

50376  
1984  
207

50376  
1984  
207

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

---

Année 1984

N° d'ordre 1223

## THÈSE

présentée à l'Université de Lille I

pour l'obtention du titre de

**DOCTEUR DE 3ème CYCLE**

**spécialité : BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES**

par

**Isabelle DIRAT**



# LES ANTIGÈNES VARIABLES DE TRYPANOSOMES

Présentée le 22 novembre 1984 devant la commission d'Examen

## JURY

Président : Monsieur PORCHET  
Rapporteur : Monsieur DEGAND  
Examineurs : Monsieur BOERSMA  
Monsieur DHAINAUT

DOYENS HONORAIRES DE L'ANCIENNE FACULTE DES SCIENCES

MM. 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, DECUYPER, DEHEUVELS, DEHORS, DION, FAUVEL, FLEURY, P. GERMAIN, GLACET, CONTIER, KOURGANOFF, LAMOTTE, LASSERRE, LELONG, Mme LELONG, LHOMME, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET, MICHEL, PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUELLE, SCHILTZ, SAVARD, ZAMANSKI.

PROFESSEUR EMERITE

M. A. LEBRUN.

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

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

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES  
DE LILLE

M. J. CORTOIS.

PROFESSEURS - CLASSE EXCEPTIONNELLE

M. CONSTANT Eugène	Electronique
M. FOURET René	Physique du Solide
M. GABILLARD Robert	Electronique
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 - 1<sup>ère</sup> 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. BOUGHON Pierre	Algèbre
M. BOURIQUET Robert	Biologie Végétale
M. BREZINSKI Claude	Analyse numérique
M. CELET Paul	Géologie générale
M. CHAMLEY Hervé	Géotechnique
M. COEURE Gérard	Analyse
M. CORDONNIER Vincent	Informatique
M. DEBOURSE Jean Pierre	Gestion des entreprises
M. DYMENT Arthur	Mécanique
M. ESCAIG Bertrand	Physique du solide
M. FAURE Robert	Mécanique
M. FOCT Jacques	Métallurgie
M. GRANELLE Jean Jacques	Sciences Economiques
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. MIGNOT Fulbert	Analyse numérique
M. PAQUET Jacques	Géologie générale
M. PROUVOST Jean	Minéralogie
M. ROUSSEAU Jean-Paul	Physiologie animale
M. SALMER Georges	Electronique
M. SEGUIER Guy	Electrotechnique
M. SIMON Michel	Sociologie
M. STANKIEWICZ François	Sciences économiques
M. TILLIEU Jacques	Physique théorique
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. ZEYTOUNIAN Radyadour	Mécanique

PROFESSEURS - 2ème Classe

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. BOSCOQ Denis	Probabilités
M. BRASSELET Jean-Paul	Géométrie et topologie

M. BRUYELLE Pierre	Géographie
M. CAPURON Alfred	Biologie animale
M. CARREZ Christian	Informatique
M. CAYATTE Jean-Louis	Sciences économiques
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. CROSNIER Yves	Electronique
M. CURGY Jean-Jacques	Biologie
Mle DACHARRY Monique	Géographie
M. DAUCHET Max	Informatique
M. DEBRABANT Pierre	Géologie appliquée
M. DEGAUQUE Pierre	Electronique
M. DELORME Pierre	Physiologie animale
M. DELORME Robert	Sciences économiques
M. DE MASSON D'AUTUME Antoine	Sciences économiques
M. DEMUNTER Paul	Sociologie
M. DENEL Jacques	Informatique
M. DE PARIS Jean-Claude	Analyse
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. DUPONT Christophe	Vie de la firme (I.P.A.)
M. FAKIR Sabah	Algèbre
M. FONTAINE Hubert	Dynamique des cristaux
M. FOUQUART Yves	Optique atmosphérique
M. FRONTIER Serge	Ecologie numérique
M. GAMBLIN André	Géographie urbaine, industrielle et démographi-
M. GLORIEUX Pierre	Physique moléculaire et rayonnements atmosphé- riques
M. GOBLOT Rémi	Algèbre
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. GOUDMAND Pierre	Chimie physique
M. GREGORY Pierre	I.P.A.
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. JACOB Gérard	Informatique
M. JACOB Pierre	Probabilités et statistiques
M. JACQUILLAT Bertrand	Gestion
M. JEAN Raymond	Biologie des populations végétales
M. JOFFRE Patrick	Vie de la firme (I.P.A.)
M. JOURNEL Gérard	Spectroscopie hertzienne

M. KREMBEL Jean	Biochimie
M. LANGRAND Claude	Probabilités et statistiques
M. LATTEUX Michel	Informatique
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. LE MAROIS Henri	Vie de la firme (I.P.A.)
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. MAIZIERES Christian	Automatique
M. MESSELYN Jean	Physique atomique et moléculaire
M. MESSERLIN Patrick	Sciences économiques
M. MONTEL Marc	Physique du solide
Mme MOUNIER Yvonne	Physiologie des structures contractiles
Mme N'GUYEN VAN CHI Régine	Géographie
M. PARSY Fernand	Mécanique
M. PASZKOWSKI Stéphan	Analyse numérique
Mlle PAUPARDIN Colette	Biologie physiologie végétales
M. PERROT Pierre	Chimie appliquée
M. PERTUZON Emile	Physiologie animale
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. ROBINET Jean-Claude	E.U.D.I.L.
M. ROGALSKI Marc	Analyse
M. ROY Jean-Claude	Psychophysiologie
M. SCHAMPS Joël	Spectroscopie moléculaire
Mme SCHWARZBACH Yvette	Géométrie
M. SLIWA Henri	Chimie organique
M. SOMME Jean	Géographie
Mlle SPIK Geneviève	Biochimie
M. STAROSWIECKI Marcel	Informatique
M. STERBOUL François	Informatique
M. TAILLIEZ Roger	Génie alimentaire
Mme TJOTTA Jacqueline	Mathématiques
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	Génétique
M. WALLART Francis	Spectrochimie infrarouge et Raman
M. WARTEL Michel	Chimie inorganique
M. WATERLOT Michel	Géologie générale
Mme ZINN Justin Nicole	Algèbre

**Tomi Claire, je te dédie cette thèse, pour le soutien que tu m'as apporté  
durant toutes ces longues années d'études.**

Ce travail a été réalisé dans le laboratoire de l'Unité des protéines (Unité INSERM N° 16) dirigée par Monsieur le Professeur P. ROUSSEL à qui j'exprime toute ma reconnaissance pour m'avoir accueillie dans son groupe.

Que Monsieur le Professeur P.M. DEGAND qui m'a si bien encadrée et guidée au cours de ce travail, veuille accepter toute ma gratitude.

Je tiens à remercier toutes les personnalités du Jury d'avoir bien voulu juger ce mémoire.

Je remercie également tous les membres de l'équipe pour l'aide précieuse qu'ils ont apporté pour la réalisation de ce travail.

Je tiens particulièrement à remercier :

Monsieur T. BALTZ et tous les membres de l'équipe de Monsieur le Professeur PAUTRIZEL, pour nous avoir fourni le matériel nécessaire à cette étude.

Monsieur J.P. AUBERT, chargé de Recherches INSERM (Unité N° 124), pour la réalisation des études en dichroïsme circulaire et du programme informatique d'étude conformationnelle des protéines.

Monsieur NOUVELOT, Maître-Assistant de l'Université de Lille I, pour avoir réalisé l'analyse des acides gras.

Ce mémoire a été dactylographié par Mademoiselle MILLEVILLE, à qui j'exprime mes très sincères remerciements.

Nos recherches ont bénéficié d'une aide financière de l'INSERM et d'une aide de la CCE sous programme "Médecine, Santé et Nutrition dans les zones tropicales".

Nous avons bénéficié d'une bourse du gouvernement Congolais pendant la durée de ce travail.



## ABREVIATIONS UTILISEES DANS LE TEXTE

AnTat	Anvers Trypanozoon antigenic-type
AVS	Antigène spécifique de variant
BoTat	Bordeaux Trypanozoon antigenic-type
BrCN	Bromure de cyanogène
DMAA	Diméthylallylamine
HFBA	Acide heptafluorobutyrique
HPLC	Chromatographie liquide haute performance
IITat	International Laboratory for Research on Animal diseases (ILRAD) Trypanozoon antigenic type.
pHi	Point isoélectrique
PITC	Phénylisothiocyanate
PTH	Phénylthiohydantoïne
TFA	Acide trifluoroacétique
TxTat	Texas Trypanozoon antigenic-type
SDS	Sodium dodécyl sulfate.
VSG	Glycoprotéine spécifique de variant

## INTRODUCTION

### GENERALITES

I-	<u>Classification des trypanosomes</u>	2
II-	<u>Aspects morphologiques - Eléments biochimiques</u>	4
III-	<u>Polymorphisme</u>	6
IV-	<u>Epidémiologie</u>	7
	A. <u>Trypanosomiase américaine</u>	9
	B. <u>Trypanosomiase africaine</u>	9
V-	<u>Cycle évolutif</u>	12
	A. <u>Trypanosomes américains</u>	12
	B. <u>Trypanosomes africains</u>	12
	1- Agents vecteurs	12
	2- Cycle	13
	3- Evolution morphologique au cours du cycle	15
	a) Mitochondrion et respiration du parasite	15
	b) Solution cyclique et existence du manteau cellulaire	17
VI-	<u>Etude des antigènes variables</u>	18
	A. <u>Localisation</u>	19
	B. <u>Aspects immunologiques</u>	19
	1- Etude du phénomène de variation antigénique	19
	2- Rôle des anticorps dans la variation antigénique	21
	C. <u>Aspects biochimiques</u>	22
	1- Isolement	22
	2- Caractéristiques physico-chimiques	23

3-	Structure des AVS de <i>Trypanosoma brucei brucei</i>	25
a)	L'axe peptidique	25
	* Existence d'une extension C-terminale hydrophobe	26
	* Homologie des régions C terminales des AVS	28
b)	La copule glucidique	31
c)	Immunité croisée et immunité spécifique	31
4-	Glycosylation des AVS	34
5-	Organisation moléculaire du manteau	35
VII-	<u>Bases génétiques de la variation antigénique</u>	37
A.	Organisation des gènes codant pour les AVS	37
B.	Mécanisme d'expression des gènes	
1-	Premier mécanisme : la duplication-transposition	38
a)	L'ELC est un gène actif	38
b)	Analyse du site d'expression	38
c)	Mécanisme de transposition	39
2-	Deuxième mécanisme : expression des gènes non liée à la production d'une "copie" liée à l'expression	40
3-	Troisième mécanisme : la conversion des gènes entre différents membres d'une même famille de gènes	45

## TRAVAUX PERSONNELS

### ETUDE DE BOTAT-1

	<u>Introduction</u>	45
I-	<u>Préparation des AVS</u>	45
A.	Clonage des populations antigéniques	47
B.	Infestation des rats	47
C.	Isolement des trypanosomes	47
D.	Libération du manteau de surface	48
E.	Purification des AVS	48

II- <u>Caractéristiques physico-chimiques</u>	49
A. Masse moléculaire	49
B. Point isoélectrique et structure secondaire	49
C. Composition amino-acide	49
D. Composition glucidique	52
E. Dosage du phosphore	52
III- <u>Etude de l'axe peptidique</u>	56
Clivage de la glycoprotéine par le BrCN	56
1- Principe de la réaction	57
2- Résultats	57
a) Composition amino-acide	61
b) Séquence amino-acide	61
IV- <u>Etude de la copule glucidique</u>	61
Résultats analytiques	61
A. Composition glucidique	61
B. Etude en électrophorèse d'affinité avec la concanavaline A	65
C. Sites de glycosylation	67
1- Glycosylation N-terminale	67
2- Etude de la glycosylation C-terminale	69
a) Obtention du glycopeptide C-terminal	69
* composition amino-acide	69
* composition glucidique	69
* teneur en phosphore	69
* dosage du glycérol	73
* caractérisation des acides gras	73
* conclusion	75
b) Etude des sites de glycosylation C-terminaux	75
* préparation et étude biochimique	75
* étude immunologique	78

V-	<u>Reconstitution moléculaire de l'AVS BoTat-1 à partir des fragments BrCN</u>	79
VI-	<u>Etude de la conformation de l'AVS BoTat-1 par la méthode de Chou et Fasman</u>	80
A.	<u>Description</u>	80
1-	Recherche des structures hélicoïdales	82
2-	Recherche des structures en feuillets plissés	85
3-	Recherche des coudes $\beta$	85
B.	<u>Conformation des fragments BrCN de l'AVS BoTat-1</u>	86

ETUDE COMPARATIVE DE BOTAT-1 VIS A VIS D'AUTRES AVS DE T. EQUIPERDUM 86

1-	Masse moléculaire et point isoélectrique	89
2-	Structure secondaire	92
3-	Composition amino-acide	95
4-	Composition glucidique	95
5-	Teneur en phosphore et en glycérol	95
6-	Etude des acides gras	98
7-	Conclusion	98

ETUDE COMPARATIVE VIS A VIS DES AVS DE T. B. BRUCEI 101

1-	Point isoélectrique	101
2-	Composition amino-acide	101
3-	Composition glucidique	101
4-	Caractérisation de l'éthanolamine	104
5-	Conformation des AVS de T. b. brucei par la méthode de Chou et Fasman à partir des séquences complètes publiées.	104
6-	Conclusion	106

<u>ETUDE COMPARATIVE VIS A VIS DES AVS DE T. CONGOLENE</u>	106
1- Point isoélectrique	106
2- Composition amino-acide	106
3- Etude de la copule glucidique	106
a) analyse quantitative	108
b) analyse qualitative	108
4- Conclusion	109
<u>CONCLUSION GENERALE</u>	110
<u>APPENDICE TECHNIQUE</u>	112
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	142

## INTRODUCTION

Les parasitoses représentent un des grands problèmes humains de notre temps. Elles sévissent plus particulièrement dans les pays du tiers-monde, où leurs manifestations cliniques revêtent un caractère grave qui a suscité l'intérêt des grands organismes internationaux tels que l'Organisation Mondiale de la Santé et provoqué la mise en oeuvre de vastes programmes de recherche tant biologiques que fondamentaux.

Nous nous sommes intéressés au cas très spécifique des trypanosomiasés africaines, qui touchent autant l'homme que le bétail. Elles posent de ce fait, de graves problèmes de santé publique. D'autre part, elles ont un impact négatif sur le développement socio-économique des pays concernés.

Les échecs enregistrés dans la lutte contre les trypanosomiasés africaines s'expliquent par trois points essentiels :

- la limite de la chimioprophylaxie et de la chimiothérapie de ces maladies, due à une toxicité des trypanocides actuellement utilisés.

- la lutte contre l'insecte vecteur se heurte à l'apparition d'espèces mutantes résistantes aux insecticides.

- la potentialité qu'ont les trypanosomes africains d'échapper au système immunitaire de l'hôte grâce à la variation antigénique, rendant ainsi impossible toute vaccination.

Les mécanismes qui régissent ce phénomène biologique sont encore mal élucidés. La solution aux problèmes que nous venons d'évoquer, viendra d'une meilleure connaissance de ces mécanismes.

Notre participation à cette recherche s'inscrit dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire d'Immunologie et de Biologie Parasitaire de Bordeaux. Notre travail a porté sur l'étude des antigènes variables de T. equiperdum, espèce non pathogène pour l'homme.

Ce modèle autorise l'extrapolation. Enfin, ce mémoire résume les apports de la littérature, ce qui nous a conduit à une synthèse de l'état des connaissances de ce phénomène si original qu'est la variation antigénique.

## I- Classification des trypanosomes

Dans le domaine de la biologie animale, les parasitoses occupent une place privilégiée. Parmi les parasites sanguicoles, le trypanosome constitue un exemple typique. Vouloir situer ce protozoaire est chose délicate. Aussi, nous ferons appel à la nouvelle classification établie en 1980 par la "Society of Protozoologists" (109) qui distingue 7 phyllums : Sarcomastigophora, Labyrinthomorpha, Apicomplexa, Microspora, Ascetospora, Myxospora, Ciliophora.

Dans cette classification, les trypanosomes, sont répertoriés dans le premier phyllum et leur définition est la suivante :

Phyllum 1	Sarcomastigophora
sous-Phyllum 1	Mastigophora
Classe 2	Zoomastigophora
Ordre 2	Kinétoplastida
sous-Ordre 2	Trypanosomatina

Le sous-ordre Trypanosomatina comporte 3 genres : Blastocrithidia, Leishmania, et Trypanosoma. HOARE en 1966 (77) ; puis en 1972 (78) a proposé de répertorier les parasites du genre Trypanosoma qui affectent spécifiquement les mammifères.

Leur situation respective est présentée sous forme d'un tableau (Tableau 1) qui objective en particulier la place du sous-genre Trypanozoon ou les différentes espèces ou sous-espèces qui en dépendent.



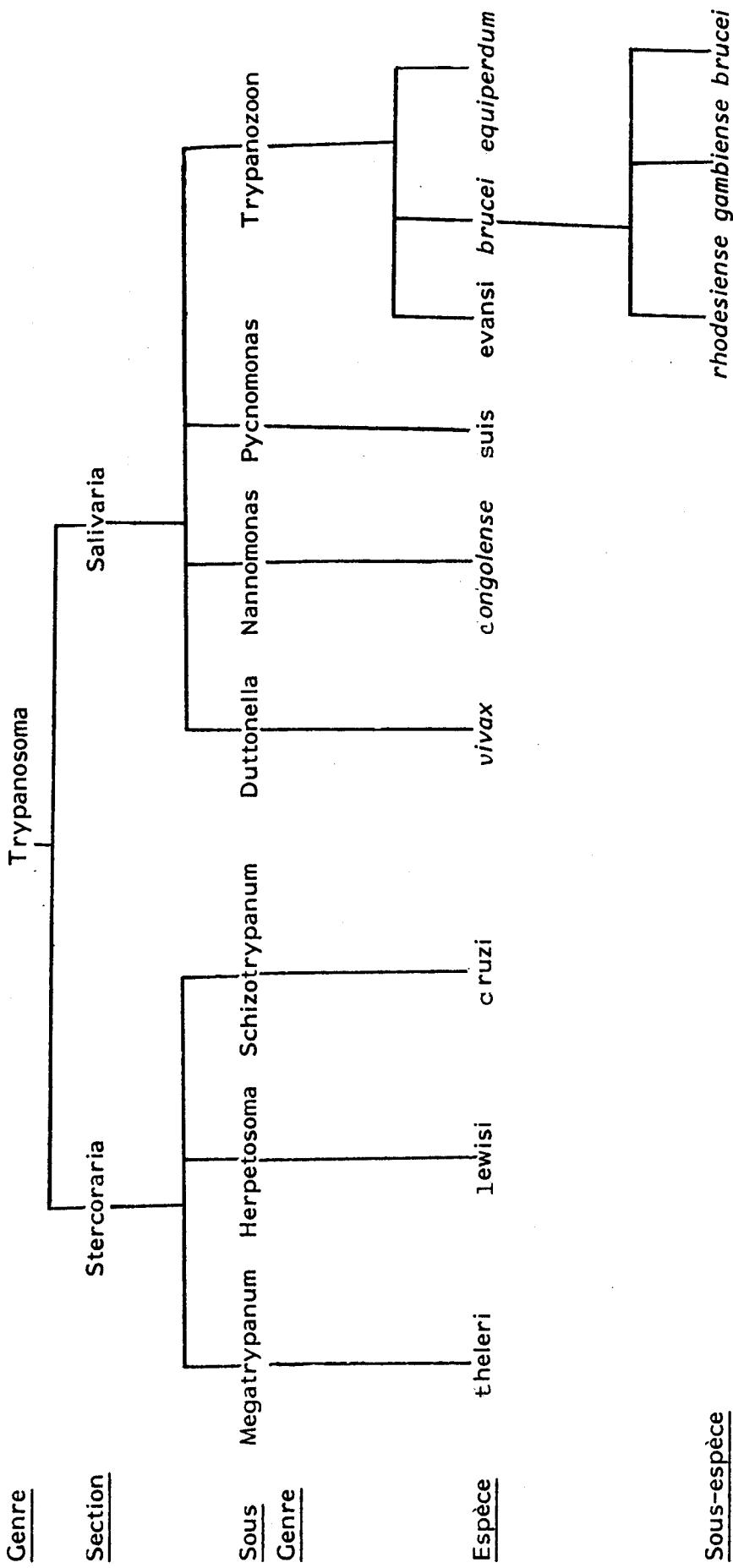


TABLEAU 1 : Schéma simplifié de la classification

des Trypanosomes d'après HOARE ( 1966 ; 1972 )

( en italique les parasites pour lesquels le phénomène de la variation antigénique a été démontré ).

## II- Aspects morphologiques - Eléments biochimiques

Les trypanosomes sont des parasites fusiformes mesurant 15 à 20  $\mu\text{m}$  de long sur 2 à 3  $\mu\text{m}$  de large (figure 1). Ils sont limités par une membrane plasmique qui est recouverte d'un manteau de surface de 12 à 15 nm d'épaisseur, exclusivement à certains stades du cycle évolutif des trypanosomes de la section Salivaria. Une caractéristique frappante est l'existence d'un flagelle qui reste attaché à la cellule et devient libre à son pôle antérieur. Sous la membrane plasmique s'étendent des microtubules liés les uns aux autres par de fins ponts latéraux. Le cytoplasme est très riche en ribosomes. A la base de la poche flagellaire se trouvent deux corps basaux (de structure centriolaire) à proximité desquels se trouve le kinétoplaste. Celui-ci est situé dans une expansion capsulaire de l'appareil mitochondrial qui est en fait un unique mitochondrion. Entre autre, l'on distingue un noyau arrondi avec un nucléole à son centre et des petites masses périphériques qui représentent probablement du matériel chromosomique. La membrane externe du noyau est continue avec le réticulum endoplasmique granulaire. Le réticulum endoplasmique lisse se trouve à proximité de la poche flagellaire. L'appareil de Golgi possède une extrémité proximale sous-tendue par un fragment de réticulum endoplasmique granulaire et à son extrémité distale s'étendent des vésicules et corps vésiculaires. Enfin, le cytoplasme contient des organites particuliers, les glycosomes.

A ces aspects morphologiques vient s'ajouter une connaissance parfaitement précise de certains de ces éléments. Nous donnerons d'une manière sommaire les résultats des dix dernières années qui ont permis une meilleure connaissance : de la membrane plasmique, du kinétoplaste et des organites intracytoplasmiques tels que les glycosomes.

HUNT et ELLAR (1974) (87) ont isolé une fraction de membrane plasmique d'un trypanosomatidé : Leptomonas Collosoma. L'étude de sa composition chimique montre qu'elle contient 52 % de protéines, 29 % de lipides et 8 % de glucides. Les glucides caractérisés sont des oses neutres dont le mannose, le glucose, le galactose et le xylose. La partie lipidique est principalement composée de phospholipides représentés en majeure partie par la phosphoéthanolamine, la phosphatidylcholine et un stérol identifié comme étant de l'ergostérol. Mais chez Trypanosoma brucei brucei, le stérol majeur est le cholestérol (DIXON et coll. (1972) (45)) et le rapport cholestérol phospholipides est très élevé comparativement aux autres cellules eucaryotes

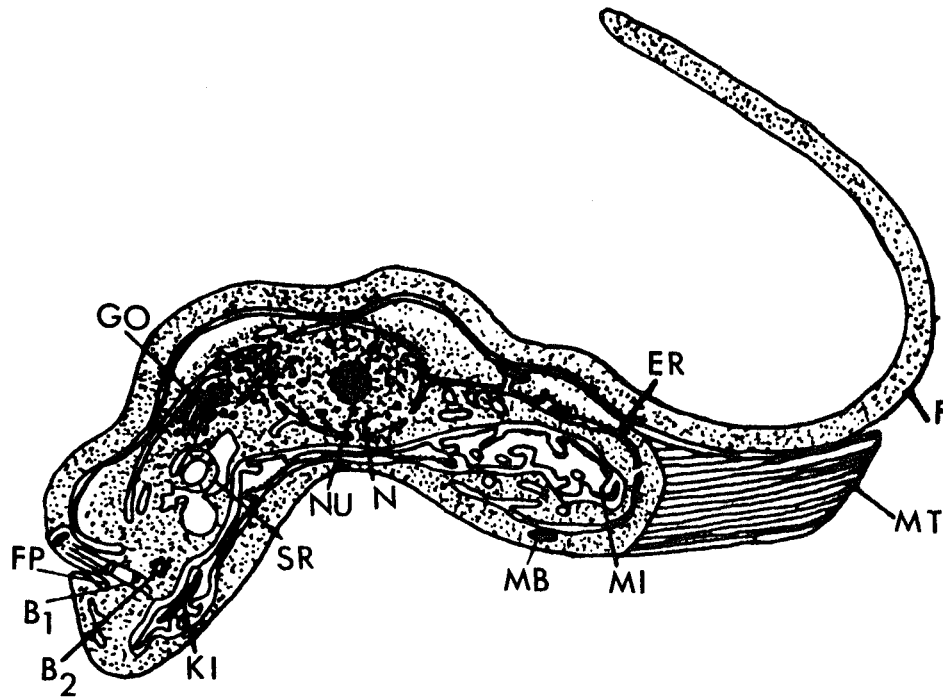


Figure 1 : Morphologie générale d'un trypanosome

- N noyau
- NU nucléole
- SR réticulum endoplasmique lisse
- MI mitochondrion
- GO appareil de golgi
- ER réticulum endoplasmique granulaire
- KI kinétoplaste
- FP poche flagellaire
- B<sub>1</sub>
- B<sub>2</sub> corps basaux
- MT microtubule
- MB glycosomes
- F flagelles

(GREEN (1977) (65) ; VOORHEIS et coll. (1979) (164)). D'autre part DIXON et coll. (1972) (45) ont observé des différences dans la composition lipidique de la membrane plasmique selon que le parasite se trouve dans le sang de l'hôte ou dans un milieu de culture. Ainsi la sphingomyéline qui représente 23 % des phospholipides membranaires des formes sanguicoles de T. b. brucei est réduite à 5 % dans les formes de culture.

