueli* PI-oligosaccharide [9]. An n.O.e was observed between Man(4) H-1 and Man(3) H-2, consistent

with the presence of a Man(4)(α 1 \rightarrow 2)Man(3) linkage. Inter-residue n.O.e.s. from the α -Man(3) H-1 could not be assigned and this linkage is discussed further below. An inter-residue n.O.e. was observed between the α -Glc H-1 and Man(1) H-1 and H-2, consistent with the presence of a nonreducing terminal Glc(α 1-2)Man(1) disaccharide, and established, in conjunction with the methylation analysis, α -Man(2) as the -3,6)-Man branchpoint. Man(1) shows a weak crosspeak both the Man(2) H-2 and to the expected Man(1) H-1/Man(2) H-3 crosspeak, indicating that the Glc(α 1-2)-Man(1) disaccharide is attached to the Man(2) O-3 and implying that the Xyl/Rha terminated branch is attached through the Man(2) O-6, although the n.O.e.s. from the Man(3) H-1 were not assigned. Man(2) H-1 shows an n.O.e. to a 10Hz triplet assigned as GlcN H-4 and GlcN H-1 shows an inter-residue n.O.e. to Ins H-6, thus completing the structure. The lowfield position of the GlcN H-5 (4.254) resonance is consistent with the presence of an AEP substituent on GlcN O-6 as deduced from the FAB MS data.

Characterization of PI-oligosaccharide C. Negative ion FAB MS of PI-oligosaccharide C showed a deprotonated molecule at m/z 1629, suggesting a similar composition to PI-oligosaccharide A, except that the mass difference of 14 between the two implies the replacement of either a hexose by a hexuronic acid or the pentose by a second deoxyhexose residue. The prominent Y₂ fragment at m/z 527 was again observed, indicating the presence of the AEP-glucosamine-inositol phosphate sequence. FAB MS of the permethylated oligosaccharide yielded a protonated molecule at m/z 1945, (average value: calculated monoisotopic value = 1944.919) in agreement with the data on the native sample, assuming loss of the AEP substituent during methylation. Most of the fragment ions observed in this spectrum were assignable to the X and Y series. Ions at m/z 1798 and 1770 were attributed to the loss of a pentose residue from the nonreducing terminal by X and Y cleavages, which therefore suggested that the m/z difference of 14 from PI-oligosaccharide A is attributable to the presence of a hexuronic acid residue. This is confirmed by signals at m/z 1712 and 1740, (^{1,5}X_{4 β} and Y_{4 β}) corresponding to the loss of a non reducing hexuronic acid

residue. The remaining fragments in the spectrum show that the structure is similar to that of PI-oligosaccharide A, except that the dihexosyl branch on the hexose distal to the glucosamine is replaced by a hexuronosylhexosyl unit. This fragmentation data is summarized in Fig 2.

The presence of the uronic acid residue is consistent with the increased retention of this PI-oligosaccharide on Dionex chromatography, compared to PI-oligosaccharide A.

The data from methylation analysis are qualitatively similar to that obtained from PI-oligosaccharide A, (Table 3) apart from the absence of the derivative corresponding to the terminal glucose. However the yields from the terminal xylose and rhamnose residues were poor as were those from the 3,6 disubstituted mannose residue. The poor yield of the 3,6-linked mannose could be taken as evidence that the uronic acid is attached to this residue; however this is difficult to reconcile with the LSIMS and NMR data, which suggest a terminal location.

NMR Spectroscopy of PI oligosaccharide C: The proton NMR spectrum (Table 6) of the PI-oligosaccharide C was closely similar to that of PI-oligosaccharide A, except that the two-dimensional spectra indicated an α -GlcA in place of the α -Glc, consistent with the late elution of this fraction from the anion exchange column and the FAB MS data. The proton chemical shifts of the α -GlcA residue were similar to those of a monosaccharide model system [29], indicating a terminal location. The linkages and sequence were deduced by analogy with PI-oligosaccharide A, because of the extreme similarity of their NMR spectra and from the FAB MS and methylation data.

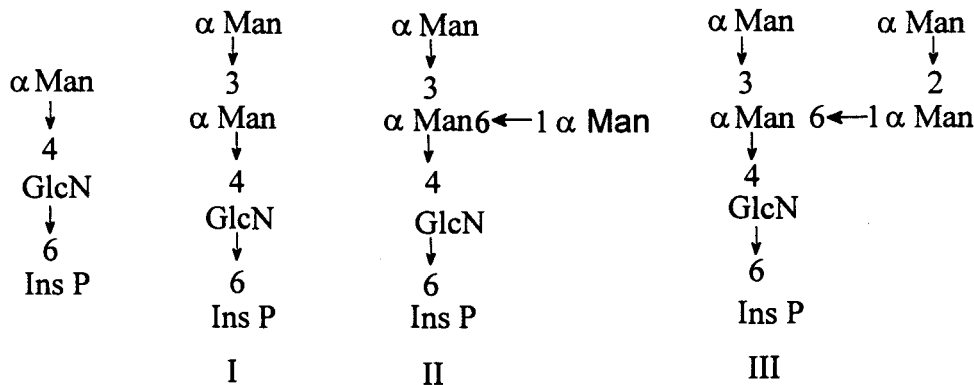
Discussion

Cloning of *Herpetomonas samuelpeessoai*, a trypanosomatid isolated from the predatory hemipteran *Zelus leucogrammus* resulted in cultures consisting primarily of promastigotes and opisthomastigotes, forms which are characteristic of the genus *Herpetomonas* [30]. The surface proteins and enzyme activities expressed by *H. samuelpeessoai* are similar to those of *Herpetomonas* species isolated from other hosts [31]. Mice immunized with live cultures of *H. samuelpeessoai* are protected against challenge with infective forms of *T. cruzi* [32], which suggests that the two organisms share common antigens. This immunological relationship to *T. cruzi* extends to other *Herpetomonas* species as demonstrated by the observation of a high proportion of positive results (98.7%) when *H. muscarum muscarum* replaces *T. cruzi* as the whole cell antigen in immunofluorescence tests [33]. The nature of these common epitopes is however unknown.

In the present study, two PI-oligosaccharides isolated from the glycoposphosphingolipids of *H. samuelpeessoai* were characterized. Their structures are depicted in table 7. They can be regarded as being formally related to the iM4 hybrid type of GIPL, found in *Leishmania* [4], differing by the addition of either an α -D-Glc (in PI-oligosaccharide A) or an α -D-GlcA (in PI-Oligosaccharide C), to the $\alpha(1\rightarrow3)$ -mannosyl branch. In both PI-oligosaccharides the terminal $\alpha(1\rightarrow2)$ linked mannopyranose of the $\alpha(1\rightarrow6)$ -mannose branch is doubly substituted by α -L-rhamnose and β -D-xylose.

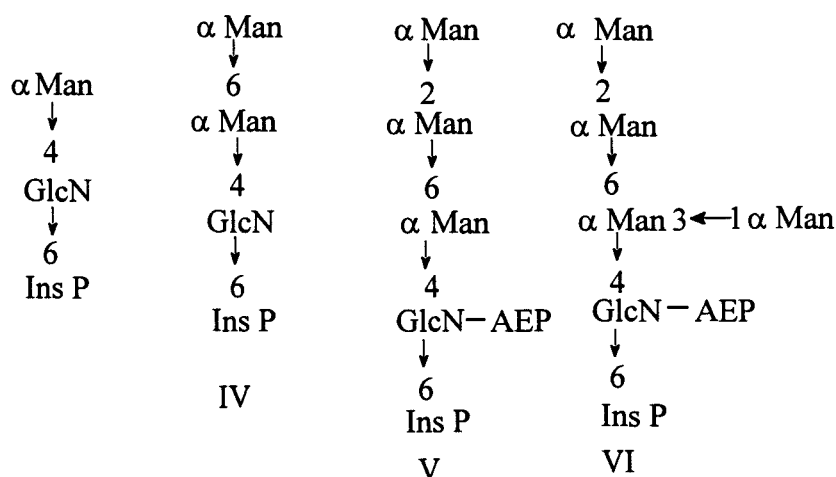
This is the first description of the occurrence of hybrid type oligosaccharides in a monoxenous trypanosomatid; previous reports having been in the dixenous species *Leishmania mexicana*, *L. donovani* [4] and *L. adleri* [34]. There are however many differences between *H. samuelpeessoai* and *Leishmania* species. The insect host of *Herpetomonas* is a hemipteran [10], whereas the vectors of *Leishmania* are sandflies. The lipid moiety of the *Herpetomonas* GIPLs is a ceramide while those of *Leishmania* are alkylglycerols [3]; finally *Herpetomonas* GIPLs are substituted by AEP, which is absent from *Leishmania* species. These features, which differentiate *Herpetomonas* from *Leishmania* are simultaneously suggestive

of a relationship to *Trypanosoma cruzi*, an organism also containing glycoposphosphingolipid and AEP, transmitted by hemiptera, and, as indicated above, having considerable immunological relationship to *Herpetomonas*. How is the apparently contradictory presence of hybrid type GIPLs to be explained in the face of these phenotypic similarities? We propose that the core structure $\text{Man}\alpha(1\rightarrow4)\text{GlcN}(1\rightarrow6)\text{Ins-P}$ was present in the common ancestors of modern trypanosomatids, and early in evolution became substituted by $\alpha\text{-Man}_p$ linked either (1 \rightarrow 3) or (1 \rightarrow 6), giving rise to two divergent families of structures, from which were derived the GIPLs of *Leishmania* species and *Endotrypanum* [35] on the one hand, and those of *T. cruzi* and *H. samuelpeessoai* on the other. Structures I, II and III depict a possible series of glycosylations which could have resulted in the characteristic core structures of *Leishmania*.



Structure I is found in the promastigotes of *L. major*, *L. mexicana*, and *Endotrypanum* and may be further substituted by units of $\beta\text{-Gal}_f$, $\alpha\text{-Gal}_p$, $\beta\text{-Gal}_p$ and $\beta\text{-Arap}$ [4, 35]. Structure II occurs in *L. donovani* and *L. mexicana*, with and without substitution of glucosamine by ethanolamine phosphate [4]. Structure III occurs in *L. mexicana*, *L. donovani* and *L. adleri*, sometimes with an ethanolamine phosphate substituent [4, 34].

In the *T. cruzi* / *H. samuelpeessoai* structural family glycosylations of the common precursor could result in the core structures IV, V and VI.



Core structure IV, in which the common precursor is substituted by an $\alpha(1\rightarrow6)$ linked Man_p unit is the probable intermediate for the synthesis of structure V, which in *T. cruzi* is substituted at glucosamine by AEP [6]. Further substitutions of V by Gal_f (1 \rightarrow 3) and Man_p(1 \rightarrow 2) give rise to oligosaccharides present in *T. cruzi* LPPG. Additional $\alpha(1\rightarrow3)$ mannosylation of V results in structure VI, which is the core sequence of *H. samuelpeessoai* GIPLs. Further substitution by α -Rha, β -Xyl and α -GlcA or α -Glc units results in the PI-oligosaccharides A and C described in this paper.

Leptomonas samueli (a trypanosomatid species that parasitizes the same insect as *H. samuelpeessoai*) is intermediate between *Leishmania* and *T. cruzi* / *Herpetomonas* with respect to these structural and phylogenetic relationships. The GIPLs of *Leptomonas* [8, 9] have the *Leishmania* type core structure I. However, further substitutions of this core involves the addition of complex chains of $\alpha(1\rightarrow3)$ linked Man, $\beta(1\rightarrow4)$ linked Xyl and terminal units of Rha, Glc and GlcA. The presence of Xyl, GlcA and Rha units in both *Herpetomonas* and *Leptomonas* (even though linked to different core structures) may represent a convergent adaptive response to the similar selective pressures experienced by two species of different phylogeny sharing the same insect host. Although the core structure of the *Leptomonas samueli* glycolipids are of the type found in *Leishmania*, the organism is clearly related to the *T. cruzi* / *Herpetomonas* group because its GIPLs are AEP-containing and ceramide-linked.

Although glycosylphosphatidylinositol lipid structures constitute a small proportion of the vast array of phenotypic traits which vary between trypanosomatid species and genera, their cell surface location and high levels of expression is suggestive of a possible involvement in the interaction of host and parasite. In consequence we would predict that the structures of these molecules would be peculiarly sensitive to the effects of the varying internal environments encountered in hosts of different species. Comparative investigation of these molecules in a range of monoxenous and dixenous trypanosomatids of varying host specificities is thus likely to afford considerable insight into the structural evolution of these molecules, and their role in mediating the adaptation of parasites to their hosts.

Acknowledgements

This investigation was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PADCT and RHAE); Financiadora de Estudos e Projetos; and Conselho de Ensino de Pós-Graduação-UFRJ. We are indebted to Orlando Augusto Agrellos Filho and Lucy Jacinto do Nascimento for excellent technical assistance. We thank Jean Michel Wieruszski for running a number of the n.m.r. spectra and Guy Ricart for MS analysis (Université des Sciences et Techniques de Lille, France). We are grateful to Prof. L. R. Travassos for continued advice.

References

- [1] Lederkremer, R. M., Tanaka, C. T., Alves, M. J. M. and Colli, W. (1977) Lipopeptidophosphoglycan from *Trypanosoma cruzi*. Eur. J. Biochem. 74, 263 - 261.

- [2] Routier, F., Previato, J. O., Jones, C., Wait, R. and Mendonça-Previato, L. (1993) Glycosylinositolphospholipids from members of the Trypanosomatidae family : Investigation on the lipid moiety. Ci. Cult. J. Braz. Assoc. Adv. Sci. 45, 66 - 68.

- [3] McConville, M. J. (1991) Glycosylated-Phosphatidylinositols as virulence factors in *Leishmania*. Cell. Biol. Intern. Rep. 15, 779 - 798.

- [4] McConville, M. J. and Ferguson, M. A. J. (1993) The structure, biosynthesis and function of glycosylated phosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher eukaryotes. Biochem. J. 294, 305 - 324.

- [5] Turco, S. J. and Descoteaux, R. (1992) The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. Annu. Rev. Microbiol. 46, 65 - 94.

- [6] Previato, J. O., Gorin, P. A. J., Mazurek, M., Xavier, M. T., Fournet, B., Wieruszkeski, J. M. and Mendonça-Previato, L. (1990) Primary structure of the oligosaccharide chain of lipopeptidophosphoglycan of epimastigotes forms of *Trypanosoma cruzi*. J. Biol. Chem. 265, 2518 - 2526.

- [7] Güther, M. L. S., Cardoso de Almeida, M. L., Yoshida, H. and Ferguson, M. A. J. (1992) Structural studies on the glycosylphosphatidylinositol membrane anchor of *Trypanosoma cruzi* 1G7-antigen. J. Biol. Chem. 267, 6820 - 6828.

-
- [8] Previato, J. O., Mendonça-Previato, L., Jones, C., Wait, R. and Fournet, B. (1992) Structural characterization of a novel class of glycophosphosphingolipids from the protozoan *Leptomonas samueli*. J. Biol. Chem. 267, 24279 - 24286.
- [9] Previato, J. O., Wait, R., Jones, C. and Mendonça-Previato, L. (1994) Structural analysis of a novel rhamnose-branched oligosaccharides from the glycophosphosphingolipids of *Leptomonas samueli*. Glycoconj. J. 11, 23 - 33.
- [10] Galvão, A. B., Oliveira, R. L., Carvalho, A. L. M. and Veiga, G. P. (1970) *Leptomonas pessoai* sp. n. (Trypanosomatidae, Kinetoplastida, Protozoa). Rev. Goiana Med. 16, 229 - 236.
- [11] Palatnik, C. B., Previato, J. O., Gorin, P. A. J. and Mendonça-Previato, L. (1987) *Leptomonas samueli* glycoconjugates. Comparison with *Herpetomonas samuelpessoai*. Comp. Biochem. Physiol. 86 B, 593 - 599.
- [12] Smith, S. W. and Lester, R. L. (1974) Inositol phosphorylceramide, a novel substance and the chief member of a major group of yeast sphingolipids containing a single inositol phosphate. J. Biol. Chem. 249, 3395 - 3405.
- [13] Gerwig, G. J., Kamerling, J. P. and Vliegthart, J. F. G. (1978) Determination of the D and L configuration of neutral monosaccharides by high-resolution capillary G.L.C. Carbohydr. Res. 62, 349 - 357
- [14] Gaver, R. C. and Sweeley, C. C. (1966) Chemistry and metabolism of sphingolipids. 3-oxo derivatives of N-acetylsphingosine and N-acetyldihydrosphingosine. J. Am. Chem. Soc. 88, 3643 - 3647.

-
- [15] Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analyt. Chem.* 28, 350 - 356.
- [16] Ames, B. N. (1966) Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases. *Methods Enzymol.* 8, 115 - 118.
- [17] Bartlett, G. R. (1959) Phosphorus assay in column chromatography. *J. Biol. Chem.* 234, 466 - 468
- [18] Lauter, C. J. and Trams, E. G. (1962) A spectrophotometric determination of sphingosine. *J. Lipid Res.* 3, 136 - 138.
- [19] Parente, J. P., Cardon, P., Leroy, Y., Montreuil, J. and Fournet, B. (1985) A convenient method for methylation of glycoprotein glycans in small amounts by using lithium methyl-sulfinyl carbanion. *Carbohydr. Res.* 141, 41 - 47.
- [20] Bjordal, H., Lindberg, B. and Svensson, S. (1967) Mass spectrometry of partially methylated alditol acetates. *Carbohydr. Res.* 5, 433 - 440.
- [21] Fournet, B., Dhalluin, J. M., Strecker, G. and Montreuil, J. (1980) Gas-liquid chromatography and mass spectrometry of oligosaccharides obtained by partial acetolysis of glycans and glycoproteins. *Anal. Biochem.* 108, 35 - 56.
- [22] Domon, B. and Costello, C. E. (1988) A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FABMS/MS of glycoconjugates. *Glycoconj. J.* 5, 397 - 409.

- [23] Piantini, U., Sørensen, O. W. and Ernst, R. R. (1982) Multiple quantum filters for elucidating NMR coupling networks. *J. Am. Chem. Soc.* 104, 6800 - 6801.
- [24] Rance, M., Sørensen, O. W., Bodenhausen, G., Wagner, G., Ernst, R. R. and Wiithrick, K. (1983) Improved spectral resolution in COSY ^1H NMR spectra of proteins via double quantum filtering. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 117, 479 - 485.
- [25] Kessler, H., Griesinger, C., Kerssebaum, R., Wagner, K. and Ernst, R. R. (1987). Separation of cross-relaxation and J-cross-peaks in 2D rotating frame NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* 109, 607 - 609.
- [26] Hoffman, R. A., Leeftang, B. R., de Barse, M. M. J., Kamerling, J. P. and Vliegthart, J. F. G. (1991) Characterization by H^1 -n.m.r. spectroscopy of oligosaccharides, derived from arabinoxylans of white endosperm of wheat, that contain the elements $\rightarrow 4)[\alpha\text{-L-Araf-(1}\rightarrow 3)]\text{-}\beta\text{-D-Xylp-(1}\rightarrow \text{ or } \rightarrow 4)[\alpha\text{-L-Araf-(1}\rightarrow 2)][\alpha\text{-L-Araf-(1}\rightarrow 3)]\text{-}\beta\text{-D-Xylp-(1}\rightarrow$. *Carbohydr. Res.* 221, 63 - 81.
- [27] Laffite, C., Nguyen Phuoc Du, A-M., Winternitz, F., Wylde, R. and Patviel - Sosa, F. (1978) Synthèse et étude R.M.N. de disaccharides et trisaccharides dans la série du L-rhamnose. *Carbohydr. Res.* 67, 91 - 103
- [28] Perkins, S. J., Johnson, L. N., Phillips, D. C. and Dwek, R. A. (1977) High-resolution ^1H and ^{13}C -N.M.R. spectra of D-glucopyranose, 2-acetamido - 2-deoxy-D-glucopyranose, and related compounds in aqueous media. *Carbohydr. Res.* 59, 19 - 34.



