

50376
1983
231

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

50376
1983
231

Année 1983

N° d'ordre : 1078

THÈSE

présentée à l'Université de Lille I
pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE 3^{ème} CYCLE

spécialité : BIOCHIMIE

par

Gullemette HUET-DUVILLIER

ÉTUDE STRUCTURALE D'UN ANTIGÈNE VARIABLE DE *TRYPANOSOMA EQUIPERDUM*



Présentée le 7 octobre 1983 devant la Commission d'Examen

JURY

Président : M. MONTREUIL
Rapporteur : M. DEGAND
Membres : M. BISERTE
M. LE RAY
M. TAILLIEZ

DOYENS HONORAIRES DE L'ANCIENNE FACULTE DES SCIENCES

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

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

MM. ARNOULT, Mme BEAUJEU, BONTE, BROCHARD, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER,
CORSIN, DECUYPER, DEHEUVELS, DEHORS, DION, FAUVEL, FLEURY, P. 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

M. A. LEBRUN.

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

MM. R. DEFRETIN, M. PARREAU, J. LOMBARD, M. MIGEON.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DE LILLE

M. J. CORTOIS.

PROFESSEURS - CLASSE EXCEPTIONNELLE

| | |
|-----------------------|----------------------------------|
| M. DURCHON Maurice | Biologie expérimentale |
| M. GABILLARD Robert | Electronique |
| M. HEUBEL Joseph | Chimie minérale |
| M. MONTREUIL Jean | Biochimie |
| M. PARREAU Michel | Analyse |
| M. TRIDOT Gabriel | Chimie appliquée |
| M. VIVIER Emile | Biologie cellulaire |
| M. WERTHEIMER Raymond | Physique atomique et moléculaire |

PROFESSEURS - 1ère CLASSE

| | |
|-------------------------|--------------------|
| M. BACCHUS Pierre | Astronomie |
| M. BEAUFILS Jean Pierre | Chimie physique |
| M. BIAYS Pierre | Géographie |
| M. BILLARD Jean | Physique du solide |
| M. BOILLY Bénoni | Biologie |
| M. BONNOT Ernest | Biologie végétale |

| | |
|---------------------------|----------------------------------|
| M. BOUGHON Pierre | Algèbre |
| M. BOURIQUET Robert | Biologie végétale |
| M. CELET Paul | Géologie générale |
| M. CHAMLEY Hervé | Géotechnique |
| M. COEURE Gérard | Analyse |
| M. CONSTANT Eugène | Electronique |
| M. CORDONNIER Vincent | Informatique |
| M. DEBOURSE Jean Pierre | Gestion des entreprises |
| M. DELATTRE Charles | Géologie générale |
| M. ESCAIG Bertrand | Physique du solide |
| M. FAURE Robert | Mécanique |
| M. FOCT Jacques | Métallurgie |
| M. FOURET René | Physique du solide |
| M. GRANELLE Jean Jacques | Sciences économiques |
| M. GRUSON Laurent | Algèbre |
| M. GUILLAUME Jean | Microbiologie |
| M. HECTOR Joseph | Géométrie |
| M. LABLACHE COMBIER Alain | Chimie organique |
| M. LACOSTE Louis | Biologie végétale |
| M. LAVEINE Jean Pierre | Paléontologie |
| M. LEHMANN Daniel | Géométrie |
| Mme LENOBLE Jacqueline | Physique atomique et moléculaire |
| M. LHOMME Jean | Chimie organique biologique |
| M. LOMBARD Jacques | Sociologie |
| M. LOUCHEUX Claude | Chimie physique |
| M. LUCQUIN Michel | Chimie physique |
| M. MAILLET Pierre | Sciences économiques |
| M. PAQUET Jacques | Géologie générale |
| M. POUZET Pierre | Analyse numérique |
| M. PROUVOST Jean | Minéralogie |
| M. SALMER Georges | Electronique |
| M. SEGUIER Guy | Electrotechnique |
| M. STANKIEWICZ François | Sciences économiques |
| M. TILLIEU Jacques | Physique théorique |
| M. VIDAL Pierre | Automatique |
| M. ZEYTOUNIAN Radyadour | Mécanique |

PROFESSEURS - 2ème CLASSE

| | |
|-------------------------|----------------------------------|
| M. AL FAKIR Sabah | Algèbre |
| M. ALLAMANDO Etienne | Electronique et électrotechnique |
| M. ANCIAN Bernard | Spectrochimie |
| M. ANTOINE Philippe | Analyse |
| M. BART André | Biologie animale |
| Mme BATTIAU Yvonne | Géographie |
| M. BEGUIN Paul | Mécanique |
| M. BELLET Jean | Physique atomique et moléculaire |
| M. BERZIN Robert | Analyse |
| M. BKOUCHE Rudolphe | Algèbre |
| M. BODARD Marcel | Biologie végétale |
| M. BOIVIN Jean Claude | Chimie minérale |
| M. BONNELLE Jean Pierre | Catalyse |
| M. BOSCO Denis | Probabilités |
| M. BOUQUELET Stéphane | Biochimie structurale |
| M. BRASSELET Jean Paul | Géométrie et topologie |
| M. BREZINSKI Claude | Analyse numérique |
| M. BRIDOUX Michel | Chimie physique |

| | |
|-------------------------|---|
| M. BRUYELLE Pierre | Géographie |
| M. CAPURON Alfred | Biologie animale |
| M. CARREZ Christian | Informatique |
| M. CHAPOTON Alain | Electronique |
| M. COQUERY Jean Marie | Psychophysiologie |
| Mme CORSIN Paule | Paléontologie |
| M. CORTOIS Jean | Physique nucléaire et corpusculaire |
| M. COUTURIER Daniel | Chimie organique |
| M. CRAMPON Norbert | Hydrogéologie et environnement |
| M. CROSNIER Yves | Electronique |
| Mlle DACHARRY Monique | Géographie |
| M. DAUCHET Max | Informatique |
| M. DEBRABANT Pierre | Géologie appliquée |
| M. DEGAUQUE Pierre | Electronique |
| M. DELORME Pierre | Physiologie animale |
| M. DEMUNTER Paul | Sociologie |
| M. DENEL Jacques | Informatique |
| M. DE PARIS Jean Claude | Analyse |
| M. DEPREZ Gilbert | Physique du solide et cristallographie |
| M. DERIEUX Jean Claude | Microbiologie |
| Mlle DESSAUX Odile | Spectroscopie de la réactivité chimique |
| M. DEVRAINNE Pierre | Chimie minérale |
| M. DHAINAUT André | Biologie animale |
| Mme DHAINAUT Nicole | Biologie animale |
| M. DORMARD Serge | Sciences économiques |
| M. DOUKHAN Jean Claude | Physique du solide |
| M. DUBOIS Henri | Spectroscopie hertzienne |
| M. DUBRULLE Alain | Spectroscopie hertzienne |
| M. DUBUS Jean Paul | Spectrométrie des solides |
| M. DYMENT Arthur | Mécanique |
| Mme EVRARD Micheline | Chimie appliquée |
| M. FONTAINE Hubert | Dynamique des cristaux |
| M. FONTAINE Jacques | Electronique, électrotechnique, automatique |
| M. FOURNET Bernard | Biochimie structurale |
| M. FRONTIER Serge | Ecologie numérique |
| M. GAMBLIN André | Géographie urbaine, industrielle et démographie |
| M. GERVAIS Michel | Gestion |
| M. GLORIEUX Pierre | Physique moléculaire et rayonnements atmosphériques |
| M. GOBLOT Rémi | Algèbre |
| M. GOSSELIN Gabriel | Sociologie |
| M. GOUDMAND Pierre | Chimie Physique |
| M. GREMY Jean Paul | Sociologie |
| M. GREVET Patrick | Sciences économiques |
| M. GUILBAULT Pierre | Physiologie animale |
| M. HENRY Jean Pierre | Génie mécanique |
| M. HERMAN Maurice | Physique spatiale |
| M. HOUDART René | Physique atomique et moléculaire |
| M. JACOB Gérard | Informatique |
| M. JACOB Pierre | Probabilités et statistiques |
| M. JACQUILLAT Bertrand | Gestion |
| M. JOURNEL Gérard | Spectroscopie hertzienne |
| M. KREMBEL Jean | Biochimie |
| M. LAURENT François | Automatique |
| Mme LECLERCQ Ginette | Catalyse |
| M. LEFEVRE Christian | Pétrologie |
| Mlle LEGRAND Denise | Algèbre |
| Mlle LEGRAND Solange | Algèbre |

| | |
|----------------------------|---|
| Mme LEHMANN Josiane | Analyse |
| M. LEMAIRE Jean | Spectroscopie hertzienne |
| M. LENTACKER Firmin | Géographie |
| M. LEROY Jean Marie | Chimie appliquée |
| M. LEROY Yves | Electronique, électrotechnique, automatique |
| M. LESENNE Jacques | Electrotechnique |
| M. LEVASSEUR Michel | Sciences économiques |
| M. LHENAFF René | Géographie |
| M. LOCQUENEUX Robert | Physique théorique |
| M. LOSFELD Joseph | Informatique |
| M. LOUAGE Francis | Electronique |
| M. MACKE Bruno | Physique moléculaire et rayonnements atmosphériques |
| M. MAHIEU Jean Marie | Physique atomique et moléculaire. |
| M. MAIZIERES Christian | Automatique |
| Mlle MARQUET Simone | Probabilités |
| M. MESMACQUE Gérard | Génie mécanique |
| M. MESSELYN Jean | Physique atomique et moléculaire |
| M. MESSERLIN Patrick | Sciences économiques |
| M. MIGNOT Fulbert | Analyse numérique |
| M. MONTEL Marc | Physique du solide |
| M. MONTUELLE Bernard | Biologie et biochimie appliquées |
| Mme N'GUYEN VAN CHI Régine | Géographie |
| M. NICOLE Jacques | Chimie analytique |
| M. NOTELET Francis | Electronique, électrotechnique, automatique |
| M. PARSY Fernand | Mécanique |
| Mlle PAUPARDIN Colette | Biologie physiologie végétales |
| M. PECQUE Marcel | Chimie organique |
| M. PERROT Pierre | Chimie appliquée |
| M. PERTUZON Emile | Physiologie animale |
| M. PETIT Francis | Chimie organique, minérale et analytique |
| M. PONSOLLE Louis | Chimie physique |
| M. PORCHET Maurice | Biologie animale |
| M. POVY Lucien | Automatique |
| M. RACZY Ladislas | Electronique |
| M. RAOULT Jean François | Géologie structurale |
| M. RICHARD Alain | Biologie animale |
| M. RIETSCH François | Physique des polymères |
| M. ROGALSKI Marc | Analyse |
| M. ROUSSEAU Jean Paul | Physiologie animale |
| M. ROY Jean Claude | Psychophysiologie |
| Mme SCHWARZBACH Yvette | Géométrie |
| M. SCHAMPS Joël | Spectroscopie moléculaire |
| M. SIMON Michel | Sociologie |
| M. SLIWA Henri | Chimie organique |
| M. SOMME Jean | Géographie |
| Mlle SPIK Geneviève | Biochimie |
| M. STERBOUL François | Informatique |
| M. TAILLIEZ Roger | Génie alimentaire |
| M. THERY Pierre | Electronique, électrotechnique, automatique |
| M. TOULOTTE Jean Marc | Automatique |
| M. TURREL Georges | Spectrochimie Infrarouge et Raman |
| M. VANDORPE Bernard | Chimie minérale |
| M. VAST Pierre | Chimie inorganique |
| M. VERBERT André | Biochimie |
| M. VERNET Philippe | Génétiq |
| M. VILETTE Michel | Résistance des matériaux |
| M. WALLART Francis | Spectrochimie Infrarouge et Raman |
| M. WARTEL Michel | Chimie inorganique |

M. WATERLOT Michel
M. WERNER Georges
M. WOSNIAK Michel
Mme ZINN JUSTIN Nicole

Géologie générale
Informatique fondamentale appliquée
Hydrométallurgie
Algèbre

Ce travail a été effectué dans le Laboratoire de L'unité des protéines (Unité n° 16 INSERM) dirigée par Monsieur le Professeur ROUSSEL à qui je suis très reconnaissante de m'avoir accueillie dans son groupe.

Je tiens à remercier en particulier Monsieur le Professeur DEGAND de m'avoir permis de réaliser cette thèse, et de m'avoir guidée et conseillée tout au long de ce travail.

Monsieur le Professeur MONTREUIL nous fait l'honneur de présider ce Jury de thèse, qu'il veuille trouver ici l'expression de notre respectueuse gratitude.

Nous tenons à remercier toutes les Personnalités de ce Jury d'avoir accepté de juger ce mémoire.

Je suis très reconnaissante à Monsieur BALTZ et au groupe de Monsieur le Professeur PAUTRIZEL d'avoir assuré la préparation de notre matériel d'étude.

Je tiens à témoigner ma profonde amitié à tous les membres de l'équipe qui m'ont apporté aides, conseils et encouragements.

Je remercie aussi en particulier :

Monsieur AUBERT, Chargé de Recherches INSERM (Unité N° 124), pour la réalisation des études par dichroïsme circulaire.

Monsieur NOUVELOT, Maître-Assistant de l'Université de Lille I, pour la réalisation des analyses d'acides gras.

Monsieur le Professeur MAZUCCA pour son aide personnelle dans les illustrations de cette thèse.

Mademoiselle MILLEVILLE qui a dactylographié cette thèse avec beaucoup de gentillesse.

NOS RECHERCHES ONT BENEFICIE
D'UNE AIDE FINANCIERE
DE L'INSERM :
CRL 81 30 22

Ce travail a fait l'objet des publications suivantes :

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

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

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

The variable surface glycoproteins of *Trypanosoma equiperdum* are phosphorylated.

BALTZ T., GIROUD C., BALTZ D., DUVILLIER G., DEGAND P., DEMAILLE J. and PAUTRIZEL R. (1982)

EMBO J., 1, 1393-1398.

Variant specific surface antigens from *Trypanosoma equiperdum* : chemical and physical studies.

DUVILLIER G., AUBERT J.P., BALTZ T., RICHEL C. and DEGAND P. (1983)

Biochem. Biophys. Res. Comm., 110, 491-498.

Partial determination of the primary structure of a variant surface glycoprotein from *Trypanosoma equiperdum*. Composition and location of a carbohydrate moiety.

DUVILLIER G., RICHEL C., BRIAND G., BALTZ T. and DEGAND P. (1983)

Mol. Biochem. Parasitol., 8, 17-30.

The variant surface glycoproteins of *Trypanosoma equiperdum* : identification of the phosphorylated glycopeptide as the cross reacting antigenic determinant.

BALTZ T., DUVILLIER G., GIROUD C., RICHEL C., BALTZ D., and DEGAND P. (1983)

FEBS Letters, in press.

Presence of glycerol and fatty acids in the C-terminal end of a variant surface glycoprotein from *Trypanosoma equiperdum*.

DUVILLIER G., NOUVELOT A., RICHEL C., BALTZ T. and DEGAND P. (1983)

Biochem. Biophys. Res. Comm., in press.

ABREVIATIONS UTILISEES DANS LE TEXTE

| | |
|-------|---|
| AVS | antigène spécifique de variant |
| 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 | phénylthiohydantoïne |
| TFA | acide trifluoroacétique |
| SDS | sodium dodécyl sulfate |

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

CHAPITRE I : LA VARIATION ANTIGENIQUE

| | |
|---|----|
| I- <u>Morphologie générale et cycle évolutif - Aspects biologiques</u> | 3 |
| II- <u>Aspects immunologiques</u> | 5 |
| 1- Biologie générale et variation antigénique | 6 |
| 2- Hétérogénéité antigénique des populations trypanosomales | 7 |
| 3- Succession des divers types antigéniques variables au cours de l'infection chronique | 8 |
| 4- Rôle des anticorps dans le phénomène de variation antigénique | 10 |
| III- <u>Aspects génétiques</u> | 12 |
| A- <u>Etude des séquences nucléotidiques des DNA complémentaires clonés</u> | 12 |
| 1- Séquence nucléotidique traduite | 12 |
| a) Extension C-terminale hydrophobe, absente des glycoprotéines isolées et purifiées | 12 |
| b) Nature de l'acide aminé C-terminal des glycoprotéines isolées | 13 |
| c) Existence d'une homologie au niveau de la région 3'-terminale | 14 |
| d) Séquence N-terminale "signal" | 20 |
| e) Etat actuel des connaissances sur les AVS de <u>T. b. brucei</u> | 20 |
| 2- Séquence nucléotidique non traduite | 20 |
| B- <u>Utilisation des techniques d'hybridation</u> | 20 |
| 1- Pour un sérodème donné, chaque variant antigénique contient le répertoire entier des gènes codant pour les AVS de ce sérodème. | 21 |
| 2- Chaque DNA complémentaire spécifique d'un AVS est capable de reconnaître au niveau des différents génomes d'un répertoire, une famille de gènes apparentés (isogènes). | 21 |
| 3- L'expression de certains AVS est liée à une duplication du gène et à | 21 |

| | |
|--|----|
| la transposition de la "copie" au niveau d'un site d'expression. | |
| a) copie de base et copie liée à l'expression | 21 |
| b) l'ELC représente le gène actif | 22 |
| c) caractéristiques du processus de transposition | 23 |
| d) analyse du site d'expression | 26 |
| 4- Certains gènes spécifiques sont exprimés sans qu'il soit possible de détecter un mécanisme de duplication et transposition. | 28 |
| 5- Evolution des gènes codant pour les glycoprotéines de surface. | 30 |
| | |
| IV- <u>Aspects biochimiques</u> | 32 |
| | |
| 1- Isolement | 32 |
| 2- Caractérisation des AVS | 33 |
| 3- Etudes structurales | 33 |
| 4- Réactivité immunologique croisée entre les antigènes purifiés | 35 |
| 5- Glycosylation des molécules d'AVS | 36 |
| 6- Détachement et fonction de l'extension hydrophobe C-terminale | 39 |
| 7- Organisation moléculaire du manteau | 39 |

CHAPITRE II : TRAVAUX PERSONNELS

| | |
|---|----|
| I- <u>Isolement, purification et caractérisation physico-chimique des AVS de T. equiperdum</u> | 42 |
| | |
| A- <u>Introduction</u> | 42 |
| | |
| B- <u>Préparation des AVS de T. equiperdum</u> | 44 |
| | |
| 1- Isolement des trypanosomes | 45 |
| 2- Libération du manteau de surface parasitaire | 45 |
| 3- Purification de l'antigène variable | 45 |
| | |
| C- <u>Etude des propriétés physico-chimiques des AVS de T. equiperdum</u> | 46 |
| | |
| 1- Estimation de la masse moléculaire apparente en gel de polyacrylamide en présence de SDS | 46 |
| 2- Détermination de la valeur du point isoélectrique par isoélectrofocalisation en gradient de pH | 48 |

| | |
|---|----|
| 3- Etude en dichroïsme circulaire | 51 |
| a. Spectre dichroïque | 51 |
| b. Dénaturation thermique | 51 |
| 4- Composition amino acide | 51 |
| 5- Séquence N-terminale | 55 |
| 6- Composition glucidique | 59 |
| 7- Mise en évidence d'une phosphorylation | 59 |
| | |
| D- <u>Conclusion</u> | 61 |
| | |
| II- <u>Etude structurale de l'AVS BoTat-1</u> | 65 |
| | |
| A- <u>Traitement de la glycoprotéine réduite et S-alkylée par le bromure de cyanogène</u> | 68 |
| | |
| 1- Résultat du clivage en gel de polyacrylamide | 68 |
| 2- Fractionnement sur colonne de Bio-gel | 68 |
| 3- Caractérisation des fractions obtenues après Bio-gel P100 | 71 |
| a) Etude en gel de polyacrylamide en présence de SDS | 71 |
| b) Composition amino acide | 71 |
| c) Composition en sucres | 71 |
| d) Etude en électrophorèse d'affinité avec la Concanavaline A | 75 |
| 4- Etude de la séquence amino acide de quelques fractions | 76 |
| 5- Conclusion | 78 |
| | |
| B- <u>Etude de la partie N-terminale de l'AVS BoTat-1 à partir du clivage par le bromure de cyanogène</u> | 80 |
| | |
| 1- Introduction | 80 |
| 2- Résultats | 83 |
| 3- Conclusion | 86 |
| | |
| C- <u>Etude de la partie C-terminale de l'AVS BoTat-1 à partir du clivage par le bromure de cyanogène</u> | 86 |
| | |
| 1- Introduction | 86 |
| 2- Hydrolyse par la protéase de <u>S. aureus</u> | 89 |
| 3- Hydrolyse par la chymotrypsine | 92 |

| | |
|---|-----|
| 4- Clivage au niveau des résidus de cystéine | 92 |
| a. Protocole | 92 |
| b. Modification chimique de la glycoprotéine - Aminoéthylation des résidus de cystéine | 96 |
| c. Hydrolyse par la trypsine | 96 |
| 5- Conclusion | 98 |
| | |
| D- <u>Caractéristiques de l'extrémité C-terminale de l'AVS BoTat -1</u> | 100 |
| | |
| 1- Suspicion de l'existence de lipides dans l'AVS BoTat -1 par coloration avec le noir Soudan | 100 |
| 2- Détermination de la structure C-terminale de l'AVS BoTat -1 | 101 |
| a. Hydrolyse trypsique | |
| b. Analyse du glycopeptide trypsique C-terminal | 101 |
| * composition amino acide | 102 |
| * composition en sucres | 102 |
| * teneur en phosphore | 102 |
| * caractérisation de glycérol | 106 |
| * analyse qualitative des acides gras | 108 |
| c. Conclusion | 110 |
| 3- Obtention des deux glycopeptides C-terminaux par action de la protéinase K | 110 |
| | |
| CONCLUSION GENERALE | 114 |
| | |
| APPENDICE TECHNIQUE | 118 |
| | |
| BIBLIOGRAPHIE | 151 |

INTRODUCTION

Si, depuis le début de ce siècle, la médecine a enregistré des succès tels qu'ils ont entraîné une augmentation sensible de notre espérance de vie, il demeure à ce jour des domaines où l'évolution des connaissances fondamentales est indispensable à la mise au point de tests diagnostiques ou à la définition de nouveaux concepts thérapeutiques. C'est le cas en particulier de la pathologie parasitaire.

Aujourd'hui les plus grands fléaux à l'échelle de continents relèvent de cette discipline. L'Amérique du sud, l'Afrique sont à ce titre l'objet de la préoccupation constante de grands organismes socio-économiques tels que l'OMS et de plus en plus la Recherche Internationale ouvre à la Parasitologie toutes les disciplines fondamentales. Les insuccès mêmes provoquent une curiosité croissante qui mobilise Morphologistes, Immunologistes, Biophysiciens, Généticiens, Biochimistes ...

Notre participation à ces recherches est le fait d'une collaboration avec le laboratoire d'Immunologie et de Biologie Parasitaire de Bordeaux, mais aussi de l'intérêt très réel que nous avons porté à la connaissance d'un phénomène biologique tout à fait original : celui de la "variation antigénique" des trypanosomes, phénomène membranaire dont le mécanisme biologique est encore à ce jour peu explicité. Sa meilleure connaissance laisse entrevoir à la fois sur le plan diagnostique et thérapeutique des progrès très sensibles.

Notre travail s'inscrit ambitieusement dans ce cadre. Il utilise un modèle non pathologique pour l'homme, Trypanosoma equiperdum, dont on sait que les données de la Biologie liée à la variation antigénique sont identiques à celles des espèces reconnues pathogènes pour l'homme = T. brucei gambiense et T. brucei rhodesiense.

La maladie du sommeil est l'apanage de l'Afrique. Les deux espèces se partagent d'ailleurs ce continent :

T. b. gambiense, l'Afrique équatoriale, occidentale et centrale ;

T. b. rhodesiense, l'est et le sud.

Deux symptomatologies différentes : la première d'évolution chronique à réservoir de virus humain (T. b. gambiense), la seconde d'évolution aiguë avec réservoir de virus animal (T. b. rhodesiense).

Trypanosoma equiperdum, notre modèle, affecte l'animal de manière exclusive. Il représente une approche expérimentale transposable aux espèces intéressant l'homme.

Chapitre I : LA VARIATION ANTIGENIQUE

Aspects biologiques, immunologiques, génétiques, et biochimiques.

Les trypanosomes sont des protozoaires flagellés appartenant à l'ordre kinetoplastida et à la famille des Trypanosomidae. Le cycle biologique de ces parasites se caractérise par un passage d'un hôte intermédiaire invertébré à un hôte définitif vertébré. Ce cycle est marqué aussi par une évolution du parasite dans laquelle on peut distinguer plusieurs stades de développement caractérisés par une modification dans la morphologie et l'activité biochimique.

I- Morphologie générale et cycle évolutif - Aspects biologiques

En raison de son aptitude à se multiplier chez le rongeur en laboratoire, T. brucei brucei constitue un modèle d'étude privilégié de la maladie du sommeil. Le cycle évolutif du parasite est représenté dans la Figure 1.

Rappelons que l'insecte vecteur est la mouche tsé-tsé ou glossine.

L'insecte contaminé transmet lors de la piqûre, par régurgitation salivaire, le parasite à un hôte sain. Le trypanosome adopte aussitôt une forme appelée trypomastigote ou trypanosoma. Ce stade se caractérise alors par un noyau central, un kinétoplaste rétronucléaire proche de l'extrémité postérieure du flagelle, et enfin un manteau de surface recouvrant la totalité de la membrane plasmique. Il faut souligner qu'une importante diversité morphologique peut être observée au niveau de l'hôte définitif (Figure 1) : le trypanosome peut passer d'une forme longue et élancée avec flagelle libre à une forme courte et massive dépourvue de flagelle libre. Les formes élancées possèdent un tube mitochondrial peu développé. Lorsqu'elles se transforment en formes massives, le mitochondrion commence alors à proliférer et à devenir plus actif. Si les formes élancées se multiplient par fission binaire dans le sang des mammifères, par contre les formes massives ne se multiplient pas chez l'hôte définitif, et l'on pense généralement qu'elles représentent un stade de "préadaptation" nécessaire à la survie chez l'hôte intermédiaire. Elles sont en effet seules capables de se développer chez l'insecte vecteur et donc d'initier le cycle.

CYCLE EVOLUTIF DE Trypanosoma brucei
(VICKERMAN, 1969)

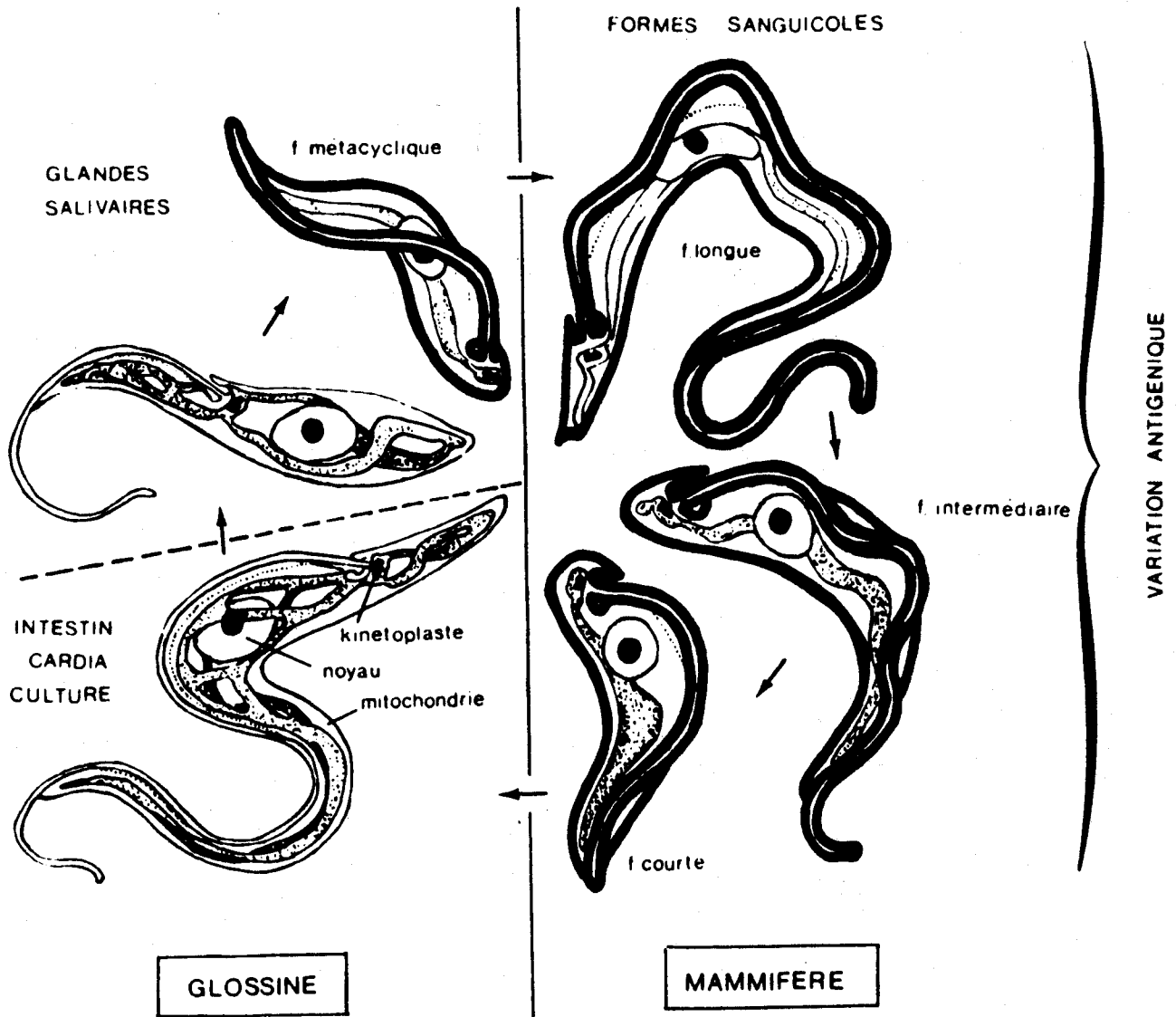


FIGURE 1

La morphologie parasitaire au niveau de l'intestin moyen de la mouche se caractérise par la présence d'un kinétoplaste cette fois situé en avant du noyau et à distance de l'extrémité postérieure du flagelle, et par un réseau extensif de tubes mitochondriaux. La perte du manteau de surface est un élément également caractéristique de ce stade. Cette forme est appelée épimastigote ou crithidia ou encore procyclique. Après 3 semaines de séjour intestinal, les parasites migrent vers les glandes salivaires de l'insecte où ils adoptent une forme trypanomastigote appelée métacyclique, morphologiquement très proche de la forme trypanomastigote sanguicole.

Les trypanosomes métacycliques, à l'opposé des trypanosomes procycliques, sont infestants pour l'hôte définitif.

La plupart des trypanosomes sont caractérisés par ce stade de développement chez la mouche tsé-tsé, à l'exception toutefois de T. evansi et T. equinum transmis par les tabanidés et T. equiperdum, notre modèle expérimental, transmis par contact "vénérien".

II- Aspects immunologiques

L'infection chronique parasitaire est caractérisée par l'apparition cyclique de pics et de rémissions parasitémiques. Les trypanosomes qui se multiplient abondamment, sont détruits en grande partie par le système immunitaire de l'hôte. Seul un petit nombre, qui au niveau membranaire a changé "d'enveloppe" donc de spécificité antigénique, va pouvoir échapper aux mécanismes de défense et proliférer encore pour donner bientôt un nouveau pic parasitémique.

La "variation antigénique" est une propriété qui a été démontrée pour la plupart des espèces trypanosomales de la section Salivaria : T. b. brucei (RITZ, 1916) (112)), T. b. rhodesiense (LOURIE et O'CONNOR, 1937) (86), T. b. gambiense (OSAKI, 1959) (98), T. vivax (CLARKSON et AWAN, 1967) (27), T. congolense (WILSON et CUNNINGHAM, 1972) (133), T. equiperdum (CAPBERN et coll, 1977) (23).

Les antigènes impliqués dans le processus sont appelés antigènes variables ou antigènes spécifiques de variants (AVS). Nous utilisons fréquemment par commodité le sigle dans la suite de ce mémoire.

Au niveau du parasite le phénomène de variation antigénique se rapporte au manteau de surface des formes sanguicoles trypanosomales ; VICKERMAN et LUCKINS (1969) (128) ont en effet pu montrer une localisation à ce niveau à l'aide d'anticorps spécifiques de variants marqués à la ferritine. CROSS en 1975 (28) a montré que le "manteau de surface" des trypanosomes était d'ailleurs principalement constitué d'un composant de nature glycoprotéique, seul responsable de la spécificité immunologique des variants. Elucider le mécanisme biologique conduisant au phénomène de la variation antigénique est devenu un thème de recherche de premier intérêt. En fonction de l'évolution des techniques plusieurs phases peuvent être distinguées dans le cheminement des idées et l'interprétation des résultats. Recensons les principaux acquis :

1- Biologie générale et variation antigénique :

Travaux de GRAY et coll (1964) (43), (1965a) (44), (1965b) (45), (1967) (46), (1972) (47), (1975) (48), 1976 (49).

GRAY et coll ont beaucoup apporté et furent parmi les premiers à montrer que certains antigènes de clones étaient plus souvent rencontrés pendant les périodes précoces de l'infection. Ils furent désignés sous le nom "d'antigènes prédominants". De plus les mêmes auteurs ont précisé un fait biologique très important, celui de la réversion à un type antigénique de base (antigène basique de la souche) après accomplissement du cycle de développement dans l'insecte vecteur. Ce phénomène était également observé par JENNI en 1977 (70) (71), et confirmé par HUDSON et coll en 1980 (66).

GRAY a ensuite observé une organisation dans l'ordre d'apparition des variants antigéniques pendant les premières étapes de l'infection. Aux stades plus tardifs (après plus d'un mois d'évolution de la parasitémie), la séquence n'était plus toujours aussi rigoureusement identique et prévisible ; toutefois des types antigéniques identiques pouvaient être reconnus dans des infections différentes. La reproductibilité du phénomène biologique partant d'une souche donnée a été aussi démontrée par les études d'inoculation expérimentale à la seringue.

Pour GRAY, la nature réversible de la variation antigénique avec particulièrement l'existence d'un type antigénique de base apparaissant en premier lieu, ainsi que le schéma organisé et constant, reconnu au cours des

premières étapes du processus biologique étaient tous deux en faveur d'un mécanisme adaptatif : en l'absence de résistance immunitaire, soit dans l'environnement dépourvu d'anticorps de l'hôte non immunisé lors d'une primo-inoculation expérimentale ou bien de la mouche lors d'une transmission naturelle cyclique, l'antigène de base tend à remplacer les antigènes variables. La synthèse par l'hôte d'anticorps contre ce type antigénique de base déclencherait le changement d'antigène pour un autre programmé dans la succession et ainsi de suite. La variation antigénique se produirait adaptativement à la réponse immunitaire et ceci suivant un ordre défini dans le génome.

Une telle interprétation laissait à penser que de fructueuses tentatives de vaccination pouvaient être envisagées, car il suffisait dans ce cas de procurer une immunisation contre le type antigénique de base ou peut-être contre les antigènes prédominants. Malheureusement le problème d'une approche thérapeutique s'est avéré beaucoup plus complexe.

2- Hétérogénéité antigénique des populations trypanosomales

Une analyse plus précise des populations trypanosomales a pu être réalisée avec l'utilisation des techniques d'immunofluorescence et d'immunolyse (VAN MEIRVENNE et coll (1975a) (124).

LE RAY et coll (1977) (81), et encore JENNI (1977b) (71) ont montré que les populations trypanosomales de la première parasitémie après transmission cyclique étaient antigéniquement hétérogènes. Au regard des travaux de JENNI (1977) (70) (71) concernant la tendance à la réversion pour un type antigénique de base au cours de la transmission cyclique, l'hétérogénéité antigénique n'apparaît qu'au niveau de l'hôte définitif. LE RAY et coll pour leur part ont suggéré dès 1977 que cette hétérogénéité pouvait être déjà préexistante au niveau de l'hôte intermédiaire. A ce titre, les auteurs se sont penchés sur l'étude des trypanosomes métacycliques issus des glandes salivaires de la mouche vectrice. LE RAY et coll (1978) (82) puis BARRY et coll (1979) (8) confirment cette hypothèse montrant qu'il n'existe pas d'homogénéité au niveau des types antigéniques variables métacycliques. A la suite des travaux de HAJDUK et VICKERMAN (1981a) (52), plusieurs règles fondamentales peuvent être retenues pour caractériser l'évolution antigénique

des parasites chez la mouche puis chez l'hôte définitif :

. Quelque soit le type antigénique ingéré par la mouche, il se développe au niveau de ses glandes salivaires un "répertoire antigénique métacyclique" caractéristique.

. Après transmission cyclique, les premiers types antigéniques détectés (environ 3 à 4 jours après l'infection) correspondent aux types métacycliques. Ils disparaissent ensuite pour donner naissance à environ une vingtaine de sérotypes variables non métacycliques, constituant la première vague de recrudescence parasitémique décelée approximativement 10 jours après l'infection.

. Enfin, il a pu être observé que la nature du type antigénique ingéré par la mouche avait une influence sur la composition antigénique de cette parasitémie ; en particulier, le sérotype ingéré par la mouche semble se développer de façon prépondérante au cours de cette recrudescence parasitaire.

Par ailleurs, HAJDUCK et coll (1981) (53) étendant les travaux à d'autres sérodèmes ont pu montrer que chacun d'entre eux possédait un répertoire distinct de types métacycliques.

Avec toutes ces observations l'on peut réaliser toute la complexité de l'approche thérapeutique immunitaire de la trypanosomiase africaine.

3- Succession des divers types antigéniques variables au cours de l'infection chronique.

L'observation de GRAY, concernant le schéma d'apparition des variants antigéniques au cours de l'infection chronique a été nuancée par d'autres études portant sur l'analyse de la variation antigénique issue d'une infestation par une population parasitaire clonée.

VAN MEIRVENNE et coll (1975) (124) (125) (1977) (126) a inventorié dans le même domaine et s'est intéressé à une étude expérimentale de la variation antigénique induite par inoculation à la seringue d'un unique clone trypanosomal de T. b. brucei. Dans ces conditions, l'auteur a pu observer que la population de première parasitémie était sensiblement homogène, constituée à plus de 99 % par un type antigénique majeur appelé homotype. Après

destruction immunitaire de l'homotype, un ou plusieurs des sérotypes mineurs (hétérotypes) se mettaient à proliférer, et ainsi les pics successifs de parasitémies pouvaient contenir un ou plusieurs sérotypes majeurs. VAN MEIR-
VENNE et coll ont pu établir avec ce protocole de transmission éliminant le facteur hôte intermédiaire, que toutes les infections étaient caractérisées par le développement en premier lieu de certains sérotypes "prédominants".

CAPBERN et coll (1977) (23) se sont intéressés de leur côté au processus de variation antigénique chez T. equiperdum, déclenché également par inoculation d'une population parasitaire clonée. Les observations suivantes ont pu être dégagées :

- * le premier sérotype détecté correspond toujours à celui ayant servi à l'inoculation

- * quelque soit le clone choisi pour l'infestation, le premier sérotype qui lui succède est toujours le même. CAPBERN et coll l'ont dénommé "type de base" de la souche

- * plus de 100 sérotypes ont été isolés dans la suite de l'infection, et séparés en 3 catégories en fonction de leur délai d'apparition chez l'animal :

- types "précoces", apparaissant dans les 3 premières semaines de la maladie
- types "semi-tardifs" se développant au delà des 3 premières semaines
- types "tardifs" caractérisés uniquement chez les lapins ayant survécu plus d'un mois

- * les types précoces apparaissent dans un ordre relativement stable

Les études ainsi réalisées par injection avec un clone unique ont montré qu'il existait un schéma relativement constant dans la succession des variants antigéniques. Toutefois, il ne s'agit pas d'un schéma rigoureusement conservé dans les différentes infections. Cette faculté de légère modification dans la succession des types antigéniques vient encore accroître le potentiel parasitaire de résistance au système immunitaire de l'hôte. Par cette irrégularité dans la programmation, les tentatives de prévention de la maladie par immunisation contre les sérotypes les plus précoces se trouvent encore compromises.

Les bases du mécanisme de cette variation dans l'ordre d'apparition des variants antigéniques n'ont pas encore pu être déterminées précisément. Il a

été évoqué des différences existant au niveau des taux de croissance selon les variants, différences dues à des effets de compétition s'exerçant entre les variants d'un même stock (SEED et coll, (1977) (117) ; SEED (1978) (118)). A ce titre, KOSINSKI (1980) (75) s'est livré à un calcul mathématique portant sur un modèle de 90 variants possédant des taux de croissance largement différents. D'après son étude, une production spontanée de variants suivie d'une sélection s'opérant uniquement à travers le taux de croissance ne semble pas capable de donner le degré d'ordre jusqu'ici rapporté dans la littérature. D'autres travaux laissent d'ailleurs entendre que l'ordre d'apparition ne dépend pas uniquement des taux de croissance : MILLER et TURNER (1981) (96) se sont intéressés à une analyse plus approfondie des types antigéniques des premières populations de rechute initiées par différents inoculum clonés de T. b. brucei appartenant au même sérodème. Ils ont signalé que les types antigéniques pouvaient être groupés en 3 catégories selon leur fréquence d'expression dans les différentes rechutes : certains variants sont exprimés dans la majorité des cas, d'autres sont seulement décelés occasionnellement et d'autres enfin ne sont apparus que pour un seul clone. Les auteurs ont ainsi proposé que chaque type antigénique nouveau soit exprimé selon un ordre de priorité statistiquement définissable, différent pour chaque variant initial. Selon eux, les variants prédominants représentent un groupe de types antigéniques qui possèdent une forte probabilité de dérivation à partir des autres types antigéniques.

Il pourrait donc exister au niveau du changement de gène un mécanisme responsable d'une certaine programmation dans la succession des types antigéniques.

4- Rôle des anticorps dans le phénomène de variation antigénique

On a longtemps pensé que le processus de variation antigénique était en quelque sorte une réponse du parasite à l'apparition des anticorps synthétisés par l'hôte. Autrement dit, le trypanosome changeait d'antigène dans le but unique d'échapper à la destruction immunitaire. Cette hypothèse peut maintenant être définitivement abandonnée comme élément dominant du mécanisme de variation antigénique.

En 1975 déjà, VAN MEIRVENNE et coll (1975a) (124) avaient remarqué que le processus de variation antigénique était décelable dans les tous premiers stades de l'infection, avant apparition d'une défense immunitaire.

LE RAY et coll (1978) (82) ont ensuite montré que des glossines infectées par un clone donné, exhibaient au bout de 2 semaines une diversité de types antigéniques au niveau de leurs glandes salivaires. Cette observation suggérait pour les auteurs que les anticorps ne jouaient pas un rôle indispensable dans l'induction du processus.