Le kinétoplaste qui donne le nom à l'ordre auquel appartiennent les trypanosomes, a fait l'objet de plusieurs études qui ont été revues par ENGLUND et coll. (1982) (50). En effet, le kinétoplaste est un réseau constitué de milliers de cercles de DNA qui sont de deux types : les maxicercles et les minicercles. Il peut renfermer 10 à 25 % du DNA cellulaire total. Les minicercles représentent 95 % de la masse du réseau et le reste est constitué de maxicercles. Les maxicercles portent des gènes identiques à ceux que l'on trouve au sein du DNA mitochondrial des autres cellules eucaryotes. Cependant, le rôle des minicercles et la raison d'être de la structure en réseau demeurent inconnus.

Les trypanosomes présentent une autre particularité qui est la présence dans leur cytoplasme d'organites contenant les enzymes de la glycolyse : les glycosomes. Ils ont été mis en évidence par OPPERDOES et BORST (1977) (121). Récemment, des travaux d'OPPERDOES et coll. (revus par BORST et coll. (1983) (23)) ont montré que ces organites contenaient également des enzymes de l'oxydation des acides gras et de la biosynthèse du plasmalogène. L'ensemble de ces propriétés les relie à la famille des peroxysomes-glyoxysomes, mais l'isolement de la glycolyse à l'intérieur d'un organite cellulaire semble être spécifique de l'ordre Kinétoplastida.

### III- Polymorphisme

Si l'ensemble des protozoaires appartenant au sous-ordre Trypanosomatina répond à la définition morphologique générale que nous venons de voir, chacun des flagellés constitutifs du sous-ordre Trypanosomatina s'individualise par une variété polymorphique caractérisée par exemple par la taille du flagelle et/ou par la position de l'ensemble kinétoplastique.

Ce polymorphisme constitutif peut être considéré comme une exigence liée par exemple à la forme du parasitisme chez l'hôte ou au cycle évolutif à

proprement parlé du parasite. A titre d'exemple et en faisant référence aux travaux de HOARE et WALLACE en 1966 (77), nous illustrerons différentes formes ou stades d'une variété de flagellés appartenant à ce sous-ordre Trypanosomatina.

- Forme amastigote ou Leishmania : c'est une forme intracellulaire, elle est de petite taille et présente une racine flagellaire intracytoplasmique
- Forme choanomastigote : de petite taille possède une collerette d'où émerge un flagelle
- Forme promastigote ou Leptomonas : dont le kinétoplaste est situé en avant du noyau.
- Forme opisthomastigote ou Herpetomonas : présente une longue poche flagellaire, la base du flagelle est située en arrière du noyau
- Forme épimastigote ou Crithidia : possède une membrane ondulante très réduite et le kinétoplaste est près du noyau
- Forme trypomastigote ou Trypanosoma : c'est une forme dont le kinétoplaste est situé dans la partie postérieure. Le flagelle contourne la cellule formant avec celle-ci une membrane ondulante, puis redevient libre à son extrémité antérieure.

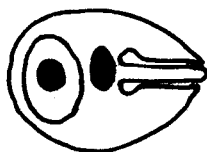
L'on peut retenir que l'importance relative de la taille, du flagelle, du volume et de la situation du noyau, de l'existence ou non d'une membrane ondulante, sont autant d'éléments de classification.

La figure 2 objective par la progression du flagelle et de la membrane ondulante "la finalité morphologique". La forme amastigote ou Leishmania est pratiquement dépourvue de structure adaptée à la mobilité : ce sont des formes intracellulaires du parasite et à l'opposé des formes sanguicoles illustrées par le stade trypomastigote ou Trypanosoma.

#### IV- Epidémiologie

Les trypanosomiasés sont encore aujourd'hui des affections parasitaires largement répandues. Elles affectent un très grand nombre de mammifères et leur expression sémiologique pourra être très différente selon l'hôte définitif contaminé. Dans ce mémoire, nous nous limiterons volontairement à un descriptif des données épidémiologiques en rapport avec une expression pathogène chez l'homme. Fonction de leur localisation géographique, deux

1- Forme amastigote ou  
Leishmania



2- Forme choanomastigote



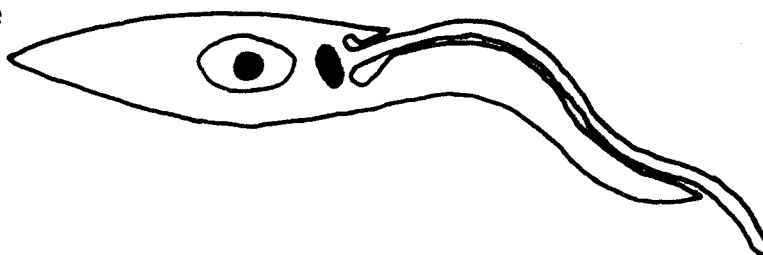
3- Forme promastigote  
ou Leptomonas



4- Forme opisthomasti-  
gote ou Herpétomo-  
nas



5- Forme épimastigote  
ou Crithidia



6- Forme trypomastigote  
ou Trypanosoma

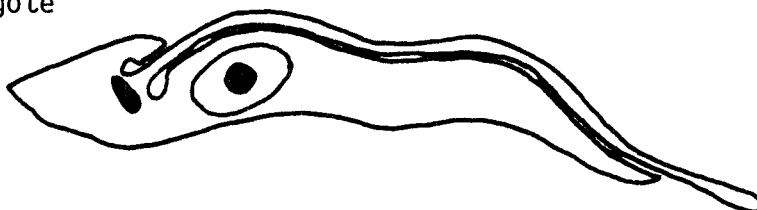


FIGURE 2

DIFFERENTES FORMES OBSERVEES DANS LE SOUS-ORDRE TRYPANOSOMATINA

affections parasitaires seront distinguées :

La trypanosomiase américaine ou la maladie de Chagas

La trypanosomiase africaine ou la maladie du sommeil

Ces deux affections sont représentatives de l'évolution d'une parasitose différente par l'agent vecteur, par son mode de transmission, par ses caractéristiques épidémiologiques et enfin par l'expression clinique qui s'y attache. On distinguera :

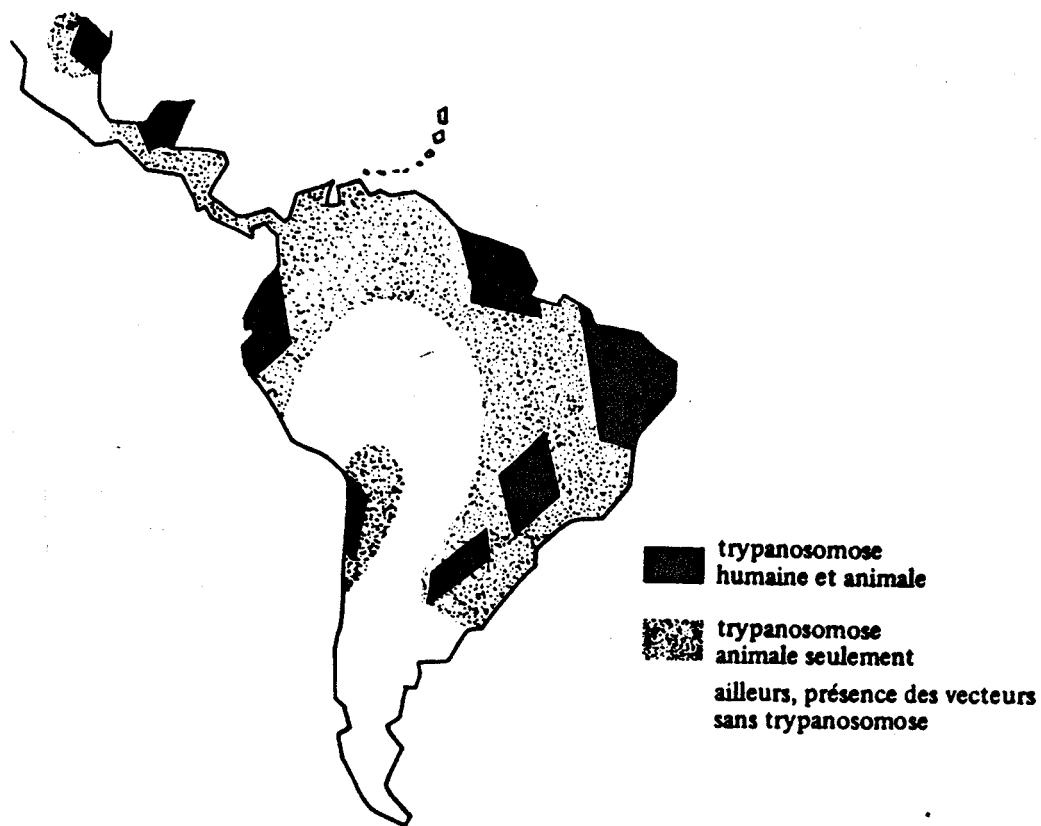
#### A. La trypanosomiase américaine

Cette affection parasitaire appelée également maladie de Chagas est répandue en Amérique latine (Centre et Sud Amérique) de manière épidémiologique principalement dans les zones rurales, en relation avec des conditions socio-économiques précaires. En effet, la maladie de Chagas est une maladie liée au sous-développement (Figure 3).

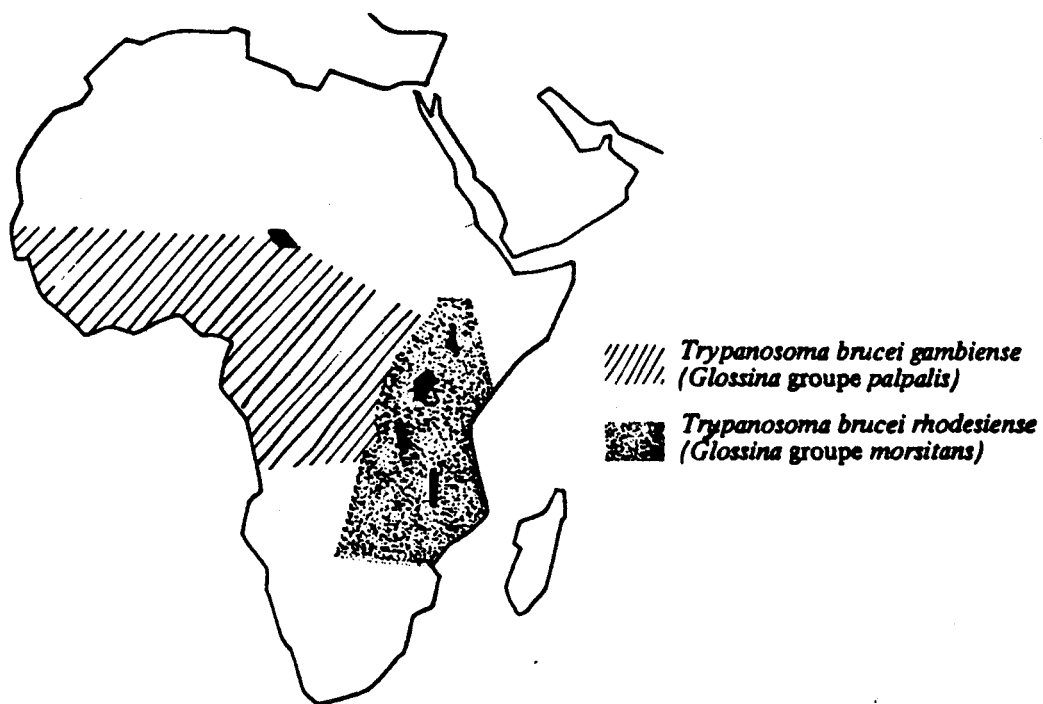
L'agent pathogène est Trypanosoma cruzi dont la virulence est variable suivant les régions. Plus on remonte vers le Nord, moins le parasite est virulent. Les principaux agents vecteurs appartiennent à la famille des Réduvidés qui fait partie de l'ordre des Hémiptères issus de l'embranchement des Arthropodes. Ils sont représentés par les genres Triatoma megista et Rhodnius prolixus, sorte de grosses punaises, adaptées aux animaux sauvages mais également à l'homme ; ces espèces domiciliées se localisent préférentiellement dans les fentes de murs et les toitures de chaume. L'insecte puise les trypanosomes dans le sang des malades lors d'une piqûre. Ces derniers subissent des transformations morphologiques tout au long du système digestif de l'hôte intermédiaire. Les formes infestantes trypanosomales se retrouvent dans l'intestin terminal et sont libérées avec les déjections de l'insecte. L'infestation de l'hôte est réalisée par le contact des doigts souillés au niveau des lésions de grattage ou au niveau des muqueuses (buccales, nasales, oculaires et anales). Il faut signaler qu'il existe des cas d'infestation congénitale ou par allaitement.

#### B. La trypanosomiase africaine

La trypanosomiase africaine humaine est due essentiellement à Trypanosoma brucei gambiense et Trypanosoma brucei rhodesiense. Elle est



REPARTITION GEOGRAPHIQUE DE LA TRYPANOSOMOSE AMERICAINE  
(Maladie de Chagas)



REPARTITION GEOGRAPHIQUE DE LA TRYPANOSOMOSE AFRICAINE HUMAINE

FIGURE 3



transmise par la piqure de la glossine (mouche tsé-tsé). L'envahissement de l'appareil encéphalo-méningé par les trypanosomes donne à cette affection une physionomie particulière qui lui a valu le nom de maladie du sommeil (figure 3). L'épidémiologie est différente selon l'agent pathogène.

La trypanosomiase à T. b. gambiense est une affection à caractère chronique, endémique, qui sévit en Afrique occidentale et centrale. La maladie est transmise par des mouches du groupe Palpalis vivant dans les galeries forestières et au bord des cours d'eau. T. b. gambiense peut affecter plusieurs espèces animales (rongeurs, herbivores, primates), mais le taux faible de parasites circulants et tissulaires réduit considérablement la probabilité d'ingestion du parasite par la glossine. L'homme représente l'espèce la plus sensible, il constitue donc le principal réservoir parasitaire.

L'infestation, chez l'homme n'est jamais massive, mais par contre, elle est compensée par le temps de survie relativement long des personnes atteintes, ce qui permet d'entretenir le cycle et de maintenir un certain niveau d'endémie.

La trypanosomiase à T. b. rhodesiense sévit à l'état sporadique en Afrique Orientale. Elle est transmise par les mouches du groupe Morsitans vivant dans la savane. Cette maladie est caractérisée par une évolution clinique plus rapide. En effet, chez l'homme, le parasite produit une infestation massive, de pronostic grave. La personne infestée présente rapidement une dégradation telle de son état général qu'elle ne peut quitter son domicile et être un facteur de transmission vis à vis des insectes. Ainsi, se distinguant de T. b. gambiense, T. b. rhodesiense ne peut survivre dans un cycle strict homme-mouche-homme ; il lui faut un réservoir parasitaire non humain où la symptomatologie est moins grave et où la probabilité de rencontre entre l'hôte et l'agent vecteur est suffisante pour assurer la transmission. Les mammifères sauvages en particulier l'antilope joue le rôle de réservoir parasitaire.

Les autres trypanosomes africains sont parasites des animaux, nous en citerons quelques uns.

- Trypanosoma brucei brucei : responsable de la "nagana", maladie redoutable des Equidés et Bovidés

- Trypanosoma congolense : provoque la trypanosomiase des Equidés, Bovidés et Porcins.
- Trypanosoma vivax : est l'agent de la "souma" des Equidés et Bovidés
- Trypanosoma evansi : responsable du "surra" des Equidés et du "débab" des dromadaires
- Trypanosoma equiperdum : cause la "dourine" chez les Equidés.

## V- Cycle évolutif des trypanosomes

### A. Cycle des trypanosomes américains

L'agent vecteur est un insecte Hémiptère Réduvidé. Il se contamine lors d'une piqûre en aspirant le sang d'homme ou d'animaux infestés. Les formes sanguicoles trypomastigotes parviennent dans l'estomac de l'insecte où elles prennent la forme épimastigote, puis les parasites adoptent la forme promastigote et se multiplient. Le passage dans l'intestin moyen se caractérise par un retour à la forme épimastigote. Enfin, au niveau de l'intestin postérieur, les parasites retrouvent une forme trypomastigote "métacyclique" qui est seule infestante. Ils seront déposés sur la peau de l'homme et des animaux avec les déjections de l'insecte et seront susceptibles d'infester par traversée des muqueuses au niveau des lésions de grattage. Les parasites pénètrent alors dans les histiocytes, s'y multiplient sous forme amastigote, puis sont libérés dans le sang où ils acquièrent la morphologie trypomastigote. Il s'agit d'une forme d'attente qui ne se multiplie pas. Une autre partie des parasites sanguicoles pénètre dans les cellules musculaires (myocarde en particulier) ou nerveuses et adopte la morphologie intracellulaire amastigote capable de se multiplier. C'est cette potentialité qui crée la pathogénie du parasite. Ces affections ayant une expression clinique fonction de la localisation intracellulaire de l'agent parasitaire.

### B. Cycle des trypanosomes africains

#### 1- Agents vecteurs

Les glossines (mouches tsé-tsé) sont les agents vecteurs de la majorité des trypanosomiasés africaines. Ce sont des Diptères Brachycères mesurant 6 à 15 mm.

Suivant leur biologie, on distingue les espèces hygrophiles du groupe palpalis vivant dans les forêts et au bord des cours d'eau (Glossina palpalis, Glossina trachynoïdes) et des espèces xérophiles vivant dans les savanes (Glossina morsitans, Glossina longipalpis). Les glossines sont des hématophages diurnes qui tous les 2 jours, par repas sanguin se nourrissent sur l'homme, le bétail ou le gibier. Tout prélèvement par piqûre d'un sujet déjà contaminé est le point de départ du cycle vecteur - hôte définitif.

## 2- Cycle

Pour T. b. gambiense et T. b. rhodesiense, le cycle peut être objectivé de la manière suivante. La glossine s'infeste en aspirant le sang d'un homme ou d'un animal parasité. Les trypanosomes ingérés se multiplient activement par fission binaire dans la partie postérieure du mésentéron (figure 4). A ce niveau, ils perdent leur manteau de surface, s'amincissent considérablement, mais gardent néanmoins la forme trypomastigote. Ces formes frêles au bout de 10 à 15 jours gagnent l'intestin antérieur et acquièrent la forme épimastigote. Elles se fixent par leur flagelle à la paroi du pharynx où elles se divisent, devenant de plus en plus trapues. Elles pénètrent ensuite dans les canaux salivaires et là, vont à la fois retrouver une forme trypomastigote "métacyclique" et se recouvrir à nouveau d'un manteau de surface. Ces trypanosomes métacycliques infestants s'engagent dans la trompe de la glossine et sont entraînés par la salive lors de la piqûre.

La glossine est infestante 18 jours après le repas contaminant. Elle le demeure toute sa vie, mais la complexité du cycle fait qu'il n'y a statistiquement que 5 à 10 % seulement des mouches qui soient infestées. Ce qui représente un élément autolimitant de la propagation des sites endémiques.

Chez l'hôte définitif, les parasites inoculés se multiplient provoquant la formation d'un chancre d'inoculation. Ils migrent d'abord vers les ganglions lymphatiques où ils se multiplient activement (période d'incubation 10 à 15 jours) avant de gagner le réseau sanguin et bientôt l'espace céphalo-rachidien.

Dans certains cas, il peut y avoir une transmission non cyclique de la maladie. On citera la transmission interhumaine congénitale, par lactation ou par transfusion.

CYCLE EVOLUTIF DE Trypanosoma brucei  
(VICKERMAN, 1969)

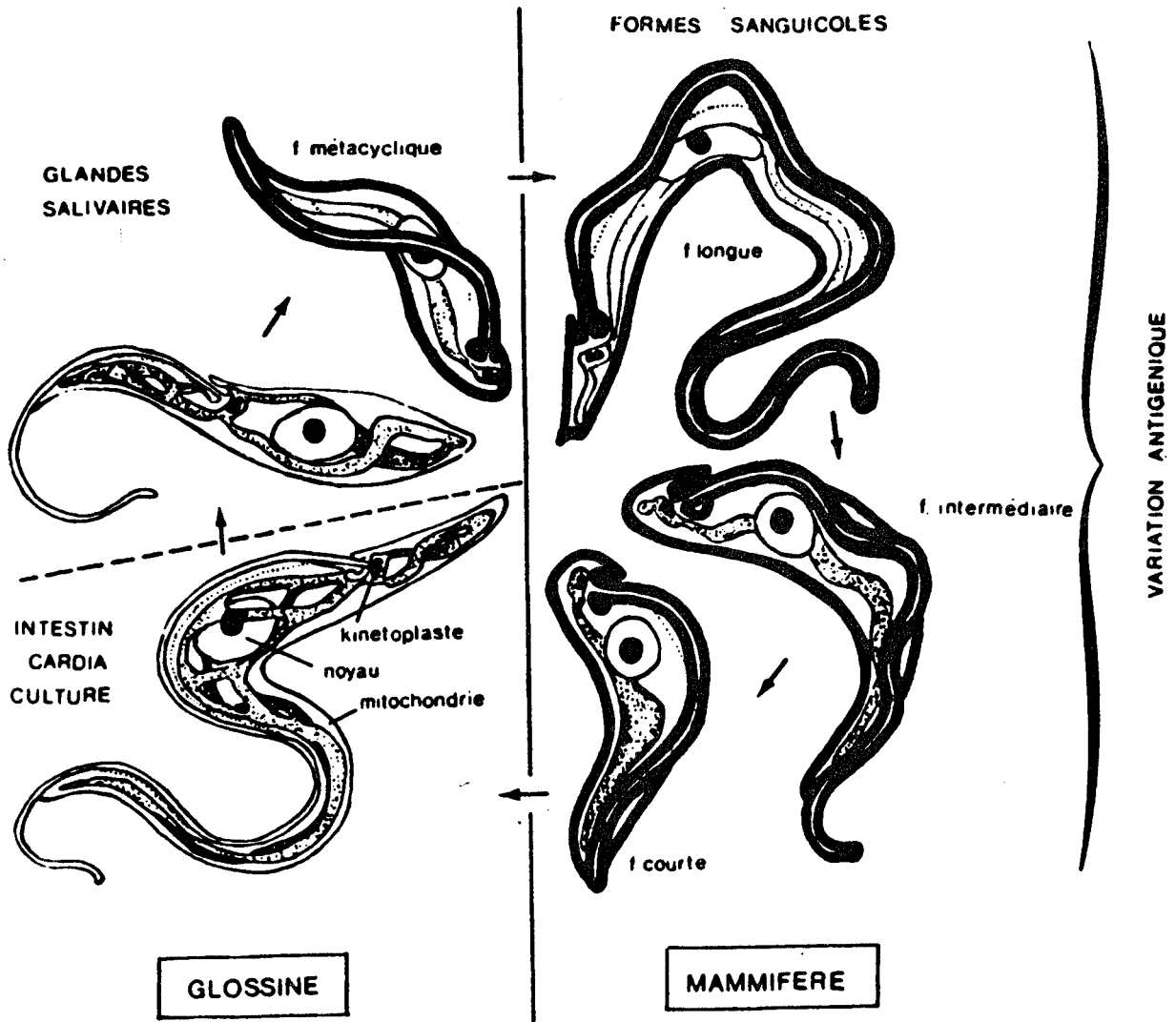


FIGURE 4

Ce modèle de cycle peut se trouver modifié. Pour T. congolense par exemple il n'y a pas de migration au niveau des glandes salivaires. Pour T. equiperdum le cycle avec insecte vecteur n'existe pas et la transmission est directe par contact sexuel.

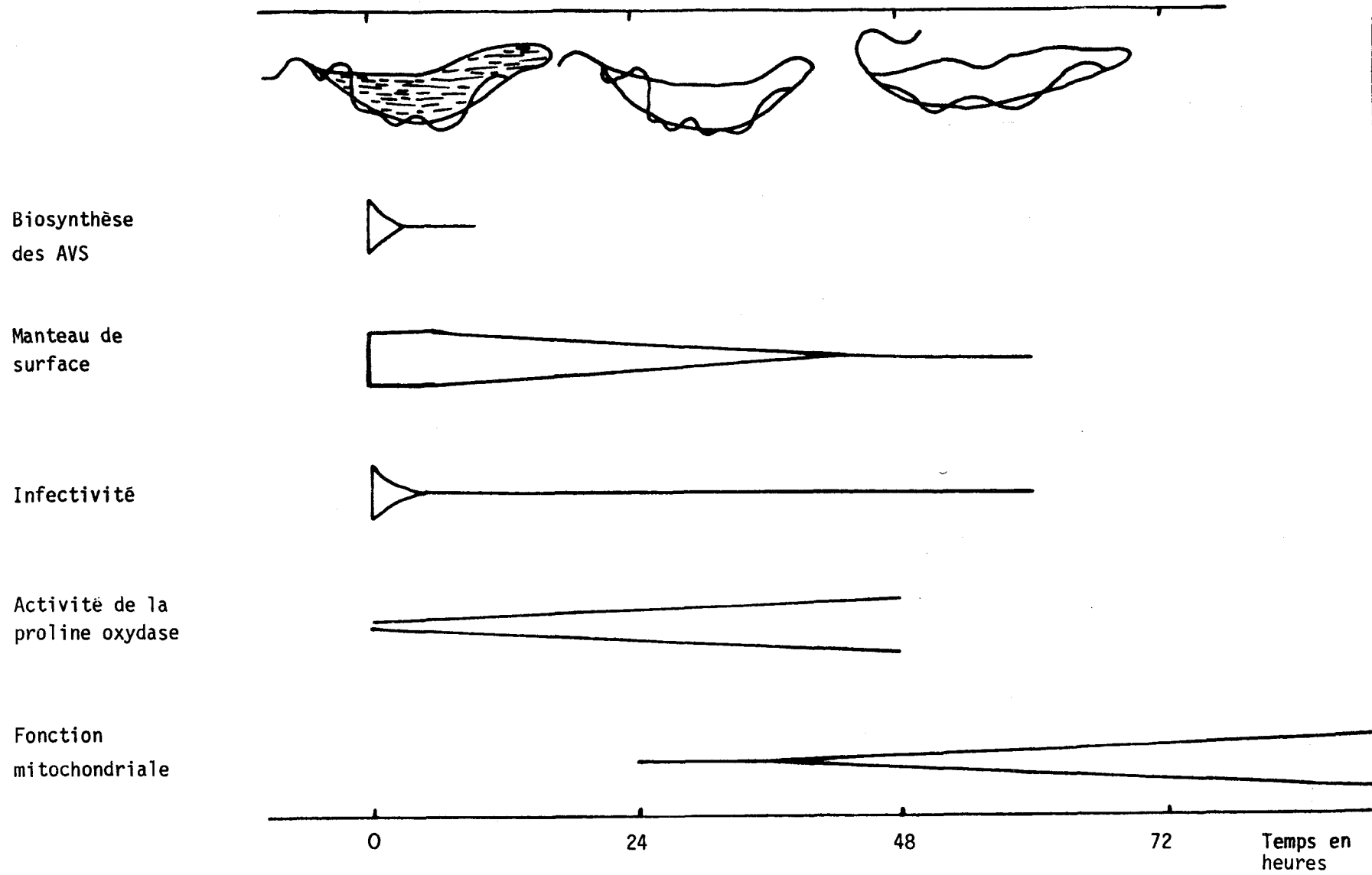
### 3- Evolution morphologique au cours du cycle

La variation morphologique au cours du cycle est un élément caractéristique des trypanosomes de la section Salivaria. Cette propriété leur a valu la dénomination de "Trypanosomes pléomorphiques". Au cours du cycle évolutif, les parasites subissent des changements morphologiques profonds et une adaptation physiologique à chaque stade. Chez l'hôte définitif, les formes longues élancées avec flagelle libre se transforment rapidement pour présenter une forme dite "courte" ou "trapue". Ces formes courtes sont incapables de se multiplier dans le sang des mammifères. Elles représentent des formes d'attente, seules capables de se multiplier chez l'hôte intermédiaire.

