

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

THÈSE

présentée à l'Université de Lille I

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITÉ

Mention : SCIENCES

par

Colette RICHET

LES ANTIGÈNES VARIABLES DE *Trypanosoma equiperdum* (étude structurale de l'antigène variable de BoTat-1)



présentée le jeudi 17 décembre 1981 devant la Commission d'examen

PRÉSIDENT : M. MONTREUIL
RAPPORTEUR : M. DEGAND
EXAMINATEURS : M. BISERTE
M. GUILLAUME
M. LE RAY
M. ROUSSEL

DOYENS HONORAIRES DE L'ANCIENNE FACULTE DES SCIENCES

Messieurs R. DEFRETIN, H. LEFEBVRE, M. PARREAU

PROFESSEURS HONORAIRES DES ANCIENNES FACULTES DE DROIT
ET SCIENCES ECONOMIQUES, DES SCIENCES ET DES LETTRES

Messieurs ARNOULT, Mme BEAUJEU, BONTE, BROCHARD, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER, CORSIN, DECUYPER, DEHEUVELS, DEHORS, DION, FAUVEL, FLEURY, GERMAIN, GLACET, GONTIER, HEIM DE BALSAC, HOCQUETTE, KAMPE DE FERIET, KOURGANOFF, LAMOTTE, LASSERRE, LELONG, Mme LELONG, LHOMME, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET, MICHEL, PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUELLE, SAVARD, SCHILTZ, WATERLOT, WIEMAN, ZAMANSKI.

PROFESSEUR EMERITE

Monsieur A. LEBRUN

ANCIENS PRESIDENTS DE L'UNIVERSITE
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

Messieurs R. DEFRETIN, M. PARREAU, J. LOMBARD

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

Monsieur M. MIGEON

PROFESSEURS - CLASSE EXCEPTIONNELLE

Monsieur	DURCHON Maurice	Biologie Expérimentale
Monsieur	GABILLARD Robert	Electronique
Monsieur	HEUBEL Joseph	Chimie Minérale
Monsieur	MONTREUIL Jean	Biochimie
Monsieur	PARREAU Michel	Analyse
Madame	SCHWARTZ Marie-Hélène	Géométrie
Monsieur	TRIDOT Gabriel	Chimie Appliquée
Monsieur	VIVIER Emile	Biologie Cellulaire
Monsieur	WERTHEIMER Raymond	Physique Atomique et Nucléaire

PROFESSEURS - 1ère CLASSE

Monsieur	BACCHUS Pierre	Astronomie
Monsieur	BEAUFILS Jean-Pierre	Chimie Physique
Monsieur	BECART Maurice	Physique Atomique et Moléculaire
Monsieur	BIAYS Pierre	Géographie
Monsieur	BILLARD Jean	Physique du Solide
Monsieur	BONNOT Ernest	Biologie Végétale
Monsieur	BOUGHON Pierre	Algèbre
Monsieur	BOURIQUET Robert	Biologie Végétale
Monsieur	CELET Paul	Géologie Générale
Monsieur	COEURE Gérard	Analyse
Monsieur	CONSTANT Eugène	Electronique
Monsieur	CORDONNIER Vincent	Informatique
Monsieur	DEBOURSE Jean-Pierre	Gestion des Entreprises
Monsieur	DELATTRE Charles	Géologie Générale
Monsieur	ESCAIG Bertrand	Physique du Solide
Monsieur	FAURE Robert	Mécanique
Monsieur	FOCT Jacques	Génie Mécanique
Monsieur	FOURET René	Physique du Solide
Monsieur	GRANELLE Jean-Jacques	Sciences Economiques
Monsieur	GRUSON Laurent	Algèbre
Monsieur	GUILLAUME Jean	Microbiologie
Monsieur	HECTOR Joseph	Géométrie
Monsieur	LABLACHE-COMBIER Alain	Chimie Organique
Monsieur	LACOSTE Louis	Biologie Végétale
Monsieur	LANSRAUX Guy	Physique Atomique et Moléculaire
Monsieur	LAVEINE Jean-Pierre	Paléontologie

Monsieur	LEHMANN Daniel	Géométrie
Madame	LENOBLE Jacqueline	Physique Atomique et Moléculaire
Monsieur	LHOMME Jean	Chimie Organique Biologique
Monsieur	LOMBARD Jacques	Sociologie
Monsieur	LOUCHEUX Claude	Chimie Physique
Monsieur	LUCQUIN Michel	Chimie Physique
Monsieur	MAILLET Pierre	Sciences Economiques
Monsieur	PAQUET Jacques	Géologie Générale
Monsieur	POUZET Pierre	Analyse Numérique
Monsieur	PROUVOST Jean	Minéralogie
Monsieur	SALMER Georges	Electronique
Monsieur	SEGUIER Guy	Electrotechnique
Monsieur	STANKIEWICZ François	Sciences Economiques
Monsieur	TILLIEU Jacques	Physique Théorique
Monsieur	VIDAL Pierre	Automatique
Monsieur	ZEYTOUNIAN Radyadour	Mécanique

PROFESSEURS - 2ème CLASSE

Monsieur	AL FAKIR Sabah	Algèbre
Monsieur	ANTOINE Philippe	Analyse
Monsieur	BART André	Biologie Animale
Madame	BATTIAU Yvonne	Géographie
Monsieur	BEGUIN Paul	Mécanique
Monsieur	BELLET Jean	Physique Atomique et Moléculaire
Monsieur	BKOUCHE Rudolphe	Algèbre
Monsieur	BOBE Bernard	Sciences Economiques
Monsieur	BODARD Marcel	Biologie Végétale
Monsieur	BOILLY Bénoni	Biologie Animale
Monsieur	BOIVIN Jean-Claude	Chimie Minérale
Monsieur	BONNELLE Jean-Pierre	Catalyse
Monsieur	BOSCQ Denis	Probabilités
Monsieur	BREZINSKI Claude	Analyse Numérique
Monsieur	BRIDOUX Michel	Chimie Physique
Monsieur	BRUYELLE Pierre	Géographie
Monsieur	CAPURON Alfred	Biologie Animale

Monsieur	CAPREZ Christian	Informatique
Monsieur	CHAMLEY Hervé	Géotechnique
Monsieur	CHAPOTON Alain	Electronique
Monsieur	COQUERY Jean-Marie	Psychophysiologie
Madame	CORSIN Paule	Paléontologie
Monsieur	CORTOIS Jean	Physique Nucléaire et Corpusculaire
Monsieur	COUTURIER Daniel	Chimie Organique
Monsieur	CRAMPON Norbert	Hydrogéologie et Environnement
Monsieur	CROSNIER Yves	Electronique
Melle	DACHARRY Monique	Géographie
Monsieur	DEBRABANT Pierre	Géologie Appliquée
Monsieur	DEGAUQUE Pierre	Electronique
Monsieur	DELORME Pierre	Physiologie Animale
Monsieur	DEMUNTER Paul	Sociologie
Monsieur	DE PARIS Jean-Claude	Analyse
Monsieur	DEPREZ Gilbert	Physique du Solide et Cristallographie
Monsieur	DERIEUX Jean-Claude	Microbiologie
Melle	DESSAUX Odile	Spectroscopie de la Réactivité Chimique
Monsieur	DEVRAINNE Pierre	Chimie Minérale
Monsieur	DHAINAUT André	Biologie Animale
Madame	DHAINAUT Nicole	Biologie Animale
Monsieur	DORMARD Serge	Sciences Economiques
Monsieur	DOUKHAN Jean-Claude	Physique du Solide
Monsieur	DUBOIS Henri	Spectroscopie Hertzienne
Monsieur	DUBRULLE Alain	Spectroscopie Hertzienne
Monsieur	DUEE Gérard	Géologie
Monsieur	DYMENT Arthur	Mécanique
Madame	EVARD Micheline	Chimie Appliquée
Monsieur	FLAMME Jean-Marie	Technologie de Construction
Monsieur	FONTAINE Hubert	Dynamique des Cristaux
Monsieur	FONTAINE Jacques	Electronique, Electrotechnique, Automatique
Monsieur	FOURNET Bernard	Biochimie Structurale
Monsieur	GERVAIS Michel	Gestion
Monsieur	GLORIEUX Pierre	Physique Nucléaire et Rayonnements Atmosphériques
Monsieur	GOBLOT Rémi	Algèbre

Monsieur	GOSSELIN Gabriel	Sociologie
Monsieur	GOUDMAND Pierre	Chimie Physique
Monsieur	GREVET Patrick	Sciences Economiques
Monsieur	GUILBAULT Pierre	Physiologie Animale
Monsieur	HENRY Jean-Pierre	Génie Mécanique
Monsieur	HERMAN Maurice	Physique Spatiale
Monsieur	HOUDART René	Physique Atomique et Moléculaire
Monsieur	JACOB Gérard	Informatique
Monsieur	JACOB Pierre	Probabilités et Statistiques
Monsieur	JACQUILLAT Bertrand	Gestion
Monsieur	JOURNEL Gérard	Spectroscopie Hertziennne
Monsieur	KREMBEL Jean	Biochimie
Monsieur	LAURENT François	Automatique
Madame	LECLERCQ Ginette	Catalyse
Melle	LEGRAND Denise	Algèbre
Melle	LEGRAND Solange	Algèbre
Madame	LHEMANN Josiane	Analyse
Monsieur	LEMAIRE Jean	Spectroscopie Hertziennne
Monsieur	LENTACKER Firmin	Géographie
Monsieur	LEROY Jean-Marie	Méthodologie
Monsieur	LEROY Yves	Electronique, Electrotechnique, Automatique
Monsieur	LEVASSEUR Michel	Sciences Economiques
Monsieur	LHENAFF René	Géographie
Monsieur	LOCQUENEUX Robert	Physique Théorique
Monsieur	LOSFELD Joseph	Informatique
Monsieur	LOUAGE Francis	Electronique
Monsieur	MACKÉ Bruno	Physique Moléculaire et Rayonnements Atmosphériques
Monsieur	MAHIEU Jean-Marie	Physique Atomique et Moléculaire
Monsieur	MAIZIERES Christian	Automatique
Melle	MARQUET Simone	Probabilités
Monsieur	MESSELYN Jean	Physique Atomique et Moléculaire
Monsieur	MIGEON Michel	Chimie Physique
Monsieur	MIGNOT Fulbert	Analyse Numérique
Monsieur	MONTEL Marc	Physique du Solide
Monsieur	MONTUELLE Bernard	Biologie et Biochimie Appliquées
Madame	N'GUYEN VAN CHI Régine	Géographie

Monsieur	NICOLE Jacques	Chimie Analytique
Monsieur	NOTELET Francis	Electronique, Electrotechnique Automatique
Monsieur	PARSY Fernand	Mécanique
Melle	PAUPARDIN Colette	Biologie Physiologie Végétales
Monsieur	PECQUE Marcel	Chimie Organique
Monsieur	PERROT Pierre	Chimie Appliquée
Monsieur	PERTUZON Emile	Physiologie Animale
Monsieur	PETIT Francis	Chimie Organique, Analytique et Minérale
Monsieur	PONSOLLE Louis	Chimie Physique
Monsieur	PORCHET Maurice	Biologie Animale
Monsieur	POVY Lucien	Automatique
Monsieur	RACZY Ladislas	Electronique
Monsieur	RAOULT Jean-François	Géologie Structurale
Monsieur	RICHARD Alain	Biologie Animale
Monsieur	RIETSCH François	Physique des Polymères
Monsieur	ROGALSKI Marc	Analyse
Monsieur	ROUSSEAU Jean-Paul	Physiologie Animale
Monsieur	ROY Jean-Claude	Psychophysiologie
Monsieur	SALAMA Pierre	Sciences Economiques
Madame	SCHWARZBACH Yvette	Géométrie
Monsieur	SCHAMPS Joël	Spectroscopie Moléculaire
Monsieur	SIMON Michel	Sociologie
Monsieur	SLIWA Henri	Chimie Organique
Monsieur	SOMME Jean	Géographie
Melle	SPIK Geneviève	Biochimie
Monsieur	STERBOUL François	Informatique
Monsieur	TAILLIEZ Roger	Génie Alimentaire
Monsieur	THERY Pierre	Electronique, Electrotechnique, Automatique
Monsieur	TOULOTTE Jean-Marc	Automatique
Monsieur	VANDORPE Bernard	Chimie Minérale
Monsieur	VERBERT André	Biochimie
Monsieur	VILETTE Michel	Résistance des Matériaux
Monsieur	WALLART Francis	Spectrochimie Infrarouge et Raman
Monsieur	WATERLOT Michel	Géologie Générale
Monsieur	WERNER Georges	Informatique Fondamentale Appliquée
Madame	ZINN-JUSTIN Nicole	Algèbre

A mes parents, en gage de mon affection et de ma profonde reconnaissance.

A ma famille

A mes amis

A la mémoire de Monsieur le Professeur HAVÉZ

Ce mémoire nous donne l'occasion d'exprimer à Monsieur le Professeur BOULANGER notre reconnaissance pour les marques de confiance qu'il nous a prodiguées depuis notre entrée au laboratoire.

Que Monsieur le Professeur BISERTE, dont nous avons toujours apprécié les grandes qualités humaines, soit assuré de notre respect et de notre sincère attachement.

Monsieur le Professeur MONTREUIL nous fait l'honneur de présider ce Jury de Thèse, qu'il veuille accepter nos remerciements et croire en notre profond respect.

Monsieur le Professeur GUILLAUME, à qui nous devons notre premier contact avec le laboratoire de Biochimie, nous a toujours laissé le souvenir de son enseignement. Qu'il en soit remercié.

Nous souhaitons dire tout particulièrement au Professeur LE RAY notre gratitude pour avoir accepté de juger ce travail.

Nous nous permettons de confondre dans une même dédicace tous ceux qui nous ont apporté connaissance, aide, amitié et tout particulièrement à ceux qui, à l'Unité 16 de l'INSERM, ont été beaucoup plus que des collègues.

Nous ne voudrions pas oublier Monsieur le Professeur MAZZUCA pour son aide personnelle dans la présentation de ce travail.

Ce travail a été réalisé dans le laboratoire de
l'Unité des Protéines (Unité N°16 INSERM),
Directeur : Professeur Philippe ROUSSEL, sous la
direction de Monsieur le Professeur Pierre DEGAND.

NOS RECHERCHES ONT BENEFICIE DU CONTRAT

CRL INSERM 813022

Ce travail a permis la présentation

de publications

Chemical and immunological characterization of specific glycoproteins from Trypanosoma equiperdum variants.

BALTZ T., BALTZ D. and PAUTRIZEL R.
RICHET C., LAMBLIN G. and DEGAND P. (1977)

FEBS Letters, 82, 93-96.

Host parasite relationship in experimental trypanosomiasis :
some aspects of the phenomena of antigenic variation, immunodepression and macroglobulinaemia.

BALTZ T., GIROUD Ch., BALTZ D., PLANTEY M.C., DEGAND P.
SCHREVEL J. and PAUTRIZEL R. (1980)

Colloques INSERM : Immunologie antitumorale et antiparasitaire, 97, 541-553.

Variant specific glycoproteins of Trypanosoma equiperdum :
cross reacting determinants and chemical studies.

LABASTIE M.C., BALTZ T., RICHET C., GIROUD Ch., DUVILLIER G.,
PAUTRIZEL R. and DEGAND P. (1981)

Biochem. Biophys. Res. Comm., 99, 723-736.

de mémoires

Contribution à l'étude des antigènes variables de Trypanosoma equiperdum

PLANTEY M.C.

Thèse Doctorat 3ème Cycle

Cleavage by cyanogen bromide, partial determination of the primary structure of a variant specific surface antigen from "Trypanosoma equiperdum".

DUVILLIER G.

DEA Biochimie

*
* * *

de posters

Physical and biochemical studies of Trypanosoma equiperdum variant surface antigens.

DEGAND P., PLANTEY M.C., BALTZ T., AUBERT J.P. et RICHET C.

Third European Multicolloquium of Parasitology.
Cambridge 7-13 septembre 1980

Cross reacting determinants in surface antigens glycoproteins
from Trypanosoma equiperdum.

PLANTEY M.C., BALTZ T., GIROUD Ch., DEMEYER D., DEGAND P.

Third European Multicolloquium of Parasitology.
Cambridge 7-13 septembre 1980

Détermination partielle de la structure primaire d'un antigène
variable.

DUVILLIER G.

Société de Chimie Biologique, Groupe Thématique "Protéines".
LILLE 2 octobre 1981.

*
*
*

sont actuellement en cours de rédaction deux projets d'article

Chemical and physical characterization of the surface anti-
genic glycoproteins from Trypanosoma equiperdum variants.

Partial determination of the primary structure of a variant
specific surface antigen from Trypanosoma equiperdum. Composi-
tion and location of a carbohydrate moiety.

ABREVIATIONS UTILISEES DANS LE TEXTE

* *

AVS	antigène spécifique de variants
BoTat	Bordeaux Trypanozoon antigenic-type
BrCN	bromure de cyanogène
DMAA	diméthylallylamine
HFBA	acide heptafluorobutyrique
HPLC	chromatographie liquide haute performance
pHi	point isoélectrique
PITC	phénylisothiocyanate
PTH	phénylthiodantoïne
TFA	acide trifluoroacétique
SDS	sodium dodécyl sulfate

TABLE DES MATIERES

*
* *

INTRODUCTION	1
<u>CHAPITRE I</u>	3
GENERALITES	3
1/ Classification des trypanosomes	3
2/ Cycle évolutif des parasites	5
a) Trypanosomes américains	5
b) Trypanosomes africains	6
3/ Définition des "antigènes variables" de surface	6
4/ Synthèse des hypothèses proposées	7
5/ Etude du génome	9
<u>CHAPITRE II</u>	13
CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE DES ANTIGENES SPECIFIQUES DE VARIANTS DE <u>TRYPANOSOMA EQUIPERDUM</u>	13
A. INTRODUCTION	11
B. PREPARATION DES AVS DE <u>TRYPANOSOMA EQUIPERDUM</u>	13
1/ Préparation des extraits membranaires de Trypanosoma equiperdum	14

2/ Isolement et purification de l'AVS à partir de l'extrait membranaire	15
C. ETUDE DES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES AVS DE <u>TRYPANOSOMA EQUIPERDUM</u>	17
1/ Etude des propriétés physiques	17
a) Détermination de la masse moléculaire des AVS par électrophorèse en gel de polyacrylamide	17
b) Détermination du point isoélectrique des AVS de <u>Trypanosoma equiperdum</u>	19
c) Etude de la structure secondaire des AVS par dichroïsme circulaire	23
2/ Etude des propriétés chimiques	27
a) Composition en acides aminés	27
b) Composition en glucides	32
c) Identification de l'acide aminé situé en position N-terminale	34
d) Recherche de l'acide aminé situé en position C-terminale	37
D. DISCUSSION - CONCLUSIONS	39

CHAPITRE III ETUDE STRUCTURALE DE L'ANTIGENE ISOLE DU VARIANT BoTat-1

A. INTRODUCTION	41
B. ETUDE DE LA SENSIBILITE DE L'AVS BoTat-1 AUX ENZYMES PROTEOLYTIQUES ET AUX COUPURES CHIMIQUES	42
1/ Sensibilité de la glycoprotéine aux enzymes protéolytiques	42
a) E ffet des protéases	43
b) Conclusion de l'étude systématique	45

2/ Sensibilité de la glycoprotéine aux méthodes de coupures chimiques	45
a) Coupure par le bromure de cyanogène (BrCN)	46
b) Coupure par le BPNS-Scatole	49
3/ Conclusions générales	54
C. TRAITEMENT PAR LE BrCN : ETUDE DES SEQUENCES EN AMINO ACIDES DES FRAGMENTS DE NATURE PEPTIDIQUE OU GLYCOPEPTIDIQUE OBTENUS	55
1/ Fractionnement des produits de clivage de l'AVS par le BrCN	55
2/ Composition chimique	60
a) Composition chimique : acides aminés, sucres	60
b) Etude des acides aminés en position N-terminale	63
c) Détermination de séquences en amino-acides sur séquenceur automatique BECKMAN 890C	65
3/ Etude particulière de la fraction F ₇ BrCN	71
a) Coupure enzymatique spécifique au niveau des résidus d'arginine	71
b) Coupure enzymatique spécifique au niveau des résidus de l'acide glutamique	75
c) Conclusions	78
DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION	80
APPENDICE TECHNIQUE	86
BIBLIOGRAPHIE	123

INTRODUCTION

Notre travail s'inscrit dans un domaine de recherche à visée diagnostique, mais aussi thérapeutique concernant une affection parasitaire particulièrement sévère dans ses conséquences : la trypanosomiase. Qu'il s'agisse en effet de formes cliniques à expression humaine ou animale, les conséquences sont toujours considérables à l'échelle de continents.

C'est en particulier le chapitre de la trypanosomiase africaine qui demeure à ce jour une préoccupation essentielle des grands organismes à vocation socio-économique tel que l'Organisation Mondiale de la Santé.

Deux voies de recherche égales dans leur importance sont à retenir :

- l'une a pour finalité la mise au point sur le terrain de techniques simples de dépistage de la trypanosomiase,
- l'autre a pour but le traitement à des fins prophylactique ou curative.

Une difficulté première à l'organisation de campagnes d'une certaine ampleur, est l'impossibilité sur le plan thérapeutique de recourir à des techniques aisées d'application comme la vaccination ou la serothérapie. C'est en effet dans le domaine immunologique que les chercheurs se sont dirigés. La caractéristique, la raison spécifique des échecs réside au niveau du trypanosome, en la notion d'un phénomène biologique encore mal connu : la variation antigénique du parasite.

Les travaux qui ont illustré cette dernière décennie, ont démontré toute l'importance de ce mécanisme intime par lequel le parasite peut échapper aux moyens de défense de l'hôte. Les résultats enregistrés, sans conteste, montrent la responsabilité d'un constituant membranaire, d'une glycoprotéine dont la nature, la structure, la conformation changent au cours du cycle d'infection. S'attacher à l'étude de ce phénomène cellulaire, c'est essayer de comprendre un phénomène biologique dont on sait maintenant, qu'il caractérise bon nombre de parasites et pourrait expliquer leur persistance.

Nous avons, dans ce mémoire, voulu présenter une synthèse des connaissances actuelles de la variation antigénique. Nous rapportons nos résultats concernant la définition chimique et physique des AVS de Trypanosoma equiperdum. Enfin, l'essentiel de notre apport se concrétise par la connaissance structurale de près de la moitié de l'axe peptidique de l'antigène spécifique du variant BoTat-1. Le choix de ce modèle expérimental s'explique pour des raisons évidentes de sécurité, par le fait que Trypanosoma equiperdum n'est pas pathogène pour l'Homme.

Enfin, nous voudrions en ce début de rédaction, faire état d'une collaboration qui s'est montrée très fructueuse : celle de notre laboratoire avec le groupe de Bordeaux et principalement avec le Docteur BALTZ, responsable de cette thématique dans le laboratoire d'Immunologie et de Biologie Parasitaire du Professeur PAUTRIZEL.

L'hypothèse de travail que nous avons évoquée en avant-propos peut paraître ambitieuse ; elle occupe un grand nombre de chercheurs. Nous avons simplement voulu apporter notre part.

CHAPITRE I

* * *

GENERALITES

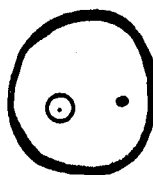
1/ CLASSIFICATION DES TRYPANOSOMES

Les trypanosomes sont des protozoaires flagellés sanguicoles, appartenant à l'ordre kinetoplastida et au sous-ordre trypanosomatina (d'après la classification de HONIGBERG et coll. (1966) (32) et KUDO (1966) (38). Les flagellés de ce sous-ordre peuvent exister sous une variété de formes morphologiques dont une nomenclature a été proposée par HOARE et WALLACE (1966) (28) :

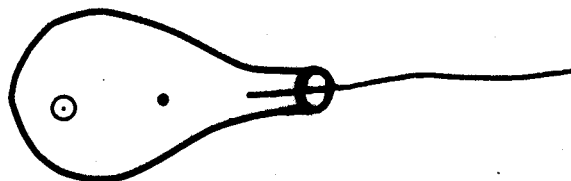
- forme amastigote ou Leishmania
- forme choanomastigote
- forme promastigote ou Leptomonas
- forme episthomastigote
- forme epimastigote ou Crithidia
- forme trypomastigote ou Trypanosoma (figure 1).

Le genre Trypanosoma est constitué, en fait, de deux groupes bien distincts (classification de HOARE, 1966-1972) (28) (29) :

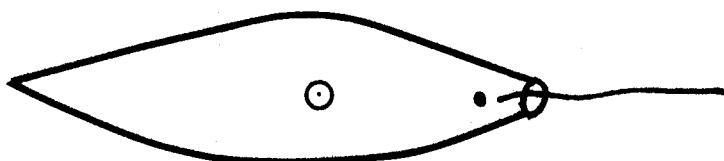
* Forme amastigote ou Leishmania



* Forme choanomastigote



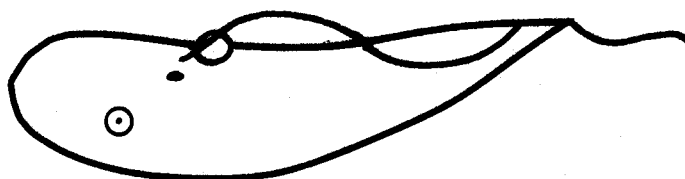
* Forme promastigote ou Leptomonas



* Forme épisthomastigote



* Forme épimastigote ou Crithidia



* Forme trypomastigote ou Trypanosoma



BHS
LILLE

Figure 1

A/ Groupe STERCORARIA : trypanosomes américains

sous genre	Megatrypanum	Herpetosoma	Schizotrypanum
Espèce	T. theileri T. tragalaphi T. ingens T. melophagium	T. lewisi T. duttoni T. nabiasi	T. cruzi T. vespertilionis T. pipistrelli

B/ Groupe SALIVARIA : trypanosomes africains

sous genre	Duttonella	Nannomonas	Pycnomonas	Trypanozoon
Espèce	T. vivax T. uniforme	T. congolense T. dimorphon T. simiae	T. suis	T. brucei T. gambiense T. rhodensiense T. evansi T. equinum T. equiperdum ←

Ces deux groupes possèdent des caractéristiques morphologiques et biologiques très voisines, mais ils sont toutefois très différents en ce qui concerne leur épidémiologie, leur cycle évolutif et surtout leur prolifération chez l'hôte : le phénomène de la "variation antigénique", sujet de notre travail ne concerne que les trypanosomes de la section Salivaria.

2/ CYCLE EVOLUTIF DES PARASITES

a) Trypanosomes américains

Les insectes sont des hémiptères hématophages nocturnes appartenant à la famille des réduvidés.

L'insecte ingère le sang d'un malade et absorbe en même temps les trypanosomes qui vont se multiplier dans l'intestin sous forme Crithidia et Leishmania, puis aboutir dans l'ampoule rectale sous forme Trypanosoma. Ce sont les déjections de l'insecte qui sont infectantes. L'homme piqué au cours du sommeil s'infecte en transportant inconsciemment avec ses doigts les déjections virulentes de l'insecte au niveau de ses muqueuses.

b) Trypanosomes africains

Les insectes vecteurs sont les glossines ou mouches Tsé-Tsé. Les trypanosomes sont absorbés par la glossine lors de la piqûre d'un malade. Ils se multiplient sous forme Crithidia dans l'intestin puis vont se localiser dans les glandes salivaires sous forme Trypanosoma. Les insectes contaminés pourront ensuite transmettre, lors de la piqûre, par régurgitation salivaire, le parasite à un hôte sain.

3/ DEFINITION DES "ANTIGENES VARIABLES" DE SURFACE

Le phénomène de variation antigénique, propre aux trypanosomes de la section Salivaria, permet à ces parasites d'échapper à la réponse immunitaire de leur hôte (LEVADITI et McINTOSCH - 1909) (42). Il se définit par l'expression successive d'un vaste répertoire de divers antigènes, appelés antigènes variables ou antigènes spécifiques de variants (AVS). L'infection chronique d'un hôte se caractérise par l'apparition successive, sous forme de vagues de parasitémie, de populations parasitaires antigéniquement différentes. Chacune de ces populations contient un type antigénique prédominant isolé par clonage, parmi un mélange de plusieurs types antigéniques mineurs. Pour une souche donnée, la séquence d'apparition des variants "prédominants" semble être relativement programmée et reproductible, ceci dans les premiers temps de l'infestation. Au delà de 3 semaines, il devient plus difficile de suivre l'évolution de la variation antigénique dans sa séquence précise d'apparition. On notera que ce sont toujours les mêmes variants qui seront chaque fois détectés (GRAY) (1976) (24), CAPBERN, GIROUD, BALTZ, MATTERN

(1977) (6). Sur ce plan strictement biologique, le processus de variation antigénique relève de modification structurale du revêtement de surface des parasites : l'utilisation par VICKERMAN (1969) (67) d'anticorps conjugués à la ferritine, apporte la preuve irréfutable de la localisation membranaire des antigènes variables. En 1975, CROSS (9) précisait que le manteau de surface de Trypanosoma brucei consistait en un type unique de glycoprotéine couvrant la surface cellulaire selon une disposition régulière monocouche, cette entité glycoprotéique étant seule responsable de la spécificité immunologique de chaque variant.

Ce manteau glycoprotéique caractéristique des formes sanguicoles disparaît dans la phase "insecte vecteur". Lorsque ces formes sont aspirées par une mouche, le parasite perd le revêtement membranaire dès l'intestin de l'insecte ; dans les glandes salivaires, après remaniement morphologique, les trypanosomes retrouvent le manteau (figure 2) ; cette réapparition étant étroitement corrélée semble-t-il, avec la notion de virulence ou de pouvoir infestant. Il faut distinguer de ces antigènes variables, les antigènes dits "communs" ou "internes" qui correspondent plutôt soit à des éléments membranaires masqués, soit à des entités intracellulaires "libérées" au cours du contact avec le tampon pH 5,5.

4/ SYNTHESE DES HYPOTHESES PROPOSEES

Il est maintenant acquis que ce phénomène de variation antigénique résulte de l'expression successive de plusieurs gènes codant pour la synthèse de ces diverses glycoprotéines.

En 1965, GRAY (21) a proposé une théorie adaptative pour expliquer le processus : il s'agit d'une théorie selon laquelle la variation antigénique se produirait d'une part adaptativement à la réponse immunitaire, et d'autre part, selon un ordre défini dans le génome.