Avec l'utilisation du protocole de culture de formes trypomastigotes sur support cellulaire développé par HIRUMI et coll (1977) (58) (59), DOYLE et coll (1980) (34) ont démontré que la variation antigénique était capable de se produire *in vitro* et avec une direction similaire à celle rencontrée "*in vivo*". Les auteurs ont d'autre part obtenu, de la même façon "*qu'in vivo*", et à partir de populations clonées, des populations de rechutes antigéniquement hétérogènes. Ils ont toutefois souligné qu'il existait une différence entre le temps nécessaire pour détecter un type antigénique nouveau "*in vivo*" et "*in vitro*" :

"*in vivo*" : 10 à 12 jours après l'infection de la souris

"*in vitro*" : 35 à 46 jours après l'initiation de la culture.

Si donc la variation antigénique se produit réellement de façon similaire, en l'absence d'anticorps, elle ne répond plus à un mécanisme adaptatif selon lequel le parasite change d'antigène au fur et à mesure que l'hôte synthétise des anticorps pour échapper aux moyens immunologiques de son hôte. Selon les auteurs, le processus de variation antigénique se produirait à une basse fréquence dans une population de trypanosomes, et les nouveaux variants deviendraient apparents dans les rechutes successives tandis que les précédents seraient éliminés par le système immunitaire de l'hôte.

Enfin, il a été également montré que le processus de variation antigénique pouvait avoir lieu chez l'animal immuno-supprimé (HAJDUK et VICKERMAN (1981b) (54)).

Il semble que l'on s'accorde actuellement à dire que les anticorps de l'hôte n'ont aucune participation inductive dans la modification des types antigéniques. Ils interviennent seulement, de par leur pouvoir éliminatoire, dans la sélection des variants.

III- Aspects génétiques

De nombreux auteurs se sont penchés, depuis ces trois dernières années sur le phénomène de variation antigénique sous l'angle des acides nucléiques. Deux voies d'approche ont été envisagées :

- * la connaissance des séquences nucléotidiques codant pour la synthèse des divers antigènes variables

- * le problème des modifications génomiques accompagnant l'expression successive des différents gènes

Toutes ces études dépendaient de la disponibilité du DNA cloné complémentaire au RNA messenger spécifique d'un antigène variable de surface.

Plusieurs équipes se sont attachées à la définition d'un protocole de préparation de ce matériel (WILLIAMS et coll (1978) (130), WILLIAMS et coll (1979) (131), LHEUREUX et coll (1979) (84), PAYS et coll (1980) (99), HOEIJMAKERS et coll (1980a) (60)).

A- Etudes des séquences nucléotidiques des DNA complémentaires clonés

1- Séquence nucléotidique traduite

- a) existence d'une extension C-terminale hydrophobe, absente des glycoprotéines de surface isolées et purifiées.

Les premiers travaux dans ce domaine ont été publiés par le groupe de BOOTHROYD et coll (1980) (13) sur l'AVS 117, dont la séquence amino acide avait été déterminée en particulier dans la région C-terminale. Les auteurs avaient alors identifié la séquence des 445 nucléotides de l'extrémité 3' de l'insertion plasmidique. En comparant ces derniers résultats avec l'analyse en séquence peptidique, ils ont montré que la glycoprotéine isolée était exempte de la séquence hydrophobe correspondant aux 23 derniers codons avant le codon stop du DNA.

BOOTHROYD et coll (1981) (14) ont par la suite procédé à la détermination des séquences nucléotidiques codant pour l'extrémité C-terminale

d'un autre AVS (221) appartenant au même stock cloné que l'AVS 117. Ils purent à nouveau mettre en évidence l'absence d'une queue C-terminale hydrophobe de 23 résidus dans la glycoprotéine isolée. En outre, les 2 extensions se terminaient par les 3 mêmes résidus : Leu-Leu-Phe.

Des extrémités hydrophobes spécifiques de 5 autres AVS ont par la suite été caractérisées (MAJUMDER et coll (1981) (92) ; MATTHYSSENS et coll (1981) (93) ; RICE-FICHT et coll (1981) (111)). Il s'est dégagé de cet ensemble que toutes se terminaient par 8 résidus hydrophobes avec comme séquence des 3 derniers résidus Leu-Leu-Phe ou Leu-Leu-Leu. Il s'avérait cependant qu'elles se distinguaient en deux groupes suivant leur taille : 23 résidus pour les AVS 117, 118, IITat 1.3, AnTat 1.1, AnTat 1.8 ; 17 résidus pour les AVS 221 et IITat 1.1.

La fonction précise de cette extension ainsi que les conditions de sa rupture restent encore à élucider.

Nous reviendrons sur les hypothèses susceptibles d'être formulées dans ces deux domaines.

b) nature de l'acide aminé C-terminal des glycoprotéines isolées

En plus de l'observation précédente concernant le détachement d'une partie C-terminale du premier produit de traduction des gènes spécifiques d'antigènes variables, la double étude menée par BOOTHROYD et coll (1980) (13) a permis d'obtenir des informations très originales au sujet de l'acide aminé C-terminal de la glycoprotéine mature de l'AVS 117 ; l'hydrolyse trypsique de la molécule dénaturée a abouti à l'obtention d'un glycopeptide C-terminal, dont l'analyse a révélé d'une part que la glycosylation était portée par l'acide aminé tout a fait C-terminal, et d'autre part que ce dernier résidu était vraisemblablement une asparagine ou peut être un acide aspartique, l'utilisation d'une hydrolyse acide dans ce protocole expérimental ne permettant pas de faire la distinction. Fait surprenant, la détermination de la séquence nucléotidique a montré que le codon correspondant à ce résidu était spécifique d'un résidu d'acide aspartique. un tel résidu est inhabituel en tant que site porteur d'une chaîne glycanique. A ce titre BOOTHROYD et coll (1980) (13) ont voulu confirmer son identité par la preuve de l'existence du site de clivage

par l'enzyme spécifique (Hind I) sur un plasmide recombinant contenant une copie génomique du gène. Il pourrait donc là s'agir d'un nouveau type de liaison, à moins que ce résidu, en dernière hypothèse ne soit converti en asparagine avant l'étape finale de la glycosylation, encore faudrait-il que la séquence code de glycosylation soit perçue à travers un hydroxy amino acide en position 2 de la partie hydrophobe. Ceci est le cas par exemple pour AnTat 1.1 et AnTat 1.8.

La même étude a ensuite été menée en parallèle pour d'autres AVS du même stock (55,60,118,121,221) (HOLDER et CROSS (1981) (62) ; BOOTHROYD et coll (1980) (13) (1981) (14) ; MAJUMDER et coll (1981) (92)). Sur la base également des données de séquence nucléotidique fournies par d'autres auteurs MATTHYSSENS et coll (1981) (93), RICE-FICHT et coll (1981) (111), les AVS peuvent être classés en différentes catégories suivant l'identité de l'acide aminé C-terminal (Figure 2). La notion de trois groupes sera peut-être étendue dans l'avenir en fonction d'autres AVS.

c) Existence d'une homologie au niveau de la région 3'-terminale

L'existence d'une haute similarité au niveau de la portion C-terminale a été premièrement suspectée par MAJUMDER et coll (1981) (92). Deux autres équipes l'ont ensuite plus largement cernée :

. le groupe de MATTHYSSENS et coll (1981) (93) sur les AVS AnTat 1.1 et 1.8 (Figure 3)

Les 115 amino acides C-terminaux de ces 2 séquences nucléotidiques étaient caractérisés par une homologie globale de 50 %, particulièrement au niveau des 32 derniers acides aminés y compris la queue hydrophobe au niveau de laquelle seuls 7 amino acides différaient.

Fait important, les auteurs ont mis en évidence la position quasi invariante des résidus de cystéine : ils ont trouvé en effet que le nombre d'acides aminés entre 2 résidus de cystéine consécutifs était conservé, sauf entre les positions 77 et 83 (Figure 3) où il existe un décalage de 2 résidus. Cette caractéristique suggère que cette partie de la molécule doit se plier à des exigences conformationnelles strictes, maintenues par plusieurs ponts disulfure.

. le groupe de RICE-FICHT et coll (1981) (111) sur les AVS IITat 1.2, IITat 1.3 et l'AVS 117 (Figure 4)

La similarité débute à environ 330 nucléotides avant le codon stop. Après déduction des amino acides correspondants, les auteurs ont pu noter que lors du changement d'un acide aminé, celui-ci était remplacé par un résidu de polarité similaire. Ils ont également trouvé parmi les 105 acides aminés C-terminaux hautement conservés, 8 résidus de cystéine positionnés pratiquement aux mêmes endroits. De plus, ces résidus étaient agencés de façon particulière : la séquence précédant la queue hydrophobe était constituée de 25 résidus très hydrophiles contenant 4 de ces cystéines. Cette région succédait à une région non chargée de 17 à 18 résidus. Et à nouveau, devant cette partie hydrophobe, se retrouvait une région hydrophile contenant les 4 autres cystéines.

Toutefois, un autre AVS étudié par le même groupe (IITat 1.1) s'est montré plus éloigné dans sa définition par rapport à la "famille" de variants déjà étudiés. Il semble d'ailleurs plus proche d'un quatrième IITat (1.4) dont la séquence correspondant à cette région n'était que partiellement déterminée. Les auteurs ont pu aligner toutefois les séquences de DNA (Figure 5) de telle sorte que parmi les 100 derniers nucléotides identifiés de l'AVS IITat 1.4, 56 était semblables à ceux de l'AVS IITat 1.1. En supposant que l'homologie se poursuive jusqu'au codon stop, elle concernerait alors 225 nucléotides. De plus, les positions des 4 résidus de cystéine les plus proches du C-terminus étaient conservées et comme discuté précédemment dans une région très hydrophile. Il existait toutefois des résidus de cystéine supplémentaires dans la séquence de l'AVS IITat 1.1 non retrouvées dans celle de l'AVS IITat 1.4. Ces deux clones ne semblaient pas avoir, parmi leur ressemblance, une région non chargée conservée, entourée de 2 régions hydrophiles contenant chacune 4 résidus de cystéine invariants comme les trois autres clones.

En conclusion, il se dégage de ces travaux l'existence d'une certaine constance au niveau de la région C-terminale, témoignant de sa participation dans la conformation de la molécule à la surface du parasite, principalement imposée par des ponts disulfure. En plus, certains gènes, même issus de répertoires différents sont caractérisés par une similitude très accentuée au niveau de leurs 100 derniers codons environ. Il semble donc que les gènes se répartissent en plusieurs familles, dont les membres présentent au niveau du

1260
 1.2 CAG GCA ATG AAG ACA GAC AGA AGT GGC GAT GGC GGC TGC ATT AAA ATC ACC GAA CCG ACC GCA TGC AAC ACC AAA CCT TTT TGC AGT TAT
 1.3 AGA CGA AAT CAA GGT AAA CAG GCT ACG GAA GAT ACC TGC AAC AAA ATC GAA GGT GAA ACA GCA TGC AAC AAC AAG CCT TTT TGC ACC TAT
 117 CTA GCA GAT CAA AAA GGC AAA TCC CCT GAA GGC GAG TGC AAT AAA ATA TCC GAG GAA ACC AAT TGC AAC ACC GGC AAG ATA TGC AGT TGG

1350
 1.2 AAT GAA ACC ACA ACT GAT GAT GAT AAT AAG TGC AAA TAT AAT GGC ACA AAA GGT GCA GAA AAT GGA GTC GCT GTA GCA CAA ACT CAA ACT
 1.3 AAT GAA ACA ACA ACT GAT GAA GAT AAG AAG TGC AAA TTT AAT GAT ACA AAA GGC TCA GAA AAT GGT GTC TCT GTA GCA CAA GCT CAA ACT
 117 AAT GAA GAG GAT GAA GCG GAA GAA AAG TAT TGC AAA TTT AAT GAT ACA AAA GGA GAA GAA AAT GGT GTC TCT GTA GCA CAA ACT CAA ACT

1440
 1.2 GGA GGG AGT GAA ACA ACA ACA GAG AAA (C)
 1.3 GGA GGA ACC GAA ACA ACA ACA GAT AAA TGC AAA GAT AAG AAA AAG GAT GAT GTC AAA TCT CCG GAT TGT AAG TGG GAG GGC GAA
 117 GCA GGA GGA ACC GAA TCC ACA ACA GAT AAA TGC AAA GGG AAT TTG GAA GAT ACC TGC AAG AAG GAG AGC AAC TGT AAT TGG GAA AAT AAT

1530
 1.3 AAT TGC AAG GAT TCC AGT TTT ATT GTA AAT AAA GAA TTC GCC CTC AAT GTG GTT TCT GCT GCA TTT GAG GCC TTG CTT TTT TAA TCC CTT
 117 GAT TGC AAT GAT TCC TGT ATT GTA AAT AAA GAA TTC GCC CTC AAT GTG GTT TCT GCT GCA TTT GAG GCC TTG CTT TTT TAA TTT

1620
 1.3 TCC CCT CTT TTT CTT CCA TGC TAA AAA TTC TTG CT AAA AAT TTT GCT ACT TGA AAA CT TCT GAT ATA TTT TAA CA CTA AAA AAA AAA
 117 TCC CCT CTT TTT CTT TAA AAA TTC TTG CT ACT TGA AAA CT TCT GAT ATA TTT TAA CA (C)₂₀

1.3 AAA AAA AAA AAA (C)₂₅



Séquences nucléotidiques identifiées pour les AVS : 117 (BOOTHROYD et Coll., 1981), IlTat 1.2 et IlTat 1.3 (RICE-FICHT et Coll., 1981), homologues de la région 3' terminale (RICE-FICHT et Coll., 1981).

FIGURE 4

1.1 GTT GCC TGC AAA AAC GGC GGC GGC GCA TGC AGT GCA GCC AGC AGC AGC GAC AAA ATA CAT ATA ACG ATC GAA ACG GAC AGC AAA AAC AAA
 1.4 GT TTC TAC CAG CAC CAA ACC AAG GTA ATG CAC CTT GGC GGG TAC CTA GAA ATA ACA TCA GGA GCA GGC AGA ACG ACG

1.1 GGG ACA GCG GCC AGC ACG ATG GAC TCC CAA AAC ACA GCG GTC GCA TTC GCA ACG GAG CTG CAG ATT GGA AGC TGG AAA AGC CAG CAC ATA
 1.4 CTA GAA CTG AAA AAC CTC AAC GAC ATC GCA CAG GAC GGT GTA CAC AAA AGC GGG CAG CTA TTG GGA GAG ATC TAC ACA CCG CTT GCA ACA

1.1 GAC AGC AAC ATA ACG GCT TTG GCG AAT GCC TTA ACA GCA CTA GAC AGC ATT CCT GAC CTC ACA GAC CCA ACG GCT TAC ACA GCA GAC GCG
 1.4 TTA AAC AGT GAA GAC ACA ACA GAA ATT AAA ACC ACA GAT GAA AGC ATA ATA AGA AGC GCT GCA GCT GCC AGC ACA TTA GAG GCC GCC GTT

1.1 GCG TTC AAA CAA CTA GTA CCC ACA GTA GCG CTC AAC AAG CCG CCA ACC ACG GAG CTA ACC GGA GAA GTT CTA GAC GCA GTA AAA CAG AGC
 1.4 CAG GAG GCT CTT AAA CTG GCA AAT CCC GAG ACG GAC CAA GAA AAG CTG AAA GAA GAA GCA GCA GAC ATC ATC AAG GAG TTT GTG GGA AGC

1.1 ATG TGC CGA CAA CTA CGG AAC CTC GGC AAG CGA GCT GAC GAC AAA ATT TGG GAA CCG TTA AAT GAA CAG ACG GCC AGC TAC TAC AGC GAA
 1.4 GAA AAT ACA AAG GGT TCC AAG GCT TGG GAA AAA CTA AAG TCG ACA AAA GTG AAG GGC ACA GAG GCG AAA CCC GAA ACA GAA AAA GAG CTA

1.1 AAA ACT ATC AAA ACC GAC CAA CTA AAG CTA CTA ACA AGC AAC CAA CAG CTG ACA ACT GCA CTA GGA GTA GCA CTG GCG AAA GCA ATA AAC
 1.4 AAA GAC ATT ACT CAC AAC GCT AAA CTG GTG TCG GCA CTA AAT TAC TAC ATC AGC AGT GCT GAA TCT AAG CTA CAG GAA GCG GAG ACA AAA

1.1 GTA AAA GAA GCT TCC AAA AAG GAA TGC AAC CTA CAC GGC CAT GAA ACA GAC GCT ACG TGC GAG GCA AAA GGA GTA GGA GAT AAC TGT AAA
 1.4 CTA GCA GCA ACA AAA GCT GCA GCT GAA AAA GTG CCA ACA GCG CCT AAA CCA GAT GAA TGC AAA GCT AAA AAG GGG GAC ACC TGC AAA

1.1 CCC CCA TGC AAA GAA GTC GAA GAA GGT GCA AAA AAG AAG TGC AAA TTG GAT AAA GAG GAG GCT AAA AGG GTA GCA GAA CAA GCA GCA ACA
 1.4 GAT GCA TGC AAA TGG GAT AGC GAC GGT GCA AAC AAA AAG TGC GTA GTG GAC CCG AAT TAC ACA AAA AAA (C)₂₉

1.1 AAT CAA GAA ACA GAA GGC AAA GAT GGA AAA ACC ACA AAC ACC ACA GGA AGC AAT TCT TTT GTC ATT CAT AAG GCA CCA CTT TTT CTT GCG

1.1 TTT TTG CTT TTT TAA TTT TTC CCT TTA AAA TTT TCC TCC TTT AAA AAC AAA TTT TTT CTA CTT GAA AAC TTC TGA TAT TTG ATA TAT TTT

1.1 AAC ACC TTT AAA AAA AAA AAA AA(C)₂₅

Séquences nucléotidiques pour les AVS IITat 1.1 et IITat 1.4 (RICE-FICHT et coll, 1981).



FIGURE 5

dernier quart de la molécule un degré élevé d'homologie. D'ailleurs, cette répartition s'accorde et donc renforce la classification précédemment évoquée (Figure 2) sur la base de la qualité de l'acide aminé C-terminal.

Vers l'extrémité N-terminale, aucune homologie supérieure à 2 amino acides n'a pu être mise en évidence.

d) séquence N-terminale "signal"

Les travaux de Mc CONNELL et coll (1981) (94) et BOOTHROYD et coll (1981) (14) (1982) (15) ont montré que les AVS étaient synthétisés comme le sont généralement les protéines de surface cellulaire et les protéines sécrétées (BLOBEL et DOBBERSTEIN (1975) (12)), c'est-à-dire sous forme d'un précurseur muni d'une extension N-terminale. Dans le cas des AVS, cette séquence "signal" est particulièrement longue (au moins 25 résidus).

e) état actuel des connaissances sur les AVS de T. b. brucei

A l'heure actuelle, l'on connaît la séquence nucléotidique complète d'un AVS : l'AVS 117 (BOOTHROYD et coll (1982) (15)). Des données partielles ont également été établies pour 10 autres AVS (BOOTHROYD et coll (1981) (14) ; MAJUMDER et coll (1981) (92) ; MATTHYSSENS et coll (1981) (93) ; RICE-FICHT et coll (1981) (111)).

2- séquence nucléotidique non traduite

L'analyse des DNA complémentaires a également permis de souligner que l'homologie se poursuivait à un haut degré dans la région 3' non traduite (MATTHYSSENS et coll (1981) (93) ; RICE-FICHT et coll (1981) (111) ; MAJUMDER et coll (1981) (92)).

Etant donné que ces régions de mRNA ne sont habituellement pas conservées, il est vraisemblable qu'elles soient douées d'un rôle particulier dans les mécanismes génétiques de la variation antigénique.

B- Utilisation des techniques d'hybridation

Grâce aux techniques d'hybridation, plusieurs points fondamentaux ont

été établis :

1- Pour un sérodème donné, chaque variant antigénique contient le répertoire entier des gènes codant pour les AVS de ce sérodème

(WILLIAMS et coll (1979) (131) ; HOEIJMAKERS et coll (1980b) (61) ; BORST et coll (1980a) (17))

La création de nouveaux variants n'est donc pas le fait d'une recombinaison de segments selon une façon analogue à l'assemblage des gènes des immunoglobulines.

2- Chaque DNA complémentaire spécifique d'un AVS est capable de reconnaître au niveau des différents génomes d'un répertoire, une famille des gènes apparentés (isogènes).

Les expériences d'hybridation avec les hydrolysats endonucléasiques de DNA nucléaire issu de plusieurs variants ont révélé que chaque DNA complémentaire spécifique d'un AVS s'hybridait selon une intensité variable, avec plusieurs bandes. Par conséquent, chaque DNA complémentaire spécifique d'un AVS reconnaissait une famille de gènes différents mais apparentés. Le nombre des "isogènes" était variable selon les familles. (HOEIJMAKERS et coll (1980b) (61) ; PAYS et coll (1981a) (100)).

BORST et coll (1980b) (18) ainsi que FRASCH et coll (1980) (40), avec l'utilisation de segments de DNA complémentaire ont montré que le degré d'homologie entre les gènes d'une même famille augmentait depuis l'extrémité 5' vers l'extrémité 3'. Selon les auteurs par conséquent, au cours de l'évolution des gènes, le taux d'acceptation de mutations diminue dans ce même sens.

3- L'expression de certains AVS est liée à une duplication du gène et à la transposition de la "copie" au niveau d'un site d'expression.

(HOEIJMAKERS et coll (1980b) (61) ; BORST et coll (1980a) (17) (1980b) (18) ; FRASCH et coll (1980) (40) ; PAYS et coll (1981a) (100) (1981b) (101) ; BERNARDS et coll (1981) (9) ; MAJIWA et coll (1982) (91)).

a) Copie de base (BC, Basic Copy) et copie liée à l'expression

(ELC, Expression-Linked Copy)

(HOEIJMAKERS et coll ont montré en 1980 (61) les faits suivants :

. Les DNA complémentaires des AVS 117 et 118 reconnaissent respectivement parmi les hydrolysats endonucléasiques de chaque DNA nucléaire issu des 4 variants étudiés (117,188,121,221) un ensemble propre et caractéristique de bandes. Cet ensemble commun représente le répertoire de base.

. Chacun de ces cDNA complémentaires reconnaît, en plus de ce répertoire de base, une bande supplémentaire dans le DNA nucléaire issu de la cellule homologue. Par conséquent, la cellule qui exprime l'AVS contient au niveau d'un site d'expression une copie supplémentaire du gène (ELC).

PAYS et coll (1981) (100) (101) ont aussi trouvé que l'expression des sérotypes AnTat 1.1 et AnTat 1.8 était liée à la synthèse d'une copie additionnelle du gène et à la transposition de l'ELC au niveau d'un autre site dans le chromosome. Ils ont aussi montré que les formes procycliques de culture "in vitro" du sérotype AnTat 1.1 ne contenaient plus l'ELC. Le fait est corrélé avec l'absence de synthèse du revêtement glycoprotéique dans les cellules procycliques cultivées "in vitro".

De façon analogue, l'ELC du gène spécifique de l'AVS 118 disparaît lorsque ce variant, après inoculation à un lapin donne naissance à de nouveaux types antigéniques (MICHELS et coll (1982) (95)).

b) l'ELC représente le gène actif

Cette copie additionnelle, dont on a vu que l'existence était corrélée avec l'expression, représentait donc très vraisemblablement la séquence effectivement transcrite en RNA messenger, et les premiers travaux entrepris dans ce sens sont ceux de PAYS et coll (1981c) (102) sur AnTat 1.1 ; ces derniers ont étudié la sensibilité d'une copie de base (BC) et de sa copie additionnelle liée à l'expression (ELC) à la DNase I, enzyme caractérisé par une action plus marquée au niveau de la chromatine active que de la chromatine inactive chez les eucaryotes (WEINTRAUB et GROUDINE (1976) (129)). Leur résultats ont montré que l'ELC se trouvait dans une configuration chromatinienne plus sensible à l'action de l'enzyme que BC et les auteurs ont

de ce fait suggéré que l'ELC était la séquence utilisée pour la transcription. La preuve directe fut finalement apportée par l'expérience de BERNARDS et coll (1981) (9), se rapportant à une digestion par la S1 nucléase d'hybrides mRNA-BC : les auteurs ont ainsi montré que les mRNA spécifiques des AVS 117 et 118 différaient des copies de base correspondantes au niveau des 100 à 150 derniers nucléotides précédant l'extension poly A. Les auteurs ont aussi mis en évidence que ce segment terminal était ajouté au gène pendant la formation de l'ELC, et que par conséquent l'ELC était nécessairement le modèle utilisé pour la transcription.

c) caractéristiques du processus de transposition

. D'après les résultats de BERNARDS et coll (1981) (9), la transposition du segment calqué à partir de la copie de base s'accompagne d'un remaniement au cours duquel l'extrémité 3' du segment est remplacée par une extrémité 3' nouvelle, différente de celle de BC, vraisemblablement déjà présente dans le site d'expression. La séquence remplacée correspond à l'étendue 3' non transcrite et aussi à une partie de l'extrémité C-terminale traduite.

Les auteurs se sont attachés d'autre part à la comparaison de ces séquences nucléotidiques différentes de l'extrémité 3' entre le DNA complémentaire et la copie de base de l'AVS 117. En réalité, les variations au niveau de cette zone ne sont pas considérables et proviennent seulement de quelques mutations ponctuelles, et de quelques insertions et délétions. En dépit de ces différences, les auteurs ont souligné que la copie de base était munie d'une extrémité 3' pleinement fonctionnelle, capable de coder pour des protéines tout à fait caractéristiques au niveau de la région C-terminale, et pourvues du prolongement non traduit comprenant les groupes de séquences homologues habituellement rencontrées au niveau des mRNA spécifiques d'AVS. Les mêmes observations ont pu ensuite être faites avec l'AVS 118 (BERNARDS, revu par CROSS et BORST (1982) (19)).

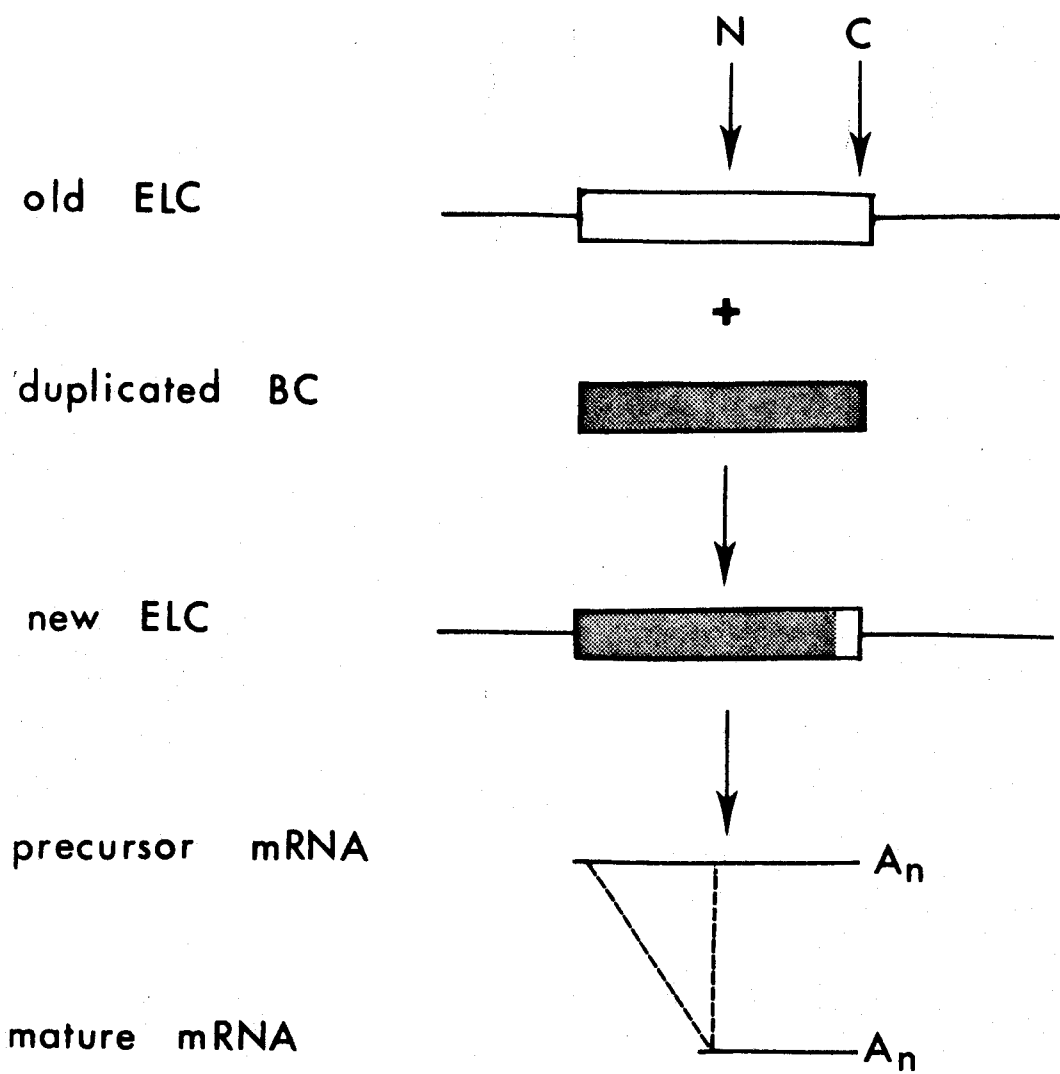
Pour BERNARDS et coll (1981) (9), la recombinaison entre la copie de base et le site d'expression pour la formation de l'ELC peut se produire en n'importe quel point dans la séquence conservée des 150 derniers nucléotides des gènes.

Une nouvelle observation est venue récemment appuyer cette dernière hypothèse : MICHELS et LIU (revu par CROSS et BORST (1982) (19) ont trouvé en effet au niveau d'un clone spécifiant l'AVS 118 un mRNA entièrement colinéaire avec la copie de base ; ils pensent que l'insertion peut avoir été effectuée dans ce cas au niveau de la portion terminale de 16 bp homologue dans tous les mRNAs.

. PAYS et coll (1981b) (101) ont démontré pour les AVS AnTat 1.1 et AnTat 1.8 que l'élément transposé était d'une taille supérieure à celle des mRNAs correspondants. Par la suite, VAN DER PLOEG et coll (1982a) (122) ont signalé la même observation pour les AVS 117 et 118. En conséquence, un segment supplémentaire de DNA est calqué et cotransposé avec la séquence caractéristique du mRNA.

PAYS et coll (1982) (104) ont ensuite montré que la sonde caractéristique de l'extrémité 5' de l'élément transposable pour l'AVS LiTat 1.6 ne reconnaissait pas le mRNA mature, mais reconnaissait spécifiquement des transcriptats à la fois plus grands et plus petits que le mRNA. Ils ont de ce fait proposé que le gène serait d'abord transcrit sous forme d'un précurseur de plus grande taille, qui serait ensuite clivé. Dans ce modèle, le promoteur serait donc fourni par le site d'expression.

En parallèle avec ces observations, d'autres travaux (BERNARDS et coll (1981) (9) ; VAN DER PLOEG et coll (1982a) (122) ; VAN DER PLOEG et coll (1982b) (123)) ont permis aussi de détecter avec une sonde caractéristique du segment 5' co-transposé de l'AVS 118 des transcriptats spécifiques plus courts et plus longs que le mRNA mature. L'un de ces transcriptats, en particulier, représentait la totalité du segment co-transposé. En comparant la séquence de l'extrémité 5' du mRNA avec celle de la copie de base du gène, les auteurs ont aussi démontré que les 34 nucléotides 5'-terminaux étaient différents. Par conséquent, cette extrémité 5' du mRNA mature n'est pas codée par la séquence correspondante de BC et les auteurs ont ainsi montré qu'elle viendrait se lier au reste de la séquence par la découpe d'un précurseur de plus grande taille. BERNARDS (1982) (10) a proposé (Figure 6) un schéma de remaniement moléculaire répondant à ces observations. Selon ce schéma, la transcription démarre avant le segment transposé et donc le site d'expression fournit le promoteur requis pour initier la transcription du gène. Le premier produit de transcription est remanié pour donner naissance au mRNA mature



Représentation schématique des processus de formation de l'ELC et de transcription en RNA messenger (Bernards (1982)).

FIGURE 6

muni d'une extrémité 5' nouvelle indépendante du segment cotransposé. BOOTHROYD et CROSS (1982) (16) se sont également attachés à l'étude de la séquence nucléotidique des extrémités 5' du mRNA et de BC de l'AVS 117. Comme il a été démontré pour l'AVS 118, les auteurs ont également mis en évidence l'existence d'un exon de 35 nucléotides. De surcroît, la séquence du segment pour ce variant s'est révélée absolument identique à celle de l'AVS 118.

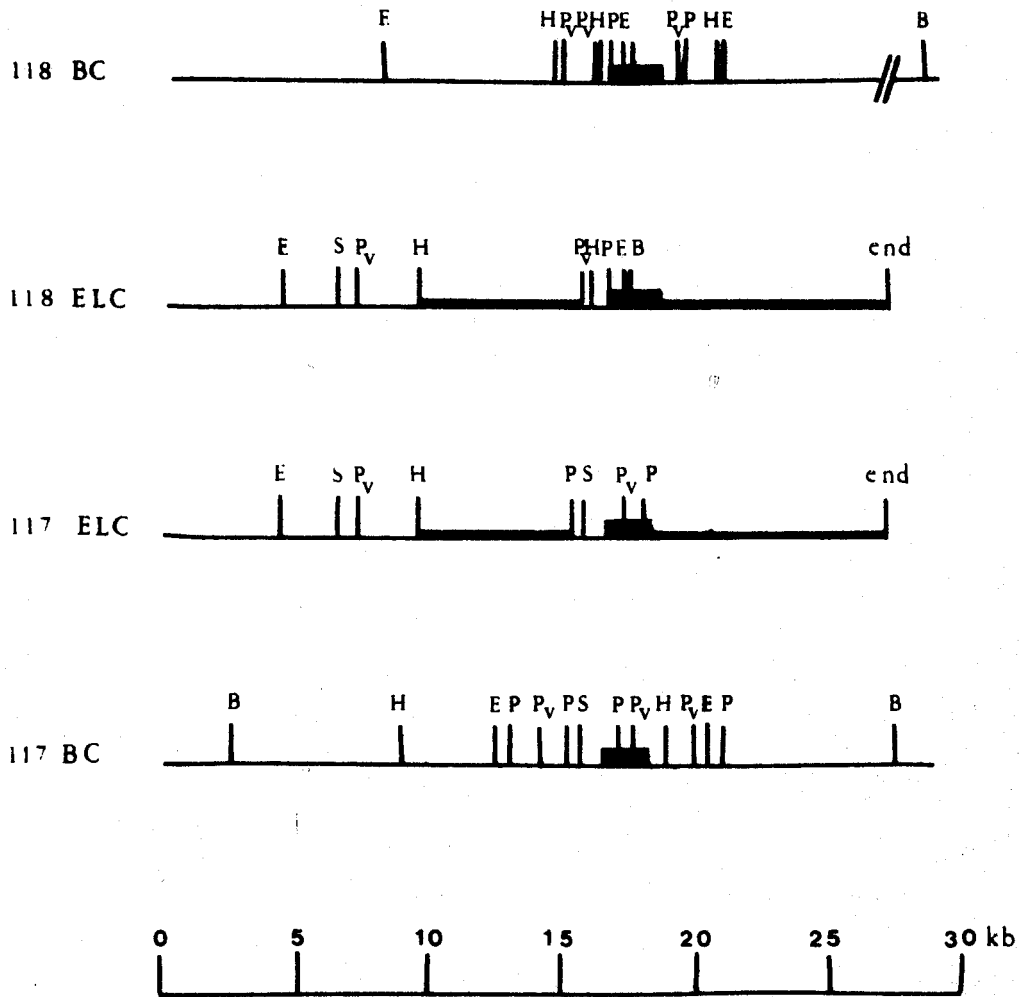
d) Analyse du site d'expression

PAYS et coll (1981b) (101) ont étudié les ELCs de deux clones différents exprimant le même type antigénique (An.Tat 1.1) ; leurs résultats suggéraient que les séquences du gène ainsi que leurs prolongements semblaient similaires. Les auteurs avaient donc démontré que les copies additionnelles avaient été calquées à partir de la même copie de base, et transposées au niveau de sites d'expression similaires.

A ce sujet, VAN DER PLOEG et coll (1982a) (122) ont comparé les cartes de restriction endonucléasique des 2 ELCs des gènes des AVS 117 et 118 (Figure 7) et d'après les profils obtenus, il semble que les gènes aient été transposés au niveau du même site chromosomal caractéristique. Ce site est caractéristique par le fait qu'il est dépourvu de tout site enzymatique de restriction sur une importante distance de part et d'autre du segment transposé (6 kb à l'avant et 8 kb à l'arrière). En outre, la séquence de 8 kb se termine par une position qui représente un site de clivage pour 15 endonucléases de restriction différentes. Les auteurs ont interprété le fait en suggérant que cette position représentait la fin de la molécule de DNA. L'absence de sites potentiels de clivage sur une telle longueur révélait l'existence de régions riches en succession d'adénine et de thymine, ou de séquences simples de DNA relativement homogènes.

Récemment, MICHELS et coll (revu par BERNARDS (1982) (10) ; BORST et CROSS (1982) (19)) ont analysé les ELCs de 2 clones différents spécifiant l'AVS 118. S'ils ont pu encore trouver une homologie au niveau des sites d'expression, ils ont néanmoins remarqué que les séquences caractéristiques de DNA différaient au niveau de leur taille (devant par une insertion de 10 kb et derrière par une délétion de 2,7 kb).

Pour BORST et CROSS (1982) (19), ces régions de DNA pourraient être



Cartes de restrictions des copies de bases (BC) et des copies liées à l'expression (ELC) des AVS 117 et 118 (Van der Ploeg et Coll. (1982)).

■ partie codante des gènes
— séquences particulières de DNA

B = Bam HI
E = Eco RI
H = Hind III
P = Pst I
P_v = Pvu I
S = Sal I



FIGURE 7

constituées de petits éléments répétitifs et les observations de MICHELS résulteraient dans ce cas d'une duplication ou d'une délétion de ces éléments répétitifs. Les auteurs n'excluent pas toutefois la possibilité que les gènes puissent être insérés dans des positions différentes du site d'expression ou bien que plusieurs sites d'expression soient présents.

4- Certains gènes spécifiques sont exprimés sans qu'il soit possible de détecter un mécanisme de duplication et transposition

WILLIAMS et coll s'étaient attachés dès 1979 (131) à étudier les hybridations du DNA complémentaire spécifique d'un AVS (IITat 1.2) avec des fragments génomiques de restriction du variant homologue et de deux autres clones. Leurs résultats n'avaient pas mis en évidence la formation d'une ELC. Ils avaient observé en revanche que le DNA complémentaire s'hybridait avec des fragments nucléaires dont les tailles étaient différentes selon les variants, preuve de l'existence d'arrangements différents de séquences de DNA autour de ces gènes selon les clones. Leurs résultats indiquaient que la variation antigénique mettait en oeuvre un type autre de réarrangement au niveau du génome, qui n'avait en apparence aucune relation directe avec l'expression du gène. La poursuite des travaux (WILLIAMS et coll, 1980) (132) a confirmé le fait et apporté d'autres précisions :

. le gène spécifique de l'AVS IITat 1.2 existe sous forme de 2 copies dans les trypanosomes exprimant ou n'exprimant pas le clone.

. les modifications génomiques observées résultent d'insertions et de délétions au niveau des extrémités 3' des 2 copies du gène.

Il apparaissait donc essentiel de savoir si l'absence d'une copie additionnelle était ou non une caractéristique propre au sérodème étudié par cette équipe. La conclusion a finalement été apportée par les travaux de MAJIWA et coll (1982) (91) ; Les auteurs ont analysé plusieurs variants et ont trouvé les résultats suivants :

1/ pour l'AVS IITat 1.1 du sérodème, il a été possible de détecter une ELC dans les cellules homologues.

2/ le répertoire de base demeure inchangé dans les autres clones étudiés (IITat 1.2 et IITat 1.3).

3/ à l'opposé, les résultats obtenus avec l'AVS ITat 1.3 se rapprochent de ceux précédemment évoqués avec l'AVS ItTaT 1.2. La seule différence réside dans le nombre de copies.

Par conséquent, à l'intérieur d'un sérodème donné, l'on peut rencontrer l'un ou l'autre type de réarrangement. Des travaux ultérieurs (LAURENT et coll (1983) (79) ont également signalé que l'antigène le plus prédominant d'un sérodème (AnTat 1.3) s'exprimait avec un phénomène de duplication-transposition.

L'existence de gènes dont l'expression n'était apparemment pas liée à un processus de duplication et transposition a été également retrouvée par BORST et coll (1980b) (18) et BERNARDS (1982) (10).

Sur la base des résultats actuels, il semblerait que la régulation de l'expression puisse être assurée par 2 mécanismes complètement différents :

1/ Selon un premier schéma, l'on trouve une copie de base (BC) de chaque gène dans tous les trypanosomes et une copie additionnelle liée à l'expression (ELC) uniquement dans les variants pourvus de la spécificité immunologique correspondante. Cette copie additionnelle est utilisée pour la transcription en RNA messager.

2/ D'autres gènes sont activés sans possibilité de détection d'une ELC. Dans ce cas, l'expression serait contrôlée par un autre mécanisme.

BERNARDS (1982) (10) a toutefois évoqué le fait que dans ce dernier cas, l'ELC pourrait exister sans que ses fragments puissent être décelables en technique de blotting. L'auteur propose plusieurs explications pour cette éventualité :

. une variation de longueur des séquences de DNA au niveau du site d'expression selon les parasites.

. une instabilité de certaines de ces séquences.

D'autre part, BOOTHROYD et CROSS (1982) (16) se sont aussi intéressés à l'étude de la séquence nucléotidique de l'extrémité 5' d'un mRNA spécifique

d'un AVS (221) pour lequel l'expression ne s'accompagne pas de la détection d'une ELC. Ils ont encore trouvé pour les 35 premiers nucléotides une séquence strictement identique à celle des AVS 117 et 118. En conséquence, le promoteur pour l'AVS 221 est suivi du même segment que celui des AVS 117 et 118, et les auteurs ont proposé 2 explications pour ce fait :

. le segment pourrait posséder un rôle indispensable dans le fonctionnement du promoteur ou dans le remaniement du mRNA

. l'activation du gène spécifique de l'AVS 221 s'effectuerait par la juxtaposition du même promoteur que celui trouvé pour les sites d'expression des AVS 117 et 118, mais selon une modalité indétectable encore inconnue.