- [29] Jansson, P. E., Kenne, L., Widmalm, G. (1989) Computer-assisted analysis of polysaccharides with an extended version of CASPER using ^1H and ^{13}C -NMR data. *Carbohydr. Res.* 188, 169 - 192.
- [30] Roitman, I., Brener, Z., Roitman, C. and Kitajima, E. W. (1976) Demonstration that *Leptomonas pessoai* Galvão, Oliveira, Carvalho & Veiga, 1970, is a *Herpetomonas*. *J. Protozool.* 23, 291 - 293.
- [31] Camargo, E. P., Mattei, D. M., Barbieri, C. L. and Morel, C. M. (1982) Electrophoretic analysis of endonuclease-generated fragments of K-DNA, of esterase isoenzymes, and of surface proteins as aids for species identification of insect trypanosomatids. *J. Protozool.* 29, 251 - 258.
- [32] Souza, M. C., Reis, A. P., Silva, W. D. and Brener, Z. (1974) Mechanism of acquired immunity induced by *Leptomonas pessoai* against *Trypanosoma cruzi* in mice. *J. Protozool.* 21, 579 - 584
- [33] Lopes, J. D., Caulada, Z., Barbieri, C. L. And Camargo, E. P. (1981) Cross-reactivity between *Trypanosoma cruzi* and insect trypanosomatids as a basis for the diagnosis of Chagas disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 30, 1183 - 1188.
- [34] Routier, F., Mendonça-Previato, L., Previato, J. O., Jones, C. and Wait, R. (1994) Structures of four oligosaccharides derived from the glycoinositol-phospholipid of *Leishmania adleri*. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 27, 211 - 217.
- [35] Previato, J. O., Mendonça-Previato, L., Jones, C. and Wait, R. (1993) Structure of the carbohydrate moiety of the glycoposphingolipid of *Endotrypanum schaudinni*. *Glycoconj. J.* 10, 340.

Table 1

Long chain base and fatty acid compositions of the GIPLs from *H. samuelpeessoai*

	%
Long chain base	
C ₂₁ -phytosphingosine	55.2
C ₂₁ -phytosphingosine	21.7
br ^a	
C ₂₂ -phytosphingosine	23.1
Fatty Acid	
18:0	3.7
19:0	1.7
18:0 (2-hydroxy)	19.0
24:0	2.0
25:0	41.9
26:0	4.5
26:0 br ^b	15.5
27:0	9.3
27:0 br ^b	2.7

^a branched phytosphingosine; ^b branched fatty acid

Table 2

Neutral sugar analysis (molar ratio) of the Dionex purified PI-oligosaccharides of GIPLs from *H. samuelpeessoai*.

Sugar	PI-oligosaccharides			
	A	B	C	D
Rhamnose	1.0	1.1	1.0	1.0
Xylose	1.1	1.0	1.3	1.3
Mannnose	4.0	3.4	4.3	3.7
Glucose	1.2	0.8	0.0	0.2

^aDetermined by GC as trimethylsilyl derivatives of methylglucosides.

Table 3

O-methylalditol acetates formed on methylation analysis of *H. samuelpeessoai* PI-oligosaccharides A and C^a

O-methyl derivative	PI-oligosaccharides	
	A	C
2,3,4-tri- <i>O</i> -methyl-1,5-di- <i>O</i> -acetyl xylitol	0.7	0.3
2,3,4-tri- <i>O</i> -methyl-1,5-di- <i>O</i> -acetyl rhamnitol	0.9	0.3
2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -methyl-1,5-di- <i>O</i> -acetyl glucitol	0.7	-
3,4,6-tri- <i>O</i> -methyl-1,2,5-tri- <i>O</i> -acetyl mannitol	2.0	1.8
2,6-di- <i>O</i> -methyl-1,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetyl mannitol	1.0	1.0
2,4-di- <i>O</i> -methyl-1,3,5,6-tetra- <i>O</i> -acetyl mannitol	0.7	0.2

^a The partially methylated alditol acetates were identified and quantified by GC-MS.

Table 4Proton NMR assignment for the *H. samuelpeessoai* PI-oligosaccharide A^a

	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	H-6'
Ins	4.077	4.199	3.574	3.689	3.411	3.861	
GlcN	5.700	3.325	4.070	3.796	4.254	4.129	n.d.
Glc	5.129	3.543	3.738	3.387	[3.841]	n.d.	n.d.
Man(1)	5.437	4.094	4.003	[3.771]	n.d.	n.d.	n.d.
Man(2)	5.286	4.216	3.904	[3.90]	n.d.	n.d.	n.d.
Man(3)	5.134	4.051	3.980	[3.840]	n.d.	n.d.	n.d.
Man(4)	5.080	4.290	4.000	[3.930]	n.d.	[3.837]	n.d.
Rha	4.968	3.963	3.899	3.478	4.148	1.266	
Xyl	4.392	3.240	3.426	3.645	3.240	3.923	

^a Data obtained at 30 °C; [] Assignment tentative

Table 5

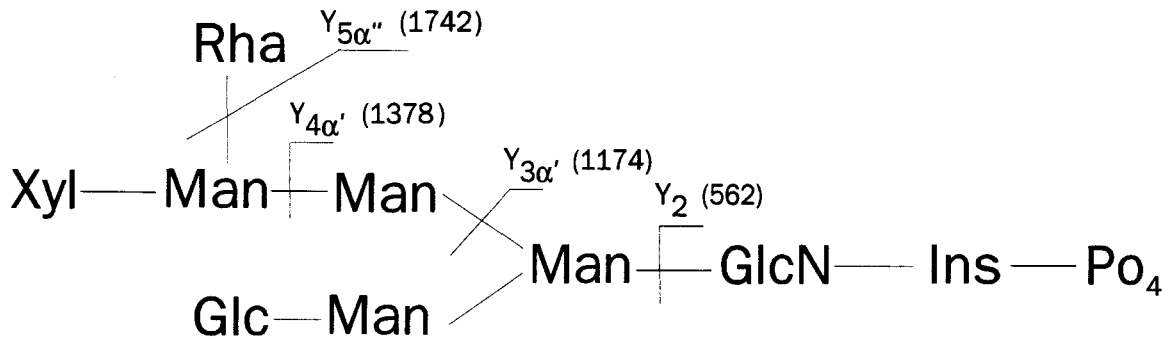
Summary of intra- and inter-residue n.O.e. data determining sugar sequence and linkage for the *H. samuelpeessoai* PI-oligosaccharide A.

From	Inter-residue	Intra-residue
GlcN H-1	H-2 @ 3.325	Ins H-6 @ 3.861 Ins H-1 @ 4.063
Man(2) H-1	{H-2 @ 4.216} {H-3 @ 3.909}	GlcN H-4 @ 3.796
Man(1) H-1	{H-2 @ 4.093} {H-3 @ 4.003} {H-4 @ 3.770}	Glc H-1 @ 5.130 Man(2) H-2 @ 4.214 Man(2) H-3 @ 3.904
Glc H-1	H-2 @ 3.547	Man(1) H-1 @ 5.347 Man(1) H-2 @ 4.094
Man(3) H-1	H-2 @ 4.050	4.000; 3.749 - not assigned
Man(4) H-1	{H-2 @ 4.290}	Man(3) H-2 @ 4.050
Rha H-1	H-2 @ 3.964	Man(4) H-2 @ 4.290 Man(4) H-3 @ 3.972
Xyl H-1	H-2 + H-5a @ 3.251 H-3 @ 3.251	[Man(4) H-4 @ 3.932] [Man(4) H-6 @ 3.837] Rha H-2 @ 3.964

Table 6Proton NMR assignments for the *H. samuelpeessoai* PI-oligosaccharide C^a

	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	H-6'
Ins	4.080	4.189	3.572	n.d.	n.d.	n.d.	
GlcN	5.700	3.338	4.075	3.758	[4.257]	[4.138]	n.d.
GlcA	5.129	3.592	3.748	3.503	4.114		
Man(1)	5.373	4.085	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Man(2)	5.202	4.246	[3.957]	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Man(3)	5.124	4.047	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Man(4)	5.080	4.290	3.992	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Rha	4.968	3.963	3.899	3.478	4.148	1.266	
Xyl	4.392	3.240	3.426	3.640	3.240	3.920	

^a Data obtained at 500 MHz and at 30 °C; [] Assignment tentative.



$$[M+H]^+ = 1931$$

Figure 1: Fragment ions observed in the daughter ion spectrum of m/z 1931 from permethylated PI-oligosaccharide A. For clarity the fractional parts of m/z values have been omitted and the masses rounded down to their nominal values.

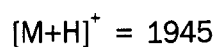
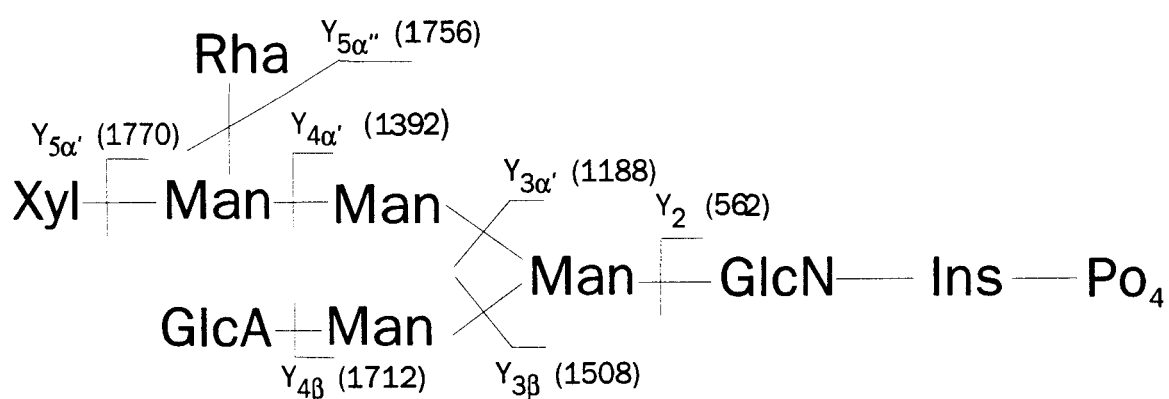


Figure 2: Fragment ions observed in the LISIMS spectrum of permethylated PI-oligosaccharide C. Most of the Y type ions were accompanied by $1,5X$ ions at $m/z Y_n + 28$. The following were omitted from the figure for reasons of clarity: $m/z 1798$ ($1,5X5_{\alpha'}$); $m/z 1784$ ($1,5X5_{\alpha''}$); $m/z 1420$ ($1,5X4_{\alpha'}$); $m/z 1216$ ($1,5X3_{\alpha'}$); $m/z 1740$ ($1,5X4_{\beta}$) and $m/z 590$ ($1,5X2$).

Table 7

Structures of PI-oligosaccharides A and C isolated from GPIs of *H. samuelpeossoi*

PI-oligosaccharide	Structure
A	$ \begin{array}{c} \alpha\text{-Rha}(1-3) \\ \beta\text{-Xyl}(1-4) \\ \alpha\text{-Man}(1-2)\alpha\text{-Man}(1-6) \\ \alpha\text{-Glc}(1-2)\alpha\text{-Man}(1-3) \\ \alpha\text{-Man}(1-4)\alpha\text{-GlcN}(1-6)\text{-Ins-1-OPO}_3^- \\ \text{OPO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+ \end{array} $
C	$ \begin{array}{c} \alpha\text{-Rha}(1-3) \\ \beta\text{-Xyl}(1-4) \\ \alpha\text{-Man}(1-2)\alpha\text{-Man}(1-6) \\ \alpha\text{-GlcA}(1-2)\alpha\text{-Man}(1-3) \\ \alpha\text{-Man}(1-4)\alpha\text{-GlcN}(1-6)\text{-Ins-1-OPO}_3^- \\ \text{OPO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+ \end{array} $

Annexe 1 :

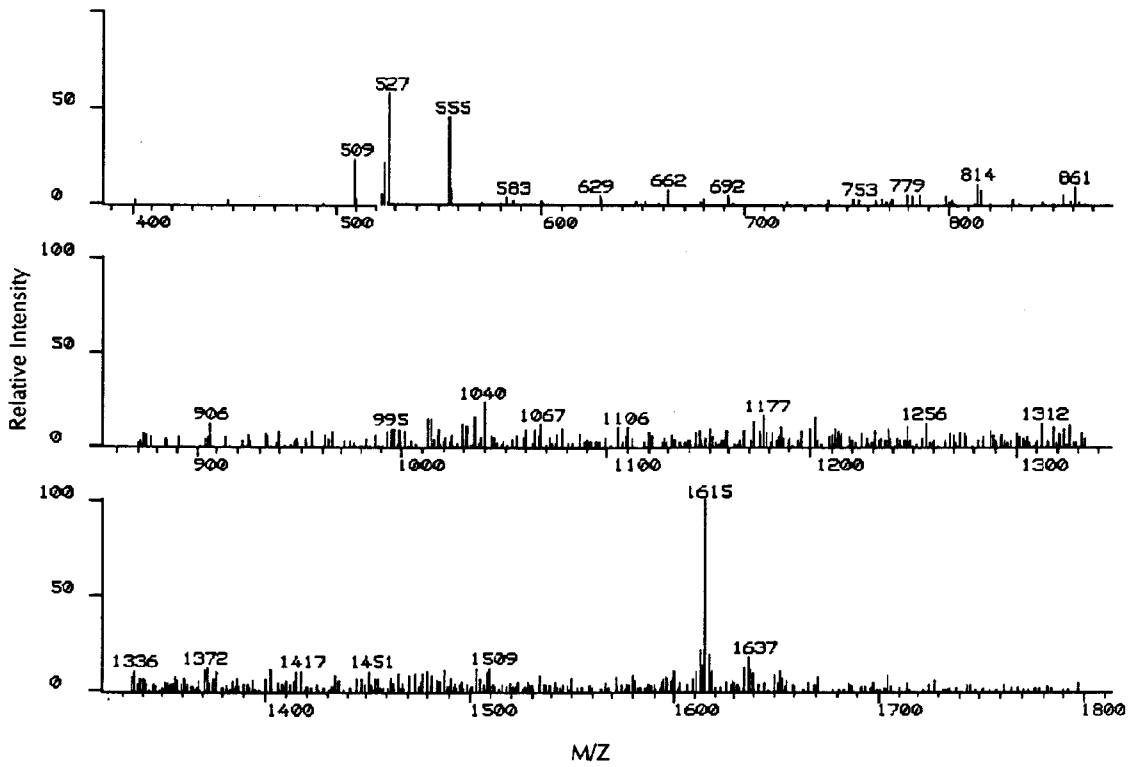


Figure 1: Negative FAB Mass spectrum of native PI-oligosaccharide A obtained from *H. samuelpeSSAOI* GIPL by alkaline hydrolysis

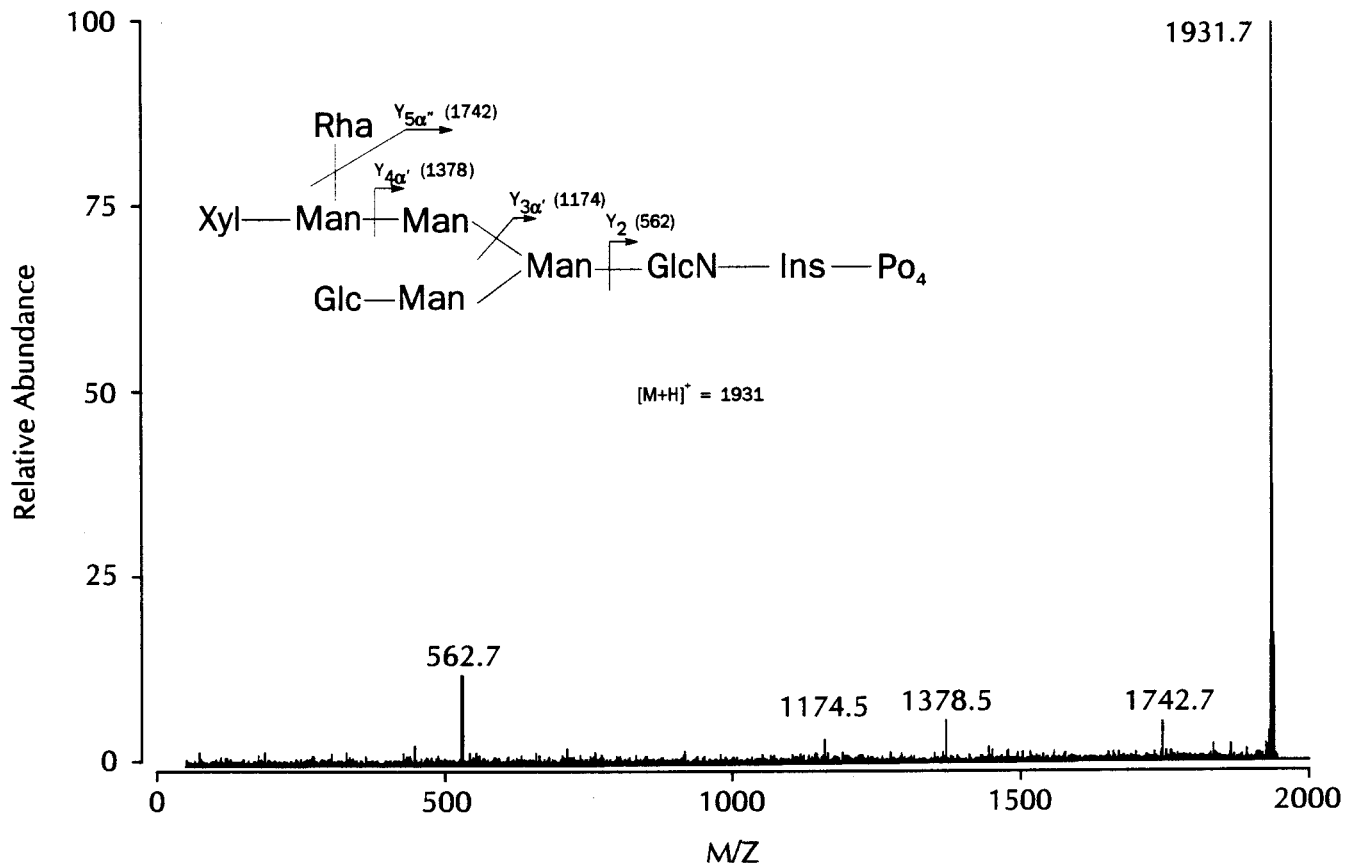


Figure 2: Positive ion collisional activation FAB Mass spectrum of permethylated PI-oligosaccharide A