CYCLE EVOLUTIF DE *TRYPANOSOMA BRUCEI*
(Vickerman, 1969) (68)

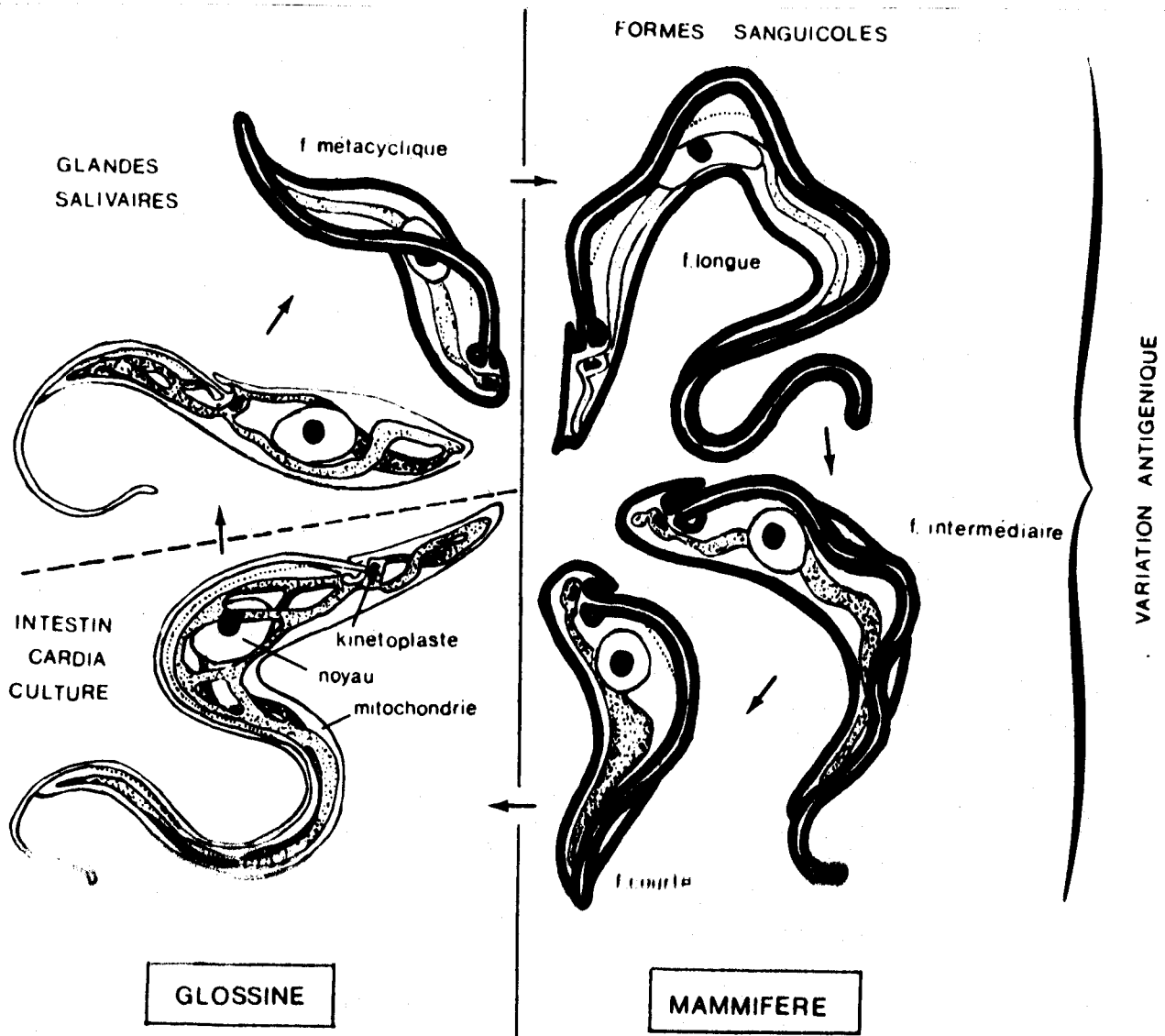


Figure 2



Depuis, différents auteurs ont montré que la "réponse de l'hôte" n'était pas indispensable pour induire l'apparition de différents types antigéniques à partir d'une population clonée : DOYLE et coll. (1980) (14) ont démontré la production d'une variation antigénique *in vitro*, donc en l'absence d'anticorps anti-variants. Ce fait va à l'encontre d'une théorie adaptative selon laquelle les parasites changent d'antigène à mesure que l'hôte produit des anticorps, cette évolution membranaire permettant d'échapper au mécanisme de défense immunitaire de l'hôte. Dans cet esprit, la réponse immunitaire de l'hôte n'interviendrait plus que dans une "participation sélective".

Il n'existe pas non plus actuellement de certitude absolue quant au schéma d'apparition des variants.

Certains auteurs pensent comme GRAY que la génération des variants s'effectue selon un ordre programmé et reproductible (RUSSEL, 1936 (57) ; INOKI, OSAKI et NAKABAYASHI (1956) (35) ; OSAKI, 1959 (48) ; GRAY, 1965 (20) (21), VICKERMAN, 1971 (69) ; GRAY, 1972 (22) ; WILSON et CUNNINGHAM, 1972 (73) ; GRAY, 1975 (23) ; VAN MEIRVENNE, JANSSENS et MAGNUS, 1975 (65) (66) ; CAPBERN, GIROUD, BALTZ et MATTERN, 1977 (6) ; VICKERMAN, 1978 (70)).

Au contraire, d'autres estiment que la génération des variants a lieu dans un ordre plus ou moins organisé ; dans cette hypothèse, les séquences biologiques jusqu'ici observées seraient le résultat d'une sélection s'exerçant entre les différents variants (SOLTYS, 1963 (62) ; WATKINS, 1964 (71) ; SEED et GAM, 1966 (58) ; McNEILLAGE et HERBERT, 1968 (47) ; SEED et EFFRON, 1973 (59) ; DE RAADT, 1974 (52) ; CLARKSON, 1976 (8) ; SEED, KEMP et BROWN, 1977 (60)).

5/ ETUDE DU GENOME

Les antigènes variables sont issus d'une famille étendue de gènes, parmi lesquels un seul est exprimé dans une cellule donnée. Le

mécanisme de la variation antigénique chez Trypanosoma brucei implique un réarrangement du génome se traduisant par la duplication du gène exprimé et par la transposition de cette copie (WILLIAMS, YOUNG, MARJIWA, 1979 (72) ; HOEIJMAKERS, FRASCH, BERNARDS, BORST et CROSS, 1980 (30), PAYS, VAN MEIRVENNE, LE RAY, STEINERT, 1981 (49)).

Plusieurs équipes ont actuellement entrepris l'étude de la séquence nucléotidique. Et récemment, l'existence d'une séquence codant pour une extrémité C-terminale hydrophobe, non retrouvée dans les glycoprotéines de variants de Trypanosoma brucei, a été rapportée par BOOTHROYD, CROSS, HOEIJMAKERS et BORST (1980) (4). Selon ces auteurs, un précurseur serait synthétisé en premier, et l'extrémité hydrophobe aurait une fonction d'attachement du reste de la molécule à la double couche lipidique de la membrane cellulaire. La libération de la glycoprotéine impliquerait un clivage protéolytique. Les résultats de séquence nucléotidique jusqu'à présent publiés, rapportent l'identification d'environ 150 résidus amino acides correspondant, soit environ le tiers C-terminal des molécules étudiées (BOOTHROYD, 1980 (4) ; MATTHYSENS, 1981 (46)).

CHAPITRE II

*
* * *

CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE DES ANTIGENES SPECIFIQUES DE VARIANTS DE TRYPANOSOMA EQUIPERDUM

A. INTRODUCTION

Notre étude biochimique des antigènes variables spécifiques de variants (AVS) de Trypanosoma equiperdum fait suite aux travaux réalisés à l'Université de Bordeaux par BALTZ et coll. (1976) (3), puis par CAPBERN et coll. (1977) (6).

A partir de ce modèle expérimental non pathogène pour l'Homme, ces auteurs ont contribué d'une part à la définition du phénomène de variation antigénique, et d'autre part, à l'isolement d'un composant antigénique membranaire dont l'évolution au cours du processus infectieux permet de suivre le phénomène de variation, véritable mécanisme de défense du parasite vis-à-vis de l'hôte.

Depuis cinq ans, une collaboration très étroite s'est établie entre ce groupe et notre Unité de Recherches. Initialement, ce rapprochement avait pour but essentiel de définir la composition chimique de plusieurs AVS. Très vite, les études des propriétés chimiques ou physiques des antigènes ont fait surgir d'autres pôles d'intérêt : possibilité de classification des antigènes, notion de microhétérogénéité. Enfin, ce travail réalisé a permis d'établir des critères de pureté sur différentes préparations qui, retournées à Bordeaux, y permettent le développement de protocoles de Recherches Immunologiques.

Notre contribution personnelle fait immédiatement suite aux recherches menées au laboratoire par PLANTEY qui, dès 1979 (51), a pu établir la composition chimique de cinq AVS différents. LABASTIE et coll. (1981) (39), faisant appel aux techniques radio-immunologiques, ont pu établir l'existence de réactions immunologiques croisées entre certains antigènes. Ces résultats préliminaires nous ont incité à entreprendre une étude structurale de deux antigènes spécifiques de variants ; l'un précoce, l'autre tardif. Le choix précis des deux antigènes était dicté par leur facilité relative de préparation, mais aussi par le fait que ces deux antigènes présentent justement cette propriété évoquée plus haut, de réaction immunologique.

Dans ce mémoire, nos résultats auront trait :

- à la définition chimique et même physico-chimique de toute une série d'antigènes d'apparitions précoce, semi-tardive et tardive au cours du cycle d'infestation expérimental ;

- à une étude biochimique structurale (axe peptidique principalement) d'un type antigénique particulier dit "type de base", dans la mesure où il est le premier à apparaître au cours du processus infectieux. Selon la nomenclature proposée par LUMSDEN en 1967 (45), cet antigène est répertorié BoTat-1 (Bordeaux Trypanozoon antigenic-type 1).

B. PREPARATION DES AVS DE TRYPANOSOMA EQUIPERDUM

Au cours des dix dernières années, comme nous l'avons vu dans le premier chapitre, s'est dégagée progressivement la notion de glycoprotéine quant à la nature de l'antigène variable de trypanosome.

Le protocole très original mis au point en 1976 par BALTZ et coll. (3), possède le double avantage de la simplicité et du haut rendement. Il comprend deux étapes essentielles :

- une étape de libération puis de préparation de l'ensemble des éléments protéiques ou glycoprotéiques membranaires à partir des trypanosomes en état de survie ;
- une étape d'isolement et de purification de l'antigène spécifique à partir de l'extrait brut membranaire et d'éléments cytoplasmiques libérés par la lyse de certains parasites.

Les parasites sont obtenus par infestation intrapéritonéale de rats Wistar, de sexe mâle, d'un poids moyen de 500 g. L'inoculum, pour chaque animal, correspond en moyenne à 10^8 trypanosomes appartenant à un clone, conservé à -196°C en azote liquide.

Très rapidement, en quelques jours (3 jours), la parasitémie devient très intense, provoquant la mort de l'animal. Ces délais très courts entre l'inoculation et la mort de l'animal sont tels qu'ils ne permettent pas la variation antigénique. Dans ces conditions expérimentales, en effet, la population parasitaire présente dans le sang des rats au moment du sacrifice et du recueil, a pu être estimée homogène pour un variant inoculé donné à plus de 99 % (VAN MEIRVENNE et coll., 1975 (65)).

Dans le protocole de BALTZ, 30 rats sont infestés simultanément à partir du même inoculum, ce qui conduit en moyenne à 8.10^{10} trypanosomes pour chaque série préparative.

1) Préparation des extraits membranaires de Trypanosoma equiperdum

A l'acmé de leur parasitémie, les rats sont l'objet d'une ponction abdominale qui permet de recueillir, avec un excellent rendement, la plus grande quantité de sang infesté. Ce sang, prélevé sous héparine, est dilué de moitié par addition d'un volume égal de tampon contenant NaCl 0,045 M, $\text{Na H}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,003 M, glucose 1 %. L'addition après dilution de dextran (PHARMACIA T500) provoque la précipitation de la plus grande partie des globules rouges. Les hématies sont écartées par centrifugation à basse vitesse. Le surnageant qui contient les trypanosomes, est prélevé par aspiration sous vide. Il est encore contaminé par une quantité notable des globules rouges et de ce fait, soumis à une chromatographie sur colonne de DEAE cellulose, ajustée à pH 8,0 selon la technique de LANHAM et GODFREY (1970) (41). Dans les conditions retenues, les globules rouges demeurent fixés sur la résine, les trypanosomes, non fixés, sont élués.

Les parasites, toujours vivants après cette opération, dès lors que toutes les étapes sont réalisées à +4°C, sont lavés plusieurs fois par le précédent tampon avant d'être repris finalement dans un tampon phosphate 0,125 M de pH 5,5 renfermant 1 % de glucose, puis sont laissés une nuit à +4°C sous agitation douce. Ce contact provoque la libération des antigènes membranaires dans le milieu. Une centrifugation à basse vitesse est nécessaire pour l'élimination d'un culot de trypanosomes toujours en survie. Le tampon pH 5,5 est alors dialysé contre une solution de NaCl 0,5 M ; il correspond en dehors de l'antigène variable à toute une série de composants de nature protéique, lipidique et à un certain nombre d'éléments de nature membranaire ou intracellulaire dont l'origine est due à l'inévitable lyse cellulaire qui affecte dans les conditions expérimentales retenues un très faible pourcentage de parasites.

Une ultracentrifugation (ultracentrifugeuse BECKMAN rotor SW40, 3000 t/min., 1 heure) élimine le matériel insoluble et laisse en solution "l'extrait antigénique brut". Ce dernier renferme, en dehors de l'AVS, des antigènes communs d'origine cytoplasmique que BALTZ et coll. (1976) (3) ont pu mettre en évidence en immunoélectrophorèse et surtout en électrophorèse de gel de polyacrylamide.

2) Isolement et purification de l'AVS à partir de l'extrait membranaire

Les antigènes spécifiques de variants sont séparés des antigènes communs en faisant appel à la chromatographie d'affinité sur colonne de Sepharose Concanavalline A. Leur nature glycoprotéique (comme il sera démontré dans le chapitre traitant de la composition chimique des AVS), leur richesse en mannose, sont à l'origine du haut rendement préparatif de cette étape.

La chromatographie est conduite en deux temps.

30 ml d'extrait brut sont déposés sur une colonne de 10 ml de Sepharose Concanavalline A équilibrée en NaCl 0,5 M. Les antigènes communs, non retenus par la lectine, sont entraînés par la solution de NaCl 0,5 M (Eluat I). Cette élution en tampon d'équilibre est suivie par lecture de l'absorption densitométrique à 280 nm.

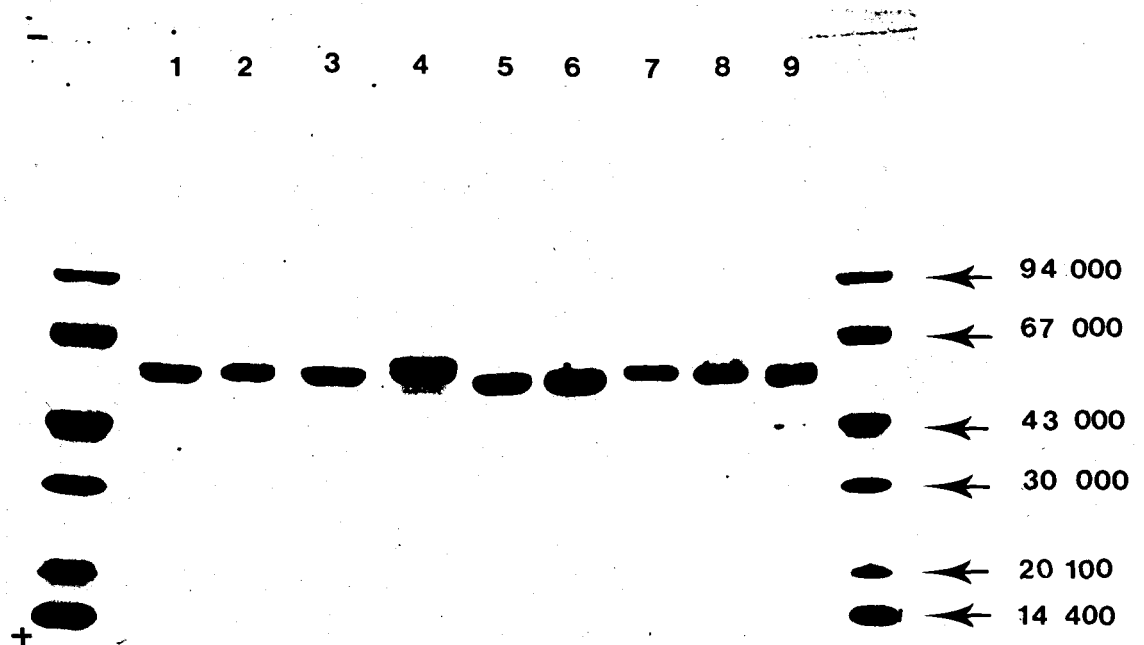
Lorsque cette absorption devient nulle, la chromatographie est poursuivie à l'aide d'une solution de NaCl de même molarité enrichie à 10 % (P/V) de alpha-méthyl-D-mannoside (Eluat II). Cet éluat, qui contient l'antigène variable, est dialysé abondamment contre de l'eau désionisée avant d'être soumis à une lyophilisation.

Un contrôle des préparations est réalisé à chaque étape de ce protocole. La préparation d'AVS obtenue se trouve dans un état de pureté très satisfaisant ; comme il est montré figure 3 une seule bande est visible en électrophorèse, elle possède d'autre part une homogénéité "immunologique".

Au total, 30 rats ayant livré 8.10^{10} trypanosomes, assurent 100 mg d'échantillon purifié d'AVS.

Cette technique préparative a pu être appliquée à toute une série de clones représentatifs de trypanosomes apparaissant au début, au cours ou à la phase ultime de la maladie parasitaire du lapin infesté par Trypanosoma equiperdum. Nous avons ainsi pu disposer en quantité suffisante de 9 antigènes spécifiques de variants : BoTat-1 (antigène de base), BoTat-2, 3, 4

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
2 BoTat-2
3 BoTat-3

4 BoTat-4
5 BoTat-20
6 BoTat-28

7 BoTat-51
8 BoTat-78
9 BoTat-100

FIGURE 3



(antigènes précoces), BoTat-78, 100 (antigènes intermédiaires), BoTat-20, 51, 28 (antigènes semi-tardifs ou tardifs). Dans tous les cas, les 10 à 20 mg nécessaires pour l'établissement de la composition chimique et des études physico-chimiques, ont correspondu à un seul lot préparatif. Dans deux cas, celui de BoTat-1 et de BoTat-28, plusieurs lots préparatifs ont été comparés, travail qui a démontré une excellente reproductibilité dans la qualité du matériel purifié.

C) ETUDE DES PROPRIETES PHYSICOCIMIQUES DES AVS DE TRYPANOSOMA EQUIPERDUM

L'étude a comporté les déterminations suivantes :

- * Sur le plan des propriétés physiques :
 - estimation de la masse moléculaire
 - détermination de la valeur du point isoélectrique
 - étude de la structure secondaire en dichroïsme circulaire
- * Sur le plan des propriétés chimiques
 - composition en acides aminés (hydrolyse chimique, hydrolyse totale enzymatique)
 - composition en sucre
 - identité de l'acide aminé en position N-terminale
 - recherche de l'acide aminé en position C-terminale (méthode chimique, méthodes enzymatiques)

1) Etude des propriétés physiques

a) Détermination de la masse moléculaire

La détermination de la masse moléculaire apparente a été réalisée par électrophorèse en gradient de gel de polyacrylamide en présence de SDS. Les conditions expérimentales retenues sont détaillées dans l'appendice technique. Les méthodes de calcul retenues y figurent. Une série de témoins de masses moléculaires connues, de valeurs comprises entre 14400 et 97000, a été utilisée. Les valeurs trouvées pour l'ensemble des AVS étudiés sont comprises

entre 52000 et 56000. Dès l'examen du gel (figure 3), il est possible de noter une certaine hétérogénéité de masse moléculaire qui ne dépasse pas 10 % de la valeur calculée. Ces différences d'un antigène variable à l'autre peuvent être la traduction :

- d'une différence structurale d'origine génétique. La traduction du gène aboutissant à un constituant de moindre taille.
- d'une protéolyse partielle pouvant survenir au cours du protocole préparatif, pendant le contact des parasites avec le tampon glucose pH 5,5. Nous avons déjà signalé l'observation d'une lyse d'un petit nombre de parasites ; cette destruction cellulaire, même limitée, a pour conséquence possible une libération dans le milieu d'enzymes protéolytiques d'origine plasmique ou lysosomiale qui seraient activés à pH 5,5. Ce point sera discuté plus loin. Disons que nos résultats tendent à infirmer cette hypothèse dans le cas de BoTat-1 où aucune coupure n'a été observée d'un lot à l'autre. Toutefois, ceci ne préjuge pas du cas des autres AVS de la variation.

Ajoutons que, récemment, BOOTHROYD et coll. (1980) (4), en étudiant la séquence nucléotidique du gène d'un AVS, ont démontré, chez Trypanosoma brucei, l'existence d'une séquence en amino-acides C-terminale hydrophobe. Cette extrémité n'étant pas retrouvée sur l'antigène variable purifié, ces auteurs soulèvent l'hypothèse d'une protéolyse physiologique au niveau membranaire, hydrolyse de l'axe peptidique venant précéder ou étant à l'origine de la libération de l'antigène variable dans le milieu ambiant.

- d'un artefact dû à la configuration moléculaire différente des AVS entre eux. Parmi les résultats enregistrés au cours des études en dichroïsme circulaire, l'évidence de différences nettes de configuration tridimensionnelle de certains antigènes a pu être démontrée. C'est le cas, par exemple pour BoTat-1, BoTat-4, BoTat-20, BoTat-28. Dans le but d'estimer à son importance l'influence éventuelle de ce facteur, nous avons comparé le comportement de BoTat-1 et de BoTat-28 à l'état natif et après réduction-alkylation. Des différences considérables de "masse moléculaire" ont été enregistrées. Pour BoTat-1, la valeur passe de 53000 à 61000 pour la forme réduite. Dans le

cas de BoTat-28, la masse moléculaire varie de 59000 à 67000. Ce traitement chimique qui n'entraîne que quelques modifications de charges, ne peut être seul responsable d'une variation aussi grande. De plus, les ponts disulfure en tant que tels, sont déjà soumis dans les techniques classiques à une réduction, la migration s'effectuant en milieu réducteur. Il est intéressant aussi, de noter que pour BoTat-1 et BoTat-28, une même différence de 8000 est enregistrée.

- d'un artefact dû au caractère glycosylé de l'AVS. Nous verrons dans le chapitre des propriétés chimiques des AVS que ces constituants membranaires possèdent de 7 à 8 % d'oses combinés. On connaît maintenant AUBERT et coll. (1976) (1) - AUBERT et coll. (1980) (2)) la notion de positionnement périphérique des glycannes dans une glycoprotéine. La ou les chaînes osidiques "pointent" généralement à l'extérieur du volume occupé par la masse peptidique. Nous savons aussi l'importance du volume occupé par les chaînes de sucres comparativement à celui de l'axe peptidique.

En conclusion de ces déterminations et de la discussion ci-dessus exposée, nous retiendrons dans la suite de cet exposé comme valeur de référence, la valeur de masse moléculaire déterminée sur échantillon non modifié chimiquement. Nous aurons l'occasion de montrer que ce paramètre s'accorde avec l'ensemble de nos résultats : nombre de résidus acides aminés, nombre d'oses combinés, nombre de fragments après coupures chimiques spécifiques d'un acide aminé (tryptophane, méthionine).

b) Détermination du point isoélectrique des AVS de Trypanosoma equiperdum

La détermination des points isoélectriques de différents variants de Trypanosoma equiperdum a été réalisée dans le double but :

- de contrôler, à travers le point isoélectrique expérimental et le point isoélectrique calculé à partir des résultats de compositions en acides aminés, le degré d'amidification des acides aminés dicarboxyliques (cf. chapitre composition chimique).
- de trouver là un procédé éventuel de classification des AVS, la masse moléculaire, à elle seule, ne permettant pas de situer un antigène au cours de la variation antigénique.

La détermination des points isoélectriques des antigènes de BoTat-1, 2, 3, 4, 78, 100, 20, 51 et 28 a été réalisée par isoélectrofocallisation sur gel de polyacrylamide en gradient de pH. Un gradient de pH entre les valeurs pH 3-pH 10 a été retenu. Les résultats enregistrés (figure 4) montrent de grandes différences d'un AVS à l'autre; Les molécules les plus basiques correspondant à BoTat-1 et surtout BoTat-28, les molécules les plus acides étant représentées par BoTat-20 et BoTat-51. Les valeurs obtenues pour BoTat-100, BoTat-2, 3, 4 et 78 étaient intermédiaires (Tableau 1). Il faut noter que, selon l'antigène, on observe un nombre plus ou moins grand de bandes électrophorétiques. Dans la plupart des cas, une quantification de l'importance relative des bandes a pu être réalisée. Ces données chiffrées figurent dans le tableau 1. Pour BoTat-1 parmi 4 bandes, l'une d'entre elles, pHi 8,3 représente 60 % de l'ensemble. Dans le cas de BoTat-28, 6 bandes peuvent être décelées : l'une majeure de pHi 8,7 correspond à 58 % ; deux autres très voisines pHi 8,4 et 8,1 couvrent 32 %. La dispersion peut être plus importante, le plus grand nombre de bandes a été enregistré pour BoTat-2 : 8 fractions sont enregistrées dont 5 représentent 92 %. Le cas le plus simple est sans conteste celui de BoTat-20 où seules deux bandes sont perçues d'égale d'intensité, pour des valeurs proches de pHi respectivement de 5,1 et 4,9.

Les valeurs de pHi dominantes ont été les suivantes :

BoTat-1	pHi 8,3
BoTat-2	pHi compris entre 7,9 et 7,2
BoTat-3	pHi compris entre 7,9 et 5,7

DETERMINATION DU pH I DES AVS DE VARIANTS DE *TRYPANOSOMA EQUIPERDUM*

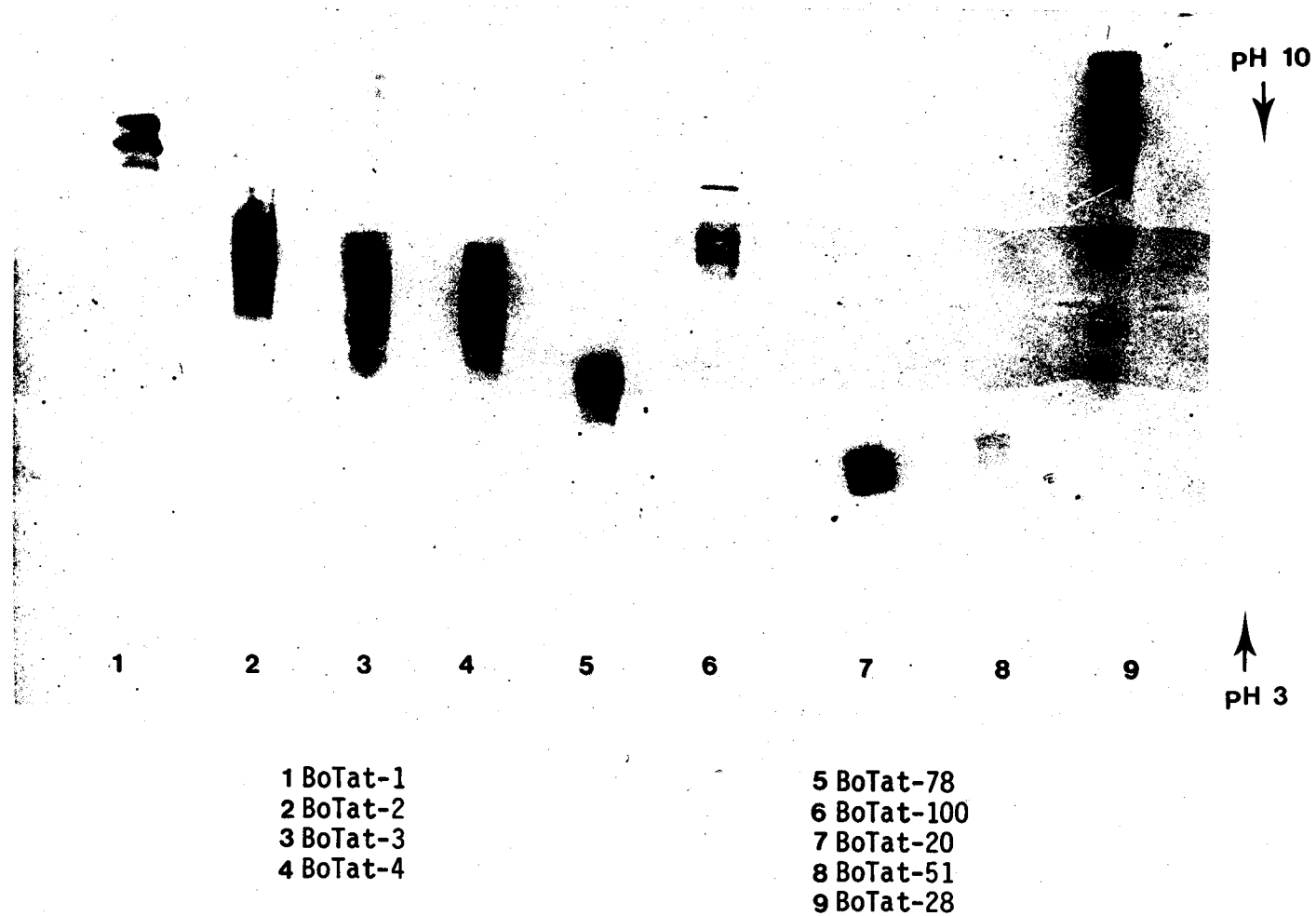


FIGURE 4

VALEURS DE POINTS ISOELECTRIQUES DES ANTIGENES VARIABLES
(pourcentage de répartition des différentes formes moléculaires)

BoTat-1	pHi	8,6	8,3	7,7	7,1				
	%	21	60	17	2				
BoTat-2	pHi	8,2	7,9	7,8	7,6	7,4	7,2	7,1	6,9
	%	2	15	28	22	15	12	4	3
BoTat-3	pHi	7,9	7,7	6,1	5,9	5,8	5,7		
	%	Non quantifiable							
BoTat-4	pHi	7,7	7,5	7,2	5,9	5,8	5,7	5,6	
	%	Non quantifiable							
BoTat-78	pHi	6,0	5,9	5,8	5,6				
	%	3	25	41	31				
BoTat-100	pHi	8,5	7,6	7,3	7,1				
	%	42	38		20				
BoTat-20	pHi	5,1	4,9						
	%	50	50						
BoTat-51	pHi	5,4	5,3	5,2	5,1				
	%	13	45	16	26				
BoTat-28	pHi	9,5	9,0	8,7	8,4	8,2	7,6		
	%		2	58		31	9		

Tableau 1



BoTat-4	pHi compris entre 7,7 et 5,7
BoTat-78	pHi compris entre 5,9 et 5,6
BoTat-100	3 valeurs distinctes de pHi 8,5 - 7 - 6 et 7,3 - 7,1
BoTat-20	2 valeurs de pHi 4,9 et 5,1
BoTat-51	pHi 5,3
BoTat-282	valeurs distinctes pHi 8,7 et 8,4.

De ces données expérimentales, nous retiendrons l'existence d'une microhétérogénéité moléculaire pour laquelle différentes hypothèses peuvent être évoquées : légère différence dans le squelette peptidique (mutations ponctuelles ?) ; variations dans le degré d'amidification (différences dans l'importance des acides aminés amidifiés au cours de la biosynthèse ou désamidation relative au cours de la conservation des échantillons), différence dans la configuration tridimensionnelle de la glycoprotéine (dénaturation plus ou moins importante au cours des étapes de purification, de dialyse ou de lyophilisation), microhétérogénéité, dans les enchaînements polysaccharidiques (variation dans le nombre des résidus osidiques, différence d'anomérisation ou de substitution pour les liaisons osidiques), enfin, peut-être différence dans le nombre des sites de glycosylation.

Globalement, nous retiendrons la grande différence de valeur de point isoélectrique d'un AVS à l'autre. Dans le chapitre des compositions chimiques, ces résultats seront discutés. Signalons dès maintenant la corrélation très étroite entre la richesse relative en asparagine, glutamine et le caractère basique relatif de ces glycoprotéines.

Enfin, ces différences de valeurs de point isoélectrique d'un AVS à l'autre, en première analyse, ne semblent pas liées au moment d'apparition de l'AVS au cours du cycle infectieux.

c) Etude de la structure secondaire des AVS par dichroïsme circulaire^{*}

^{*} Nous remercions 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.

Les déterminations de spectres dichroïques ont été pratiquées sur une série d'AVS correspondant aux variants BoTat-1, 2, 3, 4, 20, 28, 51, 78 et 100. Les spectres ont été obtenus selon un protocole décrit dans l'appendice technique.

Nous présentons (figure 5) les principaux spectres caractéristiques de chacune des catégories d'AVS. Une quantification de l'importance respective de structures alpha hélicoïdales, en feuillets plissés bêta et enfin de bêta turn ou/et de structure inorganisée, est présentée dans le Tableau 2.

Il apparaît que les antigènes peuvent être distingués en 4 groupes très nettement distincts quant à leur structure secondaire :

- le groupe 1 représenté dans notre série analytique par l'AVS "du type de base", présente comme élément caractéristique un pourcentage de près de 50 % de structure alpha hélicoïdale.
- le groupe 2 défini à travers BoTat-28, représente un type d'organisation tout-à-fait original par rapport à BoTat-1 ; on note un pourcentage élevé de configuration bêta turn ou/et de domaines inorganisés. Cette rubrique, en effet, atteint près de 45 % du total.
- le groupe 3 qui comprend le plus grand nombre d'antigènes étudiés (antigènes précoces ou semi-tardifs), se caractérise par une proportion sensiblement équivalente de structure hélicoïdale, en feuillets plissés et enfin de coude bêta ou zones inorganisées.
- le groupe 4, qui est représenté par près de 50 % de structure en feuillets plissés bêta, apparaît comme étant le plus "organisé". BoTat-20 et 51, antigènes tardifs, correspondent à ce groupe.

