

Immunologie/Immunology
(Médecine et thérapeutique/Medicine and Therapeutics)



L'analyse SDS-PAGE des protéines et antigènes de surface révèle une forte hétérogénéité chez les clones naturels de *Trypanosoma cruzi*, corrélée à la variabilité isoenzymatique

Simone Frédérique BRENIÈRE, Ivan ARANIKI, Dominique LE RAY et Michel TIBAYRENC

Résumé – Les profils des protéines de surface et des antigènes de surface de 19 clones de laboratoire de *Trypanosoma cruzi*, représentant 17 profils isoenzymatiques différents (zymodèmes), ont été comparés par analyse électrophorétique en SDS-PAGE. Les différents profils obtenus sont complexes et variés. Par dénombrement des bandes communes identifiables, nous avons calculé les coefficients de similitude des profils protéiques de surface d'une part, des antigènes de surface d'autre part, pour 33 comparaisons par paires de stocks. Dans les deux cas, ces coefficients se sont montrés statistiquement corrélés aux indices d'identité génétique isoenzymatique. Cette corrélation entre marqueurs génétiques indépendants est un argument supplémentaire en faveur de la structure clonale des populations naturelles de *T. cruzi* mise en évidence auparavant [1]. Par ailleurs, nous n'avons pas observé de différence importante entre les profils des antigènes de surface pour quatre stocks clonés de *T. cruzi*, qu'ils soient immuno-précipités par leur hyperimmun sérum homologue ou par les hyperimmuns sérums hétérologues. La signification immunologique de la variabilité des poids moléculaires des antigènes de surface chez différents zymodèmes de *T. cruzi* est discutée.

SDS-PAGE surface protein and antigen analysis evidences high heterogeneity among natural clones of *Trypanosoma cruzi*, correlated with isozyme variability

Abstract – Surface protein and surface antigen patterns of 19 *Trypanosoma cruzi* laboratory clones, representing 17 different isozymic profiles (zymodemes), were compared by SDS-PAGE analysis. Surface protein patterns were found to be complex and heterogeneous. According to the number of common bands, we calculated similarity coefficients of surface protein patterns on the one hand, and of surface antigen patterns on the other hand, for 33 stock pairwise comparisons. In both cases, these coefficients were statistically correlated to the isozyme index of genetic identity. Such a correlation between independent genetic markers favours the clonal structure of *T. cruzi* natural populations previously evidenced [1]. Moreover, we did not observe any notable differences in the surface antigen pattern among 4 *T. cruzi* cloned stocks precipitated by homologous as well as heterologous hyperimmune sera. The immunological significance of the molecular weight variability in surface antigen patterns among different zymodemes is discussed.

Abridged English Version – *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, exhibits high biological and biochemical variabilities [2] as well as a considerable genetic variability [1]. The populations of this parasite are composed of natural clones that are genetically diversified [6]. The "zymodemes" (sets of stocks presenting a common isozyme profile) are equatable to natural clones, or families of closely related clones. Given the current interest on Kinetoplastid surface proteins (particularly for vaccinal studies), we performed an electrophoresis analysis (SDS-PAGE) of surface protein and antigen among various laboratory clones which constitute a representative sample of *T. cruzi* genetic variability.

The surface proteins of 19 laboratory clones obtained by micromanipulation, representing 17 different "zymodemes" (see Table), were separated by 7% SDS-PAGE on slab gels after surface iodination according to Legrand *et al.* [4] and Lemesre *et al.* [3]. The surface antigens of the different clones were compared after immunoprecipitation of the iodinated surface proteins by a pool of 30 chagasic patients [5]. Moreover, we compared the surface antigen patterns of four different laboratory clones: Tehuentepec cl2, Tulahuén cl2, Y cl2 and Can III cl2 after precipitation by homologous and heterologous rabbit hyperimmune

Note présentée par Jean DORST.

sera. Among these four laboratory clones, Tulahuén cl2 and Y cl2 are genetically related to one another (2 different allozymes out of 24) and present high genetic distances from the other two [6].