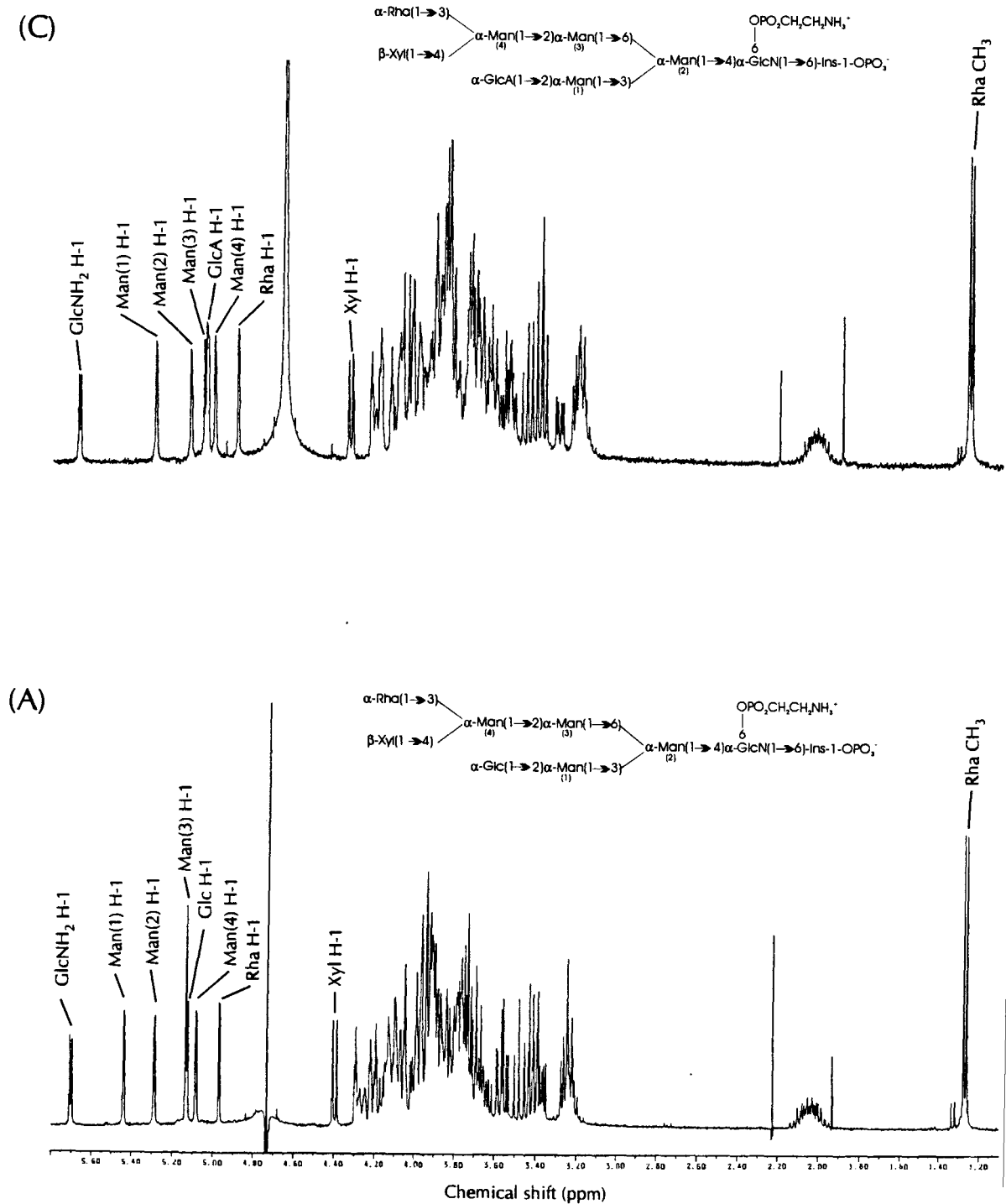


Figure 3: $^1\text{H-NMR}$ spectra of PI-oligosaccharides C and A

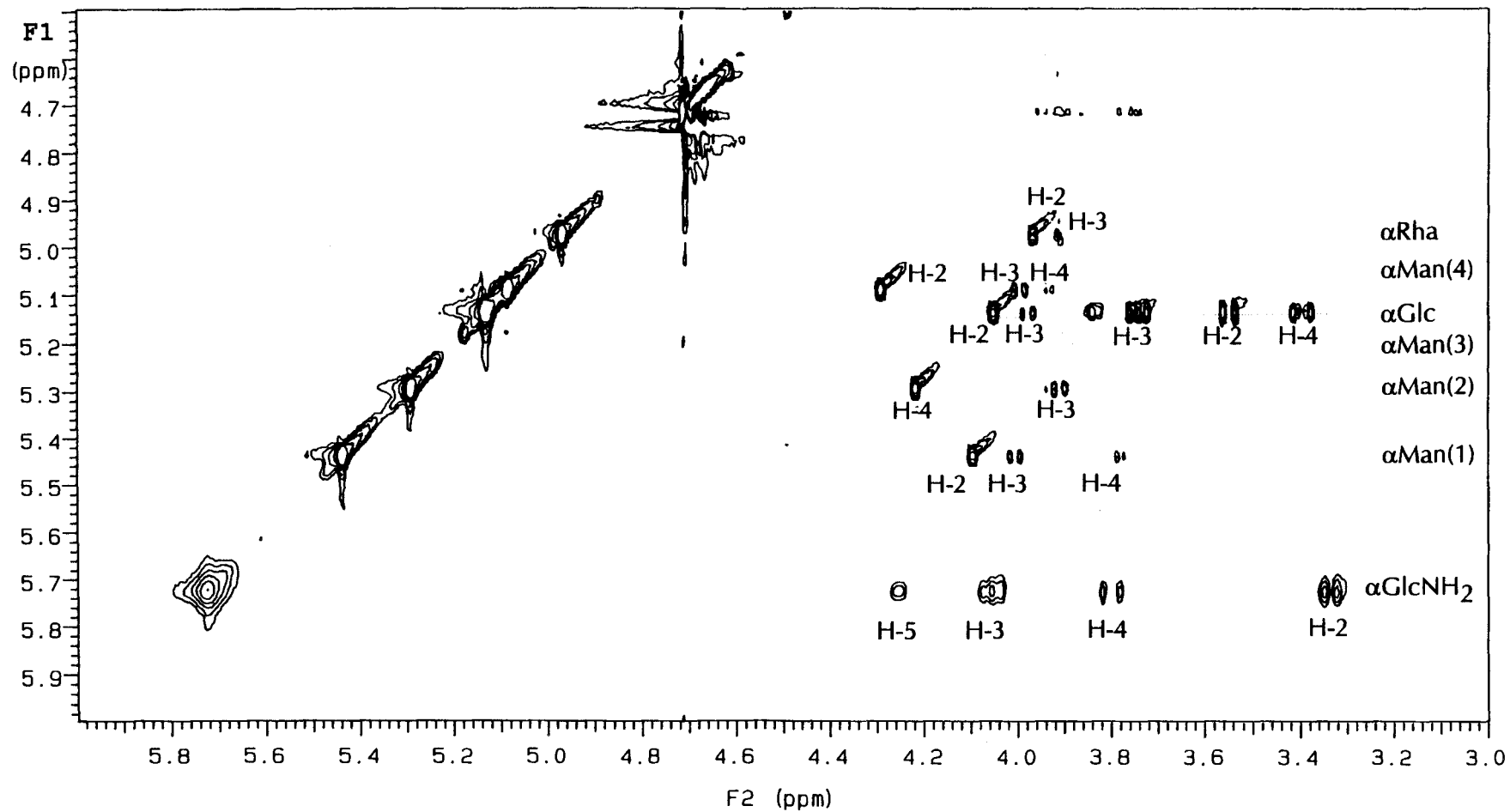


Figure 4 : Partial TOCSY spectrum of PI-oligosaccharide A

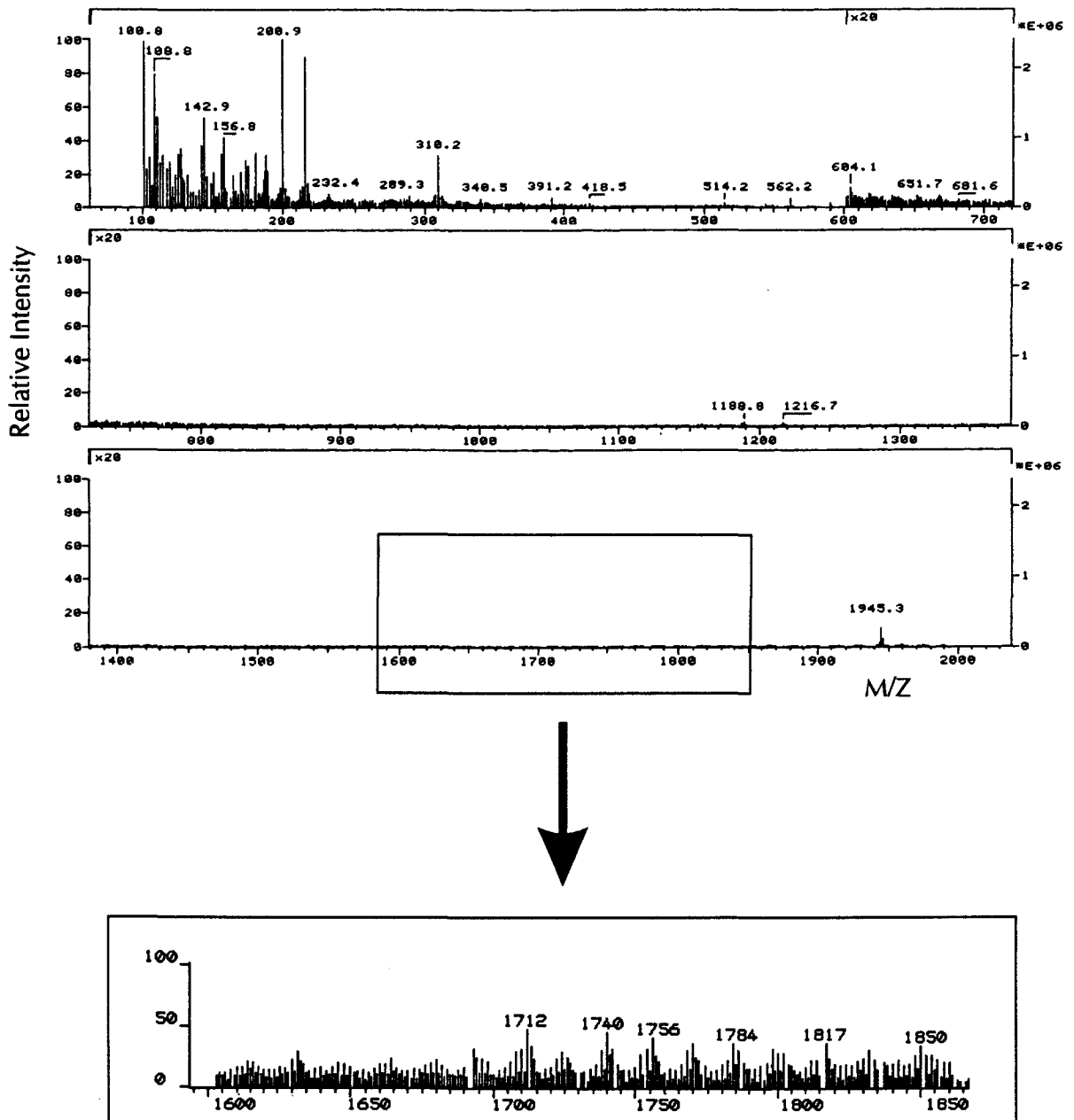
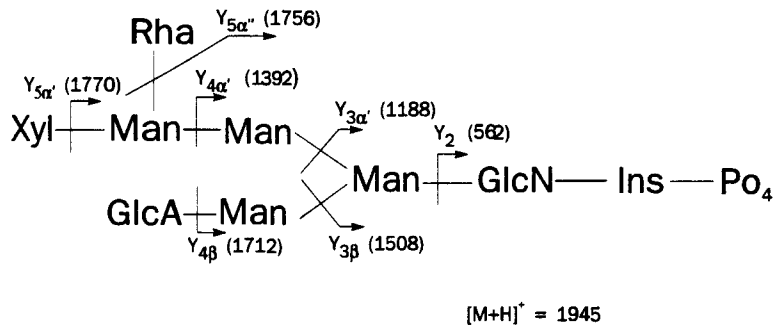


Figure 5: Positive FAB Mass spectrum of permethylated PI-oligosaccharides C.

CONCLUSIONS

Les structures des deux principaux GIPL isolés des promastigotes de *Herpetomonas samuelpeessoai* ont été élucidées grâce à diverses techniques tels que la chromatographie d'échanges d'anions à haut pH, la spectrométrie de masse, la spectroscopie RMN et la méthylation. Ces glycolipides sont les premiers GIPL de type hybride extraits de parasites monoxènes. Jusqu'à présent, ce type de GIPL n'avait été décrit que chez les parasites du genre *Leishmania* (Mc Conville et Ferguson, 1993). Toutefois, les GIPL de *H. samuelpeessoai* sont plutôt à rapprocher du LPPG de *T. cruzi* (Previato *et al.*, 1990) du fait de la présence d'aminoéthylphosphonate et de céramide.

Les PI-oligosaccharides obtenus par hydrolyse alcaline des GPS de *Herpetomonas samuelpeessoai* présentent des résidus d' α Rha, de β Xyl, et d' α Glc ou d' α GlcA. Ces mêmes monosaccharides ont récemment été décrits dans les GPS de *Leptomonas samueli* (Previato *et al.*, 1994), mais sont absents des GIPL d'autres parasites. D'autre part, les GPS de *Herpetomonas samuelpeessoai* et de *Leptomonas samueli* présentent tous deux des résidus d'aminoéthylphosphonate. L'homologie structurale existant entre ces glycolipides est peut-être le reflet des adaptations de ces deux parasites de phylogénie différente pour la colonisation du même insecte *Zelus leucogrammus*. De même que la diversité structurale des GIPL exprimés par les parasites du genre *Leishmania* (Mc Conville et Ferguson, 1993) peut correspondre à des adaptations à différents insectes vecteurs.

De plus, des études de l'adhésion des parasites *in vitro* et *in vivo* suggèrent que la fixation des parasites aux cellules épithéliales de l'intestin de l'insecte soit réalisée par des interactions électrostatiques et lectiniques (Molyneux *et al.*, 1987). Ainsi, les résidus d'aminoéthylphosphonate présents à la surface de *H. samuelpeessoai* et de *L. samueli* pourraient être impliqués dans un phénomène électrostatique permettant le rapprochement du parasite de l'épithélium de l'intestin de l'insecte. Puis, les résidus de rhamnose, de xylose, ou encore d'acide glucuronique pourraient intervenir dans des interactions lectiniques permettant l'attache du parasite. De telles

interactions lectiniques entre des récepteurs situés à la surface des intestins de phlébotomes et le LPG de *L. major* ont déjà été mises en évidence (Pimenta *et al.*, 1992).

Actuellement, le développement d'un vaccin bloquant le cycle de transmission du parasite et utilisant le LPG comme antigène est à l'étude. Les LPG sont, en effet, des molécules très importantes pour la fixation des leishmanies à l'intestin de l'insecte (Pimenta *et al.*, 1992) et en conséquence à la production de formes métacycliques infectieuses. Ainsi des anticorps contre ces molécules entreraient en compétition avec le parasite pour la fixation à l'épithélium de l'intestin et bloqueraient le cycle de transmission du parasite (Modabber, 1993).

**Structures of four oligosaccharides
derived from the
glycoinositolphospholipid
of *Leishmania adleri***

**F. Routier, L. Mendonça-Previato,
J.O. Previato, C. Jones and R. Wait**

Brazilian J Med Biol Res (1994) 27: 211-217

Les leishmanies de reptiles constituent un groupe de parasites primitifs représentant probablement un stade transitoire de l'évolution entre les trypanosomatides d'arthropodes (souche de type *Leptomonas*) et les leishmanies de mammifères (Vickerman, 1976). La plupart de ces parasites ont été isolés dans des régions où reptiles, phlébotomes et rongeurs cohabitent. De plus, les phlébotomes se nourrissent à la fois du sang des reptiles et des rongeurs. De ce fait, l'importance épidémiologique de ces leishmanies de lézards a longtemps été discuté. Toutefois, ils sont considérés comme non pathogènes pour les mammifères (Wilson et Southgate, 1979).

Parmi ces parasites *Leishmania adleri* représenterait un stade évolué des trypanosomatides de reptiles intermédiaire entre les autres leishmanies de reptiles et celles de mammifères. Ce parasite découvert au Kenya en 1958 montre une forte immunité croisée avec *Leishmania donovani* (parasite responsable de la leishmaniose viscérale appelée Kala azar). Southgate suggère que l'infection naturelle par *Leishmania adleri* soit responsable de "l'immunité naturelle" contre le Kala azar décrite au Kenya (Southgate et Manson Bahr, 1967). Toutefois, la nature spécifique des antigènes impliqués dans ce phénomène reste inconnue.

De plus, la taxonomie des leishmanies de lézards est très controversée et il a été proposé d'exclure ces parasites du genre *Leishmania* (Laison et Shaw, 1987). Nous avons donc entrepris l'étude des glycoinositolphospholipides isolés des promastigotes de *Leishmania adleri* dans l'espoir de clarifier la position taxonomique et phylogénétique de ce parasite qui est un ancêtre potentiel des leishmanies humaines. Cette étude, nous l'espérons, aidera également à la future détermination des rôles des GIPL.

Nous présentons ci-après la structure des quatre principaux PI-oligosaccharides dérivés des GIPL de *Leishmania adleri*.

Structures of four oligosaccharides derived from the glycoinositolphospholipid of *Leishmania adleri*

F. Routier¹, L. Mendonça-Previato²,
J.O. Previato², C. Jones³ and R. Wait⁴

¹Laboratoire de Chimie Biologique, USTL,
59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

²Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro,
21944-970 Rio de Janeiro, RJ, Brasil

³Laboratory for Molecular Structure, NIBSC, Herts EN6 3QG, UK

⁴Pathology Division, PHLs CAMR, Porton Down, Wilts SP4 0JG, UK

Glycoinositolphospholipids (GIPLs) were extracted from the trypanosomatid *Leishmania adleri* by hot phenol extraction and the carbohydrate moieties isolated after base cleavage. Purification of the crude oligosaccharides by high performance anion exchange (HPAE) chromatography yielded four fractions whose structures were determined by a combination of methylation analysis, fast atom bombardment (FAB) mass spectrometry and two-dimensional nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy.

Key words: FAB-mass spectrometry, NMR-spectroscopy, oligosaccharides structures, *Leishmania adleri*, glycoinositolphospholipid.

It has been suggested that the *Leishmania*-like parasites of reptiles represent an evolutionary link between (hypothetical) ancestral monoxenous parasites of arthropods and modern day leishmania (1). The taxonomic status of these organisms is, however, controversial, and it has recently been proposed (2) that the *Leishmania*-like trypanosomatids of reptiles should be excluded from the genus *Leishmania* and accommodated within a separate taxonomic grouping. We have therefore investigated the structure of the carbohydrate portion of the cell surface glycoconjugates of *Leishmania adleri* in the hope that comparison with leishmanial parasites of mammals will illuminate their taxonomic and phylogenetic relationships.

Presented at the "GPI-Anchor Proteins: Structure and Function - 1994" Meeting, Angra dos Reis, RJ, Brasil, February 20-26, 1994.

Correspondence: C. Jones, Laboratory for Molecular Structure, NIBSC, Herts EN6 3QG, UK.

Following isolation of the GIPLs by published methods and cleavage of the oligosaccharide chains from the lipid moiety with strong base (3), the oligosaccharide fraction was investigated by NMR spectroscopy and FAB mass spectrometry. Full structures

Table 1 - Composition of the four PI-oligosaccharide fractions derived from *L. adleri*, as determined by methylation analysis.

	Fraction 1	Fraction 2	Fraction 3	Fraction 4
Terminal mannopyranose	2			2
→2)-Mannopyranose	0.9			1
→3)-Mannopyranose		1.9	1.5	
→3,6)-Mannopyranose	0.8			0.7
Terminal galactopyranose		1	1	
→3)-Galactofuranose		1	0.7	
→6)-Galactopyranose		0.9		

could not be obtained from the mixture, and this was fractionated on a CarboPac PA-100 anion exchange column to yield four pools of material, Fractions 1-4. One-dimensional proton NMR showed that these fractions were of good purity apart from the characteristic heterogeneity due to migration of the phosphate from Ins O-1 to O-2 during the base cleavage (3), and that Fractions 1 and 4 and Fractions 2 and 3 were closely related in structure. The ^{31}P NMR spectrum showed that Fraction 4 contained a phosphodiester group, and characteristic resonances for an ethanolamine phosphate group were observed in the proton NMR spectrum.