SPECTRES DICHROIQUES DES AVS DE VARIANTS DE *TRYPANOSOMA EQUIPERDUM*

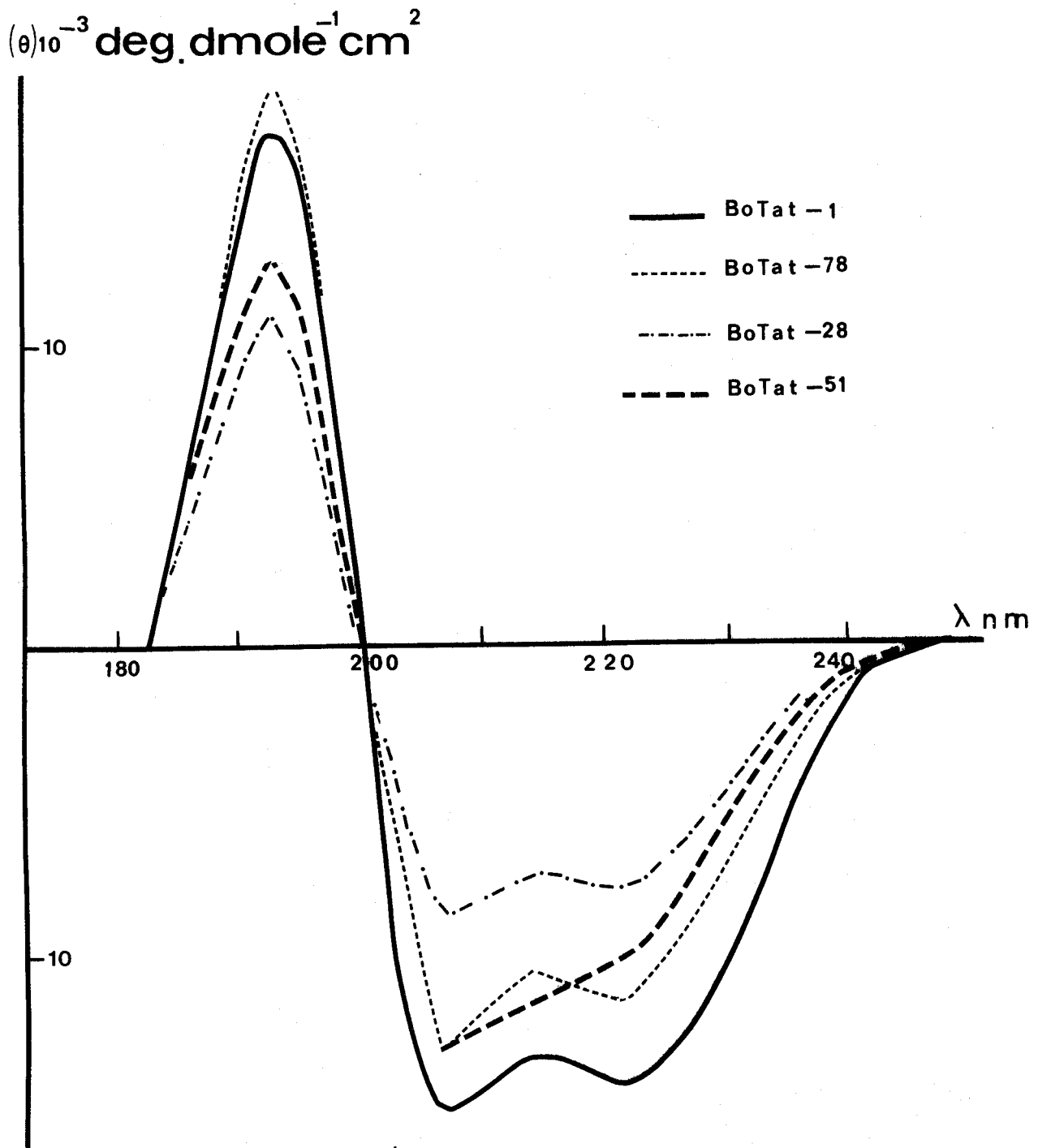


Figure 5



EVALUATION DE LA STRUCTURE SECONDAIRE
DES AVS DE VARIANTS DE
TRYPANOSOMA EQUIPERDUM

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

Tableau 2



Les spectres dichroïques semblent donc bien d'un grand intérêt. Les différences profondes de configuration sont à rapprocher des hypothèses formulées concernant les "différences de taille moléculaire" observées en gel de polyacrylamide. Les variations de structure secondaire apparaissent aussi capables d'expliquer la microhétérogénéité signalée lors des déterminations de point isoélectrique. Nous ne pouvons actuellement saisir pleinement l'importance de ces résultats. La possibilité de réactions croisées entre tel ou tel antigène est conditionnée par ces aspects structuraux. De même, l'expression en périphérie du ou des sites antigéniques communs dépend de ce facteur tridimensionnel.

2) Etude des propriétés chimiques

a) Composition en acides aminés

Les déterminations de composition en acides aminés ont été entreprises à l'aide de plusieurs protocoles expérimentaux qui permettaient selon les cas :

- l'obtention par cinétique d'hydrolyse d'une meilleure libération de l'ensemble des acides aminés.
- la protection de certains acides aminés : par exemple transformation des résidus de cystéine en acide cystéique.
- le dosage du tryptophane utilisant la méthode à l'acide bêta-mercaptosulfonique.
- la détermination précise du pourcentage d'acide aspartique ou d'acide glutamique sous forme d'asparagine ou de glutamine (hydrolyse enzymatique totale par action successive de la pronase, puis de l'aminopeptidase M) ; dans ce cas précis, une séparation en tampon lithium a été mise au point sur analyseur Beckman Multichrom B.

Lorsque les quantités d'échantillon ont permis l'ensemble de ces déterminations, nous avons pu, en tenant compte de la valeur de la masse moléculaire, présenter les résultats en nombre de moles d'acides aminés par mole de glycoprotéine (Tableau 3). Toutefois, dans bon nombre de cas, seule l'hydrolyse HCl (5,6 N 24 h 110°C) a été possible. Les résultats sont alors présentés en nombre de résidus pour 100 résidus amino acides dosés (Tableau 4) ou en micromoles par gramme (Tableau 5). Ces différentes présentations offrent l'avantage de pouvoir comparer très rapidement les compositions chimiques des différents AVS. L'examen des tableaux suggèrent en effet les remarques suivantes :

* La composition en acides aminés, bien que différente selon les AVS considérés, apparaît cependant caractéristique et représentative de la population des antigènes variables. Nous noterons la richesse en acides aminés dicarboxyliques (acide aspartique, acide glutamique), mais surtout l'importance quantitative des résidus d'alanine et de lysine.

* La quantité de leucine peut être aussi notée. Si nous faisons exception des cas particuliers représentés par BoTat-20 et BoTat-51, il semble possible d'évoquer une relation entre le taux de leucine et l'ordre d'apparition des AVS au cours du processus infectieux. Nous savons le rôle que peut également jouer cet acide aminé hydrophobe dans l'organisation moléculaire, dans le type de structuration de la glycoprotéine membranaire.

* L'attention peut également se porter vers les acides aminés soufrés. Le nombre de résidus de cystéine est très variable. L'existence de nombreux ponts disulfure peut être supposée bien que les résultats de dichroïsme circulaire ont nuancé, le rôle possible des résidus de cystéine dans la structure tridimensionnelle des AVS.

* Enfin, la possibilité d'établir une estimation quantitative précise de l'asparagine et de la glutamine, offre un moyen de contrôle des déterminations physiques de point isoélectrique. Précédemment en effet, nous avons rapporté les valeurs très différentes de point isoélectrique enregistrées pour des AVS étudiés. Dans deux cas, BoTat-1 et BoTat-28, nous avons pu comparer d'une part la valeur enregistrée à partir des résultats d'étude en

COMPOSITION EN ACIDES AMINES DES GLYCOPROTEINES
PURIFIEES DE VARIANTS BoTat-1 et BoTat-28

Acides aminés *	BoTat-1	BoTat-28
ASP	19	13
ASN	43	41
THR	36	55
SER	22	31
GLU	16	16
GLN	29	40
PRO	15	18
GLY	32	43
ALA	70	77
VAL	12	17
$\frac{1}{2}$ CYS	10	10
MET	5	2
ILE	11	17
LEU	42	22
TYR	10	9
PHE	10	12
LYS	37	49
HIS	3	3
TRP	2	5
ARG	<u>17</u>	<u>14</u>
	441	494

* Résultats exprimés en mole par mole de glycoprotéine (les poids moléculaires respectivement de 53000 (BoTat-1) et 59000 (BoTat-28) déterminés par électrophorèse en gel de polyacrylamide SDS moins le poids de sucre (8 %) ont été utilisés pour le calcul.

Tableau 3



COMPOSITION EN ACIDES AMINES DE GLYCOPROTEINES PURIFIEES DE VARIANTS DE *TRYPANOSOMA EQUIPERDUM*

Acides aminés *	BoTat-1	BoTat-2	BoTat-3	BoTat-4	BoTat-78	BoTat-100	BoTat-20	BoTat-51	BoTat-28
ASP	13,36	8,41	10,32	10,32	9,16	10,99	10,49	10,99	11,05
THR	8,90	10,74	11,07	8,67	10,48	10,53	10,57	9,05	11,20
SER	5,41	6,93	5,91	5,69	5,17	4,44	3,33	5,25	6,23
GLU	11,10	12,41	13,62	13,48	14,22	13,49	16,88	14,29	11,46
PRO	3,60	3,64	2,54	5,16	3,19	5,88	3,81	4,05	3,68
GLY	7,96	6,29	6,99	6,30	6,58	7,14	7,32	6,76	8,85
ALA	15,12	15,06	13,02	14,33	14,10	13,22	11,72	12,18	15,57
VAL	2,59	3,26	3,73	1,64	3,21	2,78	4,08	2,81	3,37
$\frac{1}{2}$ CYS	2,19	1,21	2,15	1,20	1,25	1,32	1,17	1,45	1,90
MET	1,13	0,59	Traces	1,26	0,89	0,49	Traces	0,45	0,35
ILE	2,36	4,11	3,18	4,68	3,51	2,83	3,01	2,85	3,45
LEU	9,15	7,64	6,98	6,93	6,34	5,36	7,07	8,17	4,40
TYR	2,20	2,61	2,49	2,93	2,04	2,69	2,17	2,12	1,87
PHE	2,14	1,60	1,95	2,59	3,03	1,92	1,87	3,31	2,45
LYS	8,06	9,59	11,86	10,77	11,61	11,32	12,34	11,65	9,93
HIS	0,57	2,04	2,03	1,59	1,40	2,74	1,29	1,55	0,51
TRP	0,51	0,46	0,40	0,41	1,06	0,58	0,34	ND	0,98
ARG	3,65	3,41	1,76	2,05	2,76	2,28	2,54	3,07	2,75

* Valeurs exprimées en résidus pour 100 résidus d'acides aminés dosés.

ND : non dosé



Tableau 4

COMPOSITION EN ACIDES AMINES DE GLYCOPROTEINES PURIFIEES DE VARIANTS DE *TRYPANOSOMA EQUIPERDUM*

Acides aminés *	BoTat-1	BoTat-2	BoTat-3	BoTat-4	BoTat-78	BoTat-100	BoTat-20	BoTat-51	BoTat-28
ASP	974,88	670,32	689,55	941,25	730,74	963,55	1047,90	1071,06	906,89
THR	649,35	856,23	740,01	790,75	835,42	923,76	1056,38	882,05	919,07
SER	395,04	552,18	395,05	518,63	412,08	389,04	332,23	511,26	510,69
GLU	809,80	988,92	909,58	1228,41	1132,91	1182,57	1686,41	1392,77	940,28
PRO	262,91	289,71	169,89	470,84	254,11	515,95	380,65	394,52	302,15
GLY	581,07	501,03	467,49	574,54	524,79	626,42	731,75	658,86	725,97
ALA	1103,47	1200,85	870,41	1306,85	1124,63	1158,59	1171,45	1187,03	1277,06
VAL	189,11	259,76	249,00	149,68	256,32	244,09	407,52	273,71	276,25
$\frac{1}{2}$ CYS	159,68	96,13	143,49	109,09	99,63	115,84	116,50	141,06	155,84
MET	82,21	47,12	Traces	114,60	70,81	42,70	Traces	43,67	28,41
ILE	172,17	327,76	212,82	426,57	279,97	248,49	300,51	278,00	282,88
LEU	667,94	609,13	466,25	632,34	505,90	469,92	706,87	796,42	361,35
TYR	160,24	208,03	166,75	267,27	162,88	235,76	217,11	206,96	153,07
PHE	156,05	127,33	130,43	236,29	241,36	168,62	186,98	323,01	201,18
LYS	588,46	764,56	792,78	982,44	925,50	992,57	1232,56	1135,52	814,77
HIS	41,30	161,46	135,81	145,18	111,95	240,13	128,79	150,88	41,80
TRP	37,49	36,33	26,68	35,57	84,41	50,54	34,38	ND	80,30
ARG	266,18	271,38	117,72	187,41	219,93	200,09	253,96	299,51	225,54

* valeurs exprimées en micromoles/g

ND : non dosé

Tableau 5



polyacrylamide, et d'autre part, la valeur estimée à partir d'une composition en amino-acide exprimée en nombre de moles d'amino-acides par mole d'AVS. De plus, ce type d'investigation peut avoir un intérêt certain dans la conduite d'une étude structurale au moment du choix des techniques de coupures chimiques ou enzymatiques pour la préparation des fragments à séquencer.

En centrant notre analyse sur BoTat-1 et BoTat-28, nous nous devons de noter le fait que seulement 8 amino acides représentent les 2/3 des éléments constitutifs de l'axe peptidique. Il s'agit de l'alanine, de la leucine, de la thréonine, de la lysine et enfin, des acides aminés dicarboxyliques amidifiés ou non. Si nous considérons à titre d'exemple le fait qu'un résidu de leucine est un élément favorisant tout particulièrement une organisation en structure alpha hélicoïdale, nos résultats sont en excellente corrélation avec les données apportées par le dichroïsme circulaire.

b) Composition en glucides

La partie glycanique des AVS de Trypanosoma equiperdum n'étant pas pour l'instant au centre de nos préoccupations de recherche, nous rapporterons uniquement les résultats obtenus à partir de trois préparations d'AVS : BoTat-1, BoTat-78 et BoTat-28, c'est-à-dire, un variant précoce, un variant intermédiaire et un variant tardif (Tableau 6). Il apparaît que les valeurs sont parfaitement identiques pour les 3 antigènes variables étudiés. En pourcentage, par rapport au poids sec des préparations, le contenu glucidique se situe entre 7 et 8 %. Dans tous les cas, également seul trois hexoses et une hexosamine ont pu être dosés, à savoir parmi les hexoses, le galactose, le mannose et en faible quantité, le glucose et pour l'hexosamine, la N-acétylglucosamine.

Nous avons, sur plusieurs lots préparatifs différents, pu vérifier l'absence de N-acétylgalactosamine, d'acide sialique ou de fucose. Le glucose est faiblement représenté, une à deux moles par mole de glycoprotéine. La question posée est celle de l'appartenance réelle du glucose à la structure de la glycoprotéine, ne s'agit-il pas d'une contamination ou

COMPOSITION GLUCIDIQUE DES AVS DE VARIANTS DE
TRYPANOSOMA EQUIPERDUM

Monosaccharides *	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 glucosamine	2,4	2,8	2,4

* Résultats exprimés en résidus par mole de glycoprotéine.

Tableau 6



d'un artefact de préparation. Ce problème ne pourra être réellement tranché que lorsque nous aurons progressé plus avant dans la connaissance de l'axe peptidique et partant des différents sites de glycosylation. Le seul argument qui tente à retenir l'hypothèse de la présence de glucose dans la molécule, est la reproductibilité même du pourcentage de glucose trouvé sur les mêmes AVS dosés à plusieurs reprises sur différents lots.

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

Dans quatre cas, l'acide aminé en position N-terminale des AVS a été identifié à l'aide de la technique classique de dégradation de Edman par méthode manuelle. Après conversion en milieu acide des thiazolinones, les phénylthiohydantoïnes amino-acides sont identifiées par chromatographie liquide de haute performance sur colonne de μ -Bondapack C18. Dans trois cas, BoTat-1, BoTat-78 et BoTat-100, il s'agit d'un même résidu : l'alanine. Dans le cas de BoTat-28, le glycolle a été identifié.

Dans deux cas, celui de BoTat-1 et de BoTat-28, la séquence peptidique N-terminale a pu être réalisée par dégradation de Edman rendue automatique sur séquenceur Beckman 890C. Nous rapportons (Tableau 7) les résultats obtenus.

Dans le cas de BoTat-1, plus de 20 résidus ont été établis; toutefois, des doutes subsistent concernant en particulier les cycles 15 où peuvent être évoquées devant les faibles rendements enregistrés, la présence de sérine, mais aussi l'hypothèse d'un acide aminé soufré. Enfin, un site de glycosylation ne peut être entièrement éliminé. En position 18, existe une ambiguïté de choix entre un résidu de sérine, de glutamine ou d'acide glutamique.

Signalons comme élément d'importance pour la suite du travail l'existence en position 11 d'un résidu de tryptophane, la molécule contenant au total 2 résidus ; en position 14, un résidu de méthionine sur les 5 que possède la glycoprotéine, pourrait lui aussi servir de base à une coupure chimique

BoTat-1 ALA-VAL-ALA-ASN-PRO-LEU-LYS-LYS-THR-TYR-¹⁰
 TRP-GLU-ALA-MET-ser?-ASP-LEU-^{ser}_{glx}?-ASN-ASP-²⁰
 GLY-ASN-LEU-LEU-ALA-GLN-

BoTat-28 GLY-ASP-ILE-GLY-ALA-GLY-ALA-ASN-ARG-ASP-¹⁰
 -ser?-thr?-AL A-L EU-ser?-ala?-ILE-

Tableau 7



BoTat-28 présente une séquence plus délicate à établir ; alors que la glycoprotéine native est soumise au même protocole que BoTat-1 sur séquenceur automatique, seuls 10 résidus ont été positionnés avec certitude. Des propositions peuvent être formulées pour les 7 à 8 résidus suivants.

Nous noterons qu'il n'existe aucune analogie entre les séquences N-terminales des deux antigènes variables BoTat-1 et BoTat-28.

Un point important était de vérifier la constance des résultats d'un lot préparatif à l'autre. Nous avons dans un chapitre précédent, traitant des méthodes de préparation et de purification des AVS, souligné le rôle possible de protéases libérées au cours de l'étape de libération de la glycoprotéine à partir de la membrane. Cette hypothèse avait été formulée au vu de microhétérogénéité de masse moléculaire entre les AVS. Nous pouvons maintenant avec toute sécurité affirmer que même si des protéases étaient susceptibles d'être libérées, elle n'affectent pas l'extrémité N-terminale des AVS BoTat-1 ou BoTat-28.

Un dernier point de discussion est celui des rendements relativement faibles sur séquenceur automatique. Partant d'une glycoprotéine, telle que les AVS, nous pouvons évoquer à ce propos des facteurs pouvant en être la cause : influence de la structure tridimensionnelle, solubilité et dénaturation relative dans les solvants, formation d'agglomérats dans la coupelle peu accessibles aux réactifs, environnement glycanique en périphérie du volume moléculaire, proximité relative de ponts disulfure, mais aussi de sites de liaisons glycaniques à proximité de l'extrémité N-terminale de la glycoprotéine. La valeur relative de ces différentes hypothèses ne pourra être appréciée qu'en fonction de l'avancement de nos travaux. Nous verrons dans le cas de BoTat-1 un exemple d'influence de site glycanique sur le rendement réactionnel au cours de la dégradation automatique.

Enfin, nous ajouterons que la microhétérogénéité observée lors de la détermination de la valeur des points isoélectriques en gel de polyacrylamide ne peut être interprétée comme une différence d'identité de l'extrémité N-terminale de l'AVS.

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

Nous reprendrons dans ce mémoire les résultats obtenus par PLANTEY en 1979 (51), qui a rencontré des difficultés dans l'identification de l'acide aminé en position C-terminale. Qu'il s'agisse de l'hydrazinolyse (méthode chimique), ou de méthodes enzymatiques par dégradation contrôlée en cinétique à l'aide de différentes carboxypeptidases : (carboxypeptidase Y, mélange ou utilisation séparée des carboxypeptidases A et B) les résultats obtenus sont discutables. Nous ne ferons que rappeler les interprétations de cinétiques de libération enzymatique pour les AVS BoTat-1, BoTat-2, BoTat-78, BoTat-100 et BoTat-28 (Tableau 8). Quatre acides aminés dans tous les AVS étudiés sont identifiés. Il s'agit de tyrosine, de thréonine, d'alanine et de leucine. Les différences notées entre les AVS ne sont que des données quantitatives d'un amino acide par rapport à l'autre. Devant ces résultats et l'impossibilité de conclure avec certitude, nous avons évoqué l'hypothèse de contamination des carboxypeptidases par des endopeptidases. Les acides aminés libérés par carboxypeptidase seraient donc clivés à partir de fragments libérés eux-mêmes par des protéases. La reproductibilité des résultats pour un AVS donné serait une preuve d'une relative spécificité de coupure de ces enzymes contaminants. Ainsi, les rendements différents amino-acides libérés pourraient refléter des variations de séquence d'un AVS à l'autre, mais plus encore des possibilités d'approche enzymatique fonction de variations importantes de configuration tridimensionnelle. Les résultats négatifs pour des temps courts d'hydrolyses par carboxypeptidase correspondent en première hypothèse au fait que l'enzyme est sans effet sur l'AVS, dans la mesure où l'extrémité C-terminale de l'axe peptidique pourrait être enfouie dans la structure de la molécule. L'hypothèse d'un site de glycosylation à l'extrémité C-terminale ou dans la région immédiatement C-terminale de la molécule pourrait aussi expliquer ces difficultés. Au total, des hydrolyses courtes par carboxypeptidases ne libèrent rien, des incubations lentes font alors apparaître la contamination devenue significative des endopeptidases.

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

AVS de variants	Extrémité C-terminale
BoTat-1	LEU, ALA, THR, TYR
BoTat-2	ALA, THR, LEU, TYR
BoTat-78	ALA, THR, LEU, TYR
BoTat-100	ALA, LEU, THR, TYR
BoTat-20	LEU, ALA, THR, TYR
BoTat-28	ALA, THR, LEU, TYR

Tableau 8



D. DISCUSSION - CONCLUSIONS

Les travaux que nous avons mené permettent de définir l'antigène membranaire spécifique de variants de Trypanosoma equiperdum comme étant une glycoprotéine d'une masse moléculaire de l'ordre de 50000 à 60000. La partie glycanique qui s'est avérée être remarquablement identique d'un AVS à l'autre, aussi bien dans sa définition qualitative que quantitative, semble orienter l'interprétation du phénomène de variation antigénique vers un axe polypeptidique variable. Cet axe peptidique correspondrait à un enchaînement d'environ 450 résidus d'acides aminés. Nous avons déjà souligné, l'importance des résidus dicarboxyliques amidifiés ou non : (rapport ASN/ASP de l'ordre de 2 à 3 ; GLN/GLU de l'ordre de 2). L'alanine a elle seule représente 70 à 80 résidus, la lysine de 40 à 50 résidus, les hydroxyacides de 70 à 90 résidus. Cette relative constance de composition est en opposition avec l'existence de séquences N-terminales différentes.

Une hypothèse peut être dès lors avancée, s'agirait-il d'une molécule possédant comme les immunoglobulines une partie variable et une partie constante ?

En dehors des apports de la chimie, le dichroïsme circulaire a permis non seulement une meilleure connaissance des antigènes considérés au titre de glycoprotéines individuelles, mais aussi apporté la compréhension de la variation antigénique. Il semble bien que nous puissions discerner en effet, une relation entre le type de spectre et le caractère précoce, intermédiaire, semi-tardif ou tardif du sérotype. Cette notion de "variation tridimensionnelle" pourrait être à l'origine du phénomène d'antigénicité variable, mais aussi, facteur plus important encore, expliquer l'existence de réactions croisées entre antigènes variables.

Un site antigénique, nous le savons, s'appuie en fonction de l'ordonnement dans l'espace d'un axe peptidique réunissant parfois des zones éloignées de la séquence. Cette relation structure primaire, organisation tridimensionnelle, phénomène de variation antigénique, réactions croisées entre AVS, est un aspect majeur dans l'approche de la recherche du

phénomène biologique de variation et des concepts thérapeutiques immunologiques. Nous connaissons encore mal le rôle de la glycoprotéine de surface. Certains auteurs comme CROSS (1975) (9), ont avancé l'hypothèse du rôle des glycoprotéines dans le pouvoir infestant du trypanosome. D'autres hypothèses sont à formuler : l'évolution structurale montrée par dichroïsme peut être aussi l'évidence d'un rôle de capteur externe ou d'un rôle à l'encontre des mécanismes immunologiques.

Comme nous venons de le voir, la confrontation biologie, chimie, biophysique, apparaît fructueuse.

Si nous comparons les AVS de Trypanosoma equiperdum avec d'autres espèces, Trypanosoma brucei par exemple, les problèmes posés par l'analyste semblent très voisins ; Trypanosoma equiperdum apparaît être un modèle très satisfaisant. Aussi s'imposait un développement des recherches structurales. Dans le cadre du laboratoire, et en collaboration avec le groupe de Bordeaux (Docteur BALTZ), le choix s'est porté vers l'étude de l'enchaînement peptidique de deux variants, l'un précoce BoTat-1, l'autre tardif BoTat-28. PLANTEY en 1979 (51), avait centré son activité sur BoTat-28. Quant à nous, nous avons entrepris l'étude de BoTat-1.

La seconde partie de ce mémoire aura donc trait à la présentation de nos résultats concernant :

- la définition d'une stratégie à travers l'étude de différentes méthodes de coupures chimiques et enzymatiques dont l'effet sur la glycoprotéine était appréciée par différentes techniques d'électrophorèse en gel de polyacrylamide ayant pour but des déterminations de masse moléculaire, de point isoélectrique ou la mise en évidence du caractère glycosylé des fragments obtenus.
- les déterminations de séquence en acides aminés sur glycoprotéines natives ou sur fragments obtenus après coupures chimiques ou enzymatiques (coupure par le bromure de cyanogène, le BNPS scatole, la trypsine, la chymotrypsine, la protéase de Staphylococcus aureus, etc..).

CHAPITRE III

ETUDE STRUCTURALE DE L'ANTIGENE ISOLE DU VARIANT BoTat-1

* * *

A. INTRODUCTION

L'étude de la séquence en amino acides de cette glycoprotéine de masse moléculaire apparente 53000, correspond, si nous tenons compte de la partie glycanique, à un axe peptidique d'environ 441 amino acides. Sur le plan expérimental, si les techniques de dégradation de Edman qu'elles soient manuelles ou rendues automatiques, sont parfaitement au point en ce qui concerne l'étude de protéines ou de peptides, il en va tout-à-fait autrement dans le domaine des glycoprotéines. Dans ce travail, une seconde difficulté à surmonter était la quantité relativement faible de matériel dont nous pouvions disposer.

Le gramme de glycoprotéine préparé par le groupe de Bordeaux a représenté un travail considérable. Force était donc de concevoir une stratégie chimique ou enzymatique consommant le moins de matériel possible et apportant le plus de connaissance sur l'AVS. Il faut dire que le développement très récent des techniques de chromatographie haute performance (HPLC), en particulier dans l'identification et surtout la quantification des phénylthiohydantoïnes (PTH) amino acides dérivés, nous a beaucoup aidé. Nous verrons même plus loin qu'il a permis la séquence de plusieurs fragments à la fois, ce qui a réduit au minimum les étapes de sous-fractionnement après coupures chimiques ou enzymatiques de la glycoprotéine.

Dans une première partie, seront présentées et illustrées les différentes approches permettant l'obtention de fragments intéressants pour l'utilisation d'un séquenceur automatique. Nous pouvons dire, en effet, que le but recherché en l'état actuel de nos travaux, était l'obtention de fragments de masse moléculaire élevée, solubles dans les tampons classiques, et susceptibles d'être facilement séquencés. Le test qualitatif pour juger de l'efficacité des procédés de clivage a été le gel de polyacrylamide dans les conditions de mise en évidence de masse moléculaire des fragments. Dans quelques cas, cette étude s'est vu complétée par la détermination d'un point isoélectrique. Des quantités de 100 à 500 µg de matériel ont généralement suffi à réaliser, par exemple, des cinétiques d'action enzymatique.

Dans une seconde partie seront rassemblés les résultats concernant la coupure par le bromure de cyanogène de la glycoprotéine réduite et S-alkylée. Ce clivage chimique a, en effet, mené à des fragments dont la séquence N-terminale a pu être étudiée. Pour l'un de ces fragments, des "recoupes" enzymatiques ont été réalisées. Elles ont permis de connaître près de la moitié de la séquence de l'AVS BoTat-1.

En fonction de l'ensemble de nos résultats, une hypothèse de reconstitution de la molécule sera proposée. Elle ne possède que valeur de synthèse à ce moment de l'évolution du travail.

B. ETUDE DE LA SENSIBILITE DE L'AVS BoTat-1 AUX ENZYMES PROTEOLYTIQUES ET AUX COUPURES CHIMIQUES

1) Sensibilité de la glycoprotéine aux enzymes protéolytiques

Dans une étude comparative visant à retenir éventuellement un protocole de clivage des AVS à des fins préparatives, nous avons dans un premier temps, réalisé des cinétiques d'action enzymatique. Les conditions expérimentales sont présentées dans le chapitre technique. Quatre activités enzymatiques, celles de la trypsine, la chymotrypsine, la protéase de Staphylococcus aureus et la thermolysine, ont été testées sur la glycoprotéine native ou après réduction des ponts disulfure et S-alkylation.

a) Effet des protéases sur Botat-1 .

Nous avons rassemblé, dans la figure 6, l'ensemble des études électrophorétiques réalisées à différents temps d'hydrolyse allant de 10 mn à plusieurs heures. Un ou plusieurs rapports enzyme/substrat ont été testés. Dans un nombre limité de cas, l'étude a porté également sur la glycoprotéine réduite et S-alkylée.