La conclusion de leurs derniers résultats semble démontrer que l'activation des gènes utilise si ce n'est le même promoteur, tout du moins un promoteur du même type. Cette hypothèse permettrait d'expliquer le fait qu'un unique AVS soit synthétisé à un moment donné.

5- Evolution des gènes codant pour les glycoprotéines de surface

Des auteurs (VAN MEIRVENNE et coll (1977) (126) ; VERVOOT et coll (1981) (127) ; MAGNUS et coll (1982) (89)) ont comparé par immunolyse et immunofluorescence les AVS de répertoires antigéniques issus de différents stocks de parasites et ont montré :

. que la plupart des types antigéniques étaient trouvés uniquement dans un seul stock

. mais aussi que certains types antigéniques de répertoires différents, même issus de sous-espèces ou espèces différentes (AnTat 1.8 et AVS 117 de T. b. brucei, AnTat 12.2 de T. b. rhodesiense, LiTat 1.6 de T. b. gambiense et AnTat 3.3 de T. evansi) se révélèrent similaires selon les tests immunologiques, et donc semblaient relativement conservés. Ces types antigéniques ont été qualifiés d'isotypie.

Du point de vue génétique, l'étude de l'hybridation d'une sonde spécifique du gène AnTat 1.8 avec le DNA nucléaire issu de ces différents stocks a aussi démontré la conservation de la séquence code correspondant à

ce gène (PAYS et coll (1981b) (101), (1981d) (103), (1982) (104)).

D'autre part, l'étude de la séquence nucléotidique de deux AVS isotypiques (AVS 117 (BOOTHROYD et coll (1980) (13), (1982) (15)) et AnTat 1.8 (MATTHYSSENS et coll (1981) (93))) a indiqué qu'il existait entre les deux gènes une homologie quasi complète des bases.

FRASCH et coll (1982) (41) se sont intéressés, à l'étude du degré de conservation de certains gènes d'un répertoire dans 12 stocks de parasites d'origine différente. Les auteurs ont trouvé que l'AVS 117 était essentiellement conservé dans 11 de ces stocks. L'AVS 118 s'est révélé présent dans 7 stocks mais sous 4 formes différant par leur sites enzymatiques de restriction. L'AVS 221 s'est montré absent de tous les stocks.

Les auteurs ont en conséquence classé les gènes en deux catégories. Les gènes stables et les gènes à évolution rapide. Ils pensent que les trypanosomes développent un mécanisme pour accélérer l'évolution d'un groupe de gènes. Autrement dit, il existerait un nombre limité de gènes stables et des copies de ces gènes pourraient être transposées dans une région spéciale du génome où l'évolution de la séquence est très rapide. Les gènes seraient perdus de cette région avec le même rythme avec lequel ils y entreraient. L'évolution résulterait de mutations ponctuelles.

PAYS et coll (1983) (105) se sont ensuite attachés à étudier le DNA génomique de plusieurs stocks de T. b. gambiense avec utilisation de leurs sondes spécifiques d'AVS de T. b. brucei, en parallèle avec une étude sérologique des répertoires antigéniques correspondants menée par BABIKER et LE RAY (1982) (4). Ils ont trouvé que la copie de base du gène AnTat 1.8 était uniquement présente dans les stocks capables d'exprimer un isotype du gène, mais que hormis cette différence, tous les stocks de T. b. gambiense contenaient la famille des séquences apparentées à ce gène sous forme d'un répertoire typique et identique de bandes. Les auteurs ont pu en tirer plusieurs conclusions :

* l'observation suggère qu'un seul membre de la famille des séquences relatives au gène AnTat 1.8 soit capable d'exprimer un isotype du gène. Les auteurs ont pu néanmoins remarquer parmi ces copies silencieuses, une copie très similaire à la copie de base ; ils attribuent son incapacité d'expression à

des modifications observées au niveau des séquences répétitives environnant l'élément transposable. Ces éléments apportent à une hypothèse émise par BERNARDS et coll (1981) (9) : le processus de transposition de l'ELC en vue de son expression, impliquerait une reconnaissance entre les séquences répétitives situées de chaque côté de l'élément transposable, et les séquences homologues dans le site d'expression.

* Du point de vue pratique, l'utilisation de sondes spécifiques pour l'étude des DNA nucléaires pourrait :

1) en vertu de l'existence de ce répertoire caractéristique de bandes, constituer un critère de discrimination de la sous-espèce T. b. gambiense des autres sous espèces, et peut être même permettre de différencier les sous-espèces.

2) sur la base de la présence ou non de la copie de base spécifique, permettre de prédire l'absence ou l'existence potentielle éventuelle d'un type antigénique dans un répertoire.

IV- Aspects biochimiques

1- Isolement

CROSS a publié en 1975 (28) un protocole d'isolement de glycoprotéines spécifiques de variants antigéniques de T. b. brucei. Pour l'essentiel, le protocole faisait appel à une rupture mécanique, en l'absence de détergents, du manteau de surface des parasites. La purification de l'AVS était réalisée par isoélectrofocalisation préparative. BALTZ (1976) (5) a par la suite mis au point un procédé de préparation d'AVS de T. equiperdum, avec libération du manteau par contact des parasites avec un milieu légèrement acide (pH 5.5) et purification par chromatographie d'affinité sur Sépharose Concanavalline-A.

L'existence de protocoles conduisant à des préparations de quantités importantes d'AVS a autorisé une approche biochimique des antigènes variables.

2- Caractérisation des AVS

Les AVS de T. b. brucei isolés par CROSS (1975) (28) sont caractérisés par une taille moléculaire avoisinant 65 000 en gel de polyacrylamide en présence de SDS. De profondes variations ont en revanche été détectées au niveau de leurs points isoélectriques (valeurs comprises entre 5.8 et 8.3), compositions amino acides, séquences amino acides N-terminales (BRIDGEN et coll (1976) (22)), et encore pourcentages glucidiques (7 à 17 % p/p) (JOHNSON et CROSS (1977) (72)). La partie glucidique reste toutefois stable dans sa définition qualitative représentée par des résidus de mannose, galactose, et N-acétylglucosamine (JOHNSON et CROSS, 1977, (72)).

3- Etudes structurales

- axe peptidique

L'on connaît depuis peu une séquence amino acide complète : celle de l'AVS 117, établie d'une part par ALLEN et coll (1982) (1) qui a utilisé les techniques classiques de séquence amino acide et d'autre part grâce à la détermination de la séquence de son DNA complémentaire (BOOTHROYD et coll (1982) (15)). ALLEN et GURNETT (1983) (2) ont également étudié la localisation des ponts disulfure dans la molécule. Les traits caractéristiques de cet axe protéique sont les suivants :

- * la présence d'un segment (8-40) contenant 10 résidus basiques et aucun résidu acide

- * la nature très hydrophile des 112 résidus C-terminaux, avec une richesse particulière en lysine (24 résidus) et en acide glutamique (17 résidus)

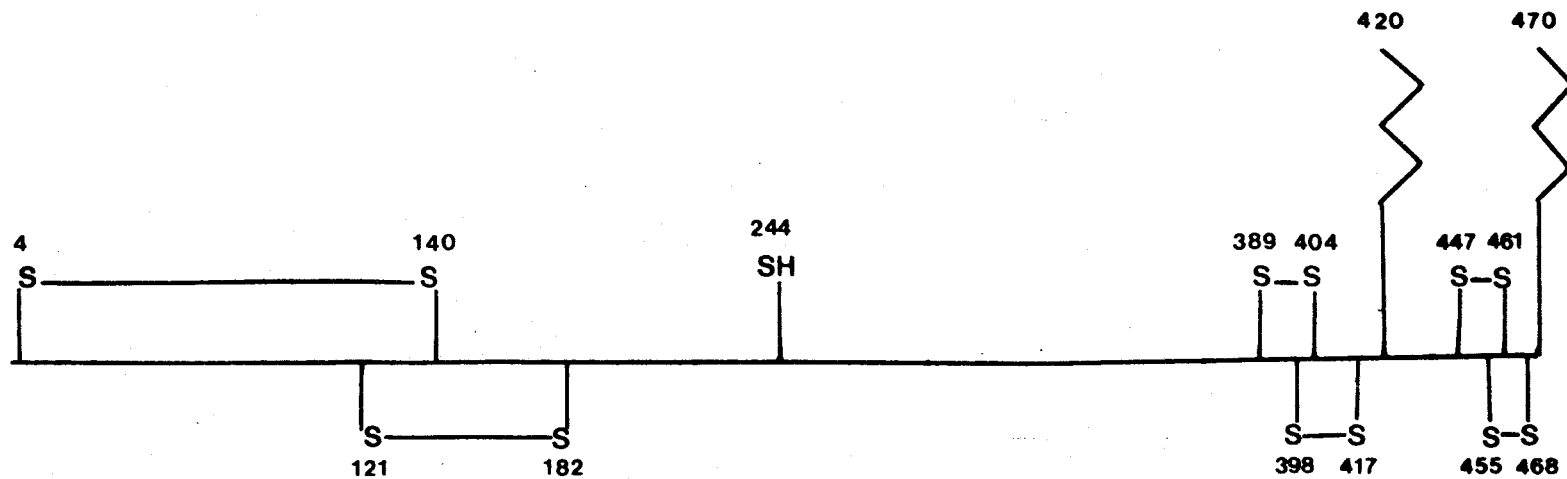
- * la présence de 8 résidus et demi cystine dans la région C-terminale, engagés entre eux dans la formation de deux groupes de ponts disulfure respectivement de part et d'autre d'une chaîne glycanique (Figure 8). Parmi ces résidus, les cinq derniers sont suivis d'une lysine.

- * l'existence de deux autres ponts disulfure dans la partie N-terminale, et d'un unique groupement thiol au centre de la molécule (Figure 8).

- * l'absence de segments hydrophobes susceptibles d'association avec la double couche lipidique.

- copule glycanique

l'analyse des compositions glucidiques des AVS de T. b. brucei (JOHNSON et CROSS, 1977) (72)) avait indiqué, rappelons-le, des contenus



LOCALISATION DE LA POSITION DE PONTS DISULFURE ET DE L'UNIQUE GROUPEMENT THIOL DANS L'AVS 117
 (Allen et Gurnett, 1982)

—⚡— Chaînes glycaniques



FIGURE 8

variables (7 à 17 % p/p) mais une distribution qualitative identique composée de mannose, galactose, et N-acétylglucosamine. L'absence d'acide sialique avait été établie. HOLDER et CROSS (1981) (62) ont isolé les glycopeptides tryptiques de 5 variants antigéniques et ont montré qu'ils se répartissaient en 2 groupes :

un premier groupe constitué par les glycopeptides dits "internes" pourvus d'une chaîne oligosaccharidique branchée au niveau de l'axe peptidique par l'intermédiaire d'un résidu d'asparagine, et contenant dans la majorité des cas uniquement du mannose et de la N-acétylglucosamine, et parfois aussi du galactose.

un deuxième groupe dit "C-terminal" englobe l'oligosaccharide branché sur l'acide aminé C-terminal et parfois un oligosaccharide subterminal lié à un résidu d'asparagine. Il est composé de mannose, galactose et de N-acétylglucosamine.

4- Réactivité immunologique croisée entre les antigènes purifiés.

Les anticorps caractéristiques du manteau de surface de variants antigéniques vivants sont spécifiques de clone et par conséquent la surface cellulaire de chaque variant est entourée de déterminants antigéniques spécifiques.

Les études de réactivité immunologique croisée entre différents antigènes purifiés se sont révélées négatives en immunodiffusion (CROSS, 1975 (28)), mais positives en radioimmuno-essai (BARBET et Mc GUIRE (1978) (6) ; CROSS (1979) (30) ; LABASTIE et coll (1981) (76)) ; Il existe finalement au niveau des AVS des déterminants antigéniques spécifiques de variants, et également des sites moléculaires susceptibles de réactivité croisée entre différents variants, mais aussi souches et espèces. Il semble donc que les AVS présentent certains éléments de structure commune.

Deux observations ont permis de montrer l'implication de glycannes à ce niveau :

* la réactivité croisée n'est plus perceptible après traitement des AVS par l'acide periodique (BARBET et coll (1979) (7)).

* Il n'y a pas de réaction croisée pour les protéines non glycosylées synthétisées in vitro (HOEIJMAKERS et coll (1980a) (60).

HOLDER et CROSS (1981) (62) ont analysé leurs glycopeptides en radioimmuno-essai et ont montré que les seules copules glycaniques impliquées dans la réaction immunologique croisée appartenaient aux glycopeptides de situation C-terminale. Ils ont aussi souligné que la réaction était constante en dépit de l'hétérogénéité observée au niveau de la taille et de la composition des oligosaccharides. Ils ont proposé à ce sujet que cette hétérogénéité soit partiellement induite par la présence d'un ou de deux sites de glycosylation selon les cas au niveau des glycopeptides C-terminaux.

5- Glycosylation des molécules d'AVS

STRICKLER et PATTON (1980) (121) ont analysé l'action de la tunicamycine sur la glycosylation des AVS. Leurs expériences consistaient à mesurer l'incorporation de mannose radioactif au niveau de variants cultivés en présence de l'antibiotique. Ils sont arrivés à la conclusion que la tunicamycine inhibait totalemment l'incorporation du mannose au niveau de l'AVS et ont pu en déduire que le monosaccharide faisait partie d'un glycanne branché par une liaison de type N-osidique. Leurs résultats indiquaient aussi que l'absence de cette glycosylation provoquait une diminution de taille moléculaire de l'AVS en gel de polyacrylamide en présence de SDS de 58 000 à 55 000.

ROVIS et DUBE (1981) (115) ont ensuite comparé l'action de la tunicamycine avec la réactivité immunologique croisée des AVS. Ils ont abouti à des résultats parallèles à ceux obtenus par HOLDER et CROSS (1981) (62), soit à la distinction de deux types de chaînes oligosaccharidiques :

- un premier type dont la biosynthèse est totalement inhibée par la tunicamycine, et qui intervient pour 5 à 10 % de la taille moléculaire apparente de l'AVS. Les auteurs ont indiqué d'autre part que le transfert de cette chaîne se produit de façon concomittante avec la synthèse protéique.

- un second type impliqué dans la structure du déterminant antigénique commun et qui n'a aucune influence sur la taille moléculaire de l'AVS. Les auteurs ont pu observer que son transfert avait lieu après la traduction.

En dehors de cette classification ROVIS et DUBE (1981) (115) ont apporté d'autres éléments :

. L'action de la tunicamycine n'empêche pas la biogénèse du manteau de surface.

. Toutefois, la présence de l'antibiotique résulte en une diminution de la quantité d'AVS pouvant être détectée par immunoprécipitation. Les auteurs ont suggéré de ce fait que l'une des fonctions du type oligosaccharidique N-branché était d'inhiber la dégradation protéolytique du manteau.

Enfin, des AVS isolés en présence de tunicamycine ont été testés pour leur capacité à inhiber une immunoprécipitation hétérologue, et des pourcentages d'inhibition très variables ont été trouvés (allant de 0 à 63 %). Les auteurs ont conclu de cette observation que le déterminant antigénique commun englobait en partie des glycanes N-liés. Cette hypothèse est corrélée avec la présence possible près du résidu C-terminal d'un site asparaginique de glycosylation comme l'ont démontrés HOLDER et CROSS (1981) (62) pour certains AVS de T. b. brucei, c'est-à-dire ceux dont l'identité de l'acide aminé C-terminal est une sérine.

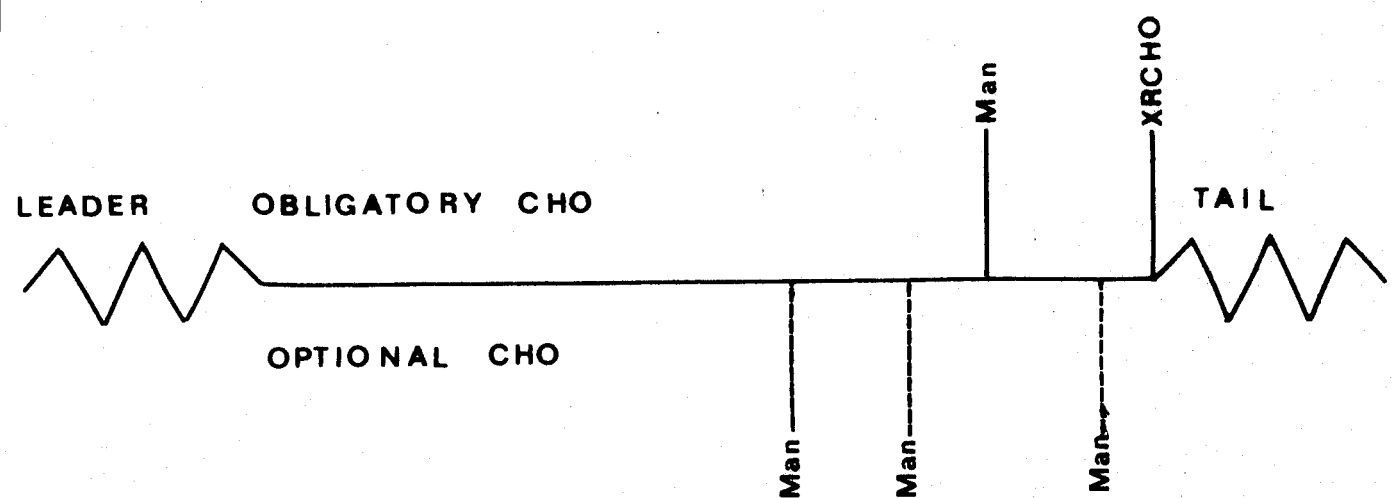
Des résultats récents de FERGUSON et OVERATH (revu par BORST et CROSS (1982) (19)) ont aussi montré que la tunicamycine bloque l'addition de sucres sur les résidus d'asparagine internes sans inhiber la glycosylation C-terminale.

Pour BORST et CROSS (1982) (19) l'organisation moléculaire des antigènes variables de T. b. brucei répondrait au schéma présenté dans la Figure 9 avec les caractères suivants :

. la présence obligatoire d'une chaîne oligosaccharidique interne dont la fonction serait par conséquent essentielle

. la présence facultative d'autres chaînes oligosaccharidiques internes

. la présence obligatoire d'une glycosylation C-terminale possédant une fonction spéciale.



BUS
LILLE

Représentation schématique de la glycoprotéine spécifique d'un variant antigénique de T. b. brucei (Borst and Cross, (1982)).

FIGURE 9

La glycosylation interne fait intervenir une liaison N-asparaginyl-glucosamine classique. La glycosylation toute C-terminale implique un type nouveau de liaison glycanique : HOLDER (1983)a (63) a récemment montré, pour deux AVS se terminant respectivement par une sérine et un acide aspartique, que l'oligosaccharide était attaché au niveau du dernier résidu par l'intermédiaire d'une éthanolamine branchée au niveau de la fonction carboxylique par une liaison amide.

6- Détachement et fonction de l'extension hydrophobe C-terminale

Aucune information n'a pu être apportée concernant le détachement de l'extension hydrophobe C-terminale.

BOOTHROYD et coll (1980) (13), (1981) (14), avaient initialement suggéré que la queue hydrophobe pourrait avoir une fonction d'attachement de la glycoprotéine à la membrane plasmique et que la libération rapide du manteau de surface du parasite pourrait résulter d'une activité protéolytique hautement spécifique.

Des données ultérieures ont en réalité indiqué que le détachement de l'extrémité C-terminale était une étape précoce dans la maturation de l'AVS (FERGUSON et OVERATH, revu par BOOTHROYD et coll (1982) (15)), et BOOTHROYD et coll (1982) (15) ont finalement suggéré que la queue hydrophobe servirait de "peptide signal" supplémentaire durant le transport intracellulaire vers la membrane plasmique.

7- Organisation moléculaire du manteau

Le mode d'attachement de la glycoprotéine à la surface cellulaire n'est toujours pas élucidé. La seule information à ce sujet concerne l'orientation probable de l'extrémité C-terminale vers la membrane plasmique : CROSS et JOHNSON (1976) (29) ont noté que la trypsinisation des parasites entraînait la libération des 3/4 N-terminaux de la molécule et laissait la région C-terminale glycosylée associée à la membrane.

Le fait également que le site antigénique glycosylé commun aux AVS purifiés ne soit plus détectable chez les parasites vivants (BARBET et Mc GUIRE (1979) (7) ; CROSS (1979) (30) ; HOLDER et CROSS (1981) (62))

indique que la partie C-terminale de la molécule est plutôt localisée à l'intérieur du manteau. La question de savoir comment l'extrémité C-terminale de la molécule s'attache à la membrane cellulaire reste encore posée. A ce sujet plusieurs éléments doivent être considérés :

- . la relative facilité de libération des glycoprotéines de la surface cellulaire des parasites isolés.

- . la libération d'antigène libre, au niveau du sang d'un hôte infecté, uniquement par les formes parasitaires en voie de dégénérescence (BLACK et coll (1982) (11)).

- . l'absence d'un segment hydrophobe dans l'AVS 117 de T. b. brucei susceptible d'expliquer de manière certaine une insertion au niveau de la double couche lipidique (BOOTHROYD et coll (1982) (15) ; ALLEN et coll (1982) (1)).

Pour cette dernière équipe deux hypothèses pourraient expliquer le mode de fixation des antigènes dans la membrane plasmique :

- . l'une se dégage de l'observation d'un pourcentage important de résidus chargés dans la région C-terminale : la liaison avec la membrane pourrait alors résulter d'interactions électrostatiques avec les têtes polaires des phospholipides membranaires.

- . L'autre tiendrait compte de la "queue hydrophobe" : Une partie des AVS pourrait conserver cette extrémité qui aurait alors la fonction de stabiliser la structure du manteau.

En conclusion de ce chapitre qui donne l'état des connaissances perçues à travers les publications les plus récentes, nous voudrions retenir que l'antigène variable sur le plan biochimique se définit comme une glycoprotéine possédant plusieurs sites de glycosylation soit intrachânes soit à l'extrémité C-terminale. L'antigénicité croisée entre AVS est précisée au niveau même de cette glycosylation C-terminale, l'antigénicité particulière de chaque AVS se localisant dans le reste de la configuration moléculaire d'ailleurs extériorisée par rapport à l'enveloppe cytoplasmique du parasite.

Nous reprendrons en fonction de nos résultats personnels sur T. equiperdum les hypothèses soulevées dans ce chapitre introductif en particulier :

- . le ou les identités glycaniques des AVS
- . la structure "glycosylée" C-terminale
- . l'antigénicité croisée et la définition du site moléculaire responsable
- . le mode de fixation des AVS sur la membrane cytoplasmique des parasites

CHAPITRE II : TRAVAUX PERSONNELS

I- ISOLEMENT, PURIFICATION ET CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE DES AVS DE T. EQUIPERDUM

A- Introduction

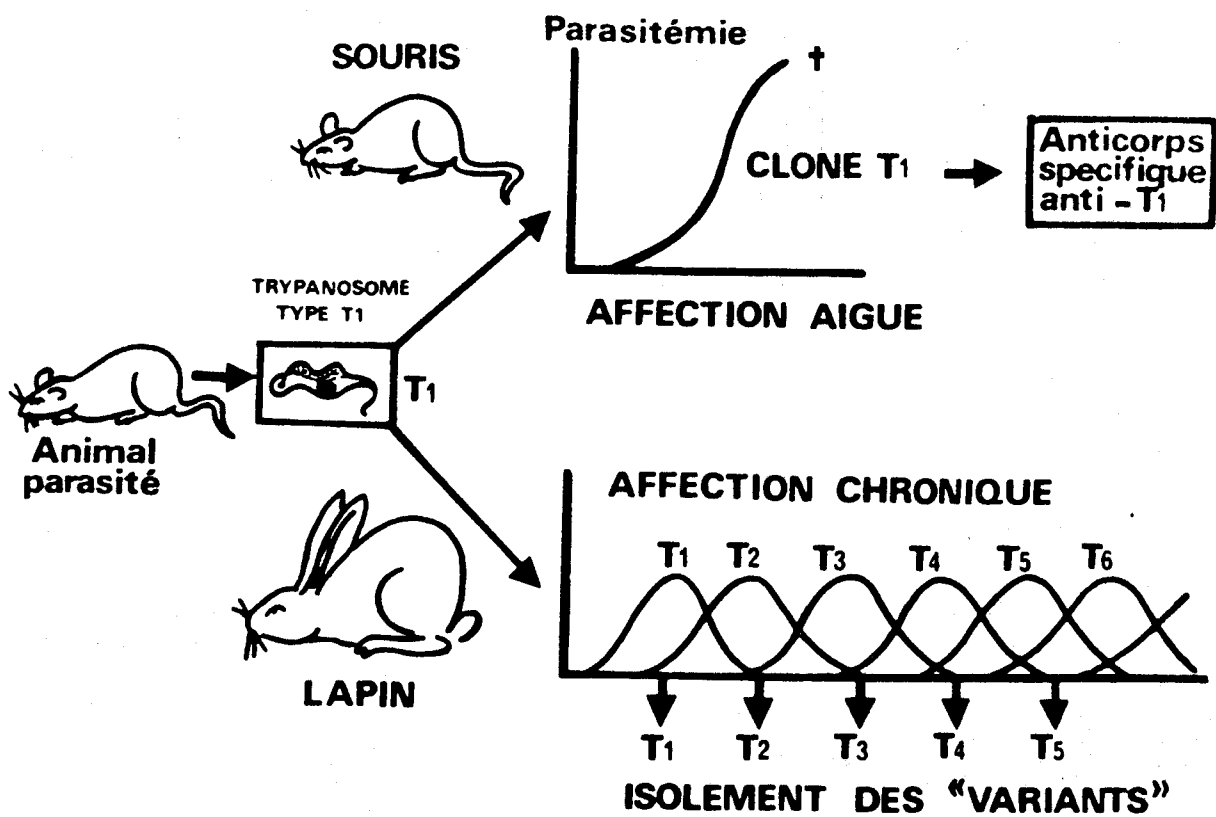
Notre modèle expérimental consiste en une série de glycoprotéines membranaires spécifiques de différents variants antigéniques de T. equiperdum.

La souche princeps de T. equiperdum qui fut utilisée a été fournie en 1961 au laboratoire d'Immunologie et de Biologie parasitaire de Bordeaux par l'Institut Pasteur. De cette souche, entretenue par passages successifs à la seringue chez la souris, le groupe de Bordeaux a isolé par clonage en 1971 un type antigénique prédominant, qu'il a appelé selon la nomenclature proposée par LUMSDEN et coll (1967) (88) BoTat - 1 (Bordeaux Trypanozoon antigenic type 1). Ce stabilat, conservé à - 196° C dans l'azote liquide, a été utilisé comme base par CAPBERN et coll (1977) (23) pour l'étude du phénomène biologique de la variation antigénique chez le lapin.

Les auteurs ont établi (Figure 10) que l'infection chronique du lapin est caractérisée par l'apparition successive de pics parasitémiques en relation avec des changements de type antigénique du trypanosome. Chez la souris ou chez le rat, l'affection étant de type aigu évolue en une seule vague parasitémique rapidement mortelle (6 à 7 jours) (Figure 10).

Il devint possible de préparer des populations antigéniquement homogènes de T. equiperdum en utilisant la technique de clonage proposée par INOKI (1960) (68) pour T. b. gambiense : le sang de lapin parasité, prélevé à différents moments de l'évolution de sa parasitologie, est inoculé à la souris.

Dès l'apparition de parasites chez la souris, un prélèvement de sang est réalisé et après dilution dans un tampon convenable, un unique trypanosome est repéré au microscope optique et inoculé à une nouvelle souris. Le seul parasite suffit pour entraîner une infection aiguë. Tous les trypanosomes sont alors issus d'un parasite représentatif d'un type antigénique.



BUS
LILLE

Evolution comparée de la parasitémie chez la souris et le lapin

FIGURE 10

De cette façon, CAPBERN et coll ont pu isoler plus de 100 types antigéniques différents caractéristiques d'un "moment" de l'évolution de la parasitose expérimentale chez le lapin. Ils ont d'autre part pu signaler plusieurs critères du mode d'apparition de ces variants antigéniques. Nous retenons :

* la réversion au type de base BoTat - 1 lors d'une infestation par n'importe lequel des types antigéniques

* l'existence d'un ordre relatif dans l'apparition des types antigéniques. Ces derniers ont été classés en trois groupes en fonction de leur délai d'apparition chez l'animal :

- type "précoces" apparaissant dans les 3 premières semaines de la maladie
- types "semi-tardifs" se développant au delà des 3 premières semaines
- types "tardifs" apparaissant seulement chez les lapins ayant survécu plus d'un mois

C'est en vue de la caractérisation plus précise du support antigénique membranaire qu'un protocole d'isolement puis de purification des antigènes variables a été recherché et bientôt mis au point par BALTZ et coll (1976) (5).

B- Préparation des AVS de T. equiperdum

L'obtention en quantité d'une population parasitaire clonée peut être réalisée par infestation intrapéritonéale de rats Wistar de sexe mâle, d'un poids moyen de 500 g. Les inoculum représentent en moyenne 10^8 trypanosomes issus d'une population clonée, conservée à -196° C dans l'azote liquide. L'infection se traduit rapidement par une parasitémie intense entraînant la mort de l'animal. Sur le plan immunologique, les trypanosomes sont alors homogènes à plus de 99,99 %, ceci pouvant être vérifié par les techniques radioimmunologiques ou par immunofluorescence indirecte, à l'aide d'antisérums spécifiques de variants.

L'isolement et la purification des antigènes à partir de ces populations cellulaires comprend plusieurs étapes :

- isolement des trypanosomes
- libération du manteau de surface des parasites
- purification de l'antigène membranaire

1- Isolement des trypanosomes

Le sang de l'animal prélevé par ponction abdominale sur héparine, est additionné d'un volume égal de tampon phosphate glucosé de pH 8 (NaCl 44 mM, Na_2HPO_4 57 mM, NaH_2PO_4 3 mM, glucose 0,1 %). La majorité des hématies est précipitée par addition de dextran (Pharmacia, T 500). Le surnageant est recueilli après centrifugation à basse vitesse. L'ensemble des éléments cellulaires demeurés en suspension est alors soumis à un passage sur colonne de DEAE-cellulose. Le protocole décrit en 1970 par LANHAM et GODFREY (78) élimine alors les hématies contaminantes, les éléments figurés, et livre une "fraction Trypanosomes". Une numération à ce stade rend compte des rendements en parasites. Une centrifugation livre un culot cellulaire utilisable pour la préparation de l'antigène membranaire.

2- Libération du manteau de surface parasitaire

La libération de l'antigène variable se réalise à partir du culot de trypanosomes par mise en suspension dans un tampon phosphate 0,125 M de pH 5,5, enrichi de glucose à la concentration de 1 %. Les parasites en suspension sont laissés une nuit à 4° C sur agitateur de KLINE. Ce traitement suffit à séparer du parasite son revêtement de surface qui se trouve solubilisé dans le milieu tamponné. Après centrifugation, qui sédimente les trypanosomes encore vivants, le surnageant est dialysé vis à vis d'une solution de NaCl 0,5 M. A ce stade les débris cellulaires, provenant de la lyse d'un faible pourcentage de parasites, sont éliminés par une étape d'ultracentrifugation (50 000 g, 1 h, 4° C). Le surnageant contient alors l'antigène variable parmi un certain nombre de composants solubles de nature et de fonctions biologiques très diversifiées.

3- Purification de l'antigène variable

La purification de l'antigène variable peut faire appel aux techniques classiques de fractionnement : chromatographie de gel filtration, d'échange ionique ..., ou bien à un protocole qui préjuge de la nature du support de

l'antigénicité spécifique des variants : la chromatographie d'affinité sur colonne de Sépharose Concanavoline-A. Cette dernière méthode apparaît être la plus élégante, la plus rapide, ceci avec des rendements satisfaisants. Le gel est équilibré en NaCl 0,5 M. La lectine retient sélectivement l'antigène variable, qui est ensuite élué par passage d'une solution enrichie à 10 % (p/v) de α méthyl-D-mannoside. Le composant membranaire support du site antigénique recherché est alors dialysé contre de l'eau désionisée puis lyophilisé. La "pureté" de la préparation est alors testée et confirmée par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS.

Toute une série de populations parasitaires de types antigéniques répartis dans les différents groupes précédemment évoqués, ont fait l'objet de l'application de ce protocole :

- type de base : BoTat - 1
- types précoces : BoTat - 2, - 3, - 4
- types semi-tardifs : BoTat - 78, - 100
- types tardifs : BoTat - 20, - 28, - 51

Il était ainsi possible de procéder à une étude visant à donner une définition physico-chimique précise des AVS de T. equiperdum.

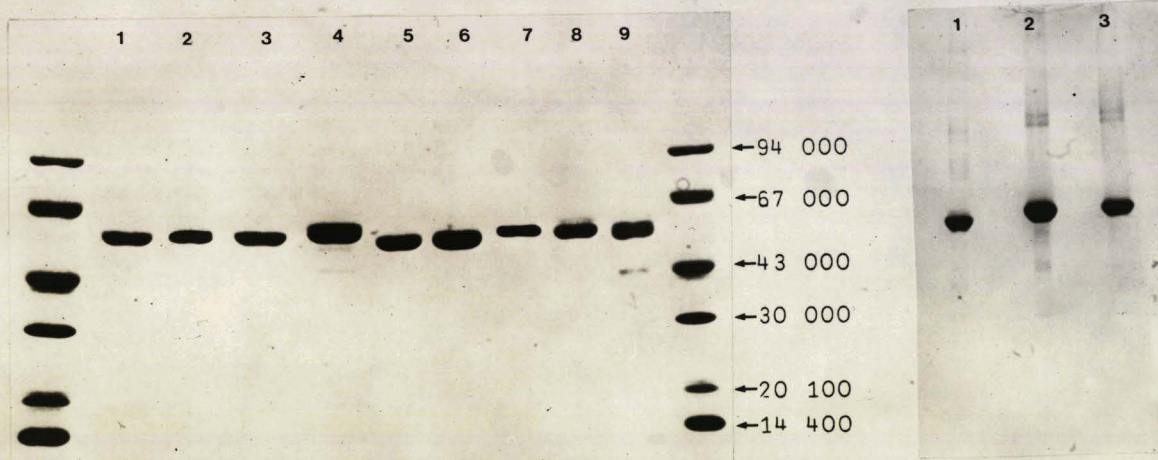
C- Etude des propriétés physico-chimiques des AVS de T. equiperdum

1- estimation de la masse moléculaire apparente en gel de polyacrylamide en présence de SDS

L'analyse des préparations d'AVS selon la technique de LAEMMLI (1970) (77) a permis non seulement de déterminer leur masse moléculaire mais aussi de vérifier leur homogénéité (Figure 11). La comparaison de leurs conditions de migration électrophorétique par rapport à celle de témoins de masse moléculaire connue a conduit à une estimation de la taille moléculaire apparente des AVS. De l'étude on notera que les AVS dans leur ensemble se comportent comme des protéines de masse moléculaire comprise entre 52 000 et 59 000. Il a pu être constaté pour les 2 AVS (BoTat - 1 et BoTat - 28) dans les conditions expérimentales "retenues" que la réduction des ponts disulfure entraînait une "augmentation" de la valeur estimée de taille moléculaire, équivalente dans chaque cas à 8 000 environ. Pour BoTat - 1, la

DETERMINATION DE LA MASSE MOLECULAIRE
DES AVS DE TRYPANOSOMA EQUIPERDUM

COMPARAISON DE LA MIGRATION
ELECTROPHORETIQUE DE L'AVS
BoTat-1 PREALABLEMENT DISSCUS



ELECTROPHORESE 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

1 en milieu non réducteur
2 en milieu réducteur à 60°C
3 en milieu réducteur à 100°C

FIGURE 11



valeur passait en effet de 53 000 à 61 000 et pour Botat - 28 de 59 000 à 67 000 (Figure 11).

Il a été rapporté par les études structurales évoquées dans le premier chapitre que la région C-terminale est particulièrement figée dans une conformation maintenue par plusieurs ponts disulfure intrachâînes. La coupure des ponts disulfure la modifiant profondément, il en résulte une sensible augmentation de la taille moléculaire apparente expliquant le changement de comportement en gel.

Si l'on se réfère aux résultats de CROSS (1975) (28) et de ALLEN et coll. (1982) (1), il semble que la valeur trouvée pour les AVS natifs soit la plus proche de la réalité : l'estimation de la taille moléculaire en milieu réducteur de l'AVS 117 de T. b. brucei avait donné une valeur en électrophorèse sur gel de polyacrylamide de 65 000 ; la connaissance complète de la structure primaire de la glycoprotéine donne une valeur calculée de 53 156, très proche de nos propres résultats. On sait aussi que les glycanes occupent un très grand volume par rapport à l'axe peptidique. Rappelons que ROVIS et DUBE (1981) (115) ont montré pour leurs AVS de T. b. brucei que les glycanes branchés par une liaison N-glycosidique amenaient une augmentation de taille moléculaire apparente de l'ordre de 10 %. Les mêmes auteurs semblent retenir que le glycanne en situation C-terminale n'a aucune influence sur le comportement de la molécule en gel de polyacrylamide en milieu réducteur.

2- Détermination de la valeur du point isoélectrique par isoélectro-focalisation en gradient de pH

La détermination de la valeur des pH_i a été réalisée par isoélectro-focalisation sur gel de polyacrylamide à 5 %. Les conditions expérimentales retenues sont détaillées dans l'appendice technique.

Tous les AVS étudiés ont montré une hétérogénéité matérialisée par la mise en évidence de plusieurs bandes colorées par le bleu Coomassie (Figure 12). Si certains présentent un nombre conséquent de bandes d'intensité non négligeable (BoTat - 2 par exemple est caractérisé dans cette technique par 5 bandes essentielles), d'autres exhibent en revanche une bande largement majeure (cas de BoTat - 1 et BoTat - 28).

Isoélectrofocalisation des AVS de Trypanosoma equiperdum

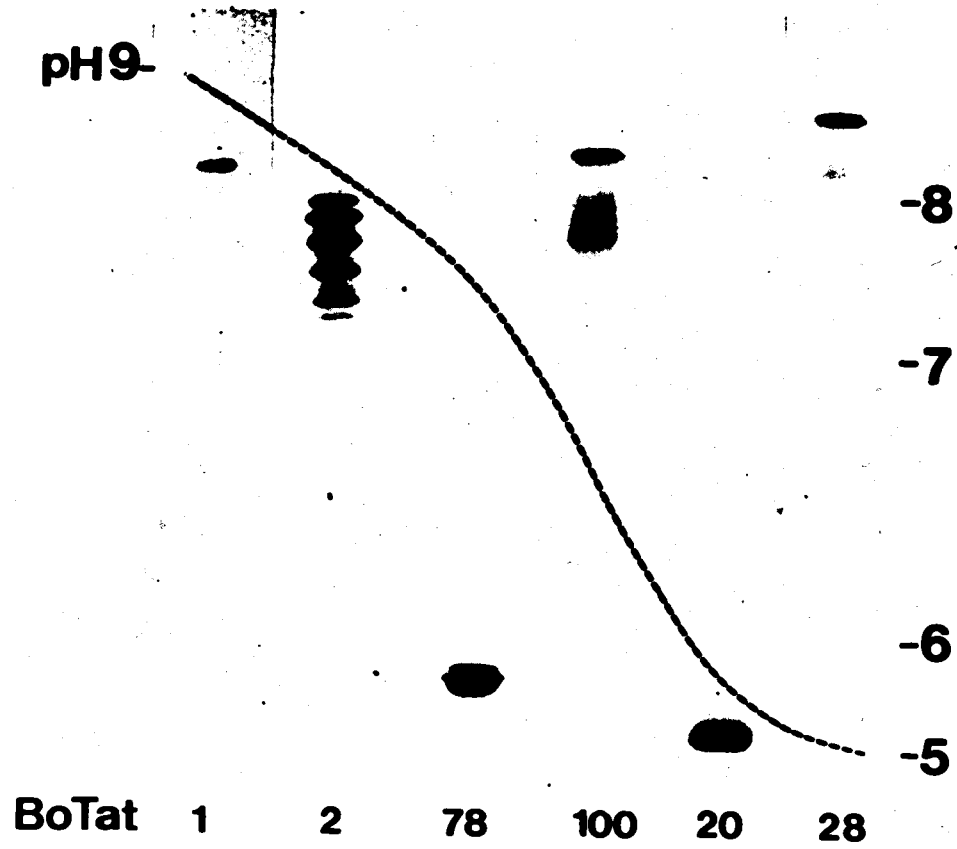


FIGURE 12



Plusieurs hypothèses peuvent conduire à une explication des résultats :

. une dénaturation plus ou moins importante des échantillons en fonction du protocole de purification des AVS. Rappelons en effet que la préparation de l'antigène comporte une étape de mise en suspension des parasites au contact d'un tampon de pH 5,5, étape inévitablement accompagnée de la lyse d'un petit pourcentage de trypanosomes, avec pour conséquence la libération dans le milieu d'enzymes de dégradation, par exemple protéolytiques. Cette hypothèse semble peu intéressante dans la mesure où aucune microhétérogénéité n'a pu être notée en gel de polyacrylamide en présence de SDS. Il faudrait admettre qu'il s'agisse de coupures se produisant aux extrémités de la molécule et n'affectant pas de manière significative la taille moléculaire. Ceci sera démenti par les études structurales.

. une microhétérogénéité des copules glycaniques d'origine biosynthétique. La variation pourrait dans ce cas affecter le nombre de sites de glycosylation, le nombre de monosaccharides constitutifs, ou enfin la qualité des oses impliqués dans les structures glycaniques.

. une microhétérogénéité affectant l'axe peptidique par des modifications d'acides aminés post-synthétiques, par exemple la phosphorylation ou l'amidification des résidus amino acides dicarboxyliques.

Ajoutons encore pour nuancer ce chapitre que deux AVS spécifiques de T. congolense se sont également révélés sous la forme de trois bandes en isoélectrofocalisation (ONODERA et coll) (1981) (97). L'isolement de l'antigène dans cette étude mettait en oeuvre un procédé très différent puisque les parasites étaient soumis à des chocs par congélation-décongélation suivis d'une légère agitation mécanique. Ces auteurs ont proposé deux explications :

- l'existence de modifications mineures post-synthétiques affectant comme nous l'avons nous même suggéré, le degré d'amidification ou le contenu polysaccharique.

- l'éventualité pour les antigènes de résulter de la traduction de plusieurs gènes co-exprimés.

Nos résultats analytiques d'isofocalisation permettent aussi de souligner l'existence de profondes variations de valeur des pH_i d'un AVS à l'autre (Figure 12).

