

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE I

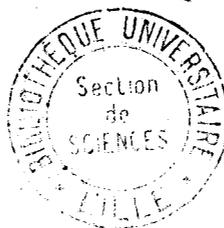
MEMOIRE

PRESENTE A L'UNIVERSITE DE LILLE I
pour l'obtention du titre de Docteur de 3ème Cycle
Spécialité : BIOCHIMIE

par

Marie-Claude PLANTEY

CONTRIBUTION A L'ETUDE DES ANTIGENES VARIABLES DE
TRYPANOSOMA EQUIPERDUM



Présenté le 4 décembre 1979 devant la Commission d'Examen

Membres du Jury :	M.	J. MONTREUIL	Président
	M.	G. BISERTE	Rapporteur
	M.	D. LE RAY	Examineur
	Melle	G. SPIK	Examineur
	M.	P. DEGAND	Examineur

T A B L E D E S M A T I E R E S

	Page
INTRODUCTION	1
<u>CHAPITRE I - GENERALITES</u>	4
A - <u>CLASSIFICATION DES TRYPANOSOMIDAE</u>	4
1 - Les trypanosomes africains	4
2 - Les trypanosomes américains	6
B - <u>LES TRYPANOSOMES AFRICAINS : CARACTERISTIQUES MORPHOLOGIQUES ET EVOLUTIVES</u>	6
1 - Description des formes présentes chez l'hôte définitif	8
2 - Evolution des trypanosomes chez la glossine	8
3 - Mécanisme de transmission	9
C - <u>LA VARIATION ANTIGENIQUE</u>	9
1 - Découverte et description du phénomène	9
2 - Bilan des travaux sur la variation antigénique	10
3 - Les principales théories de la variation antigénique	11
1° - Théorie de la mutation	11
2° - Théories adaptatives	12
D - <u>LES ANTIGENES VARIABLES DES TRYPANOSOMES SALIVARIA</u>	16
1 - Caractérisation et isolement des antigènes variables	17

	Page
2 - Localisation des antigènes variables	19
3 - Nature des antigènes variables	19
<u>CHAPITRE II</u> - TRAVAUX PERSONNELS	24
A - <u>INTRODUCTION</u>	24
B - <u>PREPARATION DES AVS DE T. EQUIPERDUM</u>	27
1 - Préparation des extraits antigéniques bruts	28
2 - Purification de l'AVS à partir de l'extrait antigénique brut	29
C - <u>ETUDE DES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES AVS DE VARIANTS DE TRYPANOSOMA EQUIPERDUM</u>	32
1 - Etude des propriétés physiques	33
a - Détermination de la masse moléculaire	33
b - Etude en dichroïsme circulaire	35
2 - Etude des propriétés chimiques	40
a - Composition en acides aminés	40
b - Composition en glucides	42
c - Identification de l'acide aminé situé en position N-terminale	44
d - Identification de l'acide aminé situé en position C-terminale	46
D - <u>DISCUSSION - CONCLUSIONS</u>	53

	Page
E - <u>ETUDE STRUCTURALE DES AVS DES VARIANTS BOTAT-1</u> <u>ET BOTAT-28</u>	63
1 - Détermination de la séquence N-terminale des AVS de BoTaT-1 et BoTaT-28	63
a - Variant BoTaT-1	64
b - Variant BoTaT-28	64
2 - Etude de la sensibilité aux enzymes protéolytiques des AVS de BoTaT-1 et BoTaT-28	66
a - Action des enzymes protéolytiques sur l'AVS de BoTaT-1	66
b - Action des enzymes protéolytiques sur l'AVS de BoTaT-28	69
c - Comparaison de la sensibilité rela- tive des antigènes variables de BoTaT-1 et BoTaT-28	71
3 - Hydrolyse par la trypsine de l'AVS de BoTaT-1	73
a - Mode opératoire	73
b - Fractionnement sur colonne de Biogel P 100	75
c - Composition en acides aminés des fractions tryptiques obtenues	77
d - Analyse des propriétés immunologi- ques des fractions tryptiques	81
4 - Hydrolyse par la trypsine de l'AVS du variant BoTaT-28	81
a - Mode opératoire	81
b - Fractionnement sur colonne de Biogel P 100	82
c - Propriétés immunologiques des fractions tryptiques	87
d - Conclusions	87

	Page
5 - Etude structurale des fractions trypsi- ques F ₁ et F ₂ de l'AVS de BoTaT-28	88
a - Détermination de la composition glucidique	88
b - Séquence N-terminale des fractions F ₁ et F ₂	91
c - Synthèse des résultats	93
F - <u>CONCLUSIONS DE L'ETUDE STRUCTURALE DES AVS DE BOTAT-1 et BOTAT-28</u>	95
 CONCLUSIONS GENERALES	 99
 BIBLIOGRAPHIE	
 APPENDICE TECHNIQUE	

I N T R O D U C T I O N

Les affections parasitaires, particulièrement répandues dans les régions tropicales et sub-tropicales, constituent dans ces contrées un important chapitre de la pathologie humaine et animale, les conséquences socio-économiques étant toujours considérables. L'Organisation Mondiale de la Santé en particulier, s'attache donc à promouvoir dans ce domaine une recherche à visée diagnostique, mais aussi thérapeutique.

Les médications, en nombre limité et d'une toxicité généralement importante, ne représentent pas toujours un recours satisfaisant ; aussi est-il devenu nécessaire de reprendre une recherche fondamentale visant à expliciter les mécanismes intimes permettant aux parasites d'échapper aux réactions naturelles de défense de l'hôte. Un grand concept vient immédiatement à l'esprit : promouvoir dans le domaine de la parasitologie générale une prophylaxie par la vaccination systématique de l'homme mais aussi du cheptel animal. Les quelques tentatives qui émaillent la recherche depuis plusieurs décades se sont souvent jusqu'ici soldées par des résultats partiels ou médiocres.

Il apparaît depuis ces dernières années nécessaire de coordonner différents aspects de recherche délibérément interdisciplinaires : ce mémoire illustre en ce qui nous concerne, une première étape visant à associer l'immunologie parasitaire à la biochimie structurale des glycoprotéines membranaires.

L'intérêt particulier suscité par les trypanosomes provient, pour certains d'entre eux, de leur remarquable capacité à modifier à intervalles de temps relativement réguliers leur identité antigénique de surface. Ce phénomène connu sous le nom de variation antigénique, encore aujourd'hui mal élucidé, serait l'explication de cette possibilité qu'ont les trypanosomes d'échapper aux systèmes immunologiques, humoraux ou cellulaires, de l'hôte. Peut-être

aussi, cette variation constitutionnelle du parasite est-elle l'explication des échecs répétés observés au cours de tentatives de vaccinations.

Des travaux récents ont permis d'établir la notion d'une relation, entre variation antigénique et nature ou structure d'un antigène de surface, caractérisé et isolé dans un état de pureté satisfaisant, pour la première fois en 1975 par CROSS.

Un projet d'étude biochimique structurale d'une glycoprotéine membranaire implique, dès le départ, deux obligations fondamentales :

- 1 - Pouvoir disposer en quantité importante de parasites représentatifs de la capacité de variation antigénique.
- 2 - Posséder un protocole de purification relativement simple, capable de fournir ce matériel dans des quantités avoisinant le gramme.

Ces deux conditions se trouvaient pour nous remplies, dans la mesure où le laboratoire d'Immunologie et de Biologie parasitaire de Bordeaux, dirigé par le Professeur PAUTRIZEL, était capable d'assurer l'une et l'autre.

Les travaux de A. CAPBERN, T. BALTZ, D. BALTZ et C. GIROUD ont, au cours des années récentes, permis le clonage dans ce laboratoire, de plus de 100 variants de *Trypanosoma equiperdum*, le choix de ce parasite étant en rapport avec des conditions évidentes de sécurité : il n'est, en effet, pas pathogène pour l'Homme.

Nous rapporterons en détail dans ce mémoire le protocole suivi par BALTZ pour identifier et purifier l'antigène variable de toute une série de ces variants. Autant dire que cet excellent modèle d'étude permettait de développer une collaboration entre notre laboratoire et le groupe de Bordeaux.

Notre but initial était la définition chimique de la composition d'antigènes variables purifiés. L'intérêt du sujet nous a amené progressivement à concevoir une étude structurale.

Ce mémoire présentera donc, dans une première partie, les éléments de définition chimique et physico-chimique de la glycoprotéine membranaire et dans une seconde partie, aura pour but de dégager notre apport personnel dans l'établissement d'une stratégie autorisant une approche structurale, pour l'instant limitée à l'axe polypeptidique de la glycoprotéine. Cette orientation préférentielle était d'ailleurs en relation avec les problèmes immunologiques : les sites antigéniques caractéristiques de la variation antigénique nous paraissant essentiellement de nature peptidique.

Notre choix s'est donc porté vers l'étude de deux variants, l'un précoce, l'autre tardif dans leur apparition au cours de l'infection. Notre espoir réside dans la mise en évidence de séquences acides aminés voisines ou identiques au sein du squelette peptidique des deux antigènes variables : leur existence nous tournerait résolument vers un concept immunologique de reconnaissance à visée diagnostique ou de prophylaxie par vaccination.

Cette hypothèse de travail qui peut paraître ambitieuse n'est pas seulement la nôtre, elle occupe un bon nombre de groupes de recherche à travers le monde et semble représenter une stratégie générale dans le domaine très vaste de la parasitologie moléculaire.

C H A P I T R E I

GENERALITES

A - CLASSIFICATION DES TRYPANOSOMIDAE

Trypanosoma equiperdum est un protozoaire zoo-flagellé unicellulaire appartenant à la famille des Trypanosomidae dont la situation dans la "systématique" est présentée dans le Tableau I.

Sur la base de leur répartition géographique et du type d'affections qu'ils provoquent, les trypanosomes peuvent être séparés en deux groupes :

- les trypanosomes africains.
- les trypanosomes américains.

1 - Les trypanosomes africains

Ce sont des parasites à évolution indirecte transmis à un hôte définitif vertébré par la piqûre d'une mouche du genre glossina (mouche tsé-tsé) qui constitue l'hôte intermédiaire et le vecteur. Seuls Trypanosoma brucei gambiense et Trypanosoma brucei rhodesiense sont pathogènes pour l'Homme chez lequel ils provoquent une parasitose connue sous le nom de "maladie du sommeil".

Trypanosoma brucei gambiense est localisé essentiellement en Afrique Equatoriale Occidentale et Centrale; il détermine une affection évoluant vers la chronicité et l'Homme semble constituer le principal réservoir de virus.

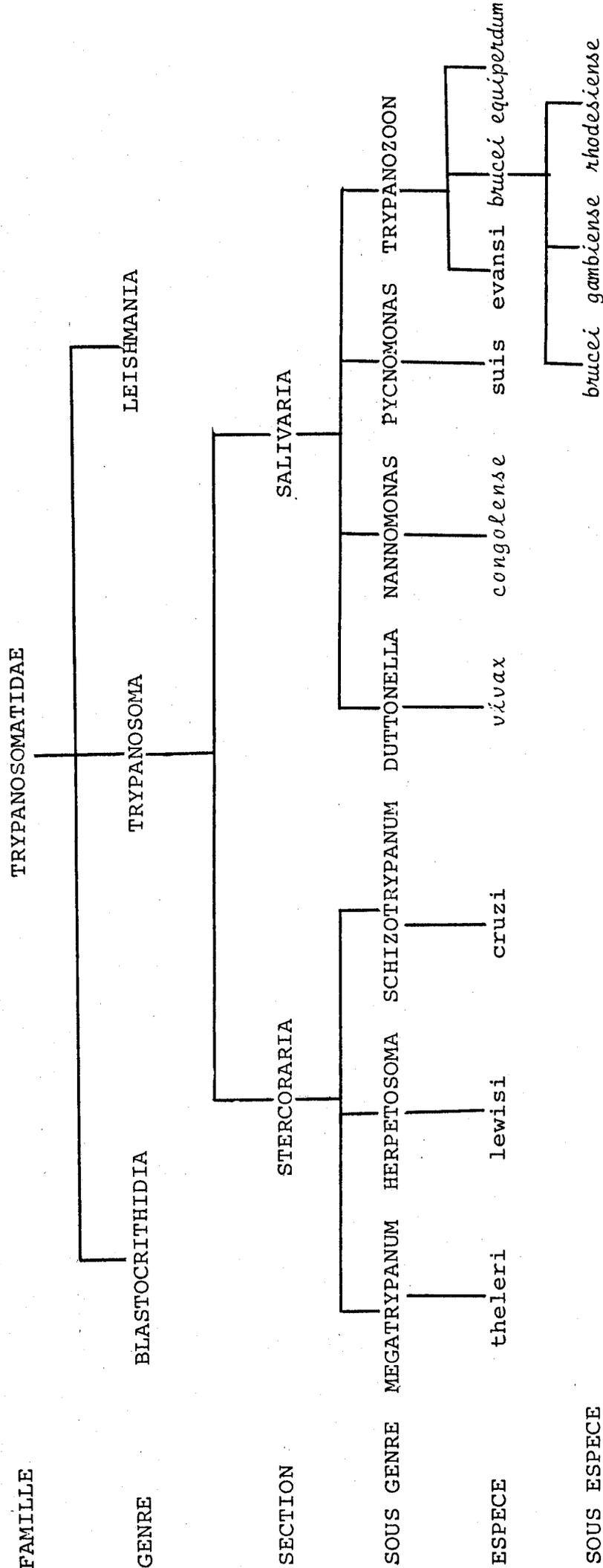


Schéma simplifié de la classification des Trypanosomatidae d'après Hoare (1972).
 (En italique les parasites pour lesquels le phénomène de la variation antigénique a été démontré).

TABLEAU I



Au contraire, *Trypanosoma brucei rhodesiense* qui sévit en Afrique de l'Est et du Sud, provoque une pathologie aigüe à évolution rapide. La notion d'un important réservoir animal doit être cette fois retenue.

2 - Les trypanosomes américains.

Ils sont représentés essentiellement par *Trypanosoma cruzi*, parasite responsable de la maladie de Chagas chez l'Homme. La transmission s'effectue par les déjections d'insectes hématophages nocturnes de la famille des réduvidés (sorte de grosse punaise). Les animaux sauvages et domestiques peuvent également être contaminés et constituent donc un important réservoir de virus.

Les affections causées par ces deux types de trypanosomes, américains ou africains, leurs caractéristiques morphologiques et évolutives très éloignées, font que nous nous limiterons dans la présentation de ce mémoire, aux seuls éléments intéressant les trypanosomes africains, auxquels est rattaché *Trypanosoma equiperdum*. Afin de faire ressortir l'intérêt des travaux entrepris, nous allons tenter, après un bref rappel des particularités des trypanosomes africains, de faire le point sur les connaissances actuelles concernant la variation antigénique, en insistant plus particulièrement sur les propriétés de l'antigène de surface impliqué dans ce phénomène.

B - LES TRYPANOSOMES AFRICAINS : CARACTERISTIQUES MORPHOLOGIQUES ET EVOLUTIVES

Au cours de leur cycle évolutif (Fig. 1), les trypanosomes passent successivement d'un hôte intermédiaire invertébré, la glossine, à un hôte définitif vertébré ; ce transfert s'accompagne de modifications morphologiques importantes.

CYCLE EVOLUTIF DE TRYPANOSOMA BRUCEI

(VICKERMAN, 1969)

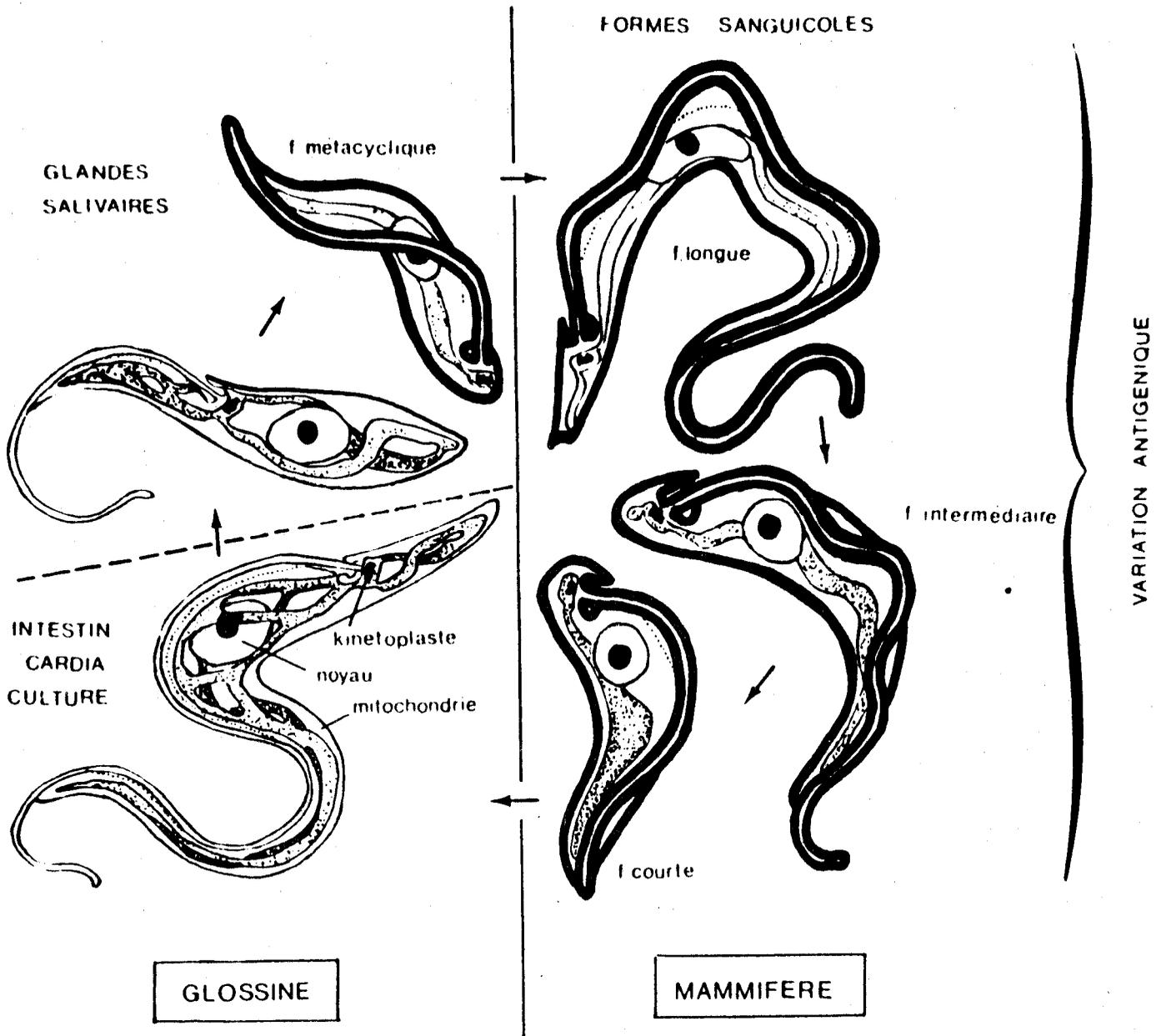


FIGURE I



1 - Description des formes présentes chez l'hôte définitif

Les formes présentes chez le vertébré infecté sont appelées formes sanguicoles ou trypomastigotes. On les retrouve dans le sang, les ganglions et le liquide céphalo-rachidien où elles se multiplient rapidement par division longitudinale binaire.

Ces formes sanguicoles sont caractérisées par un corps fusiforme allongé, entièrement recouvert par un "manteau de surface" d'une épaisseur estimée à 12-15 nm, englobant la totalité de la membrane plasmique (VICKERMAN, 1969). Les techniques classiques de coloration permettent de distinguer un gros noyau arrondi de situation centrale, d'un élément postérieur de plus petite taille, le kinétoplaste, d'où fait issue le flagelle qui, en s'accolant au protoplasme réalise une membrane ondulante. Le kinétoplaste correspond quant à lui à une dilatation de la membrane mitochondriale et renferme une forte concentration en DNA (DNA dépourvu d'histones correspondant à environ 10 % du DNA total ; RIOU, 1971). Les trypomastigotes longs et minces se transforment progressivement en formes intermédiaires puis en formes courtes, trapues, sans flagelle libre, non infectantes à ce stade pour le mammifère, mais continuant à l'être pour l'invertébré vecteur.

2 - Evolution des trypanosomes chez la glossine

Les parasites ingérés lors du repas infectant parcourent tout le tube digestif de l'insecte où ils sont transformés en formes épimastigotes ou "crithidia", caractérisées essentiellement par la perte du manteau de surface et le changement de position du kinétoplaste, maintenant situé en avant du noyau. C'est sous cette forme qu'ils migrent vers les glandes salivaires de l'insecte où ils subissent une nouvelle différenciation en formes métacycliques. Les "métacycliques" sont des trypomastigotes ; ils

ont recouvert un manteau cellulaire, leur kinétoplaste a de nouveau migré, il est retourné à l'extrémité postérieure du corps. Ils sont incapables à ce stade de se multiplier (VICKERMAN, 1969).

Lors de l'infection, dès leur pénétration dans le sang du mammifère, ils prennent la forme trypomastigote allongée sous laquelle ils se multiplient.

3 - Mécanisme de transmission

La transmission a généralement lieu par piqure. Il existe néanmoins des cas de transmission non cyclique: transmission mécanique par divers insectes, transmission inter-mammifère (congénitale, lactation, transfusion) ou encore, comme c'est le cas de *Trypanosoma equiperdum*, transmission vénérienne. Bien qu'il ne possède pas de cycle évolutif et se présente donc uniquement sous forme sanguicole, le choix de *Trypanosoma equiperdum* comme modèle d'étude de la variation antigénique reste justifié, ce phénomène étant typiquement lié au développement chez l'hôte vertébré.

C - LA VARIATION ANTIGENIQUE

1 - Découverte et description du phénomène

Le phénomène de la variation antigénique, signalé dès 1905 par FRANKE, n'intéresse que les trypanosomes de la section *Salivaria* (OMS, 1969)(Tableau I).

Il fut tout d'abord montré pour les trypanosomes du sous genre *Trypanozoon* de la classification d'HOARE (1972) c'est-à-dire *T. brucei brucei* (RITZ, 1916), *T. brucei rhodesiense* (LOURIE et O'CONNOR, 1937), *T. brucei gambiense* (OSAKI, 1959). Plus récemment, CLARKSON et AWAN en 1967, puis WILSON et CUNNINGHAM en 1970, étendirent cette propriété respectivement à *T. vivax* et *T. congolense*.

Dans les affections chroniques par des trypanosomes pathogènes, le nombre de parasites présents dans le sang du mammifère varie considérablement en fonction du temps. Chaque rémission relative de la parasitémie est due à la destruction de la majorité des trypanosomes appartenant à une population antigéniquement définie, par des anticorps spécifiques élaborés par l'hôte (LEVADITI et McINTOSCH 1910 ; MUTERMILCH et SALAMON, 1928). Les reprises de parasitémie sont dues à la prolifération de trypanosomes ayant acquis une identité antigénique différente de celle de leurs précédents, ceci, selon l'hypothèse physio-pathologique admise. Des populations d'un nouveau type antigénique apparaissent ainsi à intervalles de temps réguliers et la durée de survie de l'hôte semble être la seule limite au nombre de variants pouvant être exprimés (GRAY, 1965 a ; CAPBERN et Coll., 1977).

2 - Bilan des travaux sur la variation antigénique

Parmi les équipes qui se sont intéressées à l'étude expérimentale de la variation antigénique, certains groupes ont suivi le phénomène à partir d'organismes transmis cycliquement (par l'insecte) aux animaux de laboratoire, alors que d'autres, s'éloignant plus des conditions naturelles, ont inoculé les parasites directement à la seringue, éliminant de ce fait le facteur "hôte intermédiaire".

Les résultats ainsi obtenus ont été résumés dans plusieurs revues générales qui ont été largement consultées pour la présentation qui va suivre (DESOWITZ, 1970 ; DE RAADT, 1974 ; SEED, 1974 ; VICKERMAN, 1974, 1978 ; DOYLE, 1977 ; GRAY et LUCKINS, 1976 ; GRAY, 1977 ; CROSS, 1978). Les points essentiels retenus sont les suivants :

- Les variants antigéniques produits par une souche de trypanosomes ou ses clones* dérivés sont identiques quelque soit l'hôte vertébré (RITZ, 1916 ; GRAY, 1965 a) ; on peut parler de répertoire antigénique, l'ensemble des types antigéniques variables (TAVs) constituant le sérodème (VAN MEIRVENNE et Coll., 1975 a).

- Il semble exister une certaine programmation dans l'ordre d'apparition des variants, principalement au début de l'infection (GRAY, 1965 a, 1965 b ; INOKI, 1960 ; WILSON et CUNNINGHAM, 1970 ; ULIENBERG et GIRET, 1972 ; VAN MEIRVENNE et Coll., 1975 a ; CAPBERN et Coll. 1977).

- Au cours du cycle évolutif, le passage chez l'hôte intermédiaire invertébré permettrait aux trypanosomes de retourner à un type antigénique donné, caractéristique de la souche, appelé "type de base" (BROOM et BROWN, 1940 ; GRAY, 1965 b, 1975 ; JENNI, 1977). En fait, le retour à un type de base a également été observé lors de l'inoculation à la seringue de populations clonées (CAPBERN et Coll., 1977) ; GRAY, (1965 a) et VAN MEIRVENNE et Coll. (1975 a) préfèrent quant à eux, employer dans ce cas, la terminologie de "types prédominants", caractérisant ainsi les premiers sérotypes retrouvés en début d'infection.

3 - Les principales théories de la variation antigénique

Le phénomène de la variation antigénique est loin d'être élucidé actuellement, les causes réelles et le mécanisme impliqué étant encore inconnus. Quoiqu'il en soit, un certain nombre d'hypothèses explicatives ont été formulées.

1° - Théorie de la mutation

Cette théorie, défendue par CANTRELL (1958) et WATKINS (1964), repose entièrement sur des phénomènes de

* Clone : population homogène issue d'une cellule unique.

mutation qui seraient dûs à des erreurs de réplication du gène codant pour l'antigène variable. Cette hypothèse est aujourd'hui définitivement abandonnée car elle ne rend pas compte des observations faites depuis, d'une "programmation" dans l'ordre d'apparition des variants et du retour à un "type de base" ou "types prédominants" lors de l'infestation d'un nouvel hôte, non encore immunologiquement sollicité. De plus, des résultats préliminaires d'étude structurale permettent aujourd'hui de concevoir des différences importantes entre les séquences acides aminés des antigènes de surface isolés d'une série de variants (BRIDGEN et Coll. 1976) ; il faudrait alors admettre, dans ces conditions, qu'il y ait un grand nombre de points de mutation simultanés au niveau du génome.

2° - Théories adaptatives

- Selon DESOWITZ (1970), la variation antigénique pourrait résulter d'une réaction immunochimique, indépendante de la cellule, se produisant à la surface du parasite sous l'effet des anticorps. D'après cet auteur, la réaction antigène-anticorps provoquerait une altération de la structure tertiaire de la glycoprotéine de surface, conduisant à chaque fois à l'exposition de nouveaux déterminants antigéniques.

Cette théorie ne rend pas compte, elle non plus, de la différence importante observée au niveau de la composition chimique des antigènes variables (CROSS, 1975, 1977 ; BALTZ et Coll., 1977).

De plus, le nombre apparemment illimité de variants pouvant être produits n'est pas en faveur d'une telle théorie, lorsque l'on sait que l'antigène de surface est composé de seulement 500 à 600 résidus d'acides aminés (CROSS, 1975 ; BALTZ et Coll., 1977).

- Utilisation d'une information génétique préexistante.

Selon cette hypothèse (LE PAGE, 1968), il existerait chez tous les parasites plusieurs gènes, codant chacun pour une glycoprotéine et d'un nombre égal au nombre de variants pouvant être exprimés par un clone de trypanosomes. On peut alors imaginer dans ce cas :

Un expression successive des différents gènes, pouvant être régulés, soit par un mécanisme complexe d'exclusion mutuelle déjà évoqué à propos d'autres protozoaires tels que la paramécie (BEALE et WILKINSON, 1961), soit par un mécanisme faisant intervenir la réponse immunologique de l'hôte. (VICKERMAN, 1969 ; CROSS et JOHNSON, 1976). DOYLE (1976) a observé sous l'action des anticorps un déplacement des antigènes à la surface des parasites rappelant le "capping" observé pour les lymphocytes. Il s'ensuivrait une endocytose du complexe antigène-anticorps, agissant comme un signal au niveau génétique.

Il est également permis d'envisager une apparition spontanée, livrée au hasard, de nouveaux variants antigéniques, qui seraient toujours les mêmes pour un sérotype donné, ce mécanisme génétique étant tout à fait indépendant de la réaction immunologique de l'hôte (VAN MEIRVENNE et Coll., 1975 a, b).

De grandes différences d'infectivité et de virulence suivant les types antigéniques ont déjà été rapportées (McNEILLAGE et HERBERT, 1968 ; VAN MEIRVENNE et Coll., 1975a CLAYTON, 1978), et la compétition entre variants pourrait alors déterminer leur séquence d'apparition : lorsqu'un variant prédominant dans une population est éliminé par les anticorps de l'hôte, c'est le variant suivant le plus virulent qui deviendra à son tour prédominant (DE RAADT, 1974). Dans ce cas, la réponse immunologique de l'hôte jouerait un rôle décisif, sélectif, mais non inductif.

Cette théorie permettrait d'expliquer le retour à un "type du base" ou "types prédominants" lors de la transmission à un nouvel hôte immunologiquement neuf.

Elle serait également compatible avec les résultats expérimentaux récemment obtenus par LE RAY et Coll. (1977). Ce dernier a en effet observé, après infection cyclique de la souris, une hétérogénéité marquée des types antigéniques variables (TAVs) dans la première population de trypanosomes résultante. Selon lui, cette hétérogénéité pourrait, soit apparaître chez l'hôte infecté, très rapidement après la piqûre (JENNI, 1977), soit être déjà présente au niveau métacyclique.

Cette dernière éventualité, tout d'abord écartée à la suite des travaux de JENNI (1977), s'est vue très récemment appuyée par les résultats de LE RAY et Coll. (1978) et de BARRY et Coll. (1979) sur le sérodimme AnTat de *T. brucei brucei* (AnTat : Antwerp-Trypanozoon Antigenic-type).

Ces auteurs viennent en effet d'établir, par des techniques d'immunolyse et d'immunofluorescence au moyen d'antisera monospécifiques, que les trypanosomes présents dans la salive de la glossine ne portent pas tous le même TAV. Ils ont de plus montré que ces variants n'étaient pas spécifiques du stade d'infestation chez l'insecte, puisque la quasi totalité d'entre eux étaient lysés en présence d'un sérum "pre mortem" de lapin infecté à la seringue, témoignant ainsi de la communauté antigénique entre ces variants métacycliques et l'ensemble des variants exprimés au cours d'une affection à évolution longue.

Ajoutons que la piqûre de la mouche et donc la transmission de ce grand nombre de variants métacycliques à la souris, se solde par l'apparition chez cet animal des TAVs prédominants, caractéristiques du sérodimme AnTat étudié par ces auteurs.

Ces dernières données, qui coïncident par ailleurs avec le manque d'immunoprotection constaté sur le terrain, même dans des zones d'endémie limitées, reposent le problème de la vaccination : cette prophylaxie de la trypanosomose africaine pouvait en effet être envisagée dans la mesure où, pour une souche donnée, il y avait retour à un type antigénique de base lors de la différenciation métacyclique. Il était dans ce cas permis de supposer, étant donné l'aspect cyclique de la transmission, qu'un nombre restreint de sérodèmes et, par conséquent, un nombre restreint de types antigéniques de base étaient en circulation à l'intérieur d'une région déterminée.