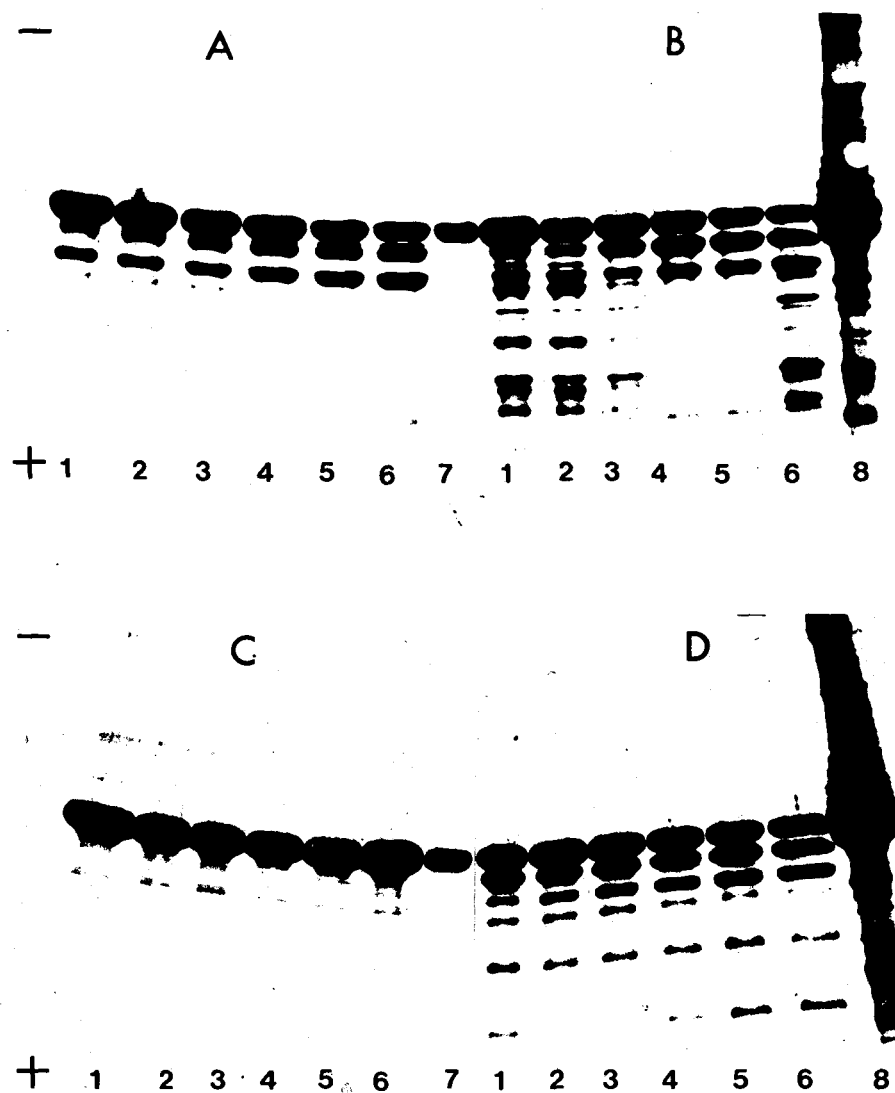
Un certain nombre de remarques peuvent être faites à la suite de ce travail :

* La chymotrypsine, dont nous aurions pu attendre une activité relativement importante du fait de la richesse en tyrosine et phénylalanine de la glycoprotéine, n'a pas d'action sur l'AVS BoTat-1. Des rapports enzyme/substrat importants, ici 1/100, n'ont aucun effet. Il apparaît, dès ce premier exemple, que l'organisation tridimensionnelle de la molécule joue un rôle pour limiter l'approche de l'enzyme et rend inaccessibles les résidus d'acides aminés aromatiques, sites de clivage potentiel.

Nous avons pu largement confirmer cette hypothèse lors de l'incubation dans les mêmes conditions expérimentales de la glycoprotéine ayant subi un profond remaniement, soit après oxydation performique, soit après réduction et S-alkylation (2-mercaptoéthanol iodoacétamide). Après ces deux types de modifications chimiques qui clivent les ponts disulfure, l'hydrolyse par la chymotrypsine aboutit à une dégradation cette fois très complète livrant des fragments de masse moléculaire inférieure à 15000, c'est-à-dire, en dessous des limites d'interprétation de notre technique en gel de polyacrylamide SDS.

* Les trois autres activités protéolytiques, trypsine, protéase de Staphylococcus aureus, thermolysine, ont conduit à des cinétiques d'hydrolyse très voisines dans leurs résultats (figure 6). Au regard des électrophorégrammes, nous pouvons, en effet, noter dans les trois cas l'apparition très rapide, dès 10 mn d'incubation, de deux gros fragments de masse moléculaire avoisinant respectivement 49000 et 40000. Il semblerait donc que l'organisation de la molécule soit telle qu'elle permette,

CINETIQUES D'HYDROLYSE PAR DIFFERENTS ENZYMES PROTEOLYTIQUES
DE L'AVS BoTat-1
(Profil en gel de polyacrylamide SDS)



(A) : Trypsine E/S : 1/200 - (B) : Protéase de *Staphylococcus aureus* E/S : 1/400
(C) : Chymotrypsine E/S : 1/100 - (D) : Thermolysine E/S : 1/200
Temps d'hydrolyses : (1) 10 minutes ; (2) 20 minutes ; (3) 30 minutes ;
(4) 1 heure ; (5) 2 heures ; (6) 4 heures ; (7) Témoin variant BoTat-1
(8) Standard de masse moléculaire : tubuline

Figure 6



en des sites privilégiés, l'approche de l'axe peptidique par les enzymes protéolytiques. Au cours de la cinétique, des bandes de masse moléculaire plus faibles, apparaissent au détriment des gros fragments déjà cités. L'observation peut être faite dans le cas de la thermolysine ou de la protéase de Staphylococcus aureus. Notons que les bandes de masse moléculaire élevée demeurent stables plusieurs heures, illustrant encore le fait d'une approche enzymatique conditionnée par la structure tridimensionnelle des fragments.

b) Conclusion

En conclusion de cette étude systématique de quatre activités protéolytiques sur l'AVS de BoTat-1, nous sommes amenés à enregistrer un échec relatif dans la mesure où aucune protéase n'est capable, avec un rendement satisfaisant, de conduire à un ou plusieurs fragments de poids moléculaire allant de 15000 à 50000. En effet, il est possible d'obtenir soit des fragments de masse moléculaire très élevée, difficiles à séparer de la glycoprotéine non dégradée, soit des éléments de faibles masses moléculaires posant immédiatement le problème de leur sous-fractionnement et de leur nombre. Une tentative d'utilisation de la trypsine à l'aide d'un rapport enzyme/substrat élevé 1/100, avait été effectuée toutefois par PLANTEY (1979) (51). Les différents essais de chromatographie de gel filtration, chromatographie sur colonne de Biogel P100 ou P200, stabilisée en acide acétique, n'avaient pas permis de fractionnement satisfaisant. De plus, ces conditions enzymatiques de clivage n'étaient pas strictement reproductibles. Devant cet insuccès, aussi bien dans le choix d'une protéase, que dans la définition des conditions chromatographiques de purification, nous avons préféré nous tourner vers des méthodes chimiques généralement plus spécifiques mais souvent de rendement limité.

2) Sensibilité de la glycoprotéine aux méthodes de coupures chimiques

Deux méthodologies devenues aujourd'hui classiques, intéressant essentiellement des liaisons peptidiques comprenant des résidus de méthionine ou de tryptophane, ont été étudiées.

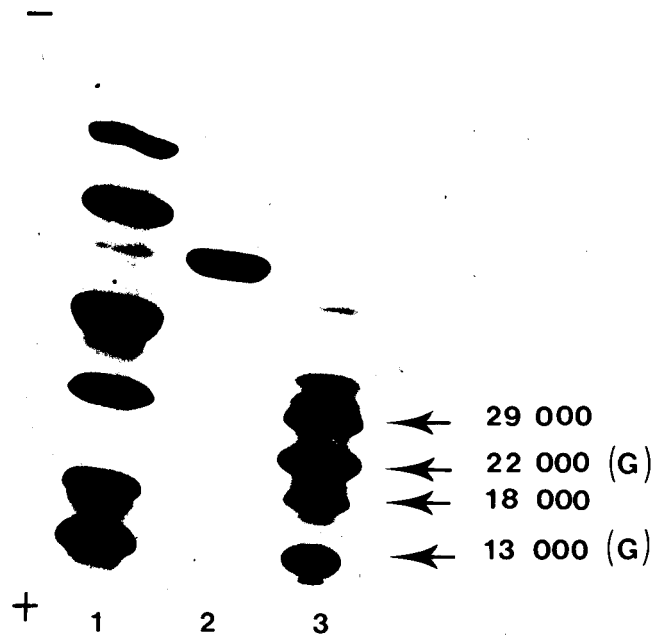
a) Coupure par le bromure de cyanogène (BrCN).

Dans une étape préliminaire, une réduction suivie d'une S-carboxyméthylation est effectuée. La glycoprotéine est reprise dans un tampon 0,003 M EDTA ; 8 M urée ; 1,5 M Tris de pH 8,5. Une concentration finale de 50 mg/ml est retenue. La réduction est assurée par le 2-mercapto-éthanol ajouté en large excès (200 fois la quantité théoriquement nécessaire). La réaction est réalisée sous atmosphère d'azote, à la température du laboratoire sous agitation douce pendant 24 heures. La S-carboxyméthylation se réalise ensuite à froid par addition d'un large excès d'iodo-acétamide (400 fois la valeur théoriquement nécessaire), à l'obscurité pendant 45 minutes. La réaction au nitroprussiate permet de vérifier la disparition des groupements thiol libres. Une dialyse de cinq jours, avec renouvellement fréquent d'eau désionisée, est nécessaire pour éliminer les réactifs. L'adialysable est alors conservé par lyophilisation.

Le clivage, à proprement parler par le bromure de cyanogène (BrCN), est réalisé sur la glycoprotéine S-carboxyméthylée, dissoute en acide formique à 70 %. Le BrCN en solution dans l'acide formique à la même concentration est ajoutée en très large excès (200 molaire par résidu de méthionine). La réaction de clivage est conduite à température du laboratoire, à l'obscurité, sous agitation douce pendant 24 heures. La concentration finale en glycoprotéine dans le milieu réactionnel est de 1 mg/ml. A la fin du temps réactionnel, la solution est diluée par addition de 10 volumes d'eau désionisée, conservée à 4°C, puis lyophilisée. Le matériel obtenu peut alors faire l'objet d'étude électrophorétique et de fractionnement par chromatographie en phase liquide.

L'étude électrophorétique en gel de polyacrylamide en présence de SDS nous a permis, sur plusieurs préparations, d'obtenir des résultats strictement reproductibles, aussi bien dans la qualité des fragments, que dans leur rendement relatif. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 7. Ils montrent essentiellement l'apparition à partir de la glycoprotéine, de 4 fragments majeurs, dont les masses moléculaires respectives s'échelonnent entre 13000 et 30000. Un examen attentif du gel, après avoir réalisé des dépôts en surcharge, fait apparaître l'existence de bandes

PROFIL EN GEL DE POLYACRYLAMIDE SDS DU
CLIVAGE PAR LE BrCN DE L'AVS BoTat-1



- 1 Témoin de masse moléculaire
2 AVS BoTat-1 réduit S carboxyméthylé
3 Clivage par le BrCN
(G)Glycolysé

Figure 7



mineures dont la masse moléculaire se situe dans les zones 53000, 45000, 35000, 33000 et inférieure à 13000. A titre d'hypothèse, la bande 53000 pourrait correspondre à la glycoprotéine non réduite, non alkylée résiduelle ou à une partie de glycoprotéine réduite alkylée, amputée d'un fragment de masse moléculaire 8000. Les fragments majeurs présentent les valeurs de masses moléculaires suivantes :

- 29000
- 22000
- 18000
- 13000.

Parmi ces différents fragments il était intéressant de reconnaître ceux qui se caractérisaient par une structure de nature peptidique ou/et glycopeptidique.

Nous avons utilisé une technique mise au point par DUVILLIER-HUET (1981) (15), qui utilise l'affinité des glycopeptides pour une lectine : la Concanavaline A. Le choix de cette lectine a été faite après examen de la composition chimique de la glycoprotéine. L'AVS s'est avéré riche en hexose et plus particulièrement en mannose. Or, on connaît la grande spécificité de la Concanavaline A pour les structures riches en mannose.

Les études montrent sans conteste l'existence de deux structures glycosylées correspondant aux fragments de masses moléculaires respectives 13000 et 22000.

En conclusion de cette étude du clivage de l'AVS de BoTat-1 par le BrCN, des points importants peuvent être soulignés :

* La coupure chimique s'est avérée parfaitement reproductible sur plusieurs aliquotes de la même préparation.

* Les fragments obtenus, du fait de la position très favorable des résidus de méthionine dans la molécule, possèdent des masses moléculaires telles que nous pouvons espérer un fractionnement relativement aisé dans les conditions classiques faisant appel à la chromatographie de gel filtration en phase liquide.

* Enfin, le caractère glycosylé des peptides 13000 et 22000 offre également la possibilité de recourir à la chromatographie d'affinité sur colonne de Sepharose Concanavaleine A.

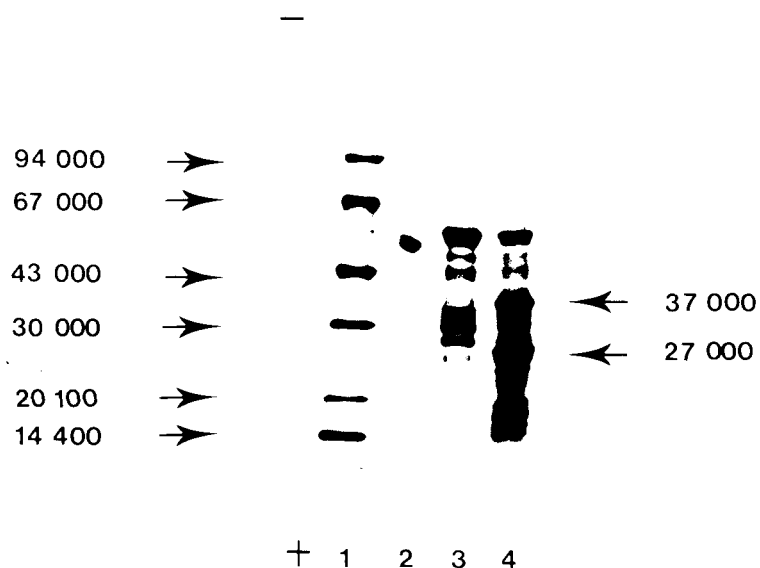
Sur le plan général de la connaissance de l'AVS BoTat-1, ces résultats, bien que préliminaires, permettent déjà de soulever une hypothèse : l'existence d'au moins 2 sites de glycosylation, dans la mesure où les fragments de masse moléculaire 13000 et 22000 ne correspondent pas à une "recoupe". L'analyse des structures devrait permettre de trancher.

b) Coupure par le BNPS Scatole.

La coupure par le 2(2-nitrophénylsulfényl)3-méthyl-3-bromoin-dole ou BNPS Scatole s'effectue comme dans le cas de la coupure par le BrCN sur une glycoprotéine préalablement S-carboxyméthylée. L'échantillon est dissous dans de l'acide acétique à 75 % à la concentration finale de 1 mg/0,33 ml. Le BNPS Scatole est ajouté en excès (100 moles de réactif par résidu de tryptophane). De la tyrosine exogène est ajoutée à raison de 100 moles par résidu de tyrosine endogène. Le milieu réactionnel est laissé à température du laboratoire, à l'obscurité, sous agitation douce pendant 68 heures. Une centrifugation à 10000 t/mn permet de séparer un surnageant qui, après dilution par addition d'eau distillée, est lyophilisé. Le matériel ainsi obtenu est repris par une solution de mercaptoéthanol à 15% en eau distillée. La réaction dure 72 heures à 30°C sous atmosphère d'azote. Après élimination par centrifugation d'un insoluble, le milieu réactionnel est lyophilisé.

L'étude électrophorétique en gel de polyacrylamide SDS (figure 8) montre essentiellement 3 bandes. Toutefois, de nombreuses bandes mineures sont nettement visibles à l'examen du gel représentant un rendement non négligeable et ne correspondant pas à des points de coupures

PROFIL EN GEL DE POLYACRYLAMIDE SDS
DU CLIVAGE PAR LE BNPS - SKATOLE DE
L'AVS BoTat-1



- 1 Témoin de masse moléculaire
- 2 BoTat-1 réduit alkylé
- 3 BoTat-1 réduit alkylé blanc réaction
- 4 BoTat-1 réduit alkylé traité par le BNPS-Skatoie

Figure 8



spécifiques. Sur la même illustration (figure 8), l'étude d'un blanc réactionnel où seule l'addition du BNPS-Scatole a été supprimée. On reconnaît l'apparition d'un grand nombre de bandes mineures évoquées ci-dessus : résultats de coupures en milieu acide. Parmi les fractions majeures, la première bande de masse moléculaire 64000 correspond très vraisemblablement à la glycoprotéine réduite et S-alkylée non modifiée au cours du traitement (nous avons discuté dans le chapitre ayant trait à la détermination de masse moléculaire de la glycoprotéine que dans les conditions expérimentales retenues, la glycoprotéine réduite et S-alkylée présente un comportement électrophorétique permettant, par le calcul, de lui attribuer une valeur de 64000). Les deux autres bandes sont de masses moléculaires respectives 37000 et 27000.

Cependant, les résultats enregistrés méritent une discussion. La composition en acides aminés de l'AVS BoTat-1 exprimée en moles d'acides aminés par mole de glycoprotéine, fait apparaître l'existence de 2 résidus de tryptophane. Sur ces deux résidus de tryptophane, l'un d'eux se trouve en position N-terminale. Tout clivage à ce niveau ne peut réellement influencer le comportement en gel de la molécule entière et se caractériser par les deux bandes précitées. Aussi, l'existence de deux bandes de masse moléculaire 37000 et 27000 peut justifier les conclusions suivantes :

- les fragments 37000 et 27000 sont bien le fait de coupures spécifiques et, dans ce cas, nous pourrions admettre que l'un d'entre eux correspond à l'extrémité N-terminale de l'AVS amputée ou non de ses 11 premiers résidus ; l'autre bande serait la partie C-terminale de la molécule. La totalisation des 2 masses moléculaires 37000 et 27000 à savoir 64000, correspondrait à la masse de la glycoprotéine réduite et S-alkylée.

- la coupure chimique s'effectue de manière incomplète : le gel de polyacrylamide SDS atteste de l'importance du pourcentage de glycoprotéine non clivée.

- le matériel obtenu, après lyophilisation ultime, présente une coloration jaune prononcée et est très difficilement soluble en milieux aqueux, limitant les possibilités chromatographiques à visée préparative. Toutefois, la différence nette de masse entre glycoprotéine non modifiée et bandes majeures, nous a incités à tenter une chromatographie de gel filtration.

Une colonne de Biogel P100 (1,8 cm/150 cm), équilibrée en acide formique à 9 %, a été retenue. Deux fractions ont été isolées. L'une exclue correspond en électrophorèse en gel de polyacrylamide SDS à 2 bandes de masses moléculaires respectives 64000 (glycoprotéine réduite S-carboxyméthylée non modifiée) et 37000. Quant à la seconde fraction, elle s'individualise par une seule bande de masse moléculaire 27000. Une détermination de séquence sur séquenceur automatique a été réalisée. La fraction exclue de plus haut poids moléculaire, nous a livré, comme nous l'attendions, deux séquences dans des rapports de rendement tels que l'interprétation était possible sans ambiguïté. L'une correspond à la séquence N-terminale de la molécule, l'autre "nouvelle", nous a permis l'identification d'une séquence de 18 amino-acides qui, nous pourrions le vérifier dans la dernière partie de ce mémoire, ne recouvre aucune des séquences des fragments BrCN (Tableau 9). La seconde fraction (27000) s'identifiait en séquence à l'extrémité N-terminale de la molécule amputée ou non de ses 11 premiers résidus.

Par déduction, le fragment 37000 aurait une position C-terminale dans l'AVS.

Au total, la coupure par le BNPS-Scatole s'est montrée décevante. Si elle a permis de situer "en position médiane de l'AVS", le deuxième résidu de tryptophane, elle n'a donné que des rendements extrêmement faibles. Nous pourrions même avancer que ces résultats sont à considérer avec une certaine réserve. Y-a-t-il véritablement coupure spécifique ? Le blanc réactionnel en électrophorèse autorise à le supposer. Les 18 résidus amino-acides positionnés seront utiles dans la reconstitution générale. Ils n'ont pour l'instant que valeur de résultats à mémoriser.

SEQUENCE N-TERMINALE D'UN FRAGMENT OBTENU APRES CLIVAGE AU BNPS SKATOLE DE L'AVS BoTat-1

1 → 10 LEU-ASP-GLY-SER-THR-GLY-GLY-ASN-ASP-ASN -

11 → 20 ALA-LEU-THR-PRO-GLN-VAL-ALA- -GLY-

tableau 9



3) Conclusions générales

De l'ensemble des résultats acquis dans le domaine, soit des coupures par enzymes protéolytiques, soit des coupures par méthodes chimiques, nous retiendrons essentiellement :

- que les coupures enzymatiques lorsqu'elles sont suivies d'effets sur la glycoprotéine native non modifiée, atteignent celle-ci en un point privilégié qui correspond très certainement à une configuration particulière. Toute réduction, toute dénaturation profonde de la molécule, entraîne une augmentation telle des possibilités de coupures, que les fragments obtenus deviennent trop nombreux et de trop faible taille moléculaire pour garder un intérêt dans un protocole visant à l'établissement de la structure primaire de l'axe peptidique de la glycoprotéine.

- que les coupures chimiques se sont avérées d'un intérêt beaucoup plus grand, en particulier le traitement de la glycoprotéine par le BrCN. Dans le cas de notre molécule, en effet, les fragments sont obtenus avec un rendement réactionnel intéressant ; la taille moléculaire des fragments peptidiques ou glycopeptidiques atteste d'une distribution des résidus de méthionine le long de l'axe peptidique. Nous noterons qu'après coupure, les fragments peptidiques ou glycopeptidiques demeurent dans leur ensemble parfaitement solubles en phase aqueuse.

Il en va tout autrement en ce qui concerne la coupure chimique spécifique des résidus de tryptophane. Bien que la position sensiblement médiane du tryptophane dans la molécule soit intéressante, les faibles rendements, les difficultés de solubilisation au cours des expériences préliminaires ci-dessus discutées, ne nous ont pas conduit vers l'utilisation de cette réaction à des fins préparatives.

Ainsi, la stratégie retenue, visant à l'établissement de la structure primaire de l'axe peptidique de l'antigène BoTat-1, correspond à un protocole faisant intervenir réduction et traitement par le bromure de cyanogène :

1. réduction par le mercaptoéthanol
2. alkylation par l'iodoacétamide
3. traitement par le BrCN
4. sous-fractionnement des produits obtenus
5. étude de la composition chimique des fractions
6. étude de la séquence manuelle de l'extrémité N-terminale des fractions retenues
7. passage sur séquenceur automatique et identification des dérivés amino-acides correspondants à chaque cycle de la dégradation chimique.

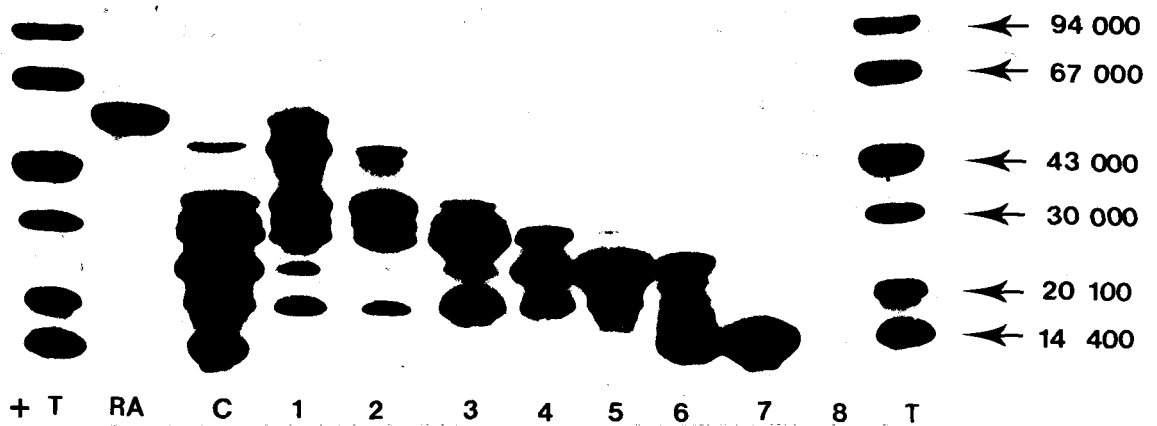
C. TRAITEMENT PAR LE BrCN : ETUDE DES SEQUENCES AMINO-ACIDES DES FRAGMENTS DE NATURE PEPTIDIQUE OU GLYCOPEPTIDIQUE OBTENUS

1) Fractionnement des produits de clivage de l'AVS par le BrCN

En fonction des études préliminaires réalisées sur micro-quantités, il était possible de soumettre une quantité importante de glycoprotéine, de l'ordre de 700 mg, à un traitement par le BrCN, en retenant un protocole identique à celui que nous avons déjà utilisé lors des manipulations tests. Le contrôle par étude électrophorétique en gel de polyacrylamide SDS de la qualité des fragments obtenus, a livré, comme il était attendu, 4 fractions essentielles. Les contrôles sont illustrés figure 9.

Le mélange peptides-glycopeptides, a été soumis à une étape de fractionnement par chromatographie de gel filtration sur une colonne de Biogel P100. La colonne (1,8 cm/150 cm) était équilibrée en acide formique 0,1 N ; l'élution a été réalisée avec un débit de 36 ml/heure. Un échantillon correspondant à 40 mg de glycoprotéine traitée par le BrCN était déposé sur le gel. L'élution était suivie par lecture spectrophotométrique à la longueur d'onde de 230 nm. De plus, des dosages par la réaction à la ninhydrine, et par la réaction à l'orcinol sulfurique, contribuaient à situer le volume d'élution des peptides et des glycopeptides. Le profil d'élution, présenté dans la figure 10, conduisait à dix fractions. Les huit premières fractions ont fait l'objet d'une étude en gel de polyacrylamide SDS (figure 9). A l'observation du gel, la quasi totalité des fractions collectées montrait un caractère très hétérogène.

PROFIL ELECTROPHORETIQUE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE SDS
DES FRACTIONS COLLECTEES PAR CHROMATOGRAPHIE DE GEL
FILTRATION DES PRODUITS OBTENUS PAR TRAITEMENT DE
L'AVS BoTat-1 PAR LE BrCN



T Témoins de masse moléculaire
RA AVS BoTat-1 réduit et alkylé
C Clivage par le BrCN
1 → 8 F₁ à F₈ Biogel P100

FIGURE 9



CHROMATOGRAPHIE DE GEL FILTRATION SUR BIOGEL P100 DES PRODUITS DE CLIVAGE PAR LE

BrCN DE L'AVS BoTat-1

(100 - 200 mesh ; colonne 150 x 1,8 cm ; acide formique 0,1 M)

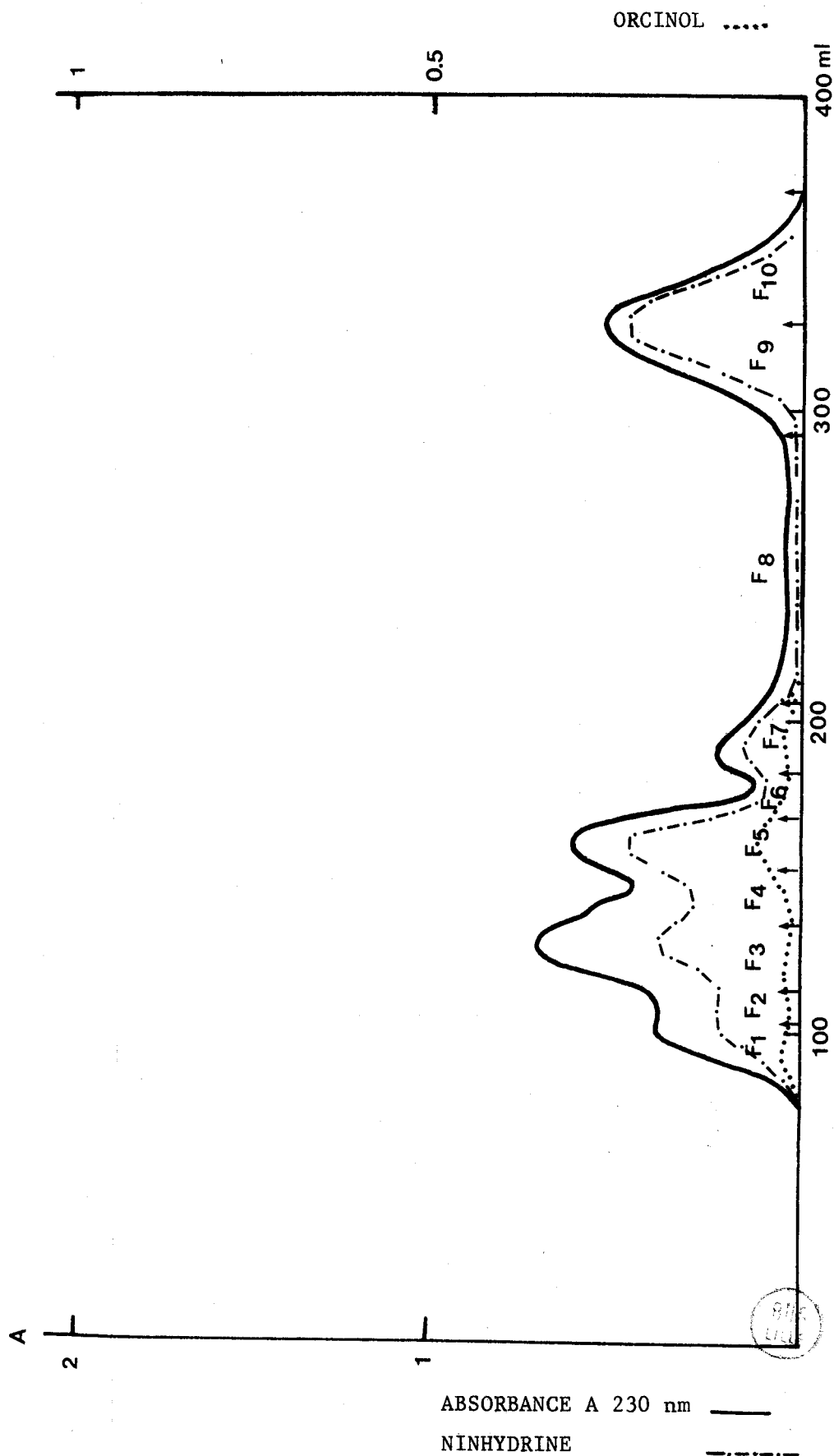


figure 10

Seule la fraction F_7 apparaissait relativement peu contaminée par des composés de faible taille moléculaire dans la mesure où elle se concrétisait par une bande majeure de masse moléculaire apparente 13000. Nous pouvons noter que toutes les fractions depuis F_1 (fraction exclue) à F_6 , contiennent une bande de masse moléculaire approximative 18000. Il est à remarquer également, que si globalement l'élution se réalise en fonction de la masse moléculaire, un certain nombre de structures interagissent au point d'être co-éluées bien que leur taille soit très différente. Ceci peut être observé en particulier pour les fractions F_1 ou F_2 . L'effet de concentration par fractionnement fait apparaître l'importance relative de bandes jusque là peu perçues au niveau du mélange initial. Il s'agit en fait, de l'illustration du rendement relatif de chaque site de coupure théorique, ce qui, bien entendu, mène à l'apparition en quantité faible de séquences recouvrant deux fragments successifs, ou à l'existence de coupures secondes favorisées en milieu acide formique.

Des renseignements appréciables ont pu être apportés par l'utilisation d'une technique d'électrophorèse d'affinité sur gel de polyacrylamide. Cette méthode mise au point par DUVILLIER-HUET (15), est en effet capable, nous l'avons déjà vu sur l'étude du mélange BrCN, à travers l'utilisation de la Concanavaline A, de distinguer des fragments glycosylés. La figure (11) illustre les résultats obtenus lors de l'étude des fractions F_3 , F_5 et F_7 .

Dans le chapitre technique est décrite la méthode, son principe et ses possibilités d'interprétation. Rappelons simplement que le gel intermédiaire contenant la lectine permet la réalisation d'un complexe, au cours de l'électrophorèse, entre l'élément glycosylé et la lectine. Le complexe atteint une taille moléculaire incompatible avec sa pénétration dans le reste du gel.

C'est ainsi que pour F_7 , il est possible de confirmer d'une part le caractère hétérogène de cette fraction, d'autre part, d'affirmer le caractère glycosylé du fragment prépondérant.

Pour F_5 , l'interprétation est identique. La fraction majeure (PM 22000) est glycosylée.

REPRESENTATION DU PROFIL OBTENU PAR ELECTROPHORESE
D'AFFINITE DES FRACTIONS F_3, F_5, F_7 .