3- Etude en dichroïsme circulaire*

a. Spectre dichroïque sur molécule "native"

Le tracé des spectres dichroïques a été pratiqué sur toute une série d'AVS spécifiques des variants : BoTat - 1, - 2, - 3, - 4, - 20, - 28, - 51, - 78, - 100.

Il a été possible d'évaluer les pourcentages respectifs de structure hélicoïdale et de feuillets plissés, ce qui a amené à distinguer 4 catégories différentes de structure secondaire (Tableau 1). Le premier groupe uniquement représenté par l'AVS BoTat - 1 se caractérise par un pourcentage élevé de conformation hélicoïdale (près de 50 %) et une répartition sensiblement égale des feuillets plissés ou de l'ensemble β turn-structure inorganisée. Un second groupe correspondant à BoTat - 28 se singularise par près de 50 % de structure inorganisée et β turn, et autant de feuillets plissés que de structure hélicoïdale. Un troisième groupe qui comprend le plus grand nombre d'AVS étudiés voit une distribution égale des trois types structuraux. Enfin, le quatrième groupe, le plus organisé, atteint près de 50 % de feuillets plissés et 30 % d'hélice α .

La figure 13 illustre les spectres dichroïques caractéristiques de chaque catégorie.

b. Dénaturation thermique

L'étude de la variation de $(\theta)_{222}$ en fonction de la température (Figure 14) a confirmé l'ensemble des résultats précédents et l'existence de 4 groupes :

- Comme attendu, la température de demi-dénaturation était liée au pourcentage de structure organisée avec légère prédominance de la structure en feuillets plissés.

- le retour progressif à la température initiale s'est accompagné d'une renaturation quasi totale pour l'AVS BoTat - 1, et partielle pour les AVS BoTat - 20 et - 51. Pour les autres catégories, la dénaturation thermique était irréversible.

4- Composition amino acide

Cette détermination a été réalisée selon le protocole classique

* Les spectres dichroïques ont été obtenus par J.P. Aubert, Chargé de Recherches INSERM, Unité INSERM N°124, Place de Verdun, 59020 Lille Cédex.

EVALUATION DE LA STRUCTURE SECONDAIRE
DES AVS 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 1

SPECTRES DICHROIQUES DES AVS BoTat-1, -78, -28 ET -51

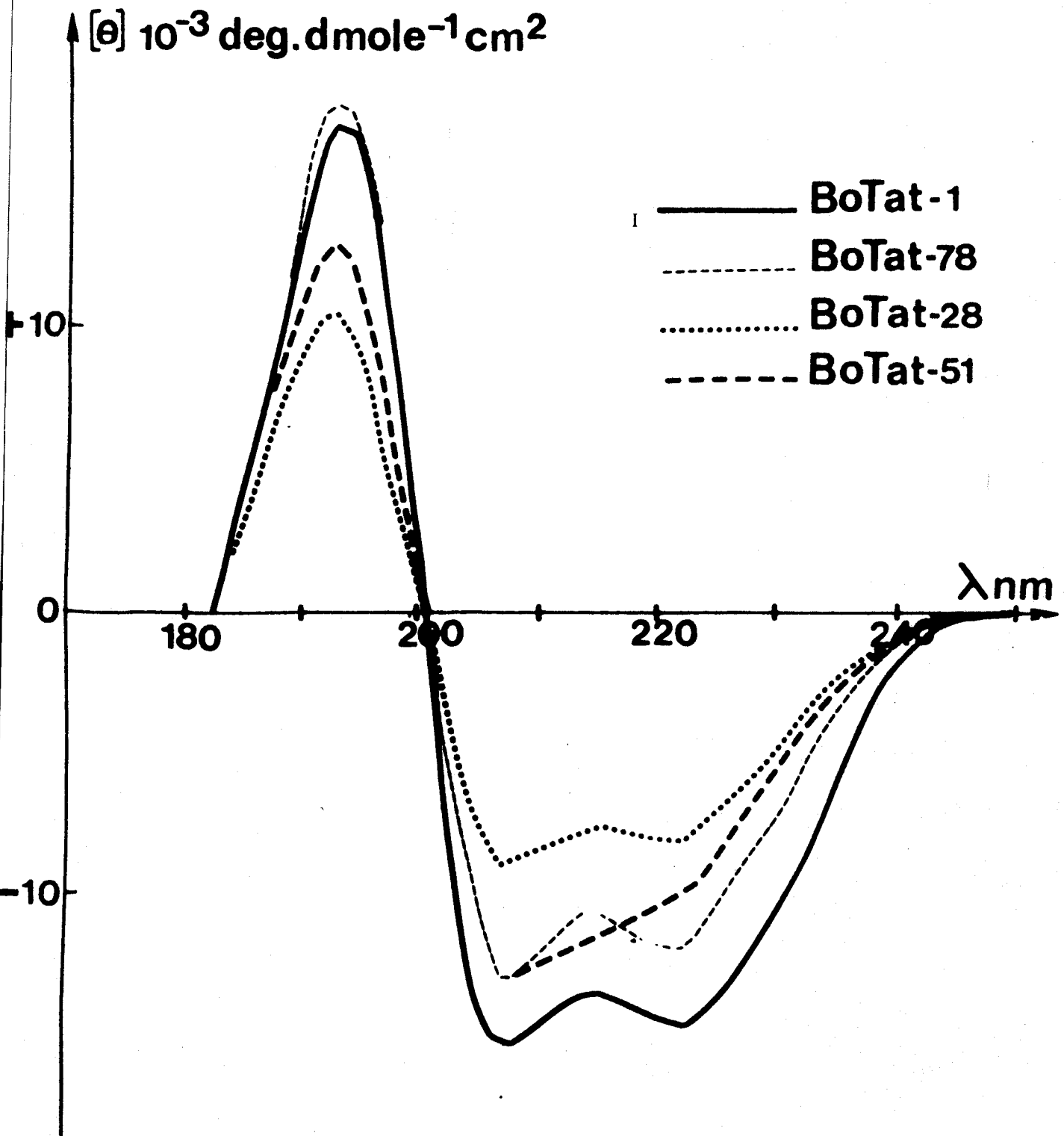


FIGURE 13



BoTat -1, -51, -28 et -78

222 10^{-3}

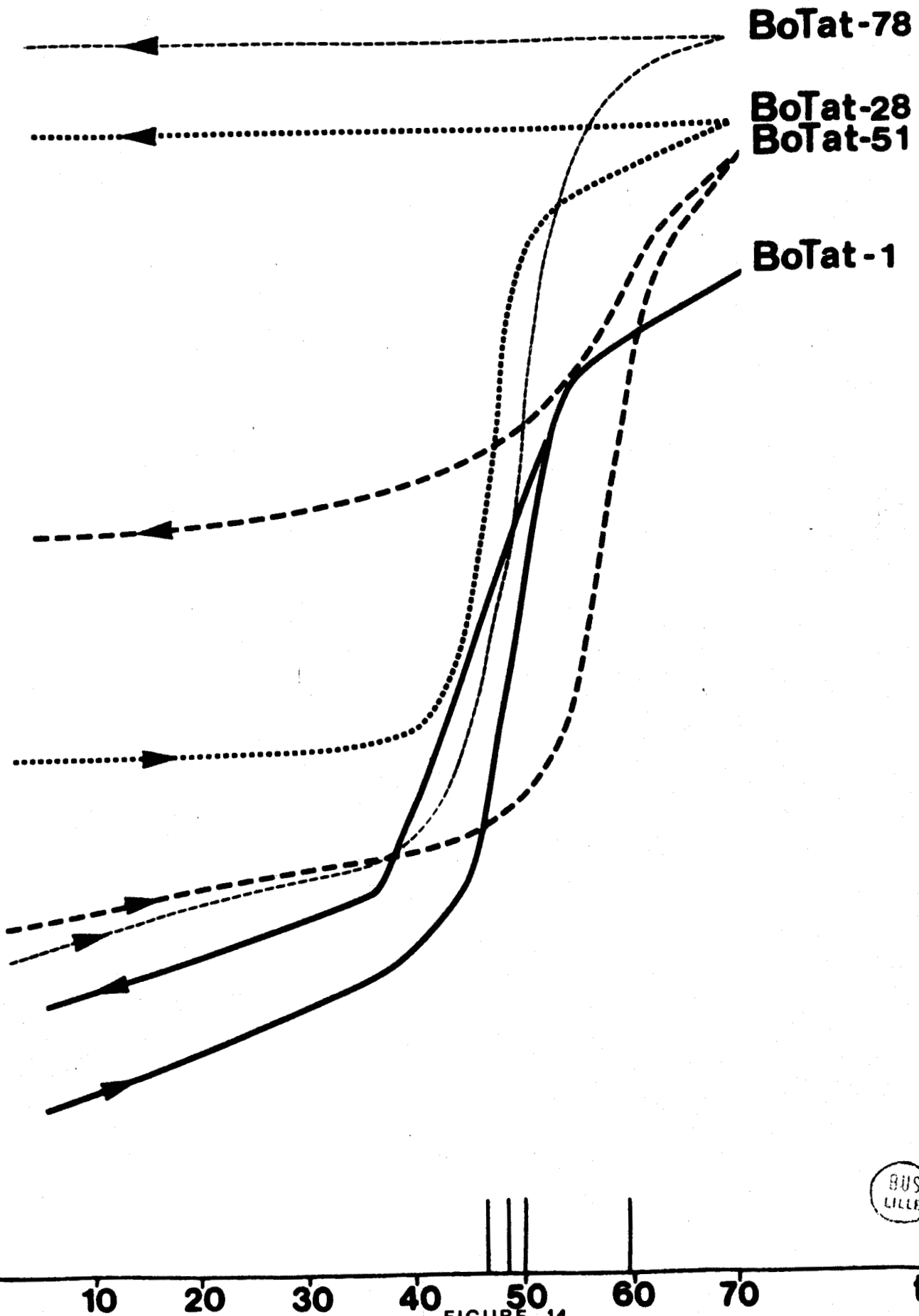


FIGURE 14



d'hydrolyse chlorhydrique et de quantification sur un système résine mono-colonne. Une approche particulière a été également retenue pour doser certains résidus amino acides :

- transformation des résidus de cystéine et cystine en acide cystéique
- hydrolyse par l'acide β mercaptosulfonique en vue du dosage des résidus de tryptophane

Les résultats ici présentés sont exprimés en nombre de résidus pour 100 résidus dosés (Tableau 2). Un calcul du nombre de résidus par mole d'antigène est rapporté pour BoTat - 1 et BoTat - 28 (Tableau 3), sur la base de la masse moléculaire apparente déterminée en gel de polyacrylamide sur le matériel non réduit.

Les principales caractéristiques à souligner sont essentiellement de trois ordres :

- une composition globale assez constante d'un AVS à l'autre, avec une prédominance de résidus d'acide aspartique et/ou d'asparagine, de thréonine, d'acide glutamique et/ou de glutamine, d'alanine et de lysine. Le rapprochement de ces résultats avec ceux obtenus en isoélectrofocalisation semble indiquer que les profondes variations au niveau des valeurs moyennes de pH_i pourraient résulter de différents degrés d'amidification des résidus amino acides dicarboxyliques.

- une diminution progressive du taux de leucine dans la succession des variants BoTat - 1, - 2, - 3, - 4, - 78, - 100, - 28 à rapprocher de leur ordre d'apparition dans le processus infectieux. Toutefois, deux variants tardifs BoTat - 20 et - 51, dont nous avons pu déjà signaler la singularité au niveau structure secondaire, semblent faire exception à la règle.

- une teneur relativement élevée en résidus de 1/2 cystine en rapport avec les données bibliographiques concernant la présence de nombreux ponts disulfure dans la partie C-terminale des AVS.

5- Séquence N-terminale

Les AVS natifs isolés des variants BoTat - 1 et BoTat - 28 ont été analysés par dégradation automatique de EDMAN (Tableau 4). Cette analyse a

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 |
| ½ 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 2

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

| Acides aminés | BoTat -1 | BoTat -28 |
|---------------|----------|-----------|
| ASX | 62 | 54 |
| THR | 36 | 55 |
| SER | 22 | 31 |
| GLX | 45 | 56 |
| PRO | 15 | 18 |
| GLY | 32 | 43 |
| ALA | 70 | 77 |
| VAL | 12 | 17 |
| 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 | 17 | 14 |
| | 441 | 494 |

* Résultats exprimés en mole par mole de glycoprotéine (les poids moléculaires respectivement de 53 000 (BoTat -1) et 59 000 (BoTat -28) déterminés par électrophorèse en gel de polyacrylamide SDS moins le poids de sucre (8 %) ont été utilisés pour le calcul.

TABLEAU 3

permis l'identification sans ambiguïté, pour BoTat - 1, des positions 1-14, 16-17, 19-26 et pour BoTat - 28 des positions 1-10, 14-15, 18. Dans les deux cas donc et surtout pour l'AVS BoTat -28, le rendement obtenu au cours de la dégradation récurrente a très vite chuté. Ce fait peut éventuellement s'expliquer par l'influence de la structure conformationnelle des molécules et aussi de la présence des glycanes.

6- Composition glucidique

3 AVS répartis chacun dans une catégorie différente (variants précoces, semi-tardifs et tardifs) ont été analysés dans le but d'établir leur composition glucidique. Les résultats (Tableau 5) ont montré une définition osidique quasi constante du point de vue qualitatif et quantitatif. Le contenu global en sucres se situe en effet entre 7 et 8 % (p/p) des préparations. JOHNSON et CROSS (1977) (72) avaient au contraire constaté sur les AVS de T. b. brucei une variation de la teneur en glucides allant de 6 à 17 %.

Sur ce plan qualitatif, les 3 oses dosés par chromatographie en phase gazeuse sont, par ordre décroissant, le mannose, le galactose, et la N-acétyl-glucosamine. Un pic dont le temps de rétention correspond au glucose est également présent sur les diagrammes. Trouvé toujours en faible quantité, il ne peut être exclu qu'il s'agisse réellement d'un hexose. Seule une analyse structurale du matériel permettra d'affirmer de manière définitive sa présence. On ne peut éliminer le fait que l'existence de glucose dans la préparation puisse être le fait d'une contamination par exemple au cours des étapes de préparation.

7- Mise en évidence d'une phosphorylation

L'existence du phosphore dans les AVS de T. equiperdum a été établie, soit par utilisation de méthodes isotopiques : obtention in vivo de parasites marqués au ^{32}P , soit par dosage direct du phosphore après minéralisation d'antigènes purifiés.

Le marquage au ^{32}P offre l'avantage de pouvoir préparer en quantité l'AVS radioactif. La vérification de l'incorporation de phosphore ^{32}P au niveau de l'antigène est réalisée par électrophorèse en gel de polyacrylamide suivie d'une autoradiographie. Sur une étude de trois variants, BoTat - 1, - 28, et -

COMPOSITION GLUCIDIQUE DES AVS 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 5



78, les zones de migration correspondant aux AVS "natifs" étaient radioactives.

Le dosage du phosphore organique sur les AVS en dehors de l'aspect quantitatif permet de mieux éliminer tout doute quant à une contamination par du phosphore inorganique ou venant d'un composé adsorbé sur la glycoprotéine. Sans rappeler le protocole suivi dans son intégralité (cf appendice technique) plusieurs temps trichloracétiques dont un à 80° C pendant 20 minutes sont retenus ceci avant minéralisation à la flamme. Le dosage du phosphore a été réalisé selon la technique au vert Malachite d'ITAYA et MICHIO (1966) (69). Les résultats présentés (Tableau 6) concernent BoTat - 1 et - 28. Dans les deux cas, une mole de phosphore est dosée par mole de glycoprotéine.

Plusieurs expériences ont été mises en oeuvre pour déterminer la nature de la liaison entre le groupement phosphate et le reste de la molécule.

. Avec l'utilisation de la technique de CAPONY et coll (1983) (24), il a pu être établi que le résidu phosphorylé n'était pas un ester aliphatique de la sérine ou de la thréonine, ni un ester aromatique de la tyrosine.

. La stabilité de la radioactivité après traitement de la phosphoprotéine marquée au ^{32}P par l'hydroxylamine ou par une solution alcaline diluée permettait d'éliminer aussi l'hypothèse d'une liaison acyl phosphate au niveau d'un résidu d'acide glutamique ou d'acide aspartique.

. Il fut également montré que la liaison phosphorique résistait à l'action de la phosphatase alcaline.

. Enfin, le fait que le groupement phosphate soit toujours présent après plusieurs précipitations trichloracétiques (16 % p/p) dont une avec incubation pendant 20 minutes à 80° C, permet d'exclure une liaison labile en milieu acide telle qu'on la trouve dans la phosphohistidine.

Il s'agit là par conséquent d'un site de phosphorylation différent de ceux habituellement rencontrés dans les phosphoprotéines.

D- Conclusion

La comparaison des résultats obtenus pour les AVS de T. equiperdum avec ceux publiés pour quelques AVS de T. b. brucei permet de souligner certains traits communs à ces antigènes variables issus d'une espèce différente.

DOSAGE DU CONTENU EN PHOSPHATE DES
AVS BoTat -1 ET BoTat -28

| AVS | Contenu en protéine (nanomoles) | Contenu en en phosphate (nanomoles) |
|-----------|---------------------------------------|---|
| | 5 | 4,5 |
| BoTat -1 | 10 | 9 |
| | 15 | 15 |
| | 5 | 4,3 |
| BoTat -28 | 10 | 9 |
| | 15 | 15 |

TABLEAU 6



- une taille moléculaire apparente en milieu réducteur relativement constante.

- l'existence d'une microhétérogénéité au niveau de la valeur du point isoélectrique. Il faut signaler que CROSS (1975) (28), au cours de son protocole de purification basé sur une isoélectrofocalisation préparative, a également remarqué l'existence de pics mineurs en plus du pic majeur isolé en tant que glycoprotéine de surface. Ces contaminants possédaient une taille moléculaire analogue à celle de la glycoprotéine majeure et les auteurs les ont attribués à des glycoprotéines extraites de variants mineurs présents dans la population, et/ou à des produits d'oxydation ou désamidation de la glycoprotéine majeure, ou encore de dégradation par des protéases endogènes. L'existence de ce dernier type de dégradation entraîne également des contaminants de taille inférieure à celle de la glycoprotéine majeure et les auteurs les éliminent par chromatographie de gel filtration.

- la prédominance des mêmes acides aminés : acides aminés dicarboxyliques, thréonine, alanine, lysine.

- la présence des mêmes monosaccharides : mannose, galactose, N-acétylglucosamine. Si toutefois nous avons trouvé pour les AVS BoTat - 1, BoTat - 78, et BoTat - 28 une composition également très similaire du point de vue quantitatif (teneur globale 7 à 8 %, rapport molaire mannose/galactose constant voisin de 2/1 et hexoses/hexosamine également constant de l'ordre de 8/1) JOHNSON et CROSS (1977) (72) aboutissent à des conclusions différentes pour les AVS de T. b. brucei : ils ont trouvé un taux global variant de 6 à 17 % et des rapports molaires très différents variant respectivement de 1/1 à 4,5/1 pour mannose/galactose et de 3/1 à 6/1 pour hexoses/hexosamine. Pour les auteurs, ces variations sont en relation avec la présence ou l'absence de sites de glycosylation facultatifs supplémentaires, conformément au schéma qu'ils ont proposé pour les AVS (Figure 9).

Aucune donnée se rapportant à la structure secondaire et au contenu en phosphore n'a été encore publiée pour T. b. brucei.

En ce qui nous concerne, les données du dichroïsme circulaire ont abouti à la caractérisation de 4 types de structure parmi les 9 AVS étudiés. Ces différents types semblaient apparemment liés au délai d'apparition de l'antigène

variable au cours de l'infection. Néanmoins, le faible nombre d'AVS qui a été analysé ne permet pas d'établir le rapport de façon précise.

Les résultats obtenus au sujet du phosphore semblent indiquer un type particulier de liaison. L'originalité décrite concernant l'oligosaccharide C-terminal laisse supposer que le groupement phosphate pourrait être impliqué dans cette structure. Nous y reviendrons plus avant dans ce mémoire.

II- ETUDE STRUCTURALE DE L'AVS BoTat-1

L'AVS BoTat-1 ou type antigénique de base a été le premier antigène choisi pour mener une étude structurale. Deux raisons ont orienté ce choix : le fait qu'il s'agisse du premier antigène à apparaître en cours d'infection, celui vers lequel il y a réversion, et aussi sa relative facilité de préparation en laboratoire.

La stratégie retenue en vue de l'étude structurale avait pour but un clivage de la glycoprotéine en "gros fragments" qui puissent être facilement positionnés au sein de la molécule. Cette méthode avait l'avantage d'utiliser au mieux les performances d'un séquenceur automatique et aussi de préciser rapidement le ou les sites de glycosylation de cette glycoprotéine. Elle offrait la possibilité d'une purification de différents fragments en vue de les tester dans leur intérêt d'un point de vue immunologique. C'est d'ailleurs dans cet esprit que le groupe de Bordeaux a pu préparer des anticorps monoclonaux à partir de plusieurs d'entre eux, une fois mieux connue leur situation dans la molécule.

Dans un premier temps, l'AVS BoTat-1 a fait l'objet d'une étude systématique de ses possibilités de clivage par méthodes enzymatiques et chimiques. Nous ne faisons ici que rappeler les principaux éléments retirés de cette étude qui faisaient l'essentiel de notre mémoire de Diplôme d'Etudes Approfondies.

. L'AVS natif ne possède que quelques sites privilégiés de coupure par la thermolysine, la trypsine et la protéase de S. aureus, livrant quel que soit l'enzyme deux gros fragments de masses moléculaires proches avoisinant 49 000 et 40 000. L'antigène dans les mêmes conditions est résistant complètement à l'action de la chymotrypsine.

. L'AVS une fois réduit et S-alkylé est beaucoup plus sensible ; il est rapidement clivé en petits peptides et glycopeptides sous l'influence des quatre mêmes enzymes cités.

Aucune de ces 2 approches n'apparaissait satisfaisante. Nous nous sommes alors orientés vers diverses méthodes de coupure chimique :

- clivage des liaisons méthionyl-X par le bromure de cyanogène (STEERS et coll (1965) (120)).

- clivage des liaison tryptophanyl-X par le BNPS-skatole (FONTANA (1972) (39)) ou par l'acide O-iodosobenzoïque (MAHONEY et HERMODSON (1979) (90)).

- Coupure des liaisons Asn-Gly par l'hydroxylamine (BORSTEIN et BALIAN (1977) (20)).

- Hydrolyse des liaisons Asp-Pro dans l'acide acétique à 10 % ajusté à pH 2,5 par de la pyridine (HASS et coll (1975) (55)).

Après examen des produits de clivage par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS selon la technique de LAEMMLI (1970) (77), nous avons retenu deux procédés : le BNPS skatole et le bromure de cyanogène.

* La coupure par le BNPS skatole livrait deux fragments de taille moléculaire respective 27 000 et 37 000. Toutefois, de nombreux problèmes ont été rencontrés en particulier lors de l'élimination de l'excès de réactif. Ces difficultés étaient dues en partie aux caractéristiques de solubilité des produits issus du clivage. L'extraction par l'acétate d'éthyle destinée à éliminer le réactif en excès s'est révélée entraîner le matériel protéique. Il a par conséquent fallu purifier l'ensemble de la phase organique par chromatographie de gel filtration en milieu acide formique à 9 %. Si elle a permis une séparation des composés, la méthode a malheureusement fourni les fragments avec un très mauvais rendement. Nous avons donc rejeté cette technique comme première approche. Toutefois une détermination de séquence amino acide a permis l'identification d'une partie de l'axe peptidique de la région centrale de la molécule (Tableau 7).

* La qualité des résultats nous a fait préférer le traitement par le bromure de cyanogène, réactif volatil dont l'élimination est très simple, obtenue par simple lyophilisation. La technique a été la base de l'étude structurale de l'AVS BoTat-1.

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 7



A- Traitement de la glycoprotéine réduite et S-alkylée par le bromure de cyanogène

* Principe

Dans son principe, selon GROSS et WITKOP (1961) (50) (Tableau 8), le mécanisme de clivage des liaisons méthionyl implique la formation initiale d'un bromure de cyanosulfonium qui, en milieu acide, se scinde en méthyl-thiocyanate et en bromhydrate d'iminolactone d'homosérine ; ce dernier se décompose spontanément en libérant d'une part la lactone de l'homosérine et d'autre part un fragment pourvu en position N-terminale de l'acide aminé lié à la fonction carboxylique de la méthionine. SCHROEDER et coll (1969) (116) ont signalé que lorsque l'acide aminé lié à la méthionine était une sérine ou une thréonine, la coupure était incomplète (Tableau 8). Enfin, étant donnée la réactivité observée au niveau des liaisons méthionine-cystine (Tableau 8), le traitement par le bromure de cyanogène n'a été appliqué que sur molécule préalablement réduite et alkylée au niveau de ses fonctions sulfhydryl.

* Résultats

Le protocole utilisé est détaillé dans l'appendice technique. Nous ne présenterons ici que les résultats :

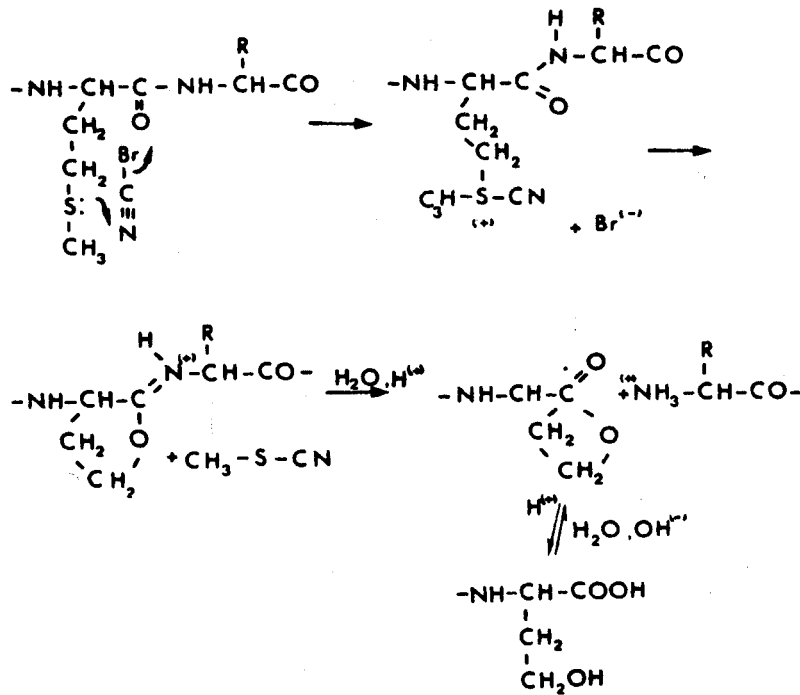
1- Résultat du clivage en gel de polyacrylamide :

L'étude électrophorétique en gel de polyacrylamide en présence de SDS des produits de clivage est illustrée dans la figure 15 ; quatre fragments essentiels ont été obtenus, dont les tailles moléculaires s'échelonnent entre 13 000 et 29 000. Les écarts de taille autorisent un fractionnement par chromatographie de gel filtration.

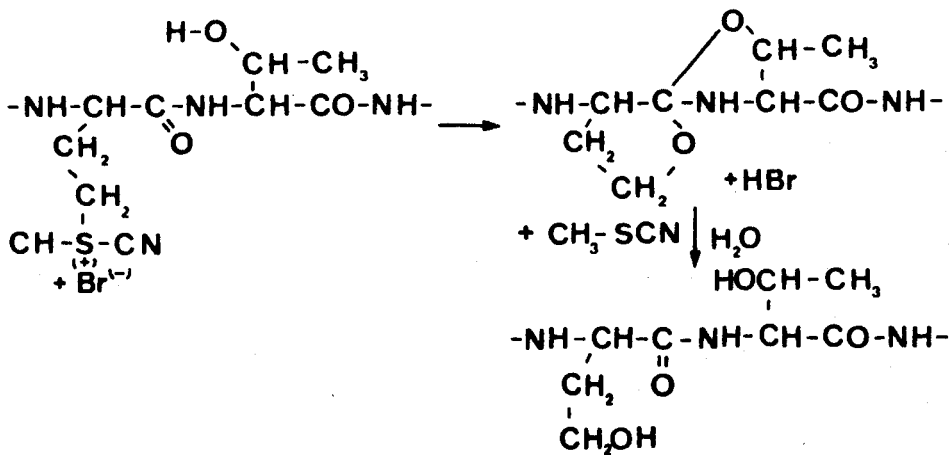
2- Fractionnement sur colonne de Bio-gel P100

Le mélange réactionnel a été fractionné par chromatographie de gel filtration sur une colonne de Bio-gel P100 équilibrée en acide acétique 0,1 N. L'élution a été réalisée avec un débit de 36 ml/heure. Les échantillons déposés

MECANISME DE COUPURE DES LIAISONS METHIONYL-X (Gross et Witkop, 1961)



COUPURE DES LIAISONS METHIONYL-THR OU METHIONYL-SER (Schroeder et coll, 1969)



SCHEMA DE LA REACTION INTRAMOLECULAIRE POSTULEE ENTRE L'ATOME DE SOUFRE DE LA CYSTINE ET L'IMINOLACTONE FORMEE PENDANT LE TRAITEMENT PAR LE BROMURE DE CYANOGENE (Doyen et Lepresle, 1979)

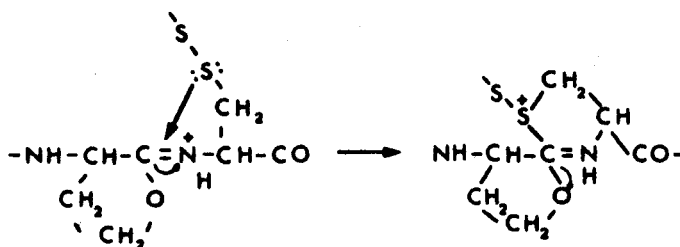
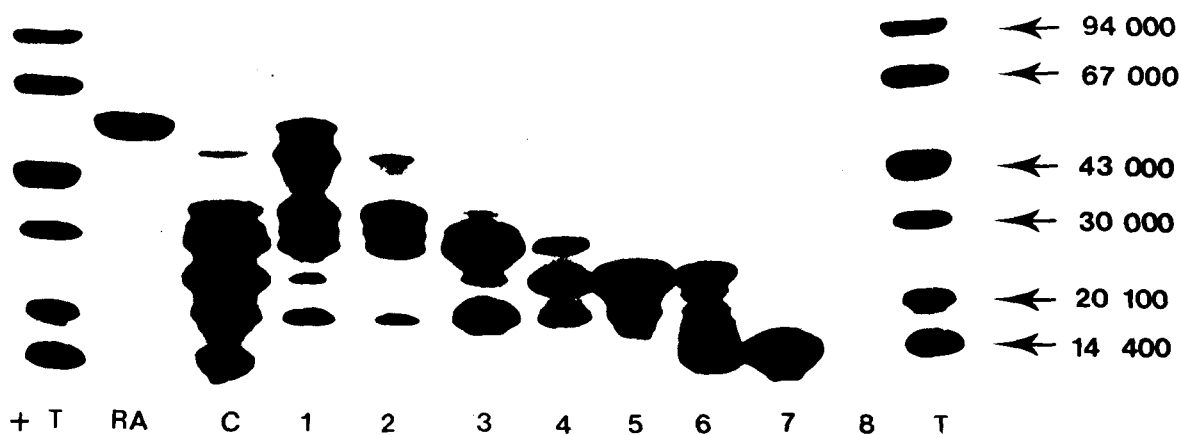


TABLEAU 8

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 15



pour chaque chromatographie correspondaient à 40 mg d'hydrolysats. L'élution était suivie par lecture spectrophotométrique à 230 nm, et par les réactions à la ninhydrine et à l'orcinol sulfurique. Les trois courbes sont illustrées dans la figure 16. Dix fractions ont été individualisées et recueillies.

3- Caractérisation des fractions obtenues après Bio-gel P100

a) Etude en gel de polyacrylamide en présence de SDS

A l'examen du gel (Figure 15) les fractions, en quasi totalité, se sont avérées très hétérogènes. Il peut être remarqué, la présence d'un composé de masse approximative 20 000 présent tout au long de l'élution, de la fraction F1 à la fraction F6.

b) Composition amino acide

Les compositions en acides aminés sont présentées dans le Tableau 9. En dépit de l'hétérogénéité des fractions, certaines informations pouvaient être dégagées de l'ensemble des résultats, notamment pour les deux fractions F5 et F7 :

- richesse relative de la fraction F7 en résidus hydrophobes (19,37 % Ala, 14,01 % Leu).

- au contraire, faible teneur en ces résidus pour la fraction F5 (10,86 % Ala, 9,66 % Leu) qui se matérialise à l'inverse par une richesse en résidus hydrophiles, particulièrement Lys et Glu eux mêmes peu représentés dans la fraction F7.

A l'époque cette première observation, en fonction des données bibliographiques concernant la structure des AVS, suggérait que la fraction F5 contenait ou représentait l'extrémité C-terminale hydrophile. Toujours en fonction des données d'autres groupes, cette hypothèse pouvait aussi être affirmée par le pourcentage élevé de S-carboxyméthylcystéine dosée. A l'inverse, la fraction F7 semblait correspondre à une autre portion de la molécule.

c) composition en sucres

Les résultats de détermination de composition glucidique par chromatographie en phase gazeuse sont présentés dans le tableau 10. L'analyse de la fraction F7 s'est révélée particulièrement intéressante à ce stade : la partie glycanique s'individualisant par l'absence totale de galactose, et mettant par conséquent en évidence :

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)

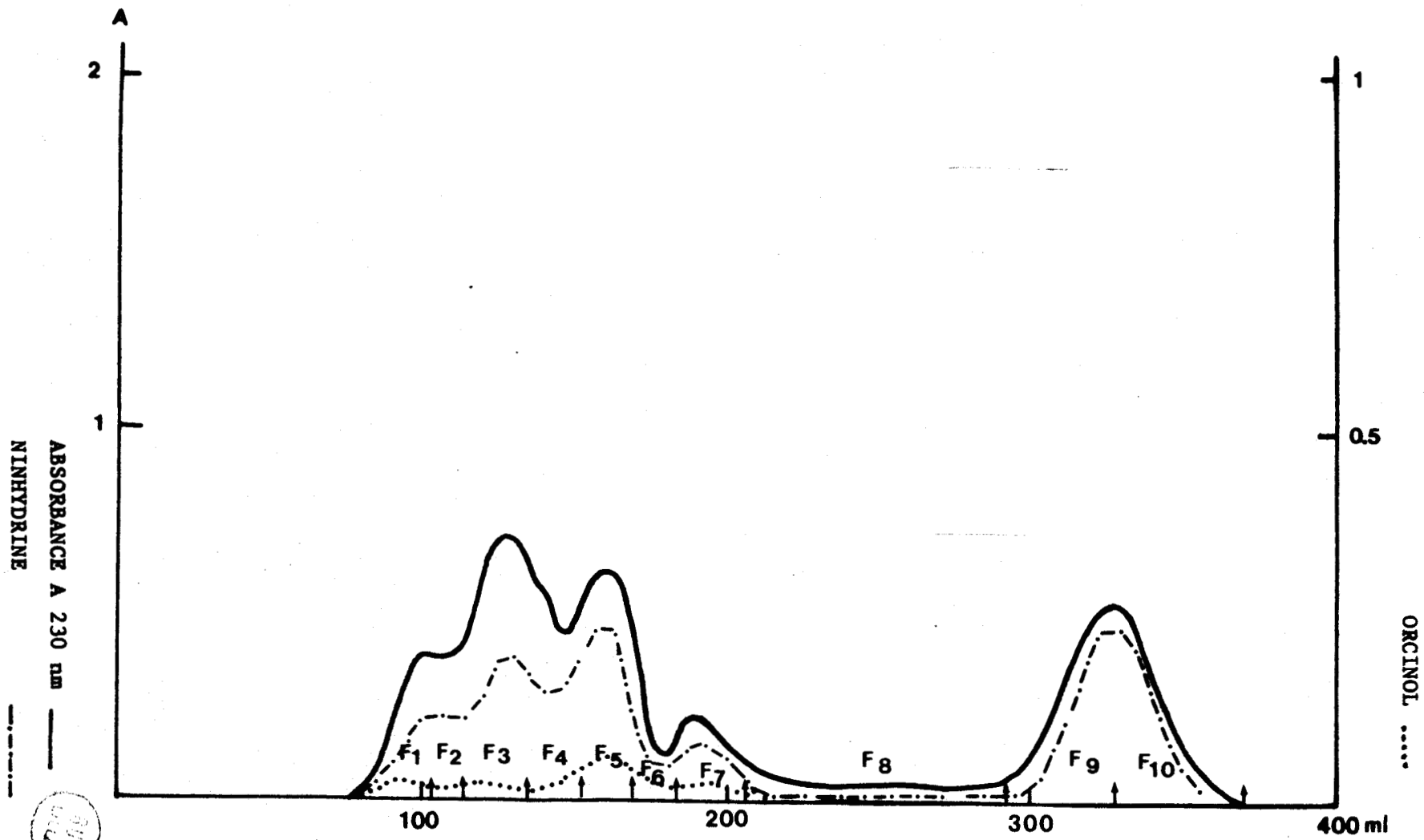


figure 16

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

| 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 † | 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'amino acides dosés.

TABLEAU 9



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 10



- la présence d'une chaîne oligomannosidique au niveau de cette fraction F7.
- la présence d'au moins deux sites de glycosylation dans la molécule et de deux types différents.

De plus, le rapport molaire mannose/N-acétylglucosamine de 9:2 obtenu pour F7 correspond au rapport molaire d'une structure oligomannosidique classique.

d) Etude en électrophorèse d'affinité avec la concanavaline A

Dans le but de montrer le caractère glycosylé de certains fragments BrCN et de les suivre aisément lors de nouveaux clivages, nous nous sommes intéressés à la mise au point d'une technique électrophorétique simple utilisant l'affinité des composants glycosylés pour une lectine.

La composition glucidique d'ensemble de l'AVS se caractérise par l'existence de structures riches en mannose, galactose, N-acétylglucosamine. De plus, le mode de préparation lui même de l'AVS repose sur une chromatographie d'affinité utilisant la concanavaline A. Enfin, les compositions osidiques des fractions F5 et F7 évoquées plus haut laissent présumer de l'existence de deux copules glycaniques susceptibles d'interagir avec la concanavaline A.

Le principe de la méthode repose sur la formation d'un complexe d'affinité au cours de l'électrophorèse, complexe qui se trouve ensuite piégé au niveau d'une interface gel-gel en raison de sa taille moléculaire. Seuls les fragments non complexés seraient à même de pénétrer un gradient approprié de gel de polyacrylamide, gel cette fois dépourvu de lectine. Il deviendrait par conséquent possible par comparaison avec la même migration en l'absence de lectine, de repérer les composants capables de se combiner avec la lectine. Dans le but de réunir des conditions optimales de formation et de stabilité du complexe, nous avons supprimé toute addition de détergent, et en particulier le sodium dodécyl sulfate.

Les profondes différences au niveau des points isoélectriques des fragments rendent difficiles la définition de conditions électrophorétiques permettant d'être assurés que la migration de tous les fragments se fait vers le même pôle. Il s'est avéré indispensable de procéder préalablement à la migration, à une modification chimique des composants. Le couplage des

résidus de lysine de la molécule avec la fluorescamine est une technique adéquate dans la mesure où elle permet aussi une visualisation par fluorescence des fragments de trop faible taille pour être révélés par le bleu Coomassie, ouvrant ainsi une application éventuelle pour l'analyse de glycopeptides.

D'un point de vue pratique, le gel est constitué de la façon suivante :

- . un gradient de gel de polyacrylamide 10-30 % en tampon tris-HCl pH 9,4.
- . un gel intermédiaire de polyacrylamide à 10 %, de faible épaisseur, en tampon identique à celui utilisé pour la formation du complexe.
- . un gel supérieur d'agarose à 2 % en tampon 1 mM CaCl₂, 1 mM MnCl₂, 0,375 M tris-HCl pH 8,8 contenant sur une moitié la lectine. Le gel est coulé à la température de 55° C pour éviter toute dénaturation de la lectine.

Dans les conditions expérimentales choisies, tous les fragments BrCN ont une migration rapide vers l'anode, la distance de migration étant fonction de leur seule taille moléculaire respective.

L'application de la technique à certaines fractions BrCN a permis de montrer que les composants majeurs des fractions F7 et F5 sont glycosylés (Figure 17).

De l'ensemble des résultats apportés par la composition glucidique des fractions et par le test d'électrophorèse d'affinité, nous pouvons affirmer que la molécule contient au moins deux glycanes interagissant avec la concanavaleine A, au niveau

- d'une structure oligomannosidique rattachée au fragment majeur 13 000 de la fraction F7.

- d'une partie glycanique contenant mannose, galactose et N-acétylglucosamine liée au fragment majeur 25 000 de la fraction F5.