Plusieurs auteurs ont étudié l'ultrastructure de ces différentes étapes morphologiques (VICKERMAN (1962) (159) ; (1965) (160) ; (1970) (163) ; BOHRINGER et HECKER (1974) (15) ; (1975) (16) ; HECKER et coll. (1972) (71) ; STEIGER (1973) (149) ; GHIOTTO et coll. (1979) (57)). Il apparaît que l'évolution morphologique générale s'accompagne de changements au niveau des organelles cellulaires, traduction d'évolution physiologique profonde (évolution des systèmes respiratoires) ou au niveau des rapports du parasite avec son environnement immédiat (existence d'un manteau cellulaire) (figure 5).

#### a) Mitochondrion et respiration du parasite

L'ultrastructure du mitochondrion de la forme sanguicole de T. b. brucei varie lors de la transformation progressive des formes longues en formes courtes (VICKERMAN (1965) (160) ; HECKER et coll. (1973) (72)). Dans les formes longues, le mitochondrion se présente sous l'aspect d'un tube étroit avec des petites crêtes peu nombreuses, alors que dans les formes intermédiaires et plus nettement encore dans les formes courtes, les canaux mitochondriaux prolifèrent et les crêtes sont plus nombreuses. Cette évolution continue lorsque les parasites acquièrent une forme procyclique dans le tube digestif du vecteur (BOHRINGER et HECKER (1975) (16)).



TRANSFORMATION DES FORMES METACYCLIQUES EN FORMES PROCYCLIQUES IN VITRO  
 (D'après OVERATH et coll. (1983) (123))

FIGURE 5

Autre exemple de corrélation entre polymorphisme et métabolisme : les formes longues sont dépourvues de réserve énergétique. Elles sont incapables d'oxyder des acides gras ou des acides aminés, mais utilisent exclusivement le glucose qu'elles transforment en pyruvate. A ce stade, la lactate déshydrogénase, les enzymes du cycle tricarboxylique de Krebs sont absents. La respiration est insensible à l'action du cyanure et de l'oxyde de carbone. Le taux d'échanges cellulaires est 10 fois plus élevé comparé à une cellule de mammifère. Leur consommation en glucose est considérable. Un seul trypanosome métabolise en une heure autant de glucose que son poids sec (BOWMAN et FLYNN (1976) (24)). Dans les formes courtes au contraire le pyruvate peut-être métabolisé en acétate, succinate et en CO<sub>2</sub>. Les enzymes du cycle tricarboxylique de Krebs sont cette fois présents mais le classique cycle de Krebs n'est pas fonctionnel à cause de l'extrême pauvreté en activités enzymatiques de type citrate synthétase ou/et succinate déshydrogénase. La synthèse de ces enzymes du cycle de Krebs représente donc très probablement une préadaptation à la survie dans l'intestin de la mouche.

Enfin au stade procyclique, les trypanosomes possèdent tous les enzymes du cycle de Krebs et la chaîne complète d'oxydation cellulaire, qui est particulièrement sensible au cyanure et à l'oxyde de carbone (BOWMAN et FLYNN (1976) (24)). Les parasites sont devenus "fermenteurs aérobies partiels" capables de produire succinate, pyruvate, acétate et CO<sub>2</sub> comme ultimes produits de l'utilisation du glucose (BOWMAN et FLYNN (1976) (24) ; GUTTERIDGE et coll. (1979) (67)).

Pendant son passage chez la mouche, la principale source d'énergie du parasite devient essentiellement des acides aminés et plus particulièrement la proline qui existe en forte concentration dans l'hémolymphe. La proline est alors métabolisée en aspartate, alanine et en CO<sub>2</sub> grâce à la proline oxydase et aux enzymes du cycle de krebs.

#### b) Evolution cyclique et existence du manteau cellulaire

La figure 4 qui illustre les différentes étapes morphologiques du cycle évolutif de T. b. brucei montre que l'existence d'un manteau cellulaire est une caractéristique de l'ensemble des formes sanguicoles mais aussi, chez l'insecte, de la forme métacyclique infestante. L'existence ou non de ce manteau cellulaire absent au niveau de l'intestin de l'hôte

intermédiaire est sûrement en relation avec une évolution fonctionnelle du parasite et des rapports du protozoaire avec la mouche ou avec le mammifère. Cette "dépendance" du protozoaire est liée à cette structure membranaire plasmique. L'intérêt de mieux connaître sa structure est considérable en regard des possibilités infestantes, des seules formes métacycliques. Il est maintenant démontré aussi que l'existence de cette interface moléculaire entre le parasite et l'hôte représente un système très élaboré de défense.

On sait maintenant que, au cours de la maladie parasitaire, l'hôte synthétise des anticorps dirigés contre le parasite et s'expriment en fonction des "types antigéniques" de la population parasitaire. Le système immunocompétent dans son expression humorale est alors capable de détruire les parasites par une réaction antigène-anticorps qui s'accompagne d'une trypanolyse. Le parasite en fait "se protège" en modifiant son antigénicité de surface qui n'est plus reconnue par les anticorps circulants, ce qui permet à la population parasitaire de continuer à proliférer.

Cette émergence de variants antigéniques successifs se manifeste chez l'hôte par des vagues de parasitémie dont la période est environ de 2 à 4 jours. Cette "variation antigénique" permet au parasite d'échapper à la réponse immunitaire de l'hôte et explique aussi dans une certaine mesure les échecs des tentatives de vaccination.

Au cours des 10 dernières années, de nombreux travaux ont été consacrés à l'étude des antigènes variables à la fois sur un plan immunologique, biochimique et génétique, ceci dans le but d'élucider les mécanismes intimes de la variation antigénique et, une fois ce mécanisme compris, de l'utiliser à des fins diagnostiques et même thérapeutiques.

#### VI- Etude des antigènes variables

Les antigènes variables de surface (AVS) sont responsables de la spécificité antigénique de chaque variant. Ils ont été longtemps désignés sous différentes appellations, suivant le procédé de caractérisation utilisé : les exoantigènes (WEITZ (1960) (169)) détectés dans le sérum de rat infestés ; les antigènes 1S et 4S (BROWN et WILLIAMSON (1962) (27) ; (1964) (28) ; LE PAGE (1968) (104)). Les PR antigènes (Protective Responsible) et les AG antigènes (Agar Gel) caractérisés par SEED (1963) (145). ALLSOPP et coll.



(1971) (4) ont finalement démontré l'identité entre ces différentes dénominations et ont retenu pour les caractériser le terme d'"antigènes de surface".

On les distinguera des antigènes dits "internes" ou encore "communs" qui sont présents à tous les stades de la vie du parasite (WEITZ (1960) (169) ; GRAY (1961) (58) ; BROWN et WILLIAMSON (1962) (27) ; SEED (1963) (145) ; BIGALKE (1966) (14) ; LUMSDEN (1967) (114) ; LE RAY (1973) (105); (1975) (106)). Ces antigènes communs se retrouvent également chez différentes espèces de trypanosomes. Certains ont été identifiés comme étant des nucléoprotéines (BROWN et WILLIAMSON (1962) (27)), d'autres des enzymes, des protéines de structure ou des substances intervenant dans le métabolisme cellulaire (LUMSDEN (1967) (114)).

#### A. Localisation

Les antigènes variables ou antigènes spécifiques de variants (AVS) sont localisés à la surface du parasite recouvrant entièrement la membrane plasmique. Ce manteau a été parfaitement observé en microscopie électronique par VICKERMAN en (1969) (161) qui a montré que seules les formes trypomastigotes sanguicoles et métacycliques (formes infestantes) sont recouvertes d'un manteau, les formes épimastigotes (non infestantes) en sont dépourvues. Cette localisation "externe" des antigènes variables a été confirmé aussi à l'aide d'anticorps spécifiques de variants (VICKERMAN et LUCKINS (1969) (162) ; FRUIT et coll. (1977) (55)). L'utilisation en particulier d'antigènes fluorescents a été déterminante dans la mise en évidence de la "variation antigénique" des populations parasitaires.

#### B. Aspects immunologiques

##### 1- Etude du phénomène de variation antigénique

Ce processus biologique de variation antigénique est une particularité des trypanosomes de la section Salivaria dont les premières observations ont été faites dès 1905 (53) par FRANKE. Cette propriété a été décrite chez différentes espèces de trypanosomes, dont T. b. brucei (RITZ (1916) (138)) ; T. b. rhodesiense (LOURIE et O'CONNOR (1937) (113)) ; T. b. gambiense (OSAKI (1956) (122)) ; T. vivax (CLARKSON et AWAN (1967) (36)) ; T. congolense (WILSON et CUNNINGHAM (1972) (173)) et T. equiperdum (CAPBERN et coll. (1977) (29)).

GRAY a réalisé de nombreux travaux ((1964) (59) ; (1965a) (60) ; (1965b) (61) ; (1967) (62) ; (1972) (63) ; (1975) (64)) à partir desquels, une hypothèse a été émise selon laquelle les antigènes variables apparaissent en fonction d'un processus adaptatif et réversible. Pour GRAY et d'autres auteurs, le développement des antigènes variables se fait selon un ordre précis et très constant surtout en début d'infection (WILSON et CUNNINGHAM (1970) (172) ; (1972) (173) ; ULIENBERG et GIRET (1972) (153) ; VAN MEIRVENNE et coll. (1975a) (156) ; CAPBERN et coll. (1977) (29)). Certains variants antigéniques apparaissent plus souvent dans les périodes précoces de l'infection. Ils ont été désignés sous le nom "d'antigènes prédominants". De plus, on peut signaler la notion de réversion antigénique à un type antigénique de base caractéristique de la souche après accomplissement du cycle chez l'hôte intermédiaire (JENNI (1977b) (91) ; HUDSON et coll. (1980) (85)).

GRAY et coll., puis CAPBERN et coll. ont démontré que cette réversion se produisait lors de l'inoculation à la seringue de populations clonées. Le caractère constant de l'ordre d'apparition des antigènes variables ainsi que le phénomène de réversion à un type antigénique de base ont amené GRAY à proposer l'hypothèse d'un mécanisme d'adaptation de variation selon un ordre défini au niveau du génome.

VAN MEIRVENNE et coll. (1975a) (156) ont mis en évidence l'existence d'une hétérogénéité antigénique au sein des populations trypanosomales en utilisant les techniques d'immunofluorescence et d'immunolyse. LE RAY et coll. (1977) (107), de même que JENNI (1977b) (91) ont pu observer que les populations issues de la première parasitémie, obtenues après transmission cyclique étaient antigéniquement hétérogènes. Une première étude de JENNI (1977a) (90) avait laissé supposer que l'hétérogénéité n'apparaissait qu'au niveau de l'hôte définitif. Mais LE RAY et coll. (1978) (108), puis BARRY et coll. (1979) (11) ont finalement établi que les populations métacycliques n'étaient pas homogènes. HAJDUK et coll. (1981) (70) confirmant les observations précédentes ont résumé le phénomène en fonction des points suivants :

- . existence d'un répertoire d'antigènes variables métacycliques plus limité que le répertoire des types antigéniques exprimés chez l'hôte définitif.
- . indépendance entre le type antigénique ingéré par la mouche et le répertoire métacyclique.
- . remplacement des types antigéniques métacycliques apparus en 3 à 4 jours lors de la première parasitémie par une vingtaine de types antigéniques non métacycliques 10 jours après l'infestation.

. enfin, la prédominance de certains antigènes variables de première parasitémie chez l'hôte définitif est influencée par le type antigénique ingéré par la mouche.

La variation antigénique ne suit pas une séquence rigoureusement prédéterminée. En effet, les travaux de CAPBERN et coll. (1977) (29) ont montré qu'il existe une légère variation dans la succession des variants antigéniques. L'origine de la programmation qui détermine l'ordre d'apparition des différents variants est encore mal définie.

Selon VAN MEIRVENNE et coll. (1975b) (157) ; (1977) (158), l'ordre d'apparition des variants dépend seulement des taux de croissance relatifs. KOSINSKI en 1980 (96) a analysé l'ordre d'apparition des variants. Il a effectué un calcul mathématique portant sur un modèle de 90 variants possédant des taux de croissance différents. La génération spontanée des variants suivie d'une sélection qui s'opère seulement à travers les taux de croissance ne semble pas capable de produire le degré d'ordre rapporté dans la littérature. D'autres observations faites par MILLER et TURNER (1981) (119) montrent que la fréquence d'expression de nouveaux variants n'est pas nécessairement en corrélation avec les taux de croissance. Cependant, ceci semble avoir un effet sur la détermination du type antigénique majeur dans chaque parasitémie.

## 2- Rôle des anticorps dans la variation antigénique

Pendant plusieurs années, les anticorps synthétisés par l'hôte au cours de l'infection ont été considérés comme les véritables facteurs induisant la variation antigénique. Mais des travaux récents ont infirmé cette hypothèse. Ainsi VAN MEIRVENNE et coll. (1977) (158) ont mis en évidence une variation des antigènes de surface durant les stades précoces de l'infection avant le développement d'une réponse immune chez l'hôte. Par la suite, LE RAY et coll. (1978) (108) ont montré l'apparition d'une diversité de variants antigéniques au niveau des glandes salivaires de la glossine, deux semaines après infestation par un clone donné. Les travaux de DOYLE et coll. (1980) (47) ont apporté un autre argument. Ces auteurs ont mis en culture des formes trypomastigotes de trypanosomes selon le protocole mis au point par HIRUMI et coll. (1977a) (75) ; (1977b) (76), l'apparition des variants a pu être détectée. Par conséquent *in vitro*, le processus de variation antigénique semble se produire de la même manière qu'*in vivo*. Seule différence, le délai d'apparition de nouveaux variants est plus long. Deux

facteurs semblent intervenir pour expliquer cette différence : le premier concerne la vitesse de développement de ces trypanosomes in vitro et in vivo, le temps de doublement d'une population est plus long dans le cas d'une mise en culture. Le second facteur est que, in vivo, la détection de nouveaux types d'antigènes variables est facilitée par la réponse immune de l'hôte qui élimine l'AVS initial. Enfin une preuve supplémentaire a été apportée par l'observation d'une variation antigénique chez des animaux immunodéprimés (HAJDUK et VICKERMAN (1981) (69)).

Les anticorps ne semblent donc pas jouer un rôle direct dans l'induction de la variation antigénique, mais exercent probablement un effet sélectif parmi les populations trypanosomales hétérogènes.

Le mécanisme par lequel les trypanosomes échappent à la réponse immune de l'hôte demeure une inconnue. Depuis quelques années, plusieurs équipes se sont orientées vers l'étude structurale des antigènes variables de surface des trypanosomes au moyen de techniques faisant appel à la biochimie et à la biologie moléculaire.

Une meilleure connaissance de la structure de ces antigènes variables, qui forment le manteau de surface permettra certainement de mieux cerner le problème des interactions hôte-parasite.

### C. Les aspects biochimiques

#### 1- Isolement

Plusieurs protocoles d'isolement des AVS ont été publiés avant 1975, mais les préparations obtenues étaient généralement hétérogènes et instables. Nous ne ferons que rappeler les principales références bibliographiques les décrivant. (SEED (1963) (145) ; (1972) (146) ; LEPAGE (1967) (103) ; (1968) (104) ; ALLSOPP et coll. (1971) (4) ; (1974) (5) ; LANHAM et TAYLOR (1972) (101)). Toutefois, ces auteurs montraient déjà que les AVS étaient de nature glycoprotéique, ce qui a facilité l'apparition des techniques de purification très spécifiques telles que la chromatographie d'affinité à l'aide de lectine.

En 1975 (38), CROSS a pu obtenir une préparation homogène d'antigènes variables de surface de T. b. brucei par rupture mécanique des parasites en

l'absence de détergents, suivie d'une purification par isoélectrofocalisation. Par la suite, furent proposés différents procédés d'isolement des AVS de T. b. brucei (AFCHAIN et coll. (1976) (1) ; STRICKLER et coll. (1978) (150) ; de T. equiperdum (BALTZ et coll. (1976) (8)) ou de T. congolense (ROVIS et coll. (1978) (141) ; ONODERA et coll. (1981) (120) ; REINWALD et coll. (1981) (134)).

DIFFLEY et JAYAWARDENA (1982) (44) ont fait une analyse comparative des différents protocoles de libération et d'isolement d'un antigène variable de T. b. rhodesiense et montré qu'ils obtenaient de meilleurs résultats par une congélation-décongélation des trypanosomes en présence d'inhibiteurs de protéases suivie d'une purification par chromatographie d'échange ionique. Ils ont isolé plus de 50 % d'antigènes variables à partir d'un extrait de trypanosomes représentant 95 % de la quantité attendue d'AVS (tableau 2).

En 1982 (167), VOORHEIS et coll. ont étudié le mécanisme conduisant à la libération du manteau de surface des trypanosomes. Ces auteurs ont montré que l'adjonction d'ions calcium et d'ionophore calcique à une suspension de trypanosomes entraînait une libération de 80 % de la glycoprotéine de surface en 10 minutes, sans altération des cellules. Cette réaction est bloquée par l'addition de zinc. Les conditions décrites pour la libération du manteau sont les mêmes que celles qui permettent l'activation de l'adénylcyclase membranaire plasmique (VOORHEIS et coll. (1980) (165) ; (1981) (166) ; (1982) (167)). Ces deux processus résulteraient de la stimulation d'un même "système de régulation" localisé au niveau de la membrane. Le fait enfin que tous ces processus soient dépendants de la température laisse supposer l'intervention d'une étape enzymatique encore inconnue.

## 2- Caractéristiques physico-chimiques

Les premières études physicochimiques des antigènes variables ont été faites par CROSS (1975) (38) ; (1977) (40) sur T. b. brucei. L'auteur avait montré que les AVS étaient constitués par une glycoprotéine monomérique, présentant une masse moléculaire de 65000 en électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS. D'autres auteurs ont ensuite observé une différence de masse moléculaire d'un AVS à l'autre. Ainsi dans le modèle T. congolense, les tailles moléculaires varient de 53000 à 57000 (ROVIS et coll. (1978) (141) ; ONODERA et coll. (1981) (120) ; REINWALD et coll. (1981) (134)). Les mêmes observations ont été enregistrées avec le modèle T. equiperdum où les tailles moléculaires s'échelonnent entre

Numéro de l'expérience	Méthode de rupture cellulaire	Méthode Chromatographique	Extrait de Trypanosomes				
			Frais		Conservé à - 20° C		Durée de la conservation en semaine
			% de libération de l'AVS	% de pureté de l'AVS	% de libération de l'AVS	% de pureté de l'AVS	
1	C.D. S.	* Affinité-anticorps	-45	65	3	12	1
			-39	52	14	33	
2	C.D. S.	Echange-ionique	-55	92	43	125	2
			-52	92	37	79	
3	C.D. S.	Affinité-lectine	-38	119	19	104	1
			-30	104	17	71	

C.D. = Congélation décongélation

S. = Sonication

1 = sans inhibiteur de protéase

Le nombre de ug d'antigène variable déterminé par radioimmunodiffusion divisé par le nombre de ug de protéines de la préparation d'antigènes variable déterminée par la méthode de Folin.

TABEAU 2 : COMPARAISON DES DIFFERENTES TECHNIQUES D'ISOLEMENT DES AVS DE T. b. rhodesiense

D'après Diffley et Jayawardena (1982)

52000 et 59000. AUFFRET et TURNER (1981) (7) ont signalé qu'en solution les AVS de T. b. brucei peuvent former des dimères ou des agglomérats.

La composition amino-acide et le point isolélectrique sont également variables suivant les AVS étudiés de T. b. brucei (BRIDGEN et coll. (1976) (26)), T. congolense (ROVIS et coll. (1978) (141) ; ONODERA et coll. (1981) (120)) et de T. equiperdum.

La copule glucidique est caractérisée par une certaine constance quant à la nature des sucres qui la composent : mannose, galactose, N-acétyl glucosamine, glucose. Les glucides 7 à 17 % chez T. b. brucei (JOHNSON et CROSS (1977) (92)) et 7 à 8 % chez T. equiperdum. La variation importante du pourcentage de glycosylation chez T. b. brucei laisse envisager l'existence d'un nombre variable de sites de glycosylation d'un AVS à l'autre.

### 3- Structure des AVS de T. b. brucei

#### a) l'axe peptidique

La connaissance de la structure peptidique des AVS a bénéficié de l'apport présenté par l'étude de la séquence DNA complémentaire de l'ARN messager spécifique des antigènes variables. Plusieurs équipes se sont attachées à la préparation de ces sondes spécifiques et ont pu déterminer tout ou partie de la séquence code d'un antigène variable (BOOTHROYD et coll. (1980) (17) ; (1981) (18) ; (1982) (19) ; MATHYSSENS et coll. (1981) (116) ; RICE-FICHT et coll. (1981) (136) ; (1982) (137) ; PAYS et coll. (1983c) (129)).

D'autres auteurs ont mené une analyse de la structure peptidique par méthode chimique classique de dégradation de Edman sur peptide (HOLDER et CROSS (1981) (81) ; ALLEN et coll. (1982) (2)).

ALLEN et GURNETT (1983) (3) ont précisé la localisation des ponts disulfure dans la molécule. L'axe peptidique de l'AVS étudié présente les caractéristiques suivantes :

- 470 résidus d'acides aminés
- existence d'une position de l'axe peptidique (8-40) contenant 10 résidus basiques et aucun résidu acide
- nature très hydrophile des 112 résidus C-terminaux avec une

richesse particulière en lysine (24 résidus) et en acide glutamique (17 résidus)

- présence de 8 résidus de cystéine dans la région C-terminale formant 2 groupes de ponts disulfure situés de part et d'autre d'une chaîne glycanique. Parmi ces résidus, les cinq derniers sont suivis d'une lysine (Figure 6).

- existence de deux ponts disulfure dans la partie N-terminale et d'un groupement thiol au centre de la molécule (figure 6) non impliqué dans un pont disulfure.

Toutes les autres séquences d'AVS de T. b. brucei ont été déterminées uniquement à partir de l'étude du DNA complémentaire spécifique (RICE FICHT et coll. (1981) (136) ; MATHYSSENS et coll. (1981) (116) ; PAYS et coll. (1983c) (129)). Tout en apportant beaucoup au concept général de la structure des AVS de T. b. brucei, il manque par cette approche les données concernant l'organisation moléculaire mais aussi le degré de glycosylation qui on l'a vu, peut varier beaucoup d'un AVS à l'autre.

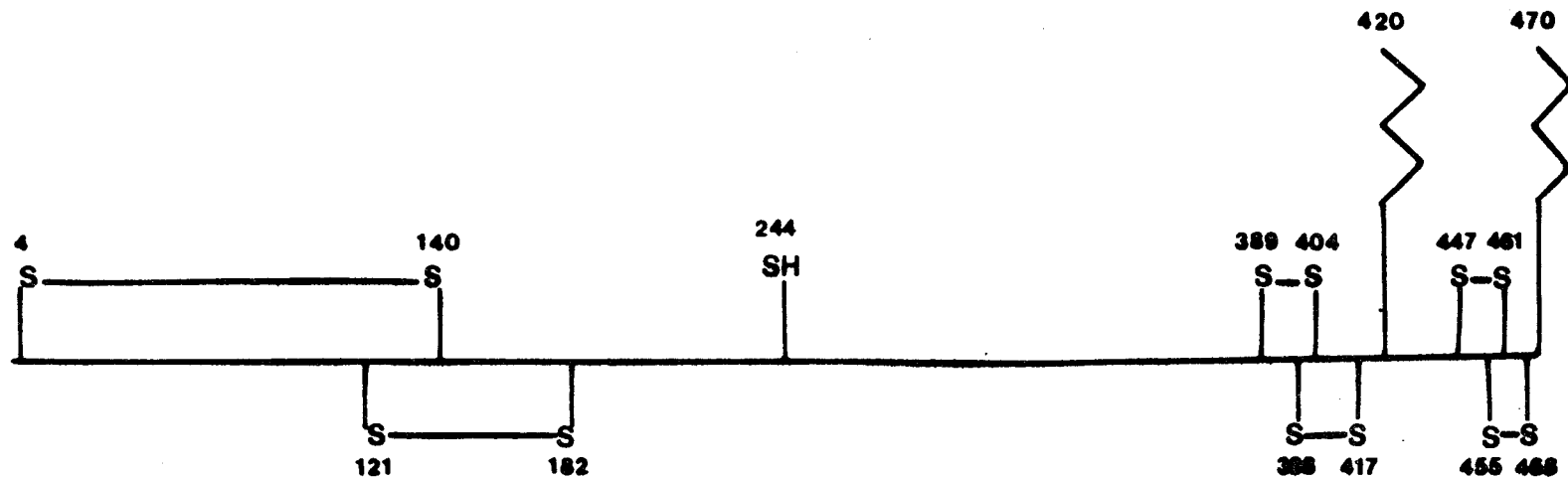
\* Existence d'une extension C-terminale hydrophobe

L'analyse comparative des séquences peptidiques et des séquences de DNA complémentaire des AVS 117 et 221 de T. b. brucei ont révélé l'existence d'une extension C-terminale hydrophobe qui n'est pas retrouvée sur la glycoprotéine de surface (BOOTHROYD et coll. (1980) (17) ; (1981) (18)). D'autres auteurs ont fait la même observation sur d'autres clones de T. b. brucei : MATHYSSENS et coll. (1981) (116) sur le clone AnTat 1.8 ; PAYS et coll. (1983c) (129) sur les clones AnTat 1.1, 1.10 et 1.1B. Cette extension hydrophobe représenterait une caractéristique générale des AVS.