Dans ces conditions, la prévention était possible, par injection systématique des antigènes variables spécifiques des différents types de base caractérisés dans la zone considérée. D'après les résultats qui viennent d'être exposés, l'éventualité d'une telle mesure préventive semble donc devoir être écartée.

Sur le plan théorique enfin, ces nouvelles données, si elles renseignent sur le phénomène de la variation antigénique au niveau phénotypique, ne permettent toujours pas d'en comprendre le mécanisme génétique. C'est pourquoi, on assiste actuellement au développement de nouvelles méthodes d'investigation basées sur l'étude du comportement des parasites *in vitro*.

C'est ainsi qu'au cours des deux dernières années, différentes équipes ont mis au point des milieux de cultures permettant la croissance des trois formes de trypanosomes caractéristiques de leur cycle de vie : HIRUMI et Coll. (1977) et TAYLOR et CROSS (1977) sont parvenus à cultiver des formes trypomastigotes possédant toutes les propriétés morphologiques, biochimiques et infectieuses des parasites au stade sanguicole. NYINDO et Coll. ont obtenus des résultats semblables à partir de formes épimastigotes (1978 a) et métacycliques (1978 b). Enfin, CUNNINGHAM et HONIGBERG (1977) ont réussi à transformer, en présence de glandes salivaires de glossine, des formes épimastigotes en formes métacycliques infectieuses.

L'identification des variants ainsi produits et la recherche des conditions favorisant le changement d'identité antigénique des parasites permettra, sans doute de mieux comprendre le mécanisme impliqué.

Il est également probable qu'une étude, directement au niveau du génome, favorisera la compréhension de ce phénomène ; des travaux dans ce sens semblent devoir se développer, et, dernièrement, EGGIT et Coll. (1977) ont pu réaliser in vitro la biosynthèse d'antigènes de *T. brucei* à partir du m RNA isolé de variants.

Enfin, parallèlement à tout ceci, il est apparu que l'étude structurale des antigènes variables spécifiques des variants produits apporterait une contribution à la compréhension du phénomène ; c'est pourquoi, des investigations dans ce domaine ont été entreprises depuis une vingtaine d'années, et nous allons rappeler brièvement les principales étapes qui ont permis d'aboutir à la localisation, la caractérisation et enfin l'isolement et l'étude chimique de ces antigènes variables.

D - LES ANTIGENES VARIABLES DES TRYPANOSOMES SALIVARIA

Les antigènes variables des trypanosomes de la section *Salivaria* (section affectée par la variation antigénique ; Tableau I) sont responsables de l'identité antigénique du parasite au stade sanguicole (LE RAY, 1975).

Ils sont à distinguer des autres antigènes dits communs ou internes ou liés (WEITZ, 1960 b ; GRAY, 1961 ; BROWN et WILLIAMSON, 1962 ; SEED, 1963 ; BIGALKE, 1966 ; LUMSDEN, 1967 ; LE RAY, 1975) que l'on retrouve à tous les stades de vie du flagellé. Ces antigènes, au nombre d'une vingtaine sont également communs à différentes souches de *T. brucei brucei*, à toutes les espèces de *T. brucei* (*T. brucei brucei*, *T. brucei gambiense* et *T. brucei rhodesiense*) et un grand nombre d'entre eux est également retrouvé dans d'autres sous genres de trypanosomes de la section *Salivaria* (*T. congolense*) (LE RAY, 1975). Ils correspondraient à des éléments de structuration, ou à des substances impliquées dans le métabolisme de la cellule

(LUMSDEN, 1967), ou enfin à des nucléoprotéines (BROWN et WILLIAMSON, 1962).

1 - Caractérisation et isolement des antigènes variables

Au fur et à mesure de leur isolement, et selon les auteurs, les antigènes variables reçurent différentes appellations : WEITZ (1960 a), qui détecta leur présence dans le serum d'animaux infectés par *T. brucei*, les nomma "exoantigènes".

Puis, SEED (1963) et SEED et WEINMAN (1963) les isolèrent par précipitation par le sulfate d'ammonium d'un homogénat de *T. rhodesiense* et les séparèrent en deux catégories, sur la base de leurs propriétés immunologiques

- l'une précipitogène et agglutinogène, les AG antigènes (Agar Gel Antigens).

- l'autre responsable de l'élaboration d'anticorps protecteurs, les PR antigènes (Protective Responsible Antigens).

L'inoculation à la souris des PR antigènes permet une immunisation de l'animal contre une infestation ultérieure par le clone homologue. De tels antigènes furent isolés par SEED (1972), également chez *T. gambiense* et *T. equiperdum*.

BROWN et WILLIAMSON (1962), parlent quant à eux, d'antigènes 1 S et 4 S qu'ils isolent après fractionnement cellulaire d'un homogénat de *T. rhodesiense*. Selon eux, c'est la fraction 4S la plus fortement antigénique et c'est contre cette dernière que sont élaborés chez le lapin des anticorps agglutinants et trypanocides (BROWN et WILLIAMSON, 1964).

Cette valeur de constante de sédimentation fut remise en question en 1972 par LANHAM et TAYLOR qui isolèrent, à partir d'une fraction capable d'immuniser la souris, trois composants de coefficients de sédimentation respectifs 6,5 S, 3 S et 1 - 1,5 S, donnant tous naissance à des anticorps agglutinants.

Une analogie a cependant pu être établie par ALLSOPP et Coll. (1971) entre l'antigène 4 S de WILLIAMSON et BROWN (1964) et l'exoantigène de WEITZ (1960 a).

Ces auteurs ont en effet montré l'identité antigénique de ces deux préparations en immunoélectrophorèse et en immunoprécipitation. Ils ont de plus trouvé, que le comportement en isoélectrofocalisation en gel de polyacrylamide de l'exoantigène, était très voisin de celui observé antérieurement par HUMPHRYES (1970) pour l'antigène 4 S. En conséquence, ils proposèrent de regrouper ces deux entités sous l'appellation unique "d'antigène de surface".

Ce n'est qu'en 1975 que CROSS publia pour la première fois un protocole d'isolement de l'antigène variable conduisant à la purification d'un composé unique, porteur de la spécificité antigénique du sérotype considéré et homogène en gel de polyacrylamide, qu'ils dénomma VSSA (Variant Specific Surface Antigen).

Enfin, on ne peut terminer ce chapitre de généralités sans faire référence au remarquable travail effectué par LE RAY (1975), au cours duquel il étudia les structures antigéniques de *T. brucei* au moyen de l'immunoélectrophorèse. Il caractérisa ainsi au stade sanguicole un composant électrophorétique majeur, antigéniquement variable et spécifique du sérotype de l'organisme qu'il appela composant ou système V.

2 - Localisation des antigènes variables

Lorsque VICKERMAN montra en 1969, au moyen de la microscopie électronique, que les formes trypomastigotes sanguicoles et métacycliques (formes infectieuses), étaient entièrement recouvertes d'un "manteau" uni et compact, dense aux électrons, alors que les formes épimastigotes (non infectieuses) en étaient dépourvues, il émit l'hypothèse que la perte et réacquisition du manteau était à rapprocher du phénomène de variation antigénique, les antigènes variables en étant vraisemblablement les principaux constituants.

Cette hypothèse fut confirmée peu de temps après par VICKERMAN et LUCKINS (1969) qui montrèrent, au moyen d'une série d'antisera monospécifiques conjugués à la ferritine, que le marquage était bien localisé à la surface des parasites homologues. Depuis, la situation externe des antigènes variables a été largement démontrée et précisée par immunofluorescence (FRUIT et Coll., 1974, 1977 ; VAN MEIRVENNE et Coll., 1975 a ; STANLEY et Coll., 1978).

3 - Nature des antigènes variables

Les antigènes variables des trypanosomes *Salivaria* ont tout d'abord été identifiés, sur la base de leurs propriétés physico-chimiques, comme étant des holoprotéines (BROWN et WILLIAMSON, 1962 ; WILLIAMSON et BROWN, 1964 ; SEED, 1963).

Les préparations les contenant étaient en effet :

- précipitables par l'acide trichloracétique et le sulfate d'ammonium.
- colorables par l'amidoschwarz.

- leur activité antigénique était perdue après action d'agents dénaturants tels que la chaleur ou l'urée 4 M, ainsi qu'après action d'enzymes protéolytiques.

Puis, en 1969, VICKERMAN montra que le manteau de surface des formes trypomastigotes était de nature protéique, puisqu'il était éliminé par l'action de la pronase.

Ce n'est qu'à partir de 1970, avec les travaux de WRIGHT et HALES que naquit le concept d'une présence glucidique au niveau des antigènes variables des trypanosomes Salivaria : ces auteurs mirent en effet en évidence au microscope électronique, par la technique de révélation de THIERY (1967), des groupements de nature polysaccharidique dans le manteau cellulaire de *T. brucei*. Ils signalèrent même que ceux-ci étaient masqués par une couche externe protéique, disparaissant après trypsinisation.

La présence de glucides fut confirmée depuis pour *T. brucei* et au moyen de la même technique, par STEIGER (1973, 1975). Toutefois, cet auteur, lorsqu'il tenta d'identifier les sucres ainsi objectivés, ne put obtenir qu'une fixation très faible de la Concanavalline A marquée à la peroxydase (1975).

Ce résultat négatif était vraisemblablement une conséquence de l'enfouissement des groupements glucidiques, car CROSS et JOHNSON (1976) et SEED et Coll. (1976), toujours sur *T. brucei*, obtinrent des réactions fortement positives, le premier avec la Concanavalline A marquée à la peroxydase, le second avec différentes lectines conjuguées à la ferritine, à condition toutefois d'avoir fait subir aux parasites un traitement protéasique préalable. SEED et Coll., qui testèrent dans le même temps leurs lectines en réaction d'agglutination avec les trypanosomes traités dans des conditions semblables, obtinrent des résultats identiques dans chacune des deux séries d'expérience, c'est-à-dire, fixation ou agglutination de :

- La Concanavaline A, indiquant la présence de résidus de glucose ou/et de mannose (GOLDSTEIN et SO, 1965).
- Ricinus communis (RCA I), spécifique du galactose (NICOLSON et Coll., 1974)
- Les agglutinines de germe de blé (WGA) et de soja (SBA), objectivant respectivement, la présence de résidus de N-acétylglucosamine (ALLEN et Coll., 1973) et de N-acétylgalactosamine (LIS et Coll 1970).

Des expériences semblables de caractérisation par des lectines furent menées par JACKSON (1977) sur *T. equiperdum*, au moyen cette fois, de la seule technique d'agglutination. Cet auteur dut également recourir à la protéolyse, avant de visualiser la formation de rosettes en présence de Concanavaline A et des phytohémagglutinines (PHA) L et P de graine de haricot rouge (*Phaseolus vulgaris*), traduisant selon lui la présence, respectivement de résidus de glucose ou de mannose et de N-acétylgalactosamine. La PHA P étant en fait un mélange des deux protomères L et E, spécifiques, le premier de la N-acétylgalactosamine, le second du groupement oligosaccharidique Gal- β -1-4-GlcNAc- β -1-2-Man (LEAVITT et Coll., 1977), une nuance doit être apportée à l'interprétation donnée par JACKSON.

La démonstration semble donc avoir été faite, que le manteau recouvrant les trypanosomes sanguicoles, était constitué d'éléments de nature glucidique et protidique. L'absence de constituants lipidiques peut en outre être déduite des observations faites au microscope électronique par GODFREY et TAYLOR (1969) et SEED et Coll. (1976). Les premiers n'observèrent en effet aucune altération du manteau de *T. brucei* après action de la phospholipase A de venin de serpent, et les seconds ne purent contraster en microscopie électronique la surface de *T. equiperdum* par des hydrosols ferriques phospholipophiles. JACKSON (1977) quant à lui, n'obtint aucune induction de l'agglutination par ses lectines après action sur *T. equiperdum* d'une lipase de pancréas de porc.

Etant donné la localisation des antigènes variables à la surface du parasite, tous ces résultats suggèraient leur nature glycoprotéique. Celle-ci fut établie encore plus clairement grâce à une série de travaux réalisés dans le même temps, non plus sur les trypanosomes eux-mêmes, mais sur les antigènes variables préalablement extraits.

HUMPHRYES tout d'abord, en 1970, puis ALLSOPP et Coll. en 1971, montrèrent que les antigènes variables de *T. brucei* étaient colorables par le réactif de Schiff après oxydation periodique, en gel de polyacrylamide. L'année suivante, à partir de la même préparation, NJOGU et HUMPHRYES (1972) identifiaient par chromatographie sur papier après hydrolyse acide deux oses neutres : le mannose et le galactose. Puis, ALLSOPP et NJOGU, en 1974, par les techniques de séparation et de coloration spécifiques des différentes catégories d'oses caractérisèrent le galactose, le mannose et la glucosamine vraisemblablement N-acétylée, dans les rapports moyens de 1 : 1 : 2.

Il faut cependant signaler que le pourcentage trouvé par ces auteurs pour chacun des monosaccharides, était variable d'une analyse à l'autre, ceci pouvant d'ailleurs être imputé au manque de pureté des préparations ou aux techniques utilisées.

En réalité, c'est CROSS en 1975 qui, le premier, montra sans aucune ambiguïté la nature glycoprotéique des antigènes variables de *T. brucei*, après les avoir isolés dans un état de pureté satisfaisant en électrophorèse en gel de polyacrylamide. Il réalisa ainsi l'isolement des antigènes spécifiques de six variants et procéda à leur caractérisation chimique. Il détermina pour chacun d'eux :

- Le point isoélectrique.
- La masse moléculaire.
- La composition en acides aminés.
- La composition en sucres.

Les résultats qu'il obtint révélèrent des différences importantes entre les antigènes variables au niveau de leur point isoélectrique (valeurs comprises entre 5.8 et 8.3) et de leurs compositions en acides aminés, tandis que la valeur de la masse moléculaire demeurait constante (65 000 daltons), de même que le pourcentage glucidique, avec présence de résidus de mannose, galactose et glucosamine. Néanmoins, la technique utilisée pour le dosage des sucres (dosage colorimétrique des oses neutres par la méthode au phénol sulfurique de DUBOIS et Coll. (1956) et identification des osamines à l'autoanalyseur d'acides aminés) ne permettait guère de conclusions à ce niveau. CROSS s'intéressa en outre aux caractéristiques immunologiques de ces glycoprotéines et montra leurs propriétés protectrices. Il vérifia en effet que l'injection à la souris de l'antigène variable issu d'une population clonée, induisait bien chez cet animal, une protection contre l'infestation ultérieure par le même clone.

Il démontra également, que le traitement par la trypsine des trypanosomes sanguicoles coïncidait, d'une part avec la disparition en gel de polyacrylamide de la bande protéique correspondant à l'antigène variable, d'autre part avec la perte du pouvoir infectieux des parasites.

Une série d'articles ont été publiés depuis par CROSS et son équipe, apportant de nouvelles précisions sur la composition chimique et la structure des antigènes variables caractérisés en 1975. Ces résultats seront détaillés ultérieurement, afin de permettre la discussion et la comparaison avec nos propres résultats, obtenus sur les antigènes variables de *T. equiperdum*.

C H A P I T R E II

TRAVAUX PERSONNELS

A - INTRODUCTION

Notre étude biochimique des antigènes variables spécifiques de variants (AVS) de *Trypanosoma equiperdum* fait directement suite au travail réalisé à l'Université de Bordeaux par CAPBERN et Coll. (1977). Ceux-ci ont étudié le phénomène de la variation antigénique chez ce parasite du cheval qui, rappelons le, n'est pas pathogène pour l'Homme.

La souche qu'ils ont utilisée détermine chez le lapin une affection chronique, mortelle en un mois à un mois et demi, tandis que l'affection déclanchée chez la souris est aigüe, évoluant en une seule vague parasitémi- que, rapidement mortelle (2 à 3 jours).

Cette souche, fournie en 1961 par l'Institut Pasteur de PARIS, avait été entretenue par passages successifs à la seringue chez la souris (figure N.2). C'est ainsi qu'un type antigénique prédominant avait été isolé par clonage et appelé, selon la nomenclature proposée par LUMSDEN et Coll. (1967) : BoTaT-1 (Bordeaux Trypanozoon Antigenic-type 1).

Pour effectuer leur étude de la variation antigénique de *T. equiperdum*, CAPBERN et Coll. (1977) ont infesté 11 lapins à l'aide de clones antigéniquement différents, cinq d'entre eux étant du type BoTaT-1. Ils ont ainsi isolé 101 variants dérivés de cette souche, ce qui a permis les observations suivantes :

TRYPANOSOMA EQUIPERDUM (SOUCHE INSTITUT PASTEUR DE PARIS)

Entretien en laboratoire depuis 1961

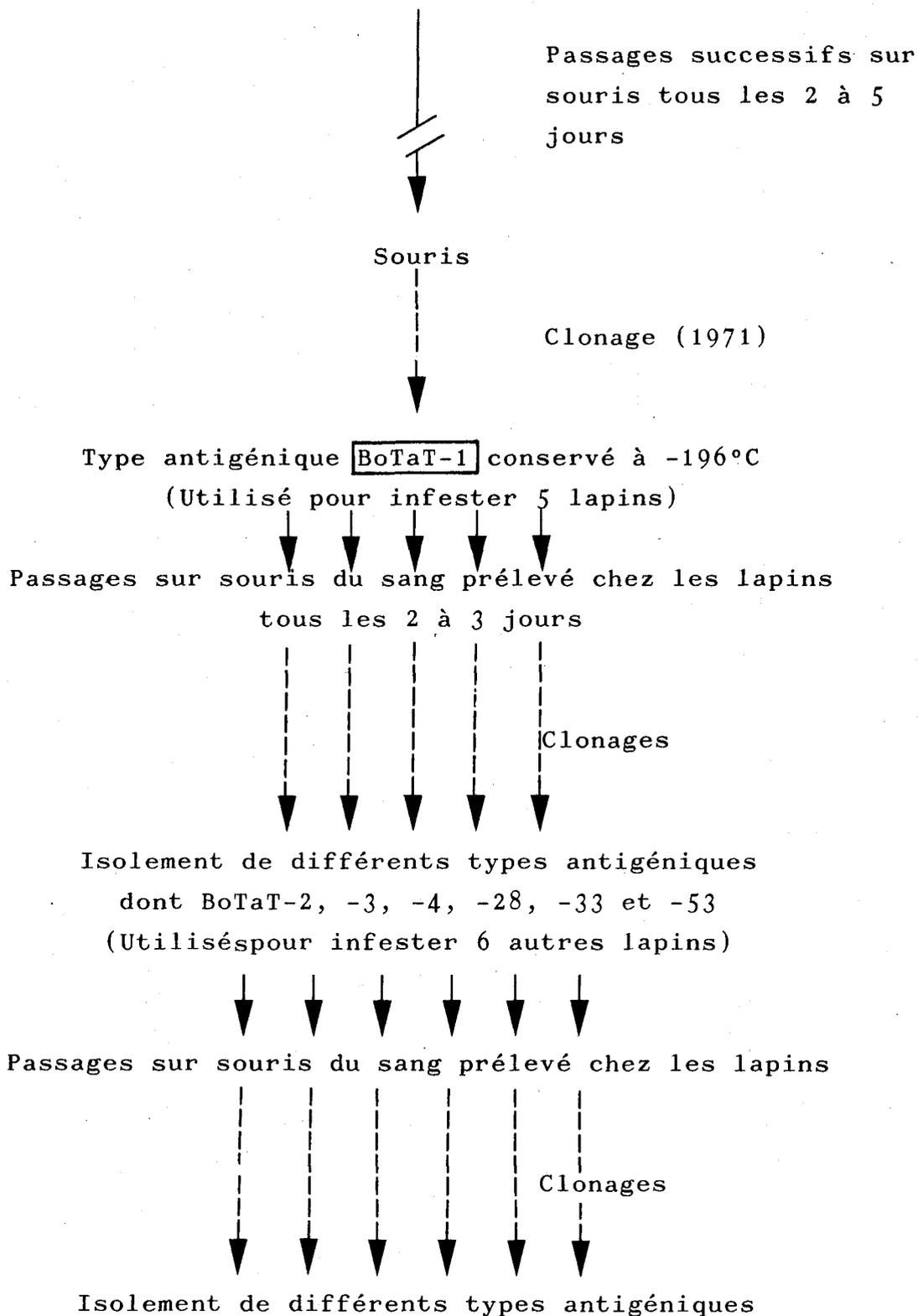


FIGURE N.2



- 1° - Les différents variants apparaissent très rapidement chez le lapin, puisqu'il est possible d'isoler un nouveau type en moyenne tous les trois jours.
- 2° - Le premier sérotype développé chez chaque lapin correspond toujours à celui ayant servi à l'inoculation.
- 3° - Chez les animaux infestés à l'aide de clones autres que BoTaT-1, c'est toujours ce variant qui apparaît en premier, immédiatement après le sérotype inoculé.
Le type BoTaT-1 semble donc être super dominant et on peut le considérer comme le "type de base" de la souche.
- 4° - Quelque soit le variant inoculé au départ, c'est la même série de variants qui est retrouvée chez les différents lapins, notamment au cours des trois premières semaines de la maladie. Ces variants ont donc été séparés en trois catégories, en fonction de leur délai d'apparition chez cet animal.
 - types "précoces", apparaissant dans les trois premières semaines de la maladie.
 - types "semi-tardifs" se développant au delà des trois premières semaines.
 - types "tardifs", apparaissant seulement chez les lapins ayant survécu plus d'un mois.

Les AVS de quelques uns de ces variants ont été isolés et purifiés selon le protocole mis au point par BALTZ et Coll. (1976), dont une description détaillée sera donnée ultérieurement. Nous avons ainsi reçu des préparations correspondant à l'AVS :

- Du type de base : BoTaT-1.
- De variants précoces : BoTaT-2, 3, 4.
- De variants semi-tardifs : BoTaT-78, 100.
- De variants tardifs : BoTaT-20, 28, 51.

Notre travail a consisté à effectuer dans un premier temps une étude générale, conduisant à une définition globale des différentes entités antigéniques sur le plan biophysique et biochimique.

Dans un second temps, nous avons débuté une étude structurale en nous limitant pour cela à deux AVS : celui du type de base BoTaT-1, et celui d'un variant tardif, BoTaT-28. Notre but était de mettre en évidence un ou des motifs communs à ces deux antigènes glycoprotéiques. Il n'est pas interdit de penser, en effet, que s'il existe un motif structural commun à la fois au type de base qui est donc le plus précoce et à un variant tardif, celui-ci sera retrouvé chez tous les variants de la souche. On assisterait alors à un phénomène proche de celui observé pour les immunoglobulines, avec présence d'une partie variable et d'une partie constante (HILSCHMANN et CRAIG, 1966). Cette partie constante, si elle existe, et si elle possède une activité immunogène, pourrait alors être utilisée dans un but de prévention, afin de protéger l'animal contre une infestation ultérieure. Le caractère unique ou la multiplicité des sites antigéniques à l'origine de la synthèse d'anticorps par l'hôte, pourrait peut-être également être précisé par cette étude structurale.

B - PREPARATION DES AVS DE T. EQUIPERDUM

La purification des AVS de variants est réalisée au laboratoire d'Immunologie et de Biologie Parasitaire du Professeur PAUTRIZEL à l'Université de Bordeaux II, selon un protocole mis au point par BALTZ et Coll. (1976), comprenant deux grandes étapes :

- 1° - Une étape de préparation des extraits antigéniques bruts à partir des trypanosomes vivants.
- 2° - Une étape de purification de la glycoprotéine variable à partir de l'extrait brut.

Les grandes quantités de parasites requises pour ce travail de purification sont obtenues par infestation intrapéritonéale de rats Wistar, de sexe mâle, d'un poids moyen de 500 g. L'inoculum correspond à 10^8 trypanosomes issus d'une population clonée, conservée à -196°C dans l'azote liquide.

Dès le troisième jour, la parasitémie est intense, provoquant la mort de l'animal sans qu'il y ait eu variation antigénique. De ce fait, la population de trypanosomes présente dans le sang des rats au moment de leur sacrifice, c'est-à-dire à l'acmé de la parasitémie, est estimée homogène à 99.99 % (VAN MEIRVENNE et Coll., 1975 a). Généralement trente rats sont infestés simultanément, ce qui permet d'obtenir en moyenne $8 \cdot 10^{10}$ trypanosomes à chaque série préparative.

1) Préparation des extraits antigéniques bruts (Tableau II).

Toutes les étapes de cette préparation sont réalisées à $+4^\circ\text{C}$ afin d'assurer une meilleure survie des trypanosomes.

Le sang de rat fortement parasité est prélevé sous héparine par ponction abdominale, dès le sacrifice de l'animal. Ce sang est dilué de moitié par addition d'une solution saline de faible molarité : NaCl 0.045 M, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.057 M, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.003 M, glucose 1 % (eau physiologique T.G.). Une partie des hématies est alors précipitée par addition de dextran (PHARMACIA, T500), étape suivie d'une centrifugation à basse vitesse. Le surnageant contenant les parasites, encore contaminés par la présence des globules rouges est prélevé par aspiration sous vide et déposé en continu sur une colonne de DEAE-Cellulose ajustée à pH 8.0, selon la technique de LANHAM et GODFREY (1970).

Cette étape de chromatographie d'échange ionique permet d'obtenir une suspension homogène de trypanosomes, les globules rouges étant retenus sur l'échangeur à pH 8.0.

Les trypanosomes ainsi purifiés, et toujours en vie, sont ensuite lavés à plusieurs reprises par l'eau physiologique T.G., avant d'être repris dans 120 ml d'un tampon phosphate 0.125 M de pH 5.5 renfermant 1 % de glucose et laissés une nuit à +4°C, sur agitateur de Kline. Par ce traitement à pH 5.5, les antigènes variables du manteau sont libérés dans le milieu ; une étape de centrifugation est alors nécessaire pour éliminer le culot de trypanosomes résiduels, désormais dépourvus de manteau. Le surnageant est alors dialysé contre une solution de NaCl 0.5 M : il contient, en dehors des antigènes du manteau de surface un certain nombre d'éléments membranaires ou intracellulaires provenant de la lyse d'un faible pourcentage de trypanosomes, lyse inévitable dans les conditions expérimentales retenues.

Le matériel insoluble est facilement éliminé par ultracentrifugation (Ultracentrifugeuse BECKMAN, rotor SW 40, 3 000t/min., 1 h), le surnageant résultant constituant "l'extrait antigénique brut". Ce dernier renferme, outre l'AVS, un certain nombre d'antigènes communs solubles, d'origine cytoplasmique, mis en évidence en immunoélectrophorèse et en électrophorèse en gel de polyacrylamide (BALTZ et Coll., 1976).

2) Purification de l'AVS à partir de l'extrait antigénique brut (Tableau III)

Les AVS sont séparés des antigènes communs par chromatographie d'affinité sur colonne de Sépharose Concanavoline A. Etant de nature glycoprotéique et renfermant (comme nous le reverrons dans le chapitre traitant de leur composition chimique) du mannose, ils sont retenus sélectivement par cette lectine.

TABLEAU II

PROCOLE DE PURIFICATION DES AVS DE VARIANTS DE

TRYPANOSOMA EQUIPERDUM (BALTZ et Coll., 1976)

- PREPARATION DE L'EXTRAIT ANTIGENIQUE BRUT

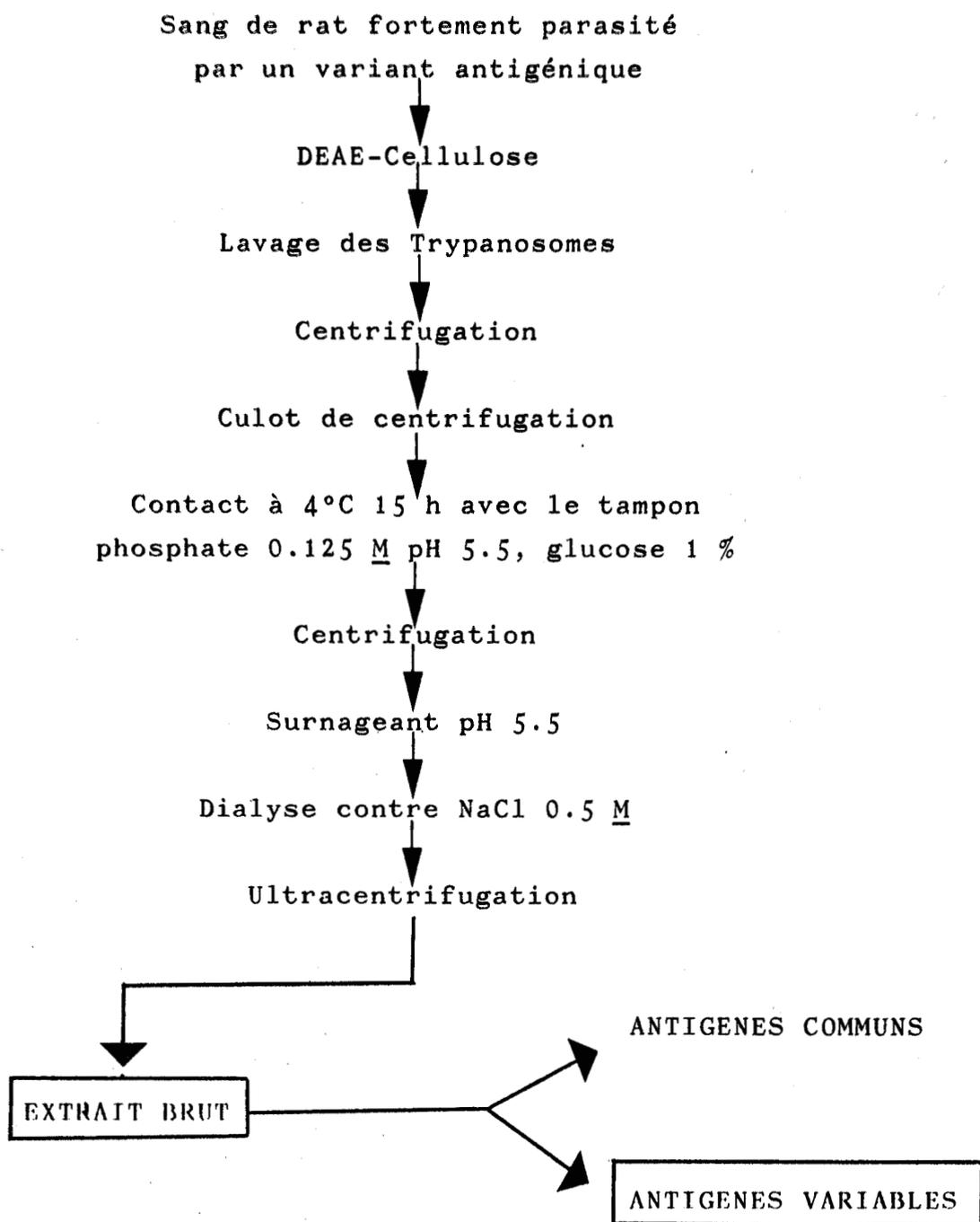
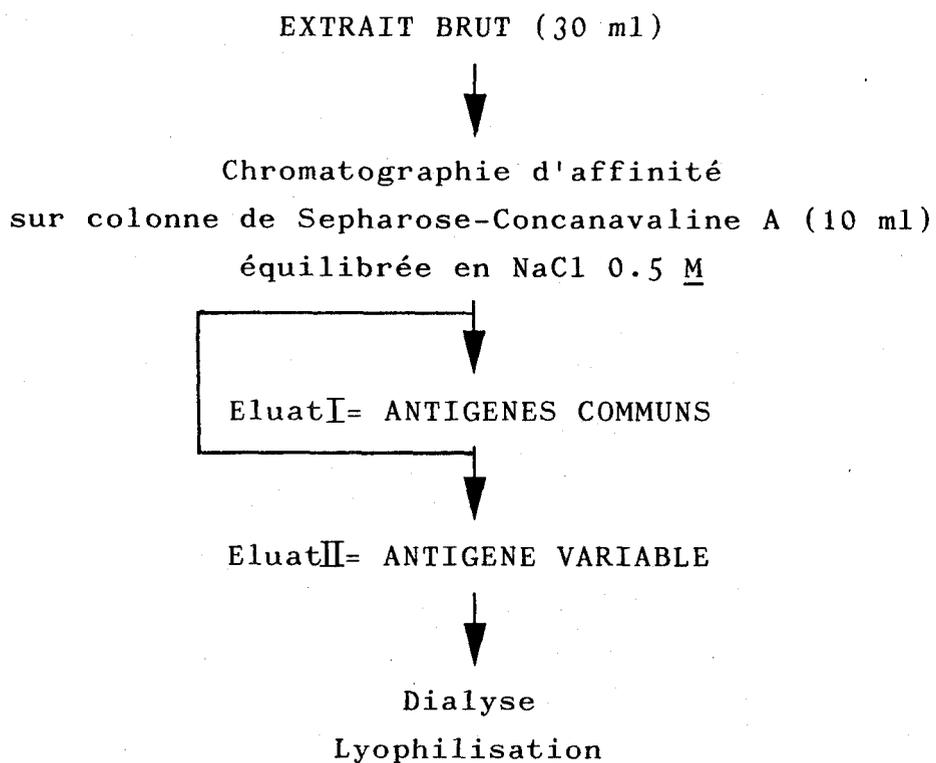


TABLEAU III

- PURIFICATION DE L'AVS A PARTIR DE L'EXTRAIT BRUT.