The different surface protein and antigen patterns exhibit a high variability among the stocks under study (see *Fig. 1 a* and *b*). The patterns are complex and reproducible, which confirm previous studies ([8], [9]). Most of the surface proteins are recognized by the pool of chagasic sera: we obtained an average number of 9 bands (from 7 to 12) for surface proteins on the one hand, and of 6 bands (from 4 to 9) for surface antigens on the other hand. To quantify the differences observed between the protein and antigen patterns among the stocks under study, we calculated an index of banding homology (h), for 33 pairwise comparisons of electrophoresed samples run side by side on the same gel. We used the following formula: $h = 2nc/nx + ny$, where nc is the number of common bands, nx and ny are the numbers of bands in x and y stocks, respectively. For the same 33 pairwise comparisons, we calculated Nei's genetic identity I [7], which is related to the standard genetic distance D (average number of codon differences by gene between two populations [7]) by the formula: $D = -\ln I$. We observed a high correlation between the banding homology index (h) calculated for protein and antigen patterns on the one hand, and the genetic identity (I) on the other hand ($r = 0.51$ and $r = 0.49$ respectively for 32 degrees of freedom and $p < 0.01$ in both cases). These correlations between two sets of independent genetic markers favour the hypothesis of clonal structure in *T. cruzi* natural populations previously evidenced by a population genetics approach [6]. Indeed, the clone concept developed in bacteriology predicts that in the case of a populational clonal structure, two sets of independent genetic markers should be correlated among a group of natural isolates as was shown in *E. coli* ([10], [11]).

Moreover, we performed the immunoprecipitation of iodinated surface proteins of four different laboratory clones by homologous and heterologous rabbit hyperimmune sera. We observed a similar surface antigen pattern between Tulahuén cl2 and Y cl2, which corroborates the result obtained for surface proteins, since these two laboratory clones are genetically related to one another [6]. On the other hand, we obtained the same antigenic patterns when the iodinated surface proteins were precipitated by homologous or heterologous rabbit hyperimmune sera. This result suggests the presence of conserved surface antigen epitopes among genetically different *T. cruzi* clones. Such a result is in favour of a possible use of these epitopes for vaccinal purposes, since they appear to be conserved among various *T. cruzi* genotypes.

INTRODUCTION. — *Trypanosoma cruzi*, l'agent de la maladie de Chagas, se caractérise par une grande variabilité biologique et biochimique [2]. L'étude de marqueurs génétiques tels que les isoenzymes et l'ADN kinétoplastique ont montré que les populations de *T. cruzi* sont constituées de clones naturels génétiquement très diversifiés [1]. Dans ce modèle, les « zymodèmes » (isolats présentant un profil isoenzymatique commun) sont assimilables à des clones, ou à des familles de clones étroitement apparentées. Étant donné l'intérêt largement développé pour les protéines de surface des parasites kinétoplastidés, en particulier à des fins immunoprophylactiques, nous avons procédé à l'analyse électrophorétique (SDS-PAGE) comparée des protéines et des antigènes de surface d'un ensemble de stocks clonés de *T. cruzi* présentant des profils isoenzymatiques (ou zymodèmes)

différents. Cet échantillonnage a été choisi de manière à être le plus représentatif possible de l'ensemble de la variabilité génétique du taxon *T. cruzi*.

MATÉRIEL ET MÉTHODES. — Les données concernant l'échantillonnage des stocks clonés de parasites (micromanipulation) sont présentées dans le tableau. Pour chaque stock cloné, les échantillons à l'étude comprenaient une quantité fixée de 10^8 épimastigotes vivants, récoltés en début de phase stationnaire (milieu axénique LIT). Le taux de trypomastigotes était constamment inférieur à 1 %, et l'influence de ces formes trypomastigotes minoritaires sur les profils protéiques peut être considérée comme négligeable. Ces échantillons ont été marqués à l' $[I^{125}]$ par la méthode de l'Iodo-Gen en présence d'Aprotinine (100 U. ml^{-1}) [3], et les protéines de surface marquées ont été comparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide réticulé à 7 % (SDS-PAGE), après réduction par le dithiothréitol à 50 mM. [4]. Chaque essai comprenait un stock témoin, dont le profil protéique de surface était connu. Les extraits protéiques ont été immunoprécipités par un pool de sérums prélevés chez 30 patients chagasiques sérologiquement confirmés (tests d'immunofluorescence et d'ELISA positifs [5]) et analysés par électrophorèse (SDS-PAGE) après adsorption des immuns complexes formés sur Protéine A-Sepharose CL-4B (Pharmacia, Uppsala, Suède) [4]. D'autre part, les protéines de surface de quatre autres stocks clonés de *T. cruzi* : Tehuentepec cl2, Tulahuen cl2, Y cl2 et Can III cl2, après marquage à l' $[I^{125}]$ et solubilisation, ont été précipitées par quatre hyperimmuns