4- Etude de la séquence amino acide de quelques fractions BrCN :

Nous avons tenté une analyse en séquence amino acide de certaines

ELECTROPHORESE D'AFFINITE AVEC LA CONCAVALINE-A*

ETUDE DES FRACTIONS B7CN

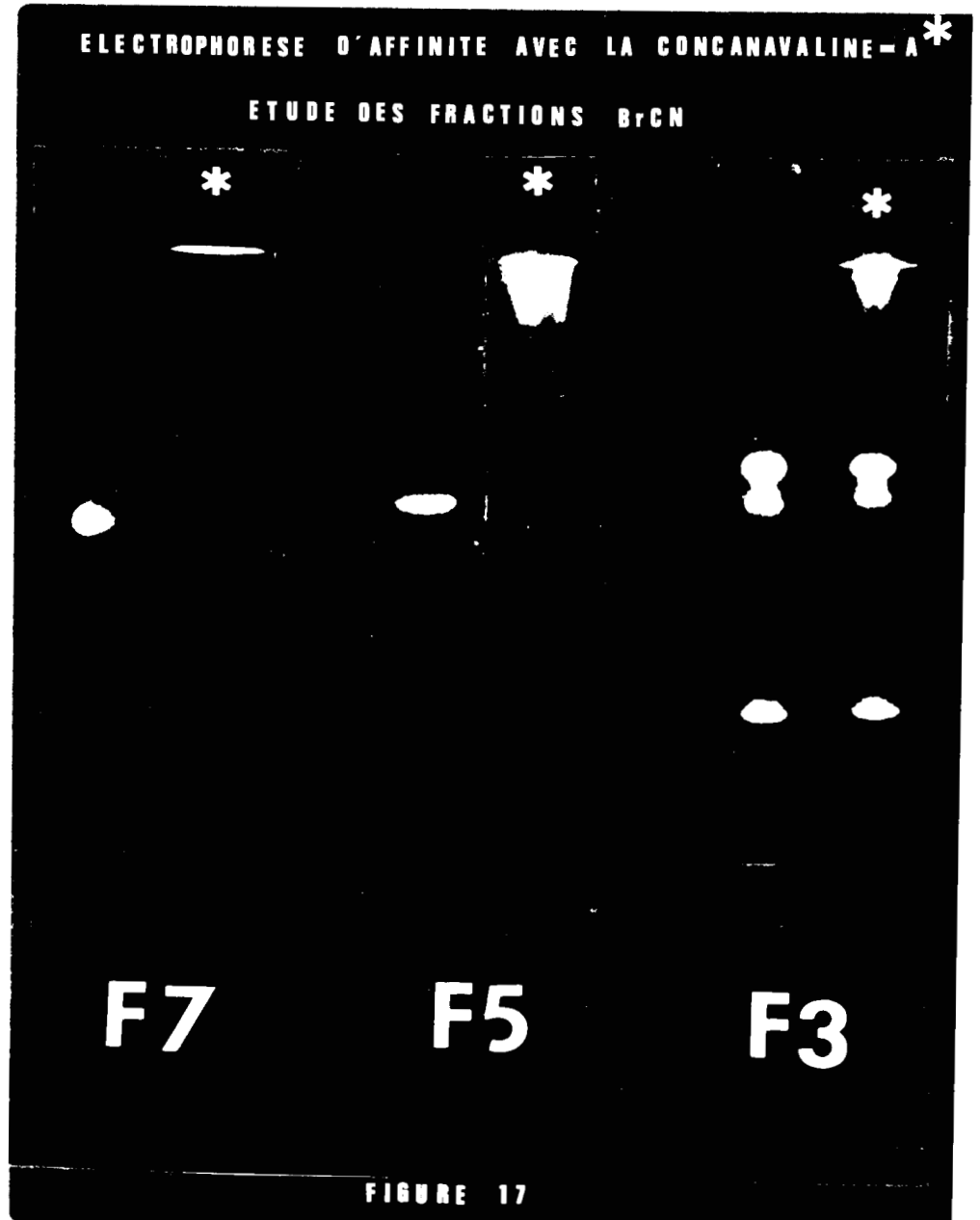


FIGURE 17



fractions BrCN en dépit de leur hétérogénéité. Les résultats de la dégradation automatique de Edman nous ont à chaque cycle livré plusieurs dérivés amino acides. La détermination quantitative précise des phénylthiohydantoïnes (PTH) amino acides par chromatographie liquide de haute performance (HPLC) nous a permis de suivre sans ambiguïté chacune des séquences dans la mesure où les deux structures peptidiques co-traitées se trouvaient en proportion très différente dans le mélange.

Si les analyses préliminaires ont été effectuées par dégradation manuelle de Edman, l'étude a été poursuivie ensuite sur séquenceur automatique Beckman 890 C. Trois fractions F7, F5 et F3 ont été analysées. Le tableau 11 présente les résultats après compilation des données apportées par l'étude de chaque fraction. En effet, chaque séquence a finalement été analysée deux fois au moins, un même fragment peptidique étant retrouvé dans plusieurs fractions BrCN issues de chromatographie.

5- Conclusion

Cette première approche structurale apporte déjà une connaissance importante de la molécule tant sur le plan de l'axe peptidique que de son organisation glycanique. Nous nous sommes intéressés à la localisation des fragments au sein de la molécule.

* La séquence majeure de la fraction F7 a pu être immédiatement située, en la rapprochant de la séquence N-terminale de la molécule native où une première méthionine en position 14 représente le site de coupure BrCN libérant F7 (Tableau 11).

* Dans la suite de la reconstitution moléculaire, nous nous sommes fondés sur des données issues de nos propres résultats et aussi sur celles apportées par plusieurs études d'AVS de T. b. brucei, données qui ont été d'ailleurs largement détaillées dans le chapitre des généralités. Il s'est en effet dégagé pour la totalité des AVS étudiés jusqu'ici, un ensemble de caractéristiques propres à la région C-terminale, soit :

- une nature essentiellement hydrophile avec une richesse particulière en lysine et en acide glutamique.
- la présence d'une copule glycanique contenant mannose, galactose et

SEQUENCES AMINO ACIDES N-TERMINALES DE 1'AVS BoTat-1 ET DES
BrcN F₇, F₅, F₃

| | | | | |
|---|----|----|----|----|
| BoTat-1 | 5 | 10 | 15 | 20 |
| ALA-VAL-ALA-ASN-PRO-LEU-LYS-LYS-THR-TYR-TRP-GLU-ALA-MET-CYS-ASP-LEU-SER-ASN-ASP GLY- | | | | |
| F7 | 5 | 10 | 15 | 20 |
| CYS-ASP-LEU-SER-ASN-ASP-GLY-ASN-LEU-LEU-ALA-GLU-ARG-ALA-ALA-SER-ARG-LEU-LYS-ALA THR-THR-GLY-GLY-PRO-SER-ALA-LEU-ALA-ALA-ALA-THR-ALA-THR-PRO-SER-SER-ALA-ALA-ASN PRO-ALA-THR-THR-ALA-LEU-LYS-ASP-THR-LYS-THR-LEU-LEU-LYS-ALA-LEU-VAL-PHE-LEU-GLU ASP-ASP-ASN-PHE-LYS-LYS-ALA-ALA-ARG-ARG-TYR- | | | | |
| SER-ALA- | | | | |
| F5 | 5 | 10 | 15 | 20 |
| PRO-ILE-GLU-GLY-ILE-LEU-LYS-ASN-SER-PRO-ASN-LEU-LYS-LYS-LEU-GLY-ASP-VAL-THR-ASP LEU-GLN-ALA-ASN-LEU-ASN-PHE-TYR-THR-GLY-THR-GLY-THR-ALA-ARG-GLU-VAL-GLN-ALA-ALA ILE-ASN-GLN-LEU-LEU-GLU-LEU-TYR-PHE-TYR-TYR-SER-ASP-LEU-ASN-LYS-GLN-ARG-LEU-GLN ARG-ASP-GLY- | | | | |
| GLU-ALA-ALA-LYS-LYS-LEU-GLN-ASP-LEU-GLU-THR-LYS-ALA-GLY-THR-LYS-SER-ALA-ALA-ASP | 25 | 30 | 35 | 40 |
| F3 | 5 | 10 | 15 | 20 |
| LEU-GLN-ALA-ASN-LEU-ASN-PHE-TYR-THR-GLY-THR-GLY-THR-ALA-ARG-GLU-VAL-GLN-ALA-ALA THR-THR-GLY-GLY-PRO-SER-ALA-LEU-ALA-ALA-ALA-THR-ALA-THR-PRO-SER-SER-ALA-ALA-ASN ARG-ASP-GLY-GLY-ARG-LEU-GLN-GLY-ALA-LEU-ARG-GLU-PHE-LEU-ALA-THR-GLN-ALA-VAL-VAL ASP-ASP-ASN-PHE-LYS-LYS-ALA-ALA-ARG-ARG- | | | | |
| SER-ALA-SER-ASN-LYS-GLY-CYS-LEU-SER-ARG- | 25 | 30 | 35 | 40 |
| | 45 | 50 | | |

TABLEAU 11

N-acétylglucosamine.

- une densité en résidus de cystéine.

Parmi les fragments majeurs dérivés du clivage par le BrCN, seul celui de la fraction 5, fragment de taille moléculaire 25 000, rassemblait toutes ces caractéristiques et par conséquent nous avons en première hypothèse placé ce composant en région toute C-terminale. Etant donné que le fragment majeur de F7, également glycosylé, était localisé de façon définitive à la suite du 14ème amino acide, il ne restait plus dans ces conditions que deux possibilités d'organisation pour les fragments mineurs de ces deux fractions respectives : fragment 18 000, trouvé également dans la fraction F3 (F3b) et fragment 11 000 (Figures 18 et 19). Le seul moyen de pouvoir décider de l'une ou l'autre était d'isoler le fragment interne 29 000 de recouvrement des deux précédents et d'en déterminer le résidu en position N-terminale. A l'examen du Tableau 11, il pouvait s'agir soit d'une thréonine (comme pour le fragment mineur de F7) et par conséquent le 1er schéma serait retenu, soit d'une leucine (comme pour le fragment mineur de F5) et dans ce dernier cas la molécule répondrait au deuxième schéma. Nous avons isolé le fragment 29 000 (F3a) par électrophorèse préparative en gel de polyacrylamide, suivie d'une électroélution. Une dégradation manuelle de Edman a été ensuite appliquée pendant 3 cycles. Elle nous a permis d'identifier un résidu de leucine en position N-terminale et donc proposer définitivement le 2ème schéma (Figure 19).

B- Etude de la partie N-terminale de l'AVS BoTat-1 à partir du clivage par le bromure de cyanogène

1- Introduction

La dégradation de Edman effectuée sur la molécule native avait permis, rappelons-le, d'établir les 20 premiers acides aminés. Parmi ceux-ci (position 14) un résidu de méthionine avait pu être noté et l'application de la coupure par le bromure de cyanogène à ce niveau a fourni un fragment glycosylé de taille moléculaire 13 000 trouvé dans la fraction chromatographique F7. L'analyse de la fraction en séquence automatique a livré les résidus 15-42 (Tableau 11).

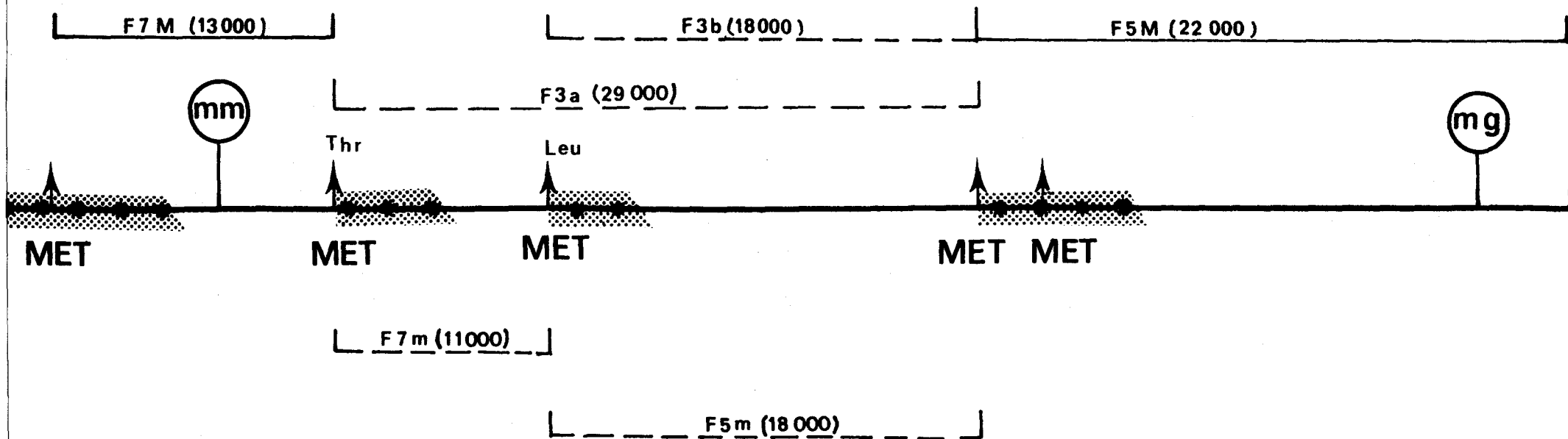


Schéma de l'AVS BoTaI-1

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



FIGURE 18

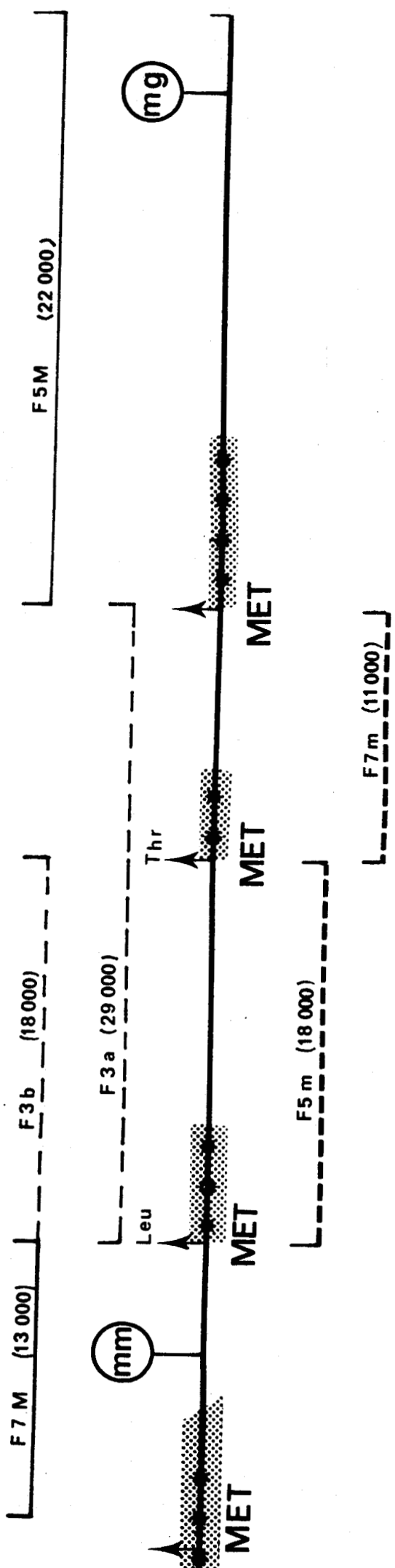


Schéma de l'AVS BoTat-1
 Localisation des fragments BrCN (tailles moléculaires apparentes déterminées par électrophorèse en gel de polyacrylamide)
 (a) F₃ fragment 29000 (b) F₃ fragment 18000
 (M) fragment majeur (m) fragment mineur
 [Stippled area] . Séquence amino-acide connue
 — . fragments interagissant avec la concanaviline A
 - - - . fragments n'interagissant pas avec la concanaviline A

905
LILLE

FIGURE 19

Nous avons poursuivi l'étude de la partie N-terminale de l'AVS par l'utilisation de deux découpes de la fraction F7 :

- une hydrolyse par l'endoprotéinase Arg-C a servi à l'identification des résidus 28-64

- une hydrolyse par la protéase de S. aureus a prolongé la connaissance jusqu'au 74ème amino acide et a permis de localiser le site de glycosylation.

Notre principal souci, au cours de cette étude, a été de miniaturiser les diverses techniques choisies. Dans l'intention de réduire encore les pertes de matériels en cours de manipulation, nous avons évité après toute nouvelle coupure, toute étape de purification. Dans cette optique, il fallait retenir la stratégie suivante :

. blocage irréversible de la fonction aminée N-terminale de la fraction F7, de telle sorte que la dégradation de Edman ne puisse s'exercer dans la zone déjà connue.

. application ensuite d'un clivage hautement spécifique affectant un petit nombre de sites pour éviter un mélange trop complexe alors ininterprétable en séquence amino acide.

Pour répondre à la première exigence, il nous a semblé que la technique de succinylation était une méthode satisfaisante pour 2 raisons :

. Elle assure un blocage des groupements NH_2 dont on a pu vérifier la stabilité après plusieurs cycles de dégradation de Edman.

. Elle transforme la lysine en succinyllysine dont le PTH-dérivé est facilement repéré et quantifié par HPLC.

Pour tester la qualité et le rendement des méthodes de clivage peptidique, nous avons utilisé l'électrophorèse en gel de polyacrylamide adaptée à la séparation et à la visualisation de petits fragments peptidiques ou/et glycopeptidiques.

2- Résultats

* L'hydrolyse par l'endoprotéinase Arg-C coupe spécifiquement les liaisons arginyl-X (sauf arginyl-Pro). Nous l'avons retenue en première

intention. L'enzyme n'entraîne qu'un nombre limité de coupures, et en outre, deux résidus d'arginine se trouvaient en position déjà connue, jugée favorable pour l'analyse séquentielle. Du point de vue expérimental, 10 mg de la fraction F7 ont été soumis à la succinylation puis à une hydrolyse par l'enzyme. Le mélange a été directement utilisé tel quel pour la dégradation automatique de Edman. Les résultats (Tableau 12) ont montré l'existence d'une seule séquence dégradable, commençant au delà du 27ème résidu de la molécule. La deuxième arginine (position 31) était inaccessible à l'action enzymatique vraisemblablement en raison de la présence voisine (position 33) d'une lysine succinylée. Cette analyse a permis non seulement de confirmer la séquence précédemment établie pour le peptide 28-56, mais aussi de prolonger l'identification de 8 résidus. La nature de ces derniers résidus a été elle-même confirmée par reconversion des PTH-dérivés en amino acides et examen des temps de rétention obtenus sur autoanalyseur.

* Le deuxième clivage vers lequel nous nous sommes tournés était l'hydrolyse par la protéase de *S. aureus* dans les conditions de coupure spécifique des liaisons glutamyl-X. L'examen des résultats précédents indiquaient l'absence de site potentiel de clivage avant le 54ème résidu amino acide. Le faible nombre de coupures apparemment produites nous a conduit rapidement à l'identification de zones inconnues.

Deux séquences étaient co-dégradées par la réaction récurrente de Edman sur séquenceur automatique (Tableau 12). Une chute brutale de rendement s'est manifestée à partir du 3ème cycle, témoignage vraisemblable du site de glycosylation dont F7 BrCN est pourvu. Ce branchement glycanique est d'autant crédible à ce stade qu'une très forte quantité de PTH-Asparagine avait pu être identifiée à cette étape (Tableau 12).

En vue de confirmer cette hypothèse de site de glycosylation, nous avons isolé le glycopeptide fourni par la protéase de *S. aureus* en utilisant l'électrophorèse d'affinité appliquée sur l'hydrolysat enzymatique. Cette technique a permis de repérer parmi les bandes séparées dans le gel de polyacrylamide celle qui correspondait au fragment glycosylé. Le glycopeptide a été récupéré par électroélution en boudin de dialyse calibré < 1000 (Spectrapor). L'éluat a été hydrolysé puis analysé en composition amino acide. Par comparaison des résultats obtenus avec la séquence déterminée après

SEQUENCES AMINO ACIDES N-TERMINALES OBTENUES PAR CLIVAGES ENZYMATIQUES DE LA FRACTION F7 BrCN

. Endoprotéinase ARG-C

| | |
|-------|---|
| 21-30 | 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 | VAL-PHE-LEU-GLU-SER-ALA-ASN-SER-THR-LEU |
| 61-70 | ARG-GLU-ALA-ALA- |

. Protéase de S. aureus

Cycles :

| | | | | | | | | | |
|----------|----------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|--------|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| SER(24) | ALA(238) | ASN(21) | LYS(37) | THR(36) | ALA(63) | ALA(65) | ASP(39) | TYR(29) | SER(9) |
| ALA(181) | | THR(35) | | | | | | | |
| 11 | 12 | | | | | | | | |
| ALA(36) | ARG(31) | | | | | | | | |

. Composition en acides aminés du glycopeptide isolé après hydrolyse par la protéase de S. aureus

GLU 1 ; ASX 1 ; THR 0,7 ; SER 1 ; ALA 1 ; LEU 0,6 ; ARG 0,4 ; GlcNH₂ 0,6.



TABLEAU 12

action de l'endoprotéinase Arg-C (Tableau 12), nous avons pu établir :

- d'une part que la position 57 était représentée par un résidu d'asparagine porteur d'un branchement glycanique.

- d'autre part que le glycopeptide issu de l'hydrolyse par la protéase de S. aureus était caractérisé par la séquence :

- Ser-Ala-Asn^{*}-Ser-Thr-Leu-Arg-Glu-

L'on pouvait en conséquence déduire les résultats de la séquence examinée en parallèle :

-Ala-Ala-Thr-Lys-Thr-Ala-Ala-Asp-Tyr-Ser-Ala-Arg-

3- Conclusion

L'analyse de la fraction F7 a permis l'identification définitive des résidus 15-74 (Tableau 13). Elle a également permis de localiser le premier site de glycosylation sur l'asparagine en position 57. L'oligosaccharide de par sa composition apparaît constitué de 9 résidus de mannose pour 2 résidus de N-acétylglucosamine et correspondre à une structure classique oligomannosidique.

Pour prolonger la connaissance structurale de la partie N-terminale de la molécule et déborder sur les fragments internes, il fallait à ce stade avoir recours à une autre stratégie de coupure générale de la glycoprotéine, capable de produire des peptides de recouvrement des fragments BrCN et en particulier du fragment majeur de F7 avec son suivant. A cet objectif, nous avons préféré poursuivre l'étude dans la partie C-terminale afin de situer et étudier le deuxième pôle glycosylé de la molécule.

C- Etude de la partie C-terminale de l'AVS Botat-1 à partir du clivage par le bromure du cyanogène

1- Introduction

Il ressortait de l'ensemble des données bibliographiques que la partie

SEQUENCE PARTIELLE DE L'AVS BoTat-1

SEQUENCE AMINO ACIDE N-TERMINALE

| | | | |
|---|----|----|----|
| 5 | 10 | 15 | 20 |
| ALA-VAL-ALA-ASN-PRO-LEU-LYS-LYS-THR-TYR-TRP-GLU-ALA-MET-CYS-ASP-LEU-SER-ASN-ASP | | | |
| 25 | 30 | 35 | 40 |
| GLY-ASN-LEU-LEU-ALA-GLN-ARG-ALA-ALA-SER-ARG-LEU-LYS-ALA-PRO-ALA-THR-THR-ALA-LEU | | | |
| 45 | 50 | 55 | 60 |
| LYS-ASP-THR-LYS-THR-LEU-LEU-LYS-ALA-LEU-VAL-PHE-LEU-GLU-SER-ALA-ASN-SER-THR-LEU | | | |
| 65 | 70 | | |
| ARG-GLU-ALA-ALA-THR-LYS-THR-ALA-ALA-ASP-TYR-SER-ALA-ARG- | | | |

PEPTIDE INTERNE

| | | | |
|---|----|----|----|
| 5 | 10 | 15 | 20 |
| LEU-GLN-ALA-ASN-LEU-ASN-PHE-TYR-THR-GLY-THR-GLY-THR-ALA-ARG-GLU-VAL-GLN-ALA-ALA | | | |
| 25 | 30 | 35 | 40 |
| ARG-ASP-GLY-GLY-ARG-LEU-GLN-GLY-ALA-LEU-ARG-GLU-PHE-LEU-ALA-THR-GLN-ALA-VAL-VAL | | | |
| 45 | 50 | | |
| SER-ALA-SER-ASN-LYS-GLY-CYS-LEU-SER-ARG- | | | |

PEPTIDE INTERNE

| | | | |
|---|----|----|----|
| 5 | 10 | 15 | 20 |
| THR-THR-GLY-GLY-PRO-SER-ALA-LEU-ALA-ALA-ALA-THR-ALA-THR-PRO-SER-SER-ALA-ALA-ASN | | | |
| 25 | 30 | | |
| ASP-ASP-ASN-PHE-LYS-LYS-ALA-ALA-ARG-ARG-TYR- | | | |

GLYCOPEPTIDE C-TERMINAL

| | | | |
|---|----|----|----|
| 5 | 10 | 15 | 20 |
| PRO-ILE-GLU-GLY-ILE-LEU-LYS-ASN-SER-PRO-ASN-LEU-LYS-LYS-LEU-GLY-ASP-VAL-THR-ASP | | | |
| 25 | 30 | 35 | 40 |
| ILE-ASN-GLN-LEU-LEU-GLU-LEU-TYR-PHE-TYR-TYR-SER-ASP-LEU-ASN-LYS-GLN-ARG-LEU-GLN | | | |
| 45 | 50 | 55 | 60 |
| GLU-ALA-ALA-LYS-LYS-LEU-GLN-ASP-LEU-GLU-THR-LYS-ALA-GLY-THR-LYS-SER-ALA-ALA-ASP | | | |

* 1er site de glycosylation



TABLEAU 13

C-terminale des antigènes variables s'inscrivait dans une structure plutôt hydrophile, riche en ponts disulfure intrachânes, et munie d'une composante glycanique. Dans ce cadre d'étude notre protocole de découpe moléculaire s'est traduit par l'obtention d'un fragment C-terminal de taille moléculaire 25 000, principalement recueilli dans la fraction chromatographique F5. Les résultats acquis par l'analyse directe de la fraction en séquence automatique ont livré des résidus 1-60 (Tableau 13).

En première intention, nous avons tenté d'analyser la fraction F5 suivant une stratégie analogue à celle développée pour F7. A ce titre, nous avons testé plusieurs hydrolyses chimiques et enzymatiques susceptibles de produire un nombre limité de coupures. Les méthodes qui ont pu être retenues étaient les digestions enzymatiques par la chymotrypsine et la protéase de S. aureus. L'analyse sur séquenceur automatique de l'hydrolysate chymotrypsique après succinylation a donné lieu dès le 3ème cycle à un problème physique de maintien de l'ensemble du matériel dans la coupelle. La couche "moléculaire" s'est transformée en un agglomérat incompatible avec la poursuite de la séquence. L'extrême richesse en lysine de cette partie peptidique pouvait être une explication éventuelle à ce phénomène. C'est la raison pour laquelle nous avons évité la technique de succinylation pour la poursuite du travail. L'utilisation d'hydrolyses enzymatiques spécifiques prolongées, suivie d'un fractionnement chromatographique résume le protocole adopté.

Trois enzymes ont été retenus :

- la protéase de S. aureus
- la chymotrypsine
- la trypsine après aminoéthylolation des résidus de cystéine.

Dans les trois protocoles, l'électrophorèse en gel de polyacrylamide donnait des résultats très satisfaisants sur la taille du ou des fragments obtenus. Nous verrons que les résultats sur séquenceur automatique ont été décevants. Ce sont toutefois ces "échecs" qui nous ont apporté beaucoup quant à la connaissance de l'extrémité C-terminale de l'AVS. Cela sera présenté en dernière partie de mémoire et fournira hypothèse pour expliquer nos problèmes de dégradation de Edman. Pour l'action des enzymes sur F5

BrCN, les résultats seront présentés dans l'ordre de leur réalisation expérimentale.

2- Hydrolyse par la protéase de S. aureus

La protéase de S. aureus produisait un profil de clivage en électrophorèse très satisfaisant (Figure 20A). Il en dérivait en effet un nombre limité de fragments dont la taille laissait espérer une bonne séparation en chromatographie de gel filtration.

10 mg de la fraction F5 ont été hydrolysés par l'enzyme (E/S = 1/50) pendant 4 heures à 25° C puis fractionnés par chromatographie de gel filtration sur Bio-gel P60 équilibré en acide acétique 0,01 M. Les premières fractions recueillies ont fait l'objet d'une étude électrophorétique (Figure 20B), et d'une analyse de leur contenu en osamine en vue de repérer le site de glycosylation (Tableau 14). Ainsi la fraction 2 s'est révélée la plus riche en osamine. Une étude par électrophorèse d'affinité avec la concanavoline A a par ailleurs démontré le caractère glycosylé du composant majeur (14 000) de cette même fraction 2. Cette préparation correspondant en grande partie à une zone inconnue de la molécule a donc été proposée pour étude de séquence amino acide. Dès le premier cycle, aucun PTH amino acide n'a pu être quantitativement identifié. L'hypothèse la plus probable pour rendre compte de ce résultat était que le résidu N-terminal du fragment aurait subi une cyclisation et était donc incapable de se coupler au phénylthioisocyanate. De telles anomalies peuvent parfois on le sait se produire avec la glutamine, et aussi étant donnée l'analogie structurale, avec la S-carboxyamidométhylcystéine. Dans cette hypothèse le clivage se serait donc produit soit au niveau d'une liaison Glu-Gln, soit au niveau d'une liaison Glu-SCMC.

Nous nous sommes par conséquent tournés vers l'analyse des autres fractions obtenues, fractions susceptibles de contenir un peptide intermédiaire. D'après les résultats de composition amino acide, la fraction 5 semblait correspondre à la partie N-terminale du fragment déjà identifiée, tandis que la fraction 4 était caractérisée par une composition totalement différente. Après une première identification du résidu N-terminal de la fraction 4 par dégradation manuelle de Edman, l'ensemble du matériel a été analysé en séquence automatique. Les résultats sont présentés dans le tableau

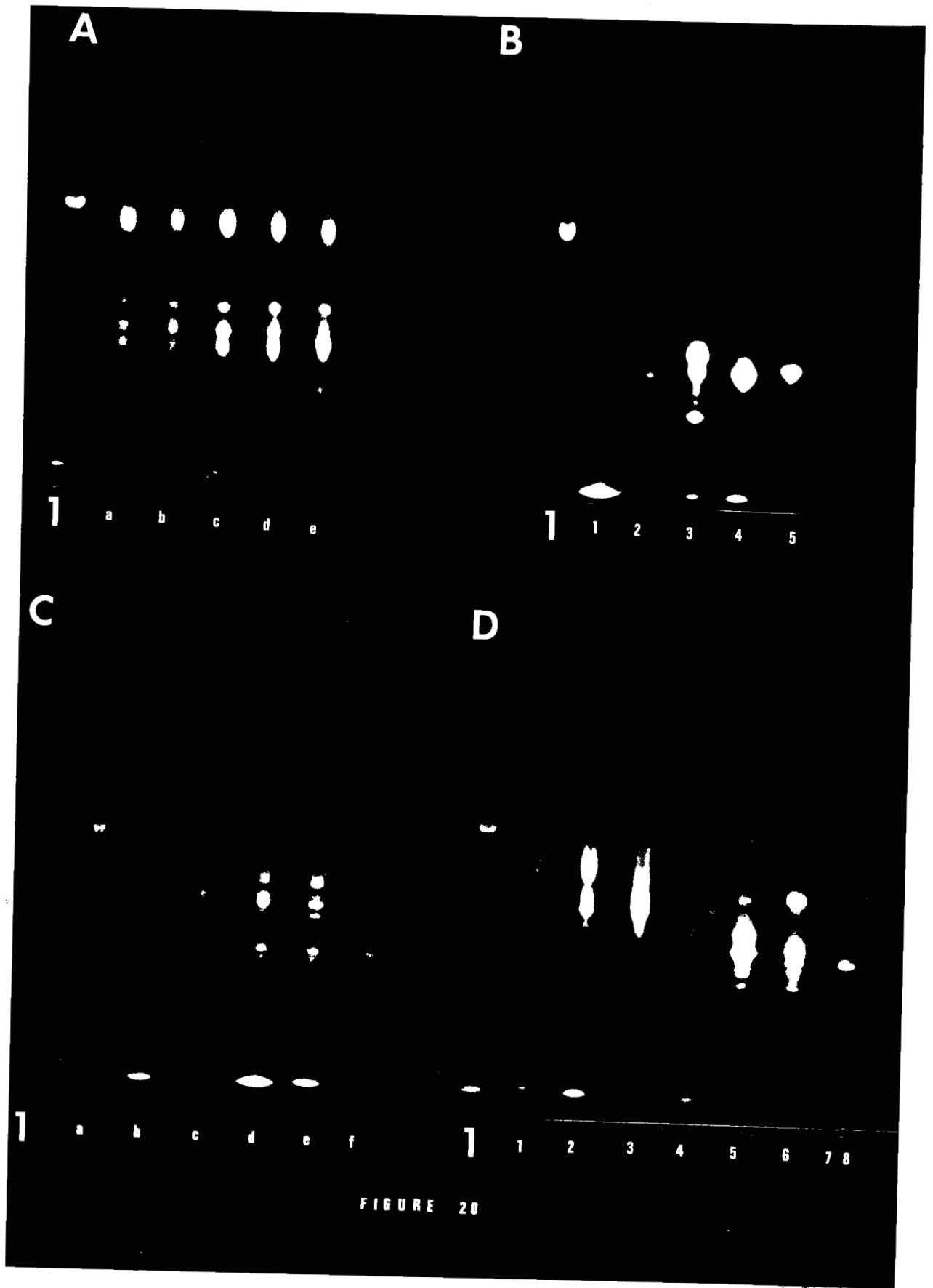


FIGURE 20

DU'S
LIFE

TENEURS RELATIVES EN OSAMINE DANS LES FRACTIONS OBTENUES APRES
CLIVAGE ENZYMATIQUE

| Fractions | Protéase <u>S. auréus</u> | Chymotrypsine | Trypsine |
|-----------|---------------------------|---------------|----------|
| 1 | 161 | 47 | 95 |
| 2 | 217 | 150 | 117 |
| 3 | 25 | 109 | 54 |
| 4 | 73 | 24 | 38 |
| 5 | 78 | 29 | - |
| 6 | 65 | 14 | - |
| 7 | 29 | 8 | - |
| 8 | 2 | - | - |
| 9 | 32 | - | - |
| 10 | - | - | - |

Résultats exprimés en $\mu\text{moles/g}$

1 → 10 : fractions obtenues après chromatographie de gel filtration de l'hydrolysate enzymatique.



TABLEAU 14

15. L'étude de ce peptide intermédiaire permettait finalement de prolonger l'identification de la séquence du fragment C-terminal étudié de la position 61 à la position 69 (Tableau 15). Le fragment glycosylé n'avait donné aucun résultat.

3- Hydrolyse par la chymotrypsine

Un traitement par la chymotrypsine, enzyme de spécificité totalement différente, a été alors envisagé. La cinétique d'hydrolyse à 25° C dans un rapport enzyme/substrat de 1/100 est illustrée (Figure 20C). Nous avons retenu comme condition optimale un temps d'hydrolyse de deux heures. Après purification chromatographique de l'hydrolysate chymotrypsique sur Bio-gel P60 nous avons séparé et recueilli 10 fractions dont certaines ont été soumises à une électrophorèse en gel de polyacrylamide (Figure 20D) et à une analyse de leur contenu en osamine (Tableau 14). Une teneur relativement élevée en osamine pouvait être remarquée dans les fractions 2 et 3. Des deux fractions dont le comportement en gel de polyacrylamide était similaire, nous avons retenu la plus homogène pour analyse par dégradation de Edman. Les résultats ont livré deux débuts de séquence, mais avec un très mauvais rendement (< 10 %). Pour l'un des peptides, l'interprétation a été possible pendant les 6 premiers cycles, et permettait de situer la séquence au delà du 30ème résidu de tyrosine du fragment C-terminal étudié (Tableau 13). Pour l'autre aucune identification définitive ne pouvait être retenue. L'on pouvait dès lors supposer que le site de coupure enzymatique dominant soit proche d'un site de branchement glycanique.

Ici encore le matériel glycopeptidique ne pouvait être séquencé.

En conclusion, les deux approches par coupure enzymatique seconde sur F5 BrCN n'avaient pas permis d'accéder à la partie C-terminale de l'AVS. La poursuite de l'étude pouvait s'envisager par hydrolyse en multiples petits peptides par utilisation de la trypsine ou de la thermolysine. Avant d'avoir recours à cette possibilité, nous avons tenté un protocole de clivage au niveau des résidus de cystéine par la trypsine.

4- Clivage au niveau des résidus de cystéine

a- protocole

L'aminoéthylation des résidus de cystéine apporte un site de clivage par

SEQUENCE AMINO ACIDE DE LA FRACTION 4 OBTENUE APRES CLIVAGE DE
LA PROTEASE DE S. AUREUS

51-60 THR-LYS-ALA-GLY-THR-LYS-SER-ALA-ALA-ASP-
61-70 LYS-GLU-LYS-GLU-CYS-ASN-THR-LYS-GLY-

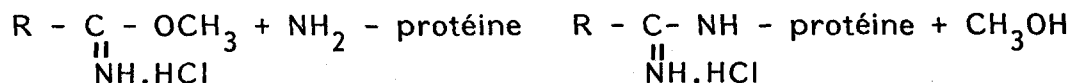
la trypsine au niveau des résidus d'aminoéthylcystéine en raison de leur analogie structurale avec les résidus de lysine (LINDLEY) (1956) (85).

L'application de cette coupure nécessitait la mise au point d'un nouveau protocole de traitement sur glycoprotéine native. Dans l'optique de cliver sélectivement les liaisons cystéinyl au niveau du fragment C-terminal issu d'une étape BrCN, il fallait envisager une méthode de blocage des autres sites d'attaque par la protéase, soit dans notre cas les résidus de lysine car la partie C-terminale contient très peu d'arginine. Le protocole de blocage des résidus de lysine devait répondre à plusieurs impératifs :

- . être réversible dans la mesure où la poursuite du travail pouvait nécessiter la coupure des liaisons lysyl-X.
- . être exempt de réactions secondaires au niveau des fonctions sulfhydryl qui devaient être ensuite aminoéthylées.
- . être stable dans les conditions ultérieures de traitement qui comprenaient notamment le traitement par le bromure de cyanogène.
- . donner lieu à des produits solubles en phase aqueuse.

La technique d'amidation des groupements ϵNH_2 des résidus lysine (LUDWIG et HUNTER) (1967) (87) semblait répondre à ces exigences. Afin de nous en assurer, nous avons procédé à plusieurs tests préliminaires sur une faible quantité de matériel.

Le principe de la réaction d'amidation est le suivant :



Le protocole consiste à traiter la molécule par le méthylacétimidate, en milieu réducteur pour bien démasquer les groupements ϵNH_2 . Après dialyse et lyophilisation, le produit est réduit puis aminoéthylé par l'éthylène-imine (RAFTERY et COLE) (1963) (108). La réaction est stoppée puis l'ensemble est dialysé et lyophilisé. Le traitement par le bromure de cyanogène a été appliqué sur ce matériel et le profil obtenu en gel de polyacrylamide était comparable à celui précédemment obtenu sur AVS S-carboxyamidométhylé.

La coupure tryptique a été testée sur cet hydrolysate BrCN amidiné (Figure 21A). Les résultats ont clairement démontré que le blocage des résidus de lysine laissait efficace l'approche de la molécule par l'enzyme. Le

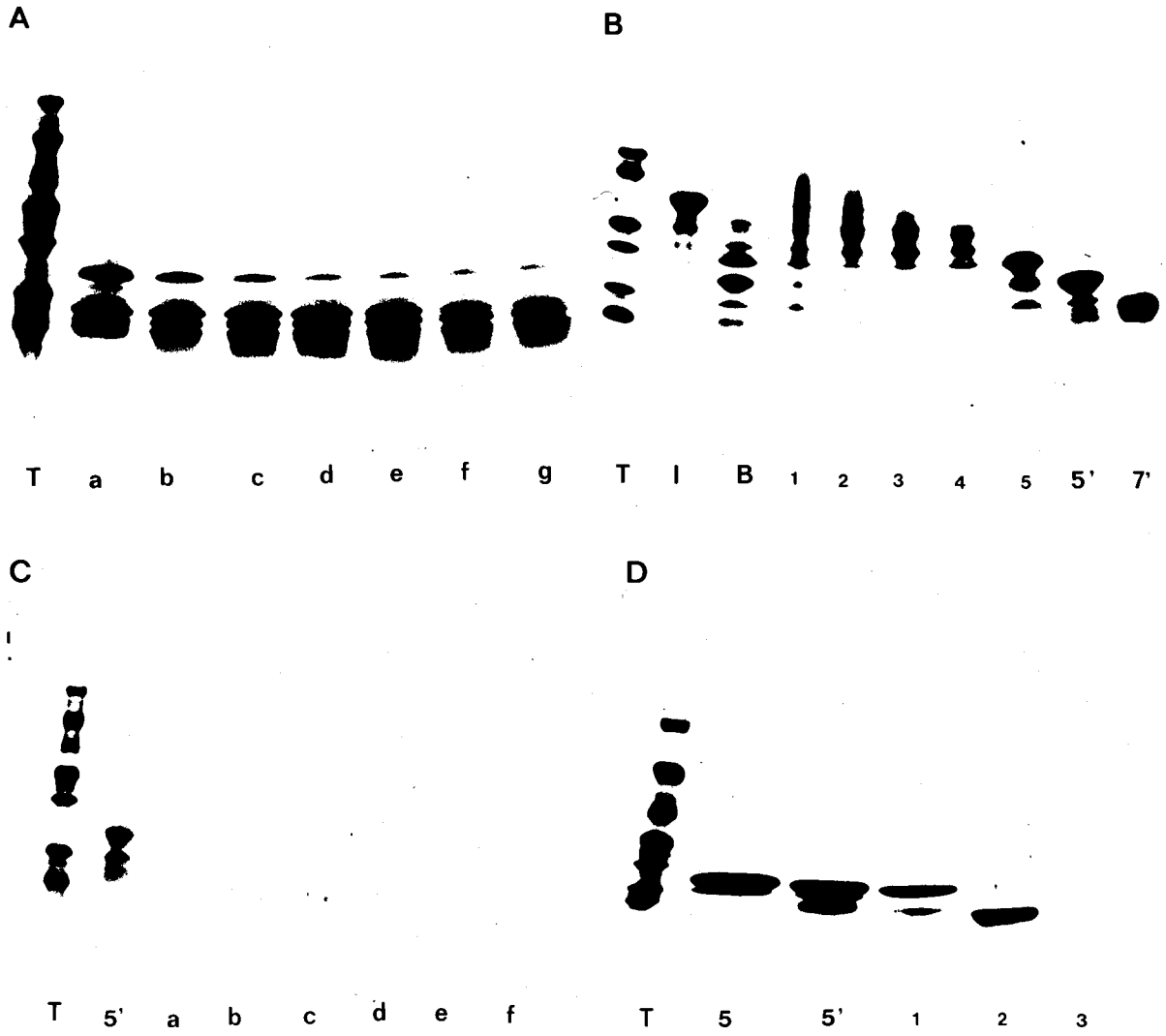


FIGURE 21



traitement enzymatique sur cette même préparation mais après déblocage des résidus de lysine en tampon acétate d'ammonium de pH 11,3 a permis de vérifier la réversibilité d'un blocage par obtention immédiate d'une grande quantité de fragments de très faible taille moléculaire.