(30 rats ; $8 \cdot 10^{10}$ Trypanosomes ; 100 mg d'antigène)



Les antigènes communs, non retenus, sont entraînés par une solution de chlorure de sodium 0.5 M (éluat I). Lorsque que l'absorption densitométrique de l'éluat mesurée à 280 nm devient nulle, l'éluat est poursuivie par passage d'une solution de chlorure de sodium 0.5 M enrichie à 10 % (p/v) de α -méthyl-D-mannoside (éluat II). L'éluat II est recueilli et dialysé contre de l'eau distillée avant d'être lyophilisé. Son étude en immunoélectrophorèse et en électrophorèse en gel de polyacrylamide montre que dès ce stade, il correspond à l'AVS dans un état de pureté satisfaisant (figure N.3).

C'est à partir de ce protocole que BALTZ et collaborateurs ont pu préparer toute une série d'antigènes variables, correspondant à des sérotypes précoces, semi-tardifs ou tardifs, sur lesquels ont été effectués au laboratoire, les travaux qui vont être décrits.

C - ETUDE DES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES AVS DE VARIANTS DE TRYPANOSOMA EQUIPERDUM

Cette étude physico-chimique a été limitée aux déterminations suivantes :

1° - Propriétés physiques :

- Détermination de la masse moléculaire.
- Etude de la structure secondaire en dichroïsme circulaire.

2° - Propriétés chimiques :

- Composition en acides aminés
- Composition en sucres
- Nature de l'acide aminé situé en position N-terminale.
- Nature de l'acide aminé situé en position C-terminale.

Les grandes quantités de matériel requises pour mener à bien certaines expérimentations ne nous ont malheureusement pas permis de faire une étude complète de tous les AVS. Nous donnerons donc, pour chaque paramètre envisagé, l'identité des AVS étudiés.

1 - Etude des propriétés physiques

a) Détermination de la masse moléculaire

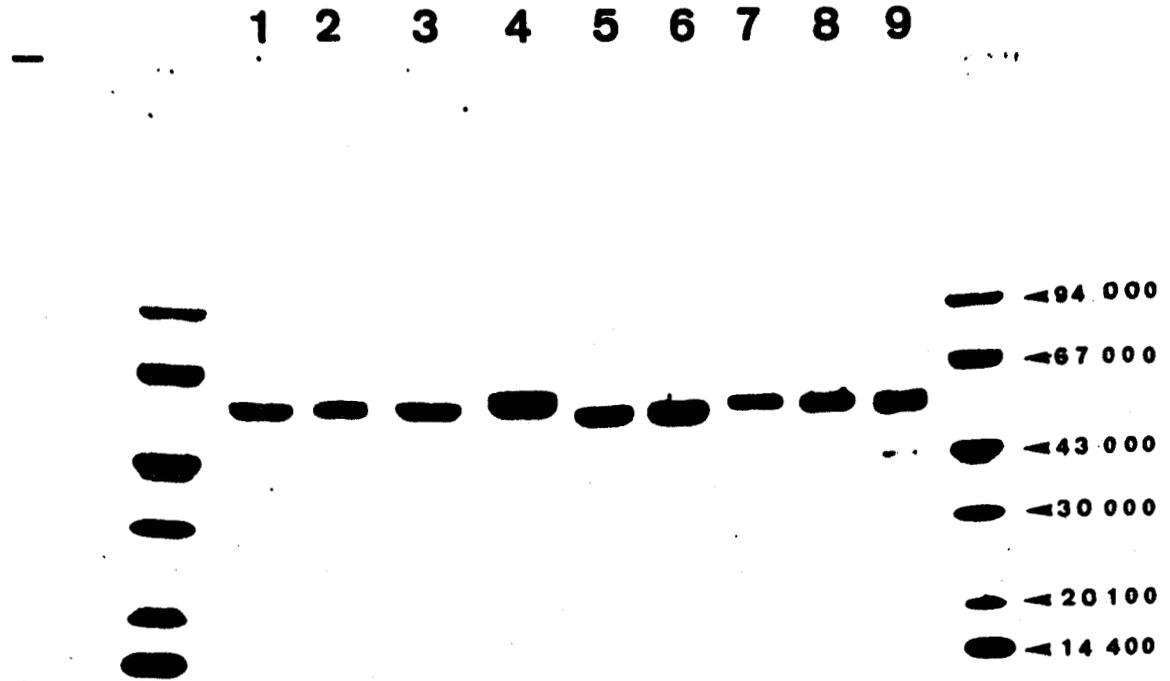
Cette détermination a été effectuée, en comparant le comportement électrophorétique des AVS, en gel de polyacrylamide en présence de SDS, à celui de témoins de masse moléculaire connue et comprise entre 14 400 et 97 000 daltons. La technique utilisée est détaillée dans l'appendice technique (p.1). Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure N.3.

Les valeurs trouvées sont comprises entre 52 000 et 56 000 daltons (Tableau IV), témoignent d'une hétérogénéité des différents AVS au niveau de leur masse moléculaire. Cette hétérogénéité peut certes refléter une variation réelle d'origine génétique, mais elle peut également résulter d'une protéolyse partielle pouvant survenir lors du traitement des parasites à pH 5.5

Nous avons signalé en effet qu'il pouvait alors se produire une lyse d'un petit nombre de trypanosomes, conduisant à la libération dans le milieu de leur contenu cellulaire. Il est très possible de ce fait, que des enzymes protéolytiques d'origine plasmique ou lysosomiale, activés en pH acide, puissent agir sur les glycoprotéines de surface au moment de leur libération et ceci malgré le maintien des préparations à +4°C durant tout le temps du contact.

On ne peut pas non plus éliminer complètement l'influence de la configuration moléculaire sur le comportement des AVS lors de leur étude en gel de polyacrylamide, ne serait-ce qu'en fonction des chaînes glycaniques et de leur situation plus ou moins extériorisée par rapport au squelette peptidique.

DETERMINATION DE LA MASSE MOLECULAIRE DES AVS DE VARIANTS
DE TRYPANOSOMA EQUIPERDUM



+ Electrophorèse en gel de polyacrylamide.
Gradient 5-30%. Tampon tris-glycocolle-SDS.

(1) BoTat-1

(4) BoTat-4

(7) BoTat-51

(2) BoTat-2

(5) BoTat-20

(8) BoTat-78

(3) BoTat-3

(6) BoTat-28

(9) BoTat-100



FIGURE N.3

Enfin, les différences observées, par exemple entre l'AVS de BoTaT-1 et de BoTaT-28, n'excèdent pas 2 000 pour une masse moléculaire de l'ordre de 52 à 54 000. Là encore, notre interprétation demande à être nuancée en fonction des limites mêmes de la technique utilisée.

b) Etude en dichroïsme circulaire*

1° - Réalisation des spectres dichroïques des AVS natifs

Cette étude a été réalisée sur les AVS des variants BoTaT-1, 2, 3, 4, 20, 28, 51, 78 et 100, afin d'établir une comparaison de leur organisation secondaire.

Les spectres dichroïques ont été déterminés selon le protocole décrit dans l'appendice technique (p. 7). Des tracés très voisins ayant été obtenus, d'une part pour les AVS des variants BoTaT-2, 3, 4, 78 et 100, d'autre part pour l'AVS des variants BoTaT-20 et 51, nous n'avons représenté dans la figure N.4 qu'un seul spectre caractéristique de chacune de ces catégories d'AVS. Les pourcentages respectifs de structure α hélicoïdale, en feuillets plissés β , ainsi que de structure inorganisée et de β turn, calculés à partir des spectres sont rassemblés dans le Tableau V.

Il apparait à la lecture de ce tableau que les résultats obtenus permettent de répartir les AVS en quatre groupes distincts par leur structure secondaire :

- Le groupe I est représenté par l'AVS du "type de base" BoTaT-1, caractérisé par la forte proportion de structure hélicoïdale α : près de 50 %.
- Le groupe II est constitué par l'AVS du variant tardif BoTaT-28 dont l'organisation secondaire apparait tout à fait différente de celle de BoTaT-1 ; on assiste en effet, par rapport à ce dernier, à une nette augmentation du pourcentage de structure inorganisée et de β turn,

* Nous remercions vivement Monsieur J.P. AUBERT, Chargé de Recherches INSERM (Unité N°124) pour avoir réalisé l'ensemble de ces études physiques des AVS par dichroïsme circulaire.

SPECTRES DICHROIQUES DES AVS DE VARIANTS DE
TRYPANOSOMA EQUIPERDUM

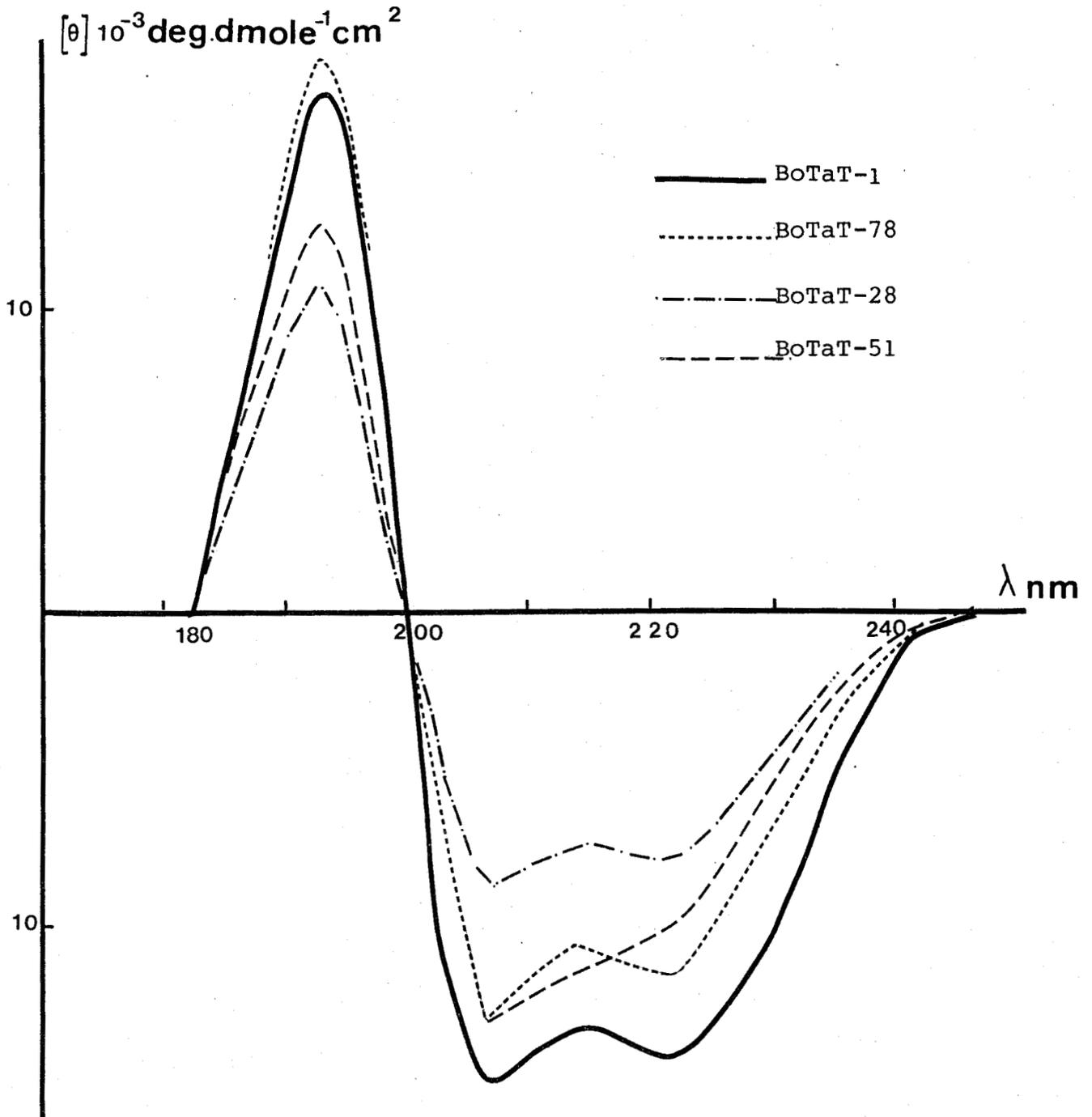


FIGURE N.4



T A B L E A U V

EVALUATION DE LA STRUCTURE II DES AVS DE VARIANTS DE

TRYPANOSOMA EQUIPERDUM

AVS DES VARIANTS	Hélice α	Feuillets plissés β	Structure inorganisée et β turn
BoTat-1	49 %	25 %	26 %
BoTat-2, 3, 4, 78 100.	35 %	33 %	32 %
BoTat-28	28 %	29 %	43 %
BoTat-20, 51.	33 %	49 %	18 %

acquise au détriment, semble-t-il, de la structure hélicoïdale et atteignant près de 50 %.

- Le groupe III qui rassemble les AVS des variants précoces et semi-tardifs, semble intermédiaire aux deux premiers groupes décrits, avec une proportion équivalente de chacune des trois structures.
- Le groupe IV enfin, représenté par les AVS des variants tardifs BoTaT-20 et 51, forme une catégorie originale, tout à fait différente des trois précédentes, caractérisée par sa richesse en feuillets plissés β : près de 50 %. C'est ce groupe qui apparaît le plus "organisé".

De l'ensemble des résultats obtenus, une question peut-être posée : le petit nombre de variants étudiés nous présente-t-il toutes les possibilités de configuration ? On ne peut en effet éliminer l'hypothèse d'autres variants formant d'autres groupes.

2° - Etude de la variation de la structure secondaire en fonction de la température.

Cette étude a été conduite en deux étapes afin de préciser, d'une part la température à partir de laquelle le spectre dichroïque était modifié, attestant ainsi une dénaturation de la glycoprotéine, d'autre part de déterminer si le retour progressif 0°C était ou non accompagné du recouvrement de la structure secondaire initiale.

- Augmentation de la température

La température de départ fixée à +4°C a été augmentée progressivement jusqu'à +70°C par paliers successifs de 5°C.

VARIATION DE LA STRUCTURE II EN FONCTION DE LA

TEMPERATURE

$[\theta]_{222} 10^{-3}$

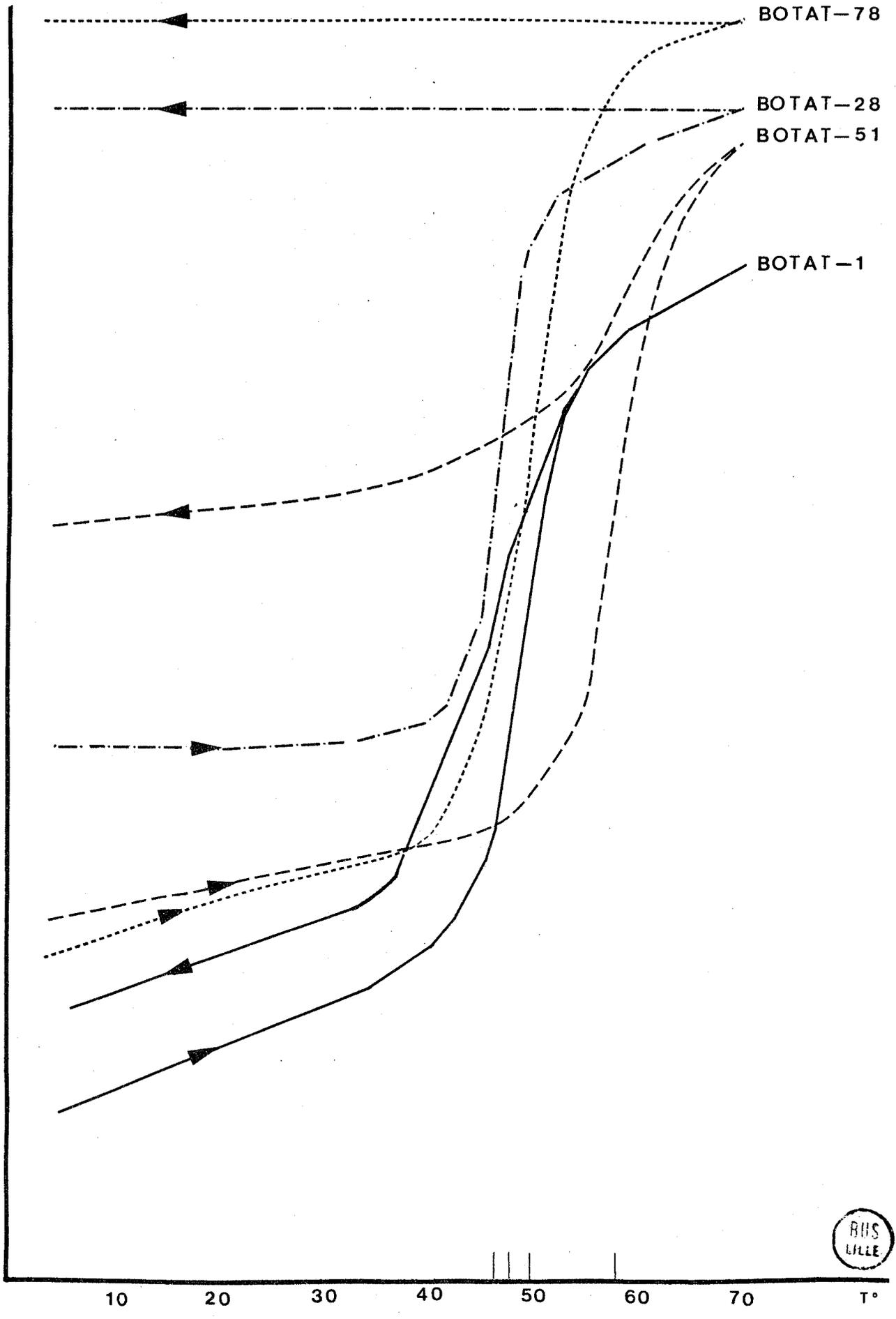


FIGURE N.5

Une modification des spectres dichroïques des AVS des variants BoTaT-1, 28, 2, 3, 4, 78 et 100 (groupes I, II et III) a été observée pour des valeurs de température voisines, comprises entre 45 et 50°C. Les AVS du groupe IV (BoTaT-20 et 51), les plus riches en structure plissée β se sont révélés plus résistants à la dénaturation thermique, la perte de leur structure secondaire n'intervenant que pour une température de 60°C.

- Retour progressif à 0°C.

Ainsi qu'il apparaît dans la figure N.5, le retour progressif à 0°C s'est accompagné d'une "renaturation" quasi totale de l'AVS du type de base BoTaT-1 et d'une renaturation partielle des AVS de BoTaT-20 et 51. Aucun recouvrement de la structure initiale n'est apparu pour les AVS des autres variants étudiés. Cette évolution des spectres en fonction de la température apporte encore, s'il était besoin, un élément dans la distinction en "groupes" des AVS et confirme la définition initiale de leur structure secondaire.

2 - Etude des propriétés chimiques

a) Composition en acides aminés

Les compositions en acides aminés ont été réalisées sur tous les AVS et sont rassemblées dans le Tableau VI.

L'examen de ce tableau suggère les remarques suivantes :

- 1° - La composition en acides aminés est différente selon les AVS et caractéristique de chacun d'eux. La différence est particulièrement significative au niveau du nombre de résidus de leucine qui, si l'on exclut les deux variants tardifs BoTaT-20 et 51, diminue progressivement à mesure que l'on avance dans la séquence d'apparition des sérotypes. Ce nombre passe en effet de 49 résidus pour

COMPOSITION EN ACIDES AMINES DES AVS DE VARIANTS DE TRYPANOSOMA EQUIPERDUM

Acides Aminés *	BoTaT-1	BoTaT-2	BoTaT-3	BoTaT-4	BoTaT-78	BoTaT-100	BoTaT-20	BoTaT-28	BoTaT-51
Asp	60.00	42.05	51.60	51.60	45.80	54.95	52.45	45.55	54.95
Thr	43.55	53.70	55.35	43.35	52.40	52.65	52.85	55.55	45.25
Ser	27.50	34.65	29.55	28.45	25.85	22.20	16.60	27.70	26.25
Glu	59.15	62.05	68.05	67.35	71.05	67.45	84.40	71.00	71.45
Pro	18.95	18.15	12.70	25.80	15.95	29.40	19.05	22.50	20.25
Gly	34.60	31.45	34.95	31.50	32.90	35.70	36.60	37.70	33.80
Ala	80.90	75.35	65.10	71.65	70.50	66.05	58.60	77.50	60.90
Val	13.85	16.30	18.60	8.20	16.05	13.90	20.40	19.10	14.05
Cys 1/2	4.85	6.05	10.75	6.00	6.25	6.60	5.85	7.50	7.25
Met	4.35	2.95	-	6.30	4.45	2.45	-	3.05	2.25
Ile	10.60	20.55	15.90	23.40	17.55	14.15	15.05	12.10	14.25
Leu	49.10	38.20	34.90	34.65	31.70	26.80	35.35	18.85	40.85
Tyr	10.40	13.05	12.45	14.65	10.20	13.45	10.85	11.50	10.60
Phe	11.95	8.00	9.75	12.95	15.15	9.60	9.35	15.75	16.55
Lys	48.35	47.95	59.30	53.85	58.05	56.60	61.65	51.65	58.25
His	3.50	10.20	10.15	7.95	7.00	13.70	6.45	3.65	7.75
Arg	16.95	17.00	8.80	10.25	13.80	11.40	12.70	15.05	15.35
Trp	1.55	2.30	2.00	2.05	5.3	2.90	1.70	4.20	N.D.

* Résultats exprimés en résidus pour 500 résidus.

TABLEAU VI

(En fonction des M.M., des pourcentages de sucres, 500 résidus représentent une expression proche du nombre de résidus par mole)



500 résidus pour l'AVS de BoTaT-1 à seulement 19 résidus (pour 500) pour l'AVS du variant tardif BoTaT-28 avec des quantités intermédiaires se situant entre 38 et 27 résidus pour les AVS des variants précoces et semi-tardifs.

Sachant que la leucine est un acide aminé favorisant tout particulièrement l'organisation en structure α hélicoïdale, les résultats de composition en acides aminés sont à rapprocher de ceux du dichroïsme circulaire, où il était apparu que BoTaT-1 est l'AVS caractérisé par le plus fort pourcentage d'hélicité (49 %) et BoTaT-28 par le plus faible pourcentage (28 %).

2° - Il existe cependant une certaine constante dans la définition globale de l'axe peptidique des AVS des différents variants, avec notamment une forte proportion d'acides aminés dicarboxyliques, de thréonine, de lysine, et surtout d'alanine.

3° - On notera également la présence de résidus de cystéine en proportion variable, laissant envisager la présence de ponts disulfure, et l'importance des acides aminés soufrés dans la structuration primaire et même secondaire de ces glycoprotéines.

b) Composition en glucides

Il ne nous a pas été toujours possible de déterminer la composition glucidique de tous les AVS en raison de problèmes techniques, se traduisant par un très mauvais rendement au niveau de l'étape de triméthylsilylation. Bien qu'une étude systématique de composition de différents lots ait été réalisée, les causes de ces échecs demeurent inexplicées. Trois lots ont permis une détermination quantitative des monosaccharides (Tableau VII).

TABLEAU VII

COMPOSITION GLUCIDIQUE DES AVS DE VARIANTS DE
 TRYPANOSOMA EQUIPERDUM

Monosac- charides *	BoTaT-1	BoTaT-78	BoTaT-28
Mannose	12	12,4	12
Galactose	6,9	6,4	7,2
Glucose	0,6	1,8	1,9
N-acétyl- glucosa- mine	2,4	2,8	2,4

* Résultats exprimés en résidus par mole de glycoprotéine.

Les valeurs obtenues révèlent une parfaite identité entre les AVS de BoTaT-1, 78 et 28 au niveau de leur contenu glucidique. Les quatre mêmes monosaccharides ont en effet toujours été retrouvés, c'est-à-dire trois hexoses : le glucose, le galactose et le mannose, et une hexosamine : la N-acétylglucosamine, présents dans des proportions semblables et représentant au total 7 à 8 % du poids sec des glycoprotéines. Aucune trace de galactosamine, d'acide sialique et de fucose n'a été détectée. Le glucose, bien que faiblement représenté dans cette composition glucidique semble néanmoins faire partie intégrante des AVS ; il a en effet toujours été retrouvé, au cours de nombreux dosages répétitifs effectués sur la même préparation et sur des lots provenant de préparations différentes.

c - Identification de l'acide aminé situé en position N-terminale

L'acide aminé situé en position N-terminale n'a pu être identifié pour tous les AVS soumis à cette étude, un grand nombre d'entre eux n'ayant pu être solubilisés parfaitement dans le tampon propanol, diméthylallylamine, eau, pH 9.5 préconisé habituellement dans la technique classique de dégradation de EDMAN par méthode manuelle. Aucune amélioration de la solubilisation n'a pu être apportée :

- Par addition d'un agent dénaturant tel que le sodium dodécyl sulfate à la concentration de 1 %
- Par augmentation de la force ionique du milieu avec du chlorure de sodium.
- Par une étape de dialyse après dissolution préalable dans du NaCl 1 M, condition devant permettre la dissociation d'éventuels complexes.

Ce problème que nous discuterons dans la conclusion de ce chapitre, n'a pas encore trouvé de solution. Les résultats positifs obtenus sont rassemblés dans le tableau VIII. Un résidu d'alanine a été identifié 3 fois, respectivement pour les AVS de BoTaT-1, 78 et 100. Le glycolle est en position N-terminale de l'AVS de BoTaT-28.

T A B L E A U VIII

ACIDE AMINE SITUE EN POSITION N-TERMINALE DES AVS DES VARIANTS DE
TRYPANOSOMA EQUIPERDUM

AVS DES VARIANTS	ACIDE AMINE EN POSITION N-TERMINALE
BoTaT-1	ALA
BoTaT-78	ALA
BoTaT-100	ALA
BoTaT-28	GLY



d - Identification de l'acide aminé situé en position C-terminale

Pour procéder à l'identification de l'acide aminé situé en position C-terminale, nous avons eu recours à une méthode chimique, l'hydrazinolyse et à deux protocoles enzymatiques, l'action de la carboxypeptidase Y et l'action du mélange des carboxypeptidases A et B.

- Hydrazinolyse

L'hydrazinolyse a été effectuée sur tous les AVS de variants de T. equiperdum, selon la technique détaillée p.15 de l'appendice technique. Les produits de la réaction ont été déposés sur autoanalyseur afin de déterminer l'acide aminé non modifié par l'hydrazine. Les diagrammes obtenus ne nous ont pas permis d'identifier avec certitude un acide aminé particulier. En effet, les profils d'élution enregistrés ont fait apparaître de nombreux pics parasites, aucun ne correspondant au temps de rétention caractéristique d'un acide aminé donné. Le "parasitage" étant très vraisemblablement le fait de la nature glycoprotéique du matériel étudié, nous avons préféré ne pas tenir compte des résultats de cette première méthode d'étude.

- Action de la carboxypeptidase Y

Nous avons fait agir la carboxypeptidase Y (CPY) sur 6 AVS de variants de T. equiperdum. Il s'agit des AVS :

- du type de base : BoTaT-1
- du type précoce : BoTaT-2
- des types semi-tardifs : BoTaT-78 et 100
- des types tardifs : BoTaT-20 et 28

Le protocole suivi pour cette cinétique enzymatique est détaillé p.15 (partie technique). Des prélèvements ont été effectués aux temps 0, 1h, 2h, 6h, et 24h d'hydrolyse. Les résultats obtenus pour chaque AVS sont reportés

dans les figures 6.

L'examen des cinétiques montre que la CPY a libéré toujours les mêmes acides aminés quelque soit l'AVS soumis à son action. Il s'agit de l'alanine, la leucine, la thréonine et la tyrosine. On assiste également à la libération de résidus de sérine, d'acide glutamique et de lysine, mais seulement pour certains AVS et dans des proportions moindres.

- Action du mélange des carboxypeptidases A et B. (CPA + B)

Les mêmes préparations que celles utilisées pour l'hydrolyse par la CPY ont été soumises à l'action du mélange des carboxypeptidases A et B dans les conditions décrites dans le chapitre technique (p.16). Les temps d'incubation ont été légèrement modifiés, de manière à obtenir un profil et une cinétique plus précis de libération des acides aminés, au cours des trois premières heures d'hydrolyse. Des prélèvements ont donc été effectués aux temps 0, 20', 40', 90', 2h 30, 4h, 6h, 10h et 24h. Les cinétiques de cette seconde expérience de dégradation enzymatique sont reportées dans les figures 7.

A l'examen des résultats, nous pouvons avancer les remarques suivantes :

- 1° Nous n'avons observé aucune libération significative d'acides aminés par l'AVS du type de base BoTaT-1 avant le temps d'hydrolyse 24h.
- 2° Pour les cinq autres AVS, les cinétiques d'hydrolyse par le mélange des carboxypeptidases A et B sont souvent voisines de celles déjà observées lors de l'hydrolyse par la CPY. Néanmoins, nous avons enregistré des différences entre ces deux séries d'expérience, tant au niveau du rendement de libération des acides aminés, qu'au niveau de la nature même

de ceux-ci. En effet, les quatre acides aminés toujours retrouvés pour tous les AVS sont dans ce cas : l'alanine, la leucine, la tyrosine et la lysine. Sur les quatre acides aminés cités, les trois premiers seulement étaient également dominants dans la première expérience enzymatique (CPY). Nous remarquerons également que la thréonine, acide aminé rapidement libéré par la CPY, n'apparaît cette fois qu'après des délais d'incubation beaucoup plus longs ; il est même absent de la cinétique de l'AVS du variant BoTaT-2.