TABLEAU

Zymodème, hôte et origine géographique des stocks clonés de *Trypanosoma cruzi* étudiés dans le présent travail

Geographic and host origin, zymodeme patterns of Trypanosoma cruzi clones studied in the present work

Stocks	Zymo dèmes (^b)	Hôte	Localité
(1) A107 cl2	1	<i>Rhodnius prolixus</i>	Montjoly, Guyane française
(2) A97 cl7	3	<i>Didelphis marsupialis</i>	Cacao, Guyane française
(3) A99 cl7	5	<i>Didelphis marsupialis</i>	Cacao, Guyane française
(4) C8 cl1 (^a)	9	<i>Triatoma infestans</i>	Chiwisivi, Bolivie
(5) A98 cl5	11	<i>Didelphis marsupialis</i>	Cacao, Guyane française
(6) 31R26 cl1	16	Homme (Chagas aigu)	Santa-Cruz, Bolivie
(7) X10 cl1 Z1 (^a)	17	Homme	Belem, Brésil
(8) 133-79 cl1	19	Homme (Chagas aigu)	Santa-Cruz, Bolivie
(9) PB3 cl2	25	<i>Rhodnius pictipes</i>	Alto Béni, Bolivie
(10) 27R27 cl1	28	<i>Aotus sp</i>	Santa-Cruz, Bolivie
(11) Esmeraldo cl3	30	homme	Bahia, Brésil
(12) TU15 cl2	32	<i>Triatoma infestans</i>	Tupiza, Bolivie
(13) TU18 cl2	32	<i>Triatoma infestans</i>	Tupiza, Bolivie
(14) Y cl2 (^a)	34	Homme (Chagas aigu)	Sao Paula, Brésil
(15) M6241 cl6	35	Homme (Chagas aigu)	Belem, Brésil
(16) M5631 cl5	36	<i>Didelphis novemcinctus</i>	Belem, Brésil
(17) SC43 cl2 (^a)	39	<i>Triatoma infestans</i>	Santa-Cruz, Bolivie
(18) 9280 cl2 (^a)	39	Homme (Chagas chronique)	Santa-Cruz, Bolivie
(19) Tulahuen cl2 FKHA	43	Homme	Chili

(^a) Ces clones ont été produits dans d'autres laboratoires.

(^a) *These clones have been produced in other laboratories.*

(^b) La numérotation des zymodèmes est attribuée selon Tibayrenc et Ayala [10].