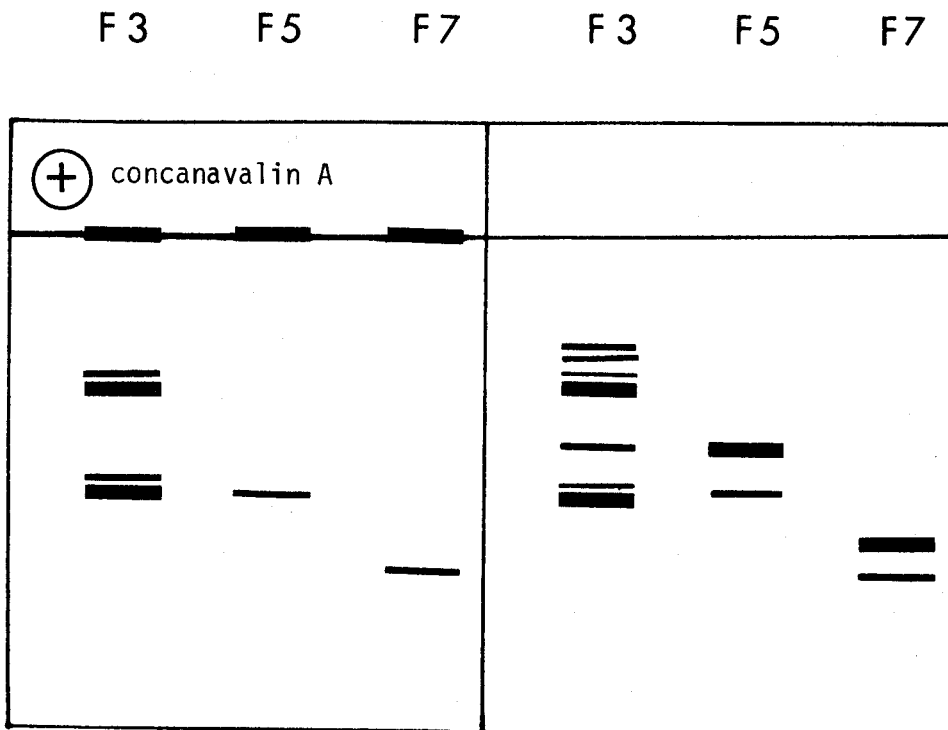


figure 11



Pour F_3 , au contraire, nous pouvons noter l'absence d'affinité pour la Concanavoline A des deux bandes majeures F_{3a} et F_{3b} ; les bandes contaminantes, soit de haute masse moléculaire, soit de taille identique à celle de la bande majeure de F_5 , sont glycosylées. Ces résultats permettent l'observation suivante : la coupure chimique de la glycoprotéine par le BrCN livre 4 fragments essentiels dont 2 sont glycosylés, et 2 ne présentent pas de caractère d'affinité pour la Concanavoline A, ce qui peut éventuellement être interprété comme une absence de glycosylation ou l'existence de structure oligosaccharidiques originales.

2) Composition chimique

a) Composition chimique : acides aminés, sucres.

Les compositions en acides aminés sont présentées Tableau 10. Nous ne discuterons que les résultats concernant les fractions F_3 , F_5 et F_7 . Devant l'hétérogénéité des fractions, les résultats sont exprimés en nombre de résidus pour 100 résidus d'acides aminés dosés. Les éléments caractéristiques, méritant pour F_7 d'être soulignés, peuvent être la richesse en alanine, leucine et acides aminés basiques : lysine et arginine. Pour ce qui est de F_5 , notons l'importance des acides aminés dicarboxyliques, de la lysine et de la S-carboxyméthylcystéine. Quant à F_3 , le seul élément à retenir, est la quantité d'alanine dosée.

Les résultats de détermination de composition en sucre par chromatographie phase gazeuse sont présentés Tableau 11. Ils mettent en évidence au niveau des fractions, l'existence d'un seul type d'hexosamine : la N-acétylglucosamine. Pour ce qui concerne les hexoses, nous retrouvons des résidus de mannose et de galactose. Force nous est de remarquer la présence de faibles quantités de glucose. Cela pose à nouveau le problème de l'existence réelle de glucose au sein de l'antigène ou d'une contamination des fractions au cours de leur purification et de leur traitement.

La très faible quantité de glucose nous oblige avant d'avoir une position définitive, d'attendre la purification de glycopeptides de faible taille contenant du glucose. Ce sera alors le moment de trancher.

Amino * acides	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄	F ₅	F ₆	F ₇	F ₈	F ₉	F ₁₀
ScMC	1,61	0,53	1,26	1,10	2,35	1,85	1,18	-	-	-
ASP	14,21	14,18	14,19	14,82	15,41	13,85	12,71	13,21	8,38	10,06
THR	8,71	8,30	8,71	8,36	8,68	9,05	9,87	7,57	6,89	6,48
SER	6,44	6,76	7,72	6,03	6,24	6,48	7,85	7,95	3,40	7,88
HSE	0,73	0,82	0,91	0,60	0,25	1,10	1,87	1,95	7,76	5,94
GLU	10,78	9,55	9,54	11,40	13,33	10,27	6,93	9,73	7,69	9,33
PRO	2,87	2,83	3,13	2,51	2,74	2,54	3,09	4,04	7,15	5,73
GLY	8,80	8,77	9,38	9,23	8,66	6,58	3,96	7,84	2,99	8,12
ALA	16,59	17,51	17,40	14,71	10,86	15,90	19,37	13,93	19,68	15,62
VAL	2,21	2,52	1,49	2,16	1,54	1,01	1,76	3,82	6,84	5,70
CYS $\frac{1}{2}$	0,21	0,72	0,20	0,72	0,38	0,26	0,10	0,31	-	-
MET	0,06	0,06	0,09	0,05	0,06	0,05	0,05	-	-	-
ILE	2,65	2,61	2,85	2,74	2,47	1,74	0,74	2,71	1,69	2,15
LEU	9,16	11,09	10,74	10,26	9,66	11,63	14,01	10,93	8,08	7,64
TYR	1,58	1,40	1,18	1,64	1,76	1,97	1,65	2,40	5,69	-
PHE	1,71	1,57	1,56	1,50	1,46	1,65	1,40	2,07	-	1,96
LYS	7,83	6,72	5,49	9,00	12,24	10,14	8,00	6,98	12,58	10,26
HIS	0,67	0,67	0,78	0,64	0,34	0,37	0,19	0,74	0,67	0,76
ARG	3,12	3,39	3,39	2,53	1,59	3,57	5,27	3,77	0,50	1,73

* Composition exprimée en résidus pour 100 résidus d'acides aminés dosés.

Tableau 10



COMPOSITION GLUCIDIQUE DES FRACTIONS ISOLEES APRES CLIVAGE PAR LE BrCN DE L'AVS DE BoTat-1

Sucres	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄	F ₅	F ₆	F ₇	F ₈
Mannose	187	133	28	172	* 172	449	* 584	366
Galactose	128	72	17	183	* 200	189	-	116
Glucose	89	5,5	-	-	22	11	11	50
N-acétylglucosamine	27	23	4,5	27	* 50	72	* 131	50

Résultats exprimés en micromoles par gramme de glycoprotéine.

Tableau 11



A l'observation des résultats, un fait majeur est dégagé en comparant la fraction F_7 à la fraction F_5 . La fraction F_7 s'individualise par une copule glucidique ne comportant que des résidus de mannose et de N-acétylglucosamine. Le rapport molaire entre mannose, N-acétylglucosamine, est de 4,5/1, ce qui impliquerait un enchaînement de 9 résidus de mannose pour 2 résidus de N-acétylglucosamine.

Dans le cas de F_5 , la copule glucidique est représentée toujours par de la N-acétylglucosamine, mais aussi par des hexoses, mannose et galactose en quantité sensiblement analogue.

Aussi, à ce stade de notre travail, nous pouvons avancer l'existence d'au moins deux sites différents de glycosylation. Le fractionnement par le BrCN conduit, en effet à :

- 2 fragments non glycosylés de masses moléculaires respectives 29000 et 18000.

- 2 fragments glycosylés de masses moléculaires 22000 et 13000 dont la nature des glycanes est différente, caractérisée ou non par la présence de galactose :

22000 = présence de galactose et de mannose ;

13000 = présence de mannose.

b) Etude des acides aminés en position N-terminale.

Les fractions F_3 , F_5 et F_7 ont été soumises à une dégradation de Edman manuelle. 3 cycles ont été réalisés sur une quantité de matériel très faible, correspondant environ à 100 nanomoles. L'identification des phénylthiodantoïnes (PTH) amino-acides dérivés, a été réalisée à l'aide de la chromatographie liquide haute performance (HPLC) sur colonne microbondapack C18, en gradient acétate/méthanol (les conditions expérimentales précises sont rapportées dans l'appendice technique). Les rendements enregistrés à ce stade autorisaient la détermination simultanée de deux séquences sur appareil automatique Beckman 890C. Cette étude préliminaire nous confirmait l'hétérogénéité des fractions déjà illustrée par étude électrophorétique en gel de polyacrylamide SDS (figure 9), et mettait en évidence l'existence de plusieurs fragments peptidiques dans chaque fraction (Tableau 12).

DETERMINATION PAR DEGRADATION DE EDMAN MANUELLE
DES ACIDES AMINES N-TERMINAUX DE 3 FRACTIONS OBTENUES
APRES CLIVAGE AU BrCN.

Fractions	Cycle 1	Cycle 2	Cycle 3
F ₃	Leu, Thr, Ala	Gln, Thr, Glu	Ala, Gly
F ₅	Pro, Leu	Ile, Gln	Glu, Ala
F ₇	Cys, Thr, Ala	Asp, Thr	Leu, Gly

Tableau 12



c) Détermination des séquences en amino-acides sur séquenceur automatique BECKMAN 890C

En tenant compte des résultats que nous venons d'exposer, à savoir d'une part les résultats de dégradation manuelle de Edman, et d'autre part de l'hétérogénéité observée en électrophorèse en gel de polyacrylamide SDS, nous avons entrepris une dégradation de Edman automatique, sur séquenceur Beckman, des 3 fractions F_3 , F_5 et F_7 BrCN. Notre hypothèse était fondée sur la possibilité de pouvoir séquencer simultanément 2 protéines différentes.

L'apport irremplaçable de la chromatographie liquide haute performance et surtout la possibilité par cette méthodologie de quantifier chaque cycle de dégradation rendaient ce projet possible. Sur le plan technique, nous avons présenté, dans le chapitre méthodologie les différentes étapes de la dégradation de Edman automatique et de l'identification des PTH amino-acides dérivés, obtenus à chaque cycle.

Deux systèmes tampons ont été utilisés dans ce travail : le système quadrol et le système DMAA. Le choix de l'une ou l'autre des conditions relevait soit de la taille moléculaire des fragments, soit de leur charge ou de leur caractère hydrophobe relatif.

* Séquence N-terminale du fragment F_3 obtenu après clivage au BrCN de l'AVS BoTat-1.

La fraction F_3 , dont nous savons à travers l'étude en gel de polyacrylamide SDS qu'elle correspond à 2 bandes de caractère essentiellement protéique de taille moléculaire relative 29000 et 18000, a été reprise en tampon quadrol. 30 cycles de dégradation de Edman ont conduit à l'établissement de 2 séquences, dont les résultats sont rapportés (Tableau 13). Pour la simplicité de la présentation, nous n'avons pas fait figurer le rendement à chaque cycle en PTH amino-acides dérivés, signalons que la séquence peptidique dominante possédait un rendement double de la seconde.

« Séquence N-terminale du fragment F3 obtenu après
clivage au BrCN de l'AVS BoTat-1 »

1-10 LEU-GLN-ALA-ASN-LEU-ASN-PHE-TYR-THR-GLY-
thr- thr- gly- gly- pro- ser- ala- leu- ala- ala-
11-20 THR-GLY-THR-ALA-ARG-GLU-VAL-GLN-ALA-ALA-
ala- gly- ala- thr- pro- ser- cys? ala- ala- asn-
21-30 ARG-SER-GLY-GLY-ARG-LEU-GLN-GLY-ALA-LEU-
asp- asp- asn- phe- lys- ala- ala- ala- arg- arg-

Tableau 13



Nous ajouterons que ces résultats, avancés après double identification en HPLC (colonnes micro-Bondapack C18 ou micro-Bondapack CN), ont parfois dû être confirmés par chromatographie en phase gazeuse ; ceci est particulièrement vrai pour distinguer la PTH-méthionine de la PTH-valine et aussi la PTH-phénylalanine de la PTH-isoleucine. De plus, la glycoprotéine avant son fractionnement par le BrCN, ayant fait l'objet d'une réduction par le 2-mercaptoéthanol suivie d'une S-carboxyméthylation, c'est sous forme S-carboxamidométhyl dérivé qu'a été recherchée la PTH cystéine.

A l'examen des 2 séquences de 30 amino-acides (Tableau 13), nous pouvons observer l'existence de toute une série de doublets d'acides, voire de triplets impliquant des résidus d'acide aspartique ou d'asparagine et des résidus d'alanine.

* Séquence N-terminale du fragment F_5 obtenu après clivage au BrCN de l'AVS de BoTat-1.

Comme dans le cas du fragment F_3 , le fragment F_5 a été soumis à une détermination de séquence automatique. Nous savions que deux séquences pouvaient être attendues ; elles ont été retrouvées (Tableau 14).

La première majeure, a pu être menée et interprétée jusqu'au 60ème cycle. La seconde n'était plus interprétable au delà du 23ème cycle. Il était intéressant de reconnaître dans cette séquence mineure, la séquence majeure de F_3 (comparer avec le Tableau 13). Toutefois, le faible rendement de cette séquence mineure nous incitait à une grande prudence d'interprétation.

Nous rapportons (Tableau 14) les résultats tels qu'ils ont été établis sans connaître les résultats de la séquence issue de F_3 . Toute une série d'acides apparaissent différents, en particulier entre les résidus en positions 15, 16 et 17, les résidus en position 2 (confusion glutamique, glutamine), et en position 5 (confusion leucine, lysine). Ces observations nous mènent à la nécessité de toujours confirmer les séquences par 2 manipulations différentes, utilisant ou non le même tampon et de n'interpréter que des résultats dont la quantification en PTH amino-acides dérivés est du domaine interprétatif, c'est à dire, supérieur à un rendement de 5 nanomoles du PTH amino-acide dérivé.

« Séquence N-terminale du fragment F5 obtenu après
clivage au BrCN de l'AVS BoTat-1 »

1-10 PRO-ILE-GLU-GLY-ILE-LEU-LYS-ASN-SER-PRO-
leu - glu - ala - asn - lys - asn - phe - tyr - thr - gly -
11-20 ASN-LEU-LYS-LYS-LEU-GLY-ASP-MET-THR-ASP-
thr - gly - thr - ala - gln - gln - met - gln - ala - ala -
21-30 ILE-ASN-GLN-LEU-LEU-GLU-LEU-TYR-PHE-TYR-
glu - ser - gly -
31-40 TYR-SER-LYS-LEU-ASN-LYS-GLN-GLN-LEU-GLN-
41-50 GLU-ALA-ALA-LYS-LYS-LEU-GLN-asp? LEU-ILE-
51-60 THR-LYS-ALA-GLY-THR-asp?ser? ALA-ALA-ASP-

* Séquence N-terminale du fragment F_7 obtenu après clivage au BrCN de l'AVS BoTat-1

Là encore, 2 séquences ont été réalisées en simultané (Tableau 15). La séquence mineure nous était connue. Elle était déjà la séquence mineure établie à partir du fragment F_3 .

Pour ce qui est de l'axe peptidique majeur inconnu jusque là, 40 résidus d'acides-amino ont pu être alignés ; l'interprétation devient délicate au-delà. L'étude en détail de cette séquence N-terminale fut immédiatement d'un grand intérêt dans la mesure où elle était totalement superposable à une séquence connue très proche de l'extrémité N-terminale de la glycoprotéine native. En effet, l'enchaînement CYS-ASP-LEU-SER... correspondait aux acides-amino en position 15, 16, 17, 18 de l'AVS natif. Ainsi, le fragment F_7 BrCN se trouvait positionné et identifié dans la glycoprotéine au quart N-terminal de l'AVS. Cette fraction glycoprotéique "riche en mannose", s'individualise du reste de la copule glucidique de la molécule et caractérise son extrémité N-terminale.

En conclusion de cette étude, en séquence automatique, de fractions correspondant à des mélanges d'éléments peptidiques ou glycopeptidiques, nous retiendrons :

- qu'il a été possible d'établir un enchaînement peptidique de près de 150 résidus au total, soit près du tiers de la glycoprotéine ;

- que nous avons identifié et positionné le fragment F_7 dans le quart N-terminal de la molécule et pu montrer ainsi que la copule glucidique devait être répartie en, au moins, 2 endroits de la molécule, le site de glycosylation oligomannosidique se trouvant proche de l'extrémité N-terminale ;

- qu'enfin, nous n'avons pas pu mettre en évidence de répétitions de séquence, mais par contre toute une série de doublets voire de triplets acides-amino portant en particulier sur les acides-amino dominants dans la composition chimique de la glycoprotéine. Ceci pourrait représenter un premier élément d'explication à la relative "constance" de la définition globale en acides-amino des différents AVS à côté de leur variabilité extrême dans la séquence.

« Séquence N-terminale du fragment F7 obtenu après clivage au BrCN de l'AVS BoTat-1 »

1-10 CYS-ASP-LEU-SER-ASN-ASP-GLY-ASN-LEU-LEU-
thr- thr- gly- gly- pro- ser- ala- leu- ala- ala-
11-20 ALA-GLN-ARG-ALA-ALA-SER-ARG-LEU-LYS-ALA-
thr- gly- ala- thr? pro- tyr? -ala- ala- asn-
21-30 PRO-ALA-THR-THR-ALA-LEU-LYS-ASP-THR-LYS-
asp- asp- asn- phe- lys- lys- ala? ala- gln- gln-
31-40 THR-LEU-LEU-LYS-ALA-LEU- -PHE-LEU-GLU-
tyr- ala? glu? gly? leu? -pro- asp- asp- asn-
41-50 SER-ALA-gln- ser? thr- leu- glu- glu- ala- ala-
lys? gln? asp?

- 70 -



3) Etude particulière de la fraction F₇ BrCN

Dans les paragraphes précédents, nous avons déjà évoqué cette fraction chromatographique qui, obtenue par gel filtration sur biogel P100, correspond à deux fragments de l'axe peptidique de la glycoprotéine BoTat-1. Le premier fragment majeur en ce qui concerne son rendement au cours de la dégradation de Edman automatique, s'est vu positionné dans la région toute N-terminale de la glycoprotéine native. Quant au fragment mineur, sa séquence avait déjà été perçue lors de l'étude de la fraction F₃ BrCN.

Outre sa position N-terminale, la fraction majeure de F₇ a retenu notre intérêt dans la mesure où son affinité très forte pour la Concanavaline A suggère une richesse en résidus de mannose déjà démontré par le dosage.

L'intérêt d'une étude particulière de la séquence de F₇ BrCN résidait avant tout dans le positionnement définitif du premier site de glycosylation.

Ne disposant que de 40 mg pour effectuer cette détermination, il s'avèrait de prime abord, impossible d'envisager, après coupures chimiques ou enzymatiques, un quelconque fractionnement. Chaque dépôt en coupelle, sur séquenceur réclamant de l'ordre de 10 à 15 mg, soit environ 500 nanomoles de matériel, nous avons préféré utiliser une stratégie combinant le blocage N-terminal du glycopeptide initial associé à une coupure spécifique. L'ensemble du mélange correspondant à une prise d'essais de 15 mg était directement déposé en coupelle.

a) Coupure enzymatique spécifique au niveau des résidus d'arginine

* Raison du choix de la protéase retenue.

La fraction F₇ BrCN est tout d'abord soumise à une succinylation dans le but de bloquer la fonction NH₂ terminale du résidu de cystéine et du résidu de thréonine, représentant l'acide aminé en position N-terminale des deux fragments majeur et mineur. Au cours de cette manipulation, l'ensemble des résidus de lysine seront substitués et identifiés au cours de la séquence sous la forme de PTH succinyl-lysine.

Partant de la composition en amino-acides de F_7 BrCN, c'est à dire de celle d'un mélange d'un glycopeptide et d'un peptide, il nous était possible de concevoir l'hypothèse que le glycopeptide F_7 possédait de 3 à 4 résidus d'arginine. A partir des résultats de la séquence F_7 BrCN globale, sur ces 4 résidus arginine, 2 résidus étaient déjà positionnés, l'un en position 13, l'autre en position 17 (Tableau 15). De la position 17 à la position 42, aucun résidu arginine n'avait été identifié, aussi nous décidions de faire appel à la protéase de glandes sous-maxillaires de Souris, dont la spécificité absolue est de cliver les liaisons peptidiques intéressant les seuls résidus d'arginine, et de laisser l'arginine en position C-terminale (LEVY) (1970) (43).

Il est à noter que l'emploi de cet enzyme spécifique des résidus d'arginine, pouvait paraître superflu, dans la mesure où l'action de la trypsine sur le glycopeptide succinylé devait avoir le même effet. Des expériences préliminaires, non rapportées dans ce mémoire, nous ont indiqué :

- que les coupures tryptiques au niveau de l'arginine étaient obtenues avec un rendement très faible dans les conditions classiques d'emploi de l'enzyme (tampon bicarbonate d'ammonium 0,01 M pH 8,5).

- que des coupures secondes pouvaient l'emporter sur la coupure primaire en fonction du fait que la trypsine devait alors être utilisée avec un rapport enzyme/substrat important, pendant un temps d'incubation relativement prolongé.

C'est donc en fonction de ce constat, et pour éviter toute perte de matériel, que notre choix s'est porté vers l'enzyme purifié à partir de glandes sous-maxillaires de Souris. Il faut dire aussi que la succinylation du glycopeptide améliorait le rendement, l'action de cette protéase sur notre substrat. Le changement relatif de polarité du glycopeptide doit entraîner en effet une modification de configuration autorisant une meilleure approche de l'enzyme.

* Conditions expérimentales

10 mg de F₇ BrCN préalablement succinylé, selon un protocole décrit dans l'appendice technique, sont ensuite soumis à une dialyse contre le tampon N-méthylmorpholine 0,1 M de pH 8,0. Après vérification du pH et incubation préalable 10 mn à 37°C, la solution enzymatique est ajoutée en quantité telle que le rapport enzyme/substrat soit de 1/50ème. L'ensemble est incubé au bain marie 1 h à 37°C. En fin d'hydrolyse, l'action enzymatique est interrompue par addition de quelques gouttes d'acide acétique 1 N. Le protéolysat est immédiatement congelé et soumis à une lyophilisation.

* Détermination de la séquence en amino-acides du protéolysat sur séquenceur automatique.

Le matériel lyophilisé correspondant à environ 500 nanomoles de départ est repris dans 300 µl d'eau distillée. Le tube est rincé par 2 fois 100 µl d'acide formique à 10%. Le tout est déposé dans la coupelle. Le programme retenu était le programme DMAA-polybrène GLY-GLY dont nous avons donné une description précise dans l'appendice technique.

Les résultats obtenus montrent l'existence d'une seule séquence en amino-acides commençant par l'enchaînement alanine, sérine, arginine, leucine, lysine. Il apparaît que l'arginine en position 17 n'a pas subi l'attaque de la protéase sous-maxillaire de Souris. Cette constatation d'ailleurs favorable dans notre processus expérimental peut être expliquée en fonction de la proximité d'un résidu de lysine (lysine en position 19) qui, succinylé, a pu représenter une cause d'empêchement stérique à l'action enzymatique.

La séquence établie est rapportée (Tableau 16). Elle confirme les résultats antérieurs depuis l'arginine 13 jusqu'à l'alanine en position 42 et permet de préciser la séquence plus avant. On note l'allongement de la séquence représentée par l'enchaînement GLN-SER-THR-LEU-GLU-GLU-ALA-ALA. Nous avons observé qu'au delà de la dernière alanine, les rendements s'effrondraient brutalement et ne permettaient plus d'interprétation, même de première approximation. L'éventualité de la proximité d'un site de glycosylation était évoquée. Nous savons que cette proximité est un obstacle majeur pour les déterminations de structure primaire des glycoprotéines.

Séquence N terminale obtenue après clivage par la protéase de glande
sous-maxillaire de souris du fragment F₇ BRCN de l'AVS BoTaT 1

*	11 — 20	ALA-ALA-SER-ARG-LEU-LYS-ALA-
21 — 30	PRO-ALA-THR-THR-ALA-LEU-LYS-ASP-THR-LYS-	
31 — 40	THR-LEU-LEU-LYS-ALA-LEU-	-PHE-LEU-GLU-
41 — 50	SER-ALA- GLN-SER-THR-LEU-GLU-GLU-ALA-ALA-	



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50

* La numérotation est à compter du N terminal du fragment majeur de F₇ BRCN

La connaissance des 50 premiers résidus du glycopeptide F₇ BrCN sur un axe peptidique dont la longueur était estimée par calcul à approximativement 80 à 85 résidus pouvait être à nouveau une base de raisonnement pour définir une nouvelle approche enzymatique ou chimique.

- b) Coupure enzymatique spécifique au niveau des résidus d'acide glutamique.

* Raison du choix de l'enzyme

De l'ensemble des résultats acquis et en particulier la séquence déjà établie, nous pouvions retenir que le glycopeptide ne comportait aucun résidu d'acide glutamique avant le résidu en position 40 : séquence Phe-Leu-Glu-Ser-Ala-Glu... Une accumulation d'acide glutamique en position 47 et 48 caractérisait la partie terminale de la séquence établie après clivage de F₇ par l'enzyme sous-maxillaire de Souris (Tableau 16) ; aussi avons nous envisagé le protocole suivant :

- succinylation de la fraction F₇ BrCN, donc blocage des amino-acides N-terminaux des deux fragments et modification des résidus de lysine.

- incubation de F₇ BrCN en présence de l'enzyme de Staphylococcus aureus, dont la spécificité est très étroite, puisque seules sont affectées dans les conditions utilisées les liaisons peptidiques impliquant un résidu d'acide glutamique qui, après clivage, demeure en position C-terminale (HOUMARD) (1972) (33).

Ainsi, en utilisant ce protocole, nous pouvions attendre des coupures entre GLU 40 et SER 41, entre GLU 47 et GLU 48, entre GLU 48 et ALA 49.

Si les coupures par l'enzyme devaient se produire avec un rendement satisfaisant, l'intérêt serait alors :

- de pouvoir confirmer les résultats antérieurs à savoir la séquence SER-ALA-GLU-SER-THR-LEU-GLU.

- de pouvoir définir la séquence du glycopeptide après les résidus alanine 49 et 50 devenus les deux premiers amino-acides en position N-terminale du fragment glycosylé résiduel.

* Conditions expérimentales.

10 mg de F₇ BrCN préalablement succinylé selon un protocole décrit dans l'appendice technique sont soumis ici à une dialyse contre le tampon acétate d'ammonium 0,05 M pH 4,0. Après vérification du pH et incubation préalable 10 mn à 37°C, la solution enzymatique est ajoutée en quantité telle que le rapport enzyme/substrat est de 4/100ème. L'ensemble est incubé au bain marie 1 h à 37°C. En fin d'hydrolyse, l'action enzymatique est stoppée par addition de quelques gouttes d'acide acétique 1 N. Le protéolysat est immédiatement congelé et soumis à lyophilisation.

* Séquence amino-acides du protéolysat sur séquenceur automatique.

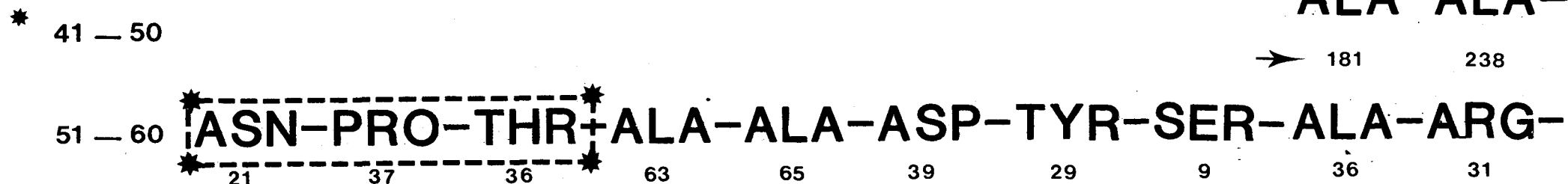
Après clivage par la protéase de Staphylococcus aureus, le mélange peptides-glycopeptides est soumis à une détermination de séquence sur séquenceur automatique. Le programme retenu était le programme DMAA-polybrène GLY-GLY. Le dépôt en coupelle s'est effectué après reprise du protéolysat par 300 µl d'eau distillée, suivie de 2 reprises par 100 µl d'acide formique à 10%. Nous avons rapporté les résultats obtenus (Tableau 17) en faisant figurer le rendement à chaque cycle en nanomoles de PTH amino-acides. A l'examen de ces valeurs, nous pouvons avancer les remarques suivantes :

- pour un dépôt correspondant globalement de 400 à 500 nanomoles, 181 nanomoles d'alanine sont quantifiées au 1er cycle. En fonction des rendements réactionnels, l'alanine se retrouve au 2ème cycle à 238 nanomoles. La séquence majeure attendue ALA (49) ALA (50) est donc confirmée.

- le 2ème fragment attendu correspondant à la séquence SER-ALA-GLN... est également perçu, 24 nanomoles de sérine au 1er cycle, puis alanine confondue avec le rendement réactionnel de l'autre fragment au 2ème cycle, puis glutamine retrouvée à 33 nanomoles, associé à PTH-glutamique comme il est normal à 11 nanomoles.

Séquence N terminale obtenue après clivage par la protéase de staphylococcus aureus
du fragment F₇ BrCN de l'AVS BoTaT 1

Séquence majeure



→ nombre de nmoles de PTH-AA

Séquence mineure



* La numérotation est à compter du N terminal du fragment majeur de F₇ BrCN

Tableau 17

L'hypothèse expérimentale se trouvait confirmée : les deux fragments sont co-séquencés avec un rendement dominant ALA-ALA... et l'autre avec un rendement du quart environ, identifié à la séquence attendue SER-ALA-GLN-SER-THR...

Si nous nous attachons à la séquence encore inconnue prolongeant les acides aminés alanine en position 49 et 50, nous pouvons constater deux faits :

- une chute de rendement considérable, de l'ordre de 90 % au 3ème cycle : PTH asparagine est retrouvée à raison de 22 nanomoles. Cette chute de rendement est interprétée comme une preuve indirecte de l'existence, à ce cycle, d'un site de glycosylation.

- un hydroxy amino-acide en position 53 : l'hypothèse de glycosylation se trouvait confirmée par la mise en évidence en position 53 de PTH thréonine avec un rendement indiscutable atteignant 36 nanomoles. Ce protocole permettait une interprétation jusqu'au résidu d'arginine en position 60.

c) Conclusions

Le protocole expérimental suivi a permis en trois déterminations automatiques de séquences d'établir de manière quasi définitive, la structure primaire de la presque totalité de F_7 BrCN.

L'intérêt de cette étude structurale tenait, à deux faits :

- * la position N-terminale du glycopeptide au sein de la molécule native,
- * son caractère glycosylé particulier, définissant un des types de glycanne de BoTat-1.

En position 51 est affirmée l'existence d'un glycanne uniquement représenté par des résidus de mannose dans un rapport 9/2 par rapport aux résidus de N-acétylglucosamine. Un glycanne de type oligomannosidique pourrait être envisagé. Ces évocations n'ont que valeur d'hypothèse ; nous nous proposons de définir cet oligosaccharide N-terminal à partir de nouvelles préparations qui seraient alors soumises à méthylation.

Un dernier point se doit d'être souligné. Il s'agit de l'identification en position 52 d'un résidu de proline. Il est une notion "classique" de vouloir exclure toute possibilité de glycosylation d'un résidu asparagine lorsqu'une proline se trouve située entre l'asparagine et l'hydroxyl-amino-acide en position du côté C-terminal. Nous avons vérifié sur le diagramme HPLC le temps de rétention du PTH amino-acide dérivé correspondant au cycle 52. Les conclusions sont formelles. Le temps de rétention est bien celui du PTH proline injecté dans le mélange standard. Bien évidemment, cette preuve n'est pas absolue pour affirmer définitivement la proline ; bien qu'une très forte probabilité existe, il nous sera nécessaire de préparer les "glycopeptides" minimum autour du site de glycosylation. Une simple composition en acides aminés devrait alors être déterminante.

DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION

Les données de la littérature, les résultats acquis en particulier à travers les déterminations de taille moléculaire des fragments obtenus par clivage au BrCN associés aux résultats de séquence, nous autorisent, en cette fin de rédaction de mémoire, à résumer notre connaissance sous la forme de 2 hypothèses de reconstitution de la glycoprotéine spécifique du variant BoTat-1. Ces deux hypothèses de reconstitution sont présentées figure 12 et figure 13. Elles apparaissent fondées dans la mesure où est définitivement établie la structure primaire du quart N-terminal de la glycoprotéine (Tableau 18). De plus, elles peuvent être établies si nous nous référons aux travaux du groupe de CROSS (HOLDER) (1981) (31), qui s'est beaucoup plus intéressé à partir d'AVS de Trypanosoma brucei à l'extrémité C-terminale de ces molécules. Ce groupe a pu démontrer en particulier, aussi bien par la séquence du DNA que par la séquence en amino-acides, l'existence de sites de glycosylation dans la partie extrême C-terminale de la molécule.