The four fractions were methylated, hydrolysed, reduced and peracetylated, and the resulting partially O-methylated alditol acetates analysed by gas chromatography-mass spectrometry (4). The results of this methylation analysis are summarised in Table 1. Under the harsh conditions used for the methylation the ethanolamine phosphate was eliminated.

The HPAE-purified fractions were analysed by FAB-mass spectrometry in both the positive and negative ionisation modes. Mass measurement of Fractions 1 and 3 suggested a composition of four hexose residues, one hexosamine and inositol phosphate ($[\text{M}+\text{H}]^+ = m/z 1070.4$; $[\text{M}-\text{H}]^- = m/z 1068.4$; M_r calculated for this composition, 1069.3). The protonated molecules of oligosaccharides 2 and 4 were observed at $m/z 1232$ and 1193 , suggesting the presence of an additional hexose and an ethanolamine phosphate substituent, respectively. Contamination of these samples with residual salt increased background ionisation, obscuring potentially informative fragment ions. Collisional activation with helium was therefore used to enhance fragmentation, and thus increase the amount of structural information in the spectra; product ions were detected by means of linked scans at constant B/E (Figures 1 and 2). Under these conditions glycosidic cleavages were observed giving rise to both "reducing" and non-reducing terminal fragments: these are labelled in Figures 1 and 2 according to the Domon and Costello system (5). The existence of a hexose branch on the

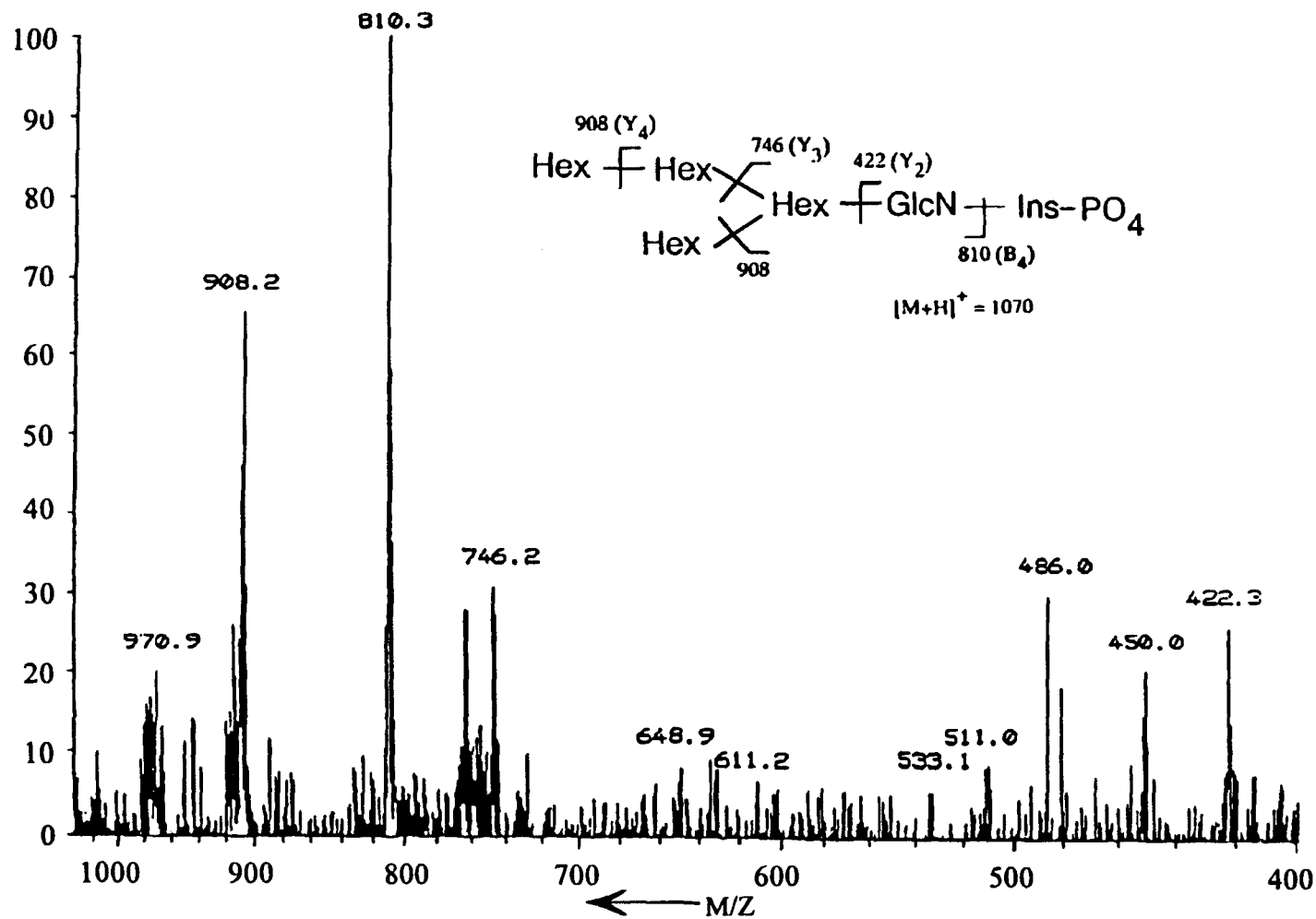


Figure 1 - Collisional activation mass spectra of the oligosaccharides with $[M+H]^+$ ions at m/z 1070 (Fraction 1). The daughter ions obtained by collision with helium in the field free region between the FAB source and the electrostatic analyser were detected by a linked scan at constant B/E ratio.

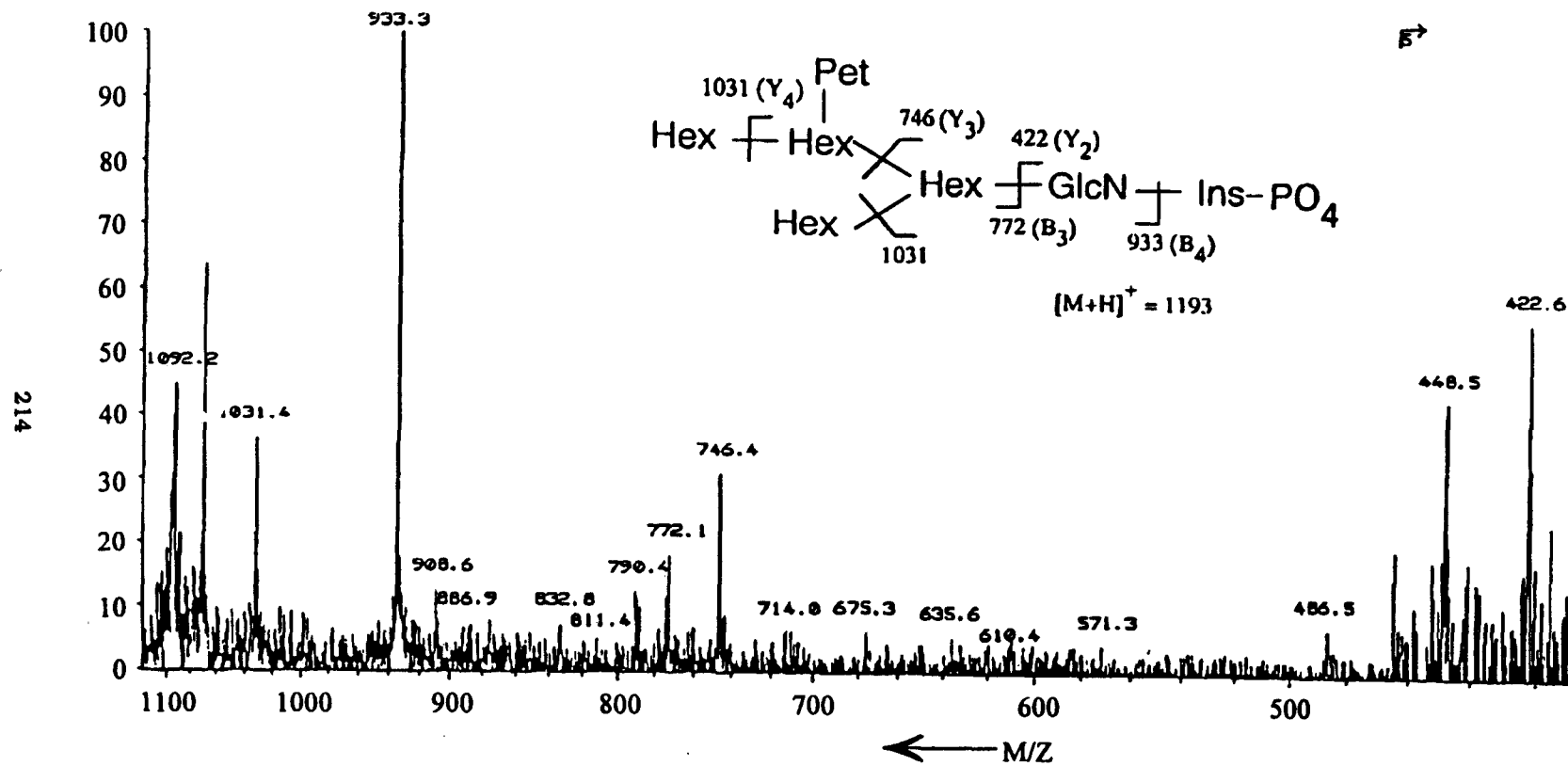


Figure 2 - Collisional activation mass spectra of the oligosaccharides with [M+H]⁺ ions at m/z 1193.

hexose distal to hexosamine of oligosaccharide 1 (Figure 1) was inferred from the absence of a Y_3 glycosidic cleavage ion at m/z 584, which would be expected if the oligosaccharide was linear. Oligosaccharide 4 (Figure 2) also appears to be similarly branched in this position. Since the Y_2 fragment ion (cleavage on the non-reducing side of GlcN) is observed at m/z 422 in all four oligosaccharides, the ethanolamine phosphate substituent in oligosaccharide 4 cannot be located on either glucosamine or inositol; the mass increment of 285 between ions Y_4 and Y_3 suggests the penultimate hexose residue is the site of substitution. The presence of several non-reducing terminal-containing fragments (particularly those assigned as B_3 and B_4) provides further support for this structure. Collisional activation of m/z 1232 and 1070 from oligosaccharides 2 and 3 suggests a linear arrangement of residues since in both cases the full set of predicted Y type glycosidic cleavage ions, including m/z 584, were observed.

Two-dimensional NMR spectroscopy at 500 MHz and 30°C of Fraction 4 revealed the presence of four α -Man spin systems as well as the common GlcNH_2 -(1 \rightarrow 6)-Ins-1/2-phosphate end group. Chemical shift comparison with published data (6) established the two non-reducing terminal Man residues, and the sequence was established from inter-residue nuclear Overhauser enhancements (n.O.e.s) obtained from a ROESY experiment (7) and carbon chemical shift data. N.O.e.s were observed between the α -GlcNH₂ H-1 and the Ins H-6, and the α -Man residue with the lowest field anomeric resonance (called Man(1)) showed an n.O.e. between this H-1 resonance and the α -GlcNH₂ H-4, consistent with the common α -Man-(1 \rightarrow 4)- α -GlcNH₂-(1 \rightarrow 6)-Ins-1/2-phosphate group. One of the α -Man residues identified as terminal (α -Man(2)) showed n.O.e.s between its anomeric proton and α -Man (1) H-2 and H-3, consistent with a monosaccharide branch located on O-3. The other terminal α -Man residue (α -Man(3)) showed n.O.e.s between its anomeric proton and α -Man(4) H-2 and H-3. The carbon NMR spectrum of this fraction was assigned from an HMQC experiment (8) and the lowfield position of the α -Man(4) C-2 resonance is consistent with an α -Man(3)-(1 \rightarrow 2)-Man(4) system, as found in an oligosaccharide from *Leishmania donovani* and *L. mexicana* (9). The anomeric resonance of α -Man(4) showed n.O.e.s to resonances at 4.118, 3.895 and 3.780 ppm, a spin system observed in a triple quantum filtered COSY experiment, consistent with an assignment as H-5/H-6/H-6'. These data establish an α -Man(4)-(1 \rightarrow 6)- α -Man(1) linkage and distinguish the monosaccharide and disaccharide branch. Due to the close spectral similarity of Fraction 1 to Fraction 4 and the published data on the *L. donovani* oligosaccharide (10) in one- and two-dimensional NMR, its structure was assigned as the unphosphorylated homologue.

Two-dimensional NMR of Fraction 2 indicated the presence of only two α -Man, a β -Gal f and two α -Gal p residues. As before, sequence and linkage were

determined from the mass spectrometric data and the inter-residue n.O.e.s observed in NMR. One of the α -Galp residues was identified as a non-reducing terminus from its chemical shifts (6), and the anomeric resonance of this residue showed an n.O.e. to one of the H-6 resonances of the other α -Galp residue, implying a terminal α -Galp-(1 \rightarrow 6)- α -Galp disaccharide. This conclusion was supported by the lowfield position of the α -Galp H-5 resonance (4.323 ppm, triplet, 6 Hz) and the methylation analysis. The anomeric resonance of the \rightarrow 6)- α -Galp-(1 \rightarrow residue showed n.O.e.s to the β -GalfH-3 and H-4s, consistent with a \rightarrow 3)- β -Galf-(1 \rightarrow as found in the GPS from *Endotrypanum schaudinii* (F. Routier, L. Mendonça-Previato, J.O. Previato, C. Jones and R. Wait, unpublished data). Beyond this the pattern of inter-residue n.O.e.s was the same as that found in the common sequence β -Galf-(1 \rightarrow 3)- α -Man-(1 \rightarrow 3)- α -Man-(1 \rightarrow 4)- α -GlcNH₂-(1 \rightarrow 6)-Ins-1/2-phosphate.

Insufficient material was available for a full NMR analysis of Fraction 3, but the one-dimensional spectrum showed that, compared to Fraction 2, it was lacking an α -Galp residue and the lowfield resonance (t, 6 Hz) assigned as \rightarrow 6)- α -Galp-(1 \rightarrow H-5 was moved to higher field. This was consistent with the FAB mass spectrometry and methylation analysis data, and indicated that Fraction 3 is a homologue of Fraction 2 lacking the non-reducing terminal α -Galp residue. The structures observed for Fractions 2 and 3 are identical with those found in glycoinositolphospholipids from *L. major* and *L. mexicana* (9).

Figure 3 summarizes the structures present in Fractions 1 to 4.

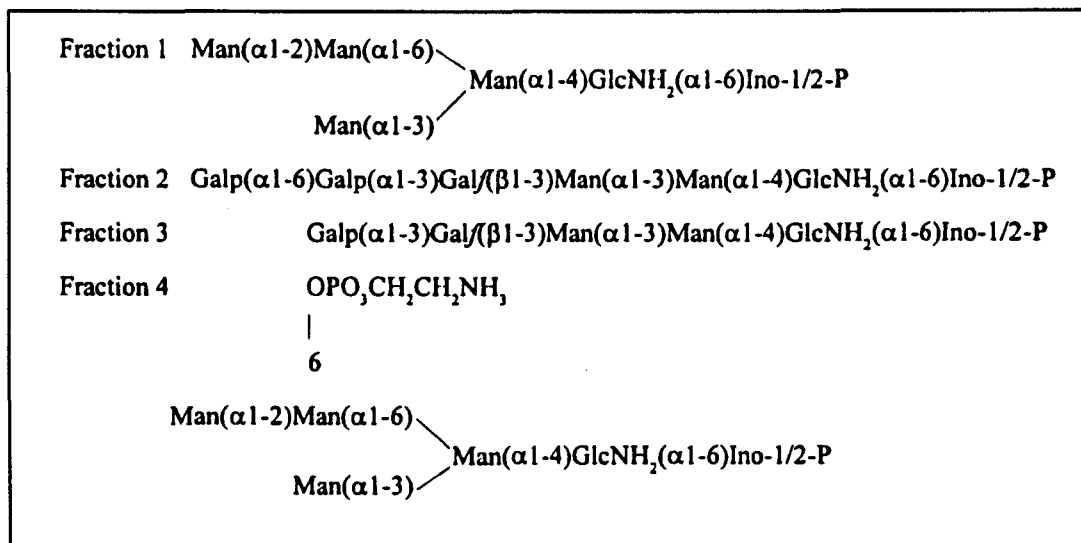


Figure 3 - Structures of the four oligosaccharides.

References

1. Wilson VCLC & Southgate BA (1979). In: Lumsden WHR & Evans DA (Editors), *Biology of the Kinetoplastida*. Vol. 2. Academic Press, London, 241-268.
2. Laison R & Shaw JJ (1987). In: Peters W & Killick-Kendrick R (Editors), *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*. Vol. 1. Academic Press, London, 1-120.
3. Previato JO, Mendonça-Previato L, Jones C, Wait R & Fournet B (1992). *Journal of Biological Chemistry*, 267: 24279-24286.
4. Jansson P-E, Kenne L, Liedgren L, Lindberg B & Lönngren (1976). *Chemical Communications of the University of Stockholm*, No. 8.
5. Domon B & Costello CE (1988). *Glycoconjugate Journal*, 5: 397-409.
6. Jansson P-E, Kenne L & Widmalm G (1989). *Carbohydrate Research*, 188: 169-192.
7. Kessler H, Griesinger C, Kerssebaum R, Wagner K & Ernst RR (1987). *Journal of the American Chemical Society*, 109: 607-609.
8. Summers MF, Marzilli LG & Bax A (1986). *Journal of the American Chemical Society*, 108: 4285-4294.
9. McConville MJ & Ferguson MAJ (1993). *Biochemical Journal*, 294: 305-324.
10. Sevlever D, Pålsson P, Rosen G, Nilsson B & Londner MV (1991). *Glycoconjugate Journal*, 8: 321-329.

Received November 17, 1993

Accepted January 3, 1994

Annexe 1 : Materials and Methods

Isolation of Glycoinositolphospholipids - Leishmania adleri promastigotes were grown in brain heart infusion supplemented with 10 mg l⁻¹ hemin (BHI-hemin), containing 10% (v/v) fetal calf serum. After 4 days at 26 °C, with shaking, the cells were harvested by centrifugation, extracted with 45% (v/v) aqueous phenol and purified as described by Previato *and al* (1990).

Isolation of phosphoinositol-oligosaccharides - The PI-oligosaccharides were isolated from the intact GIPLs by alkaline hydrolysis (KOH 1 M, 72 h at 37 °C) (Previato and *al.*, 1992). After neutralization with acetic acid, non polar material was removed by chloroform extractions. The aqueous layer was passed through a column of Dowex 50W-X8 (H⁺) resin (1 x 5 mm; Biorad, Richmond, CA) and the PI-oligosaccharides were eluted with water and desalted on a column of TSK HW40, using acetic acid as eluent (flow rate : 1 ml min⁻¹).

High pH anion exchange chromatography - The material eluted in the void volume of the TSK HW40 was fractionnated by HPAE chromatography using a Carbopac PA-100 analytic column (0.2 X 250 cm; Dionex, Sunnyville CA) and pulsed amperometric detection (PAD). The mobile phase initially consisted of 85% solution A (0.1 M NaOH) and 5% solution B (0.1 M NaOH and 1 M NaOAc). After injection the proportion of solution B was increased to 23% in a 10 min period by means of a linear gradient and maintained isocratically for 10 min. The flow rate was 4 ml min⁻¹. The fractions obtained were neutralized with acid acetic applied to a 1.8 X 13 cm column of Dowex 50W-X 8 (H⁺ form) and eluted with water. The eluates were concentrated, freeze dried and further desalted by passage through a column of Biogel P₂ (1 X 100 cm).