(^b) *Zymodeme numbering is according to Tibayrenc and Ayala [10].*

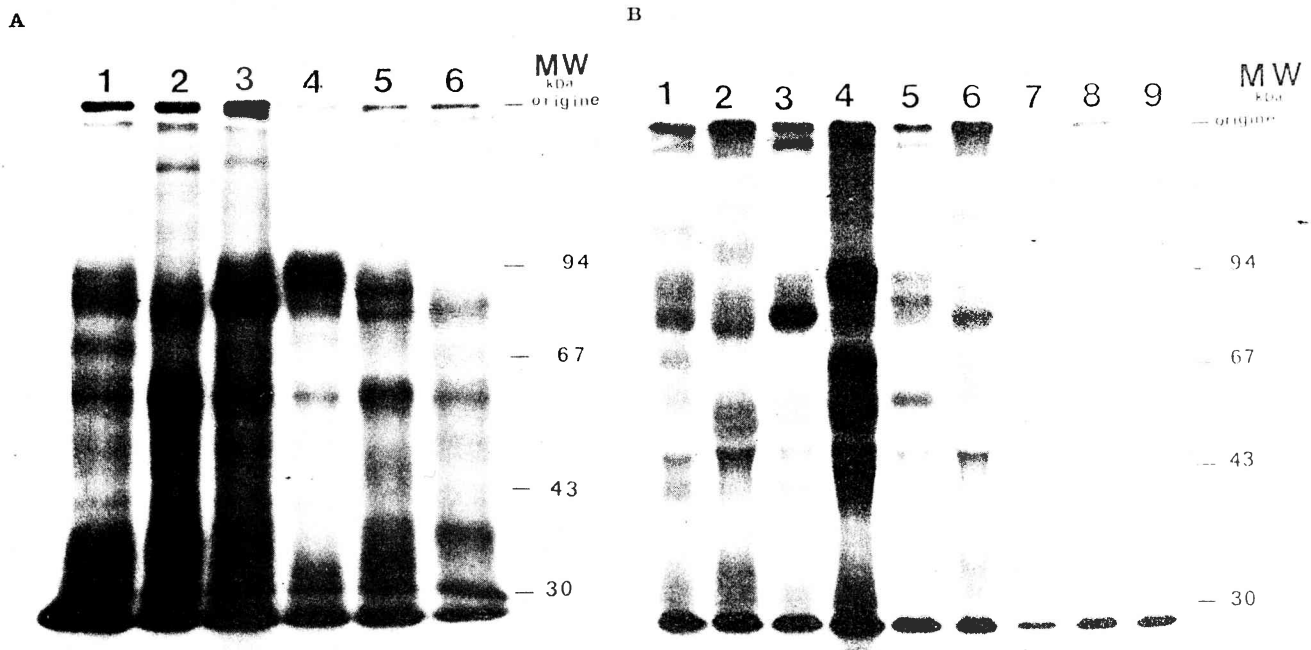


Fig. 1. — (a) Autoradiographie des protéines de surface marquées à l'iode de formes épimastigotes de stocks clonés de *Trypanosoma cruzi* après séparation du lysat cellulaire par électrophorèse en SDS-PAGE; (b) Autoradiographie des antigènes de surface marqués à l'iode et séparés par électrophorèse en SDS-PAGE après immunoprécipitation par un pool de sérums de patients chagasiques (pistes 1 à 6) et un sérum de patient atteint de leishmaniose muco-cutanée (pistes 7 à 9). Pistes 1 à 6 : stocks Tulahuen FK11A, C8 c11, 9280 c12, 27R27 c11, M5631 c15 et 133-79 c11; Pistes 7 à 9 : stocks Tulahuen FK11A, C8 c11 et 9280 c12 (voir table).

Fig. 1. — (a) Autoradiographic patterns of iodinated surface proteins of epimastigote forms from *Trypanosoma cruzi* cloned stocks after separation of the whole cell lysates by SDS-PAGE; (b) Autoradiographic patterns of iodinated surface antigens separated by SDS-PAGE after immunoprecipitation by a pool of sera of chagasic patients (lanes 1 to 6) and a serum from a patient with mucocutaneous leishmaniasis (lanes 7 to 9). Lanes 1 to 6: Tulahuen FK11A, C8 c11, 9280 c12, 27R27 c11, M5631 c15 and 133-79 c11 stocks; lane 7 to 9: Tulahuen FK11A, C8 c11 and 9280 c12 stocks (see table).

sérums de lapin produits à partir de ces mêmes stocks clonés. L'analyse électrophorétique a été menée de la même manière que ci-dessus. Parmi ces quatre derniers clones, Tulahuen c12 et Y c12 ne diffèrent que par 2 allozymes sur 24 et présentent par ailleurs de fortes distances génétiques par rapport aux deux autres stocks [6].

RÉSULTATS ET DISCUSSION. — Les profils des protéines et des antigènes majeurs de surface des 19 clones analysés (voir tableau) sont reproductibles, complexes et très hétérogènes (Fig. 1 a et b). La plupart des protéines de surface sont reconnues par le pool de sérums de chagasiques, le nombre moyen de bandes par clone étant respectivement, pour les protéines et les antigènes, de 9 (7 à 12) bandes et 6 (4 à 9) bandes. Les différents profils protéiques montrent 4 à 6 bandes entre 55 et 100 kDa.