Cette extension C-terminale n'est pas la seule puisque fut décrite aussi une extension N-terminale (Mc CONNELL (1981) (118) ; BOOTHROYD et coll. (1981) (18)).

La biosynthèse des antigènes variables passe donc en ce qui concerne leur axe peptidique par un "processing" affectant les deux extrémités de la molécule.





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

— / \ / \ — Chaînes glycaniques

FIGURE 6

Ces modifications qui caractérisent les phases précédant le stade mature et fonctionnel sont d'un grand intérêt. Elles laissent entrevoir leur rôle dans :

- l'apparition en interaction membranaire des AVS
- la stabilisation définitive de la conformation des AVS
- le mode d'attachement des AVS à la membrane plasmique

Des protéases spécifiques sont alors considérées comme des éléments d'un processus de régulation d'expression des AVS.

#### \* Homologie des régions C-terminales des AVS

De nombreux travaux ont démontré l'existence d'homologies importantes dans les séquences acides aminés de la région C-terminale des AVS (MATHYSSENS et coll. (1981) (116) ; RICE FICHT et coll. (1981) (136) ; BOOTHROYD (1981) (18) ; HOLDER et CROSS (1981) (81) ; MERRIT et coll. (1983 (117) ; PAYS et coll. (1983c) (129)). Ces homologies ont été détectées au sein des AVS de sérodèmes différents (figure 7).

Les régions C-terminales se caractérisent par l'existence de deux zones extrêmement hydrophiles contenant chacune quatre résidus de cystéine ayant des positions toujours constantes. Entre ces zones hydrophiles se trouve une "zone" riche en résidus hydrophobes. Cette constance remarquable de la position des résidus de cystéine laisse supposer leur rôle dans la réalisation d'une structure tridimensionnelle commune dans la région C-terminale des AVS. Enfin cette partie C-terminale est particulièrement riche en lysine et en acide glutamique.

RICE-FICHT et coll. (1981) (136) ont observé deux AVS IITat 1.1 et IITat 1.4 qui ne répondent pas exactement à la définition précédemment décrite de la région C-terminale (figure 8). En effet, leurs régions C-terminales présentent beaucoup moins d'homologie. Toutefois, les 4 derniers résidus de cystéine sont également situés dans une zone hydrophile où ils conservent une position "classique".

L'AVS IITat 1.4 possède d'ailleurs un résidu de cystéine supplémentaire et les zones hydrophiles et hydrophobes sont moins nettes pour ces deux AVS que pour l'ensemble des autres exemples décrits.

Une classification des AVS basée sur la structure des régions C-terminales des AVS a été proposée par RICE FICHT et coll. (1981) (136), puis reprise par

ANTAT 1.1  
 ANTAT 1.10  
 ANTAT 1.8  
 VSG 117  
 ILTAT 1.2  
 ILTAT 1.3

T	I	A	E	L	Q	T	A	A	A	T	K	P	A	C	P	G	H	K	Q	T	T	E	S	D	A	L	C	S	
T	I	A	E	I	Q	K	A	A	A	T	K	A	P	C	P	K	H	K	O	T	S	A	E	S	D	A	L	C	S
E	E	Q	K	K	T	A	E	K	I	L	K	L	E	T	E	L	A	D	Q	K	G	K	S	P	E	S	E	C	N
V	A	D	N	T	A	K	T	Q	K	E	L	T	E	A	Q	Q	A	M	K	T	D	R	S	G	D	G	G	C	T
R	L	S	S	E	N	A	K	L	T	T	E	V	K	Q	L	R	R	N	Q	G	K	Q	A	T	E	D	T	C	N

ANTAT 1.1  
 ANTAT 1.10  
 ANTAT 1.8  
 VSG 117  
 ILTAT 1.2  
 ILTAT 1.3

K	I	K	D	A	N	E	C	N	S	K	H	F	C	S	Y	N	G	T	E	T	D	S	A	K	K	C	K	Y	N
K	I	K	D	A	N	E	C	N	S	K	P	F	C	S	Y	N	S	T	E	T	D	T	A	K	K	C	Q	F	N
K	I	S	E	E	P	K	C	N	E	D	K	I	C	S	W	H	K	E	V	K	A	G	E	K	H	C	K	F	N
K	I	S	E	E	P	K	C	N	E	D	K	I	C	S	W	H	K	E	V	K	A	G	E	K	H	C	K	F	N
Q	I	T	E	P	T	A	C	N	S	K	P	F	C	S	Y	N	E	S	T	D	D	D	K	K	C	K	Y	N	
K	M	K	G	E	T	A	C	N	N	K	P	F	C	T	Y	N	A	T	E	T	E	D	N	K	K	C	K	F	N

ANTAT 1.1  
 ANTAT 1.10  
 ANTAT 1.8  
 VSG 117  
 ILTAT 1.2  
 ILTAT 1.3

A	T	K	A	S	A	S	D	A	P	V	T	Q	A	Q	T	T	S	R	S	E	T	P	A	E	K	C	T	G	K
E	T	K	A	O	K	S	G	V	S	L	P	K	T	G	P	T	G	T	E	A	T	T	D	K	C	K	D	K	K
S	T	K	A	K	E	K	G	V	S	V	T	Q	T	Q	T	A	G	G	T	A	E	T	T	D	K	C	K	G	K
S	T	K	A	K	E	K	G	V	S	V	T	Q	T	Q	T	A	G	G	T	E	A	T	T	D	K	C	K	G	K
A	T	K	A	O	E	N	G	V	P	V	A	Q	T	Q	T	G	G	S	E	T	T	T	E	K					
E	T	K	A	S	K	S	G	V	S	V	A	Q	A	Q	T	G	G	T	Q	T	T	T	D	K	C	K	D	K	

ANTAT 1.1  
 ANTAT 1.10  
 ANTAT 1.8  
 VSG 117  
 ILTAT 1.2  
 ILTAT 1.3

K	K	D	D	C	K	D	G	C	K	W	E	A	E	T	C	K	D		
O	K	D	E	C	K	S	P	N	C	K	W	E	G	E	T	C	K	D	
L	E	D	T	C	K	K	E	S	N	C	K	W	E	G	E	T	C	K	D
L	E	D	T	C	K	K	E	S	N	C	K	W	E	N	N	A	C	K	D
K	K	D	D	C	K	S	P	D	C	K	W	E	G	E	T	C	K	D	

COMPARAISON DES SEQUENCES C-TERMINALES DE DIFFERENTS AVS DE  
T. b. brucei

- ▤ Acides aminés retrouvés au moins 2 fois sur 6 variants
- ▭ Acides aminés retrouvés au moins 3 fois sur 6 variants
- Acides aminés différents

FIGURE 7

1.1 VACKNGGGACSAASSSDKIHITIEETDSKNKGTAASTMDSQNTAVAFATELQIGSWKSQHI  
1.4 FYQHQTQVTHLGGYLEITSGAGRTTLELKNLNDIAQDGVHKSGQLLGEIYTPLAT

1.1 DSNITALANALTALDSIPDLTDPTAYTADA AFKQLVATVALNKPPTTELTGEVLDAVKQS  
1.4 LNSEDTTEIKTDESIRSA AAAASTLEAAVQEALKLANPETDQEKLKEEAADIKEFVGS

1.1 MCRQLRNLGKRADDKIWEPLNEQTASYYSERKTIKTDQLKLLTSNQQLTTALGVALAKAIM  
1.4 ENTKGSKAWEKLEKSTKVKGTEAKPETEKELKDI THNAKLVSALNYYISSAESKLQEAETK

1.1 VKEASKKECNLHGHE TDATCEAKGVGDNCKPPCKEVEE GKKCKLDKEEA KRVAEQAAT  
1.4 LAATKAAAEKVPTAPKPDECKAKK-GDTC KDGC KWDSDGENKCKVVDPNYTKK

1.1 NQETEGKDGKTTNTTGSNSFVIHKAPLFLAFLLF\*

COMPARAISON DES REGIONS C-TERMINALES DES AVS IITat 1.1 et IITat 1.4  
D'après RICE FICHT et coll. (1981)

FIGURE 8

BORST et CROSS (1982) (22). Deux groupes principaux (figure 9) fonction de l'acide aminé en position C-terminale ont été distingués.

- les AVS à "acide aspartique"
- les AVS à "sérine"

BORST et CROSS (1982) (22) ont signalé un cas isolé, celui de l'AVS VSG 118 qui avait un résidu d'asparagine en position C-terminale et qui représente peut-être le seul exemple des AVS du troisième groupe.

Aucune signification de ces "groupes" n'est actuellement proposée. Quant à nous, l'hypothèse à soulever pourrait être celle sur le plan génétique de mécanismes de variation différents de ceux qui président à des changements intragroupes, en relation avec des fonctions individualisées au niveau cellulaire pour ces AVS à la fois proches mais aussi hautement différenciés.

#### b) Copule glucidique

Si l'on possède de plus en plus d'éléments sur la structure de l'axe peptidique des AVS, peu d'information concerne les différents glycanes qui viennent le substituer.

La composition glucidique des différents AVS étudiés à partir de T. b. brucei varie entre 7 et 17 % (P/P). Les sucres caractérisés à partir des préparations purifiées sont le mannose, le galactose et la N-acétylglucosamine (CROSS (1975) (38)). Des études analytiques récentes, des développements de biosynthèse montrent qu'il existe deux types de chaînes glycaniques : les unes "classiques" liées au résidu d'asparagine et comportant uniquement mannose et N acétylglucosamine.

Les autres "originales" liées au résidu d'acide aminé C-terminal et englobent à la fois galactose, mannose, N-acétylglucosamine (HOLDER et CROSS (1981) (81)). Nous reviendrons sur ce point dans le chapitre consacré à nos propres résultats obtenus à partir de T. equiperdum.

#### c) Immunité croisée et immunité spécifique

Il semblait établi depuis plusieurs années que les anticorps spécifiques du manteau de surface des trypanosomes sont spécifiques de

<u>AVS</u>	<u>Séquence C-terminale</u>								
VSG 117	Trp	Glu	Asn	Asn	Ala	Cys	Lys	Asp <sup>.</sup>	*
VSG 121	Trp	Glu	Gly	Glu	Thr	Cys	Lys	Asp	*
IlTat 1.3	Trp	Glu	Gly	Glu	Thr	Cys	Lys	Asp	*
AnTat 1.1	Trp	Glu	Ala	Glu	Thr	Cys	Lys	Asp	*
AnTat 1.10	Trp	Glu	Gly	Glu	Thr	Cys	Lys	Asp	*
AnTat 1.1B	Trp	Glu	Gly	Glu	Thr	Cys	Lys	Asp	*
AnTat 1.8	Trp	Glu	Gly	Glu	Thr	Cys	Lys	Asp	*
VSG 55				Asn <sup>.</sup>	Thr	Thr	Gly	Ser <sup>.</sup>	*
VSG 60				Asn	Thr	Thr	Gly	Ser	*
VSG 221	Gly	Asn	Thr	Asn	Thr	Thr	Gly	Ser	Ser *
IlTat 1.1	Lys	Thr	Thr	Asn	Thr	Thr	Gly	Ser	*
TxTat 1	Lys	Thr	Ser	Asn	Thr	Thr	Ala	Ser	*

FIGURE 9 :

REPARTITION DES AVS EN FONCTION DES HOMOLOGIES DES SEQUENCES  
C-TERMINALES

- \* extrémité C-terminale
- . Site de glycosylation

variants et ne réagissent pas avec les trypanosomes hétérologues. Récemment, des auteurs ont infirmé cette notion et rapporté que les anticorps dirigés contre les AVS purifiés pouvaient présenter des réactions hétérologues (BARBET et Mc GUIRE (1978) (9) ; CROSS (1979) (42)).

La réactivité croisée a pu être décelée entre différents AVS d'une même espèce et aussi entre des AVS isolés de deux espèces différentes (BARBET et Mc GUIRE (1978) (9) ; LABASTIE et coll. (1981) (97)). Ces observations ont été négatives quand les tests de recherche de réaction croisée étaient réalisés sur le parasite. Ce résultat laisse supposer que les déterminants antigéniques intervenant dans la réactivité croisée des AVS purifiés sont inaccessibles à la surface du trypanosome et sont plutôt "enfouis" à l'intérieur du manteau de surface. Cette réactivité croisée est induite par des déterminants antigéniques dans lesquels la copule glucidique est répartie. La réaction croisée peut être supprimée par oxydation périodique (BARBET et coll. (1979) (10)) et n'est pas retrouvée sur les AVS non glycosylés synthétisés in vitro (LHEUREUX et coll. (1979) (111) ; HOEIJMAKERS et coll. (1980a) (79)). Récemment il a été précisé que seuls les glycopeptides C-terminaux semblaient capables de donner des réactions immunologiques croisées alors que les glycopeptides internes ne réagissaient pas (HOLDER et CROSS (1981) (81) ; HOLDER (1983b) (83)). Ce point sera évoqué à propos de notre étude de T. equiperdum.

PAYS et coll. (1983c) (129) ont montré récemment que deux antigènes sérologiquement indistinguables à la surface du trypanosome (AnTat 1.1 et AnTat 1.1B) pouvaient présenter néanmoins des séquences de DNA complémentaire différentes. Cette différence touche l'extrémité 3'. Le gène AnTat 1.1B est en fait une séquence chimérique dont la région 5' seule est identique avec la séquence correspondante du gène AnTat 1.1. Les auteurs en concluent donc que les déterminants antigéniques de surface communs à AnTat 1.1 et AnTat 1.1B sont localisés dans la moitié N-terminale de la molécule de glycoprotéine. Ce processus nous apparaît différent de celui décrit plus haut. Il laisse entendre que des AVS possédant des séquences acides aminés peu différentes dans leur moitié N-terminale peuvent représenter des étapes de "variation ponctuelle" dont le mécanisme d'apparition pourrait être particulier.

Dans ce cas précis, la sélection immunologique ne peut plus être définitivement évoquée pour expliquer la variation et son déclenchement.

#### 4- La glycosylation des AVS

STRICKLER et PATTON en 1980 (151) ont étudié l'inhibition de la glycosylation par culture des trypanosomes en présence de tunicamycine. Ils ont montré l'effet de l'antibiotique par le taux d'incorporation du mannose. La tunicamycine, bloque complètement l'incorporation des structures polymannosidiques liées à l'axe peptidique par une liaison de type N glycosidique. ROVIS et DUBE (1981) (142) ont étudié la séquence de glycosylation des AVS toujours en présence de tunicamycine et ont observé qu'il y avait en fait dans le temps deux étapes de glycosylation correspondant à des structures différentes de glycannes.

La première correspond à la glycosylation inhibée par la tunicamycine et qui se situe pendant la synthèse protéique et/ou immédiatement après.

La deuxième phase est représentative de glycannes dont l'incorporation est insensible à l'action de la tunicamycine. Leur synthèse a lieu après achèvement de celle de la chaîne protéique. Ils contiennent les déterminants antigéniques responsables "des réactions croisées". Cette notion de biosynthèse est en accord avec les résultats de HOLDER et CROSS (1981) (81) qui ont isolé deux types de glycopeptides.

- glycopeptides internes liés par des liaisons asparaginyli N-acétyl glucosamine

- glycopeptides liés au résidu C-terminal (sérine, acide aspartique ou encore asparagine).

Par ailleurs, en présence de l'antibiotique, l'AVS est transporté normalement au niveau de la membrane plasmique des parasites. Par conséquent, les glycannes sensibles à la tunicamycine ne semblent pas essentiels à la biogénèse du manteau de surface du parasite. Il semble néanmoins que les oligosaccharides jouent un rôle dans la protection de l'axe peptidique vis à vis de toute dégradation protéolytique (STRICKLER et PATTON (1980) (151) ; ROVIS et DUBE (1981) (142)).

Enfin, l'inhibition partielle par la tunicamycine de l'immunoprécipitation de certains AVS avec des antisérums hétérologues a montré que les sucres responsables des réactions croisées entre les AVS sont localisés sur des



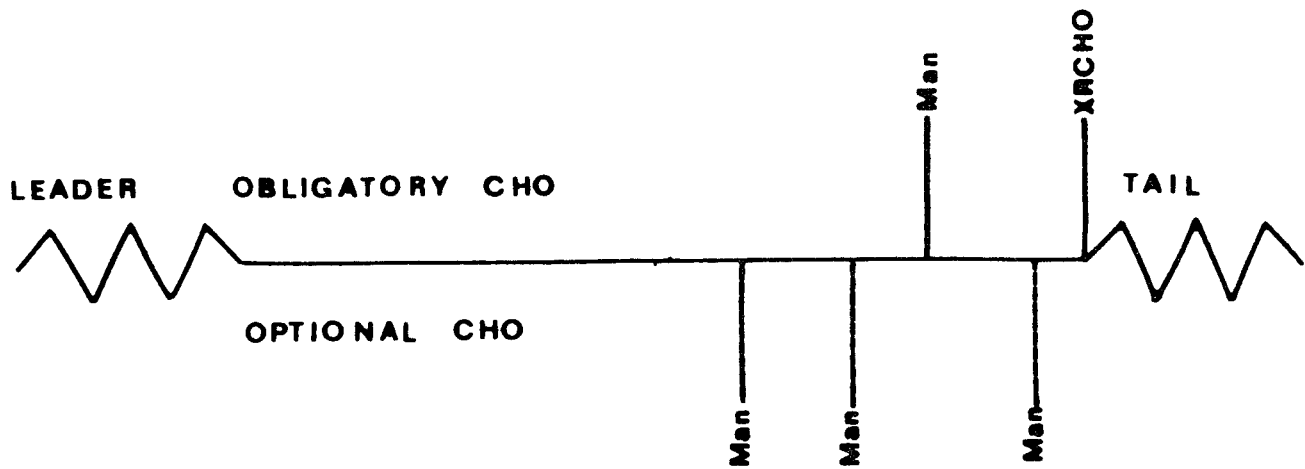
glycannes liés à la protéine par des liaisons N-glycosidiques et aussi par d'autres types de liaison. Cette hypothèse peut être corrélée avec les résultats de HOLDER et CROSS (1981) (81) selon laquelle, pour certains AVS de T. b. brucei, un site de glycosylation asparaginique est situé à proximité du résidu C-terminal.

BORST et CROSS (1982) (22) ont proposé un schéma représentatif de la structure des glycoprotéines de surface de T. b. brucei (figure 10). Les AVS sont formés d'un axe peptidique sur lequel est obligatoirement branchée une chaîne glycanique interne ayant un rôle essentiel et d'autres chaînes internes dont la présence est facultative. L'autre fait important est la glycosylation C-terminale qui semble jouer un rôle spécial. A ce propos, des travaux de HOLDER (1983a) (83) ont montré que la glycosylation C-terminale se fait par l'intermédiaire d'une éthanolamine unie par une liaison amide à la fonction carboxylique de l'acide aminé C-terminal.

#### 5- Organisation moléculaire du manteau

Le manteau de surface recouvre toute la surface du trypanosome. Il forme une barrière qui protège la membrane plasmique du parasite contre les anticorps, les facteurs sériques lytiques non spécifiques ou contre les cellules immunocompétentes de l'hôte (CROSS et JOHNSON (1976) (39)).

Le mode d'insertion des AVS dans la membrane demeure inconnu jusqu'à ce jour. Les seules indications à ce sujet concernent l'orientation des molécules. En effet, plusieurs expériences semblent prouver que l'extrémité C-terminale des AVS est orientée vers la membrane plasmique. CROSS et JOHNSON (1976) (39) ont montré que la concanavaleine A se liait aux AVS isolés mais ne se fixait pas sur le manteau de surface. Par ailleurs la digestion des AVS par la trypsine entraîne la libération d'une grande partie N-terminale de la molécule et laisse la partie C-terminal liée à la membrane (CROSS (1978) (41) ; JOHNSON et CROSS (1979) (93)). De la même manière, les anticorps dirigés contre le glycopeptide C-terminal portant les épitopes communs à plusieurs AVS ne réagissent pas avec les "parasites vivants" (BARBET et Mc GUIRE (1978) (9) ; CROSS (1979b) (43) ; HOLDER et CROSS (1981) (81)).



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

FIGURE 10

La question de savoir comment l'extrémité C-terminale des AVS se fixe sur la membrane plasmique reste encore posée. Deux hypothèses ont été émises afin d'expliquer le mode d'insertion des AVS :

- l'une se fonde sur l'importance du nombre de résidus chargés dans la région C-terminale : la liaison avec la membrane plasmique résulterait des interactions électrostatiques avec les groupements polaires des phospholipides membranaires (ALLEN et coll. (1982) (2)).

- l'autre tient compte du peptide C-terminal hydrophobe : une petite partie des AVS conserverait leur extrémité hydrophobe et stabiliserait la structure du manteau (BORST et CROSS (1982) (22)).

Seule une meilleure définition de la structure de la région C-terminale des AVS apportera une réponse au problème de l'ancrage des molécules d'antigènes à la surface du parasite.

## VII- Bases génétiques de la variation antigénique

Les techniques d'hybridation entre fragments génomiques et DNA complémentaires ont permis de progresser dans la connaissance des bases génétiques de la variation antigénique.

### A- Organisation des gènes

Des travaux concernant l'organisation des gènes codant pour les AVS ont été menés par plusieurs équipes. Trois points essentiels sont à retenir

- chaque trypanosome possède au sein de son génome tout le répertoire de gènes codant pour les AVS du sérotype auquel il appartient ; mais il ne peut en exprimer qu'un seul à la fois (WILLIAMS et coll. (1979) (170) ; HOEIJMAKERS et coll. (1980b) (80) ; BORST et coll. (1980) (17)).

- il existe différentes familles de gènes apparentés (ou isogènes) au niveau du génome de chaque variant (HOEIJMAKERS et coll. (1980b) (80) ; PAYS et coll. (1981a) (124)).

- l'expression des gènes fait intervenir différents types de réarrangements génomiques que nous détaillerons ultérieurement.

### B- Mode d'expression des gènes

Un membre de la famille des gènes sera utilisé comme modèle

pour la transcription : il s'agit de la "copie de base" (BC : Basic Copy).

1- Premier mécanisme : La Duplication-transposition

L'expression de certains gènes implique une duplication de la copie de base. La nouvelle copie synthétisée (ELC = Expression Linked-Copy) est transposée au niveau d'un site d'expression télomérique où elle est transcrite. Ce processus a été observé dans les clones de T. b. brucei (HOEIJMAKERS et coll. (1980b) (80) ; BORST et coll. (1980) (17) ; FRASCH et coll. (1980) (54) ; PAYS et coll. (1981a) (124) ; (1981b) (125) ; BERNARDS et coll. (1981) (12) ; MAJIWA et coll. (1982) (115)) ; T. b. gambiense (PAYS et coll. (1981c) (126) ; (1981d) (127) ; (1983a) (128)) ; T. b. rhodesiense (PAYS et coll. (1981d) (127) ; (1983a) (128)) et T. equiperdum (LONGACRE et coll. (1983) (112)). C'est le premier mécanisme qui a été décrit.

a) L'ELC est un gène actif

PAYS et coll. (1981a) (124) ont montré que l'ELC du gène AnTat 1.1 est plus sensible que la copie de base à l'action de la désoxyribonucléase I. Cet enzyme se caractérise par une action plus marquée au niveau de la chromatine active que de la chromatine inactive chez les eucaryotes (WEINTRAUB et GROUDINE (1976) (168)). Ces résultats tendaient à montrer que l'ELC est utilisée pour la transcription. La preuve directe a été apportée par les expériences de digestion des hybrides mRNA-copie de base par la nucléase SI (BERNARDS et coll. (1981) (12)). Les auteurs ont montré que les copies de base des gènes 117 et 118 diffèrent au niveau des 100 à 150 derniers nucléotides précédant l'extrémité poly(A). Ils ont par conséquent conclu que les ELC constituent les gènes actifs et que, durant le processus de duplication-transposition qui donne naissance à l'ELC, l'extrémité 3' est remplacée par une nouvelle extrémité 3'.

b) Analyse du site d'expression

Les premiers renseignements sur le site d'expression des gènes codant pour les AVS proviennent des travaux de PAYS et coll. (1981a) (124) qui ont étudié les séquences de deux clones de T. b. brucei exprimant le même type antigénique (AnTat 1.1). La comparaison des copies additionnelles a permis aux auteurs de postuler que la même copie de base a servi de modèle pour la synthèse des ELCs et ces dernières sont transposées au niveau de site d'expression apparemment identiques. VAN DER PLOEG et coll. (1982a) (154) ont aussi montré que le site d'expression pour le gène 117 et le

gène 118 apparaissait similaire, ceci d'après l'examen des cartes endonucléasiques des ELCs correspondantes. Le site d'expression se caractérise par une absence de sites enzymatiques de restriction de part et d'autre du segment transposé sur une longueur respective de 6 kb en avant et 8 kb en arrière. Au delà du segment 8 kb, l'on trouve une position qui est un site de clivage pour 15 endonucléases différentes. Pour expliquer ce fait inhabituel, les auteurs ont suggéré que ce site représente la fin de la molécule de DNA.

De l'observation se dégage l'idée d'une région riche en succession d'adénine et de thymine contenant des petites séquences répétitives suffisamment homogènes.