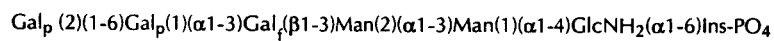
Carbohydrate analysis - After methanolysis of the samples with methanolic HCl 0.5 N for 24 h at 80 °C, the sugars were converted to their corresponding trimethylsilylated methylglycosides with bis-trimethylsilyl trifluoroacetamide/pyridine (1:1, v/v) for 2h at room temperature. The products were analyzed by GLC on a silicone OV-101 capillary column (25 m

x 0.2 mm) with a temperature program from 120 °C to 240 °C at 2 °C min⁻¹. Inositol and glucosamine were determined by GC after methanolysis followed by hydrolysis, reduction and acetylation, as previously described (Previato *and al.*, 1992).

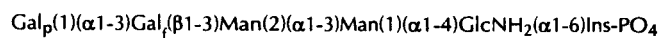
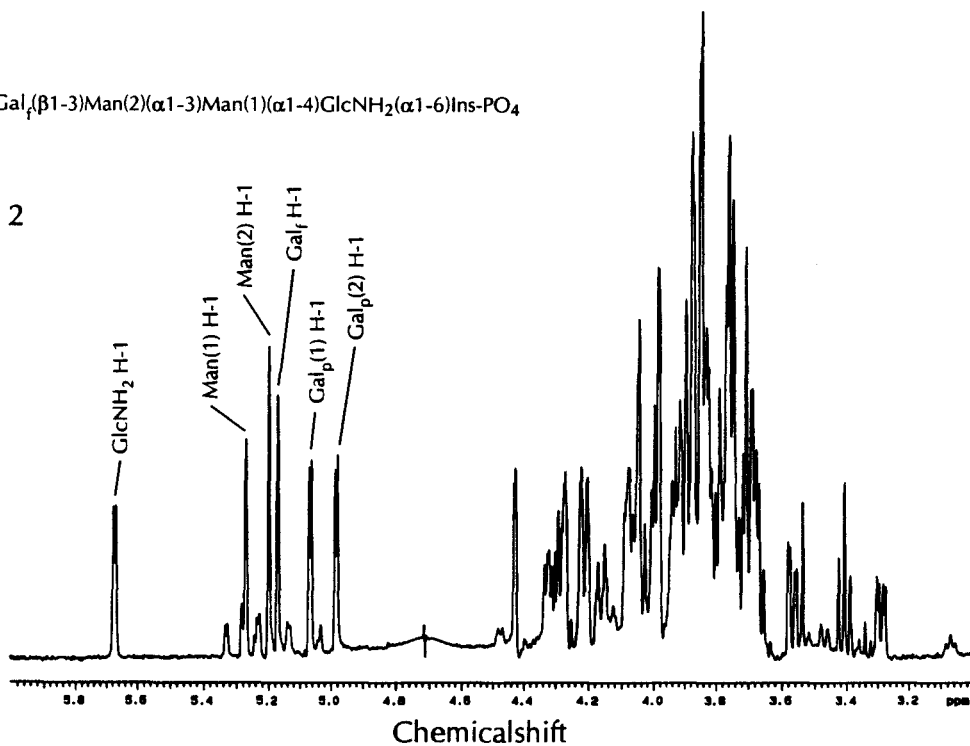
Methylation analysis - The samples were passed through a column of Dowex 50W-X2 resin on triethylamine form so as to increase their solubility in dimethylsulfoxide. Permethylation was carried out using methyl iodide in presence of methylsulfinyl anion (Parente *and al.*, 1985). The permethylated oligosaccharides were converted to acetylated partly O-methylated O-acetylated methyl glycosides and to partially methylated alditols acetates and then analyzed by GC-MS (Fournet *and al.*, 1981).

Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy - NMR spectra were collected on a Varian Unity 500 NMR spectrometer (Varian Associates, Palo Alto, CA) equipped with 5mm triple resonance (for proton detected experiments) or 5 mm broadband probes. All spectra were collected at an indicated probe temperature of 30 °C. Proton spectra were referenced to internal acetate anion at 1.908 ppm. TOSCY (Braunschweiler and Ernst, 1983) DQFCOSY (Piantini *and al.*, 1982; Rance *and al.*, 1983) and ROESY spectra (Kessler *and al.*, 1987) were obtained using standard Varian pulse programs. The spin lock field was generated by continuous low power irradiation. Solvent presaturation was achieved with a transmitter pulse except in the DQFCOSY experiment where the decoupler was used. Mixing times were 150 ms in the ROESY experiments and 80 ms in the TOSCY spectra apart from the TOSCY spectrum of fraction 1 with a 50 ms mixing time. Spectral widths of 3000 Hz (fraction 1 and 2) or 4000 Hz (fraction 4) were used in both domains and 32 scans were collected at each of 400 x 2 increments in f1. The HMQC spectrum collected 307 x 2 increments in f2. The spectral windows were 2443 Hz in f2 (¹H) and 10000 Hz in f1 (¹³C). 32 transients were averaged at each increment and the spectrum was optimised for ¹J_{CH} of 150 Hz. A delay of 0.3 s was incorporated at the end of the BIRD sequence. Broadband ¹³C decoupling was achieved with a GARP sequence .

Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry - FAB mass spectra were acquired using a Kratos MS80 RFA mass spectrometer, fitted with an Ion Tech FAB gun using xenon atoms as the bombarding particles. The matrices used were either glycerol or a mixture of glycerol and thioglycerol (1:1). The underivatized samples were dissolved in 30% acetic acid to a concentration of about $10 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ and mixed with an equal volume of matrix on the FAB probe. Methylated oligosaccharides were dissolved in methanol. The magnet was scanned at 30 s per decade of mass and several scans were accumulated and averaged using the DS 90 data system. Collision spectra were recorded in the positive ion mode. Collision-induced dissociation was achieved by admitting helium to the first field free region gas cell so as to attenuate the ion beam to 30% of its initial value. The decomposition products were analysed by means of computer B/E linked scans.



PI-oligosaccharide 2



PI-oligosaccharide 3

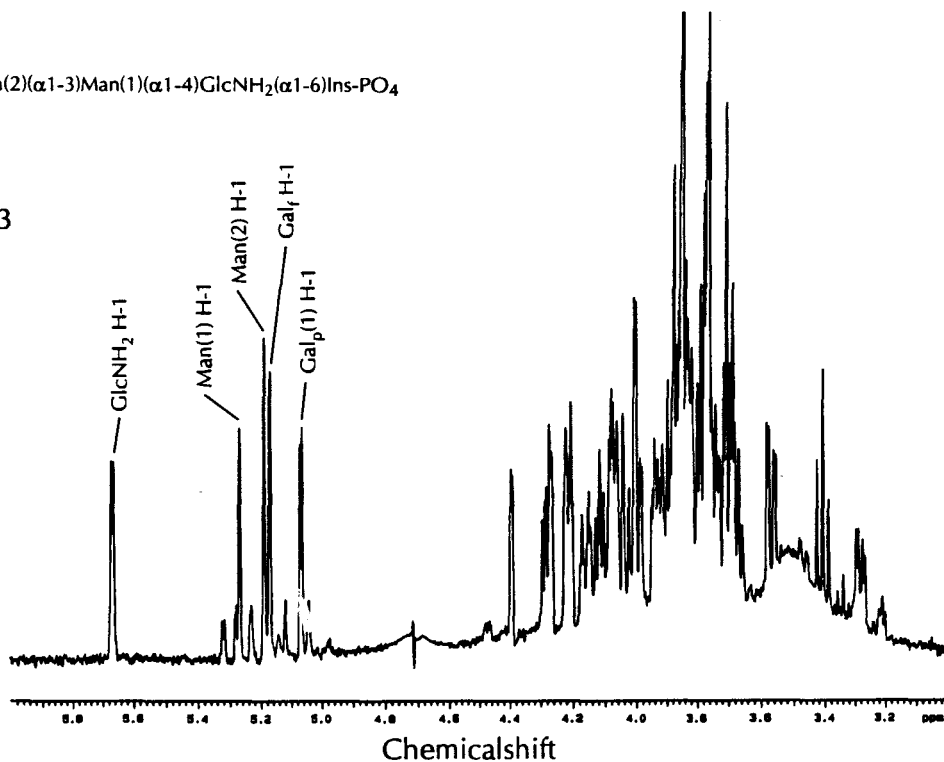


Figure 2: Partial ^1H NMR spectra of PI-oligosaccharides 2 and 3

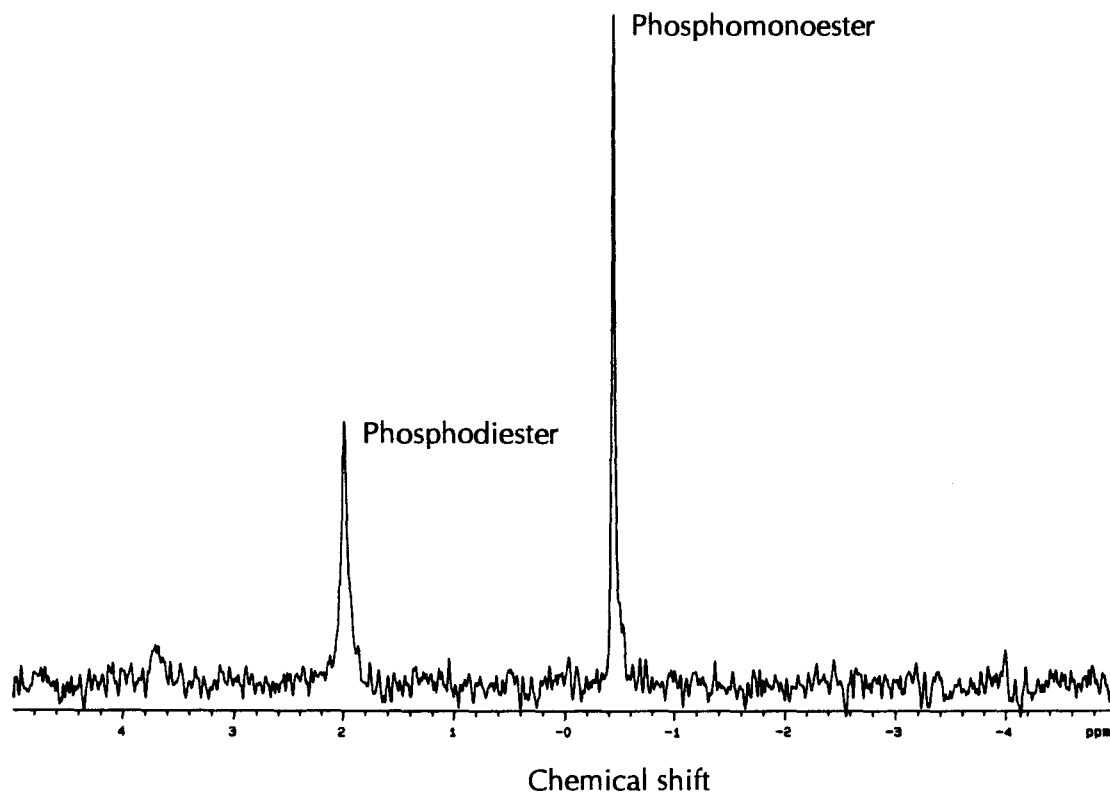


Figure 3: ^{31}P NMR spectrum of PI-oligosaccharide 4

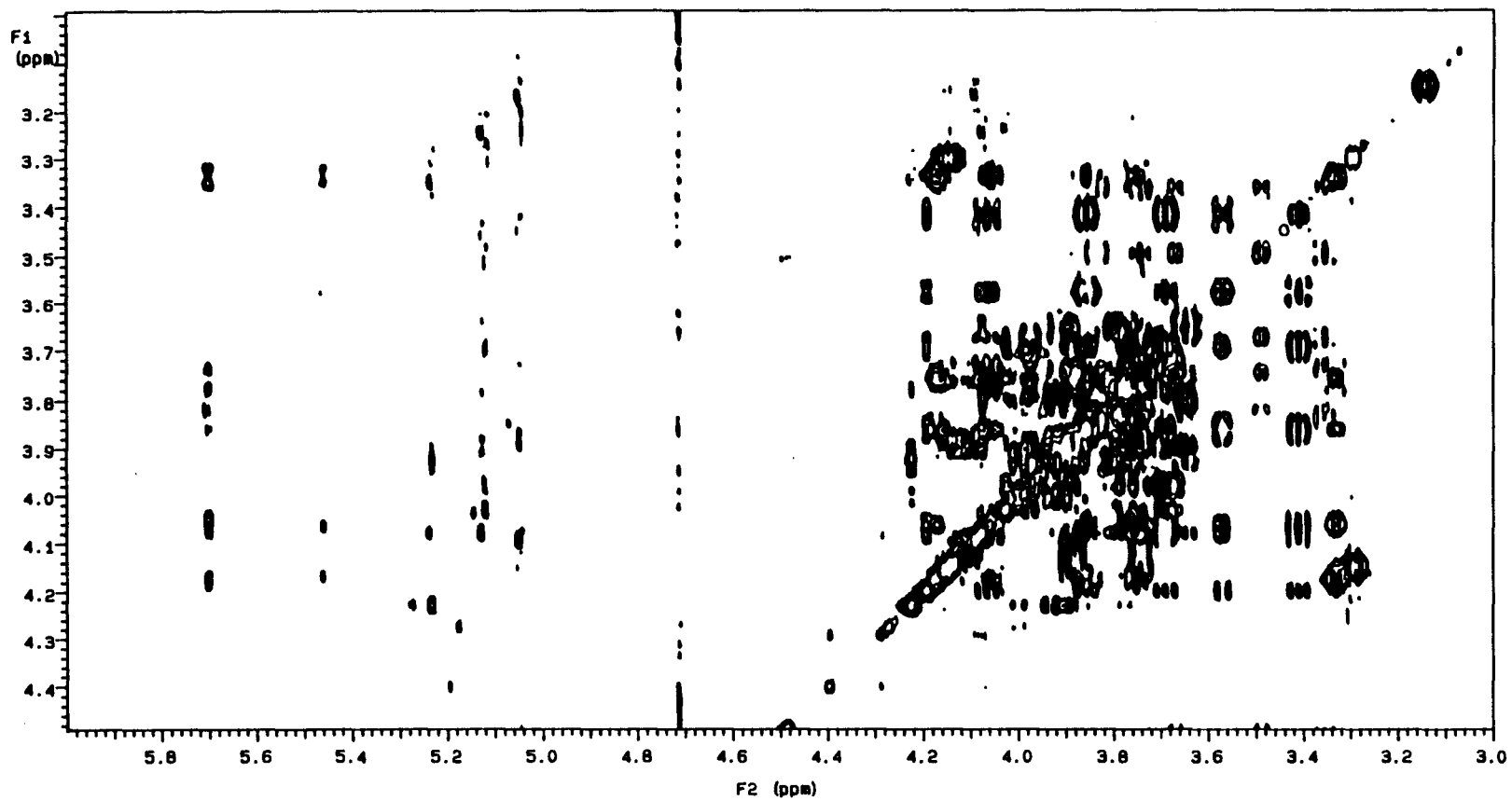


Figure 4: TOCSY spectrum of PI-oligosaccharide 2

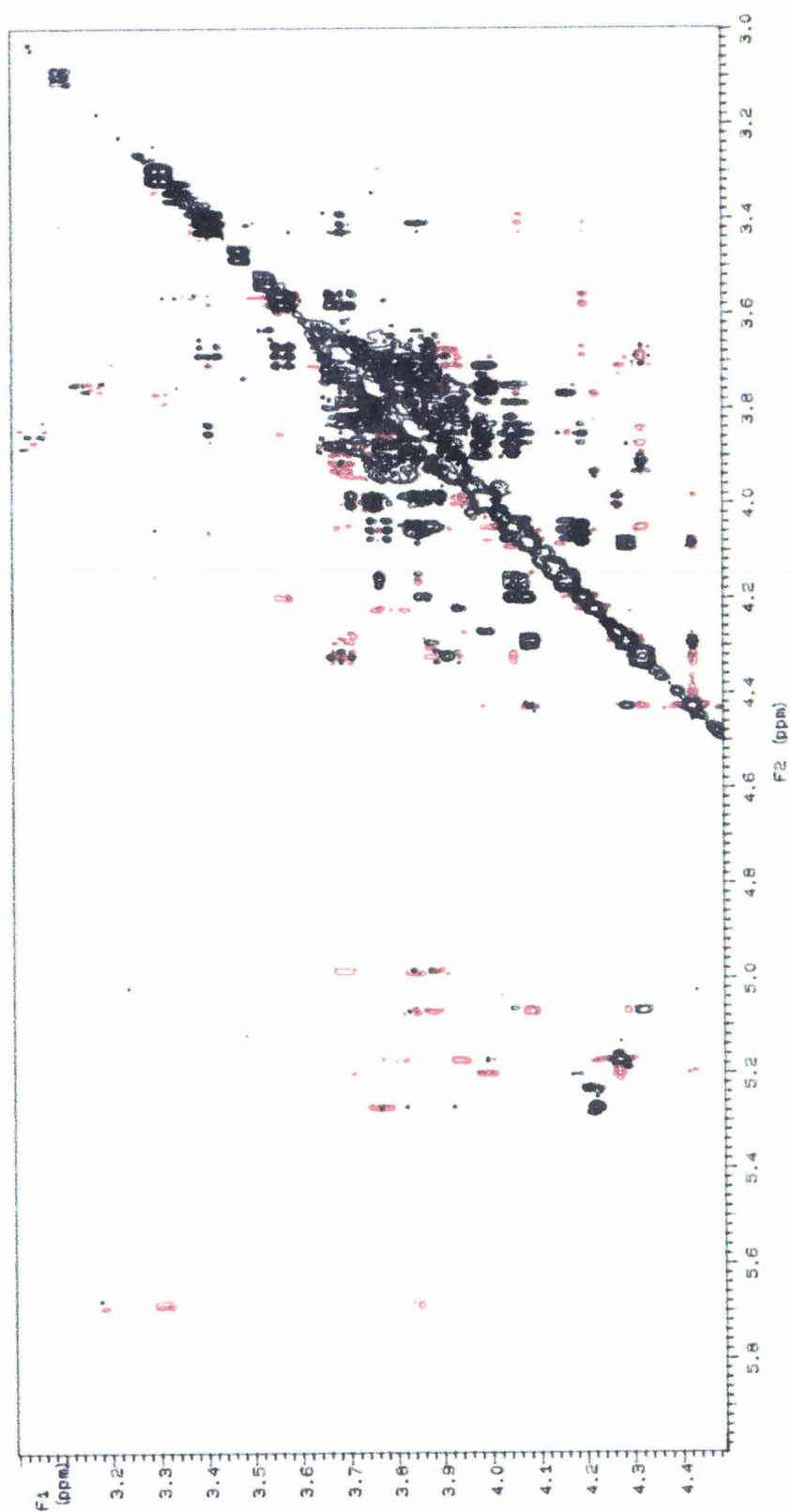


Figure 5: ROESY spectrum of PI-oligosaccharide 2

Table 1Proton NMR assignment for the *L. adleri* PI-oligosaccharide 1

	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	H-6'
Ins-1P	4.056	4.215	3.568	3.685	3.408	3.842	
Ins-2P	4.470		3.468	3.758	3.339		
GlcNH ₂	5.651	3.253	4.019	3.716	4.157	3.842	n.d.
Man(1)	5.234	4.225	3.920	3.900	[3.987	3.895	3.730]
Man(2)	5.146	4.032	3.971	3.690		[3.911	3.761]
Man(3)	5.123	4.073	3.885	3.647	[3.795	3.890	3.739]
Man(4)	5.047	4.079	3.850	3.630	[3.773	3.890	3.781]

Data obtained at 30 °C; [] Assignment tentative

Table 2Proton NMR assignments for the *L. adleri* PI-oligosaccharide 2

	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	H-6'
Ins-1P	4.060	4.200	3.568	3.686	3.408	3.851	
Ins-2P		4.484		3.668	3.471	3.754	
GlcNH ₂	5.681	3.302	4.065	3.786	4.162	3.851	
Man(1)	5.270	4.226	3.940	[3.754	3.809]		
Man(2)	5.173	4.273	3.995	[4.085	3.827	3.704]	
Gal ^f	5.199	4.426	4.082	4.291	3.875	3.682	
Galp(1)	5.067	3.834	3.887	4.050	4.323	3.912	3.685
Galp(2)	4.983	3.840	3.889	3.986			

Data obtained at 500 MHz and at 30 °C; [] Assignment tentative.