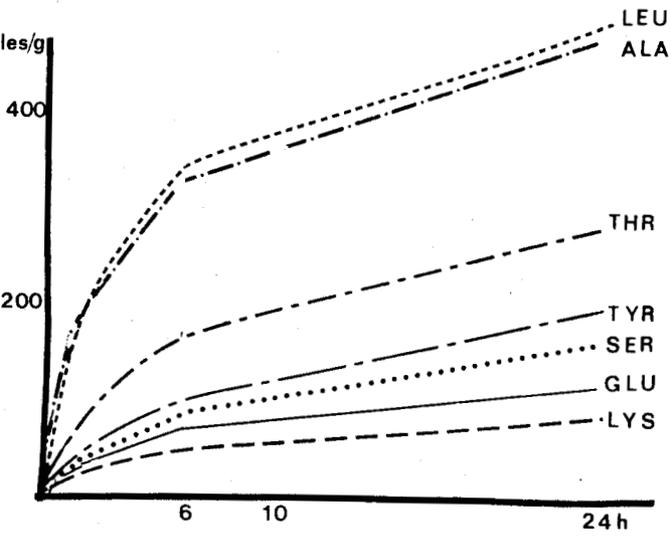
3° a. Les différences enregistrées entre les quantités libérées par les deux enzymes, d'une part au niveau des résidus de lysine, d'autre part au niveau des résidus d'acide glutamique peuvent s'expliquer par les très mauvais rendements avec lesquels, le premier est clivé par la carboxypeptidase Y (HAYASHI et Coll., 1975) et le second par la carboxypeptidase A (AMBLER, 1967).

b. Par contre, dans le cas des AVS de BoTaT-2 et BoTaT-28, l'absence totale de libération de sérine par le mélange CPA + B est plus difficilement explicable : cet acide aminé, bien qu'il soit clivé lentement de la chaîne peptidique par la CPA (AMBLER, 1967), aurait cependant dû être retrouvé lors de cette seconde expérience enzymatique.

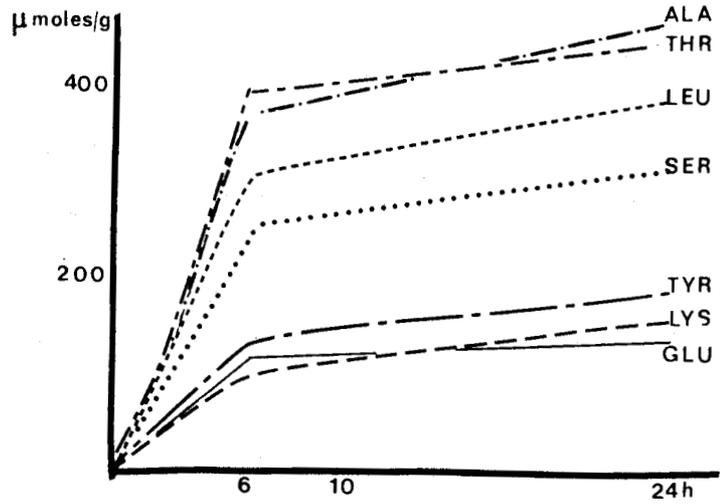
En résumé, les résultats enregistrés actuellement nous permettent, sinon de définir avec certitude la séquence des acides aminés positionnés du côté C-terminal des AVS étudiés, du moins d'identifier le ou les acides aminés présents à cette extrémité. (tableau IX.)

HYDROLYSES PAR LA CARBOXYPEPTIDASE γ

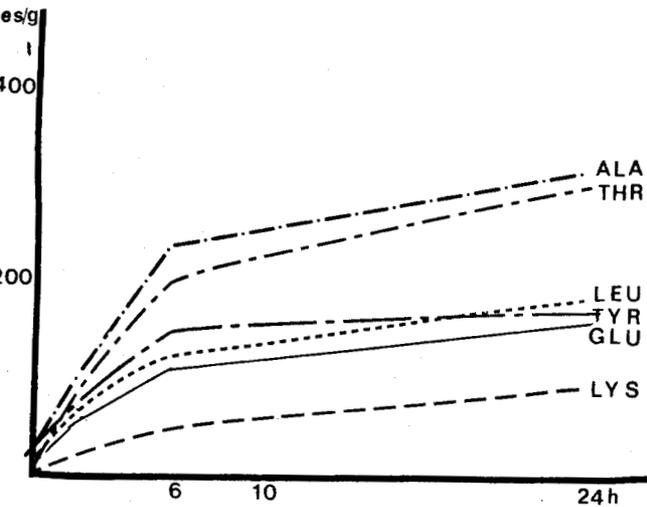
BOTAT-1



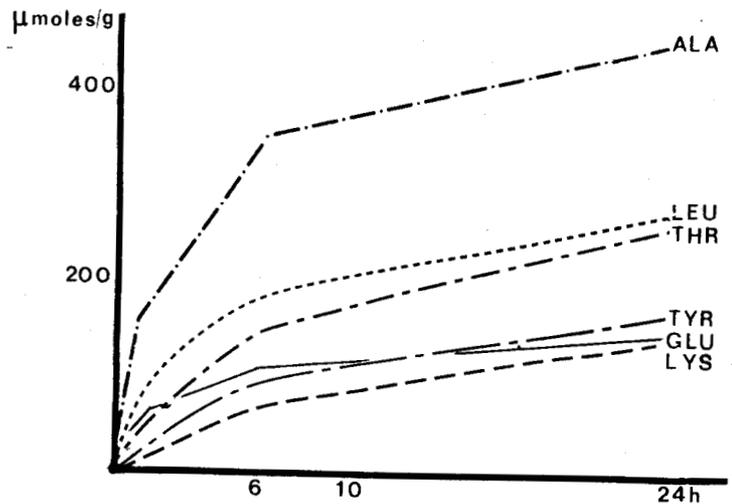
BOTAT-2



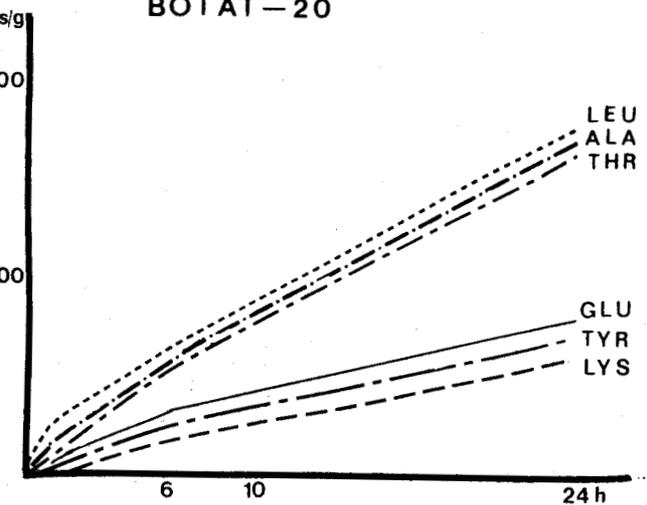
BOTAT-78



BOTAT-100



BOTAT-20



BOTAT-28

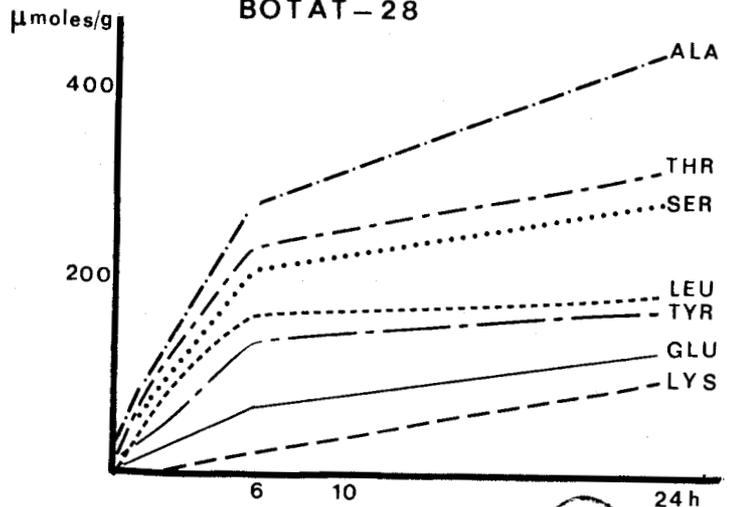


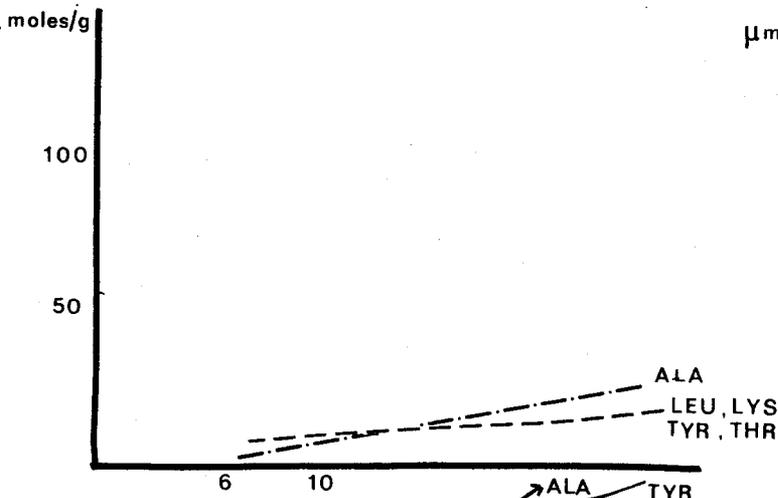
FIGURE N.6



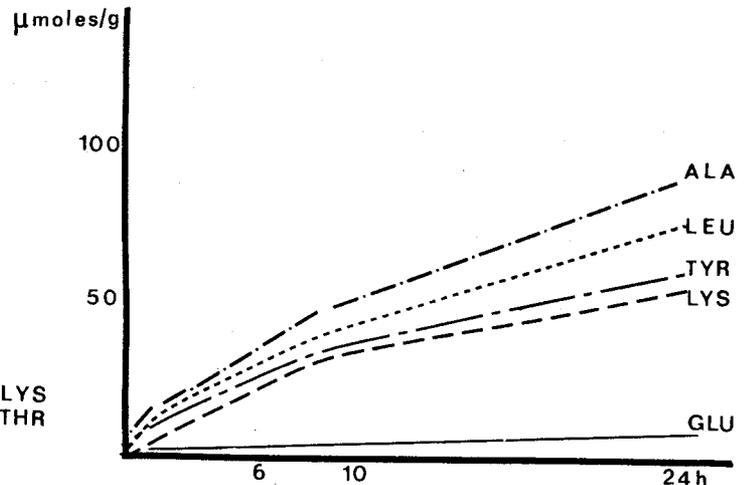
HYDROLYSES PAR LES CARBOXYPEPTIDASES

A ET B

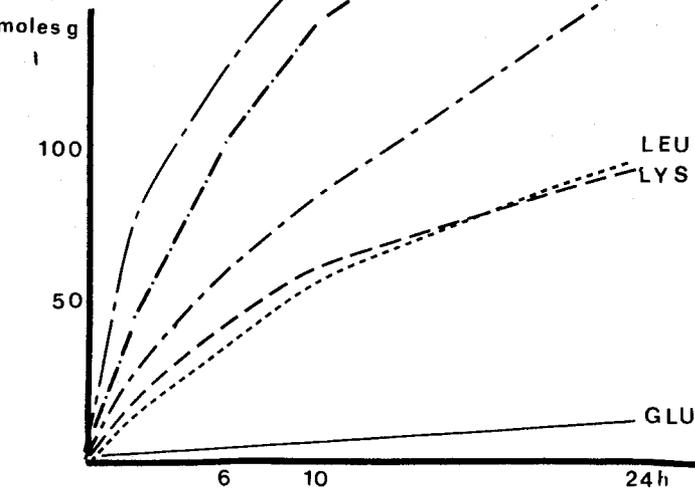
BOTAT-1



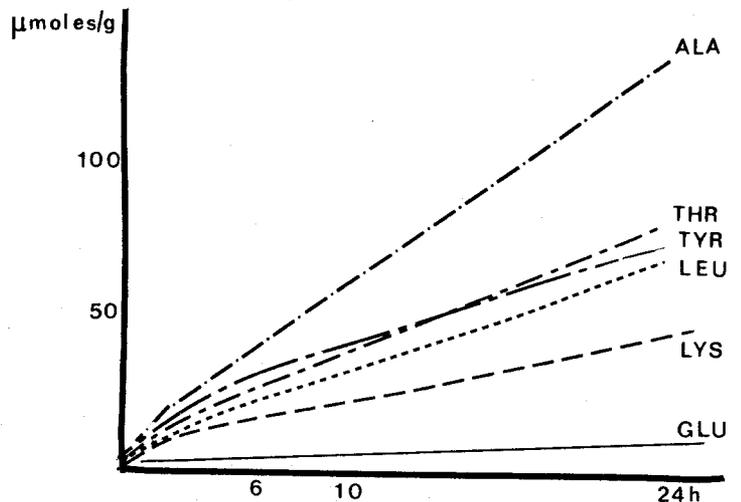
BOTAT-2



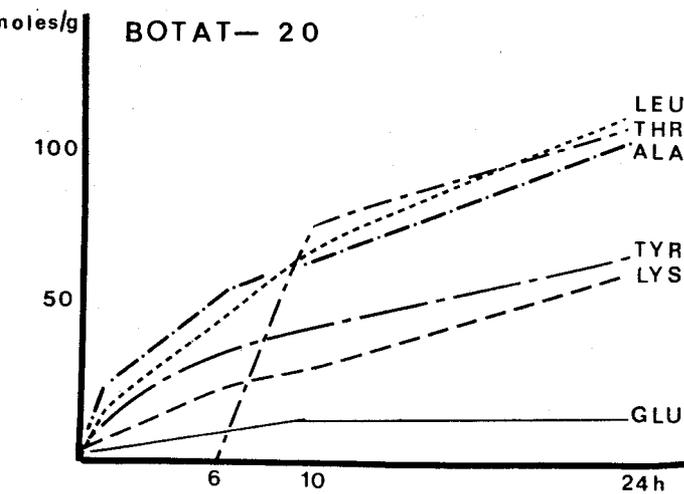
BOTAT-78



BOTAT-100



BOTAT-20



BOTAT-28

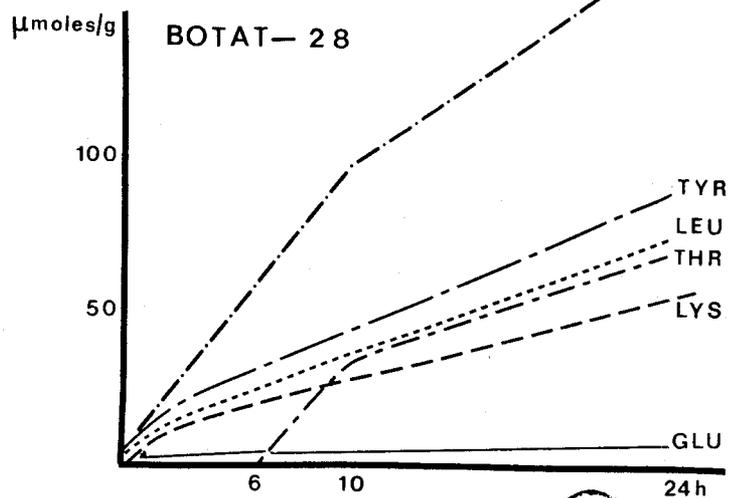


FIGURE N.7



TABLEAU IX

ACIDES AMINES SITUES A L'EXTREMITE C-TERMINALE DES AVS DE VARIANTS DE

TRYPANOSOMA EQUIPERDUM

AVS DES VARIANTS	ACIDE AMINE C-TERMINALE	EXTREMITE C-TERMINALE
BoTaT-1	Leu ou Ala	(Tyr, Thr, Ala, Leu)
BoTaT-2	Ala	(Tyr, Leu, Thr)Ala
BoTaT-78	Ala	(Leu, Thr, Tyr,)Ala
BoTaT-100	Ala	(Leu, Thr, Tyr,)Ala
BoTaT-20	Leu ou Ala	(Tyr, Thr, Ala)Leu
BoTaT-28	Ala	(Thr, Tyr, Leu)Ala

La mise en évidence de plusieurs résidus d'acides aminés amène des éléments de discussion :

- Existe-t-il ou non une contamination des préparations d'AVS par des peptides ?

La sensibilité (moins de 0.5 nanomole de PTH amino acide) de la technique d'identification en chromatographie liquide de haute performance (HPLC) de l'acide aminé N-terminal permet d'attester de l'homogénéité des préparations d'antigène variable. Elle ne met toutefois pas à l'abri de peptides à N-terminaux bloqués, soufrés ou glycosylés.

- Existe-t-il ou non une hétérogénéité des AVS au niveau de leur extrémité C-terminale, et est-elle ou non due à une protéolyse partielle ?

Nous avons déjà évoqué cette notion de protéolyse limitée lors de la présentation des résultats de détermination de masse moléculaire. Nous proposerons dans les conclusions générales de ce chapitre le ou les protocoles à suivre pour nous permettre de retenir ou rejeter cette hypothèse.

- Une limite à l'utilisation des enzymes peut également être évoquée : ces derniers, du fait de la configuration de la glycoprotéine, ont-ils une approche suffisante de l'axe peptidique ? L'absence de libération d'acides aminés par le mélange des carboxypeptidases A et B, dans le cas de l'AVS de BoTaT-1, semble être le témoin de l'enfouissement relatif de l'extrémité C-terminale de cet AVS à l'intérieur de la molécule.

D - DISCUSSION - CONCLUSIONS

L'étude physico-chimique que nous avons effectuée des AVS de variants de T. equiperdum nous permet de les définir avec certitude comme étant des glycoprotéines, d'une masse moléculaire de l'ordre de 54 000 daltons, caractérisées par un axe polypeptidique variable, d'environ 500 résidus d'acides aminés et d'une partie glycanique constante n'excédant pas 8 % du poids sec de la molécule. La variabilité de la chaîne protéique est illustrée par les résultats de la composition en acides aminés et se trouve largement confirmée par les données du dichroïsme circulaire, dont les résultats ne peuvent être expliqués que par l'existence de structures primaires très différentes.

Les difficultés auxquelles nous nous sommes heurtés, tant lors de la détermination de la composition glucidique de certains AVS que lors de la détermination de leur acide aminé situé en position N-terminale, demeurent à ce stade de notre travail inexplicables. Il n'est cependant pas exclu qu'une contamination incontrôlée par des glycolipides ou autres éléments d'origine membranaire conduisant à la formation d'agrégats en soient l'origine, quoique le protocole de purification suivi par BALTZ et Coll. ait toujours été identique.

* Nous sommes tout d'abord tentés, à l'examen des résultats du dichroïsme circulaire, d'établir une corrélation entre structure secondaire des antigènes variables et ordre d'apparition des sérotypes dont ils sont spécifiques. Sur l'ensemble des glycoprotéines membranaires de variants étudiées, il est remarquable d'avoir pu, en quelque sorte, retenir des diagrammes types. Quatre spectres ont pour l'instant été caractérisés.

Si on limite l'analyse au spectre BoTaT-1 (spectre "précoce"), BoTaT-28 (spectre "tardif") et à l'ensemble des spectres des variants précoces et semi-tardifs, il est effectivement possible de discerner une évolution.

Les résultats obtenus avec BoTaT- 20 et -51, semblent infirmer cette filiation et cette évolution progressive des spectres. Il n'est pas interdit de penser que l'examen d'autres antigènes de surface s'inscrive dans d'autres types nouveaux de structuration. La corrélation dichroïsme-variation antigénique deviendrait encore plus perceptible, et autoriserait l'hypothèse de remaniements profonds des spectres, en fonction de variations limitées de séquences de l'axe polypeptidique : "A variation de séquence sur une zone restreinte de l'axe peptidique, pourrait correspondre une grande variation de configuration".

Un autre intérêt du spectre dichroïque est de nous renseigner sur le degré d'organisation moléculaire de ces glycoprotéines de surface. Cette organisation peut d'ailleurs, nous l'avons vu, être confirmée par des expériences de dénaturation-renaturation thermique. Tout revient à dire que, semble-t-il, le variant de base soit le plus "organisé". Est-ce là un hasard ou est-ce la traduction d'une protection relative du type de base ? On sait en effet, que lors de l'infestation, si plusieurs variants sont introduits, un seul persisterait : celui dont l'antigène de surface serait le plus structuré ? Il est encore trop tôt pour pouvoir accrédi-ter cette hypothèse ; on sait toutefois, depuis les travaux de CROSS (1975) que l'injection à la souris de trypanosomes trypsinisés ne se matérialise plus par une multiplication explosive des parasites. Indubitablement, la glycoprotéine de surface est un élément primordial dans le pouvoir infestant du trypanosome.

En résumé, le dichroïsme circulaire semble donc bien constituer une excellente méthode d'étude comparative des AVS. Nous envisageons d'ailleurs de préciser plus avant nos connaissances en réalisant les spectres de ces mêmes AVS, préalablement réduits et alkylés, ceci afin de déterminer, par exemple, l'importance des ponts disulfure dans leur configuration. Cette technique sera aussi utilisée

après protéolyse des AVS et étude des fragments (peptides-glycopeptides) pour définir la notion de "domaines" qui permettrait la "reconstitution" de la molécule native à partir des éléments de séquence.

* Nous discuterons également nos résultats de détermination de masse moléculaire des AVS de variants de T. equiperdum. Nous avons vu que ces valeurs se trouvaient, pour l'ensemble des AVS étudiés, comprises entre 52 000 et 56 000 daltons. Il est possible que la valeur constante de 66 000 daltons avancée en 1976 par BALTZ et Coll. soit le fait de conditions expérimentales différentes.

CROSS (1975), pour sa part, a publié une valeur également constante de 65 000 daltons pour la masse moléculaire de six AVS de variants issus d'une souche de T. brucei tandis que RIFKIN (1977), STRICKLER et Coll. (1978) et ROVIS et Coll. (1978) ont obtenu respectivement, des valeurs de 56 000, 57 à 58 000 et 62 000 daltons pour des AVS de T. brucei, isolés de souches chacune différente de celle de CROSS. Enfin, la masse moléculaire d'un AVS de T. congolense a été récemment estimée à 56 000 daltons par ROVIS et Coll., (1978).

Il semble bien que les valeurs retenues soient pour les uns autour de 55 000 et pour les autres autour de 65 000 daltons : s'agit-il d'un problème réellement technique, ou la taille des antigènes variables issus de souches ou d'espèces différentes de trypanosomes Salivaria, n'est-elle pas toujours identique ? L'hétérogénéité que nous avons révélée quant à nous, au sein d'AVS issus d'une même souche, nécessite confirmation, étant donné les limites mêmes de notre technique et la possibilité, déjà évoquée, d'une protéolyse partielle survenue au cours de la purification. La détermination de ce paramètre par une méthode différente (ultracentrifugation à l'équilibre de sédimentation) et la mise au point de protocoles plus rapides de purification de l'AVS (extraction par des détergents, sonication, chocs thermiques) devrait permettre de

lever l'ambiguïté quant à l'interprétation à donner de ces premiers résultats.

*Autres éléments de discussion : les compositions chimiques.

Nos observations concernant les différences de compositions en acides aminés des AVS de variants de *T. equiperdum* sont en accord avec les résultats de CROSS (1975 1977 ; 1978) obtenus sur *T. brucei* et rassemblés dans le tableau X. Il est intéressant de remarquer que les AVS de variants de *T. brucei* présentent des analogies avec ceux de *T. equiperdum* : ce sont en effet les mêmes acides aminés que l'on retrouve en quantité importante dans les deux cas, c'est-à-dire :

- les acides aminés dicarboxyliques.
- La thréonine.
- L'alanine
- La lysine.

Ce point commun pourrait, s'il était étendu aux antigènes variables d'autres espèces de trypanosomes *Salivaria*, constituer un critère de classification phylogénique.

Les compositions en sucres que nous avons déterminées ont révélé une remarquable analogie entre les AVS au niveau de leur contenu glucidique. Cette observation, faite à partir de seulement trois préparations d'AVS, ne permet pas bien sûr à ce jour une généralisation de ce concept, d'autant que JOHNSON et CROSS (1977), qui ont été les premiers à publier des compositions glucidiques d'antigènes variables établies par chromatographie en phase gazeuse (Tableau XI), aboutissent à des conclusions différentes. Ils ont en effet dosé, à partir de plusieurs AVS de *T. brucei*, les quatre mêmes monosaccharides que ceux identifiés au laboratoire sur *T. equiperdum* (mannose, galactose, glucose et glucosamine), mais dans des quantités globales (6 à 17 % du poids sec) et des rapports molaires différents selon les AVS. En effet, alors que nous avons déterminé un

COMPOSITION EN ACIDES AMINES DES AVS DE VARIANTS DE *TRYPANOSOMA BRUCEI* (CROSS 1978)

Acides Aminés *	48	49	99	55	60	100	104
Asp	79	54	72	59	61	65	54
Thr	68	54	54	72	70	58	53
Ser	33	35	23	41	26	38	33
Glu	65	82	69	62	80	76	82
Pro	16	16	15	26	19	22	16
Gly	37	52	60	32	44	37	55
Ala	76	76	96	97	75	90	78
Val	19	22	18	18	17	20	23
Cys 1/2	16	15	14	14	10	15	12
Met	4	8	10	1	11	4	10
Ile	18	17	25	24	16	26	19
Leu	51	52	41	52	62	42	51
Tyr	17	13	4	13	15	15	13
Phe	12	11	12	9	6	10	11
Lys	70	72	59	52	62	53	72
His	6	12	12	12	8	10	11
Arg	17	7	16	17	15	19	8

* Résultats exprimés en résidus pour 600 résidus TABLEAU X

T A B L E A U X ICOMPOSITION GLUCIDIQUE DES AVS DE VARIANTS DE
TRYPANOSOMA BRUCEI

(D'APRES JOHNSON ET CROSS. 1977.)

Variants	055	060	099	100	104	D12
Monosaccharides *						
Mannose	13	12	28	18	8	8
Galactose	15	9	6	13	5	8
Glucose	5	3	15	8	8	20
N-acétyl-glucosamine	10	7	14	8	4	6

* Résultats exprimés en résidus par mole de glycoprotéine pour une masse moléculaire de 65 000 daltons.

rapport molaire mannose/galactose constant, voisin de 2/1, et hexoses/hexosamine également constant, de l'ordre de 8/1, ces auteurs obtiennent des rapports molaires variables, allant respectivement de 1/1 à 4.5/1 pour mannose/-galactose et de 3/1 à 6/1 pour hexoses/hexosamine.

Nous émettrons quelques réserves quant à ces résultats, qui ont été déterminés en associant deux techniques différentes :

- dosage des oses neutres par chromatographie en phase gazeuse après méthanolyse.
- dosage des osamines à l'autoanalyseur d'acides aminés après hydrolyse acide.

Quant à la présence de glucose au sein des groupements glycaniques des AVS, elle semble indiscutable. Nous avons en effet toujours retrouvé cet hexose au cours de nombreux dosages et, comme nous le reverrons au chapitre suivant, le glucose est encore présent après hydrolyse enzymatique et fractionnement des AVS. De même, JOHNSON et CROSS ont réalisé une série d'expériences afin de vérifier que ce monosaccharide faisait réellement partie intégrante de leurs glycoprotéines : bien que tous leurs dosages aient été précédés d'une étape de chromatographie sur colonne de Biogel P6, afin d'éliminer les sucres libres qui auraient pu provenir de leur protocole de purification (isoélectrofocalisation en veine liquide en gradient de saccharose), ils se sont assurés que le glucose était encore présent après divers traitements chimiques tels que la dénaturation par l'urée 8 M, la chaleur, ou enfin la précipitation par l'acide trichloracétique à 5 %. Signalons tout de même, que lors de cette dernière expérimentation, effectuée seulement pour l'AVS du variant D12, 40 % du glucose initialement dosé (20 résidus/mole) n'a pas été retrouvé. Il est très possible par conséquent, que les valeurs considérables parfois avancées par ces auteurs, ne reflètent pas la quantité exacte de glucose réellement présent.

Au reste, cette présence de glucose au niveau des AVS de *T. brucei* et *T. equiperdum* est une notion intéressante à souligner car l'existence de cet hexose au sein de glycoprotéines "non collagènes", a souvent prêté à discussion, étant donnée la possibilité de contamination des préparations par du glucose d'origine exogène (supports chromatographiques, boudins de dialyse)(CLAMP et Coll., 1972). On remarquera cependant, que cet ose neutre a été identifié, pour ne donner que quelques exemples dans des glycoprotéines d'origine aortique (RADHAKRISHNAMURTHY et BERENSON, 1966, 1973 ; WAGH et ROBERTS, 1972), dans un glycopeptide isolé de la membrane de l'érythrocyte humain (WEISS et Coll., 1971) et plus récemment dans un glycopeptide urinaire (HALLGREN et Coll., 1975).

Sur un plan très général, l'identité de nos résultats sur trois antigènes de variants est un élément d'un grand intérêt à discuter dans le cadre de l'immunochimie parasitaire : ces structures glycaniques, encore inconnues dans leur définition sont-elles ou non impliquées dans les sites antigéniques témoins de la spécificité immunologique des AVS ? Les expériences de CROSS et Coll. (1977), qui ont montré que l'oxydation périodique des antigènes variables de *T. brucei*, ne modifiait pas leurs caractères de précipitabilité par les antisera correspondants, semblent infirmer la participation de la copule glucidique dans l'antigénicité de la glycoprotéine membranaire. Les résultats évoqués au chapitre précédent (expériences de marquage spécifique des sucres en microscopie électronique et de fixation de lectines sur les trypanosomes), montraient d'autre part, le "masquage" des unités glucidiques par la chaîne protéique. Leur rôle dans le phénomène de la variation antigénique apparaît donc, pour l'instant, très limité.

Si la variation des antigènes de surface de *T. equiperdum* se traduit, comme nous venons de le revoir, par des modifications importantes de configuration et de composition chimique, il n'en reste pas moins que ces AVS répondent à une définition globale. Nos résultats, qui semblent rapporter la variation antigénique très essentiellement à l'axe peptidique, demandent bien sûr à être confirmés par des éléments de séquence acides aminés de différents AVS. C'est pourquoi, nous nous sommes tournés, dans un premier temps, vers l'identification des acides aminés en position N- et C-terminale, ceci afin de juger du degré de variation de structure.

* Lors de l'identification de l'acide aminé situé en position N-terminale des AVS de variants de *T. equiperdum* nous avons caractérisé dans les quatre cas étudiés, trois fois l'alanine (BoTaT-1, -78 et -100) et une fois le glycolle (BoTaT-28). BRIDGEN et Coll. (1976) ont identifié quant à eux, pour quatre AVS de *T. brucei*, l'alanine dans deux cas et la thréonine dans deux autres.

Là encore, une relative fréquence dans une même souche ou inter-espèces semble se dégager ; toutefois, le nombre extrêmement limité de variants ne permet en aucun cas de conclure à une "relative constance" de l'extrémité N-terminale.

Quant à l'identification de l'acide aminé en position C-terminale, elle se heurte, nous l'avons vue dans la présentation des résultats, à un problème d'interprétation. Quelques soient les cinétiques enzymatiques considérées, nous avons mis en évidence de quatre à cinq résidus d'acides aminés (leucine, alanine, thréonine, tyrosine, lysine), et cela pour tous les AVS. L'absence dans la littérature, de résultats dans ce domaine, laisse augurer de la difficulté du problème à résoudre.