Afin de quantifier les différences observées entre les différents profils protéiques et antigéniques, nous avons calculé des indices d'homologie pour des échantillons placés côte à côte sur un même gel. Nous avons utilisé la formule : $h = 2nc/nx + ny$, où nc est le nombre de bandes communes, nx et ny , les nombres de bandes respectifs chez les stocks x et y . Pour 33 comparaisons par paires des profils protéiques et antigéniques, nous

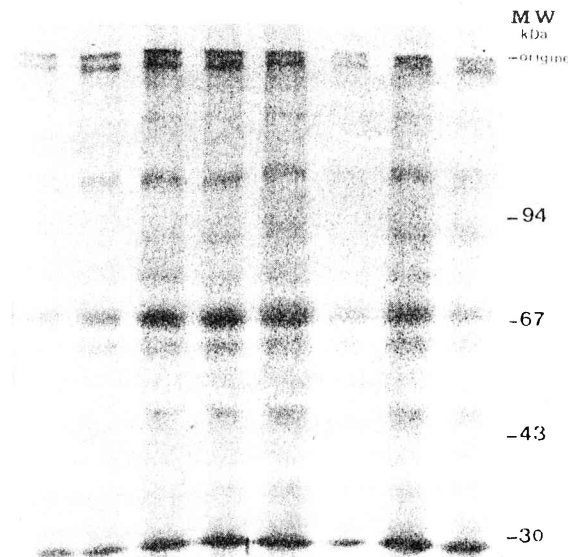


Fig. 2. — Autoradiographie des antigènes de surface marqués à l'iode et séparés par électrophorèse en SDS-PAGE après immunoprécipitation par différents hyperimmuns sérums de lapin : pistes 1 à 4 : stock Tulahuen c12 immunoprécipité par les hyperimmuns sérums de lapin dirigés respectivement contre Tulahuen c12, Tehuentepec c12, Y c12 and Can III c12; pistes 5 à 8 : stock Y c12 immunoprécipité par les hyperimmuns sérums de lapin dirigés respectivement contre Tulahuen c12, Tehuentepec c12, Y c12 and Can III c12.

Fig. 2. — Autoradiographic patterns of iodinated surface antigens separated by SDS-PAGE after immuniprecipitation by different rabbit hyperimmune sera: lanes 1 to 4: Tulahuen c12 stock immunoprecipitated by hyperimmune serum against Tulahuen c12, Tehuentepec c12, Y c12 and Can III c12 respectively; lanes 5 to 8: Y c12 stock immunoprecipitated by hyperimmune sera against Tulahuen c12, Tehuentepec c12, Y c12 and Can III c12 respectively.

avons mesuré la corrélation entre l'indice d'homologie h et l'identité génétique I de Nei [7], liée à la distance génétique D (nombre moyen de codons différents par gènes entre deux populations) par la formule : $D = -\ln I$. La corrélation obtenue entre indice d'homologie des profils protéiques de surface et identité génétique est hautement significative : $r=0,51$ pour 32 degrés de liberté, et $p < 0,01$. Celle obtenue entre indice d'homologie des profils antigéniques de surface et identité génétique l'est également : $r=0,49$ pour 32 degrés de liberté, et $p < 0,01$.

Ces résultats confirment la très grande variabilité électrophorétique des protéines et des antigènes de surface de *T. cruzi* observée par d'autres auteurs ([8], [9]), cette fois sur un grand nombre de stocks clonés et génétiquement bien identifiés. L'analyse quantitative de cette variabilité nous permet de poser l'hypothèse de l'existence d'une liaison entre ce polymorphisme de poids moléculaire des protéines de surface et l'évolution du génome nucléaire. En effet, nous obtenons de fortes corrélations entre les indices d'homologie calculés entre les profils protéiques et antigéniques d'une part, et l'identité génétique d'autre part. Or, cette dernière constitue une mesure de l'évolution du génome nucléaire (isoenzymes = marqueur nucléaire). De plus cette corrélation est en faveur de l'hypothèse de la structure clonale [6] des populations de *T. cruzi*. En effet, le concept de « clone » développé en bactériologie [10] suggère qu'en cas de structure populationnelle clonale, deux séries indépendantes de caractères génétiques doivent présenter une corrélation parmi un groupe d'isolats naturels, comme cela a été mis en évidence chez *Escherichia coli* [11].