Quant à nous, si la moitié du matériel glucidique est positionné dans le quart N-terminal de la molécule, le reste du matériel glycosylé (F_5 -BrCN), pourrait représenter l'extrémité C-terminale de la molécule. Nous pourrions en déduire que les deux derniers fragments BrCN de poids moléculaires respectifs 18000 et 29000 dont nous savons qu'ils ne sont pas glycosylés, seraient de situation intermédiaire, c'est à dire, définiraient la partie "centrale" de la molécule. Si cette idée de reconstitution nous apparaît logique, nous ne pouvons toutefois éliminer totalement l'existence éventuelle de sites de glycosylation particuliers localisés le long de l'axe peptidique. Ces glycannes qui n'auraient pas d'affinité pour la Concanavaline A pourraient être représentés par un mono sucre ou un disaccharide branché sur des résidus amino-acides autre que l'asparagine. Ils définissent des structures nouvelles non encore du domaine du "classique". La connaissance des structures glycosylées chez les protozoaires est encore fort mal connue.

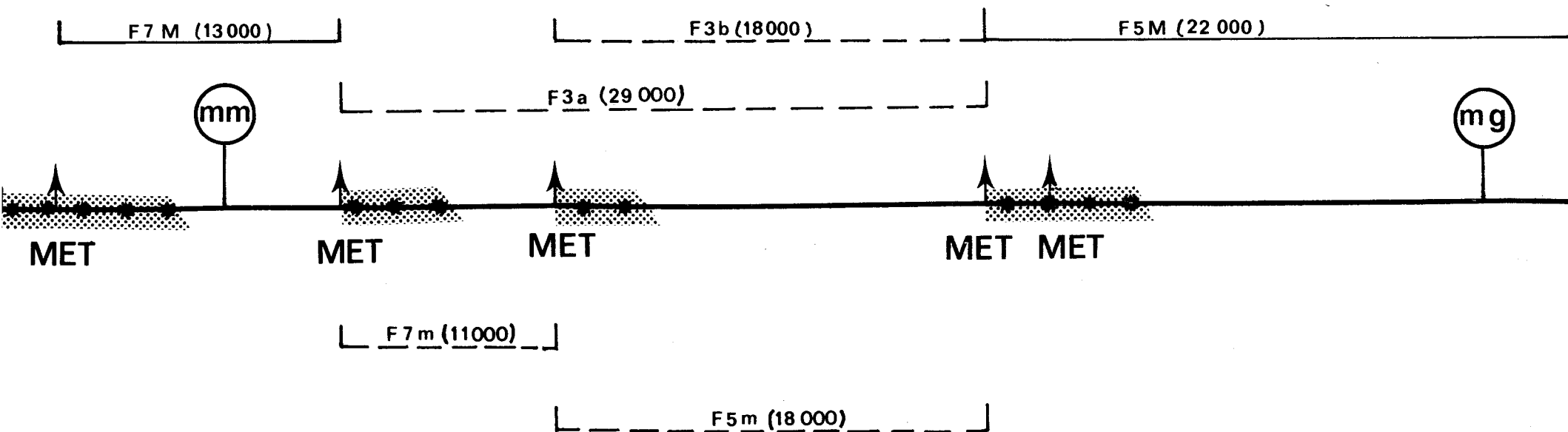


Schéma de l'AVS BoTaL-1

Localisation des fragments BrCN (tailles moléculaires apparentes déterminées par électrophorèse en gel de polyacrylamide)

(a) F_3 fragment 29000 (b) F_3 fragment 18000

(M) fragment majeur (m) fragment mineur

• . Séquence amino-acide connue

— . fragments interagissant avec la concanavaline A

- - - fragments n'interagissant pas avec la concanavaline A

figure 12

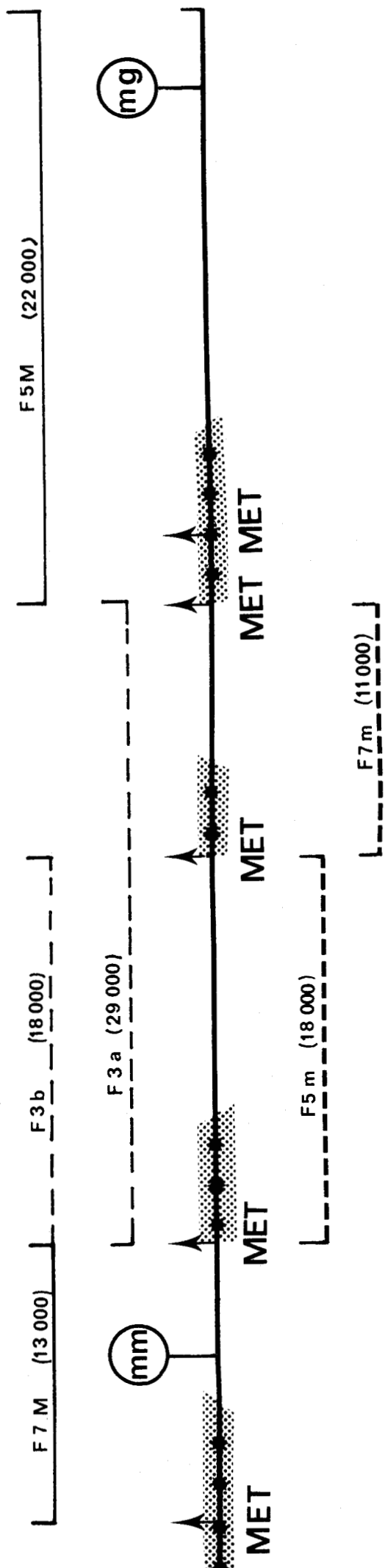


Schéma de l'AVS BoTat-1

Localisation des fragments BrCN (tailles moléculaires apparentes déterminées par électrophorèse en gel de polyacrylamide)

(a) F₃ fragment 29000 (b) F₃ fragment 18000

(M) fragment majeur (m) fragment mineur

■ . Séquence amino-acide connue

— . fragments interagissant avec la concanaviline A

- - - . fragments n'interagissant pas avec la concanaviline A

« Séquence N-terminale de l'AVS BoTat-1 »

1 → 10 ALA-VAL-ALA-ASN-PRO-LEU-LYS-LYS-THR-TYR-
11 → 20 TRP-GLU-ALA-MET-CYS-ASP-LEU-SER-ASN-ASP-
21 → 30 GLY-ASN-LEU-LEU-ALA-GLN-ARG-ALA-ALA-SER-
31 → 40 ARG-LEU-LYS-ALA-PRO-ALA-THR-THR-ALA-LEU-
41 → 50 LYS-ASP-THR-LYS-THR-LEU-LEU-LYS-ALA-LEU-
51 → 60 -PHE-LEU-GLU-SER-ALA-GLN-SER-THR-LEU-
61 → 70 GLU-GLU-ALA-ALA-ASN^{*}-PRO-THR-ALA-ALA-ASP-
71 → 80 TYR-SER-ALA-ARG-

Tableau 18



Notre intérêt pour ce sujet tel que nous l'avons évoqué en commençant cette rédaction, était de pouvoir mieux définir le ou les sites antigéniques caractérisant BoTat-1. Il apparaît maintenant qu'après purification, les différents fragments dont nous avons appris à connaître la structure primaire dans leur région N-terminale, pourront être fort utile pour :

- préciser l'existence d'un ou plusieurs sites antigéniques,
- affirmer ou infirmer le rôle du ou des types de glycanes dans ces mêmes sites antigéniques,
- mieux cerner la notion sites "communs" à différents antigènes spécifiques de variants.

La possibilité offerte par la préparation d'anticorps monoclonaux sera très certainement à utiliser dans l'avenir. Elle pourrait permettre le repérage des sites communs dont l'utilisation à des fins diagnostiques ou thérapeutiques est évidente.

Le dernier aspect que nous voudrions souligner, a trait au mécanisme biologique de la parasitologie parasitaire.

En quoi, comment ce parasite peut-il pénétrer une cellule et matérialiser ainsi son rôle pathogène ?

Les travaux récents de HENRIQUEZ et coll. (1981) (25), s'intéressent à cet aspect des choses. Si dans un milieu le parasite est mis en présence d'une cellule réceptrice, son "accrochage" à la membrane de cette cellule hôte, précède la pénétration. La notion de sites récepteurs est maintenant établie. Ces auteurs démontraient d'ailleurs la nature glycoprotéique du récepteur cellulaire, mais dans leur travail, bien que ne le discutant pas, une manipulation s'avérait à nos yeux, d'un intérêt majeur. En effet, l'enrichissement du milieu en alpha-méthyl mannoside inhibait l'attachement, donc la pénétration du parasite. Ainsi, la glycoprotéine de surface du trypanosome, l'AVS, pourrait avoir comme rôle, par l'intermédiaire de ces glycanes, de permettre l'accrochage. Notre travail s'inscrit dans cette hypothèse. Comme d'autres glycoprotéines

membranaires, cette structure est enfouie dans la membrane par son extrémité C-terminale, seule l'extrémité N-terminale se trouve en extrême périphérie du manteau. Nous avons démontré l'existence au niveau de l'AVS BoTat-1, que le quart N-terminal était porteur d'un glycanne riche en mannose. Le rapprochement avec le travail cité plus haut, permettrait d'énoncer la proposition suivante : "sur le plan physiologique, l'AVS serait un moyen d'ancrage pour pénétrer les cellules réceptrices". Les aspects de configuration tridimensionnelle, de variations de structure quant à la séquence, quant à la position extériorisée ou non du glycanne N-terminal, illustreraient la notion de pouvoir infestant dont il a été démontré la variabilité aussi au cours de la variation antigénique.

Le concept thérapeutique vis à vis de la trypanosomiase peut donc évoluer : "l'anticorps" à préparer par vaccination, ou à présenter par sérothérapie, se devrait de reconnaître le glycanne. L'enveloppement du glycanne par cette molécule viendrait bloquer le processus infestant de pénétration cellulaire.

APPENDICE TECHNIQUE

TABLE DES MATIERES
DE L'APPENDICE TECHNIQUE

*
* *

A - <u>METHODES PHYSIQUES D'ETUDE DES PROTEINES ET GLYCOPROTEINES</u>	88
I - ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE SDS	88
II - DETERMINATION DES POINTS ISOELECTRIQUES	92
III - ELECTROPHORESE D'AFFINITE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE	95
IV - ETUDE PAR DICHROISME CIRCULAIRE	97
B - <u>METHODES CHIMIQUES D'ETUDE DES PROTEINES ET GLYCOPROTEINES</u>	
I - COMPOSITION CHIMIQUE	100
1) Méthodes d'étude des acides aminés	100
* Méthode automatique de dosage des acides aminés ou des peptides par réaction à la ninhydrine	100
* Analyse des acides aminés sur autoanalyseur	101
* Dosage du tryptophane	102
* Dosage de la cystéine sous forme d'acide cystéique après oxydation performique	103
* Analyse des acides aminés dicarboxyliques amidifiés	103

2) Méthode d'étude des sucres	104
* Dosage des oses combinés à l'orcinol	104
* Détermination de la composition glucidique	105
 II - MODIFICATIONS CHIMIQUES	 105
1) Réduction et alkylation	105
2) Succinylation	106
3) Coupure chimique par le bromure de cyanogène	108
4) Coupure chimique par le BNPS-Scatole	108
 III - CONDITIONS D'UTILISATION DES DIFFERENTS ENZYMES PROTEOLYTIQUES	 108
 IV - DETERMINATION DES SEQUENCES EN AMINO-ACIDES	 110
1) Dégradation manuelle de Edman	110
2) Dégradation automatique de Edman	112
3) Identification des PTH amino-acides dérivés	117

A. METHODES PHYSIQUES D'ETUDE DES PROTEINES OU GLYCOPROTEINES

I - ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE EN PRESENCE DE SDS

1) Principe

Le dodécyl sulfate de sodium (SDS), possède la propriété de se fixer sur l'enchaînement peptidique d'une protéine lui conférant des charges négatives en nombre tel que les critères de migration électrophorétique ne dépendent plus que de la longueur de l'axe peptidique de la protéine.

Dans des conditions expérimentales données, en faisant référence à un mélange standard de protéines de masses moléculaires connues, il devient possible de déterminer la taille d'une protéine ou d'un peptide.

Cette technique possède des limites d'utilisation et d'interprétation :

- les conditions expérimentales doivent être adaptées au cas étudié ; par exemple gel choisi en fonction de la valeur suspectée de masse moléculaire de l'échantillon.
- interprétation difficile lors de l'étude de glycoprotéines ou de glycopeptides, la copule glycannique venant modifier le comportement dans le gel de l'hétéroprotéine au cours de sa migration.
- la nécessité dans le choix des tampons retenus de réunir des conditions permettant d'éviter la formation d'agrégat de l'échantillon créant ainsi des "polymères" artificiels.

2) Technique

Nous avons utilisé la technique préconisée par LAEMMLI (1970) (40). L'appareillage retenu est l'ensemble alimentation stabilisée 2197, chambre de migration verticale 2001 fourni par la société LKB. Un gel à

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

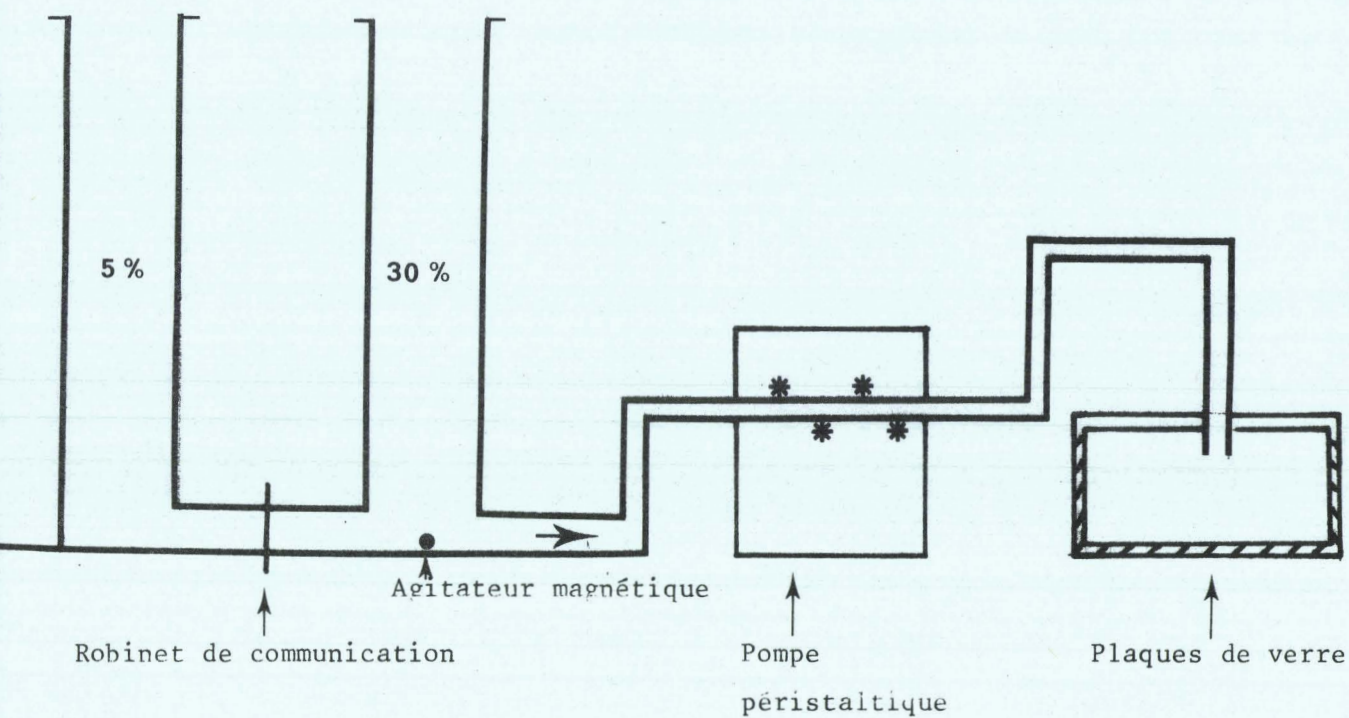


figure 14



gradient d'acrylamide 5 à 30% de 1,5 mm d'épaisseur est coulé entre deux plaques de verre à l'aide de l'appareil schématisé figure 14. Un gel supérieur à 5% d'acrylamide dans lequel sont obtenus, au moyen d'un peigne en plastique, des compartiments permettant le dépôt des échantillons, est coulé après gélification du premier.

Les dépôts sont effectués sous un volume de 5 à 10 μ l. L'électrophorèse est réalisée sous une intensité constante de 30 milliam-pères. La durée de migration, qui le plus généralement correspond à 3 heures, est appréciée à l'aide d'un indicateur de migration colorée, le bleu de bromophénol.

Le gel après migration est immergé 16 heures dans une solution colorante de bleu Coomassie. L'étape de décoloration s'effectue pendant 48 à 72 heures en présence d'eau-méthanol-acide acétique.

3) Réactifs

* Solution mère d'acrylamide : A

acrylamide 48 g

N-N'méthylènebisacrylamide 1, 28 g

eau distillée q.s.p. 100 ml

* Solution mère du tampon du gel à gradient : B

3 M Tris HCl pH 8,8

* Solution mère du tampon de gel supérieure : C

1 M Tris HCl pH 6,8

* Composition du gel à gradient

	Solution à 5 % (10 ml)	Solution à 30 % (10 ml)
A	1 ml	6 ml
B	1,25 ml	1,25 ml
eau distillée	7,2 ml	2,2 ml
SDS 2 %	0,5 ml	0,5 ml
TEMED ⁽⁺⁾	5 μ l	5 μ l
Persulfate d'ammonium 5 %	10 μ l	10 μ l
saccharose		2 g

(+) N,N,N',N'-Tétraméthylène diamine

* Composition du gel supérieur

Solution à 5 % (10 ml)

A	1 ml
C	1,25 ml
eau distillée	7,2 ml
SDS 2 %	0,5 μ l
TEMED	10 μ l
Persulfate d'ammonium 5 %	100 μ l

* 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, le tampon de dissolution était ou non enrichi en bêta-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 permettre en milieu réducteur la coupure des ponts disulfure.

* Tampon d'électrophorèse

Tris	0,025 M
glycocolle	0,192 M
SDS	0,1 %

* Colorant

bleu Coomassie	1,125 g
éthanol	122 ml
acide acétique	25 ml
eau distillée	122 ml

* 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 : 14400 à 94000) sont disposés sur le gel dans les mêmes conditions que les échantillons à analyser. La courbe d'étalonnage (figure 15) du gel est obtenue en portant la valeur du Rf de chaque témoin en fonction du logarithme de leur masse moléculaire.

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

II - DETERMINATION DES POINTS ISOELECTRIQUES

1) Principe

L'isoélectrofocalisation consiste en une migration électrophorétique en gradient de pH stable et stationnaire croissant de l'anode vers la cathode. Dans ces conditions, les protéines vont se focaliser à une valeur de pH correspondant à leur point isoélectrique ou pHi.

Lorsqu'une protéine se trouve à un pHi supérieur ou inférieur à son pHi, elle est ionisée respectivement négativement ou positivement et migre donc dans le premier cas vers l'anode, dans le second cas vers la cathode. Au cours de sa migration, sa charge diminuera progressivement en fonction de la variation du pH et deviendra nulle au pH équivalent à son point isoélectrique.

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

DE CALIBRATION

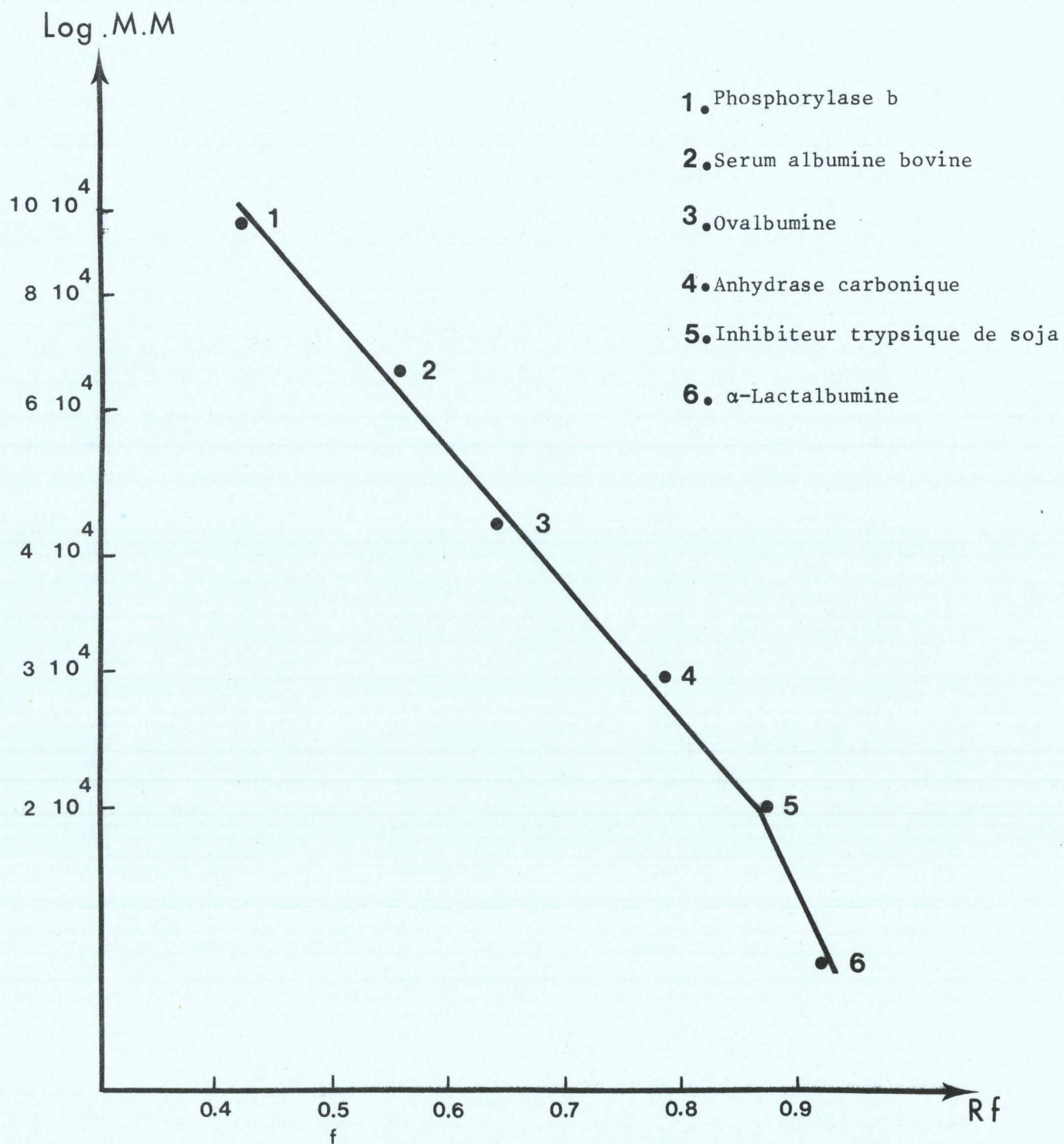


figure 15



2) Technique

Cette détermination a été effectuée par isoélectrofocalisation en gradient de pH (3,5 - 10) sur gel de polyacrylamide.

solution d'acrylamide à 29, 1 % (P/V)	5 ml
solution de N,N'-méthylène-bis acrylamide à 0,9 % (P/V)	5 ml
glycérol	3,75 ml
riboflavine	1,5 ml
ampholines 9-11	0,4 ml
(LKB 1809) 5-7	0,1 ml
4-6	0,1 ml
3,5-10	1,4 ml
eau distillée qsp	30 ml

La solution est dégazée pendant 10 minutes ; puis 0,27 ml de persulfate d'ammonium à 4 % sont ajoutés. Le mélange est coulé entre 2 plaques de verre espacées de 1 mm. La polymérisation s'effectue en 1 heure environ.

Les échantillons sont dissous dans de l'eau distillée à une concentration de 1 mg/ml. Une quantité de 30 μ l est déposée sur un morceau de papier filtre (Whatman 3 MM, Paratex), ensuite appliqué au contact du gel.

L'analyse est réalisée sur appareil LKB 2117 multiphor system. Les mèches des électrodes cathodique et anodique sont imbibées respectivement par une solution 1 M NaOH et 1 M H_3PO_4 .

L'électrofocalisation est effectuée sous une puissance constante de 6 watts pendant 5 heures au moyen d'un redresseur de courant LKB 2197 ; la température était maintenue à 15°C. Les papiers filtres sont retirés au bout d'une heure de migration. La détermination du gradient de pH obtenu est effectuée, par mesure du pH au moyen d'une électrode de surface, tous les centimètres, la migration une fois terminée.

Protocole de fixation et de coloration.

Le gel est immergé 15 heures dans la solution de fixation, lavé plusieurs fois par la solution de décoloration pendant 12 heures, immergé dans la solution colorante bleu Coomassie pendant 15 heures, puis décoloré et finalement fixé et séché sur film Gel Bond FMc Corporation.

Réactifs

* Solution de fixation

acide sulfosalicylique 17,3 g
acide trichloracétique 57,7 g
eau désionisée qsp 500 ml

* Solution de coloration

Coomassie Brilliant Bleu R250 0,460 g
solution de décoloration 400 ml

* Solution de décoloration

éthanol 250 ml
acide acétique 80 ml
eau désionisée qsp 1000 ml

III - ELECTROPHORESE D'AFFINITE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE - GEL INTERMEDIAIRE CONTENANT UNE LECTINE

Nous utilisons la méthode mise au point par DUVILLIER-HUET (1981) (15).

1) Principe

La mise au point de cette nouvelle technique avait pour but d'interpréter parmi des bandes de migration électrophorétique, les composants porteurs d'une structure glycanique possédant une affinité pour une lectine. Ainsi, la traversée d'un gel intermédiaire enrichi en Concanavaline A amène la possibilité de formation d'un complexe lectine-glycopeptide ou glycoprotéine avant la migration en gel normal. Si des conditions

de pH suffisamment basique sont retenues, la Concanavaline A se trouve sous une forme tétramérique de masse moléculaire avoisinant 140000. Tout complexe formé possède alors une taille très élevée et ne peut quitter le gel intermédiaire pour pénétrer dans le gradient de gel de polyacrylamide.

La comparaison de 2 dépôts identiques, l'un traversant le gel intermédiaire sans lectine, l'autre traversant le gel intermédiaire enrichi en lectine, permet de reconnaître, parmi l'ensemble les composants, ceux qui ne contiennent aucun site d'interaction avec la Concanavaline A : en effet, la migration électrophorétique de ces derniers n'est alors aucunement perturbée par la présence de la lectine. Au contraire, s'il y a formation d'un complexe, celui-ci reste à l'interface du gel intermédiaire et du gel classique et la bande électrophorétique correspondante disparaît de l'électrophorégramme par rapport à la migration témoin.

La présence de détergents ioniques empêche dans la plupart des cas la formation des complexes d'affinité avec les lectines. Nous avons donc procédé en l'absence de SDS, et en conséquence, utilisé le couplage à la fluorescamine pour obtenir la migration de tous les fragments étudiés vers l'anode.

2) Technique

a) Marquage à la fluorescamine.

L'échantillon de l'ordre de 100 μ g est dissous dans un tampon bicarbonate de sodium 0,5 M de pH 8,2 ; 25 μ l d'une solution fraîchement préparée de fluorescamine à 3 mg/ml dans l'acétone lui est ajouté. L'ensemble est immédiatement agité à l'aide d'un vortex. La fluorescamine réagit instantanément au niveau des fonctions amines primaires. L'excès de réactif s'hydrolyse très rapidement en produits non fluorescents. L'acétone est ensuite évaporé par un courant d'azote et quelques gouttes de glycérol sont ajoutées pour augmenter la densité du dépôt.

b) Migration

L'utilisation d'un gel de polyacrylamide 10-30% permet, après une durée suffisante d'électrophorèse (6 heures environ), l'obtention d'un équilibre de migration. Le gel supérieur correspond à un gel agarose à 2% enrichi ou non en Concanavaleine A à la concentration de 100 g/cm². L'électrophorèse est réalisée en tampon Tris-glycocolle 0,05 M de pH 9,4. A ce pH, les composants étudiés, couplés à la fluorescamine, sont chargés négativement. La migration s'effectue sous un voltage constant de 180 volts.

Après migration électrophorétique, le gel est lu sous lampe UV. Il peut être conservé 24 heures à 4°C.

3) Schématisation

Le système est présenté figure 16.

A gauche du schéma, migration témoin de l'échantillon, à droite, migration de l'échantillon à travers un gel enrichi en Concanavaleine A. Nous voyons disparaître de l'électrophorèse les composants complexés à la lectine. Sans avoir valeur absolue, tout résultat positif peut être enregistré. Tout résultat négatif doit être interprété avec réserve.

IV - ETUDE PAR 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) (44), 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 de 3 à 5 spectres réalisés à 2 sensibilités différentes. Le défilement des valeurs de longueurs d'onde est de 0,1 mm/sec. La vitesse de déroulement du papier est de 2 mm/mn. La constante de temps est égale à 10.

Electrophorèse d'affinité

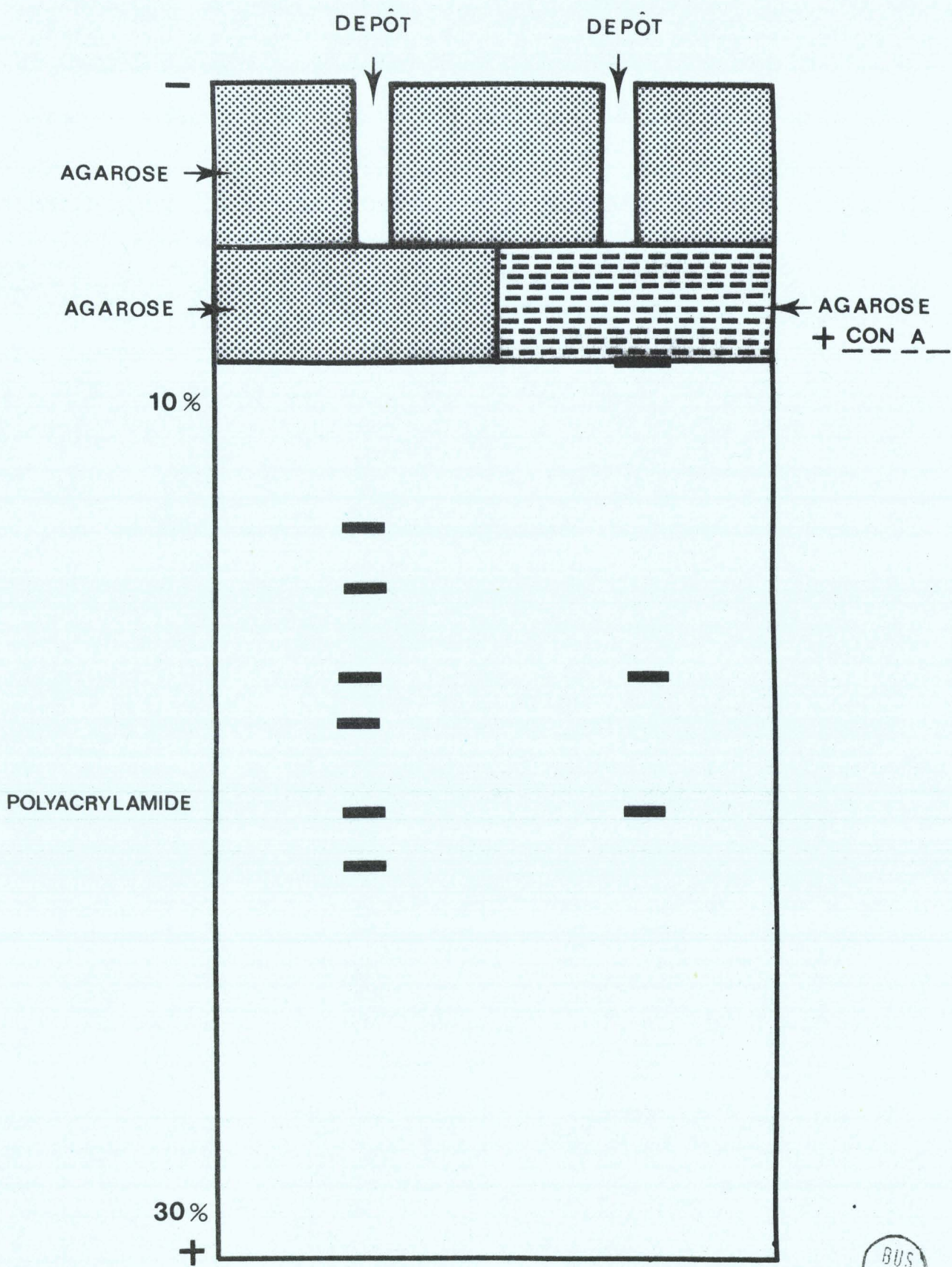


figure 16

Pour étalonner le dichrographe, est préparée une solution d'isoandrosterone dans le dioxane (25 mg/20 ml). La mesure est effectuée 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 111).

c = concentration en g/l.

d = longueur de la cuve en cm.