Enfin, avant de retenir définitivement ce protocole, nous avons testé les conséquences des traitements chimiques sur les rendements de la dégradation de Edman. A ce titre nous avons soumis un peptide connu amidiné à une étude sur séquenceur automatique. Il est apparu que la dégradation se poursuivait tout à fait normalement avec un rendement très satisfaisant. De plus, le PTH-dérivé correspondant à la lysine amidinée possède, nous l'avons aussi vérifié, un temps de rétention n'interférant aucunement sur les autres pics HPLC des PTH-amino acides.

b) Modification chimique de la glycoprotéine - aminoéthylation des résidus de cystéine

Le protocole a été appliqué sur 400 mg d'AVS Botat-1. Les conditions opératoires précises sont détaillées dans l'appendice technique. L'hydrolysate a été fractionné sur une colonne de Bio-gel P100 équilibrée en acide acétique 0,1 M. Le profil chromatographique est illustré dans la Figure 22. La réaction à l'orcinol sulfurique appliquée sur chaque tube a montré que les fractions F5' et F7' étaient glycosylées. Ces fractions contenaient donc respectivement les fragments C et N-terminaux glycosylés attendus, de taille moléculaire respective 25000 et 13000. L'analyse des fractions chromatographiques en gel de polyacrylamide (Figure 21B) en a amené confirmation. L'identification définitive s'il était nécessaire des deux fractions a pu être établie après composition amino acide et glucidique.

c) hydrolyse par la trypsine

Nous nous sommes intéressés à la fraction représentative du fragment C-terminal, fraction appelée cette fois par commodité F5'. Une hydrolyse enzymatique avec la trypsine a été testée. La cinétique (Figure 21C) montrait la libération rapide d'un fragment de taille approximative 14 000 comme nous l'avons observé déjà après action de la chymotrypsine et de la protéase de S. aureus sur F5 BrCN. 10 mg de la fraction F5' ont été traités et après

CHROMATOGRAPHIE DE GEL FILTRATION SUR BIOGEL P100 DES PRODUITS DE CLIVAGE PAR LE BrCN DE L'AVS BoTat-1 AMIDINE, AMINOETHYLE
(100-200 mesh ; colonne 150 x 1,8 cm ; acide acétique 0,1 M)

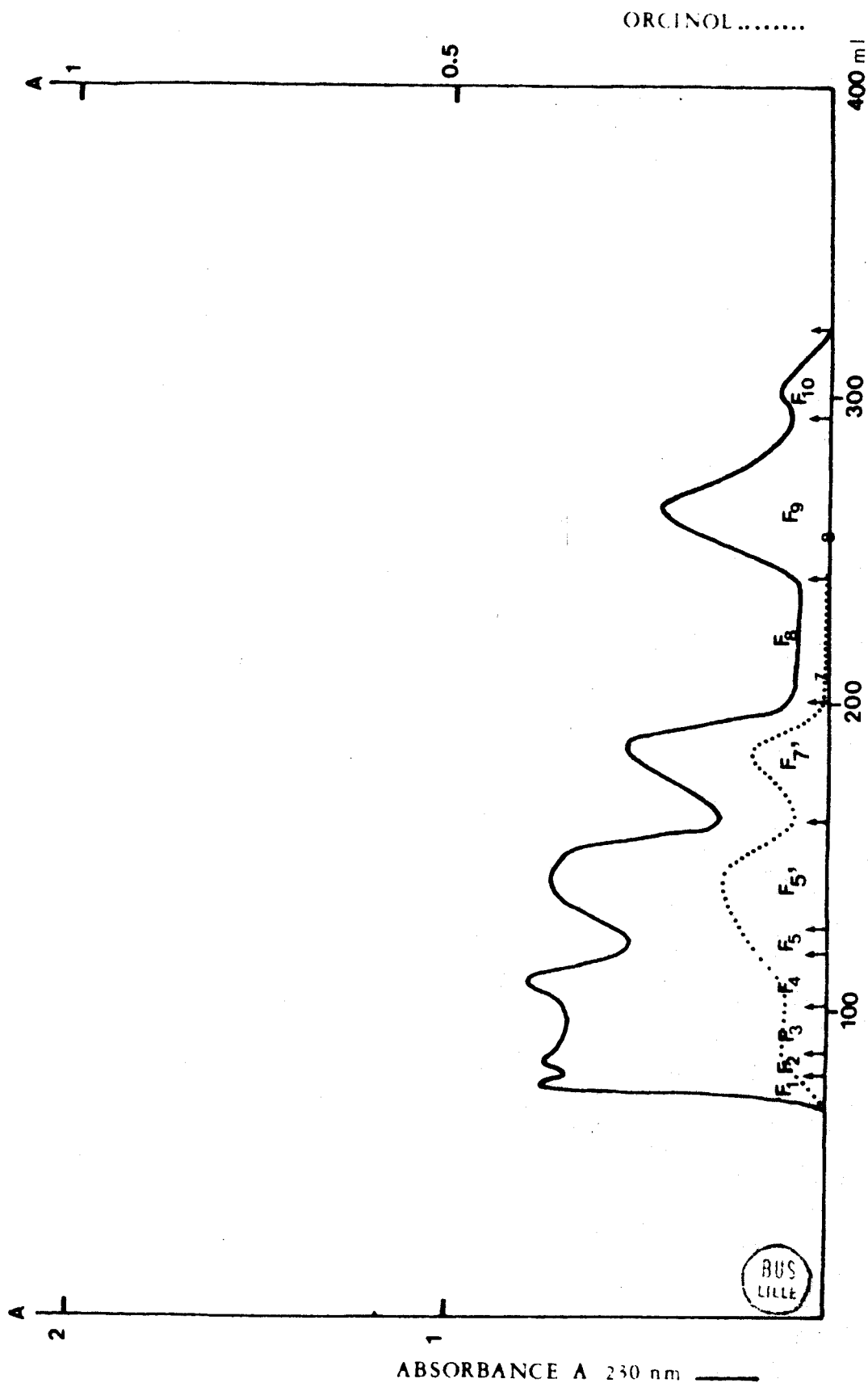


figure 22

purification chromatographique chaque fraction obtenue a été analysée en gel de polyacrylamide selon deux méthodologies :

- électrophorèse en présence de SDS et avec coloration par le bleu Coomassie (Figure 21D)

- électrophorèse après déblocage des résidus de lysine et marquage par fluorescence (Figure 23).

L'examen des teneurs relatives en osamine des fractions (Tableau 14) signalait encore la richesse particulière de la fraction 2 en sucre et la désignait comme étant la partie glycosylée de F5'. Nous l'avons alors soumise à une dégradation de Edman. Cette fois encore l'échec était total dès le premier cycle.

5- Conclusion

De ces trois protocoles expérimentaux successivement appliqués, l'on pouvait retenir les points suivants :

- . malgré une spécificité très différente, les traitements enzymatiques ont livré chaque fois un fragment glycosylé de taille moléculaire apparente avoisinant 14 000.

- . dans tous les cas, il a été impossible d'étudier les glycopeptides par dégradation de Edman.

- . les clivages ont parfois conduit à des peptides intermédiaires analysables dans de très bonnes conditions en séquence amino acide et ceci avec d'excellents rendements réactionnels.

Cet échec répété avec les glycopeptides C-terminaux laissait envisager la possibilité d'une élimination rapide de coupelle du matériel dès les premiers cycles de dégradation automatique. En effet, quelque soit le protocole suivi pour sa préparation, le glycopeptide était "muet". Les faibles quantités de PTH-amino acides obtenues en HPLC n'avaient que peu de signification, et rendait compte de fragments mineurs contaminants.

Pour vérifier cette hypothèse "d'élimination du matériel" une préparation de glycopeptide C-terminal tryptique était étudiée sur séquenceur en prenant soin de récupérer à chaque cycle les phases organiques de "lavage". Celles-ci après évaporation furent hydrolysées par l'HCl 5,6 N et déposées sur

ETUDE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE DES FRACTIONS TRYPSIQUES OBTENUES
A PARTIR DE F5' BrCN

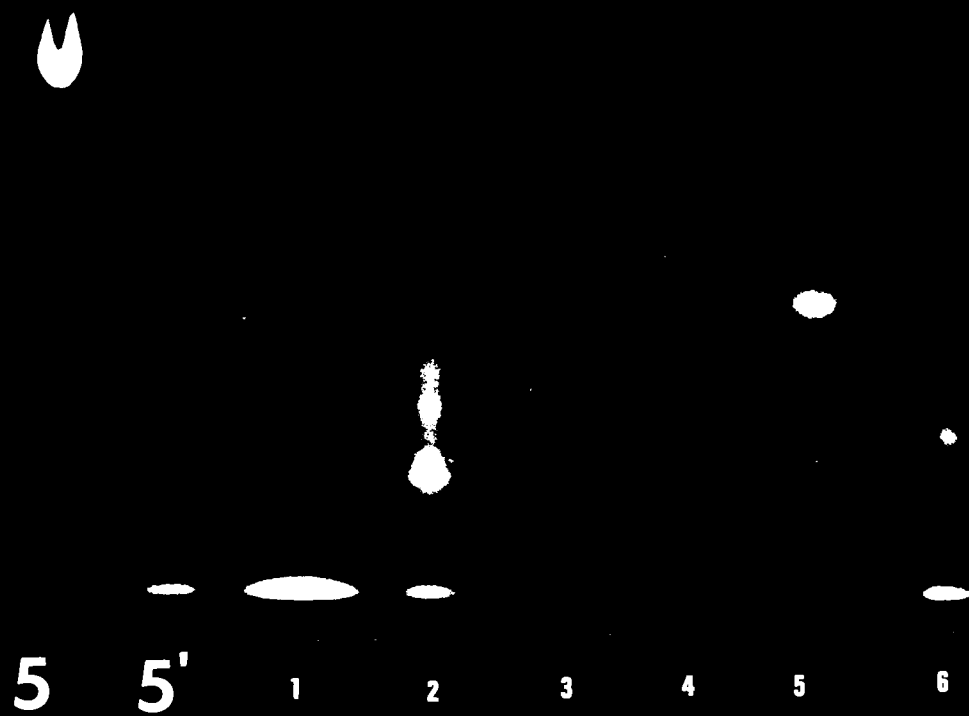


FIGURE 23

UNIVERSITY OF LILLE

analyseur d'acides aminés. Les résultats furent surprenants : absence de matériel peptidique ou glycopeptidique. Le produit de lavage de la coupelle après quelques cycles fut à son tour analysé. Il correspondait au glycopeptide déposé. Le rendement étant satisfaisant, force nous était donc d'admettre l'inefficacité de la dégradation de Edman.

Plusieurs hypothèses étaient alors avancées ; la plus intéressante émanait de la compilation de plusieurs résultats très récemment publiés :

- ceux de HOLDER (1983) (63) démontrant la substitution du carboxyl C-terminal de la glycoprotéine par de l'éthanolamine.

- ceux de notre groupe mettant en évidence :

* la présence de phosphore organique à l'extrémité C-terminale de la glycoprotéine,

* la présence à ce niveau d'un site de glycosylation.

Il était alors possible d'évoquer l'existence de lipides à travers un intermédiaire phosphatidyléthanolamine.

Cette notion nouvelle pouvait en effet largement expliquer nos problèmes de séquences dont le programme de chimie est essentiellement adapté au traitement de peptides ou de protéines.

D- Caractéristiques de l'extrémité C-terminale de l'AVS BoTat-1

1- Suspicion de l'existence de lipides dans l'AVS BoTat-1 par coloration avec le noir Soudan.

L'affinité de l'AVS BoTat-1 pour le noir Soudan a été démontrée selon deux techniques :

a) précoloration de l'AVS avec le noir Soudan et migration du complexe en électrophorèse d'agarose à 1 %.

L'AVS est en premier lieu couplé avec de la fluorescamine en vue d'accélérer sa migration anodique dans le milieu utilisé. Il est ensuite mis en

contact avec une solution de noir Soudan dans l'éthylène glycol pendant 30 minutes à l'abri de la lumière (LENARD et SINGER (1966) (80)). L'ensemble est alors déposé sur un gel d'agarose à 1 % en tampon tris-glycocolle de pH 9,4.

La complexation de l'AVS BoTat-1 avec le noir Soudan a été démontrée dans cette première méthode. Toutefois, étant donnée le faible pouvoir et même l'absence de pouvoir résolutif du gel d'agarose, l'on ne pouvait exclure que la coloration puisse provenir d'un contaminant. C'est pourquoi nous avons voulu vérifier par une coloration cette fois réalisée après migration électrophorétique en gradient de gel de polyacrylamide.

b) Coloration après migration électrophorétique

Cette coloration après migration est difficilement obtenue sur un gel de polyacrylamide réticulé et peut fausser les résultats en raison de la petite taille des pores qui gêne la pénétration du colorant. Nous avons tourné cette difficulté en sélectionnant la bande de migration correspondant à l'AVS pour la transférer dans un gel d'agarose. Il devenait dès lors possible de colorer la molécule d'antigène "après migration".

Conclusion

Les deux méthodes ont permis sans ambiguïté de mettre en évidence l'affinité de l'antigène pour le noir Soudan. Ces premiers résultats laissent donc préjuger de la nature lipoprotéique de l'antigène variable.

2) Détermination de la structure C-terminale de l'AVS BoTat-1

Pour l'étude de cette région, nous avons retenu la préparation directe du glycopeptide tryptique C-terminal à partir de la glycoprotéine non modifiée.

a) hydrolyse tryptique

La molécule native a été soumise à une hydrolyse de 24 heures par la trypsine. L'ensemble a fait l'objet d'un premier fractionnement sur Bio-gel P60 et les fractions glycosylées ont ensuite été purifiées sur Bio-gel P10 comme

l'indique la figure 24.

La recherche d'éthanolamine connue pour substituer le carboxyl C-terminal de l'AVS a été réalisée sur autoanalyseur d'acides aminés selon les conditions décrites dans l'appendice technique. Les résultats ainsi que le contenu en acide aminé des fractions sont présentés dans le tableau 16. A la lecture du tableau, il apparaît que la fraction b1 contient de l'éthanolamine en proportion équimoléculaire avec le glycolle. Ce résultat nous permettait donc, par rapprochement avec les résultats de HOLDER (1983) (63), de préjuger que la fraction b1 est uniquement représentative du glycopeptide C-terminal. Nous avons par conséquent sélectionné cette fraction pour l'étude structurale de la partie toute C-terminale de l'AVS.

b) Analyse du glycopeptide C-terminal

* Composition acide aminée

La composition en acides aminés du glycopeptide est présentée dans le tableau 17. Les résidus sont exprimés en rapport molaire par rapport au glycolle pris comme base de calcul. On peut remarquer la présence de glucosamine dans le rapport 2 : 1.

* Composition glucidique

Les monosaccharides dosés par chromatographie en phase gazeuse ont également été quantifiés : mannose et galactose ont été trouvés respectivement au nombre de 6 pour un résidu de glycolle.

* Teneur en phosphore

Après minéralisation et dosage de phosphate selon la technique au vert Malachite de ITAYA et MICHIO (1966) (69), la teneur en phosphore a été établie et calculée par rapport au glycolle : la valeur de 0,9 indique un rapport équimolaire (Tableau 17).

La présence à la fois d'une mole de phosphore et d'une mole d'éthanolamine par mole de glycopeptide venait renforcer notre hypothèse d'une structure de type phosphatidyléthanolamine. Nous nous sommes alors orientés vers la recherche d'une technique de caractérisation du glycérol.

CHROMATOGRAPHIES DE GEL FILTRATION DE L'HYDROLYSAT
TRYPSIQUE DE L'AVS BoTat 1

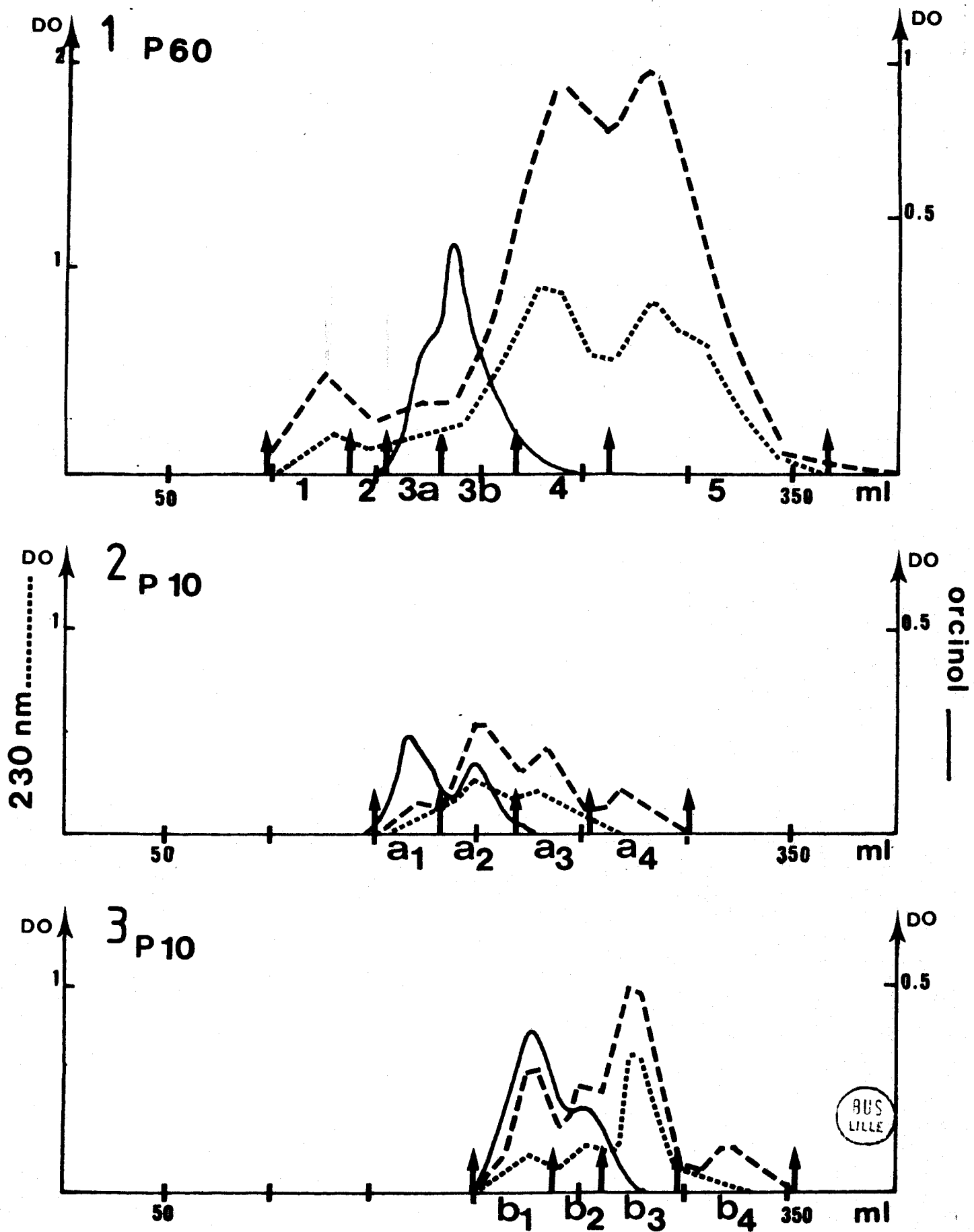


FIGURE 24

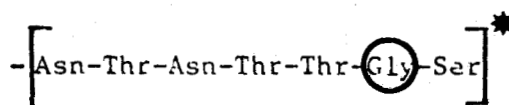
COMPOSITION EN ACIDES AMINES DES FRACTIONS TRYPSIQUES GLYCOSYLEES

| | a ₁ | a ₂ | b ₁ | b ₂ |
|--------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Asx | 300 | 769 | 399 | 424 |
| Thr | 447 | 722 | 741 | 441 |
| Ser | 200 | 563 | 203 | 414 |
| Glu | 27 | 161 | 42 | 226 |
| Pro | - | 308 | 36 | 100 |
| Gly | 214 | 400 | 247 | 172 |
| Ala | 47 | 1544 | 99 | 730 |
| Cys | - | - | - | - |
| Val | 18 | 95 | 19 | 130 |
| Met | - | 30 | - | - |
| Ile | 8 | 48 | 13 | 32 |
| Leu | 17 | 467 | 37 | 615 |
| Tyr | 6 | 12 | 10 | - |
| Phe | 10 | 202 | 24 | 176 |
| His | 9 | 82 | 9 | 11 |
| Lys | 21 | 174 | 20 | 53 |
| Arg | - | 101 | 17 | 208 |
| GlcN | 392 | 247 | 473 | 430 |
| ethanolamine | 140 | - | 203 | 22 |

Resultats exprimés en $\mu\text{mol/g}$ 

COMPOSITION CHIMIQUE DU GLYCOPEPTIDE TRYPSIQUE C-TERMINAL

| | |
|--------------|-----|
| Asx | 1.6 |
| Thr | 3.0 |
| Ser | 0.8 |
| Gly | 1 |
| GlcN | 1.9 |
| ethanolamine | 0.8 |
| Galactose | 6.0 |
| Mannose | 6.1 |
| Phosphate | 0.9 |



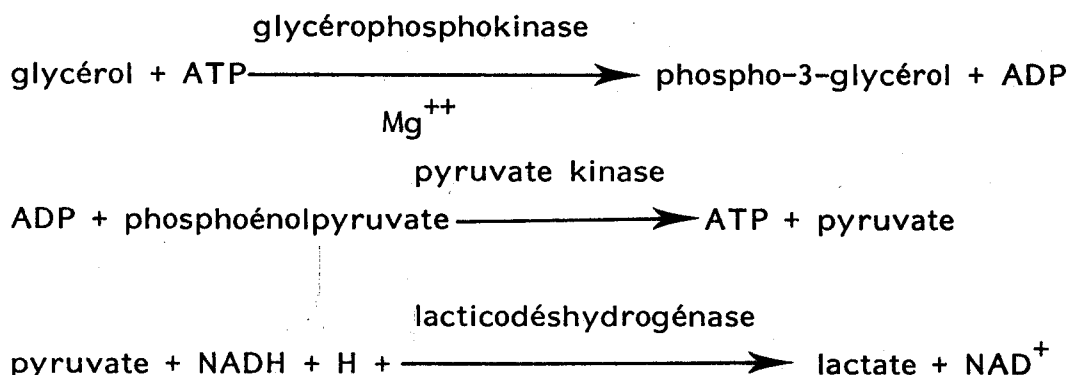
Les résultats sont exprimés en rapport molaire par rapport au glycolle.

* Séquence amino-acide de l'extrémité C-terminale de l'AVS 221 (BOOTHROYD et coll (1981))



* Caractérisation du glycérol

La caractérisation et le dosage du glycérol ont été obtenus au moyen de la réaction spécifique de phosphorylation du glycérol par la glycérophosphokinase et l'ATP, combinée avec l'évaluation de la quantité d'ADP formée en utilisant le système lactate-pyruvate :



Pour la libération du glycérol à partir de la fraction b1, nous avons fait appel à une technique décrite, permettant de restituer le glycérol à partir de glycérophospholipides (RENKONEN (1966) (110)). La méthodologie utilise une hydrolyse dans de l'HCl 2N pendant 48 heures à 125° C en tube scellé sous vide. Nous avons appliqué le protocole d'une part sur la fraction b1 et d'autre part sur du glycérol standard et sur une phosphatidyl-éthanolamine témoin (Koch-Light Laboratories). Les résultats présentés dans le tableau 18 montrent que la fraction b1 contient près de une mole de glycérol par mole de glycolle.

Néanmoins afin de s'assurer que le glycérol ne provienne pas d'un contaminant de nature glycérolipidique adsorbé sur la molécule, nous avons procédé à la même analyse sur plusieurs lots d'AVS BoTat-1 après avoir soumis la molécule à une agitation prolongée dans un mélange chloroforme/méthanol/eau selon les conditions de FOLCH et coll (1956) (38). Après séparation des 2 phases par centrifugation, chacune d'entre elle a fait l'objet d'une caractérisation du glycérol selon le protocole précédemment évoqué.

Les résultats obtenus figurent dans le Tableau 18. Ils montrent dans chaque cas une teneur constante en glycérol dans la phase aqueuse : environ 5,5 nmoles, ceci pour une prise d'essai avoisinant 20 nmoles. Par conséquent, la technique de dosage utilisée perdait de son efficacité lorsqu'elle était appliquée à l'ensemble de la glycoprotéine, le rendement n'étant que de 25 % à

DOSAGE DU GLYCEROL DANS LA FRACTION b_1

| | Quantité théorique en nanomoles | Quantité dosée en nanomoles | Recou- vrement en % |
|---------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|---------------------------|
| Témoin glycérol | 500 | 357 | 71 |
| Témoin phosphatidylethanolamine | 500 | 233 | 47 |
| b_1 | 25 | 10 | 40 |

DOSAGE DU GLYCEROL DANS LES PHASES ORGANIQUE ET AQUEUSE APRES PARTAGE DE FOLCH
ET COLL. APPLIQUE SUR DIFFERENTS LOTS D'AVS BoTat -1

| Lot | Phase organique | Phase aqueuse |
|-----|-----------------|---------------|
| 1 | 1,0 | 5,6 |
| 2 | 1,3 | 5,6 |
| 3 | 2,6 | 5,7 |

Valeurs exprimées en nanomoles de glycérol dosé par mg d'AVS.



30 %. Néanmoins, elle restait toujours fiable dans la mesure où des valeurs identiques avaient été obtenues pour différents lots. Au niveau des phases organiques, des traces de glycérol ont pu être aussi détectées. Cette observation pouvait attester d'une légère contamination de l'antigène, mais aussi, hypothèse déjà suggérée en fonction du comportement de la molécule lors du traitement par le BNPS-skatole, une fraction de l'échantillon pouvait s'être "solubilisée" dans la phase organique. C'est pourquoi nous avons analysé, pour le lot 1, la phase organique du point de vue de sa composition amino acide. Les résultats ont confirmé qu'approximativement 10 % de l'échantillon s'était réparti dans la phase organique, valeur tout à fait corrélée avec la quantité de glycérol dosée dans cette phase.

En fonction des résultats obtenus avec la fraction b1, on peut affirmer que l'AVS BoTat-1 contient, au niveau de son extrémité C-terminale, un glycérol lié par liaison covalente.

* analyse qualitative des acides gras

Tous les résultats enregistrés précédemment étaient en faveur de la présence d'un noyau de phosphatidyléthanolamine au niveau de la partie C-terminale de l'AVS BoTat-1. Dans cette hypothèse, il devenait fort probable que les lipides de la molécule soient fixés, comme il est classique, au niveau d'une fonction alcoolique du glycérol par une liaison ester. A ce titre, nous avons fait appel pour les libérer à la technique de saponification par de la potasse méthanolique 0,1 M pendant 2 heures à 80° C. Après cette phase de libération des acides gras, le partage de FOLCH et coll (1957) (38) a été appliqué. La phase organique récupérée et évaporée a été soumise à une réaction de transestérification puis à une chromatographie sur couche mince. Les acides gras éventuels pouvaient alors être analysés sous forme d'esters méthyliques par chromatographie en phase gazeuse.

Selon ce protocole, aucun acide gras n'a pu être détecté dans l'AVS BoTat-1.

D'autres conditions de libération des acides gras ont alors été envisagées et en particulier nous avons employé une hydrolyse classique dans de l'HCl 5,6 N pendant 24 heures à 105° C en tube scellé sous vide. Dans ces conditions, plusieurs acides gras ont pu être identifiés à la fois dans la molécule native et dans la fraction glycopeptidique b1. Les répartitions relatives des acides gras de chaque analyse figurent dans de tableau 19.

REPARTITION RELATIVE DES ACIDES GRAS (MOLES %) DANS L'AVS BoTat-1 NATIF
ET DANS SON GLYCOPEPTIDE TRYPSIQUE C-TERMINAL

| Acides gras | AVS BoTat-1 | Glycopeptide C-terminal |
|-------------|-------------|-------------------------|
| C 16 : 0 | 38.4 | 42.4 |
| C 18 : 0 | 37.5 | 34.2 |
| C 18 : 1 | 24.1 | 23.4 |



TABLEAU 19

Seuls trois types d'acide gras ont été détectés : l'acide palmitique (C16 : 0), l'acide stéarique (C18 : 0) et l'acide oléique (C18 : 1). Les pourcentages obtenus dans ces préparations sont très proches, ce qui pourrait indiquer que tous les lipides de la molécule soient inclus dans la seule partie C-terminale*.

c) Conclusion

En conclusion de cette étude il était démontré que le glycopeptide tryptique C-terminal s'inscrivait dans une structure englobant en dehors des acides aminés et des sucres les éléments suivants :

- phosphore organique
- éthanolamine
- glycérol
- acides gras

L'ensemble des constituants rappelait une structure de type glycérophospholipidique classique dans laquelle les acides gras sont liés au niveau des fonctions alcooliques du glycérol. Dans cette éventualité se pose alors la question du mode d'attachement des sucres ?

3- Obtention et étude des glycopeptides C-terminaux

Cette partie du travail a été réalisée en étroite collaboration avec le laboratoire d'Immunologie et de Biologie parasitaire de Bordeaux. Il avait pour objectifs de pouvoir définir la composition chimique de la copule glycanique C-terminale, d'examiner le ou les modes d'attache, enfin d'étudier sa participation éventuelle dans la réactivité immunologique croisée entre antigènes purifiés.

* Etude biochimique

En fonction des résultats déjà évoqués concernant la localisation C-terminale d'une atome de phosphore, le protocole préparatif a été entrepris

* Nous remercions Monsieur A. Nouvelot, Maître-assistant à l'Université de Lille I d'avoir réalisé les analyses d'acides gras.

sur un fragment C-terminal issu d'une hydrolyse trypsique réalisée sur de l'AVS BoTat-1 marqué au ^{32}P . Le fragment a été soumis en second temps à une digestion prolongée avec une préparation de protéinase K. L'hydrolysat a été purifié par chromatographie de gel filtration sur Bio-gel P4 équilibré en eau désionisée.

Deux fractions glycosylées ont alors été obtenues, et parmi celles-ci une seulement était radioactive. L'analyse chimique de chaque fraction (Tableau 20) a permis de distinguer deux individualités glycaniques :

- le glycopeptide 1 contient 5 résidus de mannose pour 2 résidus de N-acétyl glucosamine.

- Le glycopeptide 2 est composé de galactose et de mannose selon un rapport molaire 5 : 1. Le glycopeptide est radioactif et contient aussi l'éthanolamine.

L'extrémité C-terminale de l'AVS BoTat-1 est donc caractérisée par l'existence de deux copules glycaniques :

- l'une est constituée de mannose et de N-acétylglucosamine selon un rapport 5:2, rapport correspondant à la limite inférieure d'une structure oligomannosidique réduite par action de mannosidase (étape intermédiaire métabolique au cours de la biosynthèse de glycoprotéines).

- l'autre présente une composition plus originale, en relation vraisemblablement avec les lipides.

Si l'on rapproche nos résultats de composition amino acide (Tableau 20) des données structurales établies à partir de séquence DNA pour plusieurs AVS de T. b. brucei, il est possible d'avancer par comparaison et extrapolation une séquence de l'extrémité C-terminale de l'AVS BoTat-1 :

- Asn* -Thr-Thr-Gly-Ser*

Le résidu d'asparagine est alors porteur d'un glycanne oligomannosidique (mannose 5, N-acétylglucosamine 2).

COMPOSITION CHIMIQUE DES GLYCOPEPTIDES OBTENUS
APRES ACTION DE LA PROTEINASE K

| | Gp1 | Gp2 |
|-----------------|-----|-----|
| Asx | 1 | - |
| Thr | 1,5 | - |
| Ser | - | 0,8 |
| Gly | - | - |
| Etn | - | 1 |
| ³² P | - | + |
| Man | 5 | 1 |
| Gal | - | 5 |
| Glc Nac | 2* | - |

* Valeur corrigée en tenant compte du coefficient de libération dans les conditions utilisées.

Les résultats sont exprimés en rapport molaire relativement à Asx et Glc Nac pour Gp1 et à Gly et Man pour Gp2.

Le résidu de sérine est substitué par l'éthanolamine, le phosphore, les acides gras, enfin des sucres : galactose essentiellement (galactose 5, mannose 1).

* Etude immunologique

L'intérêt d'une meilleure connaissance structurale de l'AVS devrait nous permettre de répondre à certaines interrogations immunologiques.

Des résultats antérieurs de radioimmuno-essai (LABASTIE et coll) (1981) (76) avaient signalé l'existence d'une réaction immunologique croisée entre les AVS BoTat-1 et BoTat-28. L'utilisation alors d'une hydrolyse trypsique avait également permis de localiser en toute hypothèse le site antigénique commun dans la partie C-terminale de la molécule. C'est dans le but de mieux le préciser que nous avons analysé la capacité des glycopeptides 1 et 2 à inhiber la réaction hétérologue de l'AVS BoTat-1 avec des anticorps dirigés contre l'AVS BoTat-28 : Aucune inhibition n'a été décelée avec le glycopeptide 1. En revanche, le glycopeptide 2 s'est montré capable d'inhiber à 100 % la réaction hétérologue étudiée. Il devenait possible d'identifier la réaction immunologique croisée à la partie glycophospholipidique toute C-terminale des AVS de BoTat.

CONCLUSION GENERALE

L'ensemble des résultats que nous venons de présenter amène une meilleure connaissance de l'antigène variable tant sur le plan de sa nature que de son organisation moléculaire.

Le "manteau de surface" de T. equiperdum peut être qualifié de lipophosphoglycoprotéine. Cette notion nouvelle complète le terme de "glycoprotéine de surface" qui a très longtemps été retenu pour les différentes espèces de trypanosomes africains. Il faut préciser que le protocole de préparation de l'antigène qui a permis ce travail avait l'avantage, par rapport à d'autres procédés appliqués notamment sur T. b. brucei, d'employer des conditions particulièrement douces, la libération de l'antigène étant simplement obtenue par mise en suspension pendant 12 h des parasites vivants dans un tampon légèrement acide de pH 5,5. Cette étape n'altère en rien la membrane plasmique des trypanosomes. Au contraire, l'isolement des AVS de T. b. brucei avait pour préalable une rupture cellulaire en l'absence de détergent, ceci pouvant être à l'origine de libération d'enzymes de dégradation de l'AVS. Jusqu'à ces derniers mois, l'antigène de surface avait été décrit comme étant une glycoprotéine de surface. Un article récent a aussi démontré la nature de glycoprotéine phosphorylée (Cardoso de Almeida et Turner (1983) (25)). Ajoutons que le même travail rapporte le caractère hydrophile du constituant membranaire isolé dans ces conditions, par opposition au caractère amphiphile du constituant membranaire préparé après lyse des trypanosomes par ébullition en présence de détergent. Les auteurs ont avancé que cette dernière "forme moléculaire" représente bien la forme liée à la membrane et que la forme soluble dans l'eau, obtenue après rupture cellulaire, résulte d'un processus dynamique de modification covalente affectant la structure et/ou la conformation de la région C-terminale de l'AVS. En vue de nous comparer et nous situer, nous avons analysé selon des conditions techniques électrophorétiques voisines les propriétés de l'AVS BoTat -1 et nous avons obtenu, bien que l'AVS soit parfaitement soluble dans l'eau, une migration correspondant à la forme dite "amphiphile". Il devient par conséquent difficile de juger des propriétés physiques des AVS sans tenir grand cas du protocole de libération.

Cardoso de Almeida et Turner ont également constaté une moindre réactivité immunologique de la forme "amphiphile" avec des anticorps dirigés

contre le site antigénique commun aux AVS. Or le site est maintenant mieux défini dans sa localisation : Holder (1983) (63) a récemment isolé l'acide aminé C-terminal glycosylé de deux AVS se terminant respectivement par une sérine et un acide aspartique, et a pu dans les 2 cas lui associer la responsabilité de la réactivité immunologique croisée. En ce qui nous concerne, le glycopeptide tout à fait C-terminal isolé de l'AVS BoTat-1 s'est également montré capable d'inhiber à 100 % la réaction hétérologue BoTat -1 - antiBoTat -28.

De toutes les données structurales et immunologiques acquises pour l'AVS BoTat -1 de T. equiperdum l'on peut donc proposer un schéma moléculaire (Figure 25). Selon cette hypothèse, l'éthanolamine serait unie au glycérol par une liaison phosphodiester. Les deux autres fonctions alcooliques libres du glycérol serviraient de points d'attache pour les sucres ou/et les acides gras. Plusieurs éventualités peuvent être envisagées en tant que modes de liaison :

- chaque fonction alcoolique du glycérol pourrait recevoir respectivement un acide gras et une chaîne oligosaccharidique, ce qui semble en désaccord avec la non libération des acides gras par saponification.

- l'une ou les deux fonctions alcooliques du glycérol pourrait être unie à une chaîne oligosaccharidique qui constituerait le support des acides gras, entité structurale originale à définir. En supposant que les acides gras soient liés par une liaison amide, leur point d'attache pourrait être par exemple une glucosamine comme il a été décrit au niveau de glycolipides de bactéries gram négatif, ou bien encore une sphinganine, l'existence d'un tel alcool aminé n'étant pas incompatible avec la présence en particulier de galactose.

La définition précise de cet enchaînement C-terminal revêt un intérêt primordial pour comprendre le mode de fixation de l'antigène à la membrane plasmique mais aussi pour appréhender les voies de biosynthèse.

Sur le plan des retombées de cette recherche structurale très fondamentale, l'ensemble des résultats acquis peut maintenant nous laisser espérer à court terme

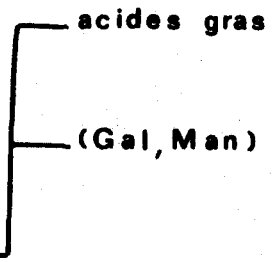
- une approche conformationnelle des AVS
- une définition des différents types de structure glycanique et surtout leur rôle au niveau moléculaire

BoTat

déterminants antigéniques spécifiques



Eth- (P)



déterminant antigénique commun



FIGURE 25

- un concept de dépistage mais aussi de traitement des trypanosomiasés à travers un descriptif précis de sites immunologiques.

Enfin la biologie du parasite, ses relations avec l'hôte sont à réenvisager en fonction d'une véritable interface dynamique parasite/hôte que représente l'antigène spécifique du variant.

APPENDICE TECHNIQUE

TABLE DES MATIERES
DE L'APPENDICE TECHNIQUE

| | |
|---|-----|
| I- <u>Méthodes d'étude physico-chimique</u> | 121 |
| A- <u>Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS</u> | 121 |
| 1- Principe | 121 |
| 2- Technique | 121 |
| 3- Conditions opératoires | 121 |
| 4- Détermination de la masse moléculaire apparente | 123 |
| B- <u>Isoélectrofocalisation analytique sur gel de polyacrylamide</u> | 123 |
| 1- Principe | 123 |
| 2- Technique | 124 |
| C- <u>Electrophorèse en gel de polyacrylamide adaptée à la séparation de peptides</u> | 125 |
| 1- Principe | 125 |
| 2- Conditions opératoires | 126 |
| D- <u>Electrophorèse d'affinité avec la concanavaline A</u> | 127 |
| E- <u>Electrophorèse adaptée à la visualisation de lipoprotéines</u> | 130 |
| 1- Electrophorèse en gel d'agarose d'échantillons précolorés avec le noir Soudan | 130 |
| 2- Visualisation de lipoprotéines par le noir Soudan après migration | 131 |
| F. <u>Etude en dichroïsme circulaire</u> | 131 |
| 1- Réalisation des spectres dichroïques | 132 |
| 2- Application à l'étude de la dénaturation thermique | 132 |
| G- <u>Composition amino acide</u> | 132 |

| | |
|--|-----|
| H- <u>Composition glucidique</u> | 134 |
| I- <u>Etude de la phosphorylation</u> | 135 |
| 1- Dosage du phosphore | 135 |
| 2- Etude de la nature de la liaison du phosphore à la molécule | 136 |
| J- <u>Caractérisation de glycérol - quantification</u> | 137 |
| K- <u>Composition lipidique</u> | 137 |
| II- <u>Méthodes d'étude structurale de l'AVS Botat -1</u> | 137 |
| A- <u>Techniques de modifications chimiques</u> | 137 |
| 1- Réduction et S-carboxamidométhylation | 137 |
| 2- Succinylation | 138 |
| 3- Amidination | 139 |
| 4- Réduction et S-aminoéthylation | 139 |
| B- <u>Conditions d'utilisation des différents enzymes</u> | 139 |
| 1- Enzymes utilisés | 139 |
| 2- Tampons d'incubation | 140 |
| 3- Protocoles d'hydrolyse | 140 |
| C- <u>Coupures chimiques</u> | 140 |
| 1- par le BNPS skatole | 140 |
| 2- par le bromure de cyanogène | 141 |
| D- <u>Détermination de séquence amino acide</u> | 141 |
| 1- Principe | 141 |
| 2- Méthodologies | 143 |
| a) Dégradation manuelle | 143 |
| b) Dégradation automatique | 144 |
| c) Identification des PTH amino acide dérivés | 147 |

I- Méthodes d'étude physico-chimique

A- Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS

1- Principe

Le dodécyl sulfate de sodium (SDS) possède la propriété de se fixer dans certaines conditions sur l'enchaînement peptidique d'une protéine lui conférant ainsi des charges négatives en nombre telle que la migration électrophorétique ne dépend plus que de la longueur de l'axe peptidique de la protéine.

L'utilisation d'un gradient d'acrylamide permet d'obtenir une résolution optimale, et permet également de pouvoir établir une relation linéaire entre la mobilité électrophorétique et le logarithme de la masse moléculaire.

2- Technique

La méthode utilisée est celle décrite par LAEMMLI (1970) (77).

Un gel de gradient d'acrylamide (5 à 30 %) de 1,5 mm d'épaisseur est coulé entre deux plaques de verre. Un gel supérieur à 5 % d'acrylamide, dans lequel sont réalisés au moyen d'un peigne en plastique des compartiments pour le dépôt des échantillons, est ensuite coulé.

Les migrations ont été réalisées dans une cuve à électrophorèse verticale (LKB 2001) sous une intensité constante réglée de 30 milliampères (alimentation stabilisée LKB 2197). Le temps d'électrophorèse est apprécié à l'aide d'un témoin coloré (bleu de bromophénol).

Après migration, le gel est démoulé, coloré par immersion pendant 16 heures dans la solution de bleu Coomassie, puis décoloré dans plusieurs bains successifs de solution décolorante.

3- Conditions opératoires

Solutions

* solution mère d'acrylamide : A

- acrylamide 48 g
- N-N'méthylènebisacrylamide 1,28 g
- eau distillée q.s.p. 100 ml
- * Solution tampon du gel à gradient : B
 - 3 M tris HCl pH 8,8
- * Solution tampon du gel supérieur : C
 - 1 M tris HCl pH 6,8

Composition du gel à gradient

| | Solution à 5 % | Solution à 30 % |
|----------------------------|----------------|-----------------|
| A | 1,40 ml | 8,40 ml |
| B | 1,75 ml | 1,75 ml |
| SDS 2 % | 0,70 ml | 0,70 ml |
| eau distillée | 10,00 ml | 3,00 ml |
| saccharose | - | 2,80 g |
| riboflavine 4 mg/100 ml | 0,20 ml | 0,20 ml |
| TEMED ⁽⁺⁾ | 15 µl | 10 µl |
| persulfate d'ammonium 10 % | 25 µl | 10 µl |

Composition du gel supérieur

| | Solution à 5 % |
|----------------------------|----------------|
| A | 1,00 ml |
| C | 1,25 ml |
| SDS 2 % | 0,50 ml |
| eau distillée | 7,10 ml |
| riboflavine 4 mg/100 ml | 0,20 ml |
| TEMED | 40 µl |
| persulfate d'ammonium 10 % | 60 µl |

- * Tampon de dissolution des échantillons
 - tris-HCl 0,625 M pH 6,8
 - SDS 2 %
 - glycérol 10 %

Les analyses ont été réalisées selon les cas en présence ou en absence d'agent réducteur (β -mercaptoéthanol à la concentration finale de 5 %).