Par ailleurs, nous avons immunoprécipité les protéines de surface marquées à l' [125 I] de quatre stocks clonés de *T. cruzi* (Tulahuen cl2, Y cl2, Tehuentepec cl2 et Can III cl2) par les quatre hyperimmuns sérums de lapin correspondants. Les profils antigéniques des stocks Tulahuen cl2 et Y cl2, dont l'identité génétique est forte, montrent une grande similitude (fig. 2). Ceci confirme l'existence d'une liaison entre polymorphisme des poids moléculaires des protéines de surface et identité génétique. Par ailleurs, l'observation des profils obtenus révèle une similitude importance des poids moléculaires des antigènes reconnus par les hyperimmuns sérums homologues ou hétérologues pour les quatre stocks étudiés (fig. 2) bien que ceux-ci soient très diversifiés génétiquement ([1], [6]). Ces résultats, dans les limites de notre échantillonnage, suggèrent que les épitopes majeurs des antigènes de surface de *T. cruzi* sont conservés d'un zymodème à l'autre.

La conservation des épitopes majeurs des protéines de surface entre stocks génétiquement très différents est encourageante pour l'avenir d'une utilisation vaccinale de ces protéines.

Le financement de ce travail a été assuré par le Programme de la Coopération technique française et par le Conseil belge pour la Recherche médicale (FGWO n° 3.0082.85). Nous remercions tout particulièrement les docteurs Gerardo Antezana et Philippe Desjeux, Directeurs de l'Institut Bolivien de Biologie d'Altitude, qui ont permis la réalisation de ce travail ainsi que M^{me} S. De Doncker pour son assistance technique.

Note remise le 7 janvier 1991, acceptée après révision le 1^{er} mars 1991.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] M. TIBAYRENC, P. WARD, A. MOYA et F. J. AYALA, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 83, 1986, p. 115-119.
- [2] J. A. DVORAK, *J. Cell. Biochem.*, 24, 1984, p. 357-371.
- [3] J. L. LEMESRE, F. S. RIZVI, D. AFCHAIN, M. SADISGUSKY, A. CAPRON et F. SANTORO, *Infect. Immun.*, 50, 1985, p. 136-141.
- [4] D. LEGRAND, P. DESJEUX, E. PRINA, F. LE PONT et S. F. BRENIÈRE, *C. R. Acad. Sci. Paris*, 303, série III, 1986, p. 607-612.
- [5] S. F. BRENIÈRE, R. CARRASCO, H. MIGUEZ, J. L. LEMESRE et Y. CARLIER, *Trop. Geograph. Med.*, 37, 1985, p. 231-238.
- [6] M. TIBAYRENC et F. AYALA, *Evolution*, 42, 1988, p. 277-292.
- [7] M. NEI, *Amer. Natur.*, 106, 1972, p. 283-292.
- [8] F. PLATA, F. GARCIA PONS et H. EISEN, *Eur. J. Immunol.*, 14, 1984, p. 392-399.
- [9] B. ZINGALES, G. ABUIN, A. J. ROMANHA, E. CHIARI et W. COLLI, *Acta Tropica*, 41, 1984, p. 5-16.
- [10] F. ORSKOV et I. ORSKOV, *J. Infec. Dis.*, 148, 1983, p. 346-357.
- [11] R. D. MILLER et D. L. HARTL, *Evolution*, 40, 1986, p. 1-12.

S. F. B. et M. T. : *Laboratoire de Génétique des Parasites et des Vecteurs, ORSTOM, 2051, avenue du Val de Montferrand, B.P. n° 5045, 34032 Montpellier Cedex*;

I. A. : *Institut Bolivien de Biologie, Institut de Médecine tropicale « Prince Léopold », 155 Nationalestraat, B-2000 Antwerpen, Belgium.*