Récemment MICHIELS et coll. (revu par BERNARDS (1982) (13)) ; BORST et CROSS (1982) (22)) ont analysé les ELCs de 2 clones différents exprimant le gène 118. Les auteurs ont également retrouvé une similitude au niveau des sites d'expression mais ils ont trouvé que les séquences caractéristiques de DNA différaient au niveau de leur taille (en avant par une insertion de 10 Kb) et en arrière par une délétion de 2,7 kb). Selon BORST et CROSS (1982) (22), ces régions de DNA seraient constituées de petites unités répétitives et pourraient varier de taille par des duplications ou des délétions de ces unités. Les auteurs n'excluent pas toutefois qu'il est possible que les gènes soient insérés dans des positions différentes au sein d'un site d'expression ou bien que plusieurs sites d'expression différents soient présents.

#### c) Mécanisme de transposition

La transposition de copie additionnelle s'accompagne d'un remplacement de son extrémité 3', différente de celle de la copie de base. Ce changement se fait par recombinaison entre une séquence de DNA du site d'expression et l'extrémité 3' de la copie additionnelle (BERNARDS et coll. (1981) (12)).

Plusieurs auteurs ont montré que le segment transposé a une taille supérieure à celle des mRNAs correspondants. Ces résultats impliquent donc qu'un segment supplémentaire de DNA est calqué et transposé en même temps que la séquence caractéristique du mRNA (BERNARDS et coll. (1981) (12) ; PAYS et coll. (1981a) (124) ; VAN DER PLOEG (1982b) (155)). Ce segment 5' cotransposé a été retrouvé au niveau de transcriptats plus courts et aussi plus longs que le mRNA mature suggérant que le gène est transcrit sous forme d'un

précurseur de plus grande taille qui serait ensuite coupé. Sur la base de ces observations, BERNARDS (1982) (13) a proposé un schéma de formation de l'ELC et de synthèse de mRNA (figure 11). Dans ce modèle, la transcription commence avant le segment transposé et le site d'expression fournit donc le promoteur pour initier la transcription du gène. Le premier produit de transcription est ensuite remanié pour donner naissance au mRNA mature, muni d'une nouvelle extrémité 5' indépendante du segment cotransposé. BOOTHROYD et CROSS (1982) (19) ont étudié la séquence nucléotidique des extrémités 5' de la copie de base et du mRNA de l'AVS 117. Ces auteurs ont également mis en évidence l'existence d'un mini-exon de 35 nucléotides. Cette séquence semble être présente sur tous les mRNA matures. Plusieurs gènes sont activés par ce mécanisme (AnTat 1.1, AnTat 1.3, AnTat 1.8, AnTat 1.13, AnTat 1.30).

2- Deuxième mécanisme : expression de gènes non liée à la production d'une "copie liée à l'expression"

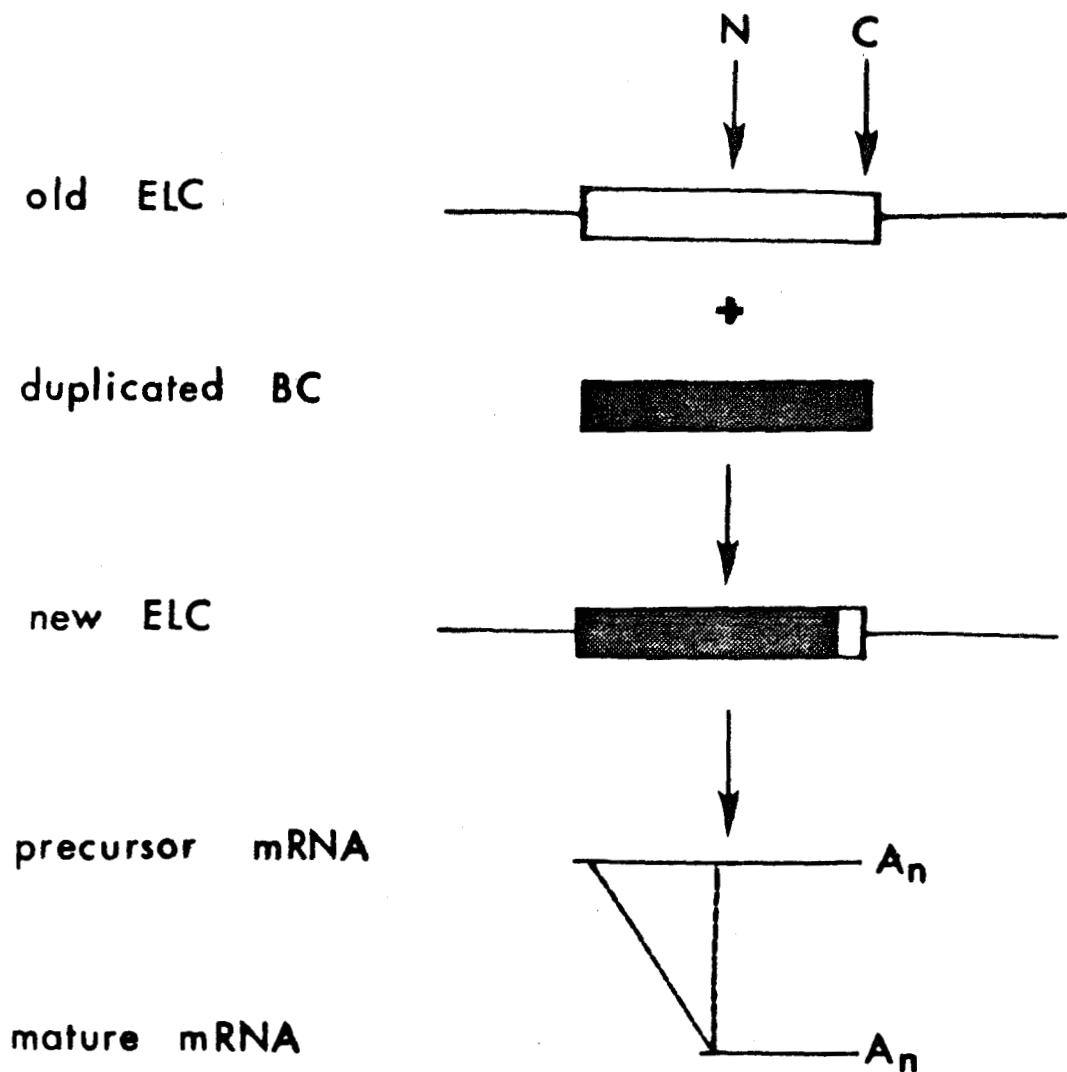
D'autres travaux ont montré que certains gènes étaient exprimés sans apparition d'une copie liée à l'expression (WILLIAMS et coll. (1979) (170) ; (1980) (171) ; BORST et coll. (1980) (21) ; BERNARDS (1982) (13) ; BOOTHROYD et CROSS (1982) (19)) ; PAYS et coll. (1983d) (130). Les gènes concernés sont les suivants : AnTat 1.6, VSG 221, IITat 1.2, IITat 1.3, IITat 1.4.

En outre ces gènes présentent d'autres particularités :

- . ils sont présents sous forme de copies multiples (WILLIAMS et coll. (1980) (171) ; MAJIWA et coll. (1982) (117) ; YOUNG et coll. (1983) (174)).
- . les copies sont localisées au niveau des séquences télomériques du génome (YOUNG et coll. (1983) (174)).

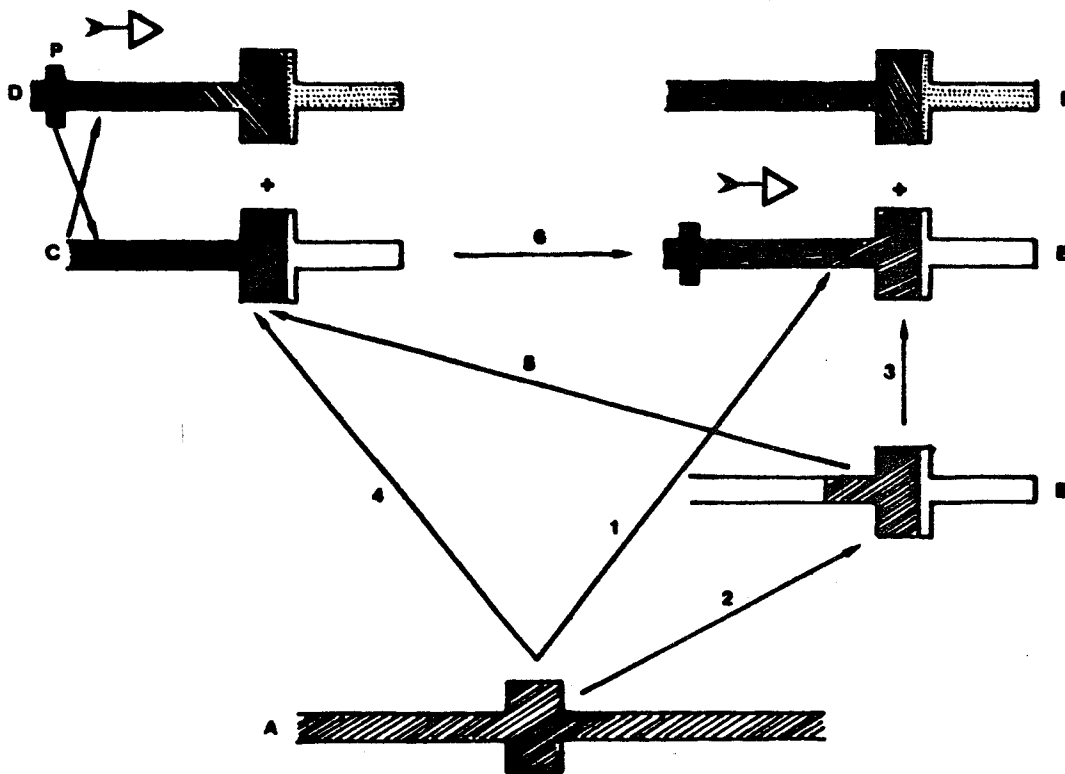
YOUNG et coll. (1983) (174) pensent que la copie exprimée résulte d'un processus de duplication suivi d'une transposition vers un site télomérique.

D'autre part BOOTHROYD et CROSS (1982) (19) ont montré que les mRNA issus de ces gènes avaient la même séquence 5' de 35 nucléotides que le mRNA provenant des ELC, suggérant par conséquent que l'activation de ces gènes utilisait le même promoteur. L'activation des gènes sans ELC se ferait par un échange entre l'extrémité 3' du chromosome portant le gène télomérique et le site d'expression (TURNER (1983) (152) ; BORST et coll. (1983) (23) selon le schéma de la figure 12. Ce processus expliquerait le fait que l'expression des gènes sans ELC ne résulte pas systématiquement en la disparition de l'ELC correspondant au type antigénique précédent.



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

FIGURE 11



TURNER M. Nature, 303, 202, (1983)

Comparaison des voies d'activation des gènes avec ou sans ELC (Turner M. (1983)).

1 : Une copie de base d'un gène non télomérique (A) est calquée et transposée vers un site d'expression (E) pour donner une ELC.

2 + 3 : Cette voie peut également passer par un site télomérique intermédiaire (B).

4 : Le processus pourrait aussi donner un gène "non-ELC" directement ou

2 + 5 : en passant par un intermédiaire (B).

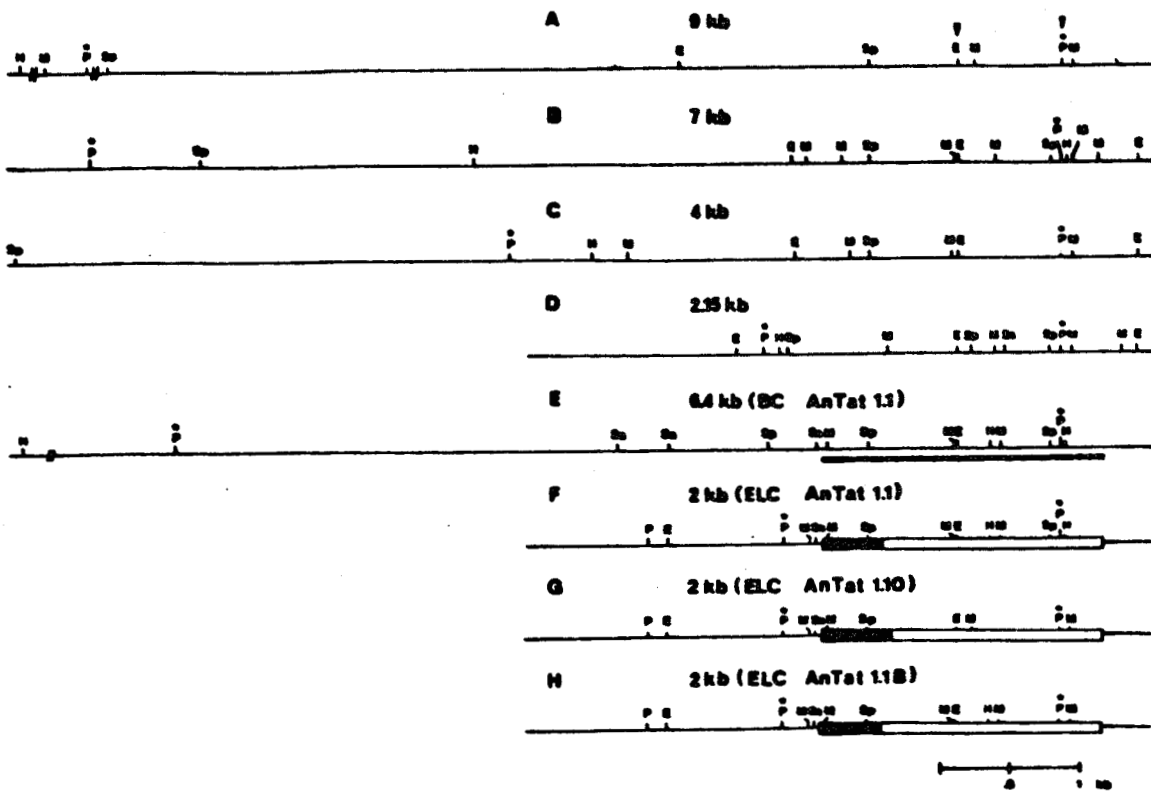
6 : Les gènes "non-ELC" sont exprimés grâce à un échange réciproque d'extrémité chromosomale entre le gène et un unique site d'expression (D) pour produire une copie exprimée (E) et une ELC persistante (F). Les zones élargies représentent les séquences trouvées dans le mRNA de l'AVS. La lettre P indique la position du promoteur.

Figure 12

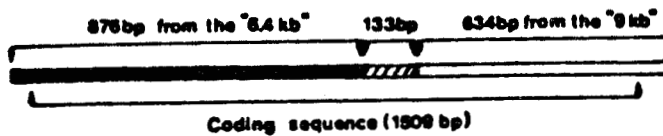


3- Troisième mécanisme : la conversion de gènes entre différents membres d'une même famille de gènes

PAYS et coll. (1983) (129) ont fait une analyse détaillée des ELCs de 2 clones successifs de T. b. brucei (AnTat 1.10 et AnTat 1.1B) dérivant du clone AnTat 1.1. D'après les auteurs, ce changement antigénique résulte d'un réarrangement génomique faisant intervenir une conversion de gènes (Figure 13).



Les 5 membres de la famille des gènes AnTat 1.1 (lettres A E) sont désignés selon la taille du fragment qui les inclut après coupure par l'enzyme Pst I. La ligne sous la carte E indique la longueur de l'élément transposé. Les rectangles clairs au niveau des cartes F, G et H recouvrent la partie de séquence, qui est aussi trouvée dans le cDNA. Les rectangles noirs représentent les séquences cotransposées. La jonction entre les deux n'est pas précisément connue pour l'ELC d'AnTat 1.10. Le passage AnTat 1.1 à AnTat 1.10 correspond au remplacement de l'ELC d'AnTat 1.1 (F) par une copie faite à partir du gène "9 kb" (A). Le passage AnTat 1.10 à AnTat 1.1b correspond au remplacement partiel de l'ELC préexistente par une nouvelle copie (mais incomplète) faite à partir du gène "6,4 kb" (E), selon le schéma suivant :



En plus, un troisième gène non identifié pourrait avoir été impliqué dans l'élaboration de l'ELC AnTat 1.1b puisque cette dernière comprend un domaine de 133 bp qui diffère à la fois des gènes "6,4 kb" et "9 kb". Une autre hypothèse serait que ce domaine soit une copie imparfaite de la séquence correspondante du gène 6, 4 kb (Pays et Coll (1983) (80).

Figure 13

## TRAVAUX PERSONNELS

### ETUDE DE BOTAT-1

#### INTRODUCTION

T. equiperdum représente le modèle parasitaire sur lequel nous nous sommes fondés pour l'étude des AVS. Il est responsable d'une affection grave chez le cheval mais il est non pathogène pour l'homme.

La souche princeps de T. equiperdum utilisée a été fournie en 1961 au laboratoire d'Immunologie et de Biologie parasitaire de Bordeaux par l'Institut Pasteur de Paris. L'entretien de la souche se fait par passages successifs sur souris tous les 2 à 3 jours. En 1971, le groupe de Bordeaux a isolé par clonage un type antigénique dominant, désigné selon la nomenclature de LUMSDEN et Coll. (1967) (114) : BoTat-1 (Bordeaux Trypanozoon antigenic type 1). Ce stabilat est conservé à -196° C dans l'azote liquide.

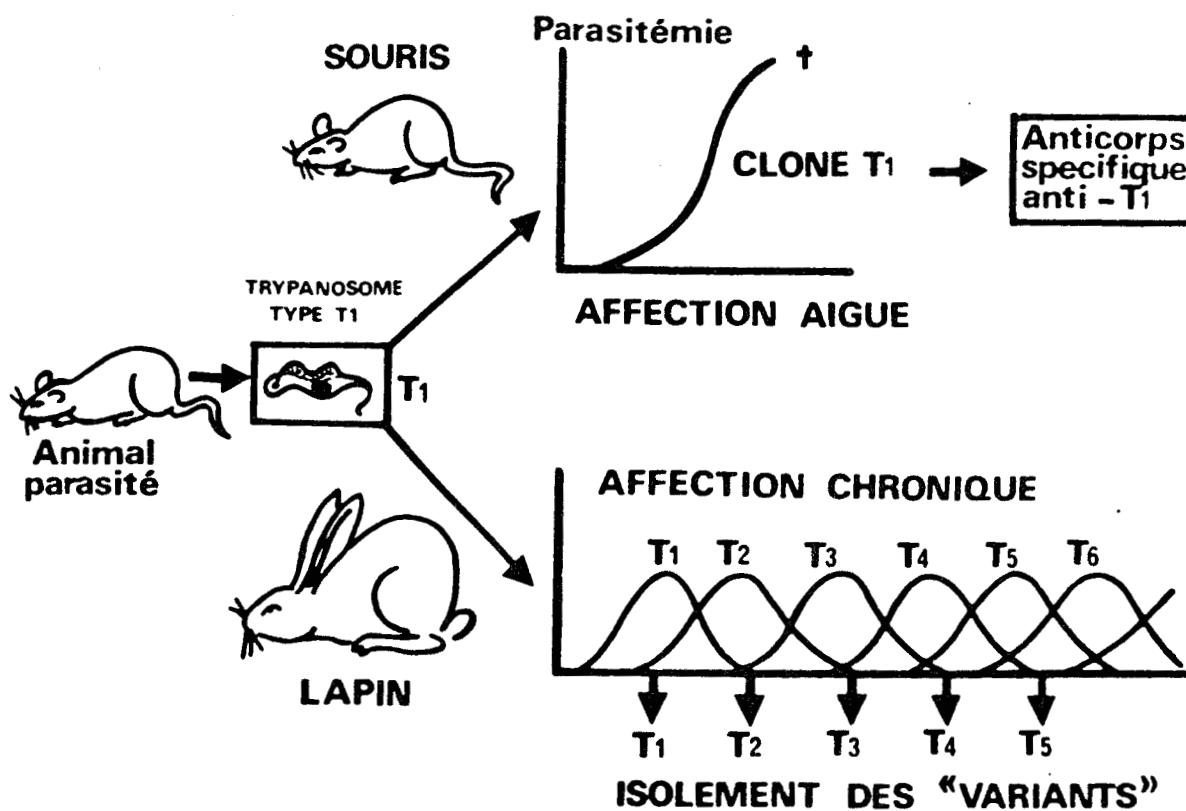
CAPBERN et Coll. (1977) (29) se sont basés sur ce variant dominant pour étudier le phénomène de variation antigénique chez le lapin. Les auteurs ont montré que l'infection chronique chez le lapin est caractérisée par l'apparition successive de pics parasitémiques en rapport avec des changements de type antigénique du trypanosome (Figure 14). Par contre, chez la souris et le rat le caractère aigu de l'affection conduit à une seule vague parasitémique rapidement mortelle au bout de 6 à 7 jours.

Au cours de cette étude, 101 clones de trypanosomes antigéniquement différents ont été isolés. Ainsi CAPBERN et Coll. (1977) (29) ont pu déterminer de façon plus précise la séquence d'apparition des sérotypes en suivant l'évolution des anticorps spécifiques. Les résultats obtenus sont les suivants :

- le premier sérotype développé chez chaque lapin correspond toujours au clone inoculé,
- chez les lapins infestés avec un clone différent, le premier variant qui se développe appartient au type BoTat-1 qui représente le type antigénique de base de la souche.

Enfin, les sérotypes ont été répartis selon leur séquence d'apparition en trois catégories :

- types "précoces", se développant en général dans les trois premières semaines de la maladie.



Evolution comparée de la parasitémie chez la souris et le lapin

FIGURE 14

- types "semi-tardifs", apparaissant après trois semaines
- types "tardifs", isolés chez les lapins ayant survécu plus d'un mois.

## I- Préparation des AVS de T. equiperdum

### A./ Clonage de populations antigéniques

La technique de clonage utilisée dérive de celle proposée par INOKI (1960) (88) pour T. gambiense : le sang des lapins parasités est prélevé et inoculé à des souris. Lorsque la parasitémie développée chez ces souris est suffisante, un prélèvement de sang est effectué et après dilution dans un tampon approprié, un parasite unique est repéré au microscope optique et inoculé à une nouvelle souris. L'inoculation à la souris d'un seul parasite suffit pour provoquer une infection aigue, au terme de laquelle la parasitémie est intense. De cette façon, il est donc possible d'obtenir des populations de T. equiperdum antigéniquement homogènes.

### B. Infestation des rats

Elle permet d'obtenir des quantités de parasites plus importantes. Des rats Wistar mâles d'un poids moyen de 500 g sont infestés par voie intrapéritonéale. Les inoculums correspondent à  $10^8$  trypanosomes issus d'une population clonée, conservée à  $-196^\circ$  C dans l'azote liquide. Au bout de trois jours, la parasitémie est intense provoquant la mort de l'animal sans qu'il y ait eu variation antigénique. Les trypanosomes obtenus sont homogènes à 99,99 %. L'homogénéité est vérifiée par des techniques radioimmunologiques ou par immunofluorescence indirecte à l'aide d'antisérums spécifiques de variants.

### C. Isolement des trypanosomes

Les rats infestés sont sacrifiés et le sang est prélevé sous héparine. Ce sang est ensuite dilué de moitié par une solution saline de faible molarité NaCl 0,045 M,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,057 M,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,003 M, glucose 1 % (eau physiologique T.G.). L'addition de dextran (Pharmacia) suivie d'une centrifugation à faible vitesse, permet d'éliminer la majeure partie des hématies. Le surnageant est alors déposé sur une colonne de DEAE cellulose à

pH8 selon le protocole de LANHAM et GODFREY (1970) (100) afin de parfaire la purification des trypanosomes, qui après cette étape restent vivants.

#### D. Libération du manteau de surface

Les trypanosomes sont lavés plusieurs fois par de l'eau physiologique T.G., puis repris dans 120 ml de tampon phosphate 0,125 M pH 5,5 contenant 1 % de glucose. Cette suspension est laissée une nuit à 4° C sur agitateur de KLINE. Ce traitement provoque la libération des constituants du manteau de surface dans le milieu. Après centrifugation on obtient un surnageant qui est dialysé contre une solution de NaCl 0,5 M. Il contient des antigènes variables et d'autres constituants membranaires et cytoplasmiques. Le matériel insoluble est éliminé par ultracentrifugation à 50.000 g pendant 1 h à 4° C. Le surnageant ainsi obtenu constitue "l'extrait antigénique brut".

#### E. Purification des AVS

La purification des AVS de T. equiperdum tient compte de leur rétention sélective sur la concanavoline A. Ainsi "l'extrait antigénique brut" est déposé sur une colonne de sépharose concanavoline A. Les antigènes communs non retenus sont élués par une solution de NaCl 0,5 M. Lorsque l'absorption densitométrique de ce premier éluat devient nulle, les AVS sont élués par une solution de NaCl 0,5 M contenant de l' $\alpha$ -D mannoside à 10 % (P/V). Ce deuxième éluat est dialysé contre de l'eau désionisée puis lyophilisé. L'état de pureté de la préparation d'AVS obtenue s'avère satisfaisant après contrôle sur gel de polyacrylamide en présence de SDS.

Plusieurs AVS répartis dans les différentes catégories précitées ont été préparés selon 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.

Nous avons pu ainsi entreprendre une étude des AVS de T. equiperdum avec une définition structurale plus approfondie de l'AVS BoTat-1.

## II- Caractéristiques physico-chimiques

### A- Masse moléculaire

La préparation d'antigène a été analysée selon la technique de LAEMMLI (1970) (98) afin de déterminer la masse moléculaire apparente et de vérifier également l'homogénéité. L'AVS BoTat-1 se présente sous forme d'une seule bande correspondant à environ 53.000. Lorsque l'AVS est réduit, l'on note une augmentation de la masse moléculaire apparente d'environ 8.000. Ceci démontre bien l'importance des ponts disulfure dans la conformation des AVS et le rôle de ceux-ci au cours de la migration.

### B- pHi et structure secondaire

Le pHi a été déterminé par isoélectrofocalisation sur gel de polyacrylamide à 5 %. Les détails concernant le mode opératoire sont donnés dans l'appendice technique. L'examen du gel montre une bande majeure de pHi 8,3 et des bandes mineures (8,6 ; 7,7 ; 7,1).