Table 3

Summary of intra- and inter-residue n.O.e. data determining sugar sequence and linkage for the *L. adleri* PI-oligosaccharide 2

From	Inter-residue	Intra-residue
GlcNH ₂ H-1	H-2 @ 3.307	Ins-1P H-6 @ 3.851 Ins-1P H-1 @ 4.062
Man(1) H-1	H-2 @ 4.221	GlcN H-4 @ 3.766
Man(2) H-1	H-2 @ 4.271	Man (1) H-3 @ 3.936
Gal _f H-1	H-2 @ 4.436	Man(2) H-3 @ 3.992 Man(2) H-2 @ 4.271
Gal _p (1) H-1	H-2 @ 3.825 H-3 @ 3.880 H-5 @ 4.321	Gal _f H-3 @ 4.086 Gal _f H-4 @ 4.292
Gal _p (1) H-5	H-4 @ 4.050 H-6 @ 3.916 H6' @ 3.688	Gal _f H-2 @ 4.426
Gal _p (2) H-1	H-2 @ 3.838 H-3? @ 3.875	Gal _p (1) H-6' @ 3.685

Table 4Proton NMR assignment for the *L. adleri* PI-oligosaccharide 4

	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	H-6'
Ins-1P	4.067	4.192	3.688	3.573	3.410	3.856	
Ins-2P	4.485	3.742	[3.355]	3.488	3.822	3.865 ^a	3.865 ^a
GlcNH ₂	5.705	3.330	4.055	3.750	4.170	3.852	3.840 ^b
Man(1)	5.235	4.233	3.930	[3.918	4.118	3.895	3.780]
Man(2)	5.130	4.076	3.888	[3.748] ^a			
Man(3)	5.125	4.029	3.966	[3.713] ^{ac}			
Man(4)	5.047	4.092	3.872	[3.691] ^{ac}			
PEt	4.137	3.285					

Data obtained at 30 °C; [] Assignment tentative

^a From C-H correlation spectrum^b From crosspeak in tqfcosy spectrum^c Assignments may be reversed

Table 5

Summary of intra- and inter-residue n.O.e. data determining sugar sequence and linkage for the *L. adleri* PI-oligosaccharide 4

From	Inter-residue	Intra-residue
GlcNH ₂ H-1	H-2 @ 3.335	Ins-1P H-6 @ 3.855
		Ins-1P H-1 @ 4.054
GlcNH ₂ H-1	H-2 @ 3.331	Ins-2P H-6 @ 3.831
Man(1) H-1	H-2 @ 4.222 H-3 @ 4.045	GlcN H-4 @ 3.749
Man(2) H-1	H-2 @ 4.080	Man(1) H-2 @ 4.224
		Man(1) H-3 @ 3.910
Man(3) H-1	H-2 @ 4.029	Man(1) H-5 @ 4.118
		Man(1) H-6 @ 3.780
Man(4) H-1	H-2 @ 4.086	Man(3) H-2 @ 4.023
		Man(3) H-3 @ 3.924

Annexe 3 : HPAE Chromatography

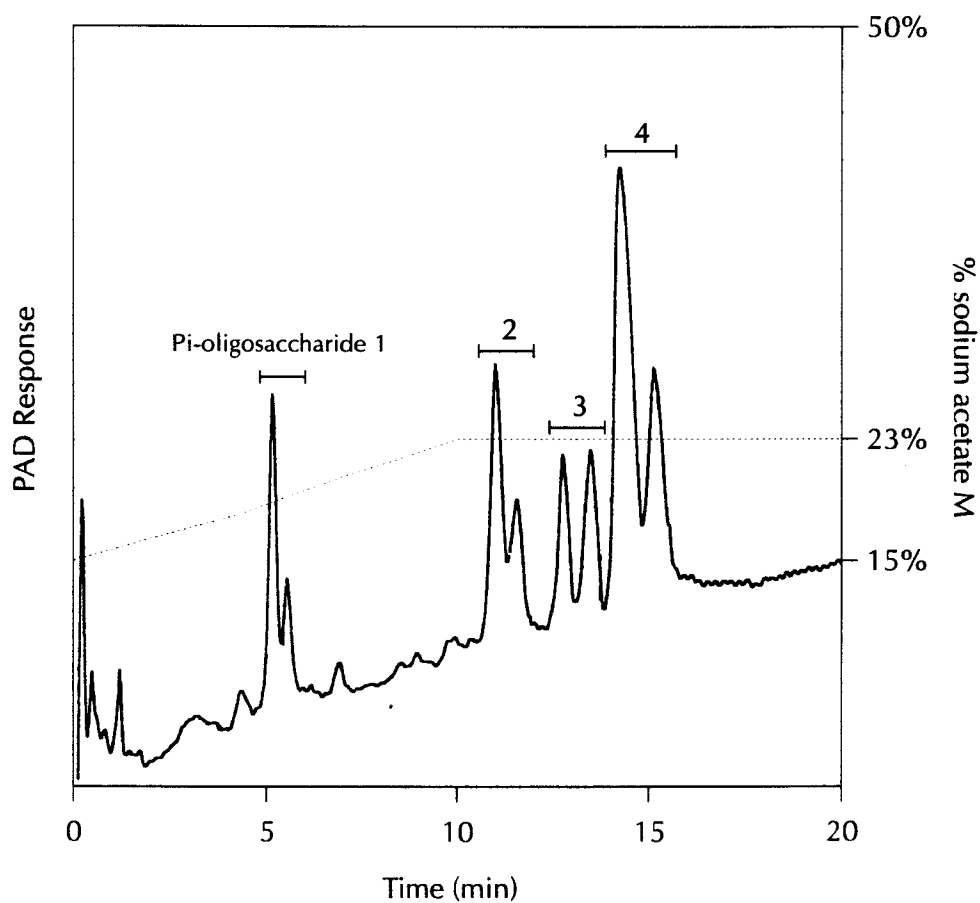


Figure 6: HPAE chromatography of PI-oligosaccharides obtained from *L. adleri* GIPL by alkaline hydrolysis

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Cette étude établit les structures des quatre principaux PI-oligosaccharides obtenus à partir des GIPL des promastigotes de *Leishmania adleri*. Ces PI-oligosaccharides ont été fractionnés par chromatographie d'échange d'anions à haut pH et analysés par spectrométrie de masse en mode FAB, spectroscopie RMN une et deux dimensions et méthylation. L'association de ces différentes techniques est très efficace puisqu'il nous a été possible de déterminer les structures complètes de ces PI-oligosaccharides avec de faibles quantités (respectivement 160, 240, 70, et 510 µg pour les PI-oligosaccharides 1, 2, 3, et 4).

La chromatographie d'échange d'anions à haut pH est une technique très puissante. Ainsi des PI-oligosaccharides ne se différenciant que par la position du phosphate sur l'hydroxyl 1 ou 2 de l'inositol peuvent être séparés (Annexe 6, p. 138). L'inconvénient majeur de cette technique réside dans la nature des éluants. Même après plusieurs étapes de déssalage, les fractions obtenues présentent un pic d'acétate résiduel en RMN (utilisé comme référence). Toutefois, ces fractions étant homogènes, elles permettent l'obtention de spectres RMN d'une excellente qualité avec des quantités inférieures à 0,5 mg (Annexe 1, p. 128 à 137).

La spectrométrie de masse en mode d'ionisation FAB des oligosaccharides natifs et perméthylés fournit les mêmes renseignements. Cependant la sensibilité de la méthode est considérablement augmentée après méthylation des oligosaccharides. Cette augmentation de la sensibilité provient de la glucosamine qui offre un site de protonation sous forme di-N-méthylée. Curieusement la fragmentation de ces oligosaccharides perméthylés s'effectue préférentiellement par un mécanisme de type X (résultats non présentés). Cette préférence n'est pas observée pour les produits natifs.

Toutefois, l'intensité des ions fragments obtenus par ionisation FAB est souvent faible. De manière à augmenter la fragmentation, les ions moléculaires $[M+H^+]$ des PI-oligosaccharides natifs ont été collisionnés avec des atomes neutres d'hélium. Lors de ces expériences de collision, le clivage

principal s'effectue entre la glucosamine et l'inositol selon la voie B défini par Domon et Costello (1988) (figures 1 et 2, p.120 et 121). Par contre, ce clivage est quasiment inexistant lors d'expériences similaires réalisées sur les PI-oligosaccharides de *Leptomonas samueli* (Previato *et al.*, 1992) ou d'*Endotrypanum schaudinii* (Previato *et al.*, communication personnelle) dans lesquels un résidu d'aminoéthylphosphonate ou d'éthanolamine phosphate substitue la glucosamine. Ainsi la présence de l'ion fragment B_n (à m/z = M-259) correspondant au clivage entre la glucosamine et l'inositol semble indiquer l'absence de substituant phosphaté (aminoéthylphosphonate ou éthanolamine phosphate) sur la glucosamine. A l'inverse, l'absence de cet ion est probablement caractéristique de la substitution de la glucosamine par des résidus phosphatés.

Les structures élucidées sont résumées dans la figure 3 (p.123). Les PI-oligosaccharides contiennent de l' α -Man_p, de l' α -Gal_p et du β -Gal_t, comme l'ensemble des GIPL identifiés chez les leishmanies pathogènes pour l'Homme (McConville *et al.*, 1990b; 1993; McConville et Blackwell, 1991; McConville et Homans, 1992). Par ailleurs, trois des quatre PI-oligosaccharides étudiés possèdent des structures identiques à celles des leishmanies de mammifères. Ainsi l'oligosaccharide 1 est identique au GIPL nommé iM4 extrait des promastigotes de *Leishmania mexicana* (Figure 16, p. 56) et *Leishmania donovani* (McConville *et al.*, 1990b; McConville et Blackwell, 1991). De même, les PI-oligosaccharides 2 et 3 ont été relatés chez *Leishmania major* (Figure 15, p. 54) et en quantité plus faible chez *Leishmania mexicana* (McConville *et al.*, 1990b; 1993). Par contre, la structure du PI-oligosaccharide majoritaire (PI-oligosaccharide 4) n'a encore jamais été décrite. *Leishmania mexicana* possède toutefois un GIPL de structure très similaire (Figure 16, p. 56) dans laquelle un résidu d'éthanolamine phosphate substitue non pas un mannose mais la glucosamine (McConville *et al.*, 1993). D'autre part, des résidus d'éthanolamine phosphate sont présents chez *Endotrypanum schaudinii* (Previato *et al.*, 1993), parasite proche des leishmanies de mammifères (Shaw, 1992). Ils ne sont cependant pas spécifiques des GIPL des

trypanosomatides, puisqu'ils sont également rencontrés dans divers GPI ancrant les protéines tel que l'ancrage de l'acétyl-choline esterase humaine. Cette molécule possède plusieurs résidus d'éthanolamine phosphate dont l'un substitue le mannose 2 du noyau des GPI ancrant les protéines (Figure 10, p. 23) (Deeg *et al.*, 1992).

Il faut cependant remarquer que l'étape de déphosphorylation par l'acide hydrofluorique aqueux utilisée dans la plupart des études antérieures prévenait la mise en évidence des substituants d'éthanolamine phosphate (ou d'aminoéthylphosphonate). Ainsi la présence de l'oligosaccharide 4 ne peut être exclu chez d'autres leishmanies. Dans cette étude des PI-oligosaccharides de *L. adleri*, le résidu d'éthanolamine phosphate est localisé par spectrométrie de masse. Les ions fragments Y₃ et Y₄ (Figure 2, p. 121) apportent une preuve irréfutable de la position de ce substituant.

L'homologie structurale existant entre les GIPL de *Leishmania adleri* et ceux des leishmanies pathogènes pour l'Homme s'étend à la partie lipidique de ces molécules. Les GIPL de *Leishmania adleri* possèdent des alkylacylglycérols comportant principalement des chaînes alkylées ayant 24 atomes de carbones et de l'acide stéarique. Les mêmes alkylacylglycérols sont présents chez *Leishmania tarentolae*, autre parasite de lézards (Routier *et al.*, 1993). Ce parasite synthétise-t-il des GIPL identiques à ceux des leishmanies de mammifères et de *L. adleri*? C'est ce que laissent supposer des résultats préliminaires indiquant, chez *L. tarentolae*, l'existence de quatre principaux PI-oligosaccharides constitués de mannose ou de mannose et de galactose.

L'ensemble de ces résultats confirme l'existence d'un lien étroit entre les leishmanies de reptiles et de mammifères et sont favorables au maintien de ces parasites de reptile dans le genre *Leishmania*.

De plus, cette étude met en évidence l'existence de PI-oligosaccharides communs aux parasites *Leishmania adleri* (PI-oligosaccharide 1) et *Leishmania donovani* (iM4). Or ces deux parasites présentent une forte réaction immunologique croisée (Southgate et Manson Bahr, 1967). De plus,

L. Adleri présente également des relations antigéniques avec *L. tarentolae*. Le caractère antigénique des GIPL de type hybride et leur implication dans la réaction immunologique croisée avec *T. cruzi* restent cependant à démontrer.

Actuellement, le développement d'un vaccin bloquant le cycle de transmission du parasite et utilisant le LPG comme antigène est à l'étude. Les LPG sont, en effet, des molécules très importantes pour la fixation des leishmanies à l'intestin de l'insecte (Pimenta *et al.*, 1992) et en conséquence à la production de formes métacycliques infectieuses. Ainsi, des anticorps contre ces molécules entreraient en compétition avec le parasite pour la fixation à l'épithélium de l'intestin et bloqueraient le cycle de transmission du parasite (Modabber, 1993).

CONCLUSION

CONCLUSION GENERALE

Bien qu'étant les principaux glycoconjugués de surface des trypanosomatides, les GIPL restent peu connus. La caractérisation structurale de ces molécules est indispensable à l'étude des mécanismes de biosynthèse, eux-mêmes nécessaires au développement de drogues antiparasitaires. De plus, la comparaison des structures des GIPL chez un grand nombre de protozoaires monoxènes et polyxènes peut éclairer les fonctions de ces glycoconjugués.

Comme les leishmanies de mammifères et *T. cruzi*, les parasites de la famille des Trypanosomatidae non pathogènes pour l'Homme (parasite d'arthropodes, de plantes, de lézards et de mammifères) synthétisent des GIPL. Ces molécules possèdent le motif $\text{Man}(\alpha 1-4)\text{GlcNH}_2$ lié soit à un inositol-phosphosphingolipide, soit à un inositol-phosphoglycérolipide et appartiennent en conséquence à la famille des GPI.

La présence d'aminoéthylphosphonate ou de phosphoéthanolamine dans quelques GIPL, nous a conduit à développer de nouvelles méthodologies pour l'analyse structurale de ces molécules, permettant la conservation et la localisation des résidus phosphatés. Les PI-oligosaccharides obtenus par hydrolyse alcaline des GIPL sont séparés par chromatographie d'échange d'anions à haut pH, puis analysés par méthylation, spectrométrie de masse et spectroscopie RMN. Cette stratégie d'analyse a permis l'élucidation des structures des principaux PI-oligosaccharides provenant des GIPL de *Herpetomonas samuelpessoai*, parasite monoxène d'insecte et de *Leishmania adleri*, parasite polyxène de lézard.

Toutes les molécules étudiées possèdent la même architecture que les GIPL décrits dans la littérature et peuvent être classés en GIPL de type hybride ou de type 2. Elles sont de ce fait similaires aux glycolipides présents chez les parasites du genre *Leishmania*. Cette homologie est particulièrement importante dans le cas de *L. adleri*, puisque trois des quatre PI-oligosaccharides étudiés sont identiques à ceux décrits chez *L.*

major et *L. mexicana*. *L. adleri* synthétise également un GIPL de type hybride dont l'un des mannoses est substitué par un résidu de phosphoéthanolamine. Ce dernier glycolipide est quasiment identique à un GIPL rencontré chez *L. mexicana*. De plus, certaines études antérieures ayant négligé la recherche de substituants phosphatés, l'existence de ce GIPL chez les leishmanies de mammifères ne peut être écartée. Enfin, les GIPL extraits des leishmanies de lézards comportent des alkylacylglycérols renforçant la ressemblance avec ceux des leishmanies de mammifères.

Les GIPL de *Herpetomonas samuelpessoai* sont les premières molécules de type hybride identifiées chez des parasites monoxènes. La présence d'aminoéthylphosphonate et de céramide dans ces molécules permet de les comparer au LPPG de *T. cruzi*. Cependant, les GPS de *H. samuelpessoai* possède une homologie plus étroite avec ceux de *Leptomonas samueli*, parasite colonisant le même insecte. Il faut en particulier remarquer dans les glycolipides de ces deux parasites monoxènes la présence d'aminoéthylphosphonate, d' α Glc, d' α GlcA et du motif oligosaccharidique Xyl(β 1-4)[Rha(α 1-3)]Man(α 1-2)Man α 1-.

L'ensemble de ces résultats nous a amené à plusieurs conclusions et hypothèses concernant l'évolution des parasites de la famille des Trypanosomatidae, leur taxonomie et les fonctions des GIPL.

Ces études indiquent tout d'abord que l'expression des GIPL est commune chez les parasites de la famille des Trypanosomatidae. Les relations structurales existants entre les parties glycanniques des GIPL de *H. samuelpessoai*, *Leptomonas samueli*, *T. cruzi* et les parasites du genre *Leishmania* suggèrent que ces glycolipides aient été hérités d'un ancêtre monoxène commun.

D'autre part, l'identité des GIPL extraits des leishmanies de lézards et de mammifères est en faveur du maintien de ces premiers dans le genre *Leishmania*. Les structures des GIPL constituent certes un seul caractère phénotypique parmi de nombreux autres. Toutefois, l'abondance de ces glycolipides chez les trypanosomatides en font un critère de choix.

Enfin, l'expression de GIPL par les parasites monoxènes *H. samuelpessoai* et *L. samueli* suggère que la fonction première de ces molécules soit en relation avec la colonisation et la survie du parasite chez l'insecte. Cette hypothèse est confortée par le fait que deux parasites colonisant le même hôte invertébré synthétisent des GIPL semblables. Ces glycoconjugués pourraient être impliqués dans des interactions lectiniques avec l'épithélium de l'intestin de l'insecte, comme le sont les LPG de *Leishmania major*. La confirmation d'un tel rôle pour les GIPL en ferait des molécules de choix pour la lutte contre les maladies parasitaires, en permettant par exemple le développement d'un vaccin bloquant le cycle de transmission du parasite.