Δ = nombre de mm mesurés.

s = sensibilité (10^{-6} à $2 \cdot 10^{-4}$).

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

Réalisation des spectres dichroïques



Tous les spectres expérimentaux ont été réalisés 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 "DUPONT 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 α 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) (7).

B - METHODES CHIMIQUES D'ETUDE DES PROTEINES OU GLYCOPROTEINES

I - COMPOSITION CHIMIQUE

1) Méthodes d'étude des acides aminés

- * Méthode automatique de repérage des acides aminés ou des peptides par réaction à la ninhydrine.

Nous utilisons la méthode adaptée sur autoanalyseur Technicon par DEGAND (1972) (11), qui permet de mettre en évidence la présence d'acides aminés ou de peptides dans les éluats de colonne.

a) Réactifs

Pendant 24 heures, un mélange à partie égale de méthylcellosolve et d'eau distillée (1500 ml/1500 ml), dégazé, est maintenu sous azote. 15 g de ninhydrine sont dissous dans 500 ml de méthylcellosolve pur. Sont alors ajoutés 1,125 g d'hydrindantine puis 262,5 ml de tampon acétate de Na 4M pH 5,5. Le mélange s'effectue à l'aide d'une agitation magnétique douce et sous bullage constant d'azote pendant 30 minutes. Cette solution est alors ajoutée aux 3 litres de méthylcellosolve dilué et maintenu sous azote pendant 24 heures. L'ensemble remis sous atmosphère d'azote est prêt à l'emploi. Le réactif ainsi préparé peut être étalonné avant chaque dosage par rapport à une gamme de norleucine et de proline.

b) Mode opératoire

500 μ l d'éluat de colonne 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. Le débit est établi à l'aide de tuyaux calibrés. Il est de 1,69 ml/mn pour la ninhydrine, de 0,32 ml/mn pour l'azote et l'échantillon. Après passage au bain marie à 95°C, et refroidissement, la densité optique est lue à 570 nm.

* Analyse des acides aminés sur autoanalyseur

a) Hydrolyse

De 100 µg à 500 µg d'échantillon sont hydrolysés par l'acide chlorhydrique 5,6N à 110°C en tube scellé sous azote. La durée d'hydrolyse est généralement de 24 heures, toutefois, lorsque la quantité d'échantillon le permet, des cinétiques d'hydrolyse de 6 heures à 72 heures peuvent être établies. 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 et sur une seule colonne la séparation des acides aminés et des osamines.

La résine utilisée est la résine DURRUM DC6A dans une colonne de 6 mm de diamètre et de 350 mm de hauteur. La composition des tampons utilisés est rapportée dans le tableau suivant :

Tampon	1	2	3	4
pH	2,97	2,97	4,10	7,10
citrate de Na 2H ₂ O	15,7 g	15,7 g	15,7 g	15,7 g
NaCl		30 g		37,5 g
Thiodiglycol	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml
Acide N caprylique	0,08 ml	0,08 ml	0,08 ml	0,08 ml
eau distillée qsp	1000 ml	1000 ml	1000 ml	1000 ml

Le pH de chaque tampon est ajusté avec de l'acide chlorhydrique à 32 %.

Le programme utilisé pour l'analyse est le suivant :

	Temps en mn
Tampon 1	0 - 93
Tampon 2	93 - 125
Tampon 3	125 - 142
Tampon 4	142 - 234
Régénération NaOH 0,2 <u>N</u>	234 - 242
Rééquilibration en tampon 1	242 - 283

La température d'élution est de 50°C pendant les 185 premières minutes ; elle passe alors à 60°C afin d'accélérer l'élution de l'arginine en fin d'analyse. Au début de la rééquilibration de la colonne en tampon 1, la température est ramenée à 50°C.

Dans le programme, l'utilisation du tampon 2 de pH 2,97 citrate de Na enrichi en NaCl (30 g/l), permet l'élution des hexosamines, successivement glucosamine puis galactosamine entre les résidus d'alanine et de valine.

La composition des réactifs à la ninhydrine retenue est la suivant :

Ninhydrine (Touzart & Matignon) 75 g
Chlorure stanneux (Merck) 1,5 g
Tampon acétate de Na pH 5,5 (Merck) 1.250 ml
Méthylcellosolve (SDS) 3.750 ml

Le réactif est maintenu sous atmosphère d'azote. Les débits d'élution sont respectivement de 35 ml/heure pour les tampons et de 17,5 ml/heure pour le réactif à la ninhydrine.

* Dosage du tryptophane

Le tryptophane détruit par l'hydrolyse acide HCl 5,6 N est dosé par la méthode de PENKE (1974) (50).

1 mg d'échantillon est hydrolysé 24 heures sous vide à 110°C par 1 ml d'acide β -mercaptoéthanol sulfonique en présence de 500 nanomoles de norleucine. Le pH de l'hydrolysat est ensuite ajusté à pH 2,2 par de la soude 2 N et le volume ajusté à 5 ml avec un tampon pH 2,2 utilisé habituellement pour le dépôt des échantillons sur autoanalyseur. Un aliquot de cette solution est déposé sur la colonne. L'analyse s'effectue dans les conditions générales de séparation des acides aminés.

* Dosage de la cystéine sous forme d'acide cystéique après oxydation performique.

L'oxydation performique est réalisée selon le protocole décrit par HIRS (1967) (27). 1 à 2 mg d'échantillon sont repris dans 100 μ l d'acide formique à 99 % et 20 μ l de méthanol, puis sont laissés à -5°C pendant 30 mn. Sont alors ajoutés 100 μ l d'acide performique (réactif acide performique = mélange de 5 volumes d'eau oxygénée à 30 % et 15 volumes d'acide formique à 99 %). Le milieu réactionnel est maintenu à -5°C pendant 150 mn. Après dilution par addition d'eau distillée, la solution est soumise immédiatement à une lyophilisation. La poudre ainsi obtenue est hydrolysée par HCl 5,6 N, 24 heures à 110°C. L'hydrolysat est soumis à une analyse dont le programme d'élution correspond aux conditions précédemment décrites.

* Analyse des acides aminés dicarboxyliques amidifiés sur auto-analyseur.

a) Hydrolyse

Une hydrolyse enzymatique totale par action successive de la pronase et de l'aminopeptidase M a été retenue.

1 mg d'échantillon est dissous dans 1 ml de tampon bicarbonate d'ammonium 0,05 M de pH 8,0 dans un rapport enzyme/substrat de 1,5/100. Une incubation de 48 heures est effectuée au bain marie à 37°C sous agitation douce avec recharge en enzyme aux temps 30 mn et 24 h. Après 48 heures d'incubation, la réaction est stoppée par chauffage à 100°C pendant

5 mn. Une seconde hydrolyse enzymatique est alors entreprise avec de l'aminopeptidase M dans le même tampon pendant 24 heures à 37°C. Le rapport enzyme/substrat utilisé est alors de 4/100. La réaction est stoppée par addition de quelques gouttes d'acide acétique normal. L'hydrolysate est alors lyophilisé.

b) Analyse sur autoanalyseur

L'analyse est réalisée sur autoanalyseur BECKMAN de type Multichrom B. Un tampon citrate de lithium est utilisé. Un tampon de pH 2,86 ajusté avec de l'acide chlorhydrique à 32% est retenu. La composition est la suivante :

citrate de lithium 16,9 g
thiodiglycol 2,5 ml
acide octanoïque 0,04 ml
eau distillée qsp 1000 ml.

Une colonne de 220 mm de hauteur, de 6 mm de diamètre de résine DURRUM DC6A est utilisée. L'élution s'effectue à 50°C avec un débit de tampon de 35 ml/h et de 17,5 ml/h pour le réactif ninhydrine.

L'analyse est stoppée après le passage de l'alanine. L'ordre d'élution des acides aminés est le suivant : acide aspartique, thréonine, sérine, asparagine, acide glutamique et glutamine suivis de glycolle et alanine.

2) Méthodes d'étude des sucres

* Repérage des oses combinés par dosage à l'orcinol.

La présence d'oses combinés dans les éluats de colonne est mise en évidence par méthode de dosage à l'orcinol sulfurique adaptée à l'autoanalyseur TECHNICON par DEMAILLE (1965) (12).

Les échantillons, au rythme de 40 par heure, sont pompés à un débit de 0,16 ml/mn et mélangés avec le réactif à l'orcinol injecté à un débit de 2,88 ml/mn. La colonne de liquide fragmentée par injection d'air 0,42 ml/mn à intervalles réguliers, passe dans un bain marie à 95°C pendant 5 mn. Après refroidissement, la densité optique du mélange est lue à 520 nm.

* Détermination de la composition glucidique.

La composition en oses neutres et en osamines est déterminée par chromatographie en phase gazeuse selon la méthode de REINHOLD (1972) (53), modifiée par ROUSSEL et coll. (1975) (56), avec des colonnes en verre (0,3 x 150 cm) contenant de l'OV17 à 3 % sur Chromosorb W-AW-DMCS 80-100 mesh (Supelco).

II - MODIFICATIONS CHIMIQUES

1) Réduction et alkylation

La réduction et la S-carboxyméthylation sont effectuées selon la technique de GALL (1968) (19). La glycoprotéine est dissoute dans un tampon EDTA 0,003 M urée 8M, Tris 1,5 M de pH 8,5 à la concentration de 50 mg par ml.

Un excès de 2-mercaptoéthanol de 200 moles/mole est ajouté. Le tube est maintenu quelques secondes sous azote.

La réduction est poursuivie pendant 24 h à température ambiante, sous agitation constante. Après 24 heures, le tube est refroidi dans de la glace fondante et de l'iodoacétamide est ajouté selon un excès de 400 moles/mole. La réaction se poursuit pendant 45 mn à l'obscurité. La disparition des groupements thiol est contrôlée par la réaction au nitroprussiate de ROSNER (1940) (55). Les réactifs sont éliminés par dialyse contre eau désionisée pendant 5 jours. La glycoprotéine est ensuite lyophilisée.

2) Succinylation

a) Principe

L'utilisation de l'anhydride succinique permet de bloquer les groupements NH_2 libres. L'acide aminé N-terminal des protéines, glycoprotéines, peptides et glycopeptides ne peut plus alors être dégradé et converti en thiazolinone lors de la dégradation de Edman.

Cette méthodologie affecte également les résidus de lysine. Lorsque la dégradation récurrente de Edman atteint un résidu de lysine, la thiazolinone obtenue correspond à celle d'une succinyl lysine. Après conversion, la thiazolinone livre une PTH succinyl-lysine dont nous avons pu apprécier le comportement en HPLC sur colonne μ -Bondapack C18. Il faut noter que l'identification d'un cycle correspondant à une succinyl-lysine, s'exprime en HPLC par 3 pics qui attestent de l'existence de composés réactionnels intermédiaires ou de produits de dégradation non identifiés.

L'intérêt essentiel de cette technique réside dans le fait que :

* nous pouvons bloquer l'extrémité N-terminale, puis cliver par exemple par voie enzymatique un axe peptidique. Ainsi sans fractionnement, si la coupure enzymatique est très spécifique et unique dans la structure considérée, nous pouvons directement soumettre le mélange peptide bloqué, peptide apparu à une séquence automatique. La succinylation est préférée à d'autres méthodes dans la mesure où le blocage de l'extrémité N-terminale est stable au cours d'une dégradation automatique de Edman portant sur un nombre de cycle supérieur ou égal à 30. Nous avons pu vérifier expérimentalement ces données.

* nous pouvons utiliser cette modification chimique pour changer la configuration de la molécule à cliver par des protéases ou à sous-fractionner sur colonne de HPLC par exemple. De nombreux auteurs, en effet, commencent à utiliser ce type de stratégie pour favoriser des purifications.

b) Méthode

La succinylation est effectuée selon la méthode de KLOTZ (1967) (37).

100 mg d'anhydride succinique sont dissous dans 10 ml de dioxanne. L'échantillon à succinyler est repris à une concentration de 2 mg/ml dans de l'eau distillée. Le pH est amené à 9 avec de la soude 0,1 N. L'anhydride succinique est ajouté goutte à goutte en excès, à raison de 20 moles/mole de lysine contenue dans l'échantillon, sous agitation constante avec maintien du pH entre 8,5 et 9,5 à l'aide soit de soude 0,1 N, soit de soude 0,5 N. Quand la totalité du réactif est ajoutée et que le pH est demeuré stable pendant 30 mn, l'échantillon est dialysé une nuit à 4°C puis 48 h à température ambiante, avec changements fréquents contre le tampon retenu pour l'hydrolyse enzymatique envisagée.

3) Coupure chimique par le bromure de cyanogène

a) Principe

Le bromure de cyanogène (BrCN) hydrolyse sélectivement les liaisons méthionyl. Le mécanisme de clivage est le suivant : il se forme initialement un bromure de cyanosulfonium qui, en milieu acide se scinde en méthyl-thiocyanate et bromohydrate d'iminolactone d'homosérine ; celui-ci se décompose spontanément en libérant d'une part la lactone de l'homosérine, et d'autre part un fragment ayant en position N-terminale l'acide aminé dont le groupe NH_2 était uni au COOH de la méthionine.

b) Méthode

La technique utilisée est celle préconisée par STEERS (1965) (63). La glycoprotéine S-carboxyméthylée est solubilisée en acide formique à 70 %. Le BrCN fraîchement dissout dans de l'acide formique à 70 % est ajouté à raison de 200 moles par mole de méthionine contenu dans la glycoprotéine. La concentration finale du milieu est de 1 mg de glycoprotéine par ml. La réaction est poursuivie 24 h à l'obscurité, à température ambiante et sous agitation. La réaction est stoppée par addition de 10 volumes d'eau désionisée refroidi à 4°C. Le mélange des différents fragments BrCN est alors conservé par lyophilisation.

4) Coupure chimique par le BNPS-Scatole

a) Principe

Le 2(2-nitrophénylsulfényl)-3-méthyl-3-bromoindole ou BNPS-Scatole a, par l'analogie de structure qu'il présente avec le tryptophane, une orientation préférentielle de coupure vers cet acide le laissant en position C-terminale du fragment clivé.

b) Méthode

Nous avons utilisé la méthode décrite par DEBUIRE (1977) (10).

100 mg de glycoprotéine S-carboxyméthylée sont dissous dans 33 ml d'acide acétique à 75 %. 100 moles de tyrosine exogène sont ajoutées par mole de tyrosine endogène. Enfin, 100 moles de BNPS-Scatole sont ajoutées par mole de tryptophane.

La solution est laissée à température ambiante sous agitation douce à l'obscurité pendant 68 h. Le mélange est ensuite centrifugé 10 mn à 1000 t/mn. Le surnageant récupéré, dilué par de l'eau désionisée est lyophilisé.

Dans un second temps, la lyophilisat est repris dans 250 ml d'une solution à 15% de mercaptoéthanol dans de l'eau désionisée, mis sous atmosphère d'azote et placé 72 h à 30°C sous agitation. Après centrifugation permettant l'élimination d'un insoluble, le milieu réactionnel est lyophilisé.

III - ETUDE DE L'ACTION DE DIFFERENTS ENZYMES PROTEOLYTIQUES

1) Enzymes utilisés

- Trypsine (SIGMA type XI N°1003) débarassée de son activité chymotrypsique par le chlorure de diphénylcarbamy1 (DPCC).

- Chymotrypsine (SIGMA type VII N°C3142) débarassée de son activité trypsique par le 1-chloro-3 tasydamido-7-amino-2-heptanone (TLCK).
- Thermolysine (SIGMA type X N°P1512).
- Protéase de Staphylococcus aureus (MILES N°36900).
- Protéase de glandes sous-maxillaire de Souris (BOEHRINGER MANNHEIM 269590).

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.

L'hydrolyse par la thermolysine est réalisée dans un tampon bicarbonate d'ammonium 0,05 M ajusté à pH 8,0.

L'hydrolyse par la protéase de Staphylococcus aureus est menée soit dans un tampon bicarbonate d'ammonium 0,05 M ajusté à pH 8,9, soit dans un tampon acétate d'ammonium 0,05 M pH 4,0 (HOUMARD) (1972) (33).

Enfin, l'hydrolyse par la protéase de glandes sous-maxillaires de Souris est conduite dans un tampon N méthyl morpholine 0,1 M pH 8,0 (LEVY) (1970) (43).

3) Protocole d'hydrolyse

Un protocole identique est suivi quel que soit l'enzyme envisagé : l'échantillon est dissous à raison d'1 mg/ml dans le tampon retenu fonction de l'activité enzymatique considérée puis incubé 10 mn à 37°C. L'enzyme en solution dans le même tampon est ajouté en quantité correspondant aux rapports enzyme/substrat choisis (1/50 à 1/400). L'ensemble est laissé au bain marie à 37°C sous agitation. Des aliquotes sont prélevés à des temps allant de 10 mn à 6 h pour les études cinétiques.

Dans tous les cas, la réaction est stoppée par addition d'acide acétique 1 N puis par congélation immédiate. Le matériel ainsi préparé est lyophilisé.

IV - DETERMINATION DES SEQUENCES AMINO-ACIDES

1) Dégradation manuelle de Edman

Nous suivons le protocole établi par EDMAN (1970) (17) et modifié par DEMAILLE (1979) (13).

a) Couplage

Les différentes étapes sont les suivantes :

- dissolution d'environ 200 nanomoles d'échantillon à séquencer dans un tube conique à col rodé, par 100 μ l d'un tampon diméthylallylanine/propanol/eau (1,2/15/10 - v/v/v) fraîchement préparé et ajusté à pH 9,5 par de l'acide trifluoroacétique (TFA) à 10 %.

- addition de 5 μ l de phénylisothiocyanate (PITC) et maintien du tube sous courant d'azote pendant 30 secondes.

- agitation à l'aide d'un vortex.

- incubation à 50°C pendant 40 minutes. Le mélange est immédiatement refroidi après cette réaction de couplage.

- élimination de l'excès du réactif par 3 additions successives de 0,5 ml de benzène, suivies de centrifugation à 2000 t/mn pendant 5 minutes et élimination de la phase benzénique.

- séchage de la phase aqueuse par évaporation sous faible courant d'azote puis par dessiccation pendant 30 minutes dans un dessiccateur maintenu à 50°C, sous vide et en présence d'anhydride phosphorique.

b) Clivage

* addition de 50 μ l d'acide trifluoroacétique (TFA) immédiatement après la dessiccation avec maintien quelques secondes sous courant d'azote.

- agitation à l'aide d'un vortex
- incubation à 50°C pendant 7 minutes
- séchage du produit sous azote
- extraction de la thiazolinone par de l'éther dépourvu de peroxydes et contenant de l'éthylmercaptan comme antioxydant (20 μ l pour 50 ml d'éther). Trois extractions par 0,5 ml d'éther suivies de centrifugation à 2000 t/mn pendant 3 minutes sont effectuées. Les phases étherées réunies dans un nouveau tube conique à col rodé sont séchées sous azote. Le produit résiduel est alors parfaitement séché en dessiccateur sous vide en présence d'acide sulfurique pendant 30 minutes. Il est ensuite prêt pour le cycle suivant.

c) Conversion

- addition de 200 μ l d'acide chlorhydrique 0,1 N contenant de l'éthylmercaptan comme anti-oxydant et maintien du tube sous courant d'azote pendant 30 secondes.

- agitation à l'aide d'un vortex
- incubation à 80°C pendant 10 minutes
- refroidissement rapide
- extraction de la phénylthiodantoïne (PTH) par trois fois 0,5 ml d'acétate d'éthyle suivie de centrifugations à 2000 t/mn pendant 5 mn. Les phases d'acétate d'éthyle sont rassemblées et évaporées sous azote. Quant à la phase aqueuse, elle est lyophilisée. En effet, tous les dérivés des acides aminés ne sont pas retrouvés dans la phase acétate d'éthyle, ceux de l'arginine, de l'histidine et de la cystéine restent dans la phase aqueuse. Le PTH amino-acide ainsi préparé est prêt pour son identification.

2) Dégradation automatique de Edman

Plusieurs causes interviennent dans les pertes importantes de rendement au cours de la dégradation manuelle de Edman. Les unes sont chimiques (désulfurisation oxydative du groupement phénylthiocarbamyl), les autres "mécaniques" (difficultés de solubilisation, réactions échantillon-réactifs imparfaites, extractions manuelles successives entraînant une partie de l'échantillon. Le séquenceur utilisé, de type Beckman 890C, pallie à bon nombre de ces inconvénients.

La dégradation automatique de Edman est réalisée en atmosphère inerte d'azote. Le "centre vital" de l'appareil est une coupelle cylindrique en verre, maintenue en rotation pour permettre l'étalement de l'échantillon en un film très fin et régulier qui favorise les échanges avec les réactifs comme avec les solvants. L'élimination des réactifs est rapide et le séchage du film est meilleur. La coupelle comporte un "étranglement" discret (undercut) situé à mi-hauteur de sa partie cylindrique dont le but est d'empêcher l'élimination de l'échantillon lors des lavages au benzène (figure 17).

Les différentes étapes de la dégradation automatique effectuées à 57°C sont les suivantes (figure 18) EDMAN (1956) (16) :

- solubilisation du peptide
- couplage avec le phénylisothiocyanate (PITC)
- élimination de l'excès des réactifs
- clivage par l'acide heptafluorobutyrique (HFBA)
- extraction des 2-anilino-5-thiazolines.

La conversion, quant à elle, est effectuée manuellement.

a) Solubilisation de l'échantillon

200 à 500 nanomoles de l'échantillon à séquencer (glycoprotéine, glycopeptide, peptide) sont solubilisées dans 400 μ l d'eau ou d'acide formique à 10 % ou même dans le tampon de couplage puis délicatement déposées près du fond de la coupelle, tandis que celle-ci tourne à 1000 t/mn. L'échantillon sous l'effet de la force centrifuge, est plaqué contre la paroi. Le séchage est ensuite effectué par une série de balayages à l'azote et de vide progressif.

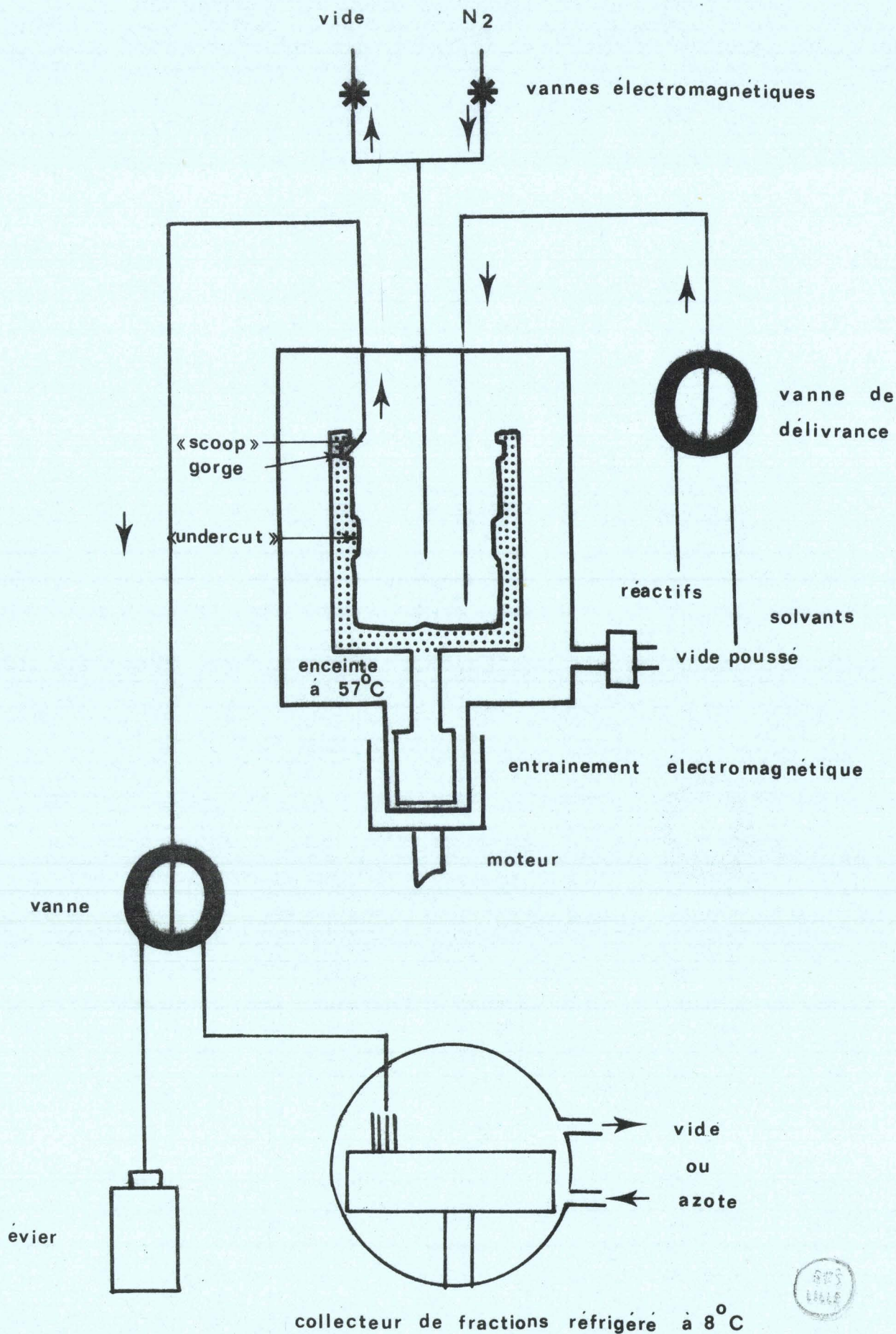


figure 17

ETAPES DE LA DEGRADATION DE EDMAN

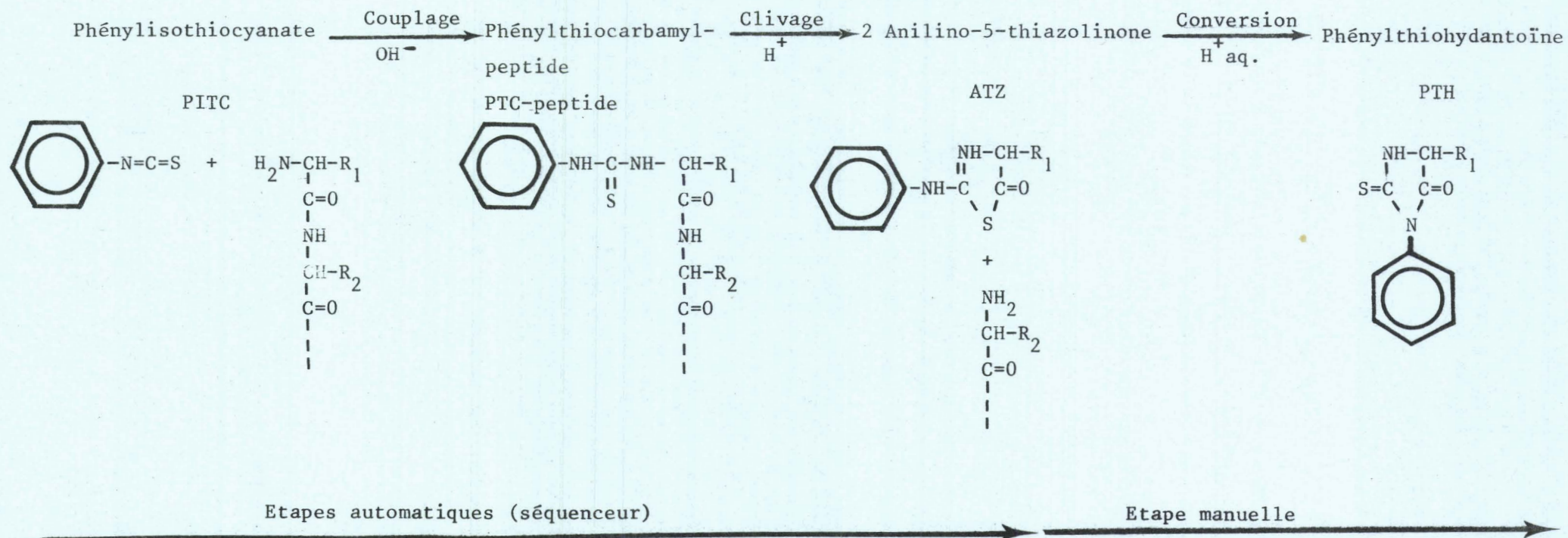


figure 18

b) Couplage

Le couplage est réalisé en faisant agir l'échantillon avec du PITC en tampon de couplage. Deux tampons peuvent être utilisés selon le programme choisi : soit un tampon quadrol 0,1 M (programme Beckman 122974), utilisé pour les protéines, glycoprotéines, "gros" peptides ou glycopeptides, soit un tampon diméthylallylamine 0,8 M pH 9,4 (DMAA), utilisé pour les "petits" peptides ou glycopeptides.

c) Elimination de l'excès des réactifs

L'élimination du tampon de couplage, du PITC en excès et de ses dérivés secondaires, est réalisée par un vide progressif, suivi d'un balayage d'azote sous vide partiel puis par lavage au benzène. Le solvant de lavage est ensuite éliminé lorsqu'il atteint la gorge située à la partie supérieure de la coupelle par aspiration à l'aide d'un tube appelé Scoop. Le DMAA, utilisé pour les peptides et glycopeptides relativement courts, très volatil, s'élimine en grande partie par évaporation sous vide. La quantité nécessaire de benzène pour le lavage est ainsi très réduite, limitant les pertes de peptide et de glycopeptide en cours de séquence.

d) Clivage par l'acide heptafluorobutyrique

Après séchage du film, le clivage est réalisé par addition de HFBA. Un vide progressif suivi d'un balayage d'azote sous vide permet d'éliminer l'acide à la fin de la réaction.

e) Extraction des thiazolinones

Enfin la dernière étape, réalisée par le séquenceur, est l'extraction par le chlorobutane de 2-anilino-5-thiazolinones (ATZ), et leur collection dans des tubes réfrigérés contenant le milieu de conversion : 200 μ l d'HCl 1 N, et quelques gouttes d'éthylmercaptan comme anti-oxydant.

La dégradation automatique d'une durée de 80 minutes se termine par un séchage du produit résiduel grâce à un vide progressif, suivi d'un balayage d'azote sous vide partiel. Le cycle suivant peut alors commencer.

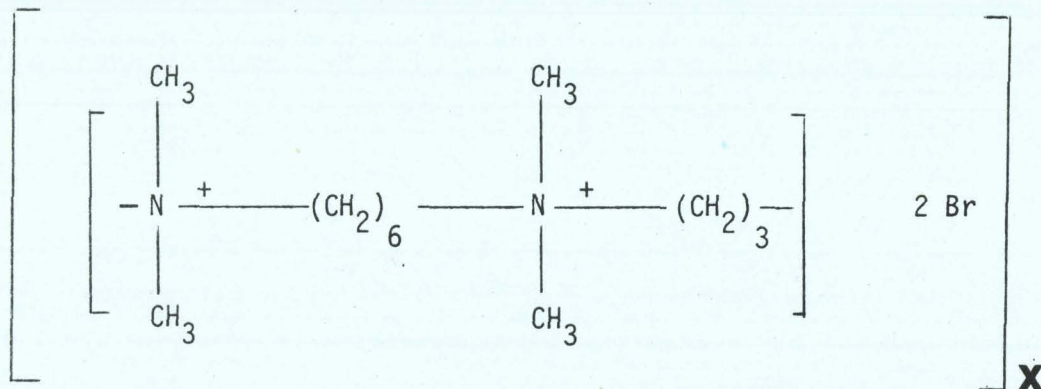
f) Conversion manuelle

Au cours de la conversion, la thiazolinone est transformée en une phénylthiohydantoïne d'acide aminé (PTH) plus stable.