Une nouvelle approche de la détermination de la séquence C-terminale pourrait être envisagée par la purification du peptide ou glycopeptide C-terminal, obtenu soit par coupure chimique, soit par coupure enzymatique. Peut-être pourrait-on alors confirmer l'hypothèse de CROSS et JOHNSON (1976) selon laquelle l'attachement des antigènes variables du manteau sur la membrane cytoplasmique se ferait au niveau de leur extrémité C-terminale. Dans ce cas, et quelque soit le mode de liaison :

- Inclusion dans les feuilletts lipidiques d'une séquence plus ou moins longue, de caractère hydrophobe,
- Prise en charge par un récepteur de l'antigène (qui serait alors reconnu par une séquence ou une configuration particulière),

il apparaît probable que les séquences d'acides aminés, à ce niveau, soient communes à tous les AVS. (CROSS et JOHNSON, 1976).

Comme nous venons de le voir, ces identifications de résidus acides aminés de la région N- et C-terminale ne permettent pas de statuer définitivement sur des notions de constance ou de variabilité des portions extrêmes du squelette peptidique. De telles notions ne pourront être réellement appréhendées que lors d'une étude plus précise. Des travaux dans ce sens ont été entrepris sur deux AVS de variants : BoTaT-1 et BoTaT-28 ; nous allons donc maintenant rapporter les résultats préliminaires obtenus lors de cette étude.

E - ETUDE STRUCTURALE DES AVS DES VARIANTS BOTAT-1 ET BOTAT-28

L'étude structurale des AVS des variants BoTaT-1 et BoTaT-28 de *T. equiperdum* a été abordée en deux étapes:

1° - Détermination de leur séquence N-terminale

Cette détermination a été conduite dans le but, d'une part de mieux apprécier l'homogénéité de nos préparations, d'autre part de pouvoir procéder par la suite à l'identification et au positionnement au sein de chacun des AVS, des fragments peptidiques et glycopeptidiques.

2° - Définition d'une stratégie pour l'étude de la séquence complète des AVS.

Nous avons réalisé une étude comparative de l'action de différents enzymes protéolytiques sur l'AVS de BoTaT-1 et de BoTaT-28. L'objectif à atteindre étant l'obtention, dans un premier temps, de quantités importantes de fragments de grande taille moléculaire, nous avons donc choisi de soumettre à l'hydrolyse enzymatique les AVS dans leur état natif (pas de dénaturation, pas de réduction des ponts disulfure).

1) Détermination de la séquence N-terminale des AVS de BoTaT-1 et BoTaT-28.

La séquence des acides aminés situés en position N-terminale a été réalisée par dégradation récurrente de EDMAN manuelle, et dans le cas de BoTaT-1 a fait l'objet d'une détermination au séquenceur automatique (BECKMAN 890C). Les PTH amino acides résultants ont été identifiés et quantifiés par chromatographie liquide de haute performance (HPLC)(appendice technique : p.13). Les résultats obtenus sont les suivants :

a) Variant BoTaT-1

La détermination de séquence manuelle, présentée dans le tableau XII, livre sans ambiguïté les 7 premiers résidus d'acides aminés, suspecte en position 8 un résidu de lysine et en position 9 un résidu de proline. Un blanc est enregistré pour le cycle 11.

Cette séquence a pu être vérifiée sur séquenceur automatique et les 20 premiers résidus ont été ainsi identifiés (Tableau XII). La lysine en position 8 est confirmée, l'identification d'un résidu de proline en position 9 est infirmée, un résidu de thréonine ayant été caractérisé en HPLC au moyen de deux gradients différents. En position 11, un résidu de tryptophane est localisé ; selon toute vraisemblance, et en fonction de la composition en acides aminés, il représenterait un des deux résidus présents dans la molécule (Cf. composition acides aminés : Tableau VI).

b) Variant BoTaT-28

Nous ne disposons actuellement que des résultats d'une séquence obtenue par méthode manuelle et positionnant avec certitude les sept premiers résidus d'acides aminés (Tableau XII). La richesse en glycolle et en alanine est à souligner et suggère la possibilité d'une structure hélicoïdale α dans cette région de la molécule.

L'examen des séquences obtenues pour les deux AVS montre une absence totale d'analogie entre ceux-ci au niveau de leur extrémité N-terminale. Réalisées sur des lots différents elles nous ont permis d'apprécier l'homogénéité des préparations fournies par BALTZ et Coll.

SEQUENCE N-TERMINALE DES AVS DES VARIANTS DE BOTAT-1 ET BOTAT-28

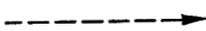
BOTAT-1

- Séquence manuelle

10

ALA-VAL-ALA-ASN-PRO-LEU-LYS-LYS -pro-TYR-(X)-GLX...

20



- Séquence automatique

ALA-VAL-ALA-ASN-PRO-LEU-LYS-LYS-THR-TYR-TRP-GLU-ALA-MET-ser-ASP-LEU^{ser}_{glx}(?) -ASN-ASP...

BOTAT-28

Séquence manuelle

GLY-ASP-ILE-GLY-ALA-GLY-ALA...

* En minuscules les acides aminés dont la présence est suspectée.

TABLEAU XII



2) Etude de la sensibilité aux enzymes protéolytiques des AVS de BoTaT-1 et BoTaT-28.

Dans le cadre de cette étude comparative, nous avons réalisé des cinétiques d'hydrolyse par quatre enzymes différents, dans les conditions expérimentales exposées dans le chapitre technique (p.17). Leur action respective a été ensuite appréciée au moyen de l'électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS. Quatre enzymes de spécificités différentes ont été choisis :

- La trypsine.
- La chymotrypsine.
- La protéase de *Staphylococcus aureus*.
- La thermolysine.

a) Action des enzymes protéolytiques sur l'AVS de BoTaT-1.

Les quatre enzymes précédemment cités ont été incubés avec de faibles quantités de glycoprotéine. Nous avons fait varier pour chacun d'eux le rapport enzyme/ substrat de 1/100° à 1/400° et effectué des prélèvements dans le milieu réactionnel aux temps d'hydrolyse : 10', 20', 30', 1h, 2h, 4h et 6h.

Nous avons rassemblé dans la figure N.8 l'illustration de nos résultats les plus caractéristiques et à partir desquels nous avons fixé notre choix d'un enzyme et des conditions exactes d'hydrolyse à retenir pour les appliquer à de grandes quantités (de l'ordre de 500 mg) d'antigène variable.

Les cinétiques que nous avons obtenues nous conduisent à faire les remarques suivantes :

BOTAT-1: CINÉTIQUES D'HYDROLYSE PAR DIFFÉRENTS ENZYMES PROTÉOLYTIQUES
(Etude en gel de polyacrylamide)

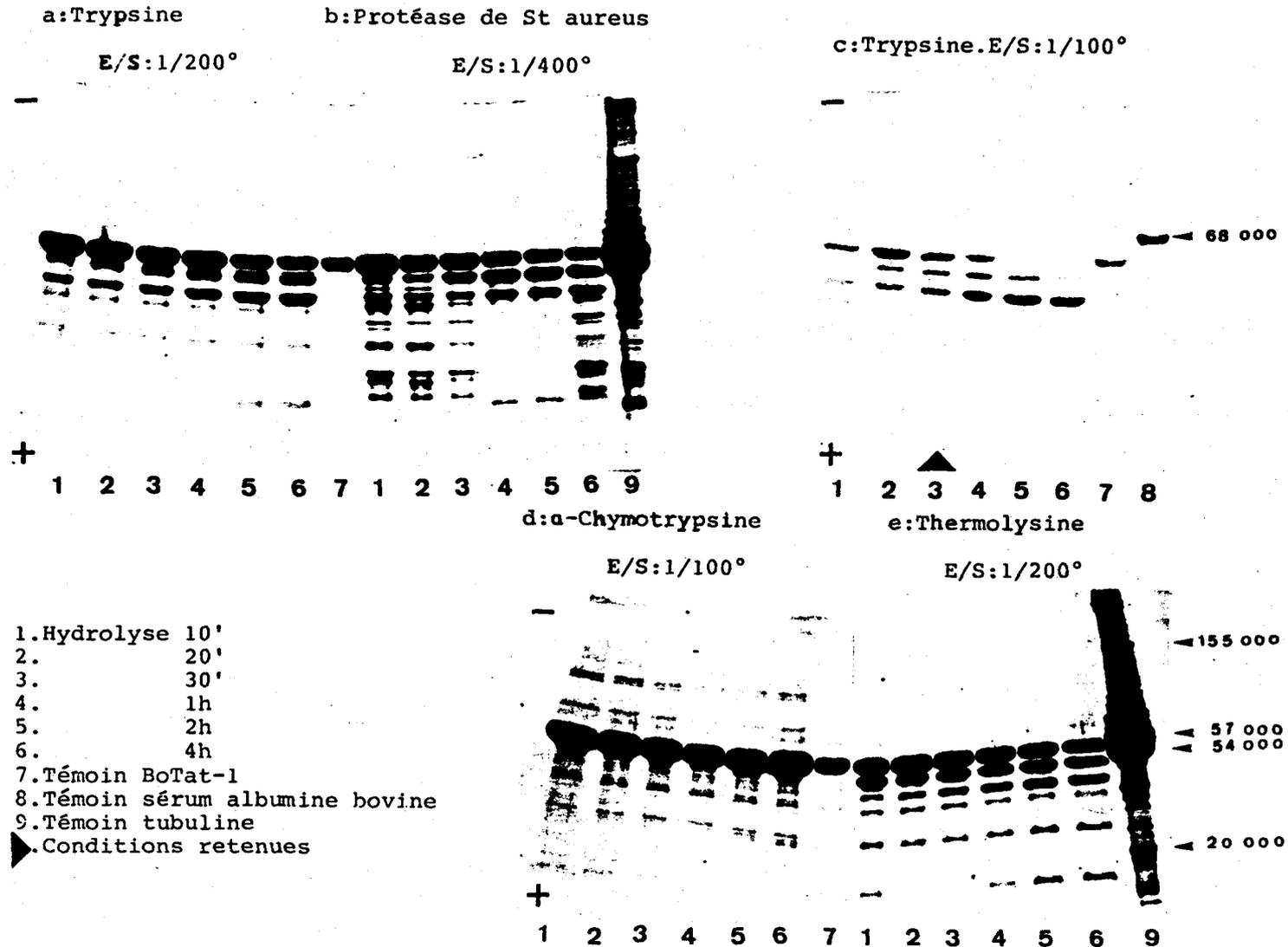


FIGURE N 8



1° La chymotrypsine n'a pas eu d'action sur l'AVS du variant BoTaT-1, même pour un rapport enzyme/substrat de 1/100°. Nous expliquons ceci par le fait d'empêchement stérique, les résidus d'acides aminés aromatiques susceptibles d'être clivés par cet enzyme lui étant vraisemblablement inaccessibles, lorsque la glycoprotéine se trouve à l'état natif.

Nous avons en effet pu constater que la même préparation enzymatique était active sur l'AVS du variant BoTaT-1 lorsque celui-ci avait subi une dénaturation par l'acide performique. Cette observation nous conduit à retenir cette approche pour obtenir, avec les mêmes enzymes, des fréquences plus grandes de coupure.

2° Les trois autres enzymes testés, dont les spécificités d'action sont cependant différentes, ont fourni des cinétiques d'hydrolyse très voisines : on a assisté en effet dans tous les cas, à la libération dès le temps d'incubation 10', de deux gros fragments de masse moléculaire respective de l'ordre de 49 000 et 40 000 daltons.

Même si nous tenons compte des quantités relativement faibles d'enzyme que nous avons ajoutées, il semblerait qu'il existe au sein de la molécule au moins deux points "d'approche" de l'axe peptidique, expliquant la libération de ces deux grands fragments. On peut par ailleurs remarquer que la prolongation de la durée d'hydrolyse n'entraîne pas de modification sensible de taille moléculaire de ces fragments. En revanche, la disparition sur le gel de polyacrylamide de certaines bandes protéiques correspondant à des fragments de moindre taille moléculaire, suggère qu'il s'agit de peptides ou glycopeptides plus facilement accessibles aux enzymes, une fois libérés de l'axe peptidique de l'AVS.

Enfin, si l'on prend l'exemple de l'action de la trypsine, l'augmentation du rapport enzyme/substrat (1/200° à 1/100°) a permis d'améliorer le rendement d'hydrolyse de l'antigène, mais n'a pas modifié le profil des fractions obtenues, confirmant l'hypothèse d'une configuration spatiale telle que l'accès aux enzymes n'est possible qu'en un nombre limité de points de l'axe polypeptidique.

Choix d'un protocole d'hydrolyse enzymatique

Etant donné l'objectif que nous nous étions fixé, à savoir la purification dans un premier temps de gros fragments, en quantités suffisamment importantes pour que nous puissions les situer dans la molécule (identification de leurs extrémités N- et C-terminales), avant de les sous-fractionner, nous avons retenu pour les 478 mg d'AVS de BoTaT-1 disponibles, une hydrolyse par la trypsine pendant 30 minutes, dans un rapport enzyme/substrat de 1/100°.

b) Action des enzymes protéolytiques sur l'AVS de BoTaT-28.

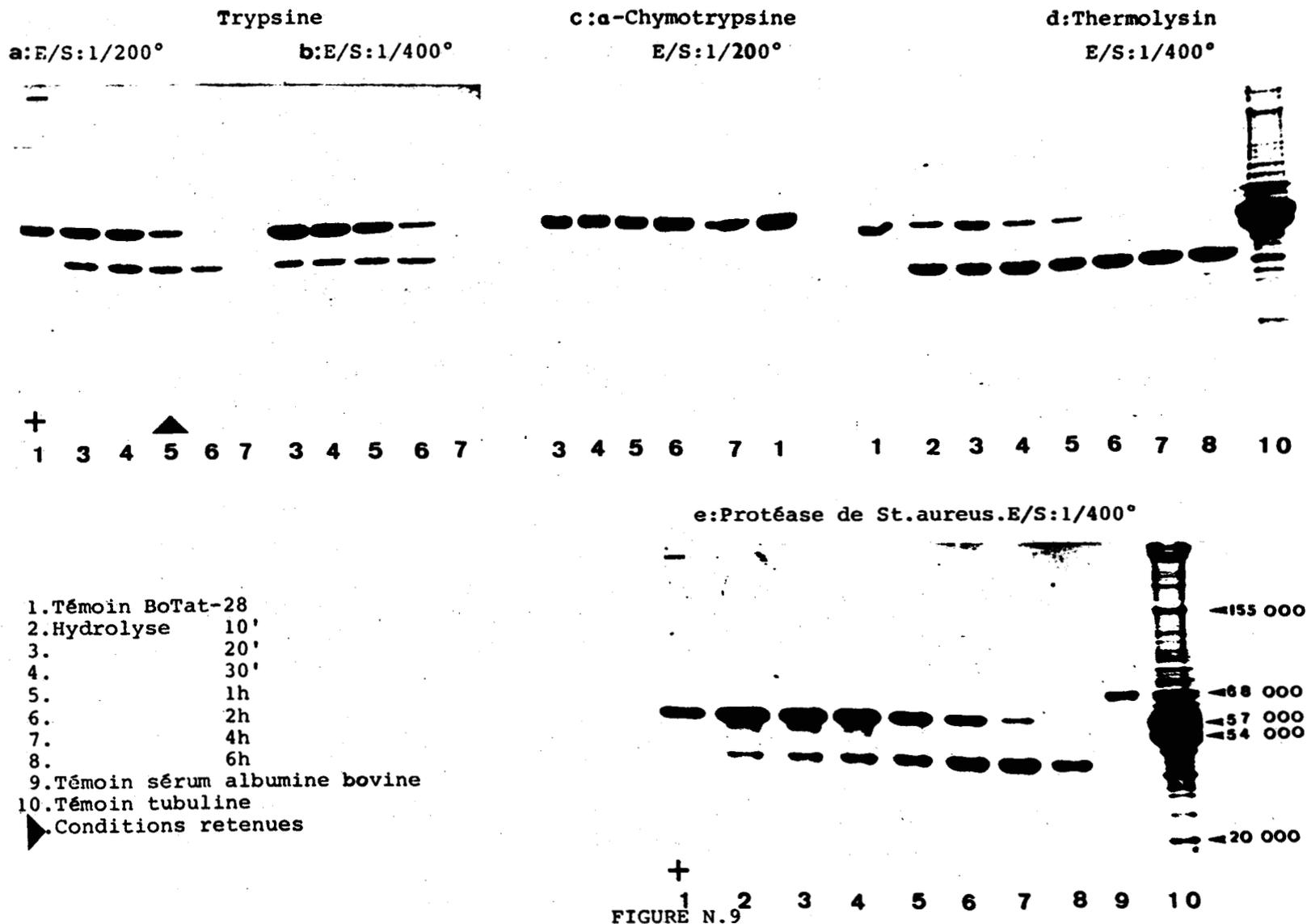
Nous avons procédé pour l'AVS du variant BoTaT-28 de la même manière que pour celui de BoTaT-1. Un exemple des cinétiques obtenues avec chacun des quatre enzymes utilisés est rapporté dans la figure N.9.

Nous avons retrouvé pour l'AVS de BoTaT-28 :

- une absence totale d'action de la chymotrypsine.
- une action très voisine des trois autres enzymes, chacun conduisant à la libération des mêmes types de fragments.

BOTAT-28: CINÉTIQUES D'HYDROLYSE PAR DIFFÉRENTS ENZYMES PROTÉOLYTIQUES

(Etude en gel de polyacrylamide)



Il existerait donc également au niveau de l'antigène variable de BoTaT-28, des zones particulières d'accessibilité aux enzymes protéolytiques, livrant essentiellement un gros fragment d'une masse moléculaire estimée à 38 000 daltons.

En examinant plus en détails l'action de la trypsine, on peut noter que l'hydrolysats s'enrichit progressivement en fragment 38 000 daltons, puis, dans un second temps, cette fraction est dégradée à son tour, à partir du moment semble-t-il, où la totalité de l'antigène natif a été lui-même "digéré". Cette "recoupe" est accompagnée de l'apparition sur les gels de polyacrylamide de fragments de taille moléculaire inférieure.

Choix d'un protocole d'hydrolyse enzymatique

Nous avons choisi en fonction des tests préalables, pour le traitement de 900 mg disponibles d'AVS de BoTaT-28, de retenir la trypsine (Enzyme/substrat = 1/200°, 1h).

c) Comparaison de la sensibilité relative des antigènes variables de BoTaT-1 et BoTaT-28

L'examen comparatif des gels de polyacrylamide illustrant les cinétiques d'hydrolyse enzymatique des AVS de BoTaT-1 et BoTaT-28 amène une série de remarques :

- pour une même activité enzymatique de spécificité limitée, la taille des fragments obtenus est différente.

- pour une même activité enzymatique, les rendements de coupure sont également différents dans le temps.

Ceci suppose donc que les configurations des deux antigènes soient assez éloignées ; or nous avons montré dans le chapitre précédent, par l'étude des spectres dichroïques, le caractère très structuré de l'AVS de BoTaT-1 par rapport à celui de BoTaT-28. Rappelons que pour BoTaT-1, la répartition correspondait à près de 50 % de structure hélicoïdale α et 25 % de configuration en feuillets plissés, pour seulement 26 % de structure inordonnée ou/et β turn. Au contraire, près de 50 % de l'axe peptidique de l'AVS de BoTaT-28 est apparu inorganisé, ce qui expliquerait une meilleure approche et un meilleur rendement des enzymes protéolytiques dans le cas de BoTaT-28. La possibilité, dans certains "domaines" de l'axe peptidique ou entre ces "domaines", de structuration par ponts disulfure n'est pas à négliger. Soulignons que dans ce travail "préparatoire" nous ne les avons volontairement pas clivés pour obtenir des gros fragments, utilisables en séquence automatique.

De plus, que ce soit pour l'AVS de BoTaT-1 ou de BoTaT-28, les sites de clivage correspondent, semble-t-il, à des séquences comportant des résidus de lysine ou d'arginine (Trypsine), d'acide glutamique (protéase de *St. aureus*) et des acides aminés impliqués dans les liaisons peptidiques sensibles à la thermolysine. Seuls les acides aminés aromatiques semblent absents de ces "crevasses" : ceci peut être envisagé en fonction de l'action nulle ou extrêmement faible de la chymotrypsine.

Au total, ces études de cinétiques enzymatiques nous ont confirmé les différences de configuration moléculaire des antigènes variables ; elles ont de plus permis de préciser les conditions d'obtention de fragments représentant la moitié ou les deux tiers de chaque AVS.

L'analyse de telles fractions après purification permettra, par exemple, de discuter de leur localisation dans la molécule initiale et aussi de considérer la répartition des chaînes glycaniques dans la molécule native.

Ces différents aspects ont un intérêt accru, s'ils sont examinés dans le cadre de l'immunochimie des variants. Ils permettront en effet, d'appréhender le problème de l'unicité ou de la multiplicité des sites antigéniques et aussi celui du masquage relatif, du fait des configurations moléculaires des deux antigènes étudiés, de certaines régions de séquence commune.

3) Hydrolyse par la trypsine de l'AVS de BoTaT-1

a) Mode générateur

478 mg de glycoprotéine ont été soumis à l'action de 4.78 mg de trypsine, soit un rapport enzyme/substrat de 1/100° pendant 30 minutes, dans les conditions détaillées dans la partie technique (p.18). Après arrêt de l'hydrolyse enzymatique et congélation, l'hydrolysate a été directement chromatographié sur une colonne de Biogel P100 (100-200 mesh) stabilisé dans l'acide acétique 0.1 N. Douze chromatographies préparatives ont été réalisées, chacune correspondant à 40 mg d'hydrolysate sous un volume de dépôt de 8 ml. Un aliquot de l'hydrolysate a d'autre part été conservé et analysé en électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS, ce qui nous a permis de vérifier la qualité de la protéolyse et de comparer les résultats obtenus à ceux des essais préliminaires (figure N.10b).

a: FRACTIONNEMENT DE L'HYDROLYSAT TRYPSIQUE DE BoTat 1 (25/4/78)
 E/S : 1/100 ; 37°C ; Tp NH4 HC03 0,01 M pH 8,5
 BIOGEL P 100 (100 - 200 mesh) - CH3 C00H 0,1 N

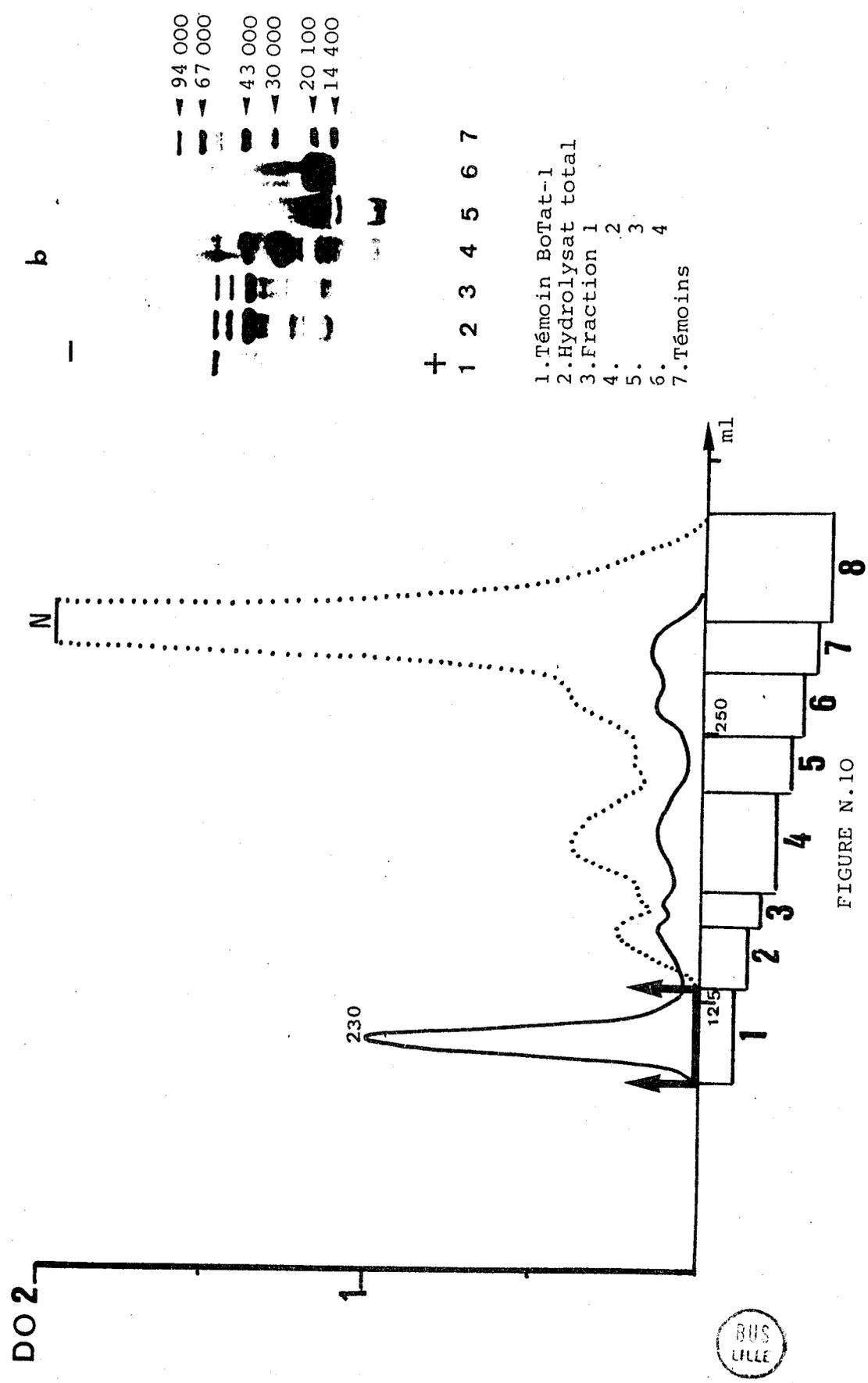


FIGURE N.10

b) Fractionnement sur colonne de Biogel P100

L'élution de la colonne a été suivie par lecture des variations de l'absorbance mesurée à 230 nm et dosage de la réactivité à la ninhydrine des fractions recueillies. Un repérage glucidique par la méthode à l'orcinol sulfurique a été effectué sur quelques unes seulement de ces fractions, choisies en fonction du profil densitométrique à 230 nm. 8 fractions ont ainsi été individualisées (figure N.10a). L'analyse de leur comportement électrophorétique en gel de polyacrylamide en présence de SDS a en outre permis :

- d'apprécier leur degré d'homogénéité.
- d'évaluer la masse moléculaire des bandes protéiques ou glycoprotéiques présentes dans chacune de ces fractions, et colorées par le bleu de Coomassie. (figure N.10b).

L'examen des résultats obtenus permet quelques remarques :

- 1° - La fraction F_1 , qui représente à elle seule 59 % du rendement de l'hydrolyse trypsique, est éluée avec le volume mort de la colonne. Son analyse en gel de polyacrylamide révèle qu'elle est constituée d'un mélange de trois composants au moins :
 - la glycoprotéine résiduelle.
 - la fraction protéique de masse moléculaire 49 000 daltons.
 - la fraction protéique de masse moléculaire 40 000 daltons, cette dernière étant la plus importante quantitativement, si l'on se réfère à l'intensité de la coloration observée.

2°- Les fractions F_2 à F_4 sont présentes en faibles proportions dans l'hydrolysats ; leur analyse en gel de polyacrylamide révèlent leur absence d'homogénéité. En effet :

- La fraction F_2 contient, outre une contamination par F_1 , un mélange de plusieurs composants de taille moléculaire comprise entre 10 000 et 30 000 daltons.
- La fraction F_3 correspond aux éléments de plus petite taille moléculaire (inférieure à 30 000 daltons), déjà objectivés dans F_2 .
- Le contenu de la fraction F_4 témoigne de l'enrichissement de cette dernière par les composants compris entre 15 et 20 000 daltons présents dans les deux fractions précédentes.

3°- Les fractions F_5 à F_8 , très retardées sur la colonne de Biogel P100, ne sont pas révélées par le bleu Coomassie ; il s'agit vraisemblablement d'un mélange de peptides ou/et de glycopeptides de petite taille, objectivé par ailleurs par la forte réactivité de ces fractions à la ninhydrine.

4°- Seuls les aliquots prélevés au niveau des fractions F_1 à F_5 ont donné une réaction positive à l'orcinol sulfurique, témoignant ainsi d'une présence glucidique.

Devant l'insuccès de séparation des trois bandes visualisées au niveau de la fraction F_1 , de nouveaux protocoles chromatographiques ont été tentés ; nous avons fait appel, en particulier, à un gel de Sephadex G200 équilibré en tampon $\text{NaCl } 0.2 \text{ M}$, $\text{PO}_4 \text{ Na}_2 \text{ } 0.1 \text{ M}$ de pH 8.0. Là encore, aucune séparation appréciable n'a pu être obtenue, la presque totalité du matériel déposé ayant été à nouveau élué

avec le volume mort de la colonne. Ces échecs répétés peuvent être interprétés :

- soit en fonction d'une configuration moléculaire des trois fragments en présence telle qu'elle limite la pénétration et donc la filtration par les grains de Sephadex ou de Biogel.
- soit en fonction de l'existence de fortes interactions entre la glycoprotéine résiduelle et les fragments 49 000 et 40 000 daltons, conduisant à la formation d'un agrégat moléculaire, exclu alors des grains de Biogel ou de Sephadex.
- L'absence de séparation, nous l'avons vérifié, ne peut être expliquée par l'existence de ponts disulfure empêchant la libération des fragments tryptiques ; en effet, le profil électrophorétique de F_1 en gel de polyacrylamide est identique, que l'étude de la mobilité soit réalisée avant ou après réduction par le β -mercapto-éthanol.

Au total, aucune des fractions tryptiques de l'AVS de BoTaT-1 n'est directement utilisable pour des déterminations de séquence. Un sous-fractionnement devra donc être entrepris; une réhydrolyse tryptique limitée de F_1 , devant conduire à l'obtention du fragment 40 000 daltons est envisagée.

c) Composition en acides aminés des fractions tryptiques obtenues

La composition en acides aminés des 8 fractions éluées de la colonne de Biogel P100 a été réalisée. Les résultats en sont rassemblés dans les tableaux XIII et XIV.