BIBLIOGRAPHIE

- Ames, B. N. (1966) Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases. *Methods Enzymol.* **8**, 115-118.
- Anderson, R. G. W., Kamen, B. A., Rolhberg, K. G. et Lacey, S. W. (1992). Potocytose : Sequestration and transport of small molecules by calveolae. *Science* **255**, 410-411.
- Bahr, V., Stierhof, Y. D., Ilg, T., Demar, M., Quinten, M. et Overath, P. (1993) Expression of lipophosphoglycan, high-molecular weight phosphoglycan and glycoprotein 63 in promastigotes and amastigotes of *Leishmania mexicana*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **58**, 107-121.
- Bangs, J. D. , Doering, T. L., Englund, P. T. et Hart, G. W. (1988). Biosynthesis of a variant surface glycoprotein of *Trypanosoma brucei*. *J. Biol. Chem.* **263**,17697-17705.
- Baker, J. R. (1963). Speculation on the evolution of the family Trypanosomatidae Doflein. *Exp. Parasitol.* **13**, 219-233.
- Bartlett, G. R. (1959) Phosphorus assay in column chromatography. *J. Biol. Chem.* **234**, 466-468.
- Bhattacharya, A., Prasad, R. et Sacks, D. L. (1992) Identification and partial characterization of a lipophosphoglycan from a pathogenic strain of *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **56**, 161-168.
- Bjorndal, H., Lindberg, B. et Svensson, S. (1967) Mass spectrometry of partially methylated alditol acetates. *Carbohydr. Res.* **5**, 433-440.
- Bütikofer, P., Kuypers, F. A., Shaeckleton, C., Brodbeck, U. et Stieger, S. (1990). Molecular species analysis of the glycosylphosphatidylinositol anchor of *Torpedo marmorata* acetylcholinesterase. *J. Biol. Chem.* **265**, 18983-18987.
- Buxbaum, L. U. (1994). Myristate exchange in glycolipid A and VSG of african trypanosomes. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* **27**, 115-119.

- Camargo, E. P., Mattei, D. M., Barbieri, C. L. et Morel, C. M. (1982) Electrophoretic analysis of endonuclease generated fragments of k-DNA, of esterase isoenzymes and of a surface proteins as aids for species identification of insect trypanosomatids. *J. Protozool.* **29**, 251-258.
- Carver, M. A. et Turco, S. J. (1992). Biosynthesis of lipophosphoglycan from *Leishmania donovani* : Characterization of mannosylphosphate transfer *in vitro*. *Arch. Biochem. Biophys.* **295**, 309-317.
- Chan, J., Fujiwara, T., Brennan, P., McNeil, M., Turco, S. J., Sibille, J. C., Snapper, M., Aisen, P. et Bloom, B. R. (1989) Microbial glycolipids: possible virulence factors that scavenge oxygen radicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 2453-2457.
- Conzelmann, A., Puoti, A., Lester, R. L. et Desponds, C. (1992). Two different types of lipid moities are present in glycoposphoinositol-anchored membrane proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **11**, 457-466.
- Conzelmann, A., Riezman, H., Desponds, C. et Bron, C. (1988). A major 125-kd membrane glycoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* is attached to the lipid bilayer through an inositol-containing phospholipid. *EMBO J.* **7**, 2233-2240.
- Da Silva, R. P., Hall, B. F., Joiner, K.A. et Sacks, D. L. (1989) CR1, The C3b receptor, mediates binding of infective *Leishmania major* metacyclic promastigotes to human macrophages. *J. Immunol.* **143**, 617-622.
- Davies, C. R., Cooper, R. M., Peacock, C., Lane, R. P. et Blackwell, J. M. (1990) Expression of LPG and GP63 by different developmental stages of *Leishmania major* in the sandfly *Phlebotomus papatasi*. *Parasitology* **101**, 337-343.
- Dearborn, D. G., Smith, S et Korn, E. D. (1976) Lipophosphoglycan of the plasma membrane of *Acanthamoeba castellanii*. *J. Biol. Chem.* **251**, 2976-2982.
- Deeg, M. A., Humphrey, D. R., Yang, S. H., Ferguson, T. R., Reinhold, V. N. et Rosenberry T. L. (1992). Glycan components in the glycoinositol phospholipid

- anchor of human erythrocyte acetylcholinesterase. *J. Biol. Chem.* **267**, 18573-18580.
- De Majumdar, T. (1992). *Leishmania donovani* : Purification and partial characterization of a glycoposphosphingolipid antigen expressed on promastigote surface. *Exp. Parasitol.* **74**, 251-260.
 - Descoteaux, R., Matlashewski, G. et Turco, S. J. (1992) Inhibition of macrophage protein kinase C-mediated protein phosphorylation by *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. *J. Immunol.* **149**, 3008-3015.
 - Descoteaux, A. et Turco, S. J. (1993) The lipophosphoglycan of *Leishmania* and macrophage protein kinase C. *Parasitol. Today* **9**, 468-471.
 - Doering, T. L., Masterson, W. J., Englund, P. T. et Hart, G. W. (1989). Biosynthesis of the glycosyl phosphatidylinositol membrane anchor of the trypanosome variant surface glycoprotein. *J. Biol. Chem.* **264**, 11168-11173.
 - Domon, B. et Costello, C. E. (1988). A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB MS/MS of glycoconjugates. *Glycoconj. J.* **5**, 397-409.
 - Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. et Smith, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analyt. Chem.* **28**, 350-356.
 - Englund, P. T. (1993). The structure and biosynthesis of glycosyl-phosphatidylinositol protein anchors. *Annu. Rev. Biochem.* **62**, 121-138.
 - Elhay, M. J., Kelleher, M., Bacic, A., Mc Conville, M. J., Tolson, D. L., Pearson T. W. et Handman, E. (1990). Lipophosphoglycan expression and virulence in ricin-resistant variants of *Leishmania major*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **40**, 255-268.
 - Elhay, M. J., Mc Conville, M. J., Curtis, J. M., Bacic, A. et Handman, E. (1993). Identification of truncated forms of lipophosphoglycan in mutant clones

of *Leishmania major* that are deficient in mature lipophosphoglycan. *Parasitol. Res.* **79**, 435-438.

- Fankhauser, C., Homans, S. W., Thomas-Oates, J. E., McConville, M. J., Desponds, C., Conzelmann, A. et Ferguson, M. A. J. (1993). Structures of glycosylphosphatidylinositol membrane anchors from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **268**, 26365-26374.
- Ferguson, M. A. J. (1992a). Site of palmitoylation of a phospholipase C-resistant glycosylphosphatidylinositol membrane anchor. *Biochem. J.* **284**, 297-300.
- Ferguson, M. A. J. (1992b). Glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchors : the tale for the tail. *Biochem. Soc. Trans.* **20**, 243-256.
- Ferguson, M. A. J. (1994). What can GPI do for you? *Parasitol. Today* **10**, 48-52.
- Ferguson, M. A. J. , Duszenko, M., Lamont, G. S., Overath, P. et Cross, G, A. M. (1986). Biosynthesis of *Trypanosoma brucei* variant surface glycoproteins *J. Biol. Chem.* **261**, 356-362.
- Ferguson, M. A. J., Homans S. W., Dwek, R. A. et Rademacher, T. W. (1988). Glycosyl-phosphatidylinositol moiety that anchors *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein to the membrane. *Science* **239**, 753-759.
- Ferguson, M. A. J., Materson, W. J., Homans S. W. et McConville, M. J. (1991). Evolutionary aspects of GPI metabolism in kinetoplastid parasites. *Cell. Biol. Int. Rep.* **15**, 991-1005.
- Ferguson, M. A. J., Murray, P., Rutherford, H. et McConville, M. J. (1993). A simple characterization of procyclic acidic repetitive protein and demonstration of a sialylated glycosylphosphatidylinositol membrane anchor. *Biochem. J.* **291**, 51-55.
- Ferguson, M. A. J et Williams, A. F. (1988) *Annu. Rev. Biochem.* **57**, 285-320

- Field, M. C., Menon, A. K. et Cross, G. A. M. (1991). Developmental variation of glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchors in *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.* **266**, 8392-8400.
- Field, M. C., Menon, A. K. et Cross, G. A. M. (1992). Developmental variation of glycosylphosphatidylinositol membrane anchors in *Trypanosoma brucei*. *J. Biol. Chem.* **267**, 5324-5329.
- Fournet, B., Dhalluin, J. M., Strecker, G. et Montreuil, J. (1980) Gas-liquid chromatography and mass spectrometry of oligosaccharides obtained by partial acetolysis of glycans and glycoproteins. *Anal. Biochem.* **108**, 35-56.
- Galvao, A. B., Oliveira, R. L., Carvahlo, A. L. M. et Veiga, G. P. (1970) *Leptomonas pessoai* sp. n. (Trypanosomatidae, Kinetoplastida, Protozoa). *Rev. Goiana Med.* **16**, 229-236.
- Gaver, R. C. et Sweeley, C. C. (1966) Chemistry and metabolism of sphingolipids. 3-oxo derivatives of N-acetylsphingosine and N-acetyldihydrosphingosine. *J. Am. Chem. Soc.* **88**, 3643-3647.
- Gerwig, G. J., Kamerling, J. P. et Vliegenhart, J. F. G. (1978) Determination of the D and L configuration of neutral monosaccharides by high resolution capillary GLC. *Carbohydr. Res.* **62**, 349-357.
- Greis, K. D., Turco, S. J., Thomas, J. R., McConville, M. J., Homans, S. W. et Ferguson, M. A. J. (1992) Purification and characterization of an extracellular phosphoglycan from *Leishmania donovani*. *J. Biol. Chem.* **267**, 5876-5881.
- Güther, M. L. S., Cardoso de Almeida, M. L., Yoshida, N. et Ferguson, M. A. J. (1992). Structural studies on the Glycosylphosphatidylinositol membrane anchor of *Trypanosoma cruzi* 1G7 antigen. *J. Biol. Chem.* **267**, 6820-6828.
- Güther, M. L. S., Materson, W. J. et Ferguson, M. A. J. (1994). The role of glycolipid C in the GPI biosynthetic pathway in *Trypanosoma brucei* bloodstream forms. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* **27**, 121-126.

- Handman, E. et Goding, J. W. (1985) The *Leishmania* receptor for macrophages is a lipid-containing glycoconjugate *EMBO J.* **4**, 329-336.
- Handman, E., Schnur, L. F., Spithill, T. W. et Mitchell, G. F. (1986) Passive transfer of *Leishmania* Lipopolysaccharide confers parasite survival in macrophages. *J. Immunol.* **137**, 3608-3613.
- Haynes, P. A., Gooley, A. A., Ferguson, M. A. J., Redmond, J. W. et Williams, K. L. (1993). Post traslational modifications of the *Dictyostelium discoideum* glycoprotein PsA. *Eur. J. Biochem.* **216**, 729-737.
- Hoffman, R. A., Leeflang, B. R., de Barse, M. M. J., Kamerling, J. P. et Vliegenthart, J. F. G. (1991) Characterization by H¹-n.m.r. spectroscopy of oligosaccharides, derived from arabinoxylans of white endosperm of wheat, that contain the elements $\rightarrow 4)[\alpha\text{-L-Araf-(1}\rightarrow 3)]\text{-}\beta\text{-D-Xylp-(1}\rightarrow$ or $\rightarrow 4)[\alpha\text{-L-Araf-(1}\rightarrow 2)][\alpha\text{-L-Araf-(1}\rightarrow 3)]\text{-}\beta\text{-D-Xylp-(1}\rightarrow$. *Carbohydr. Res.* **221**, 63-81.
- Homans, S. W., Edge, C. J., Ferguson, M. A. J., Dwek, R. A. et Rademacher, T. W. (1989). Solution structure of the glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchor glycan of *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein. *Biochemistry* **28**, 2881-2887.
- Homans, S. W., Ferguson, M. A. J., Dwek, R. A., Rademacher, T. W., Anand, R. et Williams, A. F. (1988). Complete structure of the glycosyl phosphatidylinositol membrane anchor of rat brain Thy-1 glycoprotein. *Nature* **333**, 269-272.
- Homans, S. W., Melhert, A. et Turco, S. J. (1992) Solution structure of the lipophosphoglycan of *Leishmania donovani*. *Biochemistry* **31**, 654-661.
- Huang, C. et Turco, S. J. (1993). Defective galactofuranose addition in lipophosphoglycan biosynthesis in a mutant of *Leishmania donovani*. *J. Biol. Chem.* **268**, 24060-24066.

- Ilg, T., Etges, R., Overath, P., McConville, M. J., Thomas-Oates, J. E., Thomas, J., Homans, S. W. et Ferguson, M. A. J. (1992) Structure of *Leishmania mexicana* lipophosphoglycan. *J. Biol. Chem.* **267**, 6834-6840.
- Jansson, P. E., Kenne, L. et Widmalm, G. (1989) Computer assisted analysis of polysaccharides with an extended version of CASPER using ¹H and ¹³C-NMR data. *Carbohydr. Res.* **188**, 169-192.
- Karp, C. L., Turco, S. J. et Sacks, D. L. (1991) Lipophosphoglycan masks recognition of the *Leishmania donovani* promastigote surface by human kala-azar serum. *J. Immunol.* **147**, 680-684.
- Kelleher, M., Bacic, A. et Handman, E. (1992) Identification of a macrophage-binding determinant on lipophosphoglycan from *Leishmania major* promastigotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**, 6-10.
- Kessler, H., Griesinger, C., Kerssebaum, R., Wagner, K. et Ernst, R. R. (1987). Separation of cross-relaxation and J-cross-peaks in 2D rotating frame NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **109**, 607-609.
- King, D. L., Chang, Y. D. et Turco, S. J. (1987) Cell surface lipophosphoglycan of *Leishmania donovani*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **24**, 47-53.
- Laffite, C., Nguyen Phuoc Du, A-M., Winternitz, F., Wylde, R. et Patviel-Sosa, F. (1978) Synthèse et étude R.M.N. de disaccharides et trisaccharides dans la série du L-rhamnose. *Carbohydr. Res.* **67**, 91-103
- Lauter, C. J. et Trams, E. G. (1962) A spectrophotometric determination of sphingosine. *J. Lipid Res.* **3**, 136-138.
- Lederkremer, R. M., Alves, M. J. M., Fonseca, G. C. et Colli, W. (1976) A lipopeptidophosphoglycan from *Trypanosoma cruzi* - Isolation, purification and carbohydrate composition. *Biochim. Biophys. Acta.* **444**, 85-96.

- Lederkremer, R. M., Lima, C., Ramirez, M. I. et Casal, O. L. (1990). Structural features of the lipopeptidophosphoglycan from *Trypanosoma cruzi* common with the glyco-phosphatidylinositol-anchors. *Eur. J. Biochem.* **192**, 337-345.
- Lederkremer, R. M., Lima, C., Ramirez, M. I., Ferguson, M. A. J., Homans, S. W. et Thomas-Oates, J. E. (1991) Complete structure of the glycan of lipopeptidophosphoglycan from *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *J. Biol. Chem.* **266**, 23670-23675.
- Lederkremer, R. M., Lima, C., Ramirez, M. I., Gonçalvez, M. F. et Colli, W. (1993) Hexadecylpalmitoylglycerol or ceramide is linked to similar glycoposphoinositol anchor-like structures in *Trypanosoma cruzi*. *Eur. J. Biochem.* **218**, 929-936.
- Lederkremer, R. M., Tanaka, C. T., Alves, M. J. M. et Colli, W. (1977) Lipopeptidophosphoglycan from *Trypanosoma cruzi*. *Eur. J. Biochem.* **74**, 253-261.
- Lee, H.-C., Shoda, R., Krall, J. A., Foster, J. D., Selhub, J. et Rosenberry, T. L. (1992). Folate binding protein from kidney brush border membranes contains components characteristic of a glycoinositol phospholipid anchor. *Biochemistry* **31**, 3236-3243.
- Lopes, J. D., Caulada, Z., Barbieri, C. L. et Camargo, E. P. (1981) Cross reactivity between *Trypanosoma cruzi* and insect trypanosomatids as a basis for the diagnosis of the Chagas disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **30**, 1183-1188.
- Luhrs, C. A. et Slomiany, B. L. (1989). A human membrane-associated folate binding protein is anchored by a glycosyl-phosphatidylinositol tail. *J. Biol. Chem.* **264**, 21446-21449.
- Maltese, A. W. (1990). Posttranslational modification of protein of proteins by isoprenoids in mammalian cells. *FASEB. J.* **4**, 3319-3328.

- Masterson, W. J., Raper, J., Doering, T. L., Hart, G. W. et Englund, P. T. (1990). Fatty acid remodeling : a novel reaction sequence in the biosynthesis of trypanosome glycosyl phosphatidylinositol membrane anchors. *Cell* **62**, 73-80.
- Mayor, S., Menon, A. K. et Cross, G. A. M. (1990a). Glycolipid precursors for the membrane anchor of *Trypanosoma brucei* variant surface glycoproteins : Part II. *J. Biol. Chem.* **265**, 6174-6181.
- Mayor, S., Menon, A. K. , Cross, G. A. M., Ferguson, M. A, J., Dwek, R. A. et Rademacher, T. W. (1990b). Glycolipid precursors for the membrane anchor of *Trypanosoma brucei* variant surface glycoproteins : Part I. *J. Biol. Chem.* **265**, 6164-6173.
- Mayor, S., Menon, A. K. et Cross, G. A. M. (1991). Transfer of glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchors to polypeptide acceptors in a cell-free system. *J. Cell. Biol.* **114**, 61-71.
- Mayor S., Menon, A. K. et Cross, G. A. M. (1992). Galactose-containing glycosylphosphatidylinositols in *Trypanosoma brucei*. *J. Biol. Chem.* **267**, 754-761.
- McConville, M. J. (1991) Glycosylated-phosphatidylinositols as virulence factors in *Leishmania*. *Cell Biol. Int. Rep.* **15**, 779-798.
- McConville, M. J. et Bacic, A. (1989) A family of glycoinositol phospholipids from *Leishmania major*. *J. Biol. Chem.* **264**, 757-766.
- McConville, M. J. et Bacic, A. (1990) The glycoinositolphospholipid profiles of two *Leishmania major* strains that differ in lipophosphoglycan expression. *Mol. Biochem. Parasitol.* **38**, 57-68.
- McConville, M. J., Bacic, A., Mitchell, G. F. et Handman, E. (1987) Lipophosphoglycan of *Leishmania major* that vaccinates against cutaneous leishmaniasis contains an alkylglycerophosphoinositol lipid anchor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**, 8941-8945.

- McConville, M. J. et Blackwell, J. M. (1991). Developmental changes in the glycosylated phosphatidylinositols of *Leishmania donovani*. *J. Biol. Chem.* **266**, 15170-15179.
- McConville, M. J., Collidge, T., Ferguson, M. A. J. et Schneider, P. (1993). The glycoinositol phospholipids of *Leishmania mexicana* promastigotes. *J. Biol. Chem.* **268**, 15595-15604.
- McConville, M. J. et Ferguson, M. A. J. (1993) The structure, biosynthesis and function of glycosylated phosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher eukaryotes. *Biochem. J.* **294**, 305-324.
- McConville, M. J. et Homans, S. W. (1992) Identification of the defect in lipophosphoglycan biosynthesis in a non-pathogenic strain of *Leishmania major*. *J. Biol. Chem.* **267**, 5855-5861.
- McConville, M. J., Homans, S. W., Thomas-Oates, J. E., Dell, A. et Bacic, A. (1990a) Structures of the glycoinositolphospholipids from *Leishmania major*: a family of novel galactofuranose-containing glycolipids. *J. Biol. Chem.* **265**, 7385-7394.
- Mc Conville, M. J., Schneider, P., Proudfoot, L., Materson, C. et Ferguson, M. A. J. (1994). The developmental regulation and biosynthesis of GPI-related structures in *Leishmania* parasites. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* **27**, 139-144.
- McConville, M. J., Thomas-Oates, J. E., Ferguson, M. A. J. et Homans, S. W. (1990b) Structure of the lipophosphoglycan from *Leishmania major*. *J. Biol. Chem.* **265**, 19611-19623.
- McConville, M. J., Turco, S. J., Ferguson, M. A. J. et Sacks, D. L. (1992) Developmental modification of lipophosphoglycan during the differentiation of *Leishmania major* promastigotes to an infectious stage. *EMBO J.* **11**, 3593-3600.