(+) TEMED : N,N,N',N'Tétraméthylène diamine

Après dissolution dans le tampon, l'échantillon est porté à 100° C pendant 3 minutes afin de permettre la fixation du SDS sur la chaîne peptidique et aussi, le cas échéant, la rupture des ponts disulfure.

* Tampon d'électrophorèse

- tris 0,025 M
- glycolle 0,192 M
- SDS 0,1 %

* Colorant

- bleu Coomassie R 250 1,25 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- Détermination de la masse moléculaire apparente

Dans ce cas, un mélange de témoins de masse moléculaire connue (kit de calibration de bas poids moléculaire, Pharmacia) est déposé sur le gel dans les mêmes conditions que les échantillons à étudier. La courbe d'étalonnage du gel est obtenue en portant $\log M_m = f(R_f)$.

$$R_f : \frac{\text{migration de la protéine}}{\text{migration du bleu de bromophénol}}$$

Le report du R_f de l'échantillon analysé sur la courbe d'étalonnage donne immédiatement une valeur de masse moléculaire apparente.

B- Isoélectrofocalisation analytique sur gel de polyacrylamide

1- Principe

Cette technique 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. En effet, lorsqu'une protéine se trouve à un pH 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.

2- Technique

Cette détermination a été effectuée par isoélectrofocalisation en fine couche d'acrylamide (1,5 mm) dans un gradient de pH allant de 4,5 à 9 au moyen d'une cuve LKB multiphor (2117).

* Composition du gel

| | |
|---|----------|
| - solution d'acrylamide à 29,1 % (p/v) | 5,00 ml |
| - solution de N-N'méthylène-bisacrylamide à 0,9 % (p/v) | 5,00 ml |
| - glycérol | 3,75 ml |
| - riboflavine (4 mg/100 ml) | 1,50 ml |
| - ampholines (LKB 1809) 9-11 | 0,40 ml |
| 5-7 | 0,10 ml |
| 4-6 | 0,10 ml |
| 3,5-10 | 1,40 ml |
| - eau distillée q.s.p. | 30,00 ml |

Le mélange est dégazé pendant 10 minutes. Le catalyseur de polymérisation (0,27 ml de persulfate d'ammonium à 4 %) est ensuite ajouté, et la solution est coulée entre deux plaques de verre. La polymérisation s'effectue en une heure environ.

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

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 (alimentation LKB 2197), et avec réfrigération continue à 15° C. Les papiers filtres sont retirés au bout d'une heure de migration.

A la fin de l'analyse, le gradient de pH est tracé par mesure du pH tous les centimètres au moyen d'une électrode de surface. Le gel est à nouveau soumis à une migration de 30 mn approximativement pour assurer une focalisation fine des bandes qui ont pu diffuser pendant la mesure des valeurs de pH.

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

Réactifs

- * solution de fixation
- acide sulfosalicyllique 17,3 g
- acide trichloracétique 57,7 g
- eau distillée q.s.p. 500 ml

- * solution de coloration
- bleu Coomassie R 250 0,460 g
- solution de décoloration 400 ml

- * solution de décoloration
- éthanol 250 ml
- acide acétique 80 ml
- eau désionisée q.s.p. 1000 ml

C- Electrophorèse en gel de polyacrylamide adaptée à la séparation de

peptides

1 - Principe

En dessous d'une certaine taille moléculaire, les peptides ne sont plus colorables par le bleu Coomassie. Nous avons donc utilisé la visualisation par

fluorescence après marquage des échantillons. Nous avons utilisé le couplage avec la fluorescamine (ROSEMBLATT et coll) (1975) (113) en raison de sa simplicité et de sa rapidité de mise en oeuvre ; par ailleurs, la réaction modifie la charge intrinsèque des molécules et il devient possible d'établir des conditions électrophorétiques telles que la migration de tous les échantillons s'effectue vers l'anode. Ce fait permet d'omettre le SDS et d'obtenir un gel plus net.

2- Conditions opératoires

- Couplage avec la fluorescamine

L'échantillon est dissous dans 35 μ l d'une solution de bicarbonate de sodium 0,05 M de pH 8,2 ; 10 μ l d'une solution fraîchement préparée de fluorescamine à 5 mg/ml dans l'acétone lui sont ajoutés tandis que le tube est maintenu sous agitation vigoureuse au Vortex. Le réactif réagit instantanément avec les fonctions amine primaire, et l'excès s'hydrolyse en produits non fluorescents. L'acétone est ensuite évaporé par un courant d'azote et une goutte de glycérol est ajoutée pour augmenter la densité de la solution à déposer.

- Solutions

* solution mère d'acrylamide : A

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

* solution tampon du gel : D

- 1,5 M tris HCl PH 9,4

- Composition du gel

| | Solution à 15 % | Solution à 30 % |
|----------------------------|-----------------|-----------------|
| A | 1,40 ml | 8,40 ml |
| D | 3,60 ml | 3,60 ml |
| eau distillée | 9,00 ml | 2,00 ml |
| saccharose | - | 2,8 g |
| riboflavine | 0,10 ml | 0,10 ml |
| TEMED | 15 μ l | 10 μ l |
| persulfate d'ammonium 10 % | 25 μ l | 10 μ l |

Après polymérisation du gel à gradient, un gel supérieur à 5 % est ensuite coulé pour y enfoncer le peigne afin de réaliser les compartiments pour le dépôt des échantillons.

* Migration

l'électrophorèse est réalisée sous un voltage constant de 150 volts pendant 5 heures environ. La migration est en réalité appréciée par lecture du gel sous une longueur d'onde d'excitation de 365 nm.

Après migration satisfaisante, le gel peut être photographié ou bien faire l'objet d'un enregistrement de l'intensité relative de fluorescence des bandes.

D- Electrophorèse d'affinité avec la concanavaline A

La mise au point de cette technique avait pour but de pouvoir caractériser, parmi des bandes de migration électrophorétique, celles qui portaient des structures glycaniques possédant une affinité pour la concanavaline A.

La lectine libre est incorporée dans un gel très faiblement réticulé pour permettre la formation du complexe d'affinité. Ce premier gel est superposé, comme l'indique le schéma (Figure 1) a un gel intermédiaire d'acrylamide dont la concentration est calculée pour y empêcher la pénétration du complexe. Un gel en gradient d'acrylamide destiné à la séparation fine des bandes succède à ce gel intermédiaire (Figure 1).

La comparaison de deux dépôts identiques, traversant un gel enrichi ou non en lectine, permet de reconnaître parmi l'ensemble des composants ceux qui possèdent un site d'interaction pour la lectine : en effet, la bande électrophorétique correspondante disparaît de l'électrophorégramme par rapport à la migration témoin et le complexe d'affinité reste piégé à l'interface. La migration électrophorétique des composants exempts d'une interaction avec la lectine n'est aucunement perturbée par rapport à la migration témoin.

La présence de détergents ioniques gêne 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

Electrophorèse d'affinité

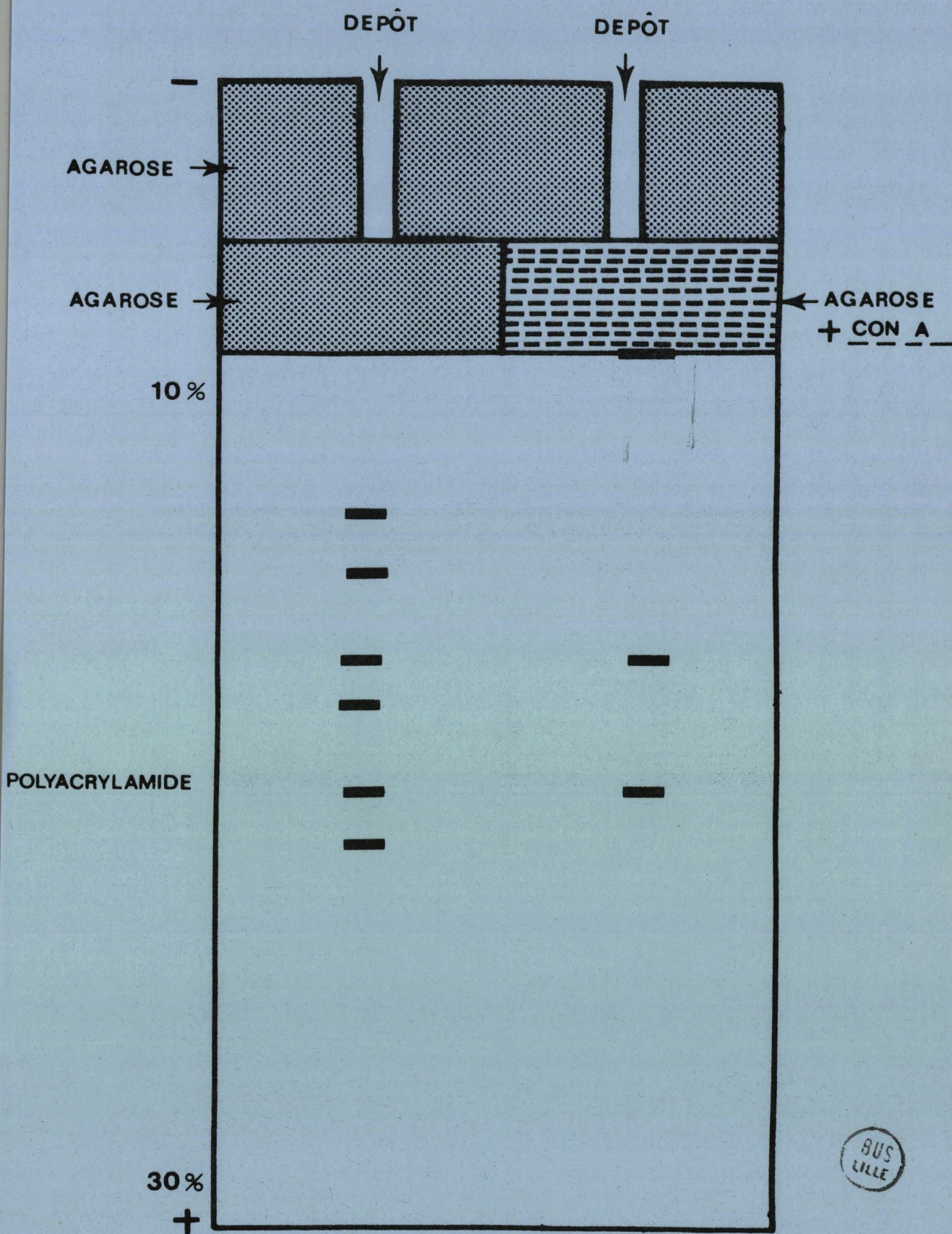


figure 1

pour obtenir dans des conditions données, la migration de tous les fragments étudiés vers l'anode.

La concanavaline A est constituée de sous unités de masse moléculaire 25 500. Au dessus de pH 7, elle se trouve sous une forme tétramérique, donc de masse moléculaire 102 000. Elle possède sous cette forme quatre sites de liaison. Avec cette lectine, l'emploi d'un gel intermédiaire à 10 % suivi d'un gradient d'acrylamide 10 % - 30 % s'est montré satisfaisant.

- Solution

* solution mère d'acrylamide : A

- acrylamide 48 g
- N N'méthylène bisacrylamide 1,28 g
- Eau distillée q.s.p. 100 ml

* solution tampon du gel à gradient : E

- 1,75 M tris-HCl pH 9.4

* solution tampon du gel intermédiaire et du gel supérieur : F

- 3 M tris - HCl pH 8,8

- Composition du gel

| | Solution à 10 % | Solution à 30 % |
|----------------------------|-----------------|-----------------|
| A | 2,80 ml | 8,40 ml |
| E | 3,60 ml | 3,60 ml |
| eau distillée | 7,60 ml | 1,85 ml |
| saccharose | - | 2,8 g |
| riboflavine (4 mg/100 ml) | 0,10 ml | 0,10 ml |
| TEMED | 20 μ l | 10 μ l |
| persulfate d'ammonium 10 % | 30 μ l | 15 μ l |

Après polymérisation du gel à gradient, le gel intermédiaire suivant est coulé :

| | |
|-------------------------|---------|
| A | 2,00 ml |
| E | 1,00 ml |
| CaCl ₂ 0.1 M | 0,10 ml |
| MnCl ₂ 0.1 M | 0,10 ml |

| | |
|----------------------------|-------------|
| eau | 5,30 ml |
| TEMED | 60 μ l |
| persulfate d'ammonium 10 % | 120 μ l |

Le gel supérieur faiblement réticulé est préparé à partir d'agarose :

| | |
|-------------------------|----------|
| F | 3,00 ml |
| CaCl ₂ 0,1 M | 0,30 ml |
| MnCl ₂ 0,1 M | 0,30 ml |
| eau distillée | 21,90 ml |
| agarose A45 | 0,60 g |

Une moitié du gel est coulée telle qu'elle. A l'autre moitié du gel maintenue à la température de 50° C, sont ajoutés 100 μ l d'une solution de lectine à 25 mg/ml (Boehringer), et le tout est ensuite coulé.

Les compartiments pour les dépôts sont réalisés au moyen d'une trompe à vide.

Les échantillons sont marqués à la fluorescamine comme précédemment. L'électrophorèse est réalisée en tampon 0,05 M tris-glycocolle pH 9,4 pendant une nuit sous un voltage constant de 150 volts et avec réfrigération continue à 15° C.

E. Electrophorèse adaptée à la visualisation de lipoprotéines

1- Electrophorèse en gel d'agarose d'échantillons précolorés avec le noir Soudan

Les échantillons sont d'abord marqués à la fluorescamine. Ensuite une précoloration des lipides est réalisée par addition d'un volume d'une solution de noir Soudan B succinylé à 0,5 % (p/v) dans l'éthylène glycol et contact pendant 30 mn à l'abri de la lumière (LENARD et SINGERS (1966) (80)). Les échantillons sont ensuite déposés sur un gel d'agarose à 1 % en tampon de pH 9,4. La migration s'effectue sous un voltage constant de 150 volts.

2- Visualisation de lipoprotéines par le noir Soudan après migration

Une première migration des échantillons préalablement marqués avec la fluorescamine est réalisée en gradient de gel de polyacrylamide selon les conditions précédemment décrites. Les bandes sont découpées et mises à migrer en seconde dimension dans un gel d'agarose à 1 %. Le gel est ensuite fixé, séché et coloré par la solution de noir Soudan.

- Solution de fixation

- eau 450 ml
- acide acétique 100 ml
- éthanol 450 ml

- Solution de coloration

- noir Soudan 200 mg
- Alcool à 60° C 200 ml

Le mélange est porté à l'ébullition pendant 20 minutes sous réfrigérant, puis filtré.

La décoloration s'effectue dans l'alcool à 50° C.

F. Etude en dichroïsme circulaire

Les études ont été réalisées sur un dichrographe Jobin-Yvon RJ Mark III, permettant 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). L'épaisseur des cellules de mesure varie de 0.01 cm à 2 cm. L'ellipticité molaire (Θ) a été calculée pour la région du spectre correspondant au chromophore amide (entre 180 et 240 nm), en prenant la moyenne à partir de 3 à 5 spectres réalisés à 2 sensibilités différentes. La vitesse de déroulement des nanomètres était de 0,1 mm/sec. La vitesse de déroulement du papier était de 2 mm/mn. La constante de temps était égale à 10.

L'appareil a été étalonné au moyen d'une solution d'isoandrosterone dans le dioxane (25 mg/20 ml). On mesure à 304 nm, en cuve de 1 cm, à la sensibilité de $10 \cdot 10^{-5}$ afin d'obtenir sur l'enregistreur une expansion correspondant à 142,5 mm.

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

$$\theta : 3\ 300 \frac{M \Delta s}{cd}$$

- 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 cm².

1- Réalisation des spectres dichroïques

Tous les spectres expérimentaux ont été faits dans des conditions telles que la densité optique soit toujours inférieure à 1.5. Ils ont été ensuite convertis en courbes gaussiennes à l'aide d'un convertisseur de courbes "DU PONT CURVE". On obtient ainsi des maxima négatifs à 207, 214 et 222 nm. Le contenu en hélice α est apprécié à partir de la transition $n \rightarrow \pi$ au niveau de la bande centrée à 222 nm et en prenant la valeur de -30 620 comme étalon pour l'hélice. La quantité de structure β est appréciée de façon similaire au niveau de la bande à 214 nm et en prenant la valeur de -7 040 comme étalon pour la forme β . Les valeurs des étalons sont déterminées pour le dichrographe utilisé dans la région du spectre 180-250 nm à partir de 6 protéines d'après la méthode de CHEN et coll (1974) (26).

2- Application à l'étude de la dénaturation thermique

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

G- Composition amino acide

a) hydrolyse

L'échantillon en quantité de 100 à 500 μ g est hydrolysé par l'acide

chlorhydrique 5,6 N à 110° C en tube scellé sous vide. La durée de l'hydrolyse est généralement de 24 heures. L'hydrolysate est ensuite évaporé sous vide à basse température (Evapo Mix Buchler).

La reconversion des phénylthiohydantoïne-dérivés en amino acides est obtenue par hydrolyse dans l'HCl 5,6 N à 150° C pendant 24 heures.

b) Analyse des acides aminés sur autoanalyseur

La composition en acides aminés est réalisée sur autoanalyseur Beckman de type 119 CL. Les tampons et le programme retenus (FAUCONNET et ROCHE-MONT) (1978) (37) permettent en une seule étape et sur une seule colonne la séparation des acides aminés et des osamines, sur une résine DURRUM DC 6A dans une colonne de 6 mm de diamètre et de 220 mm de hauteur.

La composition du réactif à la ninhydrine est la suivante : ninhydrine (Touzart et Matignon) 75 g, chlorure stanneux (Merck) 1,5 g, tampon acétate de sodium pH 5,5 (Merck) 1 250 ml, methylcellosolve (SDS) 3 750 ml.

Le réactif est maintenu sous atmosphère d'azote.

* Dosage du tryptophane

Le tryptophane détruit par l'hydrolyse acide HCl 5,6 N est dosé par la méthode de PENKE et coll (1974) (106).

1 mg d'échantillon est hydrolysé 24 heures sous vide à 110° C par 1 ml d'acide β -mercapto-sulfonique en présence de 500 nanomoles de norleucine. Le pH de l'hydrolysate 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. L'analyse s'effectue ensuite selon les conditions précédemment décrites.

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

L'oxydation performique est réalisée selon le protocole décrit par HIRS (1967) (57). 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 de 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 dans les conditions précédemment décrites.

H- Composition glucidique

La composition en oses neutres et en osamines est déterminée, après méthanolyse, par chromatographie en phase gazeuse selon la méthode de REINHOLD (1972) (109).

1- Méthanolyse

La méthanolyse est effectuée dans une solution de méthanol-HCl 1,5 M à 80° C pendant 24 heures. La solution est ensuite séchée sous courant d'azote dans un bain-marie à 37° C.

2- N-acétylation et dé-O-acétylation

* N-acétylation

Les échantillons sont N-acétylés par addition de 100 μ l d'anhydride acétique et de 100 μ l de pyridine, laissés 3 minutes à température ambiante et séchés sous azote dans un bain-marie à 37° C.

* Dé-O-acétylation

Les échantillons sont alors dé-O-acétylés dans 500 μ l de méthanol - HCl 1,5 M pendant 1 heure à 65° C. Le méthanol est alors évaporé sous courant d'azote.

3- Triméthylsilylation

La silylation est effectuée par addition de 100 μ l de Sylon (Sylon HTP-Inc, Bellafonte, Pennsylvania, 16 823) pendant 1 heure à température am-

biante. Après séchage sous azote, 100 μ l d'heptane sont ajoutés. Un délai de 30 minutes est fixé avant l'injection de 1 à 2 μ l de la phase heptanique.

4- Chromatographie en phase gazeuse

L'analyse est effectuée sur appareil Hewlett-Packard 5840 A équipé d'un détecteur à ionisation de flamme sur des colonnes d'acier (180 x 0,3 cm) contenant de l'OV 17 à 3 % sur chromosorb W-A-DMCS (100-200 mesh (Packard)).

La température initiale du four est de 120° C. Elle augmente de 8° par minute jusqu'à 270° C. La surface des pics et le temps de rétention sont déterminés au moyen de l'intégrateur digital couplé à l'appareil.

I- Etude de la phosphorylation

1- Dosage du phosphore

Les échantillons ont été dissous dans de l'eau distillée à une concentration de l'ordre de 0,1 mg/ml. La teneur protéique a été ensuite dosée selon la méthode de SPECTROR (1978) (119).

* Elimination des groupements phosphate libres.

Des aliquots de solution correspondant à 5 nmoles, 10 nmoles, et 15 nmoles de glycoprotéine ont été de façon répétée précipités par de l'acide trichloracétique (16 % p/v), chauffés à 80° C pendant 20 minutes puis centrifugés, avec redissolution des précipités dans de la soude 0,1 N à 0° C.

* Minéralisation (AMES) (1966) (3)

L'on ajoute aux précipités précédents, et à une gamme étalon préparée à partir d'une solution de KH_2PO_4 0,5 M, 62,5 μ l de nitrate de magnésium à 10 % dans l'éthanol absolu. Les échantillons sont séchés en étuve à 105° C puis minéralisés à la flamme d'un bec bunsen.

* Dosage du phosphate inorganique (ITAYA, et MICHIO, (1966) (69))

- préparation du réactif : 1 g d'heptamolybdate d'ammonium $((\text{NH}_4)_6 \text{Mo}_7 \text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O})$ est dissous dans 10 ml d'HCl 4 N, et 60 mg de vert Malachite dans 30 ml d'eau. Les deux solutions sont ensuite mélangées et laissées sous agitation 30 mn. Le mélange est centrifugé juste avant l'emploi.

- les cendres sont dissoutes dans 375 μl d'HCl 1,2 N et l'on ajoute 125 μl de réactif, et après 5 minutes, 12,5 μl de tween 20 à 1,5 %. La lecture se fait à 660 nm.

2- Etude de la nature de la liaison du phosphore à la molécule

* Recherche de phosphosérine, phosphothréonine ou phosphotyrosine

L'échantillon marqué au ^{32}P est hydrolysé dans l'HCl 5,6 N pendant 2 heures à 110° C; l'hydrolysate est passé en même temps que les phosphoaminoacides témoins froids sur une résine DC 6 A (8 x 0,6 cm). Une élution isocratique est réalisée avec de l'acide trifluoroacétique 10 mM à la température de 48° C pendant 75 minutes selon un débit de 25 ml par heure. Les phosphoaminoacides sont détectés par fluorimétrie avec un réactif à l'orthophthaldialdéhyde dont le débit est de 12,5 ml par heure. L'éluat correspondant aux temps de rétention des phosphoaminoacides est récupéré puis il est compté en Cerenkov.

* Traitement par l'hydroxylamine

L'échantillon marqué au ^{32}P est incubé pendant 1 heure dans 200 μl de tampon tris HCl 0,1 M de pH 8 enrichi d'hydroxylamine fraîchement préparée à la concentration de 0,8 M.

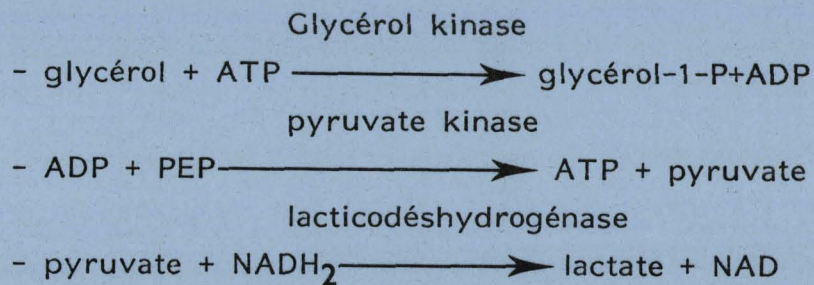
* L'hydrolyse alcaline a été réalisée dans de la soude 0,1 N pendant 1 heure à température ambiante.

* Hydrolyse par la phosphatase alcaline

L'échantillon marqué au ^{32}P est incubé avec 0,4 unité d'enzyme (Sigma) dans 40 μl de tampon tris-HCl 0,1 M de pH 8 pendant 90 minutes à 37° C.

J- Caractérisation du glycérol

Le glycérol est libéré par hydrolyse dans de l'HCl 2 N à 125° C pendant 48 heures (RENKONEN (1982) (110)). Il est ensuite dosé sur analyseur centrifuge (type Rotochem) avec le monoréactif 92 807 de l'Institut Pasteur selon la technique adaptée par ZIEGENHORN (1975) (134) utilisant les réactions suivantes :



K- Composition lipidique

Les acides gras sont libérés par hydrolyse HCl 5,6 N pendant 24 heures à 110° C en tube scellé sous azote. Après évaporation sous vide, les acides gras sont recueillis selon le partage de FOLCH et coll. (1957) (38) ; l'on ajoute 50 µl d'HCl 2 N, 100 µl d'eau, 200 µl de méthanol et 400 µl de chloroforme. Après agitation et centrifugation, la phase organique est récupérée et lavée trois fois avec 200 µl d'un mélange chloroforme/méthanol/eau (1/10/10).

Les acides gras sont convertis en esters méthyliques par transestérification (HAGENFELDT (1966) (51)). Après extraction à l'heptane, les esters méthyliques sont séparés par chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire avec utilisation de 2 types de phase stationnaire : Carbowax 20 M (2 %) et DEGS (10 %). Pour l'identification des acides gras insaturés, l'on utilise la méthode des longueurs équivalentes de chaîne.

II- Méthodes d'étude structurale de l'AVS BoTat-1

A- Techniques de modification chimique

1- Réduction et S-carboxamidométhylation

Réduction et S-carboxamidométhylation sont effectuées selon la technique

de GALL et coll (1968) (42). La glycoprotéine est dissoute dans un tampon EDTA 0,003 M, urée 8 M, tris 1,5 M de pH 8,5 à la concentration de 50 mg par ml. Un excès de 2-mercaptoéthanol de 200 moles par mole est ajouté. Le tube est maintenu quelques secondes sous azote, et la réduction est poursuivie pendant 24 h à température ambiante, sous agitation constante. Le tube est ensuite refroidi dans la glace fondante et de l'iodoacétamide est ajouté selon un excès de 400 moles par mole. La réaction est effectuée pendant 45 minutes à l'obscurité. La disparition des groupements thiol est contrôlée par la réaction au nitroprussiate (ROSNER, (1940) (113)). 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 irréversiblement les groupements aminés libres. Le blocage au niveau du N-terminal rend impossible la dégradation de Edman. La modification affecte également le groupement ϵNH_2 des résidus de lysine. La PTH succinyllysine s'exprime en HPLC sur colonne μ -Bondapack C18 par 3 pics qui attestent de l'existence de composés réactionnels intermédiaires ou de différents produits possibles de dégradation.

b) Méthode

La succinylation est effectuée selon la méthode de KLOTZ (1967) (74). 100 mg d'anhydride succinique sont dissous dans 10 ml de dioxane. L'échantillon à succinyler est repris à une concentration de 2 mg/ml dans de l'eau désionisée. Le pH est amené à 9 avec de la soude 0.1 N. L'anhydride succinique est ajouté goutte à goutte en excès de 20 moles par 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 minutes, l'échantillon est dialysé une nuit à 4° C puis 48 heures à température ambiante, avec changements fréquents contre le tampon retenu pour l'hydrolyse enzymatique envisagée.

3- Amidination

La méthode a été décrite par LUDWIG et HUNTER (1967) (87).

a) Principe

Cette méthode permet un blocage réversible des groupements NH_2 avec absence de réactions secondaires du niveau des groupements SH et OH si l'on opère entre pH 7 et 10.

b) Méthodologie

L'échantillon est dissous dans l'eau en présence de 1 % de mercaptoéthanol pour permettre une meilleure accessibilité des réactifs. Le pH est ajusté à 10 au moyen de soude 0,1 N. Le chlorhydrate de méthyl acétimide est ensuite ajouté progressivement tout en maintenant le pH à 10. Quand la totalité de réactif a été ajoutée, la solution est dialysée contre de l'eau désionisée pendant 3 jours à 4° C.

4) S-aminoéthylation.

(RAFTERY et COLE. (1977) (107)).

La réaction a été effectuée en tampon 2 M tris, 4 M urée, 0,003 M EDTA de pH 8,6, sous azote. L'échantillon est soumis à une réduction pendant 4 heures en présence de mercaptoéthanol 20 fois en excès par rapport aux résidus de cystéine. L'alkylation a été réalisée par addition d'éthylène imine en plusieurs fois à raison de 100 moles par mole de cystéine. Après arrêt de la réaction, les réactifs sont éliminés par dialyse contre de l'eau désionisée.

B- Conditions d'utilisation des différents enzymes protéolytiques

1- Enzymes utilisés

- trypsine (Sigma type XI N° 1003) débarassée de son activité chymotrypsique par le chlorure de phénylcarbamyloxy (DPCO).

- chymotrypsine (SIGMA type VII N° C 3142) débarassée de son activité trypsique par le 1-chloro-3 tosylamido-7 amino-2-heptanone (TLCK).

- endoprotéinase ARG-C (Boehringer Mannheim, 269590).
- protéase de Staphylococcus aureus (Miles n° 36900).
- protéinase K (E. Merck, Darmstadt)

2- Tampons d'incubation

Les hydrolyses tryptiques et chymotryptiques sont effectuées en tampon bicarbonate d'ammonium 0,01 M ajusté à pH 8,5.

L'hydrolyse par l'endoprotéinase ARG-C est réalisée en tampon N méthylmorpholine 0,1 M de pH 8 (LEVY (1970) (82)).

L'hydrolyse par la protéase de S. aureus est menée dans un tampon acétate d'ammonium 0,05 M pH 4 (HOUMARD et DRAPEAU) (1972) (64)).

L'hydrolyse par la protéinase K est conduite en tampon bicarbonate d'ammonium 0,1 M ajusté à pH 8,5 et contenant de l'urée à la concentration de 2 M.

3- Protocoles d'hydrolyse

Les concentrations en échantillons sont de 1 mg par ml. Selon les cas, nous avons été amenés à utiliser différents rapports molaires enzyme/substrat (1 % à 4 %), et différentes températures d'incubation (4° C à 37° C).

C- Coupures chimiques

1- par le BNPS skatole

a) principe

Le 2(2-nitrophénylsulfényl)-3-méthyl-3-bromoindole ou BNPS-skatole est un agent bromant d'action comparable avec la N-bromosuccinimide mais l'analogie de structure qu'il présente avec le tryptophane oriente préférentiellement la coupure vers cet amino acide.

b) méthode

Nous avons utilisé la méthode décrite par DEBUIRE et coll (1977) (31).

100 mg de glycoprotéine S-carboxamidométhylée 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-skatole sont ajoutées par mole de tryptophane.

La solution est laissée à température ambiante sous agitation à l'obscurité pendant 68 heures. Le mélange est ensuite centrifugé 10 minutes à 1000 tours par minute. Le surnageant est dilué puis lyophilisé.

Dans un second temps, la molécule est reprise dans une solution aqueuse à 15 % de mercaptoéthanol, placée 72 heures sous azote à 30° C avec agitation constante. Après centrifugation permettant l'élimination d'un insoluble, le milieu réactionnel est lyophilisé.

2- par le bromure de cyanogène

Le principe réactionnel est détaillé dans le chapitre II. La technique utilisée est celle préconisée par STEERS et coll (1965) (20). La glycoprotéine réduite et S-alkylée est dissoute à la concentration de 1 mg par ml dans de l'acide formique à 70 %. Le BrCN fraîchement dissout dans de l'acide formique à 70 % est ajouté en excès de 200 moles par mole de méthionine contenue dans la glycoprotéine. L'ensemble est maintenu 24 heures à l'obscurité, à température ambiante et sous agitation. La réaction est stoppée par addition de 10 volumes d'eau désionisée refroidie à 4° C. Les produits sont alors lyophilisés.

D- Détermination de séquence amino acide

1- principe

Les étapes de la dégradation de EDMAN (1956) (35) sont schématisées dans la figure 2.

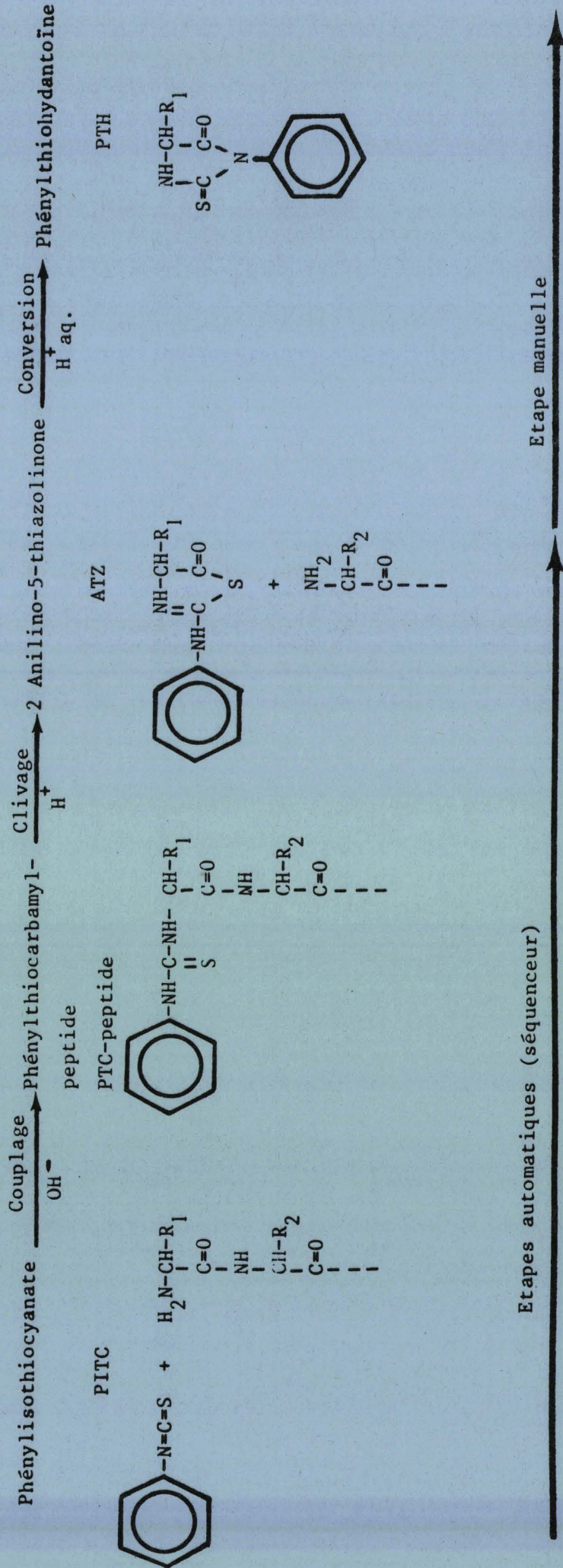


figure 2

2- Méthodologie

a) Dégradation manuelle

Nous suivons le protocole établi par EDMAN (1970) (36) et modifié par DEMAILLE (1979) (32).

- Couplage

Les différentes étapes sont les suivantes :

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

- . addition de 5 μ l de phénylthiocyanate et maintien du tube sous courant d'azote pendant 30 secondes.

- . agitation au vortex

- . incubation à 50° C pendant 40 minutes - le mélange est ensuite refroidi.

- . élimination de l'excès de réactif par 3 additions successives de 0,5 ml de benzène, suivies de centrifugation à 2000 tours par minute pendant 5 minutes et élimination de la phase benzénique.

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

- Clivage

* Addition de 50 μ l d'acide trifluoroacétique 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'ether). 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 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.

- 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 phénylthiohydantoïne (PTH) par trois fois 0,5 ml d'acétate d'éthyle suivie de centrifugations à 2000 t/mn pendant 5 mn. Les phases organiques 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.

b) Dégradation automatique

Les dégradations ont été réalisées sur un séquenceur Beckman 890 C dont un schéma simplifié est donnée dans la figure 3. Les différentes étapes sont effectuées à 57° C en atmosphère d'azote.

1- Etalement de l'échantillon sur la coupelle

L'échantillon en quantité de 200 à 500 nanomoles est solubilisé dans 400 μ l d'eau puis déposé 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 vides progressifs.

2- couplage

L'échantillon est couplé au phénylthioisocyanate (PITC) dans 2 types de tampon selon le programme choisi : soit un tampon quadrol 0,1 M (programme

SCHEMA SIMPLIFIE DU SEQUENCEUR BECKMAN 890 C

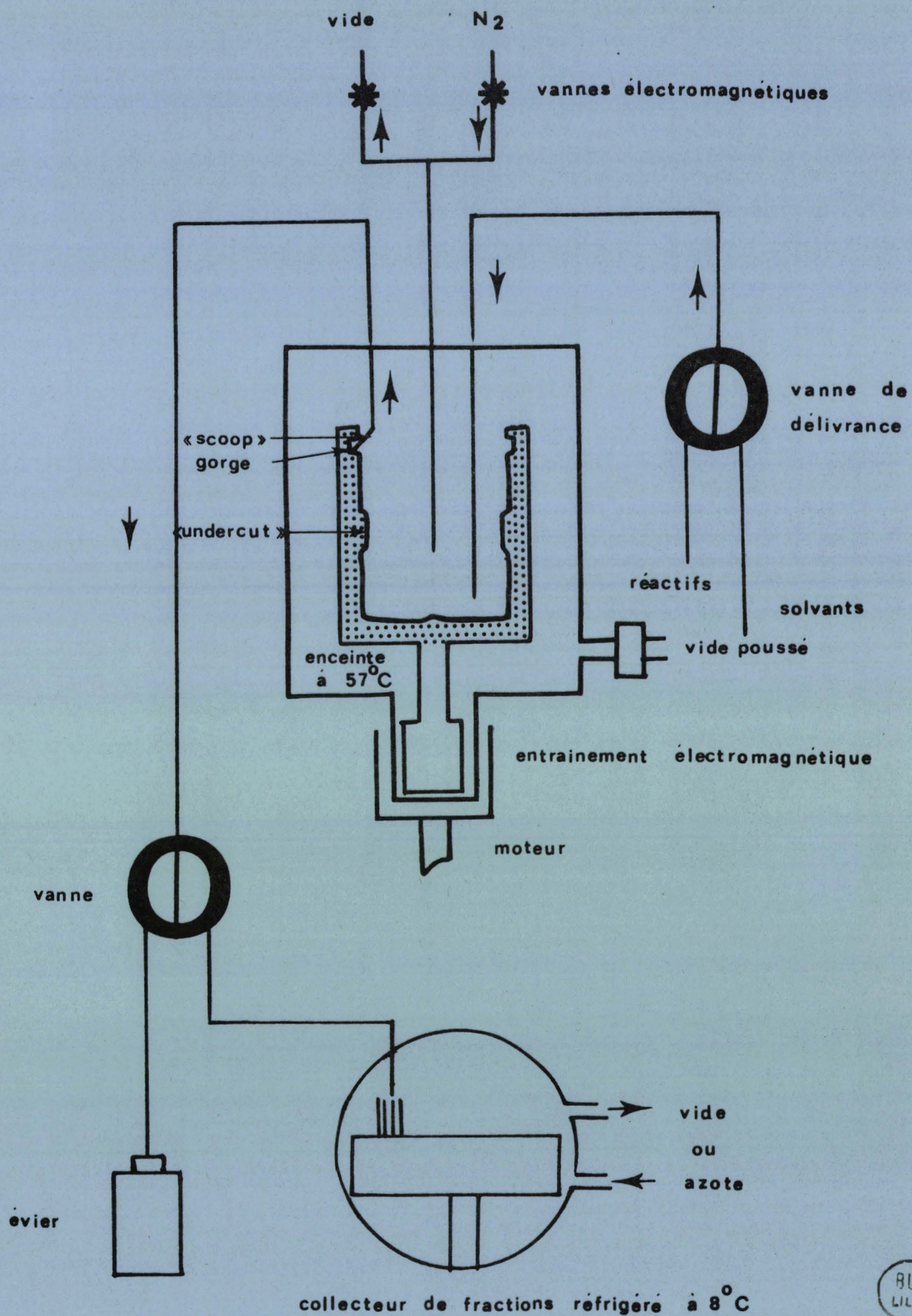


figure 3



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.

3- Elimination de l'excès des réactifs

Cette étape est réalisée par succession d'un vide progressif, d'un balayage d'azote sous vide partiel, et d'un lavage au benzène.

4- Clivage par l'acide heptafluorobutyrique (HFBA)

Après séchage du film, le clivage est réalisé par addition de HFBA. L'excès d'acide est éliminé par un vide progressif suivi d'un balayage d'azote sous vide.

5- extraction des thiazolinones

Les 2-anilino-5-thiazolinones (ATZ) sont extraites par le chlorobutane et recueillies dans des tubes réfrigérés contenant le milieu de conversion : 200 µl d'HCl N et quelques gouttes d'éthylmercaptan comme anti-oxydant.

Un cycle dure 80 minutes. Ensuite, le produit résiduel de la coupelle est séché par vide progressif, suivi d'un balayage d'azote sous vide partiel. Le cycle suivant peut alors commencer.

6- Conversion manuelle

Le chlorobutane est évaporé sous azote. Au cours de cette évaporation, la thiazolinone se concentre progressivement dans la phase HCl qui est incubée 10 minutes à 80° C.

Dans le cas d'une dégradation appliquée à des petites molécules, il convient d'utiliser un mainteneur. Nous avons utilisé le polybrène en quantité de 2 à 3 mg (KLAPPER et coll) (1978) (73). Les artefacts dus au polybrène sont légèrement atténués en commençant par 3 cycles de dégradation de 50 nanomoles de dipeptide de Gly-Gly (HUNKAPILLER et HOOD) (1978) (67).

c) Identification des PTH amino acides dérivés

Pour ce stade nous avons fait appel essentiellement à la chromatographie liquide de haute performance (HPLC) et dans certains cas à la chromatographie en phase gazeuse.

1- Chromatographie liquide de haute performance

L'appareil utilisé était un Hewlett Packard modèle 1084 B équipé d'un détecteur fixe à 254 nm et d'un détecteur variable entre 200 et 540 nm. La technique employée était celle préconisée par HERMANN et coll (1978) (56), modifiée par BRIAND (1981) (21).

La séparation est réalisée sur une colonne μ -Bondapack C18 (Water Associates). La PTH norvaline est utilisée comme témoin interne, le diagramme obtenu ainsi que les conditions opératoires sont représentées dans la figure 4. Sur cette colonne, les PTH-méthionine et PTH-valine d'une part et les PTH-isoleucine et PTH phénylalanine d'autre part ne sont pas séparées. L'identification définitive est dans ce cas réalisée à l'aide d'une colonne μ -Bondapack CN (Waters Associates) Figure 5.