La structure secondaire a été établie par dichroïsme circulaire. Le spectre dichroïque obtenu est représenté sur la figure 15. Les pourcentages respectifs des structures hélicoïdales, feuillets plissés et de l'ensemble coude  $\beta$  - structure inorganisée sont illustrés dans le tableau 3. L'AVS BoTat-1 se caractérise par une conformation particulièrement riche en hélice  $\alpha$  (près de 50 %) et la structure en feuillets plissés se trouve dans les mêmes proportions que l'ensemble coude  $\beta$  -structure inorganisée.

### C- Composition amino acide

La composition amino acide a été obtenue suivant la technique classique d'hydrolyse chlorydrique 5,6 N pendant 24 h à 110° C suivie d'une analyse quantitative sur une résine monocolonne. Le dosage de certains résidus amino acides a nécessité l'utilisation de traitements particuliers tels que :

- la transformation des résidus cystéine et cystine en acide cystéique
- l'hydrolyse par l'acide mercaptosulfonique afin de doser les résidus de tryptophane

Hélice	49 %
Feuillets plissés	25 %
Structure inorganisée et $\beta$ turn	26 %

Evaluation de la structure secondaire de  
l'AVS BoTat-1

TABLEAU 3



SPECTRE DICHROIQUE DE L'AVS BoTat-1

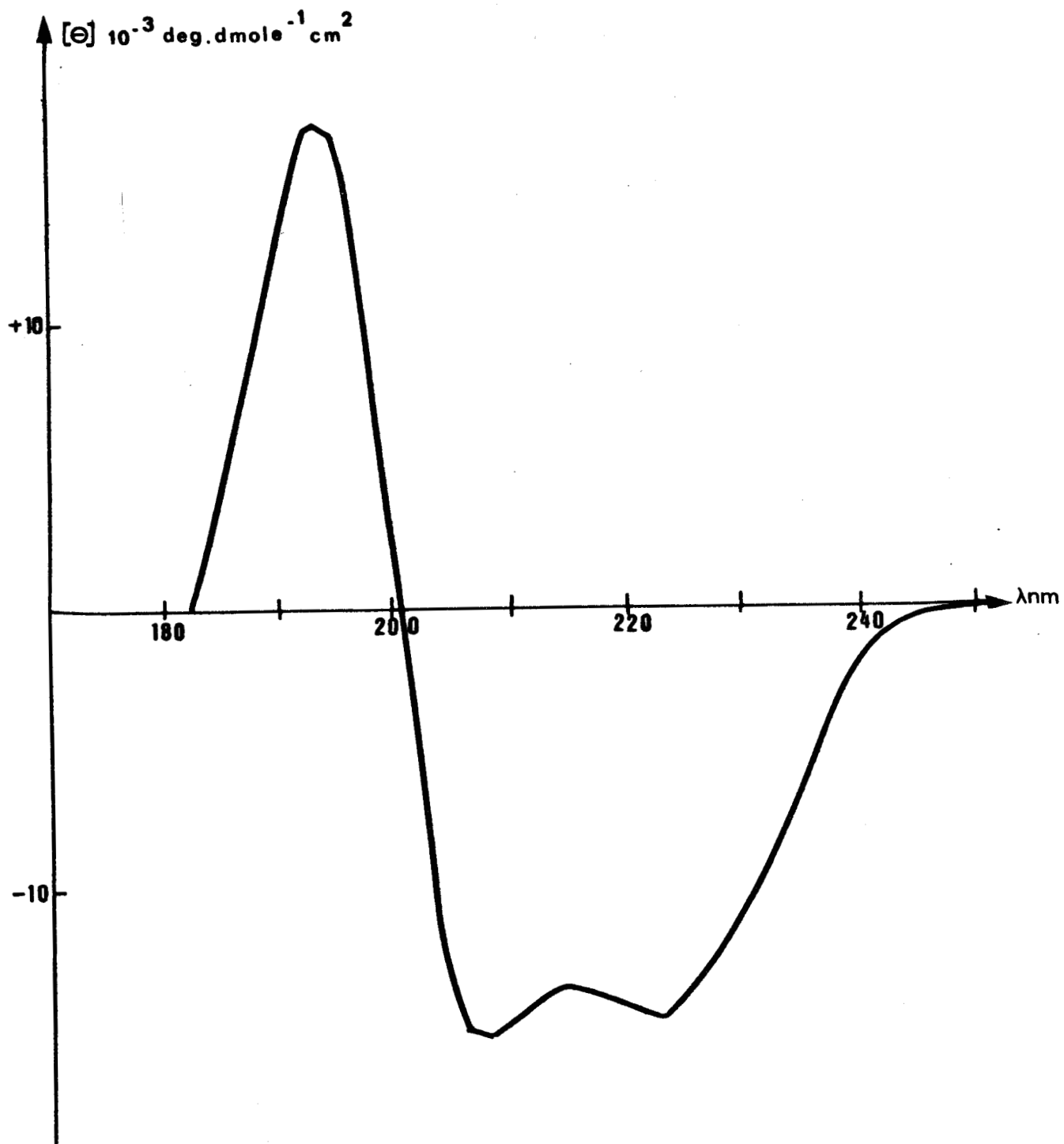


FIGURE 15

L'analyse des résultats (Tableau 4) nous permet de remarquer une forte proportion des résidus d'acides aminés dicarboxyliques, d'alanine, de leucine et de lysine.

Le nombre de résidus par mole de glycoprotéine a été calculé (Tableau 4) en fonction de la masse moléculaire apparente de l'AVS natif déterminé en gel de polyacrylamide.

#### D- Composition glucidique

Les oses ont été dosés par chromatographie en phase gazeuse après méthanolyse en milieu acide (voir appendice technique). Le tableau 5 montre que les oses caractérisés dans l'ordre quantitatif décroissant sont : le mannose, le galactose, la N-acétylglucosamine et des traces de glucose. Les faibles quantités de glucose dosé peuvent laisser supposer une contamination du matériel au cours de la préparation. La détermination de la structure complète permettra de vérifier l'existence ou non de glucose dans la copule glucidique des AVS.

#### E- Dosage du phosphore

Deux techniques ont été utilisées pour mettre en évidence le phosphore

- . la mesure de l'incorporation de  $^{32}\text{P}$  dans la molécule d'antigène
- . le dosage du phosphore organique selon la technique au vert malachite d'ITAYA et MICHIO (1966) (89). Les résultats présentés dans le tableau 6 montrent qu'une mole de phosphore est dosée pour une mole d'antigène.

Il restait alors à définir le mode d'attachement du groupement phosphate au reste de la molécule. Les AVS ont alors été soumis à divers traitements.

- l'utilisation de la technique de CAPONY et Coll. (1983) (30) a permis d'établir qu'il ne s'agit pas d'une liaison ester entre le groupement phosphate et un résidu de sérine, de thréonine ou de tyrosine.

La radioactivité des AVS marqués au  $^{32}\text{P}$  s'avérait stable après traitement par l'hydroxylamine ou par une solution alcaline diluée. Ce résultat permettait d'exclure l'hypothèse d'une liaison acyl-phosphate au niveau du résidu d'acide

COMPOSITION EN ACIDES AMINES DE LA  
GLYCOPROTEINE PURIFIEE DU VARIANT BoTat-1

Acides aminés	* Nombre de résidus par mole de glycoprotéine	Nombre de résidus pour 100 résidus d'acides aminés dosés.
ASX	62	13,36
THR	36	8,90
SER	22	5,41
GLX	45	11,00
PRO	15	3,60
GLY	32	7,96
ALA	70	15,12
VAL	12	2,59
CYS	10	2,19
MET	5	1,13
ILE	11	2,36
LEU	42	9,15
TYR	10	2,20
PHE	10	2,14
LYS	37	8,06
HIS	3	0,57
TRP	2	0,51
ARG	17	3,65
	<hr style="width: 10%; margin: 0 auto;"/> 441	

\* Le nombre de résidus est calculé en fonction de la masse moléculaire apparente de l'AVS déterminée en gel de polyacrylamide soit 53.000.

TABLEAU 4

COMPOSITION GLUCIDIQUE DE L'AVS BoTat 1

Monnosaccharides	Nombre de $\mu$ moles par gramme de glycoprotéine
Mannose	226
Galactose	116
Glucose	9
N-acétylglucosamine	118

TABLEAU 5

DOSAGE DU CONTENU EN PHOSPHATE  
DE L'AVS BoTat-1

---

Contenu protéique (nanomoles)	Contenu en phosphate (nanomoles)
5	4,5
10	9
15	15

---

TABLEAU 6

aspartique ou d'acide glutamique.

Cette liaison est également stable en présence de phosphatase alcaline.

La stabilité de cette liaison après plusieurs étapes de précipitation trichloracétique (16 % p/p) dont une est effectuée à 80° pendant 20 minutes, permet d'exclure l'éventualité d'une liaison du type phosphohistidine qui est labile en milieu acide.

Ces résultats montrent bien que le type de liaison entre la glycoprotéine de surface et le groupement phosphate est différent des liaisons classiques que l'on trouve habituellement dans les phosphoprotéines.

### III- Etude de l'axe peptidique

Le but de notre étude était de préparer de gros fragments peptidiques dont l'étude en séquence de EDMAN allait nous permettre de les situer sur l'axe peptidique et de déterminer le ou les sites de glycosylation de cette glycoprotéine de surface.

L'étude directe de la molécule native sur séquenceur automatique a permis de connaître la nature des 20 premiers résidus. Par la suite, nous avons testé l'action d'un certain nombre d'enzymes protéolytiques, dans le but d'établir un protocole permettant l'obtention de gros fragments peptidiques utilisables sur séquenceur. Les résultats obtenus étant peu satisfaisants, nous nous sommes tourné vers les techniques chimiques de coupure qui, bien que donnant des rendements parfois plus limités, sont plus spécifiques. Une seule méthodologie a été retenue : le clivage par le bromure de cyanogène (BrCN) spécifique des liaisons méthionyl-X, méthode qui s'est avérée très positive tant sur le plan qualitatif que quantitatif.

#### Clivage de la glycoprotéine par le BrCN

Le clivage par le BrCN nous a permis d'obtenir du matériel de bonne qualité. Cette technique a servi de base à l'étude visant à établir la structure primaire de l'axe peptidique de BoTat-1.

## 1- Principe de la réaction

D'après GROSS et WITKOP (1961) (66) le clivage des liaisons méthionyl débute par la formation d'un bromure de cyanosulfonium qui, en milieu acide, se scinde en méthyl-thiocyanate et en bromhydrate d'iminolactone de l'homosérine ; ce dernier subit un réarrangement qui conduit à la libération de la lactone de l'homosérine et d'un fragment ayant en position N terminale l'acide aminé lié au départ à la fonction carboxylique de la méthionine (Tableau 7). Notons que SCHROEDER et Coll. (1969) (144) ont signalé que la nature de l'acide aminé voisin de la méthionine est déterminante dans la possibilité de cliver mais aussi influencer le rendement réactionnel. Ces auteurs ont en effet montré que la coupure était incomplète lorsque par exemple une sérine ou une thréonine est liée à la méthionine (Tableau 7).

Le clivage par le BrCN a été réalisé sur la glycoprotéine préalablement réduite et alkylée afin d'éviter les réactions intramoléculaires au niveau des liaisons méthionine-cystéine (Tableau 7). Le mode opératoire est décrit dans l'appendice technique.

## 2- Résultats

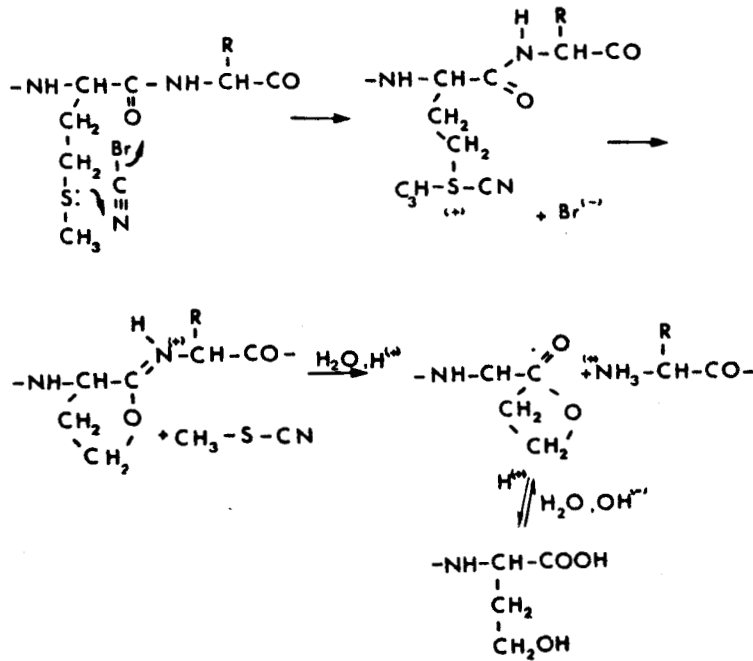
Les produits de clivage ont été analysés en électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (Figure 16).

On observe essentiellement 4 bandes dont les tailles moléculaires apparentes sont respectivement : 13 000, 18 000, 22 000, 29 000.

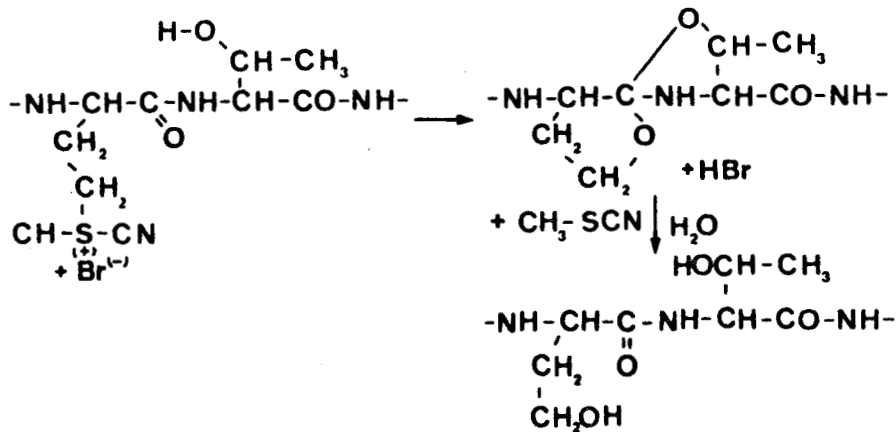
D'autre part, la même préparation a fait l'objet d'une étude par chromatographie de gel filtration sur colonne de Biogel P<sub>100</sub> en milieu acide acétique 0,1 N. La figure 17 représente les profils obtenus après la lecture spectrophotométrique à 230 nm, les dosages à l'orcinol sulfurique et à la minhydrine.

L'étude électrophorétique sur gel de polyacrylamide de chacune des dix fractions obtenues montre qu'elles sont hétérogènes. Mais, on note dans tous les cas la présence d'importance variable d'une bande voisine de 22 000.

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)

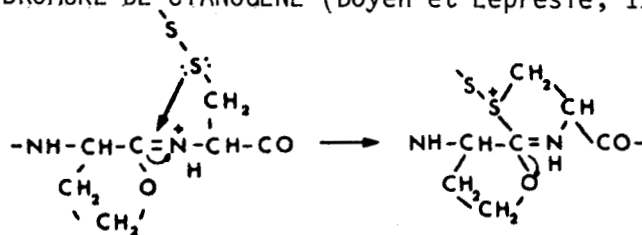
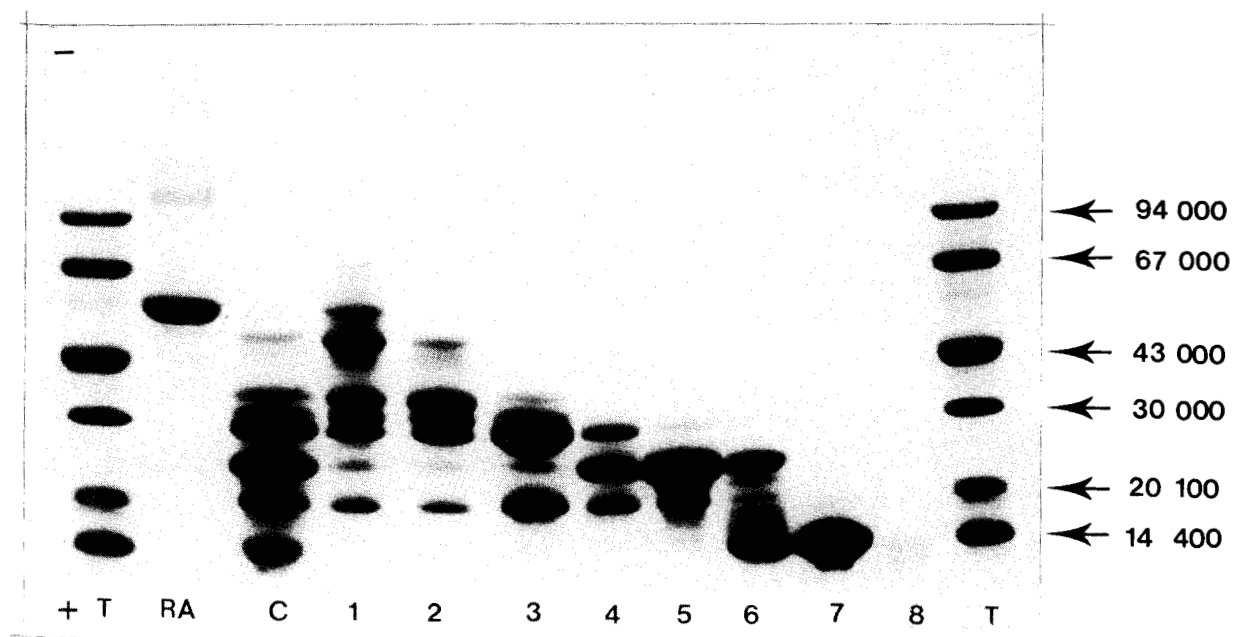


TABLEAU 7



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 F<sub>1</sub> à F<sub>8</sub> Biogel P100

FIGURE 16

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)

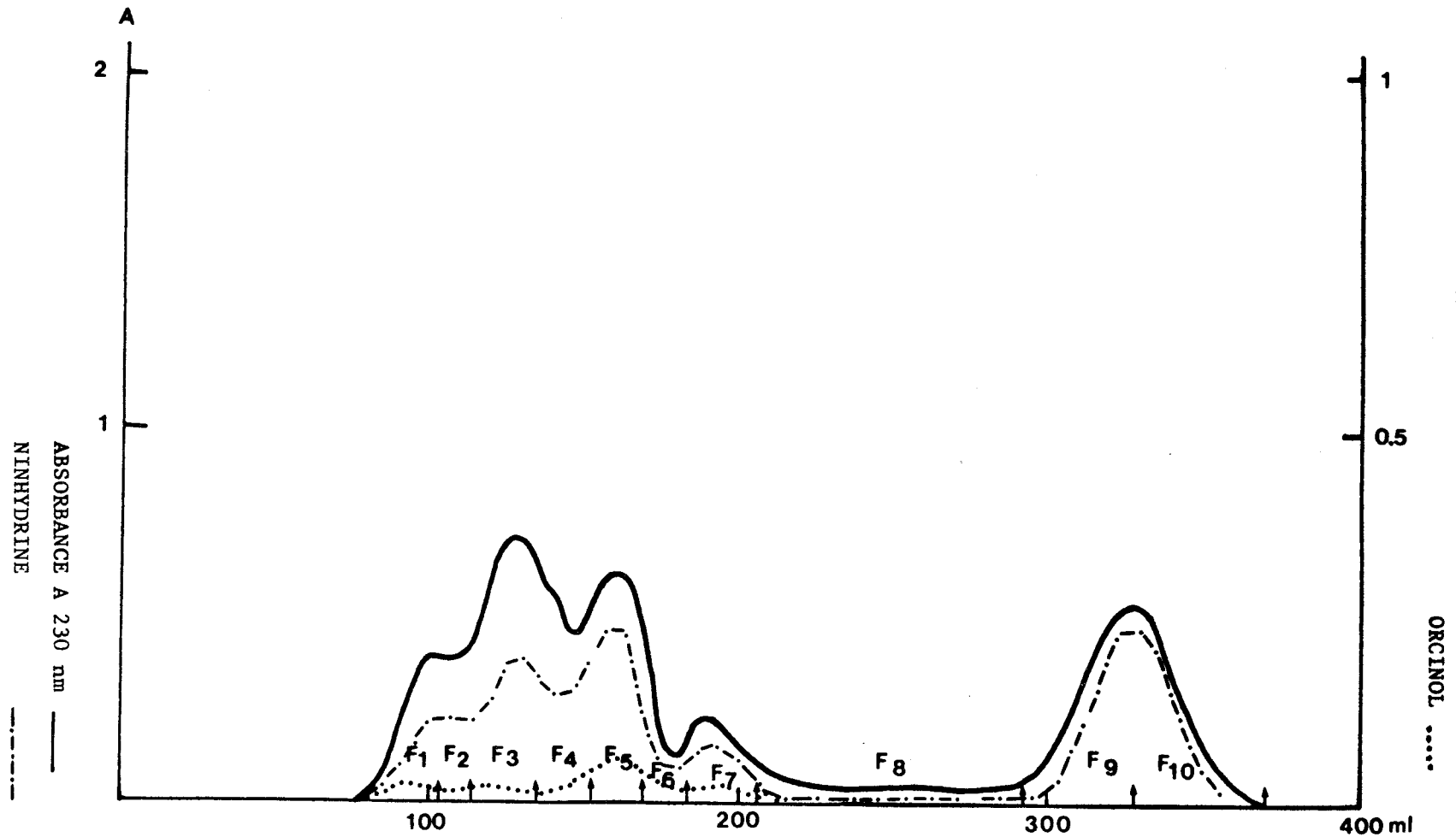


figure 17

a) Composition amino-acide

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 8. Malgré l'hétérogénéité des préparations, certains points remarquables sont à noter en particulier pour les fractions  $F_5$  et  $F_7$ .

- la fraction  $F_7$  présente une très grande richesse en résidus hydrophobes (19,37 % Ala et 14,01 % Leu) alors que dans la fraction  $F_5$ , l'on note une plus faible proportion des mêmes résidus (10,86 % Ala et 9,66 % Leu). La fraction  $F_5$  est riche en résidus hydrophiles (Lys, Glu ou Gln) qui existent en faible quantité dans la fraction  $F_7$ .

Si l'on se réfère aux données bibliographiques concernant la structure des AVS, la fraction  $F_5$  contient ou représente la partie C-terminale hydrophile. Cette hypothèse se trouve confortée par le pourcentage élevé des carboxyméthylcystéines dosées. La fraction  $F_7$ , quant à elle, semble représenter une autre portion de la molécule que nous sommes parvenus à localiser.

b) Séquence amino-acide

Trois fractions ont été étudiées :  $F_3$ ,  $F_5$  et  $F_7$ . Les séquences ont d'abord été déterminées manuellement, puis sur séquenceur automatique Beckman 890 C. A chaque cycle, plusieurs dérivés amino-acide sont obtenus, la détermination quantitative des phénylthiohydantoïnes (PTH) amino-acides par chromatographie liquide de haute performance (HPLC) nous a permis d'interpréter deux séquences à la fois, dans la mesure où les deux structures peptidiques se trouvent en proportion nettement différente dans le mélange. Les résultats sont présentés dans le tableau 9. Il montrent aussi que d'une fraction BrCN à l'autre, les séquences mineures sont retrouvées à plusieurs reprises, ce qui ajoute encore à la validité de l'interprétation.

IV- Etude de la copule glucidique

A. Composition glucidique

Le tableau 10 présente la composition en sucres des différentes fractions. Les mêmes fractions précédemment citées se sont révélées particulièrement intéressantes.

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

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

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

TABLEAU 8

SEQUENCES AMINO ACIDES N-TERMINALES DE 1'AVS BoTat-1 ET DES  
BrcN F<sub>7</sub>, F<sub>5</sub>, F<sub>3</sub>

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

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-

TABLEAU 9

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

Sucres	F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>	F <sub>3</sub>	F <sub>4</sub>	F <sub>5</sub>	F <sub>6</sub>	F <sub>7</sub>	F <sub>8</sub>
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.

TABEAU 10

La fraction  $F_7$  se caractérise par une absence de galactose. Elle ne contient que du mannose, de la N-acétylglucosamine et des traces de glucose. Le rapport mannose/ N-acétylglucosamine est de 9/2, tout à fait en faveur d'une structure oligomannosidique classique.