Le chlorobutane est évaporé sous azote. Au cours de cette évaporation, la thiazolinone se concentre progressivement dans la phase HCl qui est incubée de 7 à 15 minutes à 80°C. Cette durée dépend des PTH amino-acides. Pour la plupart d'entre eux, elle est de 10 minutes, cependant, ce temps est limité à 7 minutes pour les PTH amino-acides hydroxylés (sérine, thréonine), afin d'éviter leur destruction, et est portée à 15 minutes pour permettre une conversion totale des PTH amino-acides, valine, leucine, isoleucine, phénylalanine et lysine.

Pour les peptides et glycopeptides courts, à cette technique classique de Edman, nous avons ajouté l'utilisation de "mainteneurs", SILVER (1974) (61), FRANK (1976) (18), ROCHAT (1976) (54), TARR (1978) (64), qui ont pour but de minimiser au maximum les pertes lors des lavages par une stabilisation mécanique dans la coupelle.

Bien qu'il soit possible d'utiliser des protéines bloquées naturellement ou artificiellement (FRANK) (18), (ROCHAT) (64), le mainteneur le plus utilisé est le polybrène. Le polybrène est un ammonium quaternaire de formule :



Si son mécanisme d'action n'est pas encore bien connu, on sait que la quantité minimum à utiliser est de 2 à 3 mg (KLAPPER) (1978) (36). Les artefacts dûs au polybrène sont sensiblement diminués en soumettant 50 nanomoles de dipeptide GLY-GLY à 3 cycles de dégradation en présence de mainteneur. Cette opération a pour but de faire réagir les impuretés du polybrène avec le groupe α aminé terminal du dipeptide (HUNKAPILLER) (1978) (34).

Le peptide ou le glycopeptide est ensuite déposé dans la coupelle, puis soumis à la dégradation automatique.

3) Identification des PTH amino-acides dérivés

Que ce soit pour l'identification des PTH amino-acides obtenus par dégradation de Edman manuelle, ou par dégradation de Edman automatique, nous avons utilisé dans les deux cas, pour notre travail, l'identification par chromatographie liquide haute performance (HPLC) et parfois pour certains PTH amino-acides l'identification en phase gazeuse. Nous avons complètement abandonné l'identification de PTH amino-acides en chromatographie couche mince de gel de silice.

La chromatographie liquide haute performance représente de nombreux avantages par rapport à la chromatographie sur couche mince ou en phase gazeuse :

- quantification précise des PTH amino-acides. Ceci nous permet d'identifier un plus grand nombre de résidus, la quantification minimisant les risques d'erreur en présence d'un bruit de fond inévitable en fin de dégradation.

- faible quantité de l'échantillon utilisé.

- absence de transformation préalable à l'injection de l'échantillon comme en phase gazeuse.

a) Chromatographie liquide haute performance

L'appareil utilisé pour la chromatographie liquide à haute performance est un Hewlett Packard modèle 1084B, équipé d'un détecteur UV fixe (254 nm), et d'un détecteur UV variable (200 - 540 nm). La technique utilisée est celle préconisée par HERMANN (1978) (26), modifiée par BRIAND (1981) (5).

La phase utilisée pour la séparation des PTH amino-acides est constituée d'un support solide (silice) sur lequel sont greffés les groupements $-(CH_2)_{17}-CH_3$ de caractère peu polaire (micro-Bondapack C18 Waters Associates). La phase mobile utilisée est polaire, il s'agit alors de chromatographie liquide à phase inversée. La séparation des PTH amino-acides sur colonne C18 (3,9 x 300 mm) ainsi que les conditions opératoires utilisées, sont présentées dans la figure (19).

La PTH-norvaline est utilisée comme témoin interne. Les PTH-méthionine et PTH-valine d'une part et les PTH-isoleucine et PTH-phénylalanine non séparées sur colonne micro-Bondapack C18, peuvent être identifiées sur colonne micro-Bondapack CN (Waters Associates). Cette colonne de polarité intermédiaire est constituée par la liaison chimique d'un groupe cyano sur un support de silice. La séparation obtenue et les conditions opératoires utilisées sont présentées dans la figure 20.

Les phénylthiohydantoïnes des amino-acides hydroxylés (sérine, thréonine), sont particulièrement instables et forment des dehydrodérivés. 80 % de la PTH sérine et 65 % de la PTH-thréonine sont détruites pendant la conversion malgré l'emploi d'éthylmercaptan et même avec une durée de conversion limitée à 7 minutes. Leur détection en HPLC à 254 nm est difficile, mais il est cependant possible de détecter les dérivés de la PTH-thréonine à 313 nm.

b) Chromatographie en phase gazeuse

L'appareil utilisé pour la chromatographie en phase gazeuse est un Hewlett Packard modèle 5730A. La chromatographie en phase gazeuse n'a été utilisée que pour l'identification après HPLC des PTH-méthionine et PTH-valine d'une part, et des PTH-isoleucine et PTH-phénylalanine d'autre part, la colonne micro-Bondapack CN en HPLC étant d'utilisation récente.

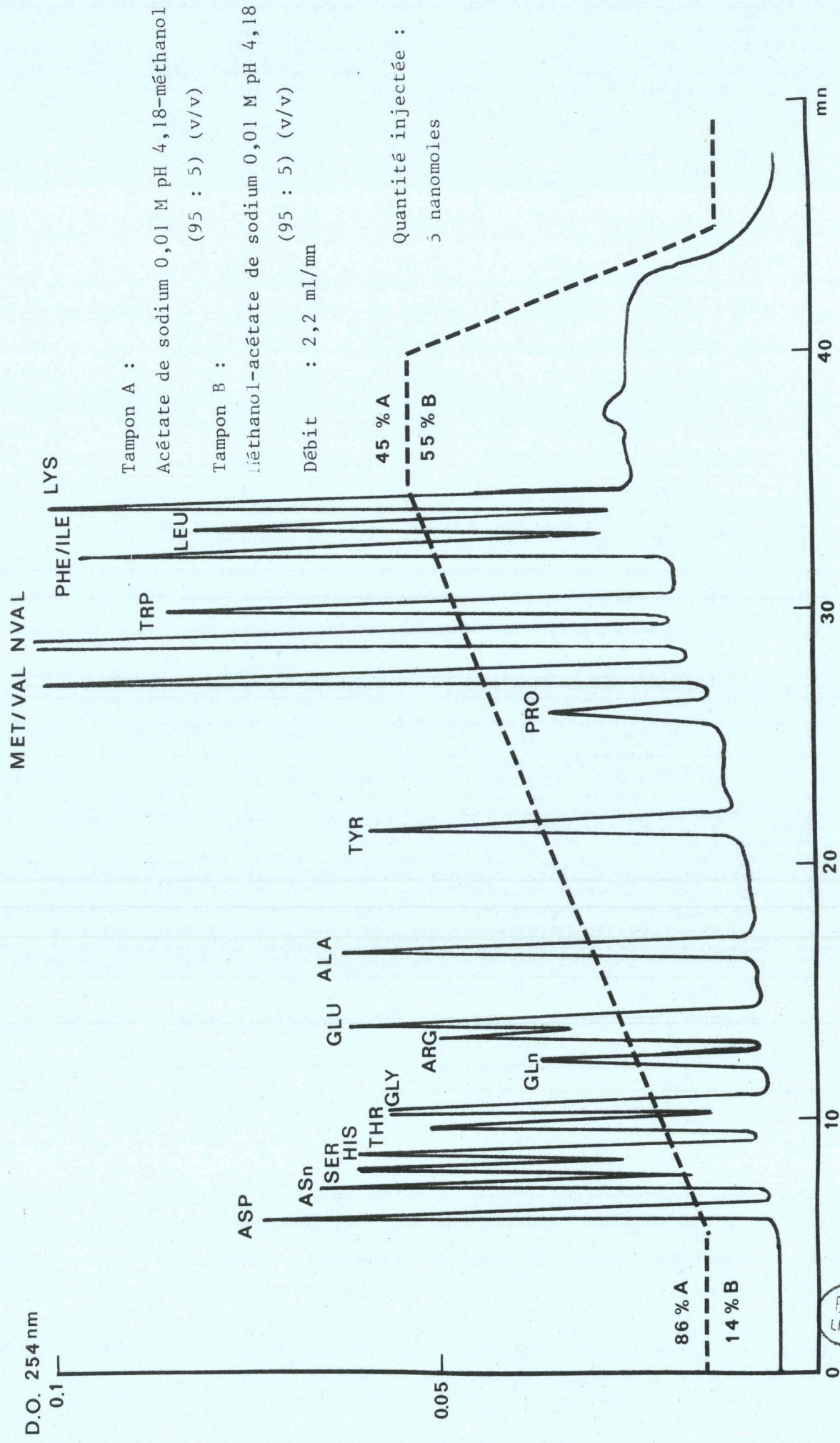


figure 19

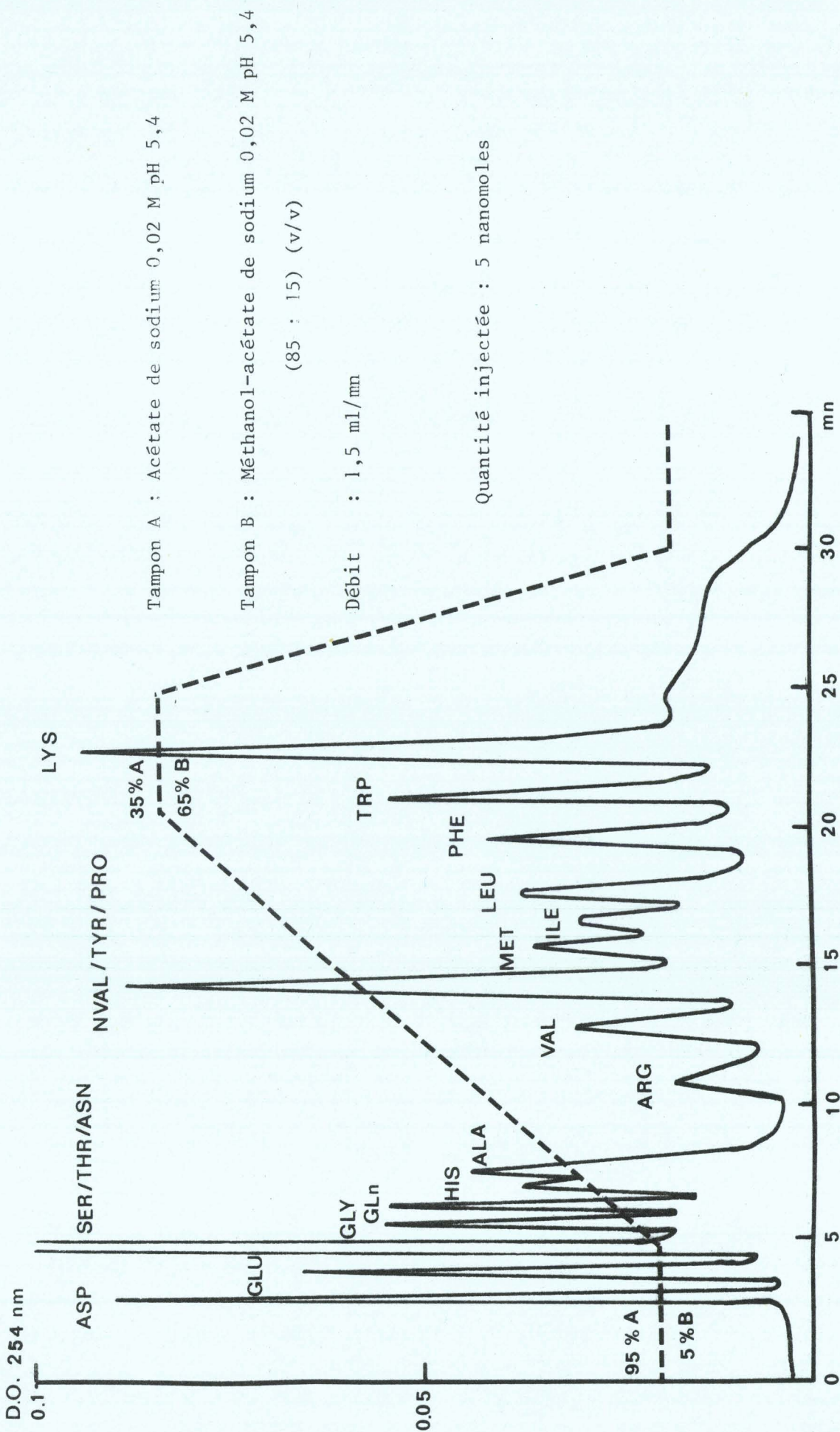


figure 20



La chromatographie en phase gazeuse est effectuée dans le cas présent, sans silylation préalable des échantillons. La colonne utilisée est une colonne WHP 100/120 mesh imprégnée de chlorophénylsilicone SP400 à 10 %. Le diagramme des PTH amino-acides sans silylation et les conditions opératoires sont présentées figure 21.

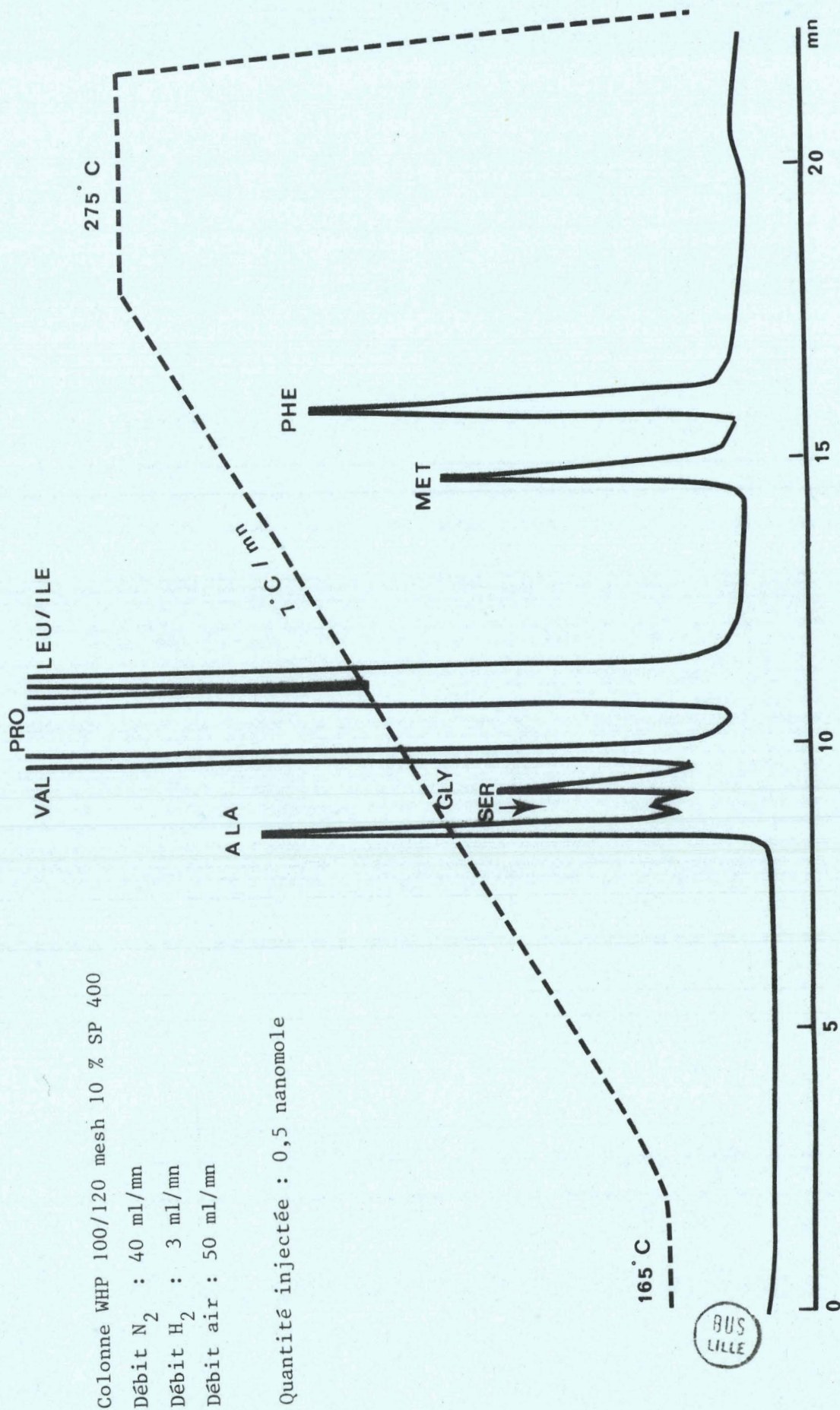


figure 21

BIBLIOGRAPHIE

1. AUBERT J.P., BISERTE G. and LOUCHEUX-LEFEBVRE M.H. (1976)
Carbohydrates peptide linkage in glycoproteins.
Arch. of Biochem. Biophys., 175, 410-418. (19)
2. AUBERT J.P., HELBECQUE N. and LOUCHEUX-LEFEBVRE M.H. (1981)
Circular dichroism studies of synthetic ASN-X-SER/THR- containing peptides : structure glycosylation relationship.
Arch. of Biochem. Biophys., 208, 20-28. (19)
3. BALTZ T., BALTZ D. et PAUTRIZEL R. (1976)
Affinité de la Concanavalline A pour Trypanosoma equiperdum : applications à l'isolement de la fraction glycoprotéique spécifique du type antigénique.
Annales d'Immunologie (Institut Pasteur), 127 C, 761-774. (12, 13, 14)
4. BOOTHROYD J.C., CROSS G.A.M., HOEIJMAKERS J.H.J. et BORST P. (1980)
A variant surface glycoprotein of Trypanosoma brucei synthesized with a C-terminal hydrophobic "tail" absent from purified glycoprotein.
Nature, 288, 624-626. (10, 18)
5. BRIAND G. (1981)
Histone H₅ d'érythrocyte de Poulet.
Thèse de Doctorat ès-Sciences LILLE. (118)
6. CAPBERN A., GIROUD C., BALTZ T. et MATTERN P. (1977)
Trypanosoma equiperdum : étude des variations antigéniques au cours de la trypanosomase expérimentale du Lapin.
Exp. Parasit., 42, 6-13. (7, 9, 11)

7. CHEN Y.H., YANG J.T. et CHAU K.H. (1974)
Determination of the helix and beta form of proteins in aqueous solution by circular dichroism.
Biochemistry, 13, 3350-3359. (99)
8. CLARKSON M.J. (1976)
Trypanosomes.
Vet. Parasit., 2, 9-29. (9)
9. CROSS G.A.M. (1975)
Identification, purification and properties of clone specific glycoproteins antigens constituting the surface coat of Trypanosoma brucei.
Parasitology, 71, 393-417. (7, 40)
10. DEBUIRE B., HAN K.K., DAUTREVAUX M., BISERTE G., REGNOUF F. et KASSAB R. (1977)
Amino acid sequence of a cyanogen bromide fragment containing two tryptophanyl residues of lobster arginine kinase.
J. Biochem., 81, 611-619. (108)
11. DEGAND P. (1972)
Classification et éléments de structure des mucines bronchiques.
Thèse Doctorat ès-Sciences LILLE. (100)
12. DEMAILLE J., DAUTREVAUX M., HAVEZ R. et BISERTE G. (1965)
Isolement, propriétés physico-chimiques et composition de α_2 -macroglobuline de Porc.
Bull. Soc. Chim. France, 12, 3506-3511. (104)
13. DEMAILLE J. (1979)
Communication personnelle. (110)

14. DOYLE J.J., HIRUMI H., HIRUMI K., LUPTON E.N. et CROSS G.A.M. (1979)
Antigenic variation in clones of animal infective Trypanosoma brucei
derived and maintained in vitro.
Parasitology, 80, 359-369. (9)
15. DUVILLIER-HUET G. (1981)
Cleavage by cyanogen bromide : partial determination of the primary
structure of a variant specific surface antigen from Trypanosoma
equiperdum.
DEA Biochimie. (48, 58, 95)
16. EDMAN P. (1956)
On the mechanism of the phenyl isothiocyanate degradation of pepti-
des.
Acta Chem. Scand., 10, 761-768. (112)
17. EDMAN P. (1970)
Molecular Biology Biochemistry and Biophysics.
Needleman S.B. Ed., Springer Verlag New-York, 211-255. (110)
18. FRANK G. and ZUBER H. (1976)
The amino acid sequence of Monellin.
Hoppe Seyler's Z. Phys. Chem., 357, 587-592. (116)
19. GALL W.E., CUNNINGHAM B.A., WAXDAL M.J., KONISBERG W.H. and EDELMAN
G.H. (1968)
The covalent structure of a human G Immunoglobulin. IV The inter-
chain disulfide bond.
Biochemistry, 7, 1973-1982. (105)
20. GRAY A.R. (1965)
Antigenic variation in a strain of Trypanosoma brucei transmitted by
glossina morsitans and G palpalis.
J. Gen. Microbiol., 41, 195-214. (9)

21. GRAY A.R. (1965)
Antigenic variation in clones of Trypanosoma brucei. I. Immunological relationships of the clones.
Ann. Trop. Med. Parasit., 59, 27-36. (7, 9)
22. GRAY A.R. (1972)
Variable agglutogenic antigens of Trypanosoma gambiense and their distribution among isolates of the trypanosoma collected in different places in Nigeria.
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 66, 263-284. (9)
23. GRAY A.R. (1975)
A pattern in the development of agglutinogenic antigens of cyclically transmitted isolated of Trypanosoma gambiense.
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 69, 131-138. (9)
24. GRAY A.R. et LUCKINS A.G. (1976)
Antigenic variation in salivarian trypanosomes.
In "Biology of the Kinetoplastida", 493-542.
(Lumsden W.H.R. et Evans D.A. Eds) Academic Press London. (6)
25. HENRIQUEZ D., PIRAS R. and PIRAS M. (1981)
The effect of surface membrane modifications of fibroblastic cells on the entry process of Trypanosoma cruzi trypomastigotes.
Molec. Biochem. Parasitol., 2, 359-366. (84)
26. HERMANN J., TITANI K., ERICSSON L.H., WADE R.D., NEURATH H. and WALSH K.A. (1978)
Amino acid sequence of two cyanogen bromide fragments of glycogene phosphorylase.
Biochemistry, 17, 5672-5679. (118)
27. HIRS C.H.W. (1967)
Determination of cystine as cysteic acid.
Methods in Enzymology (Hirs Ed) Academic Press, New York, San Francisco, London, 11, 59-62. (103)

28. HOARE C.A. et WALLACE F.G. (1966)
Developmental stages of trypanosomatid flagellates : a new terminology.
Nature, (Lond.), 212, 1385-1386. (3)
29. HOARE C.A. (1972)
The trypanosomes of mammals.
Blackwell Scientific Publications, Oxford. (3)
30. HOEIJMAKERS J.H.J., FRASCH A.C.C., BERNARD A., BORST P. et CROSS G.A.M. (1980)
Novel expression-linked copies of the genes for variant surface antigens in trypanosomes.
Nature, 284, 78-80. (10)
31. HOLDER A.A. and CROSS G.A.M. (1981)
Glycopeptides from variant surface glycoproteins of Trypanosoma brucei. C-terminal location of antigenically cross reacting carbohydrate moieties.
Mol. Biochem. Parasitol., 2, 135-150. (80)
32. HONIBERG B.M., BALAMUTH W., BOWEE E.C., CORLISS J.O., GOJDICS M., HALL R.P., KUDO R.R., LEVINE N.D., LOEBLICH A.R., WEISER J. and WENRICH D.H. (1966)
A revised classification of the phylum protozoa.
J. Protozool., 11, 7-20. (3)
33. HOUMARD J. and DRAPEAU G. (1972)
Staphylococcal protease : A proteolytic enzyme specific for glutamyl bonds.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 69, 12, 3506-3509. (103)
34. HUNKAPILLER M.W. and HOOD L.E. (1978)
Direct microsequence analysis of polypeptides using an improved sequanator, a non protein carrier (Polybrene), and high pressure liquid chromatography.
Biochemistry, 17, 2124-2133. (117)

35. INOKI S., OSAKI H. et NAKABAYASHI T. (1956)
Med. J. Osaka University, 7, 165-173. (9)
36. KLAPPER D.G., WILDE C.E. and CAPRA J.D. (1978)
Automated amino acid sequence of small peptides utilizing polybrene.
Anal. Biochem., 85, 126-131. (117)
37. KLOTZ I.M. (1967)
Succinylation.
Methods in Enzymology, 11, 576-580. (107)
38. KUDO R.R. (1966)
Protozoology, Thomas Springfield, I 11. (3)
39. LABASTIE M.C., BALTZ T., RICHET C., GIROUD Ch., DUVILLIER G.,
PAUTRIZEL R. and DEGAND P. (1981)
Variant specific glycoproteins of Trypanosoma equiperdum : cross
reacting determinants and chemical studies.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 99, 729-736. (12)
40. LAEMMLI U.K. (1970)
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of
bacteriophage T₄.
Nature, 227, 680-681. (88)
41. LANHAM S.M. and GODFREY D.G. (1970)
Isolation of salivarian trypanosomes from man and other mammals
using DEAE-cellulose.
Exp. Parasit., 28, 521-534. (14)
42. LEVADITI C. et MCINTOSH J. (1909)
Le mécanisme de la création des variétés de trypanosomes résistants
aux anticorps.
Comptes Rendus de la Société Biologique, 66, 49-51. (6)
43. LEVY M., FISHMAN L. and SCHENKEIN I. (1970)
Mouse submaxillary gland proteases.
Methods in Enzymology (Academic Press N.Y. London), 19, 672-681. (72, 109)

44. LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. and RANDALL R.J. (1951)
Protein measurement with the folin phenol reagent.
J. Biol. Chem., 193, 265-275. (97)
45. LUMSDEN W.H.R. (1967)
Trends in research on the immunology of trypanosomiasis.
Bull. Org. Med. Santé, 37, 167-175. (12)
46. MATTHYSSENS G., MICHIELS F., HAMERS R., PAYS E. et STEINERT M. (1981)
Two variant surface glycoproteins of Trypanosoma brucei have a conserved C-terminus.
Nature, 293, 230-233. (10)
47. McNEILLAGE G.J.C. and HERBERT W.J. (1968)
Infectivity and virulence of Trypanosoma (Trypanozoon) brucei for mice. II comparison of closely related trypanosome antigenic types.
J. Comp. Path., 78, 345-349. (9)
48. OSAKI I. (1959)
Studies on the immunological variation in Trypanosoma gambiense (serotypes and the mode of relapse).
Biken's J., 2, 113-127. (9)
49. PAYS E., VAN MEIRVENNE N., LE RAY D. et STEINERT M. (1981)
Gene duplication and transposition linked to antigenic variation in Trypanosoma brucei.
Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 78, 2673-2677. (10)
50. PENKE B., FERENCZI R. and KOVACS K. (1974)
A new acid hydrolysis method for determining tryptophan in peptides and proteins.
Analytical Biochemistry, 60, 45-50. (102)

51. PLANTEY M.C. (1979)
Contribution à l'étude des antigènes variables de Trypanosoma equiperdum.
Thèse Doctorat 3ème Cycle BIOCHIMIE (12, 37, 40)
52. RAADT P. (DE) (1974)
Immunity and antigenic variation : clinical observations suggestive of immune phenomena in African trypanosomiasis.
In Ciba Fdn Symp. 20 NS, 199-224.
Amsterdam : Associate Scientific Publishers. (9)
53. REINHOLD V.N. (1972)
Gas-liquid chromatographic analysis of constituent carbohydrate in glycoproteins.
Methods in Enzymology (Hirs Ed) Academic Press New York San Francisco, London, 25, 244-249. (105)
54. ROCHAT H.G., BECHIS G., KOPEYAN C., GREGOIRE J. and VAN RIETSCHOTEN J. (1976)
Use of parvalbumin as a protecting protein in the sequanator ; an easy and efficient way for sequencing small amounts of peptides.
FEBS Lett., 64, 404-408. (116)
55. ROSNER L. (1940)
The reaction between iodoacetic acid and denaturated egg albumin.
J. Biol. Chem., 132, 657-661. (105)
56. ROUSSEL P., LAMBLIN G., DEGAND P., WALKER-NASIR E. et JEANLOZ R.W. (1975)
Heterogeneity of the carbohydrate chains of sulfated bronchial glycoproteins isolated from a patient suffering from cystic fibrosis.
J. Biol. Chem., 250, 2114-2122. (105)
57. RUSSEL H. (1936)
Observations an immunity in relapsing fever and trypanosomiasis.
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 30, 179-190. (9)

58. SEED J.R. and GAM A.A. (1966)
Passive immunity to experimental trypanosomiasis.
J. Parasit., 52, 1134-1140. (9)
59. SEED J.R. and EFFRON H.G. (1973)
Simultaneous presence of different antigenic populations of Trypanosoma brucei, gambiense in microtus montanus.
Parasitology, 66, 269-278. (9)
60. SEED J.R., KEMP W.H. and BROWN R.A. (1977)
Antigenic variation in the african trypanosomes : number and sequence.
Texas Journal of Science. Special Publication N°2, 3-13. (9)
61. SILVER J. and HOOD L.E. (1974)
Automated microsequence analysis in the presence of a synthetic "carrier".
Anal. Biochem., 60, 285-292. (116)
62. SOLTYS M.A. (1963)
Immunity in African Trypanosomiasis.
Bull. Org. Mond. Santé, 28, 753-761. (9)
63. STEERS E., CRAVEN G.R. and ANFINSEN C.B. (1965)
Evidence for nonidentical chains in the beta galactosidase of Escherichia coli K12.
J. Biol. Chem., 240, 2478-2484. (107)
64. TARR G.E., BEECHER J.F., BELL M. and McKEAW D. (1978)
Polyquaternary amines prevent peptide.
Anal. Biochem., 84, 622-627. (116)
65. VAN MEIRVENNE N., JANSSENS P.G. and MAGNUS E. (1975)
Antigenic variation in syringe passaged populations of Trypanosoma (Trypanozoon) brucei. I. Rationalization of the experimental approach.
Ann. Soc. Belge Med. Trop., 55, 1-23. (13)

66. VAN MEIRVENNE N., JANSSENS P.G. and MAGNUS E. (1975)
Antigenic variation in syringe passaged populations of Trypanosoma
(Trypanozoon) brucei. II. Comparative studies on two antigenic type
collections.
Ann. Soc. Belge Med. Trop., 55, 25-30. (9)
67. VICKERMAN K. and LUCKINS A.G. (1969)
Localization of variable antigens in the surface coat of Trypanosoma
brucei using ferritin-conjugated antibody.
Nature, 224, 1125-1126. (7)
68. VICKERMAN K. (1969)
On the surface coat and flagellar adhesion in trypanosomes.
J. Cell. Sci., 5, 163-193. (8)
69. VICKERMAN K. (1971)
Morphological and physiological considerations of extracellular
blood protozoa.
In "Ecology and Physiology of Parasites" ed (A.M. Fallis), 58-91.
University of Toronot Press. (9)
70. VICKERMAN K. (1978)
Antigenic variation in trypanosomes.
Nature, 273, 613-617. (9)
71. WATCKINS J.F. (1964)
Observations on antigenic variation in a strain of Trypanosoma
brucei growing in mice.
J. Hyg. Cambridge, 62, 69-80. (9)
72. WILLIAMS R.O., YOUNG J.R. and MARJIWA P.A.O. (1979)
Genomic rearrangements correlated with antigenic variation in Trypa-
nosoma brucei.
Nature, 282, 847-849. (10)

73. WILSON A.J. and CUNNINGHAM M.P. (1972)

Immunological aspects of bovine trypanosomiasis.

I. Immuno response of cattle infection with "Trypanosoma congolense"
and the antigenic variation of the infecting organisms.

Exp. Parasitol., 32, 165-173. (9)