2- Chromatographie en phase gazeuse

Elle a été employée, dans les toutes premières déterminations, pour différencier PTH-méthionine et PTH-valine d'une part, PTH-isoleucine et PTH-phénylalanine d'autre part. Les identifications ont été réalisées sur une colonne WHP 100/120 mesh imprégnée de chlorophénylsilicone SP 400 à 10 % à l'aide d'un appareil Hewlett Packard modèle 5730 A. Le diagramme type ainsi que les conditions opératoires sont représentés dans la figure 6.

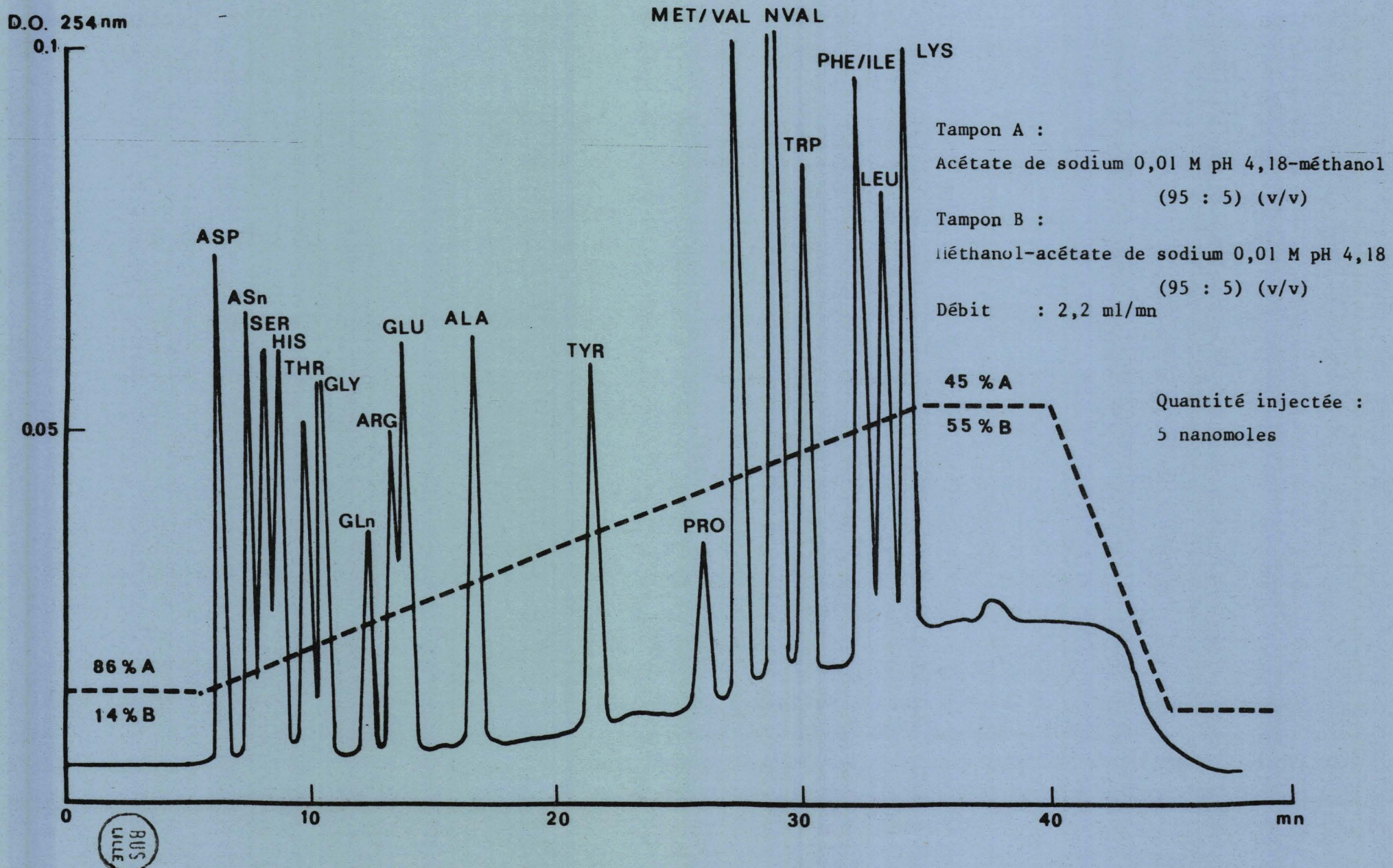


figure 4

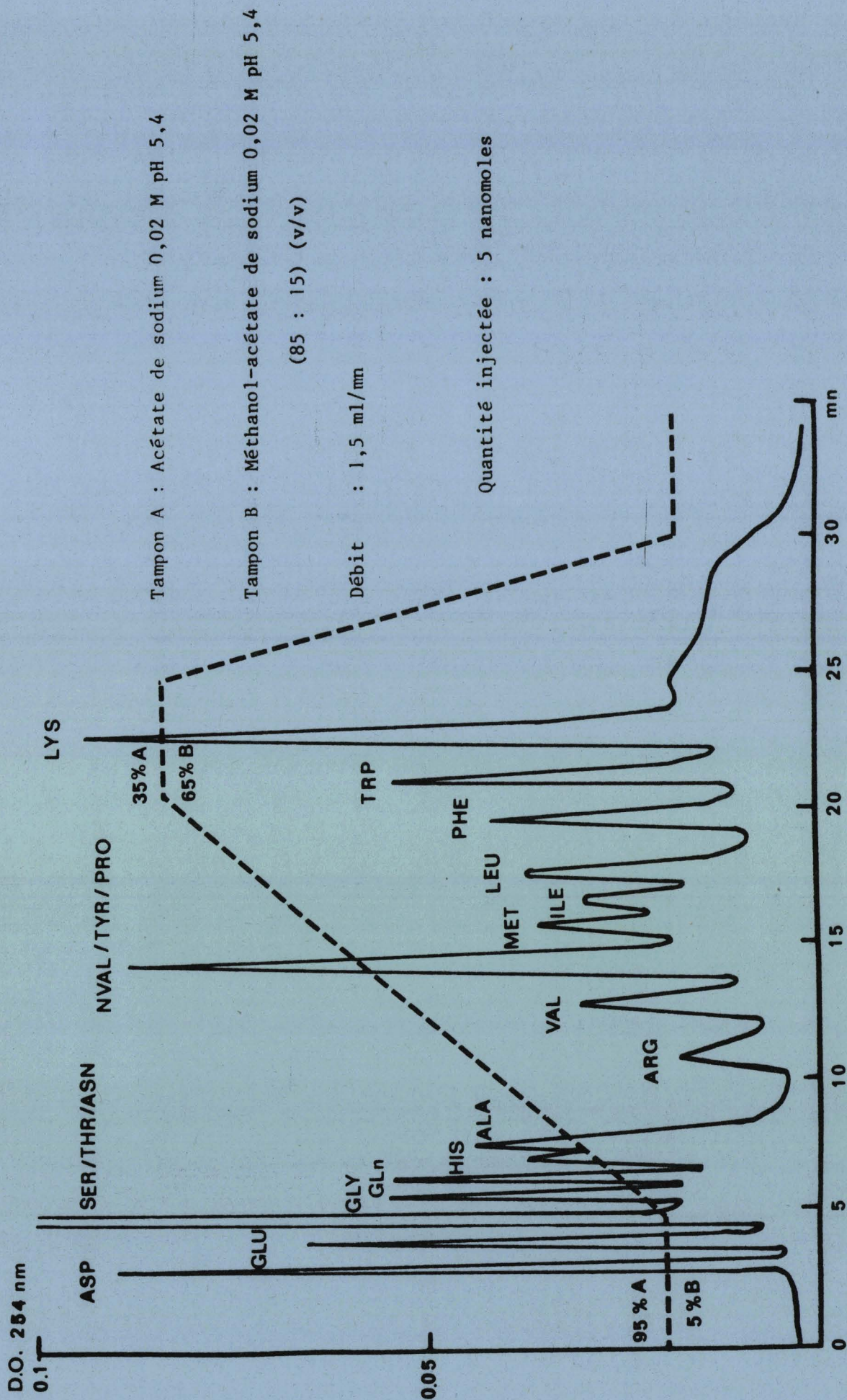
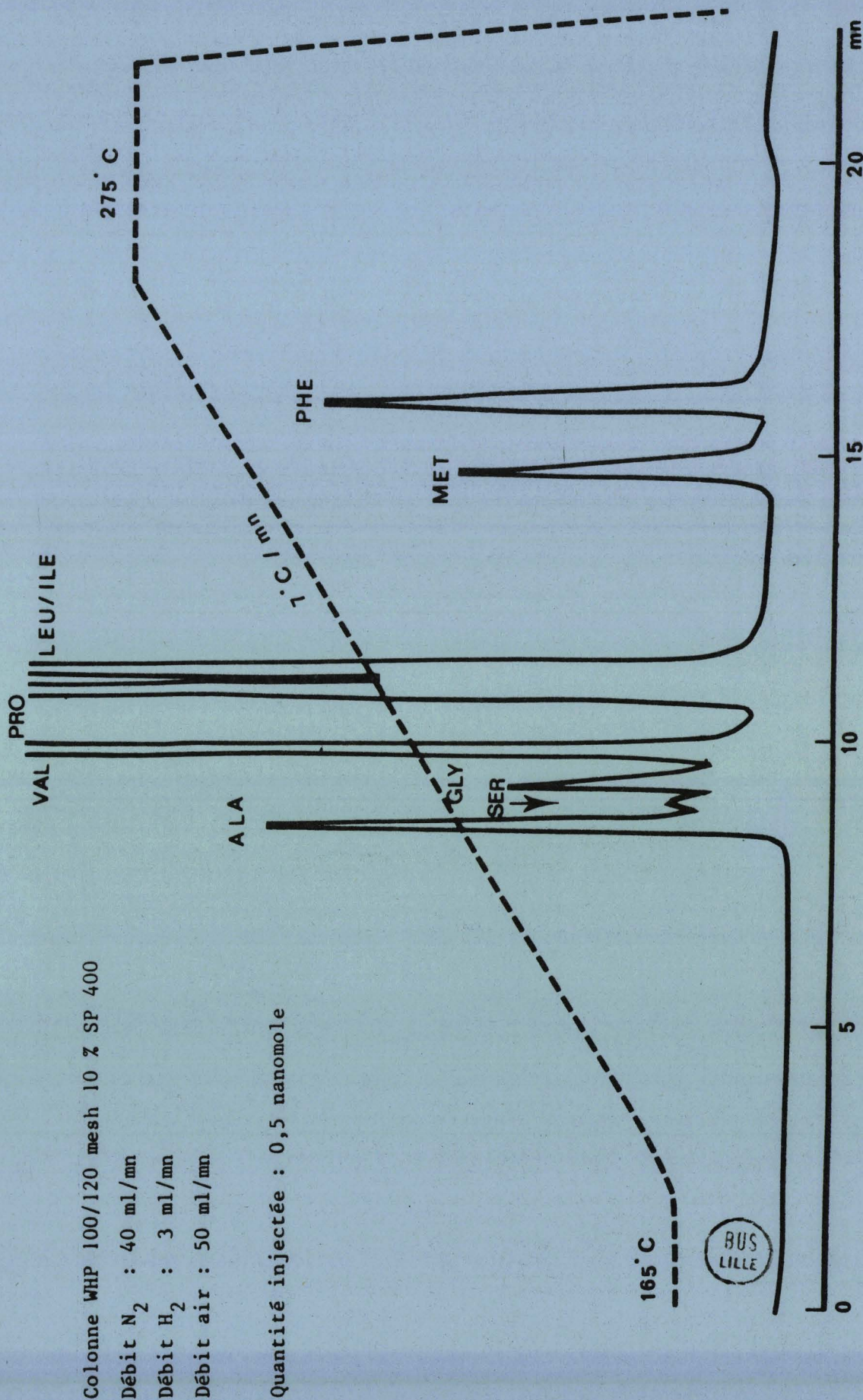


figure 5





Colonne WHP 100/120 mesh 10 % SP 400

Débit N₂ : 40 ml/mn

Débit H₂ : 3 ml/mn

Débit air : 50 ml/mn

Quantité injectée : 0,5 nanomole

figure 6

BIBLIOGRAPHIE

- 1- ALLEN, G., GURNETT, L.P., and CROSS, G.A.M. (1982)
Complete amino acid sequence of a variant surface glycoprotein (VSG 117) from *Trypanosoma brucei*.
J. Mol. Biol., 157, 527-546. (33,40,48)

- 2- ALLEN, G., and GURNETT, L.P. (1983)
Locations of the six disulphide bonds in a variant surface glycoprotein (VSG 117) from *Trypanosoma brucei*.
Biochem. J., 209, 481-487. (33)

- 3- AMES, B.N. (1966)
Assay of inorganic phosphate.
Methods Enzymol., 8, 115-118. (135)

- 4- BABIKER, E.A., and LE RAY, D. (1982)
Studies on serodemes of *T. b. gambiense*. II. Repertoire relationships among stocks from Zaïre, Congo and Cameroun. In preparation. (31)

- 5- BALTZ, T., BALTZ, D. et PAUTRIZEL, R. (1976)
Affinité de la concanavaline A pour *Trypanosoma equiperdum*. Applications à l'isolement de la fraction glycoprotéique spécifique du type antigénique.
Ann. Immunol. (Institut Pasteur), 127C, 761-774. (32,44)

- 6- BARBET, A.F., and Mc GUIRE, T.C. (1978)
Cross-reacting determinants in variant specific surface antigens of African trypanosomes.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1989-1993. (35)

- 7- BARBET, A.F., Mc GUIRE, T.C., MUSOKE, A.J. and HIRUMI, H. (1979)
Cross-reacting determinants in trypanosome surface antigens. In : Pathogenicity of Trypanosomes, (LOSOS, G. and CHOUINARD, A., Eds.) International Development Research Centre, Ottawa, pp 38-43. (35,39)

8- BARRY, J.D., HAJDUK, S.L., VICKERMAN, K. and LE RAY, D. (1979)
Detection of multiple variable antigen types in metacyclic populations of
Trypanosoma brucei.

Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 73, 205-207. (7)

9- BERNARDS, A., VAN DER PLOEG, L.H.T., FRASCH, A.C.C., BORST, P., BOOTHROYD, J.C., COLEMAN, S. and CROSS, G.A.M. (1981)

Activation of trypanosome surface glycoprotein genes involves a duplication transposition leading to an altered 3' end.

Cell, 27, 497-505. (21,23,24,32)

10- BERNARDS, A. (1982)

Transposable genes for surface glycoproteins in trypanosomes.

TIBS, 7, 253-255. (24,26,29)

11- BLACK, S.J., HEWETT, R.S., and SENDASHONGA, C.N. (1982)

Trypanosoma brucei variable surface antigen is released by degenerating parasites but not by actively dividing parasites.

Parasit. Immunol., 4, 233-244. (40)

12- BLOBEL, G. and DOBBERSTEIN, B. (1975)

Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolitically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma.

J. Cell. Biol., 67, 835-851. (20)

13- BOOTHROYD, J.C., CROSS, G.A.M., HOEIJMAKERS, J.H.J., and 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. (12,13,14,20,31,39)

14- BOOTHROYD, J.C., PAYNTER, C.A., CROSS, G.A.M., BERNARDS, A., and BORST, P. (1981)

Variant surface glycoproteins of *Trypanosoma brucei* are synthesized with cleavable hydrophobic sequences at the carboxyl and amino termini.

Nucl. Acids. Res., 9, 4735-4743. (12,14,20,39)

15- BOOTHROYD, J.C., PAYNTER, C.A., COLEMAN, S.L. and CROSS, G.A.M (1982)

Complete nucleotide sequence of cDNA coding for a variant surface glycoprotein from *Trypanosoma brucei*.

J. Mol. Biol., 157, 547-556. (20,31,33,39,40)

16- BOOTHROYD, J.C. and CROSS, G.A.M. (1982)

Transcripts coding for variant surface glycoproteins of *T. brucei* have a short, identical exon at their 5' end.

Gene, 20, 281-289. (26,29)

17- BORST, P., FRASCH, A.C.C., BERNARDS, A., HOEIJMAKERS, J.H.J., VAN DER PLOEG, L.H.T. and CROSS, G.A.M. (1980)a.

The genes for variant antigens in trypanosomes.

Am. J. Trop. Med. Hyg., 29, 1033-1036. (21)

18- BORST, P., FRASCH, A.C.C., BERNARDS, A., VAN DER PLOEG, L.H.T., HOEIJMAKERS, J.H.J., ARNBERG, A.C. and CROSS, G.A.M. (1980)b

DNA rearrangements involving the genes for variant antigens in *Trypanosoma brucei*.

Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 45, 935-943. (21,29)

19- BORST, P. and CROSS, G.A.M. (1982)

Molecular basis for trypanosome antigenic variation.

Cell, 29, 291-303. (23,24,26,37)

20- BORSTEIN, P. and BALIAN, G. (1977)

Cleavage at Asn-Gly bonds with hydroxylamine.

Methods Enzymol., 47, 132-145. (66)

21- BRIAND, G. (1981)

Histone H5 d'érythrocyte de poulet.

Thèse de Doctorat ès-sciences Lille. (147)

22- BRIDGEN, P.J. and CROSS, G.A.M. (1976)

N-terminal amino acid sequences of variant specific surface antigens from

Trypanosoma brucei.

Nature, 263, 613-614. (33)

23- CAPBERN, A., GIROUD, C., BALTZ, T. et MATTERN, P. (1977)

Trypanosoma equiperdum : étude des variations antigéniques au cours de la trypanosomiase expérimentale du lapin.

Exp. Parasit., 42, 6-13. (5,9,42)

24- CAPONY, J.P. and DEMAILLE, J.G. (1983)

A rapid microdetermination of phosphoserine, phosphothreonine, phosphotyrosine in proteins by automatic cation exchange on conventional amino acid analyzer.

Anal. Biochem., 128, 206-212. (61)

25- CARDOSO DE ALMEIDA, M.L. and TURNER, M.J. (1983)

The membrane form of variant surface glycoproteins of Trypanosoma brucei.

Nature, 302, 349-352. (114)

26- CHEN, Y.H., YANG, J.T., and CHAU, K.H. (1974)

Determination of the helix and β -form of proteins in aqueous solution by circular dichroism.

Biochemistry, 113, 3350-3359. (132)

27- CLARKSON, H.J., and AWAN, M.A.Q. (1967)

Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 61, 142-145. (5)

28- CROSS, G.A.M. (1975)

Identification, purification and properties of clone specific glycoprotein antigens constituting the surface coat of Trypanosoma brucei.

Parasitology, 71, 393-417. (6,32,33,35,48,63)

29- CROSS, G.A.M. and JOHNSON, J.G. (1976)

In : The Biochemistry of Parasites and Host-Parasite Relationships (Van den Bossche H. Ed) The Host-Invader-Interplay, North-Holland, Amsterdam, pp. 413-420. (39)

30- CROSS, G.A.M. (1979)

Cross reacting determinants in the C-terminal region of trypanosome variant

surface antigens.

Nature, 277, 310-312. (35,39)

31- DEBUIRE, B., HAN, K.K., DAUTREVAUX, M., BISERTE, G., REGNOUF, F. and KASSAB, R. (1977)

Amino acid sequence of a cyanogen bromide fragment containing two tryptophanyl residues of lobster arginine kinase.

J. Biochem., 81, 611-619. (141)

32- DEMAILLE, J. (1979)

Communication personnelle. (143)

33- DOYEN, N. and LEPRESLE, C. (1979)

Partial non-cleavage by cyanogen bromide of a methionine-cystine bond from human serum albumine and bovine γ -lactalbumin.

Biochem. J., 177, 251-254. (69)

34- DOYLE, J.J., HIRUMI, H., HIRUMI, K., LUPTON, E.N., and CROSS, G.A.M. (1980)

Antigenic variation in clones of animal infective *Trypanosoma brucei* derived and maintained in vitro.

Parasitology, 80, 359-369. (11)

35- EDMAN, P. (1956)

On the mechanism of the phenylisothiocyanate degradation of peptides.

Acta Chem. Scand., 10, 761-768. (141)

36- EDMAN, P. (1970)

In : Molecular Biology Biochemistry and Biophysics, (Needleman S.B. Ed.) Springer Verlag New York, pp 211-255. (143)

37- FAUCONNET, M. and ROCHEMONT, J. (1978).

A single-column amino acid analysis method which resolves hexosamines and several cysteine derivatives.

Anal. Biochem., 91, 403-409. (133)

38- FOLCH, J., LEES, M. and SLOANE-STANLEY, G.H. (1957)

Isolation and purification of total lipids from tissues.

J. Biol. Chem., 226, 497-509. (106,108,137)

39- FONTANA, A. (1972)

Modifications of Tryptophan with BNPS-skatole.

Methods Enzymol., 23, 419-423. (66)

40- FRASCH, A.C.C., BERNARDS, A., VAN DER PLOEG, L.H.T., BORST, P., HOEIJMAKERS, J.H.J., VAN DEN BURG, J. and CROSS, G.A.M. (1980)

The genes for the variable surface glycoproteins of *Trypanosoma brucei*.

In : *The Biochemistry of Parasites and Host-Parasite Relationships* (Van den Bossche, H., Ed.) *the Host-Invader- Interplay*, North-Holland, Amsterdam, pp.235-239. (21)

41- FRASCH, A.C.C., BORST, P. and VAN DEN BURG, J. (1982)

Rapid evolution of genes coding for variant surface glycoproteins in trypanosomes.

Gene, 17, 197-211. (31)

42- CALL, 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 interchain disulfide bond.

Biochemistry, 7, 1973-1982. (138)

43- GRAY, A.R. (1964)

Immunology, 4, 253-261. (6)

44- GRAY, A.R. (1965)a

Antigenic variation in a strain of *Trypanosoma brucei* transmitted by *Glossina morsitans* and *Glossina palpalis*.

J. Gen. Microbiol., 41, 195-214. (6)

45- GRAY, A.R. (1965)b

Antigenic variation in clones of *Trypanosoma brucei*. Immunological relationships of the clones.

Ann. Trop. Med. Parasit., 59, 27-36. (6)

46- GRAY, A.R. (1967)

Some principles of the immunology of trypanosomiasis.

Bull. Org. Mond. Santé, 37, 177-193. (6)

47- GRAY, A.R. (1972)

Variable agglutinogenic antigens of *Trypanosoma gambiense* and their distribution among isolated of the trypanosoma collected in different places in Nigeria.

Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 66, 263-284. (6)

48- GRAY, A.R. (1975)

A pattern in the development of agglutinogenic antigens of cyclically transmitted isolates of *Trypanosoma gambiense*.

Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 69, 131-138. (6)

49- GRAY, A.R. and LUCKINS, A.G. (1976)

Antigenic variation in salivarian trypanosomes

In : *Biology of the Kinetoplastida* (LUMSDEN, W.H.R. and EVANS, D.A., Eds.) Academic Press, London, pp 493-542. (6)

50- GROSS, E. and WITKOP, B. (1961)

J. Am. Chem. Soc., 83, 1510-1511. (68,69)

51- HAGENFELDT, L. (1966)

Clin. Chim. Acta, 13, 266-268. (137)

52- HAJDUK, S. and VICKERMAN, K. (1981)a

Antigenic differentiation of *Trypanosoma brucei* : studies on metacyclic and first parasitemia populations.

Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 75, 145-146. (7)

53- HAJDUK, S.L., CAMERON, C., BARRY, J.D. and VICKERMAN, K. (1981)

Antigenic variation in cyclically transmitted *Trypanosoma brucei*. Variable antigen type composition of metacyclic trypanosome populations from the salivary glands of *Glossina morsitans*.

Parasitology, 83, 595-607. (8)

54- HAJDUCK, S.L., and VICKERMAN, K. (1981)b

Antigenic variation in cyclically transmitted *Trypanosoma brucei*. Variable antigen type composition of the first parasitemia in mice bitten by trypanosome-infected *Glossina morsitans*.

Parasitology, 83, 609-621. (11)

55- HASS, G.M., NAU, H., BIEMANN, K., GRAHN, D.T., ERICSSON, L.H., and NEURATH, H. (1975)

The amino acid sequence of a carboxypeptidase inhibitor from potatoes.

Biochemistry, 14, 1334-1342. (66)

56- 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. (147)

57- HIRS, C.H.W. (1967)

Determination of cystine as cysteic acid.

Methods Enzymol., 11, 59-62. (133)

58- HIRUMI, H., DOYLE, J.J., and HIRUMI, K., (1977)a

African trypanosomes : cultivation of animal infective *Trypanosoma brucei* in vitro.

Science, 196, 992-994. (11)

59- HIRUMI, H., DOYLE, J.J., and HIRUMI, K. (1977)b

Cultivation of bloodstream *Trypanosoma brucei*

Bull. Org. Mond. Santé, 55, 405-409. (11)

60- HOEIJMAKERS, J.H.J., BORST, P., VAN DEN BURG, J., WEISSMANN, C., and CROSS, G.A.M. (1980)a

The isolation of plasmides containing DNA complementary to messenger RNA for variant surface glycoproteins of *Trypanosoma brucei*.

Gene, 8, 391-417. (12,36)

61- HOEIJMAKERS, J.H.J., FRASCH, A.C.C., BERNARDS, A., BORST, P., and CROSS, G.A.M. (1980)b

Novel expression-linked copies of the genes for variant surface antigens in trypanosomes.

Nature, 284, 78-80. (21,22)

62- 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. (14,35,36,37,39)

63- HOLDER, A.A. (1983)a

Carbohydrate is linked through ethanolamine to the C-terminal amino acid of *T. brucei* variant surface glycoprotein.

Biochem. J., 209, 261-262. (39,100,102)

64- HOLDER, A.A. (1983)b

Characterization of the cross-reacting carbohydrate groups on two variant surface glycoproteins of *Trypanosoma brucei*.

Mol. Biochem. Parasitol., 7, 331-338. (115)

65- HOUMARD, J. and DRAPEAU, G. (1972)

Staphylococcal protease : a proteolytic enzyme specific for glutamyl bonds.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 3506-3509. (140)

66- HUDSON, K.M., TAYLOR, A.E.R. and ELCE, B.J. (1980)

Antigenic changes in *Trypanosoma brucei* on transmission by Tsetse fly.

Parasit. Immunol., 2, 57-69. (6)

67- HUNKAPILLER, M.W. and HOOD, L.E. (1978)

Direct microsequence analysis of polypeptides using an improved sequenator, a non protein carrier (polybrene), and high pressure liquid chromatography.

Biochemistry, 17, 2124-2133. (146)

68- INOKI, S. (1960)

Studies on antigenic variation in the Welcome strain of *Trypanosoma gambiense*
I. Improvements in technique.

Biken's J., 3, 215-222. (42)

69- ITAYA, K. and MICHIO, U. (1966)

A new micromethod for the colorimetric determination of inorganic phosphate

Clin. Chim. Acta, 14, 361-366. (61,102,135)

70- JENNI, L. (1977)a

Antigenic variants in cyclically transmitted strains of the *T. brucei* complex.

Ann. Soc. Belge Med. trop., 57, 383-386. (6,7)

71- JENNI, L. (1977)b

Comparisons of antigenic types of *Trypanosoma brucei* strains transmitted by
Glossina morsitans.

Acta tropica, 34, 35-39. (6,7)

72- JOHNSON, J.G., and CROSS, G.A.M. (1977)

Carbohydrate composition of variant specific surface antigen glycoproteins
from *Trypanosoma brucei*.

J. Protozool., 24, 587-591. (33,59,63)

73- 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. (146)

74- KLOTZ, I.M. (1967)

Succinylation.

Methods Enzymol., 11, 576-580. (138)

75- KOSINSKI, R.J. (1980)

Antigenic variation in trypanosomes : a computer analysis of variant order.

Parasitology, 80, 343-357. (10)

76- LABASTIE, M.C., BALTZ, T., RICHEL, C., GIROUD, C., 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. (35,113)

77- LAEMMLI, U.K. (1970)

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄.

Nature, 227, 680-681. (66,121)

78- 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. (45)

79- LAURENT, M., PAYS, E., MAGNUS, E., VAN MEIRVENNE, N. MATTHYSSENS, G., WILLIAMS, R.O. and STEINERT, M. (1983)

DNA rearrangments linked to expression of a predominant surface antigen gene of trypanosomes.

Nature, 302, 263-266. (29)

80- LENARD, J. and SINGER, S.J. (1966)

Succinylation of gamma globulin.

Nature, 210, 536-537. (101,130)

81- LE RAY, D., BARRY, J.D., EASTON, C. and VICKERMAN, K. (1977)

First Tsetse fly transmission of the "AnTat" serodeme of *Trypanosoma brucei*.

Ann. Soc. Belge. Med. Trop., 57, 369-373. (7)

82- LE RAY, D., BARRY, J.D., and VICKERMAN, K. (1978)

Antigenic heterogeneity of metacyclic forms of *Trypanosoma brucei*.

Nature, 273, 300-302. (7,11)

83- LEVY, M., FISCHMAN, L. and SCHENKEIN, I. (1970)

Mouse submaxillary gland proteases.

Methods Enzymol., 19, 672-681. (140)

84- LHEUREUX, M., LHEUREUX, M., VERVOORT, T., VAN MEIRVENNE, N.V., STEINERT, M. (1979)

Immunological purification and partial characterization of variant specific surface antigen messenger RNA of *Trypanosoma brucei brucei*.

Nucl. Acids Res., 7, 595-609. (12)

85- LINDLEY, H. (1956)

A new synthetic substrate for trypsin and its application to the determination of amino acid sequence of proteins.

Nature, 178, 647-648. (94)

86- LOURIE, E.N. and O'CONNOR, R.J. (1937)

Ann. Trop. Med. Parasit., 31, 319-340. (5)

87- LUDWIG, M.L. and HUNTER, M.J. (1956)

Aminidination.

Methods Enzymol., 11, 595-604. (94, 139)

88- LUMSDEN, W.H.R. (1967)

Trends in research on the immunology of trypanosomiasis.

Bull. Org. Mond. Santé, 37, 167-175. (42)

89- MAGNUS, E., VERVOORT, T. and VAN MEIRVENNE, N. (1982)

Serological cross-reaction among Trypanosome variable antigen isotype of the subgenus Trypanozon.

Ann. Soc. Belge Med. Trop., 62, 25-39. (30)

90- MAHONEY, W.C., and HERMODSON, M.A. (1979)

High-yield cleavage of tryptophanyl peptide bonds by O-iodosobenzoic acid.

Biochemistry, 18, 3810-3814. (66)

91- MAJIWA, P.A.O., YOUNG, J.R., ENGLUND, P.T., SHAPIRO, S.Z., and WILLIAMS, R.O. (1982)

Two distinct forms of surface antigen gene rearrangement in *Trypanosoma brucei*.

Nature, 297, 514-516. (21, 28)

- 92- MAJUMDER, H.J., BOOTHROYD, J.C. and WEBER, H. (1981)
Homologous 3' terminal regions of mRNAs for surface antigens of different antigenic variants of *Trypanosoma brucei*.
Nucl. Acids. Res., 9, 4745-4753. (13,14,20)
- 93- MATTHYSSENS, G., MICHIELS, F., HAMERS, R., PAYS, E. and STEINERT, M. (1981)
Two variant surface glycoproteins of *Trypanosoma brucei* have a conserved C-terminus.
Nature, 293, 230-233. (13,14,20,31)
- 94- Mc Connell, J., GURNETT, A.M., CORDINGLEY, J.S., WALDER, J.E., and TURNER, M.J. (1981)
Biosynthesis of *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein. Part I : synthesis size and processing of an N-terminal signal peptide.
Mol. Biochem. Parasitol., 4, 225-242. (20)
- 95- MICHELS, P.A.M., BERNARDS, A., VAND DER PLOEG, L.H.T., and BORST, P. (1982)
Characterization of the expression-linked gene copies of variant surface glycoprotein 118 in two independently isolated clones of *Trypanosoma brucei*.
Nucl. Acids Res., 10, 2353-2366. (22)
- 96- MILLER, E.N., and TURNER, M.J. (1981)
Analysis of antigenic types appearing in first relapse populations of clones of *Trypanosoma brucei*.
Parasitology, 82, 63-80. (10)
- 97- ONODERA, M., ROSEN, N.L., LIFTER, J., HOTEZ, P.J., BOGUCKI, M.S., DAVIS, G., PATTON, C.L., KONISBERG, W.H., and RICHARDS, F.F. (1981)
Trypanosoma congolense : surface glycoproteins of two early bloodstream variants. II. Purification and partial chemical characterization.
Exp. Parasit., 52, 427-439. (50)
- 98- OSAKI, I. (1959)
Studies on the immunological variation in *Trypanosoma gambiense* (serotypes

on the mode of relapse)

Biken's J., 2, 113-127. (5)

99- PAYS, E., DELRONCHE, M., VERVOOT, T., BLOCK, J., CANNON, F.,
and STEINERT, M. (1980)

Cloning and characterization of DNA sequences complementary to messenger
ribonucleic acids coding for the synthesis of two surface antigens of
Trypanosoma brucei.

Nucl. Acids Res., 8, 5965-5981. (12)

100- PAYS, E., VAN MEIRVENNE, N., LE RAY, D. and STEINERT, M.
(1981)a

Gene duplication and transposition linked to antigenic variation in
Trypanosoma brucei.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 2673-2677. (21,22)

101- PAYS, E., LHEUREUX, M. and STEINERT, M. (1981)b

Analysis of the DNA and RNA changes associated with the expression of
isotypic variant specific antigens of trypanosomes.

Nucl. Acids Res., 9, 4225-4238. (21,22,24,26,31)

102- PAYS, E., LHEUREUX, M. and STEINERT, M. (1981)c

The expression-linked copy of surface antigen gene in *Trypanosoma* is
probably the one transcribed.

Nature, 292, 365-367. (22)

103- PAYS, E., LHEUREUX, M., VERVOORT, T. and STEINERT, M. (1981)d

Conservation of a variant specific surface antigen gene in different
trypanosomes species and sub-species.

Mol. Biochem. Parasitol., 4, 349-357. (31)

104- PAYS, E., LHEUREUX, M. and STEINERT, M. (1982)

Structure and expression of *Trypanosoma brucei gambiense* variant specific
antigen gene.

Nucl. Acids Res., 10, 3149-3163. (24,31)

105- PAYS, E., DEBRECK, P., VAN ASSEL, S., BABIKER, E.A., LE RAY, D., VAN MEIRVENNE, M. and STEINERT, M. (1983)

Comparative analysis of a *Trypanosoma brucei gambiense* antigen gene family and its potential use in epidemiology of sleeping sickness.

Mol. Biochem. Parasitol., 7, 63-74. (31)

106- PENKE, B., FERENCZI, R. and KOWACS, K. (1974)

A new acid hydrolysis method for determining tryptophan in peptides and proteins.

Analytical Biochemistry, 60, 45-50. (133)

107- RATFERY, M.A. and COLE, R.D. (1977)

Reduction and aminoethylation of insulin.

Methods Enzymol., 47, 115-116. (139)

108- RAFTERY, M.A., and COLE, R.D. (1963)

Tryptic cleavage at cysteinyl peptide bonds.

Biochem. Biophys Res. Commun., 10, 467-471. (94)

109- REINHOLD, V.N. (1972)

Gas-liquid chromatographic analysis of constituent carbohydrate in glycoproteins.

Methods Enzymol., 25, 244-249. (134)

110- RENKONEN, O. (1969)

Determination of glycerol in phosphatides.

Biochem. Biophys. Acta, 56, 367-369. (106,137)

111- RICE-FICHT, A.C., CHEN, K.K., and DONELSON, J.E. (1981)

Sequence homologies near the C-termini of the variable surface glycoproteins of *Trypanosoma brucei*.

Nature, 294, 53-57. (13,14,17,20)

112- RITZ, M. (1916)

Mitteilung arch. F. Schiffs. U. Trop. Hyg., 20, 387-420. (5)

113- ROSEMBLATT, M.S., MARGOLIES, M.N., CANNON, L.E. and HABER, E. (1975)

Peptides : an analytical method for their resolution by polyacrylamide gel electrophoresis applicable to a wide range of sizes and solubilities.

Ann. Biochem., 65, 321-330. (126)

114- ROSNER, L. (1940)

The reaction between iodo acetamic acid and denatured egg albumin.

J. Biol. Chem., 132, 657-661. (138)

115- ROVIS, L., and DUBE, D.K. (1981)

Studies on the biosynthesis of the variant surface glycoprotein of *T. brucei* : sequence of glycosylation.

Mol. Biochem. Parasitol., 4, 77-93. (36,37,48)

116- SCHROEDER, W.A., SHELTON, J.B. and SHELTON, J.R. (1969)

An examination of conditions for the cleavage of polypeptide chains with cyanogen bromide : application to catalase.

Arch. Biochem. Biophys., 130, 551-556. (68,69)

117- SEED, J.R., KEMP, W.M. and BROWN, R.A. (1977)

Antigenic variation in the african trypanosomes : number and sequence.

In : Symposium on Experimental Parasitology of Host Parasite Interfaces. Texas,

J. Sci. Special. Publ. n°2, pp1.13. (10)

118- SEED, J.R. (1978)

Competition among serologically different clones of *Trypanosoma brucei gambiense* in vivo.

J. Protozool., 25, 526-529. (10)

119- SPECTOR, R. (1978)

Refinement of the coomassie blue method of protein quantitation.

Anal. Biochem., 86, 142-146. (135)

120- STEERS, E., CRAVEN, G.R. and ANFINSEN, C.B. (1965)

Evidence for non identical chains in the beta galactosidase of *Escherichia coli*

K 12.

J. Biol. Chem., 240, 2478-2484. (66,141)

121- STRICKLER, J.E. and PATTON, C.L. (1980)

Trypanosoma brucei brucei : inhibition of glycosylation of the major variable surface coat glycoprotein by tunicamycin.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 3, 1529-1533. (36)

122- VAN DER PLOEG, L.H.T., BERNARDS, A., RIJSEWIJK, F.A.M. and BORST, P. (1982)a

Characterization of the DNA duplication-transposition that controls the expression of two genes for variant surface glycoproteins in Trypanosoma brucei.

Nucl. Acids Res., 10, 593-609. (24,26)

123- VAN DER PLOEG, L.H.T., LIU, A.Y.C., MICHELS, P.A.M., DE LANGE, T., BORST, P., MAJUMBER, H.K., WEBER, H., VEENEMAN, G.H., and VAN BOOM, J. (1982)b

RNA splicing is required to make the messenger RNA for a variant surface antigen in trypanosomes.

Nucl. Acids Res., 10, 3591-3604. (24)

124- VAN MEIRVENNE, N., JANSSENS, P.G., and MAGNUS, E., (1975)a

Antigenic variation in syringe passaged populations of Trypanosoma (Trypanozoon) brucei. I. Rationalization of the experimental approach.

Ann. Soc. Belge. Med. Trop., 55, 1-23. (7,8,11)

125- VAN MEIRVENNE, N., JANSSENS, P.G., MAGNUS, E., LUMSDEN, W.H.R., and HERBERT, W.J. (1975)b

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. (8)

126- VAN MEIRVENNE, N., MAGNUS, E. and VERVOORT, T. (1977)

Comparisons of variable antigenic types produced by Trypanosome strains of the sub-genus trypanozoon.

Ann. Soc. Belge Med. Trop., 57, 409-423. (8,30)

127- VERVOORT, T., BARBET, A.F., MUSOKE, A.J., MAGNUS, E., MPLIMBAZA, G. and VAN MEIRVENNE, N. (1981)

Isotypic surface glycoproteins of trypanosomes.

Immunology, 44, 223-232. (30)

128- 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. (4,6)

129- WEINTRAUB, H. and GROUDINE, M. (1976)

Chromosomal subunit in active genes have an altered conformation.

Science, 193, 848-856. (22)

130- WILLIAMS, R.O., MARCU, K.B., YOUNG, J.R., ROVIS, L., and WILLIAMS, J.C. (1978).

A characterization of mRNA activities and their sequence complexities in *Trypanosoma brucei* : partial purification and properties of the VSSA mRNA.

Nucl. Acids Res., 5, 3171-3182. (12)

131- WILLIAMS, R.O., YOUNG, J.R. and MAJIWA, P.A.O. (1979)

Genomic rearrangements correlated with antigenic variation in *Trypanosoma brucei*.

Nature, 282, 847-849. (12,21,28)

132- WILLIAMS, R.O., YOUNG, J.R., MAJIWA, P.A.O., DOYLE, J.J. and SHAPIRO, S.Z. (1980)

Am. J. Trop. Med. Hyg., 29 (5), 1037-1043. (28)

133- 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. (5)

134- ZIEGENHORN, J. (1975)

Improved method for enzymatic determination of serum triglycerides.

Clin. Chem., 21, 1617-1629. (137)

Cette thèse a été
imprimée sur offset

par

Le Service Polycopie de
L'ASSOCIATION CORPORATIVE DES
ETUDIANTS EN MEDECINE DE LILLE

HUET-DUVILLIER Guillemette

**ÉTUDE STRUCTURALE D'UN ANTIGÈNE
VARIABLE DE *TRYPANOSOMA EQUIPERDUM***

THÈSE de Docteur de 3ème Cycle
spécialité : Biochimie - LILLE I - 1983 - N°

Cadre de classement :

Mots-clefs : Trypanosomes africains
Glycoprotéine spécifique de variant

RÉSUMÉ DE LA THÈSE

Les trypanosomes de la section Salivaria ont la propriété d'échapper à la réponse immunitaire de leurs hôtes grâce au mécanisme particulier de la «variation antigénique». La spécificité antigénique de chaque trypanosome sanguicole est uniquement déterminée par la structure du constituant du manteau de surface parasitaire.

L'étude chimique d'un antigène variable de *T. equiperdum* a permis de définir son caractère de lipophosphoglycoprotéine et aussi de mettre en évidence la présence d'éléments structuraux originaux tels qu'éthanolamine et glycérol, probablement impliqués au niveau des liaisons entre glycolipide et glycoprotéine.

Les antigènes variables purifiés, même issus d'espèce différente, peuvent présenter des caractéristiques structurales communes responsables d'une réactivité immunologique croisée. L'approche structurale objet de ce travail a permis dans cette optique de distinguer au niveau moléculaire deux domaines, l'un impliqué dans la spécificité stricte de l'antigène du variant, l'autre dans l'immunologie croisée dont la localisation est vraisemblablement le site d'insertion membranaire de l'AVS.

JURY

Président : M. MONTREUIL
Rapporteur : M. DEGAND
Membres : M. BISERTE
M. LE RAY
M. TAILLIEZ