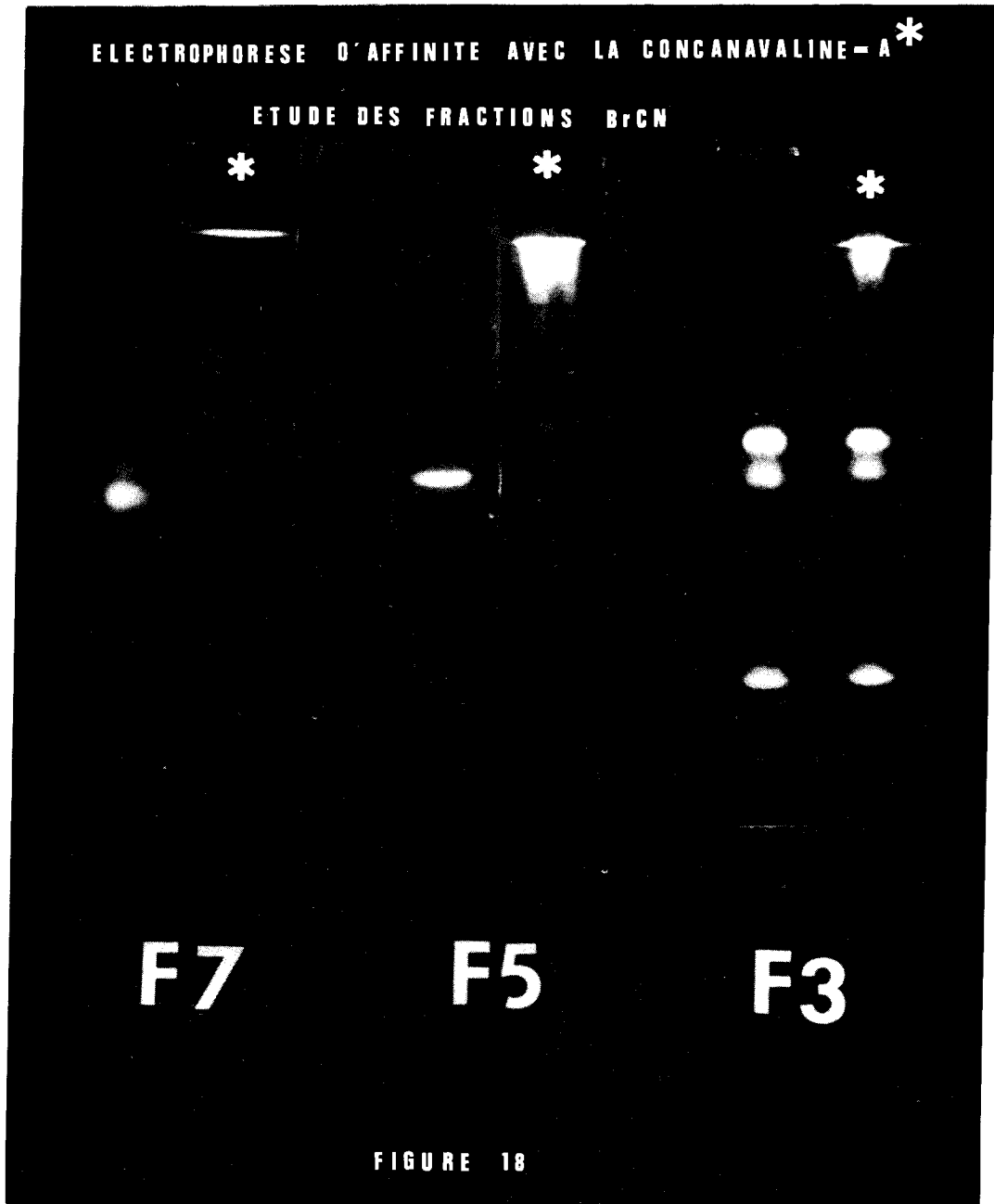
La fraction  $F_5$  par contre contient du galactose en plus de mannose et de N-acétylglucosamine. Cette dernière existe en quantité trop faible pour permettre d'envisager une structure où les résidus de galactose seraient des éléments de substitution de résidus de N-acétylglucosamine eux-mêmes branchés sur un trimannoside central séparé de l'asparagine de liaison par 2 N-acétylglucosamine. Dès le stade de l'analyse globale on en vient à suspecter l'existence de deux glycanes. Nous reviendrons sur ce point précis.

#### B. Etude en électrophorèse d'affinité avec la concanavaleine A

Afin de repérer en électrophorèse les fragments BrCN glycosylés, nous avons utilisé une technique fondée sur la formation de complexes d'affinité avec la concanavaleine A. Ce complexe formé est piégé au niveau d'une interface gel-gel compte tenu de sa taille moléculaire élevée. Ainsi, les fragments non complexés peuvent pénétrer dans le gel de polyacrylamide classique dépourvu de lectine. La comparaison du comportement d'une fraction avec des gels enrichis ou non en lectine permet de repérer les fragments glycosylés. Pour avoir les meilleures conditions de formation et de stabilité du complexe, nous avons travaillé en absence de détergents.

Etant donné la diversité des points isoélectriques des fragments, il a fallu définir des conditions électrophorétiques adaptées. Nous avons par conséquent procédé à une modification chimique préalable du matériel avant migration. Le couplage des résidus lysyl à la fluorescamine a été choisi à double titre. Il permet d'uniformiser la charge des composés qui vont alors migrer en fonction de leur seule taille moléculaire. De plus, la fluorescence résultat de ce couplage permet de visualiser les fragments de petite taille, non révélés par le bleu Coomassie. Le protocole est détaillé dans l'appendice technique.

L'étude faite sur certaines fractions a permis de montrer que les composants majeurs des fractions  $F_5$  et  $F_7$  sont glycosylés (Figure 18).





Les éléments d'information apportés par la composition en sucres et par l'étude en électrophorèse d'affinité nous permettent d'affirmer qu'il existe au moins deux glycanes interagissant avec la concanavaleine A, par l'intermédiaire d'une structure oligomannosidique liée au fragment majeur 13.000 de la fraction F<sub>7</sub> et d'une structure glycanique comprenant du mannose, du galactose et de la N-acétylglucosamine liée au fragment majeur 25.000 de la fraction F<sub>5</sub>.

## C- Sites de glycosylation

### 1- Glycosylation N-terminale

La séquence de l'AVS natif et de la fraction F<sub>7</sub> a permis de connaître la séquence des 42 premiers acides aminés de l'extrémité N-terminale. Pour la suite de cette étude nous avons procédé à un "sous-clivage enzymatique" sélectif de la fraction F<sub>7</sub> à l'aide de deux enzymes différents qui sont :

- l'endoprotéinase Arg-C qui coupe spécifiquement les liaisons arginyl-X (sauf arginyl-Pro)
- la protéase de S. aureus, utilisée dans les conditions de coupure spécifique des liaisons glutamyl-X.

L'utilisation des deux protéases a finalement permis de compléter nos résultats et d'identifier la séquence jusqu'à l'acide aminé en position 76. L'étude attentive des rendements de dégradation, les données analytiques sur les produits de coupure nous ont aussi autorisé à avancer que le site de glycosylation correspond au résidu asparaginyll 57.

Au total, les résultats présentés dans le tableau 11 situent notre connaissance actuelle de la glycoprotéine, positionnent deux peptides internes et confirment l'existence du site de glycosylation N-terminal.

Nous avons vu précédemment dans la composition glucidique de F<sub>7</sub> que en toute hypothèse la chaîne glycanique comporte 9 résidus de mannose pour 2 résidus de N-acétylglucosamine et correspondrait à une structure oligomannosidique classique qui explique l'affinité constatée pour la concanavaleine A de cette partie de l'antigène variable.

Par la suite nous nous sommes orientés vers le deuxième pôle glycosylé de la molécule : la région C-terminale.

## 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 11

## 2- Etude de la glycosylation C-terminale

Pour cette étude, nous avons envisagé la préparation du glycopeptide C-terminal par action de la trypsine sur la molécule native.

### a) Obtention du glycopeptide C-terminal

La glycoprotéine native a été soumise à une hydrolyse trypsique de 24 heures. Le produit d'hydrolyse a d'abord été fractionné sur Biogel P<sub>60</sub>. Les fractions glycosylées ont été sélectionnées puis purifiées sur Biogel P10 (Figure 19).

#### \* Caractérisation du glycopeptide C-terminal.

Nous nous sommes basés sur les travaux de HOLDER (1983a) (82) qui avait montré que chez T. b. brucei une éthanolamine était liée au carboxyl C-terminal des AVS. Dans notre cas, la recherche et la quantification d'éthanolamine ont été effectuées sur autoanalyseur d'acides aminés. Le tableau 12 présente les résultats obtenus ainsi que la composition amino-acide des fractions correspondantes. Seule la fraction b<sub>1</sub> contient de l'éthanolamine dans les mêmes proportions que le glycolle pris comme base de calcul (acide aminé élémentaire). Cette fraction a donc été retenue pour l'étude du site de glycosylation C-terminal.

#### \* Composition amino-acide.

Le tableau 13 présente les résultats en rapport molaire par rapport au glycolle. Notons la présence de glucosamine dans le rapport 2 : 1.

#### \* Composition glucidique.

Le dosage par chromatographie en phase gazeuse montre l'existence de mannose et de galactose dans les mêmes proportions. Le rapport molaire de ces deux monosaccharides par rapport au glycolle est de 6 : 1 (Tableau 13).

#### \* Teneur en phosphore.

Le dosage de phosphore a été réalisé selon la technique au vert malachite d'ITAYA et MICHIO (1966) (89). La teneur en phosphore est rapportée au glycolle dosé. Les résultats (Tableau 13) indiquent un rapport équimolaire.

La présence simultanée de phosphore et d'éthanolamine nous a orienté vers la recherche de glycérol et d'acides gras qui viendraient conforter l'hypothèse d'une structure de type phosphatidyléthanolamine en position C-terminale de l'AVS.

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

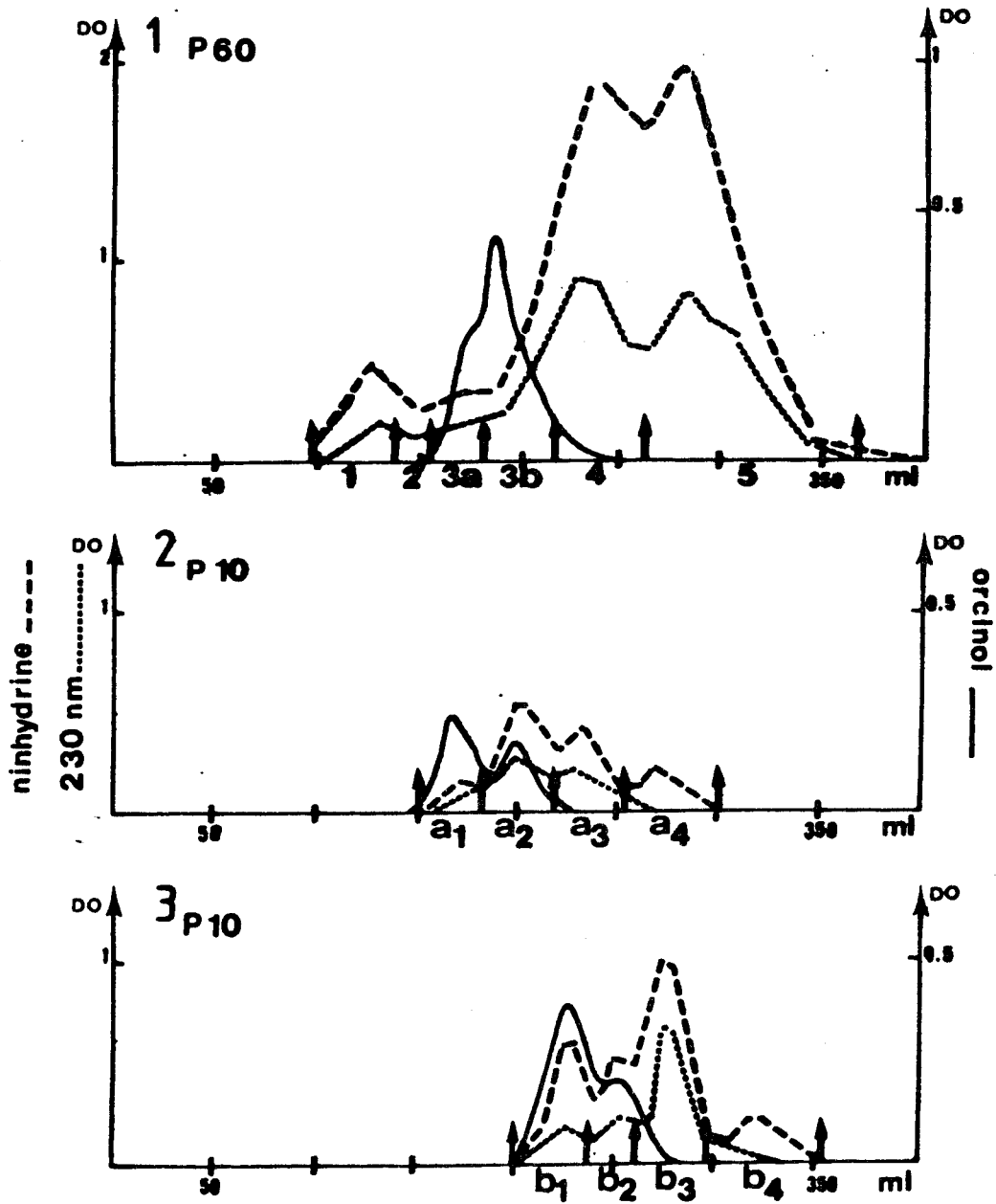


FIGURE 19

## COMPOSITION EN ACIDES AMINES DES FRACTIONS TRYPSIQUES GLYCOSYLEES

	a <sub>1</sub>	a <sub>2</sub>	b <sub>1</sub>	b <sub>2</sub>
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  $\mu\text{mol/g}$ 

TABLEAU 12

COMPOSITION CHIMIQUE DU GLYCOPEPTIDE TRYPSIQUE C-TERMINAL

Asx	1.6	} [Asn-Thr-Asn-Thr-Thr-Gly-Ser]*
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))

\* Dosage du glycérol.

Le mode opératoire est détaillé dans l'appendice technique. Cette caractérisation du glycérol comporte deux étapes :

- libération du glycérol selon la technique décrite pour les glycérophospholipides par RENKONEN (1969) (135).

- dosage enzymatique basé sur la phosphorylation spécifique du glycérol par la glycérokinase et l'ATP. La quantité d'ADP formé est déterminée à l'aide du système lactatepyruvate selon le schéma suivant.



Cette technique a été appliquée sur la fraction  $b_1$ , du glycérol standard et sur un phosphotidyl-éthanolamine témoin (Koch-light laboratories).

Les résultats obtenus (Tableau 14) montrent que la fraction  $b_1$  contient une mole de glycérol par mole de glycolle.

\* caractérisation des acides gras.

Nous avons en première intention recherché la présence d'acides gras saponifiables en traitant l'AVS par la potasse méthanolique 0,1 M pendant 2 h à 80° C. Les acides gras libérés sont extraits par la technique de FOLCH et Coll. (1957) (52). La phase organique est évaporée puis soumise à une réaction de transestérification. L'analyse de cette phase gazeuse n'a révélé aucun acide gras.

L'utilisation d'une hydrolyse acide chlorhydrique 5,6 N pendant 24 h à 105° C en tube scellé sous vide a permis d'identifier les acides gras dans l'AVS natif et dans la fraction  $b_1$ . Ce sont :

- l'acide palmitique ( $C_{16} : 0$ )
- l'acide stéarique ( $C_{18} : 0$ )
- l'acide oléique ( $C_{18} : 1$ ).

DOSAGE DU GLYCEROL DANS LA FRACTION  $b_1$ 

	Quantité théorique en nanomoles	Quantité théorique en nanomoles	%
Témoin glycérol	500	357	71
Témoin phosphatidyléthanolamine	500	233	47
$b_1$	25	10	40

TABLEAU 14



Les taux relatifs de chaque acide gras sont représentés dans le tableau 15. Le fait que les pourcentages obtenus pour l'AVS natif et la fraction b<sub>1</sub> soient quasiment les mêmes laissent entendre que tous les lipides présents dans la molécule sont situés exclusivement dans la partie C-terminale.

\* Conclusion.

Au terme de cette partie de notre étude, il apparaît que le glycopeptide tryptique C-terminal, en dehors des acides aminés et des sucres qui le constituent, est substitué par les éléments suivants :

- phosphore organique
- éthanolamine
- glycérol
- acide gras

Cette structure pourrait correspondre à une structure de type glycérophospholipidique classique dans laquelle les acides gras sont liés aux fonctions alcooliques du glycérol. Cette interprétation pose encore le problème du mode d'attachement des sucres et amène à décrire un glycolipide encore non décrit.

b) Etude des sites de glycosylation C-terminaux

Cette partie de notre étude a été entreprise en collaboration avec le laboratoire d'Immunologie et de Biologie Parasitaire de Bordeaux. Notre but était la définition de la composition chimique de la copule glucidique de l'extrémité C-terminale afin de l'étudier ensuite sous un aspect immunologique.

\* Préparation et étude biochimique.

La préparation du ou des glycopeptides C-terminaux a été entreprise à partir du fragment C-terminal, produit d'une hydrolyse tryptique réalisée sur l'AVS natif marqué au <sup>32</sup>P. Ce fragment C-terminal a été dans un second temps soumis à une digestion par la protéinase K. L'hydrolysate a été purifié par chromatographie en gel filtration sur Biogel P4 équilibré en eau désionisée.

Des deux fractions obtenues, une seule s'est révélée radioactive. La composition glucidique de chaque fraction (Tableau 16) a permis de distinguer deux entités glycanniques :

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

---

COMPOSITION CHIMIQUE DES GLYCOPEPTIDES OBTENUS  
APRES ACTION DE LA PROTEINASE K

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

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

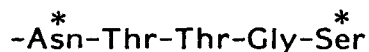
Les résultats sont exprimés en rapport molaire relativement à Asx et Glc Nac pour Gp1 et à Gly et Man pour Gp2.

- le glycopeptide 1 contient 5 résidus de mannose pour 2 résidus de N-acétylglucosamine et pas de galactose.
- le glycopeptide 2, radioactif, est composé de galactose, de mannose selon un rapport molaire 5 : 1 ; il contient en outre de l'éthanolamine.

Ces résultats démontrent bien que l'extrémité C-terminale de l'AVS BoTat-1 comprend deux chaînes glycaniques dont :

- l'une est composée de mannose et de N-acétylglucosamine selon un rapport 5 : 2, qui correspond à la limite d'une structure oligomannosidique réduite par action de mannosidase telle qu'on l'observe au cours de la biosynthèse des glycoprotéines ("processing" avant "repousse" possible des sucres).
- l'autre se caractérise par une composition particulière faisant intervenir les lipides.

La comparaison des résultats de composition amino-acide des glycopeptides C-terminaux avec les structures établies à partir de séquence DNA de plusieurs AVS de T. b. brucei nous permet de proposer par extrapolation une séquence de l'extrémité C-terminale de l'AVS BoTat-1 qui serait



Le résidu d'asparagine serait porteur d'un glycanne de structure oligomannosidique (mannose 5, N-acétylglucosamine 2).

Le résidu de sérine serait lui substitué par l'éthanolamine, le phosphore, les acides gras et les sucres dont le galactose serait l'élément caractéristique (galactose 5, mannose 1).

\* Etude immunologique.

Les travaux de LABASTIE et Coll. (1981) (97) avaient montré l'existence en R.I.A. (Radio Immuno Assay) d'une réactivité immunologique croisée entre BoTat-1 et BoTat-28 qui est un AVS d'apparition tardive au cours de l'infection. L'utilisation du fragment tryptique avait permis de localiser le site antigénique commun dans la partie C-terminale de la molécule. Nous avons repris cette étude en testant la capacité des glycopeptides 1 et 2 d'inhiber la réaction hétérologue de l'AVS BoTat-1 avec

des anticorps dirigés contre l'AVS BoTat-28. Le glycopeptide 1 était sans effet alors que le glycopeptide 2 inhibait totalement la réaction. Ces résultats permettent d'affirmer que les déterminants intervenant dans la réactivité immunologique croisée sont représentés par la partie glycoglycér phospholipidique C-terminale des AVS de T. equiperdum.

V- Reconstitution moléculaire de l'AVS BoTat-1 à partir des fragments BrCN

L'ensemble des résultats dont nous disposons à ce stade de notre étude permettait d'envisager une reconstitution moléculaire à l'aide des fragments BrCN.

Le fragment majeur de la fraction F<sub>7</sub> a pu être facilement situé car sa séquence recoupe celle des 20 premiers amino acides N-terminaux, séquence déterminée sur la molécule native. La méthionine en position 14 représente le site de clivage par le BrCN libérant F<sub>7</sub> (Tableau 11).

Si l'on se réfère aux résultats de composition chimique des fragments BrCN et aux données apportées par l'étude des AVS T. b. brucei, il en ressort une définition générale du profil de la région C-terminale. Elle présente les caractéristiques suivantes :

- richesse en résidus hydrophiles, particulièrement en lysine et acide glutamique,
- forte densité en résidus de cystéine,
- existence d'une copule glucidique comportant du mannose, du galactose et de la N-acétylglucosamine.

Le fragment majeur de la fraction  $F_5$  de taille moléculaire 25000 correspond bien à cette définition. Nous l'avons donc placé sans possibilité de doute dans la région C-terminale de l'AVS. Deux possibilités se présentaient quant à la disposition des deux fragments mineurs présents respectivement dans les fractions chromatographiques  $F_5$  et  $F_7$  : fragment 18000 (également présent dans la fraction  $F_3$  ( $F_{3b}$ ) et fragment 11.000. L'isolement du fragment 29000 de recouvrement présent dans la fraction  $F_3$  par électrophorèse préparative suivie de la détermination de l'acide aminé en position N-terminale a conduit à une représentation de la molécule reconstituée illustrée figure 20.

## VI- Etude de la conformation de l'AVS BoTat-1 par la méthode de Chou et Fasman

### A. Description

La méthode décrite par CHOU et FASMAN en 1974 (32) (33) permet de prédire la conformation d'une protéine en fonction de la fréquence d'apparition des 20 amino-acides au sein des différentes structures organisées : hélice  $\alpha$ , structure en feuillets plissés ( $\beta$ sheet) et coude  $\beta$  ( $\beta$  turn).

Les auteurs ont fait une analyse statistique à partir d'un certain nombre de protéines dont la structure tertiaire avait été établie par cristallographie. Ils ont pu ainsi déterminer la fréquence d'apparition (F) de chaque amino-acide.

$$F_{j,k} = \frac{n_{j,k}}{n_j}$$

$F_{j,k}$  est la fréquence d'apparition du résidu j dans la structure k.

$n_{j,k}$  est le nombre de fois où le résidu j apparaît dans la structure k.

$n_j$  est le nombre de fois où le résidu j apparaît dans la protéine.

D'autre part, les auteurs se sont basés sur la fréquence d'apparition de chaque amino-acide dans les 3 structures possibles afin de calculer le paramètre conformationnel P.

$$P = \frac{Pr_{j,k}}{Pr_j}$$

$Pr_{j,k}$  est la probabilité de trouver le résidu j dans la structure k.

$Pr_j$  est la probabilité de trouver le résidu j dans la protéine.

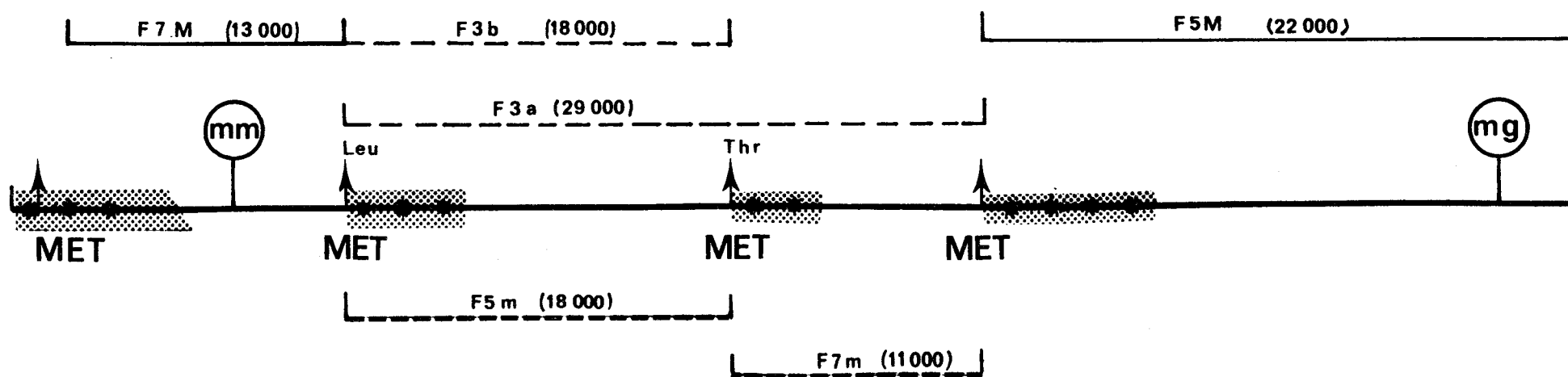


Schéma de l'AVS BoTat-1

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

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

(M) fragment majeur (m) fragment mineur

▨ . Séquence amino-acide connue

— . fragments interagissant avec la concanavaline A

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

FIGURE 20

En outre, le calcul de la probabilité pour la prédiction des structures en coude  $\beta$ , tient compte de la position de chaque amino-acide dans le coude  $\beta$ .

$$P ( t ) = f_i \times f_{i+1} \times f_{i+2} \times f_{i+3}$$

$f_i, f_{i+1}, f_{i+2}, f_{i+3}$  représente la fréquence d'existence des différents résidus en position  $i, i+1, i+2, i+3$  (Tableau 17). Les valeurs de toutes ces données statistiques ont été affinées grâce à la connaissance de nouvelles structures primaires et tertiaires de protéines (CHOU et FASMAN (1977) (34) ; (1978) (35)). Le Tableau 18 indique les paramètres conformationnels de chaque amino-acide correspondants aux différentes structures organisées. Les amino-acides sont répartis en trois catégories.

- Les stabilisateurs (former = H et k)
- les indifférents (indifférent : l et i)
- les déstabilisateurs (breaker = B et b)

La détermination de la structure secondaire des protéines (hélice  $\alpha$ , structure en feuillets plissés  $\beta$ , coude  $\beta$ ) par la méthode de CHOU et FASMAN répond à des règles bien précises énoncées ci-dessous.