L'examen de ces compositions nous suggère les remarques suivantes :

COMPOSITION EN ACIDES AMINES DES FRACTIONS TRYPSIQUES DE L'AVS DE BOTAT-1

Acides aminés*	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄	F ₅	F ₆	F ₇	F ₈
Asp	14.11	14.83	16.56	15.84	12.99	14.55	12.02	11.94
Thr	8.11	8.04	7.64	9.63	14.31	6.48	9.20	6.09
Ser	6.23	7.14	8.73	6.95	7.09	3.80	3.82	6.72
Glu	10.05	12.11	11.07	13.31	6.66	13.07	13.19	9.61
Pro	2.62	1.59	1.56	1.81	4.61	4.26	2.27	1.35
Gly	7.60	9.24	10.84	9.56	7.03	6.72	8.28	10.44
Ala	16.29	10.44	12.07	13.02	15.57	14.85	15.83	17.71
Val	2.76	1.35	2.81	0.63	2.81	2.63	1.95	2.13
1/2 Cys	1.59	3.66	3.58	4.80	-	-	1.31	0.92
Met	-	-	-	-	-	-	-	-
Ile	2.68	1.39	2.89	0.47	1.59	3.66	1.27	1.17
Leu	12.06	4.90	7.41	4.16	12.32	13.75	11.77	8.47
Tyr	2.39	0.91	0.83	0.78	1.39	1.93	1.79	4.00
Phe	1.86	1.51	1.53	1.88	2.22	1.54	1.11	1.90
Lys	7.09	13.20	10.56	15.79	8.38	10.99	11.04	5.43
His	1.10	0.76	0.98	1.15	1.07	0.31	0.22	0.32
Arg	3.46	8.93	0.94	0.20	1.96	1.45	4.92	11.80

* Résultats exprimés en résidus pour 100 résidus

TABLEAU XIII

COMPOSITION EN ACIDES AMINES DES FRACTIONS TRYPSIQUES DE L'AVS DE BOTAT-1

A.A. *	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄	F ₅	F ₆	F ₇	F ₈
Asp	930.99	719.18	852.60	646.66	352.22	823.92	600.24	450.70
Thr	535.23	389.88	393.07	393.30	388.00	367.09	459.31	207.04
Ser	410.92	346.09	449.51	283.62	192.22	215.04	190.77	228.36
Glu	662.92	587.35	570.02	543.55	180.40	740.05	658.91	326.63
Pro	173.19	76.86	80.71	74.03	124.97	241.07	113.57	45.73
Gly	501.87	447.83	557.83	390.48	190.65	380.53	413.72	354.82
Ala	1 075.17	506.04	621.61	531.65	422.17	841.13	790.89	601.78
Val	182.42	65.48	144.46	25.70	76.20	149.16	97.30	72.50
1/2 Cys	104.71	177.39	184.39	196.13	-	-	65.40	31.26
Met	-	-	-	-	-	-	-	-
Ile	176.92	67.36	148.67	19.16	43.05	207.52	63.55	39.74
Leu	796.03	237.80	381.32	169.90	333.90	778.98	587.92	287.70
Tyr	157.70	43.97	42.56	31.96	37.72	109.45	89.65	136.10
Phe	122.81	73.42	78.85	76.63	60.16	87.23	55.29	64.58
Lys	467.70	640.05	543.43	644.71	227.08	622.45	551.38	184.70
His	72.40	36.85	50.49	47.01	28.91	17.72	11.09	10.79
Arg	228.43	432.87	48.58	8.32	53.06	82.28	245.81	401.08
Glc NH ₂	34.60	97.34	31.10	119.11	160.92	41.40	7.07	3.02

* Résultats exprimés en µmoles/g de préparation

TABLEAU XIV

- on retrouve au niveau des 8 fractions, sur le plan quantitatif, les mêmes acides aminés dominants que ceux identifiés dans l'antigène natif. Il semblerait donc que ces acides aminés ne "s'accumulent" pas, mais soient répartis tout le long de l'axe polypeptidique.

- Les fractions F_2 , F_3 et F_4 sont caractérisées par leur richesse en résidus de cystéine qui pourrait expliquer leur relative stabilité au cours de l'hydrolyse.

- La quantité importante d'acides aminés basiques dosée au niveau des 8 fractions tryptiques peut s'expliquer :
 - * pour les gros fragments, par une action très limitée de la trypsine.

 - * pour les fractions de faible taille moléculaire, par la présence d'un grand nombre de petits fragments en mélange, possédant un résidu d'acide aminé basique à leur extrémité C-terminale.

- La présence de résidus de glucosamine en proportions variables dans les fractions F_1 à F_6 (Tableau XIV) confirme les résultats du repérage orcinol, mais ne permet pas de tirer de conclusions concernant la position et le nombre des groupements glycaniques de l'AVS de BoTaT-1, aucune de ces fractions n'étant homogène.

d) Analyse des propriétés immunologiques
des fractions tryptiques.

Nous avons recherché au moyen de l'immunoélectrophorèse et de l'immunoprécipitation en gel d'agarose si l'antigénicité spécifique du variant BoTaT-1 était retrouvée au niveau des fractions tryptiques :

Seule la fraction F_1 a donné un arc de précipitation avec l'immunoserum anti AVS de BoTaT-1 ; la persistance au niveau de F_1 d'un pourcentage non négligeable d'antigène natif nous oblige à être prudent dans l'interprétation à donner de ce résultat et ne nous permet pas de conclure que l'un ou l'autre des deux fragments 49 000 et 40 000 daltons, présents dans cette fraction, soient porteurs de l'antigénicité spécifique du variant.

4) Hydrolyse par la trypsine de l'AVS du variant
BoTaT-28

a) Mode opératoire

900 mg de glycoprotéine ont été incubés pendant une heure avec 4.5 mg de trypsine, soit un rapport enzyme/substrat de 1/200°, dans les conditions décrites p.18 (chapitre technique). Après arrêt de la réaction, un volume correspondant à 1 mg d'hydrolysate a été prélevé afin d'être analysé en gel de polyacrylamide en présence de SDS (figure N.11b).

De la même façon que pour l'AVS du variant BoTaT-1 la totalité de l'hydrolysate tryptique a été déposée par fractions de 8 ml, soit 32 mg d'antigène hydrolysé, sur une colonne de Biogel P100 (100-200 mesh) équilibrée en acide acétique 0.1 N.

b) Fractionnement sur colonne de Biogel P100

L'élution de la colonne, suivie par lecture de l'absorbance à 230 nm, ainsi que par l'étude de la réactivité à la ninhydrine a permis d'individualiser 8 fractions (figure N.11a). Chacune d'elle a fait l'objet :

- d'un repérage colorimétrique des glucides.
- d'une analyse en gel de polyacrylamide en présence de SDS (figure N.11b).
- d'une détermination de la composition en acides aminés (Tableaux XV et XVI).

Au vu des différents résultats obtenus, nous pouvons faire les remarques suivantes :

- 1° - Seules les fractions F_1 et F_2 , toutes deux retardées sur la colonne de Biogel P100 apparaissent dans un état relatif d'homogénéité sur gel de polyacrylamide.

La masse moléculaire du composant majeur objectivé dans F_1 est évaluée à 38 000 daltons, tandis que le fragment protéique dominant présent dans F_2 est estimé à 28 000 daltons.

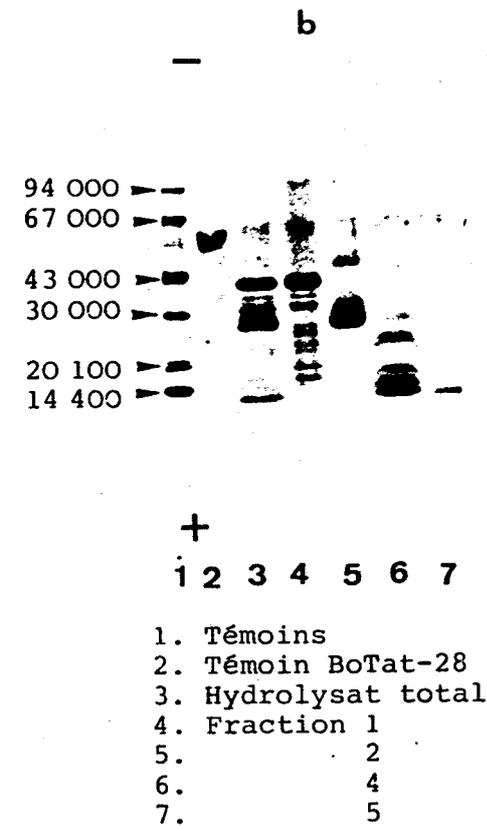
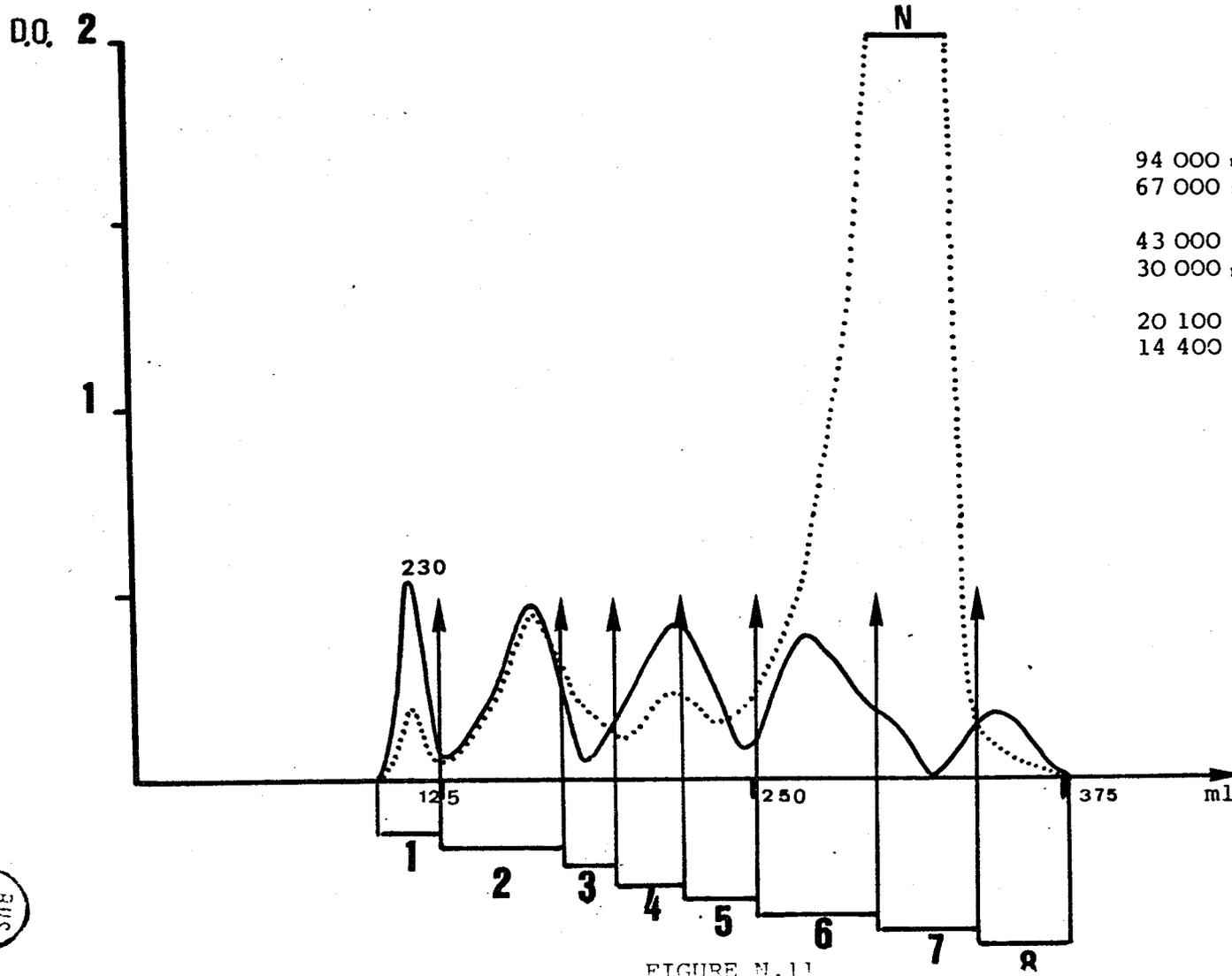
L'examen des compositions en acides aminés de ces deux fractions révèle des différences significatives dans la définition de leur axe polypeptidique. On observe notamment au niveau de F_2 , comparativement à F_1 :

- une nette diminution du nombre de résidus d'acides aminés hydrophobes.

a: FRACTIONNEMENT DE L'HYDROLYSAT TRYPSIQUE DE BoTat 28 (25/4/78)

E/S 1/200, 37°C ; Tp NH₄ HCO₃ 0,01 M pH 8,5

BIOGEL P 100 (100 - 200 mesh) - CH₃ COOH 0,1 N



- 1. Témoins
- 2. Témoin BoTat-28
- 3. Hydrolysat total
- 4. Fraction 1
- 5. 2
- 6. 4
- 7. 5

FIGURE N.11



COMPOSITION EN ACIDES AMINES DES FRACTIONS TRYPSIQUES DE L'AVS DE BOTAT-28

Acides aminés *	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄	F ₅	F ₆	F ₇	F ₈
Asp	9.74	17.30	15.04	15.51	10.84	6.98	8.26	8.57
Thr	10.38	8.80	9.91	11.30	11.89	9.72	7.42	10.68
Ser	6.44	4.12	5.72	4.90	6.84	6.92	8.35	8.09
Glu	11.68	12.92	12.13	10.22	9.95	12.55	18.25	8.97
Pro	2.82	5.33	5.02	6.17	5.29	1.03	1.79	2.29
Gly	9.23	7.98	9.31	9.25	9.26	12.36	7.95	8.69
Ala	16.24	11.23	11.50	13.33	15.61	15.24	13.01	23.93
Val	4.23	1.42	2.88	3.03	3.97	5.16	2.10	0.53
1/2 Cys	1.85	7.58	4.93	5.66	4.14	1.66	-	-
Met	0.23	-	-	-	-	-	-	-
Ile	4.00	0.90	2.26	1.75	3.33	3.97	5.31	0.55
Leu	6.15	0.64	3.23	3.13	5.99	8.05	3.98	0.67
Tyr	2.11	2.73	2.61	1.83	2.33	3.07	1.00	8.61
Phe	3.07	0.59	2.23	2.20	2.48	2.80	3.12	8.25
Lys	8.16	17.20	11.18	10.55	6.94	7.22	10.74	7.54
His	0.72	0.39	0.59	0.30	0.67	0.82	0.58	0.52
Arg	2.96	0.88	1.44	0.86	0.48	2.44	8.14	2.10

* Résultats exprimés en résidus pour 100 résidus

TABLEAU XV

BIB
1974

- 04 -

COMPOSITION EN ACIDES AMINES DES FRACTIONS TRYPSIQUES DE L'AVS DE BOTAT-28

A.A. *	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄	F ₅	F ₆	F ₇	F ₈
Asp	595.10	763.38	628.16	673.11	653.48	425.14	486.23	265.64
Thr	634.26	388.18	414.16	490.68	716.61	592.10	436.89	330.81
Ser	393.56	181.85	239.02	212.63	412.14	421.34	492.02	250.76
Glu	713.42	570.23	506.65	443.72	599.61	764.50	1 074.74	278.04
Pro	172.59	235.31	209.79	267.96	318.86	62.51	105.41	70.96
Gly	564.20	352.39	389.09	401.48	557.87	752.74	468.18	269.27
Ala	992.32	495.71	480.57	578.68	940.36	928.58	766.49	741.37
Val	258.40	62.55	120.30	131.48	238.98	314.47	123.91	16.43
1/2 Cys	112.99	334.42	205.85	245.83	249.31	101.09	-	-
Met	14.06	-	-	-	-	-	-	-
Ile	244.22	39.58	94.34	76.00	200.43	241.90	312.65	17.18
Leu	375.59	28.15	135.00	135.86	360.79	490.47	234.40	20.66
Tyr	128.69	120.32	109.09	79.49	140.33	137.14	58.77	266.88
Phe	187.57	26.08	93.19	95.58	149.19	170.75	183.85	255.51
Lys	498.64	759.01	467.09	458.12	418.22	439.88	632.36	233.54
His	43.80	17.31	24.62	13.17	40.48	50.24	33.97	16.26
Arg	180.90	38.68	60.32	37.14	29.17	148.93	479.57	65.12
 Glc NH ₂	30.52	99.66	74.10	68.62	56.63	5.38	-	-

* Résultats exprimés en µmoles/g de préparation

TABLEAU XVI

- une proportion beaucoup plus importante du nombre de résidus de cystéine et de lysine. L'absence de clivage relatif ainsi objectivé est très vraisemblablement le fait de ponts disulfure, dont l'existence est matérialisée par près de 8 % de résidus de cystéine.

- 2° - La fraction F_3 représente un mélange des fractions F_2 et F_4 , ce qui pouvait être attendu en fonction même du rassemblement des fractions collectées.

- 3° - La fraction F_4 est constituée d'un mélange de composants de taille variable, comprise entre 14 000 et 28 000 daltons.

- 4° - La fraction F_5 apparaît plus homogène en gel de polyacrylamide, représentée par le fragment majeur 14 000 daltons, objectivé dans la fraction précédente.

- 5° - Les fractions F_6 à F_8 , ainsi que l'indiquent l'absence de révélation en gel de polyacrylamide d'une part, la forte réactivité à la ninhydrine d'autre part, sont représentatives d'un mélange de peptides ou glycopeptides de faible taille moléculaire contenant, F_7 en particulier, un important pourcentage de résidus d'acides aminés basiques. La richesse en alanine de F_8 permet en outre d'envisager que de nombreux points de clivage sont situés à proximité de ces résidus.

6° - Les fractions F_1 à F_5 , qui avaient donné une réaction positive à l'orcinol sulfurique contiennent toutes des résidus de glucosamine dans leur composition, laissant envisager la présence de groupements glycaniques dans ces fractions.

c) Propriétés immunologiques des fractions tryptiques.

L'antigénicité spécifique du variant BoTaT-28 a été recherchée au niveau des fractions tryptiques éluées de la colonne de Biogel P100. Deux techniques ont été utilisées :

- L'immunoélectrophorèse en gel d'agarose.
- L'immunoprécipitation.

Un arc de précipitation vis à vis de l'immunoserum anti AVS de BoTaT-28 a été visualisé avec les fractions tryptiques F_1 à F_5 de BoTaT-28. Il apparaît donc que des fragments dont la taille moléculaire n'excède pas 15 000 daltons, soit un quart seulement de l'antigène natif, possèdent encore l'antigénicité caractéristique de ce variant. Il sera d'un grand intérêt de purifier ces fractions, afin d'isoler le plus petit fragment encore porteur de la spécificité du sérotype. Sa nature glycosylée ou non, permettrait d'affirmer ou d'infirmer le rôle des glycanes dans la réaction immunologique spécifique de variants.

d) Conclusions

Les résultats de l'hydrolyse tryptique de l'AVS du variant BoTaT-28 et notamment l'obtention de deux fragments "glycopeptidiques" (M.M : 38 000 et 28 000 daltons), isolés dans un état d'homogénéité relativement satisfaisant nous ont permis de procéder à une étude biochimique plus précise de ces derniers, visant à leur définition. Dans ce but, deux types d'investigation ont été retenus en première approche :

- Détermination de la composition glucidique.
- Détermination de la séquence des acides aminés situés à l'extrémité N-terminale des deux fragments.

5) Etude structurale des fractions tryptiques

F₁ et F₂ de l'AVS de BoTaT-28.

a) Détermination de la composition glucidique

L'examen de ces compositions (Tableau XVII) amène un certain nombre de remarques :

- 1° - La fraction F₁, qui représente les 2/3 de l'axe polypeptidique de la glycoprotéine native, contient 30 % seulement des glucides totaux dosés dans la molécule initiale. Ce résultat accrédite l'hypothèse de l'existence d'au moins deux sites de glycosylation le long du squelette peptidique de l'AVS de BoTaT-28.
- 2° - La fraction F₂, qui représente la moitié de l'axe peptidique contient, aux erreurs d'expérience près, le quart du glucose dosé dans la molécule native et la totalité des résidus de mannose et de N-acétylglucosamine. Le nombre de résidus de galactose (résultat vérifié) est deux fois plus élevé que celui de l'antigène natif, ce qui pourrait être interprété par une sous-estimation de cet hexose (près de 50 %) lors du dosage de la glycoprotéine.

Deux hypothèses peuvent être avancées :

- Une partie des résidus de galactose présents sur l'AVS de BoTaT-28 serait impliquée dans une structure glycannique occupant une position telle dans la molécule, qu'ils ne seraient pas libérés au cours du

TABLEAU XVII

COMPOSITIONS GLUCIDIQUES DES FRACTIONS TRYPSIQUES F₁ ET F₂
DE L'AVS DE
BOTAT-28

Monosaccharides *	FRACTION 1	FRACTION 2
Mannose	3.29	14.86
Galactose	0.70	13.65
Glucose	1.40	0.52
N-acétyl- glucosamine	1.50	2.62

* Résultats exprimés en résidus par mole de glycopeptide pour une masse moléculaire de 38 000 daltons (F₁) et 28 000 daltons (F₂).



traitement de la glycoprotéine par l'acide trifluoroacétique et le méthanol-HCl.

- Les préparations d'AVS natif seraient contaminées par un composant X, non identifié quant à sa nature chimique, et dont la présence empêcherait un dosage satisfaisant du galactose. On peut supposer que l'étape de fractionnement sur colonne de Biogel P100 de l'hydrolysate tryptique serait un facteur d'élimination du contaminant. Nous avons déjà insisté précédemment sur les difficultés de détermination quantitative des glucides, dans le cas de toute une série de glycoprotéines de variants. Il est à noter, que lors de la chromatographie en phase gazeuse, les diagrammes tendaient à montrer une "insuffisance du rendement de l'étape de silylation". Si tel est le cas, on comprend cependant mal que seul le dosage du galactose soit affecté.

Quoiqu'il en soit, ces derniers résultats nous amènent à remettre en question et à discuter de la valeur des compositions glucidiques établies pour les molécules natives. Pour répondre à ces questions qui demeurent en toute rigueur de simples hypothèses (configuration moléculaire, présence d'un "contaminant"), différents protocoles peuvent être envisagés :

- Détermination des compositions glucidiques sur les glycoprotéines préalablement "désorganisées" par réduction et alkylation.
- Hydrolyse enzymatique totale préalable et dosage sur glycopeptides minimum .

- Refiltration systématique sur colonne de Biogel après l'étape de chromatographie d'affinité.

On ne peut en dernière hypothèse, éliminer totalement aussi, dans ces glycoprotéines de surface de flagellés, l'existence de liaisons glycanne-axe peptidique particulières. On évoquera, à titre d'exemple, le problème posé actuellement par les "glycosylations" des hémoglobines et des protéines sériques. Celles-ci interviendraient par formation d'une base de Schiff entre le glucose et une fonction NH_2 de la chaîne protéique (groupement NH_2 terminal : BUNN et Coll., 1978 ou groupement ϵNH_2 de la lysine : DOLHOFFER et WIELAND, 1979) conduisant, après réarrangement d'Amadori, à une céto amine stable.

b) Séquence N-terminale des fractions F_1 et F_2 .

Les acides aminés situés à l'extrémité N-terminale de ces fractions ont été déterminés par séquence manuelle (F_1 et F_2) et par séquence automatique (F_1). Les résultats obtenus sont rapportés dans le Tableau XVIII.

La comparaison de ces séquences avec celle de l'AVS de BoTaT-28 (Tableau XII) indique que F_1 correspond aux 2/3 N-terminaux de la glycoprotéine et que le fragment F_2 est, lui, situé plus à l'intérieur de l'antigène variable.

Bien que, en gel de polyacrylamide, les fractions F_1 et F_2 apparaissent contaminées par des fragments de plus faible taille moléculaire, la séquence acides aminés montre l'homogénéité N-terminale de ces contaminants. S'agit-il d'un problème de sensibilité de méthode (les séquences contaminantes n'intervenant que pour un pourcentage faible, non détecté) ou, autre hypothèse, ces multiples bandes, nous le vérifions, correspondent-elles à des sous-fragments N-terminaux de F_1 ou de F_2 ?

c) Synthèse des résultats

Les résultats de l'étude de ces deux fragments glycopeptidiques F_1 et F_2 , issus de l'hydrolyse trypsique de l'AVS du variant BoTaT-28, résumés dans le Tableau XIX, permettent de faire les remarques suivantes :

- Les résultats de la dégradation de EDMAN ont permis d'identifier la fraction F_1 comme étant la partie N-terminale de l'antigène variable étudié.
- L'examen des compositions en acides aminés et en glucides permet en outre de considérer la fraction F_2 comme un élément de recouvrement partiel, dans son extrémité N-terminale, de F_1 . On note en effet dans F_2 , en comparaison avec F_1 , des quantités très supérieures de résidus de cystéine et de lysine : ces résidus d'acides aminés sont, selon toute vraisemblance, situés en prolongement C-terminal de F_1 dans l'axe peptidique de la molécule native. Cette notion est confirmée par les résultats de composition glucidique : rappelons que F_2 contient tous les résidus de mannose et de N-acétylglucosamine de la glycoprotéine.
- La taille moléculaire des deux fractions autorise, on le voit, à envisager un positionnement des chaînes glycaniques sur le squelette peptidique. Il semblerait, en l'état actuel de nos connaissances, que la majeure partie des glycannes de l'AVS du variant BoTaT-28 soit située, soit dans le 1/3 moyen soit dans le 1/3 C-terminal de la glycoprotéine. Ces résultats sont en accord avec l'hypothèse de CROSS et JOHNSON (1976), proposée à la suite d'expériences de trypsinisation, réalisées à la fois

RECAPITULATION DES RESULTATS OBTENUS SUR LES FRACTIONS TRYPSIQUES

F₁ ET F₂ DE L'AVS DE BOTAT-28

Acides aminés *	FRACTION 1 (38 000 daltons)	FRACTION 2 (28 000 daltons)
Asp	34.16	36.68
Thr	36.40	18.65
Ser	22.59	8.74
Glu	40.95	27.40
Pro	9.91	11.31
Gly	32.38	16.94
Ala	56.96	23.82
Val	14.83	3.00
Cys 1/2	6.48	16.07
Met	0.81	-
Ile	14.02	1.90
Leu	21.56	1.35
Tyr	7.39	5.78
Phe	10.77	1.25
Lys	28.62	36.47
His	2.51	0.83
Arg	10.38	1.86
Monosaccharides *		
Mannose	3.29	14.86
Galactose	0.70	13.65
Glucose	1.40	0.52
N-acétylglucosamine	1.50	2.62
Séquence N-terminale (manuelle)	Gly-Asp-Ile-Gly-Ala-Gly-Asn-Lys-Gln-Arg-Pro-Lys Ala...	

* Résultats exprimés en résidus par mole de glycopeptide.



sur le parasite intact et sur l'antigène variable purifié d'un variant de *T. brucei*. Ces auteurs ont en effet émis l'hypothèse que les glycanes étaient tous situés dans la partie C-terminale de l'antigène variable, qui correspondrait par ailleurs à la région impliquée dans l'attachement de la glycoprotéine avec la membrane plasmique du parasite. Ceci a cependant été nuancé par la suite par les mêmes auteurs (JOHNSON et CROSS, 1979), qui ont comparé une série d'antigènes variables et pu montrer la présence de glucides au niveau d'un fragment N-terminal analogue à notre fragment F₁ (2/3 Nterminaux).

Nous ne pouvons actuellement généraliser cette hypothèse reposant sur des résultats très préliminaires. Il est vraisemblable, que s'il existe des variations de séquences acides aminés d'un antigène variable à l'autre, il existe aussi des variations dans la position des sites de glycosylation d'un antigène variable à l'autre. L'intérêt de ce problème sera à considérer dans la discussion de l'étude conformationnelle et surtout dans le cadre de comparaisons immunochimiques.

F - CONCLUSIONS DE L'ETUDE STRUCTURALE DES AVS DE BOTAT-1 ET BOTAT-28

Ces études structurales préliminaires de deux antigènes variables de *T. equiperdum* nous ont permis de mieux définir ces glycoprotéines de membrane. Il a en effet été démontré :

1° que les séquences N-terminales de l'AVS de BoTaT-1 et BoTaT-28 sont tout à fait différentes, résultat en accord avec ceux de BRIDGEN et Coll. (1976) obtenus en séquence automatique de quatre AVS de *T. brucei* (Tableau XX).

SEQUENCE N-TERMINALE DES AVS DE VARIANTS DE TRYPANOSOMA BRUCEI

(D'APRES BRIDGEN ET Coll., 1976)

VARIANTS

10

20

30

I Thr-Asn-Asn-His-Gly-Leu-Lys-Leu-Gln-Lys-Ala-Glu-Ala-Ile-Cys-Lys-Met-Cys-Lys-Glu

II Ala-Lys-Glu-Ala-Leu-Glu-Tyr-Lys-Thr-Trp-Thr-Asn-His-Cys-Gly-Leu-Ala-Ala-Thr-Leu-Arg-Lys-Val-Ala-Thr-Gly-Val-Leu-Thr-Lys-Leu-Lys-Ser-His-Ile

III Thr-Asp-lys-Gly-Ala-Ile-Lys-Phe-Glu-Thr-Trp-Glu-Pro-Leu-Gln-Leu-Leu-Thr-Gln-Asp-Phe-Gly-Asn-Leu-Tyr-Asn-Lys-Ala-Lys-^{Lys}-_{Asn}-Leu-Asp-

IV Ala-Glu-Ala-Lys-Ser-Asp-Thr-Ala-Ser-Gly-Ser-Val-Asn-Ser-Pro-Gln-Thr-Glu-Ala-Thr-Tyr--Ala-Gln-Leu-Ala-Lys-Thr-Leu-Gln-Arg-Ala-Leu-Asp-

TABLEAU XX



2° Qu'il existe au sein de ces molécules, mais selon l'AVS, en des régions différentes de leur axe polypeptidique, des points particulièrement sensibles au clivage enzymatique, résultat également en accord avec ceux de CROSS et JOHNSON (1976) et JOHNSON et CROSS (1979). Ces auteurs avaient en effet rapporté en 1976, que l'action de la trypsine sur l'AVS de *T. brucei* conduisait dans tous les cas à la libération de deux fragments : l'un de grande taille (48 - 52 000 daltons), l'autre de petite taille (13 - 17 000 daltons). Il ressort cependant d'un rapport plus récent (JOHNSON et CROSS, 1979) que les fragments libérés par action de la trypsine sur différents AVS de *T. brucei* (E/S compris entre 1/20° et 1/70°, durée d'hydrolyse comprise entre 5 et 60 minutes), ne sont pas de taille toujours identique : la masse moléculaire du grand fragment est en fait variable, comprise selon les cas entre 40 et 52 000 daltons.

Ces données bibliographiques semblent donc confirmer, comme dans notre étude, l'existence de "domaines conformationnels" indépendants au sein des antigènes variables. Qu'il s'agisse de nos propres résultats ou de ceux de JOHNSON et CROSS, ils indiquent nettement, que contrairement aux immunoglobulines (PORTER, 1959), il n'est pas possible, à travers une série d'antigènes, d'obtenir des points de coupures semblables, livrant des fragments de taille très voisine ou identique. On serait donc tenté, dans le cas de la variation de séquence de glycoprotéines de surface de trypanosomes, d'envisager la notion de multi-
ples séquences partielles communes et non d'un seul
"domaine" commun de grande taille.

3° Dans le cas de l'AVS du variant BoTaT-28, la fraction tryptique F_1 obtenue s'est révélée correspondre aux 2/3 de la glycoprotéine initiale à partir de son extrémité N-terminale. Ce résultat peut être rapproché de ceux de JOHNSON et CROSS (1979), qui ont déterminé que leurs grands fragments tryptiques (40 - 52 000 daltons) possédaient la séquence N-terminale de l'antigène natif.

Les résultats que nous avons obtenus sont encore trop préliminaires pour nous permettre de conclure ou non à l'existence de séquences communes aux différents antigènes variables de *T. equiperdum*. De telles séquences ont été cependant objectivées par la mise en évidence par BALTZ et Coll. (1979) de réactions immunologiques croisées entre plusieurs de ces AVS (fixation du complément sur le complexe formé par l'AVS de BoTaT-28 et les immunosera anti AVS de BoTaT-1, -4, -20 et -78). Des réactions croisées ont également été mises en évidence avec *T. brucei* par une méthode de dosage radioimmunologique (BARBET et McGUIRE, 1978). Il semblerait toutefois que les déterminants antigéniques communs ainsi révélés soient masqués quand la glycoprotéine est liée à la membrane plasmique du trypanosome. En effet, aucune réaction croisée n'a pu être jusqu'ici observée en mettant en présence les parasites porteurs de ces AVS et les antisera monospécifiques correspondants.