- McNeely, T. B., Rosen, G., Londner, M. V. et Turco, S. J. (1989) Inhibitory effects on protein kinase C activity by lipophosphoglycan fragments and glycoposphatidylinositol antigens of the protozoan parasite *Leishmania*. *Biochem. J.* **259**, 601-604.
- McNeely, T. B. et Turco, S. J. (1990) Requirement of Lipophosphoglycan for intracellular survival of *Leishmania donovani* within human monocytes. *J. Immunol.* **144**, 2745-2750.
- Mehlert, A., Varon, L., Silman, I., Homans, S. W. et Ferguson, M. A. J. (1993). Structure of the glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchor of acetylcholinesterase from the electric organ of the electric fish, *Torpedo californica*. *Biochem. J.* **296**, 473-479.
- Mendonça-Previato, L., Gorin, P. A. J., Braga, A. F., Scharfstein, J. et Previato, J. O. (1983) Chemical structure and antigenic aspects of complexes obtained from epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Biochemistry* **22**, 4980-4987.
- Mendonça-Previato, L., Gorin, P. A. J. et Previato, J. O. (1979). Investigation on polysaccharide components of cells *Herpetomonas samuelpeσοai* grown on various media. *Biochemistry* **18**, 149-154.
- Menon, A. K. (1994). Structural analysis of glycosylphosphatidylinositol anchors. *Methods in Enzymology*, Academic Press, New York. **230**, 418-442.
- Menon, A. K., Eppinger, M., Mayor, S. et Schwarz, R. T. (1993). Phosphatidylethanolamine is the donor of the terminal phosphoethanolamine group in trypanosome glycosyl-phosphatidylinositols. *EMBO J.* **12**, 1907-1914.
- Menon, A. K., Mayor, S. et Schwarz, R. T. (1990a). Biosynthesis of glycosyl-phosphatidylinositol lipids in *Trypanosoma brucei* : involvement of mannosyl-phosphoryldolichol as the mannose donor. *EMBO J.* **9**, 4249-4258.

- Menon, A. K., Schwarz, R. T., Mayor, S. et Cross, G. R. M. (1990b). Cell-free synthesis of glycosyl-phosphatidylinositol precursors for the glycolipid membrane anchor of *Trypanosoma brucei* variant surface glycoproteins. *J. Biol. Chem.* **265**, 9033-9042.
- Menon, A. K. et Vidugiriene, J. (1994). Topology of GPI biosynthesis in the endoplasmic reticulum. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* **27**, 167-175.
- Modabber, F. (1993). Leishmaniasis dans *Tropical Disease Research Progress 1991-1992*. World Health Organization, Geneva, 77-87.
- Molyneux, D. H. (1984). Evolution of Trypanosomatidae, Considerations of polyphyletic origins of mammalian parasites. *Leishmania, Taxonomie et Phylogénèse, Coll. Int. CNRS/INSERM, Montpellier*, 231-240.
- Molyneux, D. H., Wallbanks, K. R. et Ingram, G. A. (1987). Trypanosomatid vector interfaces - In vitro studies on parasite substrate interactions dans *NATO ASI series, Host - parasite cellular and molecular interactions*. (Chang, K. P. and Snary, D., Eds), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 387-396.
- Moody, S., Handman, E. et Bacic, A. (1991) Structure and antigenicity of the lipophosphoglycan from *Leishmania major* amastigotes. *Glycobiology* **1**, 419-424.
- Moody, S., Handman, E., McConville, M. J. et Bacic, A. (1993). The structure of *Leishmania major* amastigote lipophosphoglycan. *J. Biol. Chem.* **268**, 18457-18466.
- Mosser, D. M., Springer, T. A. et Diamond, M. S. (1992) *Leishmania* promastigotes require opsonic complement to bind to the human leukocyte integrin Mac-1 (CR11b/CD18). *J. Cell. Biol.* **116**, 511-520.
- Odham, G. et Stenhagen, E. (1972). Fatty acids dans *Biochemical applications of mass spectrometry*. (Walter G. R. ed.), John Wiley and Sons, New-York, 211-228.

- Orlandi, P. A., Jr. et Turco, S. J. (1987) Structure of the lipid moiety of the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. *J. Biol. Chem.* **262**, 10384-10391.
- Palatnik, C. B., Previato, J. O., Gorin, P. A. J. et Mendonça-Previato, L. (1987) *Leptomonas samueli* glycoconjugates. Comparison with *Herpetomonas samuelpeessoai*. *Comp. Biochem. Physiol.* **86 B**, 593-599.
- Parente, J. P., Cardon, P., Leroy, Y., Montreuil, J. et Fournet, B. (1985) A convenient method for methylation of glycoprotein glycans in small amounts by using lithium methyl-sulfinyl carbanion. *Carbohydr. Res.* **141**, 41-47.
- Perkins, S. J., Johnson, L. N., Phillips, D. C. et Dwek, R. A. (1977) High-resolution ^1H and ^{13}C -N.M.R. spectra of D-glucopyranose, 2-acetamido - 2-deoxy-D-glucopyranose, and related compounds in aqueous media. *Carbohydr. Res.* **59**, 19-34.
- Piantini, U., Sørensen, O. W. et Ernst, R. R. (1982) Multiple quantum filters for elucidating NMR coupling networks. *J. Am. Chem. Soc.* **104**, 6800-6801.
- Pimenta, P. F., Da Silva, R. P., Sacks, D. L. et Da Silva, P. P. (1989) Cell surface nanoanatomy of *Leishmania major* as revealed by fracture flip; A surface meshwork of 44 nm fusiform filaments identifies infective developmental stage promastigotes. *E. J. cell Biol.* **48**, 180-190.
- Pimenta, P. F., Saraiva, E. M. B. et Sacks, D. L. (1991) The comparative fine structure and surface glycoconjugate expression of three life stages of *Leishmania major*. *Exp. Parasitol.* **72**, 191-204.
- Pimenta, P. F. P., Turco, S. J., McConville, M. J., Lawyer, P. G., Perkins, P. V. et Sacks, D. L. (1992) Stage specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut. *Science* **256**, 1812-1815.
- Pingel, S. et Duszenko, M. (1992). Identification of two distinct galactosyltransferase activities acting on the variant surface glycoprotein of *Trypanosoma brucei*. *Biochem. J.* **283**, 479-485.

- Previato, J. O., Gorin, P. A. J., Mazurek, M., Xavier, M. T., Fournet, B., Wieruszski, J. M. et Mendonca-Previato, L. (1990) Primary structure of the oligosaccharide chain of lipopeptidophosphoglycan of epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol Chem.* **265**, 2518-2526.
- Previato, J. O., Mendonca-Previato, L., Jones, C. et Wait, R. (1993) Structure of the carbohydrate moiety of the glycopospholipid of *Endotrypanum schaudinii*. *Glycoconj. J.* **10**, 340.
- Previato, J. O., Mendonca-Previato, L., Jones, C., Wait, R. et Fournet, B. (1992) Structural characterization of a novel class of glycoposphosphingolipids from the protozoan *Leptomonas samueli*. *J. Biol. Chem.* **267**, 24279-24286.
- Previato, J. O., Wait, R., Jones, C. et Mendonca-Previato, L. (1994) Structural analysis of a novel rhamnose-branched oligosaccharides from the glycoposphosphingolipids of *Leptomonas samueli*. *Glycoconj. J.* **11**, 23-33.
- Puentes, S. M., da Silva, R. P., Sacks, D. L., Hammer, C. H. et Joiner, K. A. (1990) Serum resistance of metacyclic stage *Leishmania major* promastigotes is due to release of C5b-9. *J. Immunol.* **145**, 4311-4316.
- Puentes, S. M., Sacks, D. L., Da Silva, R. P. et Joiner, K. (1988) Complement binding by two developmental stages of *Leishmania major* promastigotes varying in expression of a surface lipophosphoglycan. *J. Exp. Med.* **167**, 887-902.
- Rance, M., Sørensen, O. W., Bodenhausen, G., Wagner, G., Ernst, R. R. et Wiithrick, K. (1983) Improved spectral resolution in COSY ¹H NMR spectra of proteins via double quantum filtering. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **117**, 479-485.
- Raper, J., Doering, T. L., Buxbaum, L. U. et Englund, P. T. (1993). Glycosyl phosphatidylinositols in *Trypanosoma brucei*. *Exp. Parasitol.* **76**, 216-220.

- Roberts, W. L., Myher, J. J., Kuksis, A., Low, M. G. et Rosenberry, T. L. (1988a). Lipid analysis of the glycoinositol phospholipid membrane anchor of human erythrocyte acetylcholinesterase. *J. Biol. Chem.* **263**, 18766-18775.
- Roberts, W. L., Santikarn, S., Reinhold, V. N. et Rosenberry, T. L. (1988b). Structural characterization of the glycoinositol phospholipid membrane anchor of human acetylcholinesterase by fast atom bombardment mass spectrometry. *J. Biol. Chem.* **263**, 18776-18784.
- Roitman, I., Brener, Z., Roitman, C. et Kitajima, E. W. (1976) Demonstration that *Leptomonas pessoai* Galvao, Oliveira, Carvahlo and Veiga, 1970 is a *Herpetomonas*. *J; protozool.* **29**, 251-258.
- Rosen, G., Pahlsson, P., Londner, M. V., Westerman, M. E. et Nilsson, B. (1989) Structural analysis of glycosyl-phosphatidylinositol antigens of *Leishmania major*. *J. Biol. Chem.* **264**, 10457-10463 (correction in **265**, 7708)
- Rothberg, K. G., Heuser, J. E., Donzell, W. C., Ying, Y.-S., Glenney, J. R. et Anderson, R. G. W. (1992). Calveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* **68**, 673-682.
- Rothberg, K. G., Ying, Y.-S., Kamen, B. A. et Anderson, R. G. W. (1990). Cholesterol controls the clustering of the glycopospholipid-anchored membrane receptor for 5-methyltetrahydrofolate. *J. Cell. Biol.* **111**, 2931-2938.
- Routier, F., Mendonça-Previato, L., Previato, J. O., Jones, C. et Wait, R. (1994) Structures of four oligosaccharides derivated from the glycoinositolphospholipids of *Leishmania adleri*. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* **27**, 211-217.
- Routier, F., Previato, J. O., Jones, C., Wait, R. et Mendonça-Previato, L. (1993) Glycosylinositolphospholipides from members of the Trypanosomatidae family: Investigation on the lipid moiety. *Ci. Cult. Braz. J. Assoc. Adv. Sci.* **45**, 66-68.

- Sacks, D. L. (1989) Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes; *Exp. Parasitol.* **69**, 100-103.
- Sacks, D. L. (1992) The structure and function of the surface lipophosphoglycan on different developmental stages of *Leishmania* promastigotes. *Infectious agents and disease* **1**, 200-206.
- Sacks, D. L., Brodin, T. N. et Turco, S. J. (1990) Developmental modification of the lipophosphoglycan from *Leishmania* major promastigotes during metacyclogenesis; *Mol. Bioch. Parasitol.* **42**, 225-234.
- Schlein, Y., Schur, L. F. et Jacobson, R. L. (1990) Released glycoconjugate of indigenous *Leishmania* major enhances survival of a foreign *L. major* in *Phlebotomus papatasi*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **84**, 353-355.
- Schneider, P., Ferguson, M. A. J., McConville, M. J., Mehlert, A., Homans, S. W. et Bordier, C. (1990). Structure of the glycosylphosphatidylinositol membrane anchor of the *Leishmania* major promastigote surface protease. *J. Biol. Chem.* **265**, 16955-16964.
- Schneider, P., Rosat, J-P., Ransijn, A., Ferguson, M. A. J. et McConville, M. J. (1993) Characterization of glycoinositol phospholipids in the amastigote stage of the protozoan parasite *Leishmania* major. *Biochem. J.*, **295**, 555-564.
- Sevliver, D., Pahlsson, P., Rosen, G., Nilsson, B. et Londner, M. V. (1991). Structural analysis of a glycosylphosphatidylinositol glycolipid of *Leishmania* donovani. *Glycoconjugate J.* **8**, 321-329.
- Shaw, J. J. (1992). *Endotrypanum*, a unique intraerythrocytic flagellate of New World tree sloths. An evolutionary link or an evolutionary backwater?. *Ci. cult. J. Braz. Assoc. Adv. Sci.* **44**, 107-116.
- Singer, S. J. et Nicolson G. L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**, 720-731.

- Smith, S. W. et Lester, R. L. (1974) Inositol phosphorylceramide, a novel substance and the chief member of a major group of yeast sphingolipids containing a single inositolphosphate. *J. Biol. Chem.* **249**, 3395-3405.
- Sougthgate, B. A. et Manson Bahr, P. E. C. (1967). Studies in the epidemiology of east african leishmaniasis the significance of the positive leishmanin skin test. *J. Trop. Med. Hyg.* **70**, 29-33.
- Souza, M. C., Reis, A. P., Silva, W. D. et Brener, Z. (1974) Mechanism of acquired immunity induced by *Leptomonas pessoai* against *Trypanosoma cruzi* in mice. *J. Protozool.* **21**, 579-584.
- Stahl, N., Baldwin, M. A., Hecker, R., Pan, K.-M., Burlingame, A. L. et Prusiner, S. B. (1992). Glycosylinositol phospholipid anchors of the scrapie and cellular prion proteins contain sialic acid. *Biochemistry* **31**, 5043-5053.
- Summers, M. F., Marzilli, L. G. and Bax, A. (1986) Complete ¹H and ¹³C assignments of coenzyme B₁₂ through the use of new two- dimensional NMR experiments. *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 4286-4294.
- Talamas-Rohana, P., Wright, S. D., Lennartz, M. R. et Russell, D. G. (1990) Lipophosphoglycan from *Leishmania mexicana* promastigotes binds to members of the CR3, p150,95 and LFA-1 family of leuckocyte integrins. *J. Immunol.* **144**, 4817-4824.
- Thomas, J. R., McConville, M. J., Thomas-Oates, J. E., Homans, S. W., Ferguson, M. A. J., Greis, K. et Turco, S. J. (1992) Refined structure of the lipophosphoglycan of *Leishmania donovani*. *J. Biol. Chem.* **267**, 6829-6833.
- Tolson, D. L., Turco, S. J., Beecroft, R. P et Pearson, T W. (1989) The immunchemical structure and surface arrangement of *Leishmania donovani* lipophosphoglycan determined using monoclonal antibodies. *Mol. Biochem. Parasitol.* **35**, 109-118

- Tomlinson, S., Pontes de Carvalho, L., Vandekerckhove, F. et Nussenzweig, V. (1992). Resialylation of sialidase-treated sheep and human erythrocytes by *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase : restoration of complement resistance of desialylated sheep erythrocytes. *Glycobiology* **2**, 549-551.
- Turco S. J. (1990) The Leishmanial lipophosphoglycan: a multifunctional molecule. *Exp. Parasitol.* **70**, 241-245.
- Turco, S. J. et Descoteaux, R. (1992) The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. *Annu. Rev. Microbiol.* **46**, 65-94.
- Turco, S. J., Hull, S. R., Orlandi, P. A., Jr., Shepherd, S. D., Homans, S. W., Dwek, R. A. et Rademacher, T. W. (1987) Structure of the major carbohydrate fragment of the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. *Biochemistry* **26**, 6233-6238.
- Turco, S. J., Orlandi, P. A., Jr., Homans, S. W., Ferguson, M. A. J., Dwek, R. A. et Rademacher, T. W. (1989) Structure of the phosphosaccharide-inositol core of the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. *J. Biol. Chem.* **264**, 6711-6715.
- Turco, S. J. et Sacks, D. L. (1991) Expression of a stage-specific lipophosphoglycan in *Leishmania major* amastigotes. *Mol. Biochem. Parasitol.* **45**, 91-100.
- Ueda, E., Sevlever, D., Prince, G. M., Rosenberry, T. L., Hirose, S. et Medof, M. E. (1993). A candidate mammalian glycoinositol phospholipid precursor containing three phosphoethanolamines. *J. Biol. Chem.* **268**, 9995-10002.
- Vickerman, K. (1976). The diversity of the Kinetoplastid flagellates dans *Biology of the Kinetoplastida* 1. (Lumsden, W. H. R. and Evans, D. A., Eds), Academic press, London, 1-30.
- Vidugiriene, J. et Menon, A. K. (1993). Early lipid intermediates in glycosylphosphatidylinositol anchor assembly are synthesized in the ER and located in the cytoplasmic leaflet of the ER membrane bilayer. *J. Cell. Biol.* **121**, 987-996.

- Wallace, F. G. (1979). Biology of the Kinetoplastida of arthropods dans *Biology of the Kinetoplastida 2*. (Lumsden, W. H. R. and Evans, D. A., Eds), Academic press, London, 213-235.
- Weinhart, U., Thomas, J. R., Pak, Y., Thompson, G. A. et Ferguson, M. A. J. (1991). Structural characterization of a novel glycosyl-phosphatidylinositol from the protozoan *Tetrahymena mimbres*. *Biochem. J.* **279**, 605-608.
- Wilson, V. C. L. et Southgate, B. A. (1979). Lizard *Leishmania* dans *Biology of the Kinetoplastida 2*. (Lumsden, W. H. R. and Evans, D. A., Eds), Academic press, London, 241-263.
- Ziegelbauer, K., Stahl, B., Kras, M., Stierhof, Y.-D. et Overath, P. (1993). Proteolytic release of cell surface proteins during differentiation of *Trypanosoma brucei*. *Biochemistry* **32**, 3737-3742.
- Zingales, B., Martin, N. F., De Lederkremer, R. M. et Colli, W. (1982). Endogenous and surface labelling of glycoconjugates from the three differentiation stages of *Trypanosoma cruzi*. *FEBS Lett.* **142**, 238-242.

Ces travaux ont fait l'objet des communications et publications suivantes :

F., Routier, J. O., Préviate, C., Jones, R., Wait et L. M., Préviate (1993).

Glycosylinositolphospholipids from members of the Trypanosomatidae family: Investigation on the lipid moiety. *Ciencia e Cultura - Journal of the Brazilian association for the Advancement of Science*, **45**, 66-68.

F., Routier, L. M., Préviate, J. O., Préviate, C., Jones et R., Wait (1994).

Structures of four oligosaccharides derived from the glycoinositolphospholipids of *Leishmania adleri*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. **27**, 211-217.

F., Routier, J. O., Préviate, C., Jones, R., Wait et L. M., Préviate (1994).

Characterization of glycoinositolphosphosphingolipids from *Herpetomonas samuel pessoai* soumis à publication dans *Molecular and Biochemical Parasitology*

F., Routier, J. O., Préviate, C., Jones, R., Wait et L. M., Préviate (1993).

Glycoinositolphospholipids from members of the Trypanosomatidae family: Investigation of the lipid moiety.

- 5th Joint Meeting of the Nederlandse Vereniging voor de Bestudering van Glycoconjugaten and die Studiengruppe Glycokonjugate der GBCh, 15 et 16 Octobre 1993 - Münster (Allemagne)

F., Routier, L. M., Préviate, J. O., Préviate, C., Jones et R., Wait (1994).

Structures of four oligosaccharides derived from the glycoinositolphospholipids of *Leishmania adleri*.

- Meeting « GPI membrane anchors structures and functions » 26 au 26 Février 1994 - Angra dos Reis (Brésil)
- XXI^{ème} Forum des Jeunes Chercheurs, 4 au 7 Juillet 1994 - Reims (France)