C O N C L U S I O N S G E N E R A L E S

Les travaux effectués au laboratoire sur les antigènes variables de *Trypanosoma equiperdum* nous ont permis, dans un premier temps, d'accéder à une définition globale de ces glycoprotéines. La comparaison des résultats obtenus pour chacun des paramètres étudiés (masse moléculaire, structure secondaire, composition chimique, extrémité N- et C-terminale, a dégagé, d'une part un certain nombre de "points de similitude" entre les antigènes variables, d'autre part le "caractère d'individualité" de chacun d'eux. Une relation entre structure des AVS et ordre d'apparition des variants a pu aussi, dans une certaine mesure, être appréhendée.

Les études entreprises pour la définition d'une "stratégie d'approche" dans la détermination de la structure primaire du squelette peptidique de deux de ces antigènes de surface ont permis :

- la mise en évidence de domaines conformationnels distincts, propres à chaque glycoprotéine.
- La purification, dans le cas particulier de l'AVS de BoTaT-28, de fragments suffisamment homogènes pour une détermination de séquence et de composition glucidique, autorisant quelques hypothèses quant à la structuration générale de cette glycoprotéine.

En revanche, nos résultats n'ont pas permis jusqu'ici la mise en évidence "rapide" de fragments communs aux deux antigènes choisis, témoignant ainsi déjà de la complexité au plan structural, du mécanisme de variation antigénique. Cet échec relatif peut cependant être la conséquence de notre choix délibéré d'obtenir de gros fragments à partir de glycoprotéines natives.



D'autre part, notre difficulté dans la purification des fragments trypsiques de l'AVS de BoTaT-1 nous oriente vers une nouvelle approche d'étude structurale de cet antigène. De multiples protocoles peuvent être proposés ; citons par exemple, l'utilisation couplée de méthodes de dénaturation préalable associées à une dégradation enzymatique ou chimique.

Indépendamment des objectifs que nous nous étions fixés au plan biochimique, la préparation de fragments était aussi envisagée dans une "optique immuno-chimique". C'est dans cet esprit que différentes préparations ou fractions purifiées ont été adressées au groupe de Bordeaux, afin d'en établir une caractérisation immunologique :

- Recherche de la spécificité antigénique du variant en réaction homologue (immunserum spécifique de l'AVS correspondant).
- Recherche de sites antigéniques communs en réaction hétérologue (immunsera spécifiques de toute une série d'AVS).
- Enfin, recherche de propriétés "protectrices" : "vaccination" de la souris et étude du caractère évolutif de la parasitémie, après infestation de l'animal à l'aide d'un clone homologue ou hétérologue.

Nous terminerons sur cette note résolument optimiste dans la mesure où les tout premiers résultats obtenus dans ce domaine sont positifs. Sans entrer dans le détail de ces résultats d'enquête immunologique, nous pouvons dire que l'hypothèse de "masquage" des sites antigéniques communs à plusieurs AVS est une réalité, et qu'il est à l'origine de ce phénomène complexe de la variation antigénique des trypanosomes *Salivaria*.

B I B L I O G R A P H I E

- ALLEN A.K., NEUBERGER A. et SHARON N., 1973.
Biochem. J., 131, 155-162. (p.21)
- ALLSOPP B.A. et NJOGU A.R., 1974.
Parasitology, 69, 271-281. (p. 22)
- ALLSOPP B.A., NJOGU A.R. and HUMPHRYES K.C., 1971.
Exp. Parasit., 29, 271-284 (p. 18, 22)
- AMBLER R.P., 1967
In "Methods in Enzymology" Vol XI, Enzyme structure
(Ed. C.H. W. Hirs), 155-166, Academic Press New York San
Francisco London (p.48)
- BALTZ T., BALTZ D. et PAUTRIZEL R. 1976.
Ann. Immunol. (Inst. Pasteur), 127C, 761-774. (p.12, 26,
27, 30, 32, 55, 64)
- BALTZ T., BALTZ D. et PAUTRIZEL R.
et RICHEL C., LAMBLIN G. et DEGAND P., 1977.
FEBS Letters, 82, 93-96. (p. 12)
- BALTZ T., PLANTEY M.C., DEMEYER D., GIROUD C. et
DEGAND P., 1979.
Poster présenté au Vth Inter. Symp. on Glycoconjugates -
KIEL (Allemagne)(3-7 sept.)(p. 98)
- BARBET A.F. et Mc GUIRE T.C., 1978.
Proc. Nat. Acad. Sci., 75, 1989-1995 (p.98)
- BARRY J.D., HAJDUK S.L. et VICKERMAN K., 1979.
Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg., 73, 205-208 (p. 14)
- BEALE G.H. et WILKINSON J.F., 1961.
Ann. Rev. Microbiol., 15, 263 (p. 13)

- BIGALKE R.D., 1966.
Onderstepoort J. Vet. Res., 33, 277-286. (p. 16)
- BRIDGEN P.J., CROSS G.A.M. et BRIDGEN J., 1976.
Nature, 263, 613-614. (p. 12, 61, 95, 96)
- BROOM J.C. et BROWN H.C., 1940.
Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg., 34, 53-64. (p. 11)
- BROWN K.N. et WILLIAMSON J. 1962.
Nature, 194, 1253-1255. (p. 16, 17, 19)
- BROWN K.N. et WILLIAMSON J., 1964.
Exp. Parasit., 15, 69-86 (p. 17)
- BUNN H.F., GABBAY K.H. et GALLOP P.M., 1978.
Science, 200, 21-27. (p.91)
- CANTRELL W., 1958.
J. inf. Dis., 103, 263-271. (p.11)
- CAPBERN A., GIROUD C., BALTZ T. et MATTERN P., 1977.
Exp. Parasit., 42, 6-13. (p. 2, 10, 11, 24)
- CLAMP J.R., BHATTI T., CHAMBERS R.E., 1972.
In Gottschalk A. ed., Glycoproteins, 2nd Ed.,
Elsevier, AMSTERDAM, 300-319. (p.60)
- CLARKSON H.J. et AWAN M.A.Q., 1967.
Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg., 61, 142. (p. 9)
- CLAYTON C., 1978.
Exp. Parasit., 44, 202-208. (p. 13)
- CROSS G.A.M., 1975.
Parasitology, 71, 393-417. (p. 5, 12, 18, 22, 54, 55, 56)

CROSS G.A.M., 1977.

Am. J. trop. Med. Hyg., 26, 240-244. (p.12, 56, 60)

CROSS G.A.M., 1978.

Proc. R. Soc. Lond. B., 202, 55-72 (p. 10, 56, 57)

CROSS G.A.M. et JOHNSON J.G., 1976.

In Biochemistry of parasites and host-parasite relationships (ed. H Van den Bossche), 413-420. Amsterdam :

Elsevier/North Holland. (p. 13, 20, 62, 93, 97)

CUNNINGHAM I. et HONIGBERG B.M. 1977.

Science, 197, 1279-1282. (p. 15)

DE RAADT P., 1974.

In "Ciba foundation Symposium 20 (new series) : Trypanosomiasis and Leishmaniasis with special reference to Chaga's disease". 199-224. Associated Scientific Publishers.

AMSTERDAM. LONDON. NEW YORK (p. 10, 13)

DESOWITZ R.S., 1970.

In "Immunity to parasitic animals". (JACKSON G.J., HERMAN R. et SINGER I. Eds), Vol 2, pp551-596, Appleton-Century-Crofts, New-York. (p. 10, 12)

DOLHOFER R. et WIELAND O.H., 1979.

FEBS Letters, 103, 282-286. (p.91)

DOYLE J.J., 1976.

Rockefeller Monograph. (p.13)

DOYLE J.J., 1977.

In "Immunity to blood parasites in animals and man (eds. L. MILLER, J. PINO et J. McKELVEY) 27-63. New York, Plenum Press. (p. 10)

DUBOIS M., GILLES K., HAMILTON J.K., REBERS P.A. et SMITH F., 1956.

Anal. Chem., 28, 350-356. (p. 23)

EGGITT M.J., TAPPENDEN L. et BROWN K.N., 1977.

Parasitology, 75, 133-141. (p. 16)

FRANKE E., 1905.

Münch. Med. Woch., 52, 2059-2060. (p. 9)

FRUIT J., VAN MEIRVENNE N., PETITPREZ A., AFCHAIN D., LE RAY D. et BOUT D., 1974.

Proc. third. int. Congr. Parasit., München, p. 1095. (p. 19)

FRUIT J., AFCHAIN D., PETITPREZ A., VAN MEIRVENNE N., LE RAY D., BOUT D. et CAPRON A., 1977.

Parasitology, 74, 185-190. (p. 19)

GODFREY D.G. et TAYLOR E.R., 1969.

Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg., 63, 115-116. (p. 21)

GOLDSTEIN I.J. et SO L.L., 1965.

Arch. Biochim. Biophys., 111, 407-414. (p. 21)

GRAY A.R., 1961.

Immunology, 4, 253-261. (p. 16)

GRAY A.R., 1965a.

Ann. Trop. Med. Parasit., 59, 27-36. (p. 10, 11)

GRAY A.R., 1965b.

J. gen. Microbiol., 41, 195-214. (p. 11)

GRAY A.R., 1975.

Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg., 69, 131-138. (p. 11)

GRAY A.R., 1977.

Ann. Soc. belge. Méd. trop., 57, 403-408. (p. 10)

GRAY A.R. et LUCKINS A.G., 1976.

In "Biology of the kinetoplastida", 493-542.

(Lumsden W.H.R. et Evans D.A., Eds). Academic Press,
London. (p. 10)

HALLGREN P., LUNDBLAD A. et SVENSSON S., 1975.

J. Biol. Chem., 250, 5312-5314. (p.60)

HAYASHI R., BAI Y. et HATA T., 1975.

J. Biochem., 77, 69-79. (p.48)

HILSCHMANN N. et CRAIG L.C., 1966.

Proc. Nat. Acad. Sci. USA., 53, 1403-1409 (p. 27)

HIRUMI H., DOYLE J.J. et HIRUMI K., 1977.

Science, 196, 992-994. (p. 15)

HOARE C.A., 1972.

Blackwell Sc. Publ., Oxford. Edimburgh. (p. 5, 9)

HUMPHRYES K.C., 1970.

J. Chromatog., 49, 503-510. (p. 18, 22)

INOKI S., 1960.

Biken's J., 3, 215-222. (p. 11)

JACKSON P.R., 1977.

J. Parasit., 63, 8-14. (p. 21)

JENNI L., 1977.

Acta trop., 34, 35-41. (p. 11, 14)

- JOHNSON J.G. et CROSS G.A.M., 1977.
J. Protozool., 24, 587-591. (p.56, 58)
- JOHNSON J.G. et CROSS G.A.M., 1979.
Biochem. J., 178, 689-697 (p.95, 97)
- LANHAM S.M. et GODFREY D.G., 1970.
Exp. Parasit., 28, 521-534. (p. 28)
- LANHAM S.M. et TAYLOR A.E.R., 1972.
J. gen. Microbiol., 72, 101-116 (p. 18)
- LEAVITT R.D., FELSTED R.L. et BACHUR R., 1977.
J. Biol. Chem., 252, 2961-2966, (p.21)
- LE PAGE R.W.F., 1968.
Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg., 62, 131. (p. 13)
- LE RAY D., 1975.
Ann. Soc. belge. Méd. trop., 55, 129-311. (p. 16, 18)
- LE RAY D., BARRY J.D., EASTON C. et VICKERMAN K., 1977.
Ann. Soc. belge. Méd. trop., 57, 369-381. (p. 14)
- LE RAY D., BARRY J.D. et VICKERMAN K., 1978.
Nature, 273, 300-302. (p. 14)
- LEVADITI C. et Mc INTOSCH J., 1910.
Bull. Soc. Path. exot., 3, 368-376. (p. 10)
- LIS H., SELA B., SACHS L. et SHARON N., 1970.
Biochim. Biophys. Acta, 211, 582-585. (p. 21)
- LOURIE E.M. et O'CONNOR R.J., 1937.
Ann. trop. Med. Parasit., 31, 319-340. (p. 9)

LUMSDEN W.H.R., 1967.

Bull. Org. Mond. Santé, 37, 167-175. (p. 16, 17)

LUMSDEN W.H.R., HERBERT W.J. et McNEILLAGE G.J.C., 1967.

Vet. Rec., 81, 237-238. (p.24)

McNEILLAGE G.J.C. et HERBERT W.J., 1968.

J. Comp. Path., 78, 345-349. (p. 13)

MUTERMILCH S. et SALAMON E., 1928.

C.R. Soc. Biol. (Paris), 98, 348. (p. 10)

NICOLSON G.L., BLAUSTEIN J. et ETZLER M.E., 1974.

Biochemistry, 13, 196-204. (p. 21)

NJOGU A.R. et HUMPHRYES K.C., 1972.

Exp. Parasit., 31, 178-187. (p. 22)

NYINDO M., DARJI N., KAMINJOLO J.S., CHIMTAWI M.,
PATEL N., et ONYANGO P., 1978a.

J. Parasitol., 64, 469-474. (p. 15)

NYINDO M., CHIMTAWI M., OWOR J., KAMINJOLO J.S.,
PATEL N. et DARJI N., 1978b.

J. Parasitol., 64, 1039-1043. (p. 15)

Org. Mond. Santé, 1969.

Sér. Rapp. tech. N°411. (p. 9)

OSAKI H., 1959.

Biken's J., 2, 113-127. (p. 9)

PORTER R.R., 1959.

Biochem. J., 73, 119-127. (p. 97)

RADHAKRISHNAMURTHY B. et BERENSON G.S., 1966.

J. Biol. Chem., 241, 2106-2112. (p.60)

RADHAKRISHNAMURTHY B. et BERENSON G.S., 1973.

J. Biol. Chem., 248, 2000-2006. (p.60)

RIFKIN M., 1977.

In "V International Congress of Protozoology, New York",
p. 246. (p. 55)

RIOU G., LACOME A., BRACK C., DELAIN E. et PAUTRIZEL R.,
1971.

C.R. Acad Sci. (Paris), 273, 2150-2153. (p. 8)

RITZ H., 1916.

Mitteilung Arch. f. Schiffs. U. Trop. Hyg., 20, 397-420.
(p. 9, 11)

ROVIS L., BARBET A.F. et WILLIAMS R.Q., 1978.

Nature, 271, 654-656. (p. 55)

SEED J.R., 1963.

J. Protozool., 10, 380-389. (p. 16, 17, 19)

SEED J.R., 1972.

Exp. Parasit., 31, 98-108. (p. 17)

SEED J.R., 1974.

J. Protozool., 21, 639-646. (p. 10)

SEED T.M., SEED J.R. et BRINDLEY D., 1976.

Tropenmed. Parasit., 27, 202-212. (p. 20, 21)

SEED J.R. et WEINMAN D., 1963.

Nature, 198, 197-198. (p. 17)

STANLEY H.A., HONIGBERG B.M. et CUNNINGHAM I., 1978.

J. Protozool., 25, 245-252. (p. 19)

STEIGER R.F., 1973.

Acta trop., 30, 64-68. (p. 20)

STEIGER R.F., 1975.

Acta trop., 32, 152-158. (p. 20)

STRICKLER J.E., MANCINI P.E. et PATTON C.L., 1978.

Exp. Parasit., 46, 262-276. (p.55)

TAYLOR D.W. et CROSS G.A.M., 1977.

Parasitology, 74, 47-60. (p. 15)

THIERY J.P., 1967.

J. Micr., 6, 987-1018. (p. 20)

ULIENBERG G. et GIRET M., 1972.

Rev. Elev. Med. vet. Pays trop., 25, 37-52. (p. 11)

VAN MEIRVENNE N., JANSSENS P.G. et MAGNUS E., 1975a.

Ann. Soc. belge. Méd. trop., 55, 1-23. (p.11, 13, 19, 28)

VAN MEIRVENNE N., JANSSENS P.G. et MAGNUS E., 1975b.

Ann. Soc. belge. Méd. trop., 55, 25-30. (p. 13)

VICKERMAN K., 1969.

J. Cell. Sci., 5, 163-194. (p. 7, 8, 9, 13, 19, 20)

VICKERMAN K., 1974.

In "Ciba foundation symposium 25 (new series) : Parasites in the immunized host : mechanism of survival", 53-80.

Amsterdam : Associated Scientific Publishers. (p. 10)

VICKERMAN K., 1978.

Nature, 273, 613-617. (p. 10)

VICKERMAN K. et LUCKINS A.G., 1969.

Nature, 224, 1125-1126. (p. 19)

WAGH P.V. et ROBERTS B.I., 1972.

Biochemistry, 11, 4222-4227. (p. 60)

WATKINS J.F., 1964.

J. Hyg. Cambridge, 62, 69-80. (p. 11)

WEISS J.B., LOTE C.J. et BOBINSKI H., 1971.

Nature, New Biology, 234, 25-26. (p.60)

WEITZ B. 1960a.

Nature, 185, 788-789. (p. 17, 18)

WEITZ B., 1960b.

J. of Gen. Microbiol., 23, 589-600. (p. 16)

WILLIAMSON J. et BROWN K.N., 1964.

Exp. Parasit., 15, 44-68. (p. 18, 19)

WILSON A.J. et CUNNINGHAM M.P., 1970.

Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg., 64, 818-821. (p. 9, 11)

WRIGHT K.A. et HALES H., 1970.

J. Parasit., 56, 671-683. (p. 20)

A P P E N D I C E

T E C H N I Q U E

T A B L E D E S M A T I E R E S

	Page
I - METHODES D'ETUDE PHYSICO-CHIMIQUES	T/1
A - ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE EN PRESENCE DE SDS	1
1) Principe	1
2) Technique	1
3) Réactifs	3
4) Application à la détermination de la masse moléculaire	4
B - ETUDE EN DICHROISME CIRCULAIRE	6
1) Réalisation des spectres dichroïques	7
2) Application à l'étude de la dénaturation thermique	7
C - DETERMINATION DE LA COMPOSITION GLUCIDIQUE	7
1) Hydrolyse par l'acide trifluoroacétique	8
2) Méthanolyse	8
3) N-acétylation et dé-O-acétylation	8
4) Triméthylsilylation	8
5) Chromatographie en phase gazeuse	9
6) Repérage des oses combinés par dosage à l'orcinol	9
D - METHODES D'ETUDE DES ACIDES AMINES	9
1) Dosage des acides aminés par la réaction à la ninhydrine	9
a - Réactifs	9
b - Mode opératoire	10

	Page
2) Détermination de la composition en acides aminés	T/10
a - Hydrolyse	10
b - Analyse des acides aminés sur autoanaly- seur	10
c - Dosage du tryptophane	13
3) Détermination des acides aminés en position N-terminale	13
a - Couplage	13
b - Conversion	14
c - Identification des PTH aminoacides	14
4) Détermination des acides aminés en position C-terminale.	15
a - Hydrazinolyse	15
b - Hydrolyse par la carboxypeptidase Y	15
c - Hydrolyse par le mélange des carboxypep- tidases A et B.	16
II - METHODES D'ETUDE STRUCTURALE DES AVS DE BOTAT-1 ET DE BOTAT-28	17
A - ETUDE DE L'ACTION DE DIFFERENTS ENZYMES PROTEOLY- TIQUES	17
1) Enzymes utilisés	17
2) Tampons d'incubation	17
3) Protocole d'hydrolyse	17
B - HYDROLYSE TRYPSIQUE DE L'AVS DE BOTAT-1	18
1) Hydrolyse	18
2) Fractionnement de l'hydrolysate	18
C - HYDROLYSE TRYPSIQUE DE L'AVS DE BOTAT-28	18

	Page
III - TECHNIQUES IMMUNOLOGIQUES	T/19
A - OBTENTION DES IMMUNSERAS	19
B - IMMUNOELECTROPHORESE EN AGAROSE	19
1) Réactifs	19
2) Préparation des lames	20
3) Coloration	20
C - IMMUNOPRECIPITATION	21

BIBLIOGRAPHIE

I - METHODES D'ETUDE PHYSICO-CHIMIQUES

A - ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE EN PRESENCE DE SDS

1) Principe

La fixation du dodécyl sulfate de sodium (SDS) sur une chaîne peptidique confère à celle-ci des charges négatives telles que la migration électrophorétique anodique de la protéine ne dépend plus que de la longueur de sa chaîne peptidique.

2) Technique

Nous avons utilisé le système électrophorétique préconisé par LAEMMLI(1970) et l'appareillage décrit par KERCKAERT (1978). Un gel à gradient d'acrylamide (5 à 30 %) de 1,5 mm d'épaisseur est coulé entre deux plaques de verre au moyen de l'appareil schématisé dans la figure N°1. Un gel supérieur à 5 % d'acrylamide, dans lequel sont réalisés au moyen d'un peigne en plastique des compartiments devant permettre le dépôt des échantillons à analyser est ensuite coulé.

Les dépôts effectués sont de 5 à 10 μ l, correspondant selon les cas, (produit purifié au mélange) à des valeurs de 5 à 40 μ g de produit à analyser. L'électrophorèse est réalisée sous une différence de potentiel stabilisée à 120 volts. La durée de la migration est appréciée à l'aide d'un témoin coloré (bleu de bromophénol). Dans ces conditions, trois heures de migration ont été généralement retenues. Le gel est ensuite démoulé et coloré pendant 16 heures par le réactif au bleu de Coomassie. La décoloration s'effectue ensuite pendant 48 à 72 heures en présence d'une solution méthanol, acide acétique.

SCHEMA DE L'APPAREIL UTILISE POUR
PREPARER LES GELS A GRADIENT D'ACRYLAMIDE

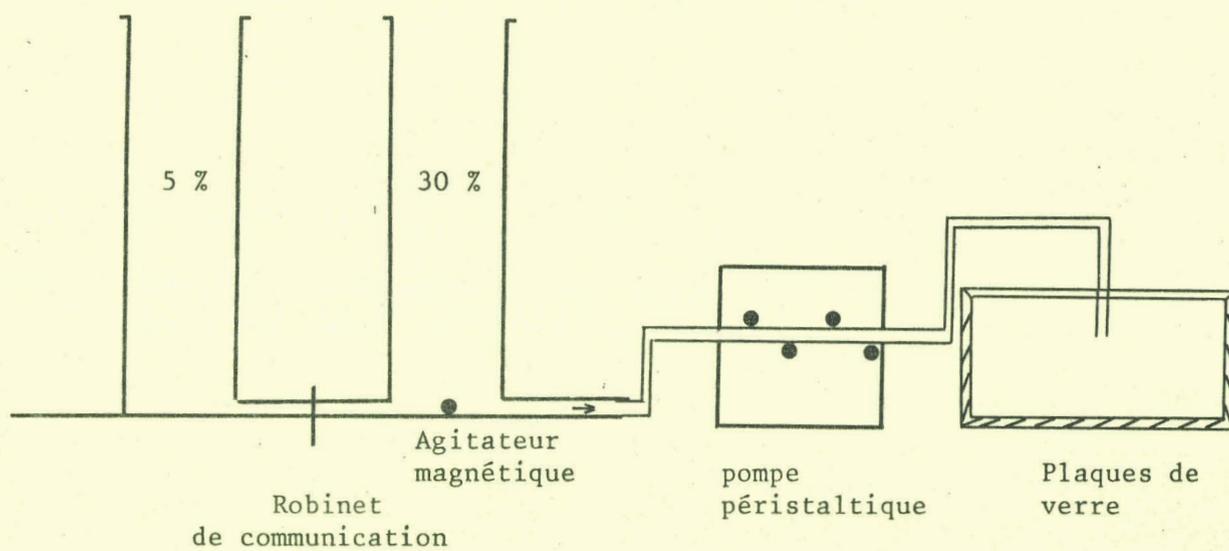


FIGURE N.1

3) Réactifsa - Solution mère d'acrylamide : 2A

- acrylamide	48g
- N-N' méthylènebisacrylamide	1,28g
- eau distillée q.s.p.	100 ml

b - Solution mère du tampon du gel à gradient : 1A

- Tris 3 M pH 8,8

c - Solution mère du tampon du gel supérieur : 1B

- Tris 1 M pH 6,8

d - Composition du gel a gradient

Solution à 5 % (10 ml)		Solution à 30 % (10 ml)	
1A	1.25 ml	1.25 ml	
2A	1 ml	6 ml	
Eau distillée	7.2 ml	2.2 ml	
SDS	0.5 ml	0.5 ml	
TEMED*	5 µl	5 µl	
Persulfate d'ammonium 5 %	10 µl	10 µl	
Saccharose	-	2 g	

* N,N,N',N' - Tétraméthyléthylène diamine.

e - Composition du gel supérieur

solution à 5 % (10 ml)

1B	1,25 ml
2A	1 ml
Eau distillée	7,2 ml
SDS	0,5 ml
TEMED	10µl
Persulfate d'ammonium 5 %	100µl



f - Tampon de dissolution des échantillons

- Tris 0,0625 M Ph 6,8
- SDS 2 %
- Glycérol 10 %
- Bleu de bromophénol : quelques gouttes.

Les analyses ayant été réalisées selon les cas en présence ou en absence d'agents réducteurs, ce tampon était ou non enrichi en β -mercaptoéthanol à la concentration finale de 5 %.

Après dissolution dans le tampon choisi, le produit à analyser est laissé 3 minutes à 100°C, afin de permettre la fixation du SDS sur la chaîne peptidique et, si l'on se trouve en milieu réducteur la coupure des ponts disulfure par le -mercaptoéthanol.

g - Tampon d'électrophorèse.

- Tris 0,025 M
- Glycocolle 0,192 M
- SDS 0,1 %

h - Colorant

- Bleu de Coomassie 1,25 g
- Ethanol 122 ml
- Acide acétique 25 ml
- Eau distillée 122 ml

i - Décolorant

- Méthanol 350 ml
- Acide acétique 70 ml
- Eau distillée 500 ml

4) Application à la détermination de la masse moléculaire.

5 μ l soit 5 μ g d'un mélange de témoins de masse moléculaire connue (kit de calibration bas poids moléculaire Pharmacia : 14 400 à 94 000 daltons) sont disposés sur

COURBE D'ETALONNAGE DES MASSES MOLECULAIRES EN FONCTION
DE LA MIGRATION DES TEMOINS DE CALIBRATION

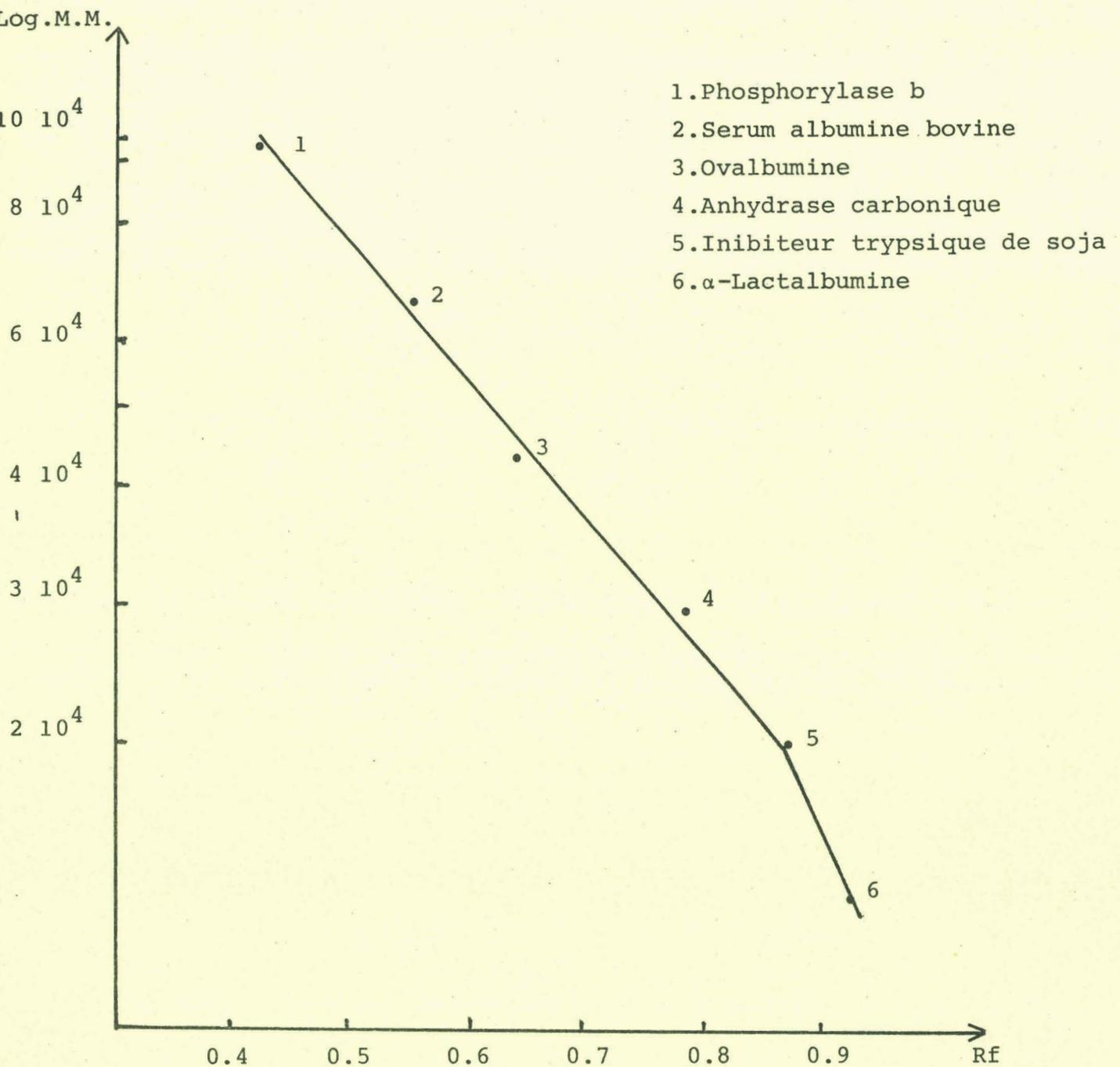


FIGURE N.2

le gel dans les mêmes conditions que les échantillons à analyser. La courbe d'étalonnage (fig N.2) du gel est obtenue en portant la valeur du Rf de chaque témoin en fonction du logarithme de leur masse moléculaire.

$$\text{Rf} = \frac{\text{Migration du bleu de bromophénol}}{\text{Migration de la protéine}}$$

B - ETUDE EN DICHROISME CIRCULAIRE

Les expériences ont été réalisées sur un dichrographe JOBIN-YVON RJ MARK III qui permet des mesures de 180 à 800 nm. La sensibilité de l'appareil peut varier de $2 \cdot 10^{-4}$ à 10^{-6} . Le signal dichroïque amplifié est enregistré sur papier calibré en cm (abscisse et ordonnée).

La concentration des protéines, déterminée par la méthode de LOWRY (1951) est de l'ordre de 1 mg/ml dans l'eau. L'épaisseur des cellules de mesure (en quartz) varie de 0,01 cm à 2 cm. L'ellipticité molaire (θ) a été calculée pour la région du spectre correspondant au chromophore amide (entre 180 et 240 nm), en prenant la moyenne à partir de 3 à 5 spectres réalisés à 2 sensibilités différentes. La vitesse de déroulement des nanomètres était de 0,1 mm/sec. La vitesse de déroulement du papier était de 2 mm/mn. La constante de temps était égale à 10.

Pour étalonner le dichrographe, on prépare une solution d'isoandrosterone dans le dioxanne (25 mg/20 ml). On mesure à 304 nm, en cuve de 1 cm, à la sensibilité de $10 \cdot 10^{-5}$ afin d'obtenir sur l'enregistreur une expansion correspondant à 142,5 mm.

La formule permettant d'obtenir les ellipticités molaires à partir du spectre expérimental est :

$$(\theta) = 3.300 \frac{M}{Cd} \Delta s$$

M = masse moyenne des résidus d'acides aminés (ici

c = concentration en g/l
 d = longueur de la cuve en cm
 Δ = nombre de mm mesurés
 s = sensibilité (10^{-6} à 2.10^{-4})

(θ) est donc exprimé en deg. décimole $^{-1} \text{cm}^2$.

1) Réalisation des spectres dichroïques.

Tous les spectres expérimentaux ont été faits dans des conditions telles que la densité optique soit toujours inférieure à 1,5. Ils ont été ensuite convertis en courbes gaussiennes à l'aide d'un convertisseur de courbes "DU PONT CURVE". On obtient ainsi des maxima négatifs à 207, 214 et 222 nm. Le contenu en hélices α est apprécié à partir de la transition $n \rightarrow \pi$ au niveau de la bande centrée à 222 nm et en prenant la valeur de -30.620 comme étalon pour l'hélice. La quantité de structure β est appréciée de façon similaire au niveau de la bande à 214 nm et en prenant la valeur de -7.040 comme étalon pour la forme β . Les valeurs des étalons sont déterminées pour le dichrographe utilisé dans la région du spectre 180-250 nm, à partir de six protéines d'après la méthode de CHEN et Coll. (1974).

2) Application à l'étude de la dénaturation thermique.

La température, mesurée par une sonde de platine plongée directement dans la solution, a été élevée de 5°C en 5°C à partir d'une solution de départ maintenue à 4°C. Les spectres dichroïques ont été enregistrés à chaque palier selon le protocole précédemment décrit.

C) DETERMINATION DE LA COMPOSITION GLUCIDIQUE.

La composition en oses neutres et en osamines est déterminée après méthanolyse par chromatographie en phase gazeuse selon la méthode de REINHOLD (1972), modifiée par ROUSSEL et Coll. (1975).

1 - Hydrolyse par l'acide trifluoroacétique

Afin d'assurer un meilleur rendement dans le dosage de la N-acétylglucosamine engagée dans la liaison asparaginy-N-acétylglucosamine, la méthanolyse est précédée d'une hydrolyse par 0.5 ml d'acide trifluoroacétique 2 N à 100°C pendant 2 heures suivie d'une N-réacétylation.

2 - Méthanolyse

Elle est effectuée dans des tubes vissés à bouchon de Teflon. 1 à 1,5 mg d'AVS sont soumis à une méthanolyse dans 0,5 ml de méthanol-HCl 0,5 M à 65°C pendant 16 heures. La solution est ensuite séchée sous courant d'azote dans un bain-marie à 37°C.

3 - N-acétylation et dé-0-acétylation

- N-acétylation.

Les produits sont N-acétylés par addition de 100 μ l d'anhydride acétique et de 100 μ l de pyridine, laissés trois minutes à la température du laboratoire et séchés sous courant d'azote dans un bain-marie à 37°C.

- Dé-0-acétylation.

Les produits sont alors dé-0-acétylés dans 500 μ l de méthanol contenant de l'ammoniaque à 20 p. 100 pendant 1 heure à 65°C. Le méthanol est alors évaporé sous courant d'azote.

4 - Triméthylsilylation

La silylation est effectuée par addition de 100 μ l de Sylon (Sylon HTP-Inc, Bellafonte, Pennsylvania, 16823) pendant 1 heure à température ambiante. Après séchage sous courant d'azote, 100 μ l d'heptane sont ajoutés. Un délai de 30 minutes est fixé avant l'injection de 1 à 2 μ l de la phase heptanique.

5 - Chromatographie en phase gazeuse

L'analyse des méthyl-0-glycosides silylés est effectuée en présence d'inositol utilisé comme témoin interne (50 g) par chromatographie en phase gazeuse sur un appareil PERKIN-ELMER (modèle 900) muni de détecteurs à ionisation de flamme et en utilisant des colonnes d'acier (180 x 0,3 cm) contenant de l'OV 17 à 3 p. 100 sur Chromosorb W-AW-DMCS (100-200 mesh (PACKARD)).

La température initiale du four est de 120°C. Elle augmente de 8° par minute jusqu'à 270°C. La surface des pics et le temps de rétention sont déterminés au moyen d'un intégrateur digital (Infotronics CRS 208, SHANNAN, Ireland).

6 - Repérage des oses combinés par dosage à l'orcinol

La présence d'oses combinés dans les éluats de colonne est mise en évidence par la méthode de dosage à l'orcinol sulfurique adaptée à l'autoanalyseur TECHNICON par DEMAILLE et Coll. (1965).

D - METHODES D'ETUDE DES ACIDES AMINES

1 - Dosage des acides aminés par réaction à la ninhydrine

La présence d'acides aminés ou de peptides dans les éluats de colonne est mise en évidence par la réaction à la ninhydrine adaptée sur autoanalyseur Technicon par DEGAND (1972).

a) Réactifs

- Solution de méthylcellosolve dilué

Préparer 24 heures avant les autres réactifs, un mélange à parties égales de :

Méthylcellosolve	1 500 ml
Eau distillée	1 500 ml

Cette solution est dégazée et maintenue sous atmosphère d'azote.

- Solution de ninhydrine "stock"

Méthylcellosolve pur	500 ml
Ninhydrine	15 ml
Hydrindantine	1,125 g
Tampon acétate de Na 4 <u>M</u> pH 5,5	262,5 ml

Cette solution est préparée et stockée sous atmosphère d'azote.

Le réactif utilisé pour le dosage est obtenu en mélangeant aux trois litres de solution de méthylcellosolve dilué, la préparation de solution "stock". L'ensemble est toujours maintenu sous atmosphère d'azote.

Le réactif peut être étalonné avant chaque dosage par rapport à une gamme de norleucine et de proline.

b) Mode opératoire

500µl de chaque fraction éluée de la colonne de Biogel P100 sont mélangés au réactif à la ninhydrine dans une première bobine de délai. Le flux liquidien est fractionné par bulles d'azote. La progression du flux est assurée par une pompe péristaltique (fig. 3). Après passage au bain-marie à 95°C et refroidissement, la densité optique est lue à 570 nm.

2 - Détermination de la composition en acides aminésa) Hydrolyse

0,3 mg d'échantillon est hydrolysé au moyen d'acide chlorhydrique 5,6 N pendant 24 heures à 110°C en tube scellé sous azote. L'hydrolysate est ensuite évaporé sous vide à basse température (EVAPO-MIX BUCHLER).

b) Analyse des acides aminés sur autoanalyseur.

La composition en acides aminés est réalisée sur autoanalyseur BECKMAN de type Multichrom B. Les tampons et le programme retenus permettent en une seule étape, sur

une seule colonne, la séparation des acides aminés et des osamines (Résine BECKMAN type M 82). La composition des tampons utilisés est rapportée dans le tableau suivant :

T/11

Tampon	1	2	3	4	5
pH	2.97	2.97	4,10	7.32	7.32
Citrate de Na, 2H ₂ O	78.4 g	78.4 g	78.4 g	78.4 g	78.4 g
HCl	56.9 ml	56.9 ml	36.5 ml	0.5 ml	0.5 ml
NaCl	-	58.5 g	-	-	187.2 g
Thiodiglycol	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml
Acide N-caprylique	0.4 ml	0.4 ml	0.4 ml	0.4 ml	0.4 ml
Eau distillée q.s.p.	500 ml	500 ml	500 ml	500 ml	500 ml

Le programme utilisé pour une analyse est le suivant :

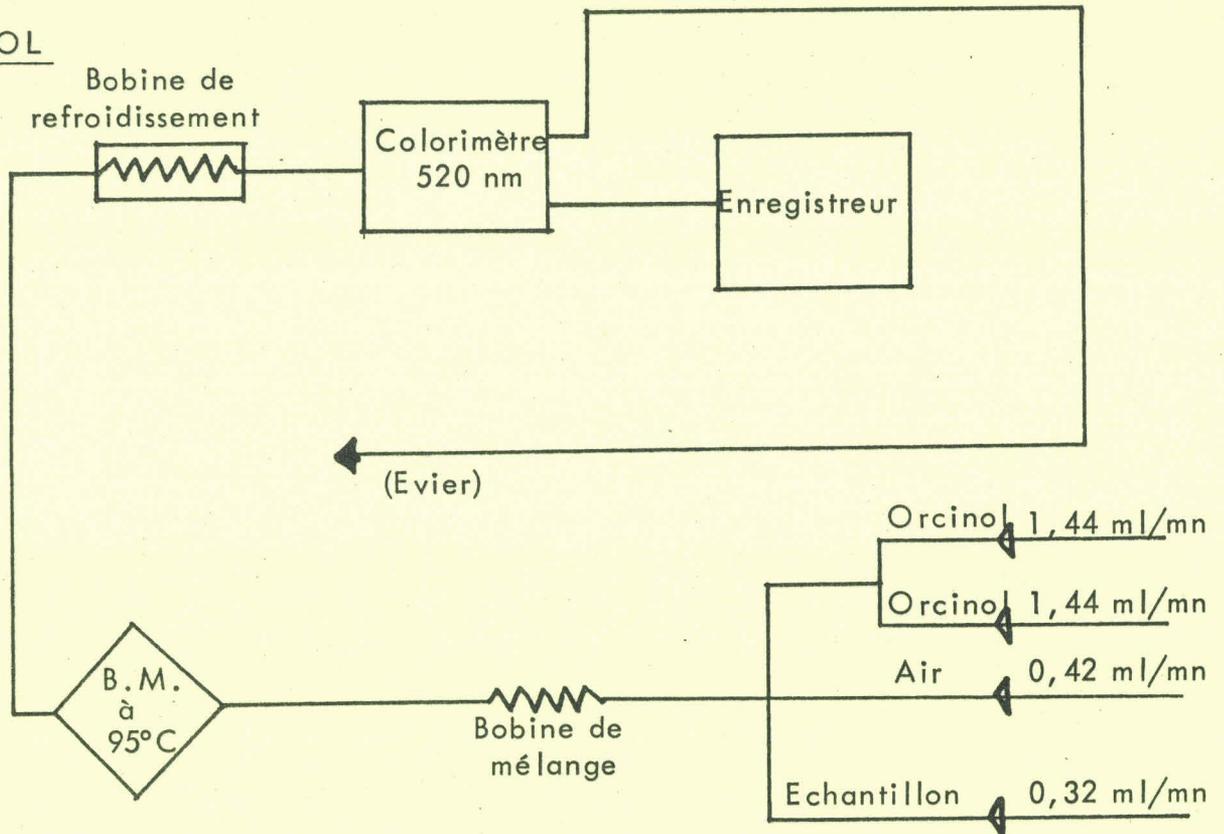
	Temps en minutes
Tampon 1	0 - 138
Tampon 2	138 - 161
Tampon 3	161 - 204
Tampon 4	204 - 219
Tampon 5	219 - 309
Régénération NaOH 0.2 M	309 - 334
Rééquilibrage en tampon 1	334 - 369

Dans le programme, l'utilisation du tampon acétate de sodium de pH 2,97 enrichi en NaCl permet l'élution des hexosamines successivement (glucosamine et galactosamine) entre les résidus d'alanine et de valine.



DOSAGE SUR AUTO-ANALYSEUR TECHNICON

ORCINOL



NINHYDRINE

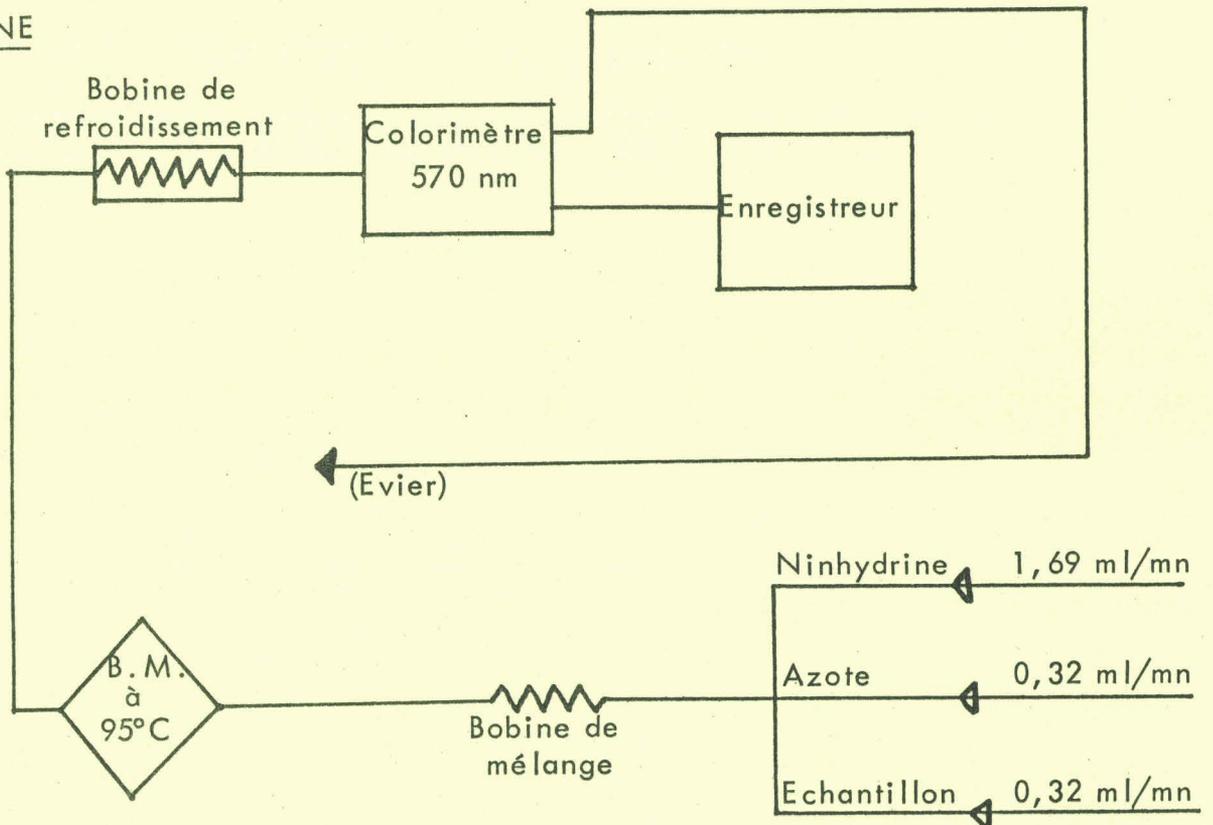


FIGURE N.3

Les hydrolysats sont repris dans un ml du tampon 1, mais ajusté à pH 2.2, contenant 100 nanomoles de norleucine (standard interne).

c) Dosage du tryptophane.

Le tryptophane qui est détruit par hydrolyse acide (HCl 5,6 N) a été dosé par la méthode de PENKE et Coll. (1974) : 1 mg d'AVS est hydrolysé 24 heures sous vide à 105°C par 1 ml d'acide β -mercaptoéthane sulfonique (PIERCE) en présence de 500 nanomoles de norleucine. Le pH de l'hydrolysat est ensuite ajusté à 2.2 par de la soude 2 N et le volume ajusté à 5 ml avec le tampon pH 2.2 utilisé habituellement pour le dépôt des échantillons sur l'autoanalyseur. 1 ml de cette solution est déposé ; l'analyse a lieu dans les mêmes conditions que précédemment.

3 - Détermination des acides aminés en position N-terminale

Elle est réalisée par la dégradation de EDMAN (1970) selon un protocole décrit en 1970. Nous utilisons un système d'identification du dérivé phényl-thio-hydantoïne amino-acide par chromatographie liquide de haute performance selon un programme d'élution décrit par HERMANN et Coll. (1978).

a) Couplage

Nous suivons la technique de couplage modifiée par DEMAILLE. Dans un tube conique à col rodé, sont dissous 200 nanomoles d'AVS dans 100 μ l d'un tampon diméthyl-allylamine/propanol/H₂O (1,2/15/10 - V/V/V) fraîchement préparé, enrichi en NaCl à 10 p. 100 et ajusté à pH 9.5 par l'acide trifluoroacétique à 10 p. 100. Sont alors ajoutés 5 μ l de phénylisothiocyanate et le tube est maintenu sous courant d'azote pendant 30 secondes. Le tube est placé dans

un bain-marie à 50°C pendant 40 minutes ; le mélange est refroidi immédiatement après la réaction de couplage. Deux extractions par addition de 0,5 ml de benzène sont effectuées, suivies d'une centrifugation afin d'éliminer la phase benzénique (2000t/mn) pendant 5 minutes. Le benzène résiduel est éliminé sous courant d'azote. Après lyophilisation de la phase aqueuse, on termine la dessiccation en disposant le tube pendant 30 minutes dans un dessiccateur thermostaté à 50°C en présence d'anhydride phosphorique. Le clivage s'effectue à 50°C pendant 7 minutes par 50 µl d'acide trifluoroacétique anhydre (PIERCE). Le produit est séché sous azote et la thiazolinone est extraite par 0,5 ml d'éther dépourvu de peroxydes et contenant de l'éthylmercaptan (20 µl pour 50 ml d'éther). L'opération est répétée trois fois. Les phases étherées réunies sont alors séchées sous azote.

b) Conversion

Les phases étherées sont chauffées en présence de 200 µl d'HCl 0.1 N pendant 10 minutes à 80°C. On extrait alors trois fois par 0,5 ml d'acétate d'éthyle. Dans la phase aqueuse, sont localisés les dérivés de l'arginine, de l'histidine et de l'acide cystéique. Dans la phase organique sont extraits tous les autres acides aminés dérivés.

c) Identification des PTH aminoacides.

Elle est réalisée par chromatographie liquide de haute performance selon le protocole décrit par HERMANN et Coll. (1978). L'appareil utilisé est un HEWLETT-PACKARD modèle 1084 B. Des standards PTH aminoacides sont injectés sur colonnes WATERS (3.9 mm x 30 cm) de type µ Bondapack C18. Le dérivé PTH de la norvaline est injecté à titre de témoin interne. L'élution de la totalité des PTH aminoacides de la phase organique est obtenue en 30 minutes par l'application d'un gradient linéaire dans un tampon acétate de Na 0.01 M de pH 4.18 enrichi progressivement en méthanol. On passe ainsi de 10 à 48 p. 100 de méthanol-acétate. Les pics d'élution sont enregistrés par lecture de l'absorbance à 254 nm.

La séparation des PTH aminoacides de la phase aqueuse est obtenue grâce à l'élution de type isocratique à 24 p. 100 de méthanol dans le tampon acétate décrit plus haut. Ce programme particulier demande dix minutes.

4 - Détermination des acides aminés en position C-terminale

a) Hydrazinolyse

Nous avons utilisé la technique d'hydrazinolyse décrite par NIU et FRAENKEL-CONRAT (1955) modifiée par HAN (1970).

10 mg d'AVS en solution dans l'eau sont placés dans un tube conique (1 cm de diamètre, 9 cm de longueur) à bouchon rodé puis séchés sous vide en présence d'anhydride phosphorique. 1 ml d'hydrazine à 98 p. 100 (PIERCE) est ajouté. Le tube conique est alors disposé dans un tube à essai qui est lui-même scellé. L'ensemble est porté à 75°C pendant 16 heures. Le contenu du tube est ensuite évaporé sous vide en présence d'acide sulfurique puis repris par 1 ml d'eau. Les hydrazides sont éliminés au maximum par 3 extractions successives par 1 ml de benzaldéhyde. L'excès de benzaldéhyde est extrait par 1 ml d'éther et la phase aqueuse est lyophilisée. Les acides aminés en position C-terminale sont alors déterminés sur l'autoanalyseur BECKMAN. Chacun des pics retenus est identifié en fonction de son temps de rétention sur colonne M 82.

b) Hydrolyse par la carboxypeptidase Y (CPY)

A 5 mg d'AVS en solution dans 0.5 ml de tampon acétate de sodium 0.1 M de pH 5.5 sont ajoutés 50µg de carboxypeptidase Y (PIERCE Réf 20212) sous un volume de 500µl (E/S = 1/100°). Le tout est incubé sous agitation au bain-marie à 37°C ; des prélèvements de 200µl sont effectués après 0, 1h, 2h, 6h et 24 h d'hydrolyse et la réaction est stoppée par chauffage 5 minutes à 100°C. Après lyophilisa-

tion, les échantillons sont repris dans 1 ml de tampon pH 2.2 contenant 100 nanomoles de norleucine avant d'être déposés sur autoanalyseur acides aminés.

Un blanc AVS et deux blancs CPY ont été réalisés dans les mêmes conditions et laissés incubés 24 heures au bain-marie à 37°C.

c) Hydrolyse par le mélange des carboxypeptidases A et B.

1° - Préparation des enzymes

Carboxypeptidase A (CPA)

La CPA (BOEHRINGER MANNHEIM N°103225) en suspension à 25 mg/ml est lavée 5 fois par 1 ml d'eau glacée. Les cristaux récupérés après centrifugation sont solubilisés dans une solution de chlorure de lithium à 10 % à la concentration de 20 mg/ml.

Carboxypeptidase B (CPB)

La solution commercialisée (BOEHRINGER MANNHEIM N°103233) à la concentration de 5 mg/ml est prête à l'emploi

2° - Hydrolyse enzymatique

9 mg d'AVS sont dissous dans 9 ml de tampon N-éthyl morpholine 0.1 M de pH 8.0 additionné de norleucine (100 nanomoles par ml). L'ensemble est soumis à l'action de 18 μ l de la solution de CPA (E/S = 1/25°) et de 72 μ l de la solution de CPB (E/S = 1/25°) et placé au bain-marie à 40°C sous agitation. Des prélèvements de 1 ml soit 1 mg d'échantillon sont effectués aux temps 0, 20', 40', 90', 2 h30', 4h, 6h, 10h et 24 h d'hydrolyse. La réaction est alors stoppée par acidification avec 1 ml d'acide acétique à 10 % suivie d'une évaporation sous vide à basse température (EVAPO-MIX BUCHLER). Les quantités d'acides aminés libérées sont estimées à l'autoanalyseur en tenant compte du

standard interne norleucine ajouté en début d'incubation.

Un blanc glycoprotéine et deux blancs enzyme contenant le mélange des deux carboxypeptidases ont été réalisés simultanément. Dans ce cas, la durée d'incubation à 40°C a été portée à 24 heures.

II - METHODES D'ETUDE STRUCTURALE DES AVS DE BOTAT-1 ET DE BOTAT-28.

A - ETUDE DE L'ACTION DE DIFFERENTS ENZYMES PROTEOLYTIQUES

1) Enzymes utilisés

- 1° - Trypsine (SIGMA-TYPE XI. N°1005) traitée de son activité chymotrypsique par le chlorure de diphénylcarbamyl (DPCC).
- 2° - Chymotrypsine (SIGMA-TYPE VII. N°C3142) traitée de son activité trypsique par la 1-chloro-3-tosylamido-7-amino-2-heptanone (TLCK).
- 3° - Protéase de Staphylococcus aureus (MILES - N°36900).
- 4° - Thermolysine (SIGMA TYPE X. N°P1512).

2) Tampons d'incubation

Les hydrolyses trypsiques et chymotrypsiques ont été effectuées dans un tampon bicarbonate d'ammonium 0.01 M ajusté à pH 8.5 et les hydrolyses par la protéase de Staphylococcus aureus et la thermolysine dans un tampon bicarbonate d'ammonium 0.05 M ajusté à pH 8.0.

3) Protocole d'hydrolyse

Un protocole identique a été suivi quelque soit l'enzyme envisagé : 1 mg d'échantillon est dissous dans 1 ml du tampon retenu pour l'activité enzymatique considérée et incubé 10 minutes à 37°C. L'enzyme en solution dans le même tampon à la concentration de 1 mg/ml est alors ajouté en quantité correspondant au rapport enzyme/substrat choisi (1/100°, 1/200°, 1/400°).

L'ensemble est laissé au bain-marie à 37°C sous agitation. Un aliquot de 140 µl est prélevé dans le milieu réactionnel aux temps d'hydrolyse 10', 20', 30', 1h, 2h, 4h et 6h. La réaction est stoppée par addition d'une goutte d'acide acétique 1 N suivie d'une congélation immédiate. Les prélèvements sont ensuite évaporés sous azote avant d'être repris dans le tampon préconisé pour l'étude électrophorétique en gel de polyacrylamide en présence de SDS à la concentration de 3 mg/ml.

B - HYDROLYSE TRYPSIQUE DE L'AVS DE BOTAT-1

1) Hydrolyse

478 mg d'AVS de BoTaT-1 dissous dans 96 ml de tampon bicarbonate d'ammonium 0.01 M pH 8.5 sont soumis à l'action de 4.78 mg de trypsine (E/S = 1/100°). L'ensemble est incubé sous agitation au bain-marie à 37°C pendant 30'. La réaction est arrêtée par acidification à l'aide d'acide acétique glacial puis congelé.

2) Fractionnement de l'hydrolysat

L'hydrolysat est chromatographié sur une colonne de Biogel P100 100-200 mesh (2 cm x 170 cm) équilibrée en acide acétique 0.1 N. Les dépôts sont réalisés sous un volume de 8 ml et le produit d'élution est recueilli par fractions de 2.5 ml. Chaque tube correspondant au fractionnement a fait l'objet d'une mesure de l'absorption spectrophotométrique à 230 nanomètres et d'un dosage à la ninhydrine.

C - HYDROLYSE TRYPSIQUE DE L'AVS DE BOTAT-28.

900 mg d'AVS dissous dans 225 ml de tampon bicarbonate d'ammonium 0.01 M pH 8.5 sont soumis à l'action de 4.5 mg de trypsine (E/S = 1/200°) pendant une heure à 37°C sous agitation. Après arrêt de la réaction, l'hydrolysat est chromatographié sur colonne de Biogel P100 100-200 mesh (2 cm x 170 cm) dans les mêmes conditions que celles précédemment décrites pour l'AVS de BoTaT-1.

III - TECHNIQUES IMMUNOLOGIQUES

A - OBTENTION DES IMMUNSERAS

Les immunosera anti AVS des différents variants ont été préparés chez le lapin. 500µg d'AVS repris par 1 ml d'eau distillée sont émulsionnés dans 1 ml d'adjuvant de Freund complet et injectés dans l'abdomen par voie intradermique (Technique d'injections sous cutanées multiples). Cette opération est renouvelée deux fois à intervalles de quinze jours. Le sang du lapin est recueilli à l'oreille dix jours après la dernière injection et le serum testé en immunoprécipitation.

B - IMMUNOELECTROPHORESE EN AGAROSE

L'électrophorèse est pratiquée selon la microméthode sur lame décrite par SCHEIDEGGER (1955). Le support retenu est un gel semi-solide d'agarose à 0.9 p. 100 en tampon véronal sodé de pH 8.2 et de force ionique 0.1. Les cuves d'électrophorèse sont des cuves à évaporation limitée permettant l'étude simultanée et comparative de 8 échantillons.

1) Réactifs

a) Gel d'agarose à 0.9 p. 100

1.8 g d'agarose sont dissous dans 200 ml de tampon véronal sodé de pH 8.2. La solution est portée à 100°C, au bain-marie pendant 20 minutes. Après refroidissement à température du laboratoire, le gel obtenu est conservé à la température de +4°C.

b) Tampon véronal sodé -HCl de pH 8.2

- véronal sodé	79.3 g
- HCl <u>N</u>	115 ml
- eau distillée q.s.p.	5 000 ml

2) Préparation des lames

3 ml d'agarose à 0.9 p. 100 sont coulés sur une lame de verre de 75 x 25 mm. Après refroidissement, un trou est pratiqué au milieu de la lame. La migration électrophorétique s'effectue pendant une heure sous une différence de potentiel de 20 volts aux extrémités de la lame. Le contact entre la lame et le tampon d'électrophorèse (véronal pH 8.2) est assuré par du papier Whatman N°1. A la fin du temps de migration, une gouttière est pratiquée dans l'agarose pour y déposer l'immunserum. La diffusion des antigènes et des anticorps dure 48 heures dans une chambre humide à température ambiante. Les lames sont ensuite lavées abondamment par le serum physiologique pendant au moins 4 heures, ce qui permet l'élimination de l'excès d'anticorps et de protéides non précipités. Elles sont ensuite séchées, lavées à l'eau et séchées de nouveau avec du papier Whatman N°3.

3) Coloration

La coloration est effectuée par un contact pendant 10 minutes avec une solution alcoolique de Bleu Coomassie :

- Bleu Coomassie	5 g
- Ethanol	450 ml
- Acide acétique	100 ml
- Eau distillée	450 ml

La décoloration dans un bain d'acide acétique, méthanol, eau distillée (1/5/5) est poursuivie jusqu'à obtention d'un fond de migration transparent.

C - IMMUNOPRECIPITATION

Nous avons appliqué la technique d'immunodiffusion double radiale décrite par OUCHTERLONY (1949). Sur une lame de 75 x 25 mm préparée dans les mêmes conditions que précédemment des trous ont été réalisés dans la gélose. Les solutions antigéniques à tester (1 mg/ml) ont été déposées dans les puits périphériques et l'immunserum dans le trou central. La diffusion a lieu pendant 48 à 72 heures en chambre humide à température ambiante. Les lames sont ensuite lavées et colorées.

B I B L I O G R A P H I E

CHEN Y.H., YANG J.T. et CHAU K.H. (1974)
Biochemistry, 13, 3350-3359 (p. 7)

DEGAND P. (1972)
Thèse de Doctorat ès-Sciences, LILLE, (p. 9).

DEMAILLE J.
Communication personnelle (p. 13)

DEMAILLE J., DAUTREVAUX M., HAVEZ R.
et BISERTE G. (1965)
Bull. Soc. Chim. France, 12, 3506-3511.

EDMAN P. (1970)
Molecular Biology Biochemistry and Biophysics
(NEEDLEMAN S.B. Ed.), 211-255, Springer, Verlag, New-York
(p. 13).

HAN K.K. (1970)
Thèse de Doctorat en Biologie Humaine, LILLE, (p. 15).

HERMANN J., TITANI K., ERICSSON L.H., WADE R.D.,
NEURATH H. et WALSH K.A. (1978)
Biochemistry, 17, 5672-5679, (p. 14).

KERCKAERT J.P. (1978)
Anal. Biochem., 84, 354-360, (p. 1).

LAEMMLI U.K. (1970)
Nature, 227, 680-685, (p.1).

LOWRY O.H., ROSEBROUGH A.L., FARR A.L.
et RANDALL R.J. (1951)
J. Biol. Chem., 193, 265-275, (p. 6).

NIU C.I. et FRAENKEL-CONRAT J. (1955)
J. Am. Chem. Soc., 77, 5882, (p.15).

OUCHTERLONY O. (1948)

Archiv. Kemi., 21B, 14, 499-532, (p. 21).

PENKE B., FERENCZI R. et KOVACS K. (1974)

Anal. Biochem., 60, 45-50, (p. 13).

REINHOLD V.N. (1972)

Methods in Enzymology (Hirs. Ed.) Academic Press, New-York,
San Francisco, London, 25, 244-249, (p. 7).

ROUSSEL P., LAMBLIN G., DEGAND P., WALKER-NASIR E. et

JEANLOZ R.W. (1975)

J. Biol. Chem., 250, 2114-2122, (p. 7).

SCHEIDEGGER J.J. (1955)

Intern. Arch. Allergy Appl. Immunol., 7, 103-110.
(p. 19).