#### 1- Recherche des structures hélicoïdales

a) L'axe peptidique est découpé en segments de six résidus, parmi lesquels quatre doivent être initiateurs d'hélice ( $h_\alpha$  ou  $H_\alpha$ ). La formation de l'hélice est défavorisée si le segment contient 1/3 ou plus de résidus déstabilisateurs, ou moins de la moitié de résidus stabilisateurs de la structure hélicoïdale.

b) L'extention du segment hélicoïdal dans les deux directions est arrêtée par les térapeptides suivants :  $b_4, b_3i, b_3h, b_2i_2, b_2ih, b_2h_2, bi_3, bi_2h$  et  $i_4$  (h,i,b incluant H, l et B). Ils ont un paramètre conformationnel moyen  $\langle P_\alpha \rangle$  qui est inférieur à 1,00.

c) Le résidu proline ne peut être situé à l'intérieur d'une hélice  $\alpha$  ou à l'extrémité C-terminale de l'hélice.

d) Les résidus proline, acide aspartique, acide glutamique se situent préférentiellement à l'extrémité N-terminale, alors que



TABLEAU 17

Acides aminés		Position i	Position i+1	Position i+2	Position i+3
Ala	A	0,086	0,089	0,052	0,060
Arg	R	0,066	<u>0,132</u>	0,076	<u>0,104</u>
Asn	N	<u>0,159</u>	<u>0,100</u>	<u>0,224</u>	0,088
Asp	D	<u>0,190</u>	<u>0,115</u>	<u>0,172</u>	0,081
Cys	C	<u>0,122</u>	0,027	<u>0,122</u>	0,095
Gln	Q	0,073	<u>0,106</u>	0,033	<u>0,114</u>
Glu	E	0,057	0,057	0,098	0,049
Gly	G	<u>0,120</u>	<u>0,120</u>	<u>0,194</u>	<u>0,162</u>
His	H	<u>0,175</u>	0,032	<u>0,111</u>	0,016
Ile	I	0,058	0,045	0,032	0,083
Leu	L	0,032	0,037	0,041	0,083
Lys	K	0,057	<u>0,109</u>	0,083	<u>0,109</u>
Met	M	0,087	0,087	0,022	0,087
Phe	F	0,032	0,021	0,074	0,042
Pro	P	<u>0,134</u>	<u>0,277</u>	0,036	0,080
Ser	S	<u>0,150</u>	<u>0,143</u>	<u>0,135</u>	<u>0,135</u>
Thr	T	<u>0,105</u>	<u>0,140</u>	0,085	<u>0,115</u>
Trp	W	0,073	0,018	0,073	<u>0,200</u>
Tyr	Y	<u>0,114</u>	0,071	<u>0,114</u>	<u>0,129</u>
Val	V	0,033	0,061	0,061	0,045

FREQUENCE D'APPARITION DES ACIDES AMINES EN FONCTION DE LEUR PLACE DANS LE COUDE  $\beta$ .

(Les valeurs soulignées contribuent à stabiliser le coude  $\beta$ )

TABLEAU 18

Acides aminés	Code 3 lettres	code 1 lettre	Hélice P <sub>α</sub>	Structure P <sub>β</sub>	turn P<βT>
Alanine	Ala	A	<u>1.42</u> H	0.83 i	0.66
Arginine	Arg	R	0.98 i	0.93 i	0.95
Asparagine	Asn	N	0.67 b	0.89 B	<u>1.56</u>
Acide Aspartique	Asp	D	1.01 I	0.54 B	<u>1.46</u>
Cystéine	Cys	C	0.70 i	1.19 h	1.19
Acide glutamique	Glu	E	<u>1.51</u> H	0.37 B	0.74
Glutamine	Gln	Q	1.11 h	1.10 h	0.98
Glycocolle	Gly	G	0.57 B	0.75 b	<u>1.56</u>
Histidine	His	H	1.00 I	0.87 i	0.95
Isoleucine	Ile	I	1.08 h	<u>1.60</u> H	0.57
Leucine	Leu	L	<u>1.21</u> H	1.30 h	0.59
Lysine	Lys	K	1.16 h	0.74 b	1.01
Méthionine	Met	M	<u>1.45</u> H	1.05 h	0.60
Phénylalanine	Phe	F	1.13 h	1.38 h	0.60
Proline	Pro	P	0,57 B	0.55 B	<u>1.52</u>
Serine	Ser	S	0.77 i	0.75 b	<u>1.43</u>
Thréonine	Thr	T	0.83 i	1.19 h	0.96
Tryptophane	Trp	W	1.08 h	1.37 h	0.96
Tyrosine	Tyr	Y	0.69 b	<u>1.47</u> H	1.14
Valine	Val	V	1.06 h	<u>1.70</u> H	0.50

PARAMETRES CONFORMATIONNELS CONCERNANT LES TROIS STRUCTURES ORGANISEES :  
Hélice α , structure β , et coude β .

(Les valeurs soulignées représentent les meilleurs stabilisateurs de la structure concernée. Les lettres H, h, I, i, B et b représentent respectivement la faculté de formation (H, h), l'indifférence" (I,i) et la rupture (B,b) d'une structure donnée. Les lettres en majuscule indiquent que le caractère est très marqué.

les résidus chargés positivement (histidine, lysine, arginine) sont plus fréquents à l'extrémité C-terminale.

### Conclusion

Tout segment de six résidus ou plus dont  $\langle P_{\alpha} \rangle$  est supérieur ou égal à 1,03 et  $\langle P_{\alpha} \rangle$  supérieur à  $\langle P_{\beta} \rangle$ , et satisfaisant aux conditions a à d est considéré comme hélicoïdale.

#### 2- Recherche des structures en feuillets plissés

a) L'axe peptidique est découpé en segments de 5 résidus, parmi lesquels trois sont initiateurs de structure ( $h_{\beta}$  ou  $H_{\beta}$ ). Cette structure est défavorisée par la présence de 1/3 ou plus de résidus déstabilisateurs ou lorsque le segment contient moins de la moitié de résidus initiateurs de structure  $\beta$ .

b) La propagation de cette structure est arrêtée par les mêmes térapeptides que précédemment dont le  $\langle P_{\beta} \rangle$  est inférieur à 1,00.

c) Les résidus acide glutamique et proline sont rarement présents dans la région .

d) Les résidus chargés apparaissent rarement au sein de la structure en feuillets plissés  $\beta$ . le résidu tryptophane est plus fréquent à l'extrémité N-terminale et plus rare à l'extrémité C-terminale.

### Conclusion

Tout segment de cinq résidus ou plus dont  $\langle P_{\beta} \rangle$  est supérieur ou égal à 1,05 et supérieur à  $\langle P_{\alpha} \rangle$ , et satisfaisant aux conditions a à d est considéré comme adoptant une structure en feuillets plissés  $\beta$ .

#### 3- Recherches des coudes $\beta$

Tout segment de quatre résidus dont  $\langle P_{\beta T} \rangle$  est supérieur à  $\langle P_{\alpha} \rangle$  et supérieur à  $\langle P_{\beta} \rangle$  et dont  $p\langle \beta T \rangle$  est supérieur à  $10^{-4}$  est considéré comme coude  $\beta$ .

## B. Conformation des fragments BrCN

Nous disposons au laboratoire d'un programme informatique automatisant la méthode de CHOU et FASMAN et à partir duquel nous avons pu établir la conformation correspondant aux portions de la molécule dont les séquences ont été déterminées.

Le tableau 19 rapporte les valeurs calculées en faveur relative d'une conformation hélicoïdale, feuillet plissé ou coude  $\beta$ . Chaque valeur se rapporte à un acide aminé, cet acide aminé étant analysé en fonction de son environnement.

L'analyse précise de ces données nous autorise (figure 21) à proposer un schéma qui situe dans les séquences que nous avons déterminé les zones de probabilité.

Il est possible de retenir au niveau de la partie N-terminale, l'existence de zone hélicoïdales très importantes.

Si l'on ajoute à cela le caractère hydrophile de cette zone de la molécule, l'apport de cette approche conformationnelle est d'un grand intérêt pour le repérage d'épitopes potentiels.

Les peptides internes, voient également une alternance entre zones hélicoïdales et possibilité d'accumulation de coude  $\beta$ .

Quant à la partie C-terminale dont on peut supposer à travers sa richesse en ponts disulfure, une conformation très ramassée. Mais, seule une meilleure connaissance structurale de la partie toute C-terminale permettra de se faire une opinion définitive.

### ETUDE COMPARATIVE DE BoTat-1 VIS A VIS D'AUTRES AVS DE T.

#### equiperdum

Les propriétés physico-chimiques des autres AVS de T. equiperdum ont été définies en suivant les mêmes protocoles que ceux appliqués pour BoTat-1.

PEPTIDE N-TERMINAL

PEPTIDE INTERNE 1

	MELICITE	FEUILLETS PLISSES	Beta TURN
			Pto10-4
A	ALA	1.143 H	.240
U	VAL	.930 H	.824 TURN
A	ALA	.948 H	.827
N	ASN	.903 b	1.640 TURN
P	PRO	1.023 b	.449
L	LEU	1.090 H	.333
K	LYS	.940 I	.681 TURN
K	LYS	.940 I	1.193 TURN
T	THR	1.020 I	.247
Y	TYR	1.175 b	1.010 H
W	TRP	1.345 H	.905 H
E	GLU	1.270 H	.840 b
A	ALA	1.145 H	.903 I
M	HET	1.093 H	1.020 H
C	CYS	.923 I	.943 H
D	ASP	.915 I	.870 I
L	LEU	.918 H	.870 H
S	SER	.798 I	.785 b
N	ASN	.730 b	.748 b
D	ASP	.845 I	.870 I
N	ASN	.915 b	1.040 I
N	ASN	1.120 b	1.080 b
L	LEU	1.230 H	1.130 H
L	LEU	1.180 H	1.040 H
A	ALA	1.223 H	.923 I
B	GLN	1.233 H	.923 I
R	ARG	1.140 I	.830 I
A	ALA	1.148 H	.835 I
A	ALA	1.095 H	.930 I
S	SER	1.050 I	.930 I
S	ARG	1.123 H	.930 I
S	LEU	1.090 H	.835 H
K	LYS	1.143 I	.730 b
A	ALA	1.040 H	.830 I
P	PRO	.913 b	.940 b
A	ALA	1.125 H	1.010 I
T	THR	1.073 I	1.130 H
T	THR	1.155 I	1.015 H
A	ALA	1.200 H	.853 I
L	LEU	1.033 H	.943 H
K	LYS	1.040 I	.883 b
D	ASP	.930 I	.915 I
T	THR	1.008 I	1.103 H
K	LYS	1.103 I	1.133 b
T	THR	1.103 I	1.130 H
L	LEU	1.250 H	1.043 H
L	LEU	1.250 H	1.043 H
K	LYS	1.213 I	1.143 b
A	ALA	1.203 H	1.303 I
L	LEU	1.153 H	1.420 H
U	VAL	1.228 H	1.180 H
F	PHE	1.153 H	.930 H
L	LEU	1.228 H	.813 H
E	GLU	1.093 H	.710 b
S	SER	.908 I	.885 b
A	ALA	.923 H	.915 I
N	ASN	.870 b	1.033 b
S	SER	.948 I	1.043 b
T	THR	1.133 I	.948 H
L	LEU	1.280 H	.830 H
R	ARG	1.333 I	.740 I
E	GLU	1.295 H	.883 b
A	ALA	1.208 H	.890 I
A	ALA	1.040 H	.980 I
T	THR	1.040 I	.980 H
K	LYS	1.208 I	.890 b
T	THR	1.170 I	.840 H
A	ALA	1.135 H	.910 I
A	ALA	.973 H	.890 I
D	ASP	.973 I	.890 I
Y	TYR	.945 I	.973 H
S	SER	.985 I	.815 b
A	ALA	1.095 H	.933 I
R	ARG	1.018 I	1.020 I

	MELICITE	FEUILLETS PLISSES	Beta TURN
			Pto10-4
L	LEU	1.103 H	.195
B	GLN	1.103 H	1.200 TURN
A	ALA	.993 H	.973 I
N	ASN	.920 b	1.115 b
L	LEU	.923 H	1.340 H
N	ASN	.830 b	1.233 b
F	PHE	.865 H	1.190 H
Y	TYR	.730 b	1.130 H
T	THR	.700 I	.970 H
G	GLY	.700 b	.970 I
T	THR	.913 I	.990 H
G	GLY	.930 b	.923 I
T	THR	1.105 I	.830 H
A	ALA	1.243 H	.930 I
R	ARG	1.145 I	1.023 I
E	GLU	1.275 H	1.000 b
V	VAL	1.233 H	1.115 H
G	GLN	1.233 H	.923 H
A	ALA	1.308 H	.780 I
A	ALA	.993 H	.743 I
R	ARG	.783 I	.743 I
D	ASP	.783 I	.743 I
G	GLY	.833 b	.930 I
G	GLY	.948 b	1.030 I
R	ARG	.948 I	1.030 I
L	LEU	1.078 H	.993 H
G	GLN	1.078 H	.993 H
G	GLY	1.045 b	.933 I
A	ALA	1.280 H	.880 I
L	LEU	1.200 H	.993 H
R	ARG	1.200 I	.993 I
E	GLU	1.318 H	.978 b
F	PHE	1.148 H	1.175 H
L	LEU	1.143 H	1.103 H
A	ALA	1.195 H	.980 I
T	THR	1.185 I	1.203 H
G	GLN	1.143 H	1.333 H
A	ALA	1.070 H	1.843 I
U	VAL	1.070 H	1.245 H
V	VAL	1.065 H	1.088 H
S	SER	.988 I	.885 b
A	ALA	1.065 H	.883 I
S	SER	.793 I	.783 b
N	ASN	.775 b	.873 b
K	LYS	.910 I	.975 b
G	GLY	.813 b	.998 I
C	CYS	.915 I	1.043 H
L	LEU	1.030 H	.920 H
S	SER	1.083 I	.813 b
R	ARG	1.245 I	.833 I

PEPTIDE C-TERMINAL

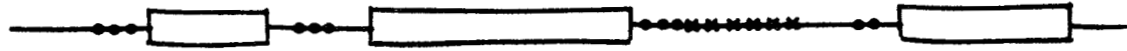
	MELICITE	FEUILLETS PLISSES	Beta TURN
			Pto10-4
P	PRO	.933 b	.937 TURN
I	ILE	1.040 I	1.080 H
E	GLU	1.093 H	1.063 b
S	GLY	1.003 b	1.098 I
I	ILE	1.030 I	1.133 H
L	LEU	.953 H	.933 H
K	LYS	.793 I	.733 b
N	ASN	.470 b	.770 b
S	SER	.865 I	.873 b
P	PRO	.983 b	.870 b
N	ASN	1.030 b	.918 b
L	LEU	1.103 H	1.020 H
K	LYS	1.028 I	.883 b
K	LYS	.988 I	.833 b
L	LEU	.943 H	1.075 H
G	GLY	.848 b	1.045 I
D	ASP	.978 I	.993 I
V	VAL	.993 H	1.250 H
Y	TYR	.898 I	1.055 H
D	ASP	.948 I	1.033 I
I	ILE	1.018 I	1.223 H
N	ASN	1.050 b	1.148 b
G	GLN	1.248 H	1.018 H
L	LEU	1.283 H	1.048 H
L	LEU	1.133 H	1.110 H
E	GLU	1.133 H	1.130 b
L	LEU	.930 H	1.403 H
Y	TYR	.880 b	1.448 H
F	PHE	.820 H	1.248 H
Y	TYR	.790 b	1.038 H
Y	TYR	.920 b	1.015 H
S	SER	.915 I	.878 b
D	ASP	1.013 I	.888 I
L	LEU	1.038 H	1.087 H
N	ASN	.980 b	.913 b
K	LYS	1.115 I	1.018 b
G	GLN	1.103 H	1.108 H
R	ARG	1.203 I	.923 I
L	LEU	1.313 H	.880 H
S	GLN	1.345 H	.783 H
E	GLU	1.378 H	.893 b
A	ALA	1.290 H	.785 I
A	ALA	1.238 H	.983 I
K	LYS	1.148 I	.978 b
K	LYS	1.123 I	.928 b
L	LEU	1.133 H	1.048 H
G	GLN	1.218 H	.838 H
D	ASP	1.140 I	.838 I
L	LEU	1.178 H	.988 H
E	GLU	1.238 H	.783 b
T	THR	.993 I	.878 H
K	LYS	.993 I	.878 b
A	ALA	.993 H	.878 I
S	GLY	.833 b	.838 I
T	THR	1.045 I	.878 H
K	LYS	1.193 I	.788 b
S	SER	1.135 I	.738 b
A	ALA	1.233 H	.733 I
A	ALA	1.273 H	.638 I
D	ASP	1.218 I	.638 I

PEPTIDE INTERNE 2

	MELICITE	FEUILLETS PLISSES	Beta TURN
			Pto10-4
T	THR	.700 I	4.420 TURN
T	THR	.635 I	1.934 TURN
G	GLY	.620 b	.780 TURN
G	GLY	.833 b	2.692 TURN
P	PRO	.993 b	.827 TURN
S	SER	1.203 I	.828
A	ALA	1.368 H	.948 I
L	LEU	1.368 H	.948 H
A	ALA	1.273 H	.920 I
A	ALA	1.273 H	.920 I
A	ALA	1.133 H	1.010 I
T	THR	.913 I	.940 H
A	ALA	.898 H	.830 I
T	THR	.735 I	3.301 TURN
P	PRO	.883 b	1.332 TURN
S	SER	1.095 I	.649 TURN
S	SER	1.070 I	.611 TURN
A	ALA	1.130 H	1.387 TURN
A	ALA	1.028 H	1.198 TURN
N	ASN	.840 b	2.748 TURN
D	ASP	.933 I	2.054 TURN
D	ASP	.993 I	1.333 TURN
N	ASN	1.030 b	.302
F	PHE	1.218 H	.174
K	LYS	1.290 I	.194
K	LYS	1.243 I	.274
A	ALA	1.208 H	.603 TURN
A	ALA	1.018 H	1.113 TURN
R	ARG	.945 I	1.198 I
R	ARG	1.023 I	1.238 I
Y	TYR	.920 b	.280

CONFORMATION DES PORTIONS DE SEQUENCES CONNUES  
DE L'AVS BOTAT-1 PAR LA METHODE DE CHOU ET FASMAN

Peptide N-terminal



Peptide interne 1



Peptide interne 2



Peptide C-terminal

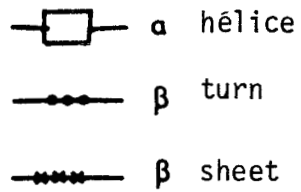


FIGURE 21

## 1- Masse moléculaire et point isoélectrique

La taille moléculaire des AVS varie entre 52000 et 59000 (figure 22).

Les AVS sont caractérisés par une hétérogénéité de définition de point isoélectrique. Elle se traduit par l'existence de plusieurs bandes dont l'intensité de coloration par le bleu Coomassie est variable (figure 23). Parmi ces AVS certains présentent une microhétérogénéité prononcée (BoTat-2) alors que BoTat-1 et BoTat-28 présentent une bande majeure représentative de l'AVS.

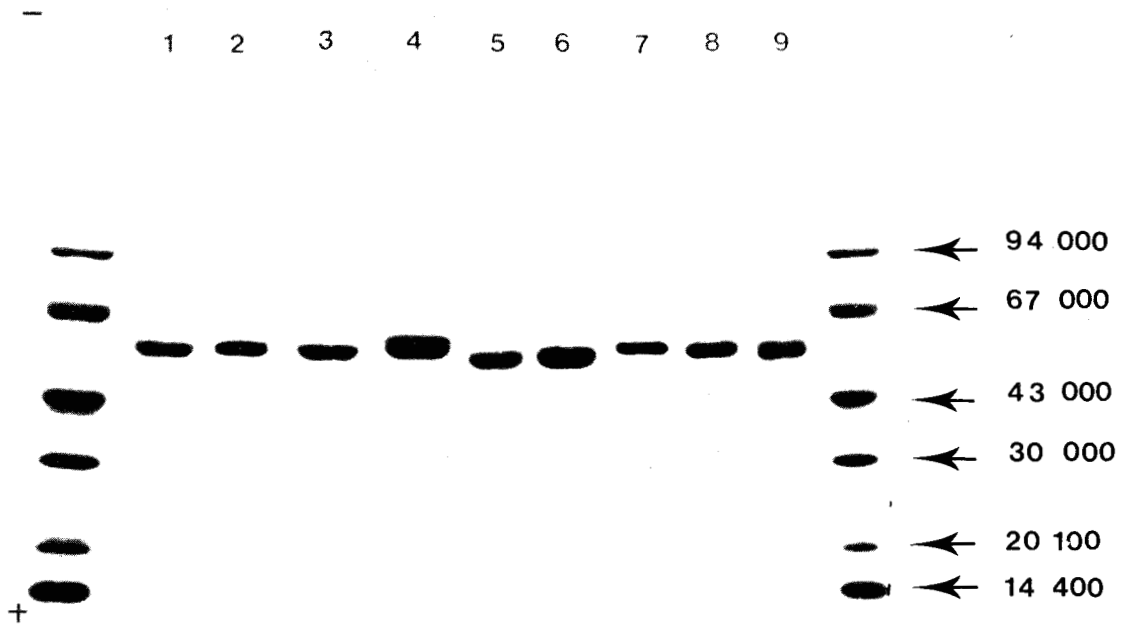
Trois hypothèses ont été émises pour expliquer cette microhétérogénéité.

- une dégradation plus ou moins importante des AVS au cours de leur purification. En effet pour libérer les AVS, les parasites sont mis au contact d'un tampon de pH acide (pH 5,5). La lyse inévitable d'une faible proportion de trypanosomes libère divers enzymes parmi lesquels des enzymes protéolytiques. Cette hypothèse doit être vue avec prudence si l'on considère qu'aucune microhétérogénéité de taille moléculaire n'a été décelée en gel de polyacrylamide contenant du SDS. On ne pourrait donc retenir que des sites de clivage aux extrémités toutes terminales de l'axe peptidique qui par conséquent ne provoqueraient pas de variation significative de taille moléculaire des AVS.

. une microhétérogénéité des chaînes glycaniques liée à leur biosynthèse. Elle résulte de la variation du nombre de sites de glycosylation, du nombre de monosaccharides constitutifs, ou de la nature des monosaccharides qui font partie des structures glycaniques. Ce ne serait pas dans ce cas une variation réelle de points isoélectriques mais une interaction variable gel-AVS.

. une microhétérogénéité au sein de l'axe peptidique, induite par la présence d'acides aminés ayant subi des modifications post-synthétiques. C'est le cas par exemple des résidus amino-acides dicarboxyliques qui peuvent exister sous forme amidifiée ou phosphorylée ou qui ont tout simplement perdu leur amidification au cours de la préparation et de la conservation de la molécule.

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



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

1 BoTat-1  
2 BoTat-2  
3 BoTat-3

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

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

FIGURE 22



Isoélectrofocalisation des AVS de Trypanosoma equiperdum

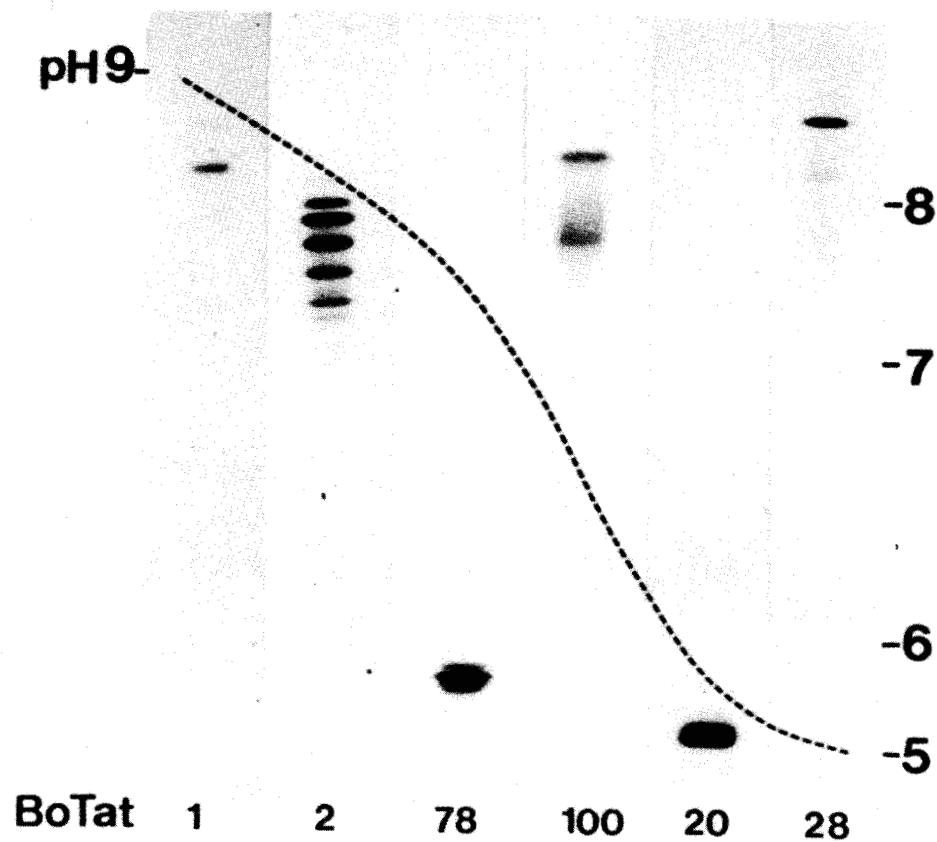


FIGURE 23

ONODERA et Coll. (1981) (120) travaillant sur deux variants de T. congolense ont également observé une hétérogénéité de leur préparation en isoélectrofocalisation. Les auteurs avaient utilisé un autre protocole d'isolement qui comportait deux étapes : une série de congélations-décongélations en présence d'inhibiteurs protéasiques suivie d'un traitement mécanique. Ils ont suggéré les deux hypothèses suivantes :

- . Il y aurait des modifications post-synthétiques mineures dues par exemple à des différences de degré d'amidification ou du contenu polysaccharidique.

- . Les AVS seraient le produit d'une coexpression de plusieurs gènes.

D'autre part, nos résultats montrent que les valeurs "moyennes" de pHi obtenues varient considérablement d'un AVS à l'autre.

## 2- Structure secondaire

Les spectres dichroïques ont été réalisés sur les AVS suivants : BoTat-2, -3, -4, -20, -28, -51, - 78, - 100. Ils sont représentés sur la figure (24).

Les pourcentages respectifs de structure hélicoïdale, feuillets plissés et de l'ensemble coude  $\beta$ - structure inorganisée sont illustrés sur le Tableau 20.

L'examen de ces résultats montrent une différence nette avec la structure secondaire de BoTat-1. Rappelons à cet effet que l'AVS BoTat-1 se caractérise par une forte proportion de structure hélicoïdale (près de 50 %).

Trois types de structures secondaires différentes ont été définis pour les autres AVS.

- . Le premier groupe correspond à BoTat-28, qui contrairement à BoTat-1 possède 43 % de coude  $\beta$  - structure inorganisée. Les 2 structures organisées représentent 28 à 29 % de la molécule.

- . Le deuxième groupe comprend la majorité des AVS étudiés qui se caractérisent par une répartition égale des 3 structures.

- . Le troisième groupe représente les AVS les plus structurés avec 49 % de structure en feuillets plissés et 33 % d'hélice  $\alpha$ .

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

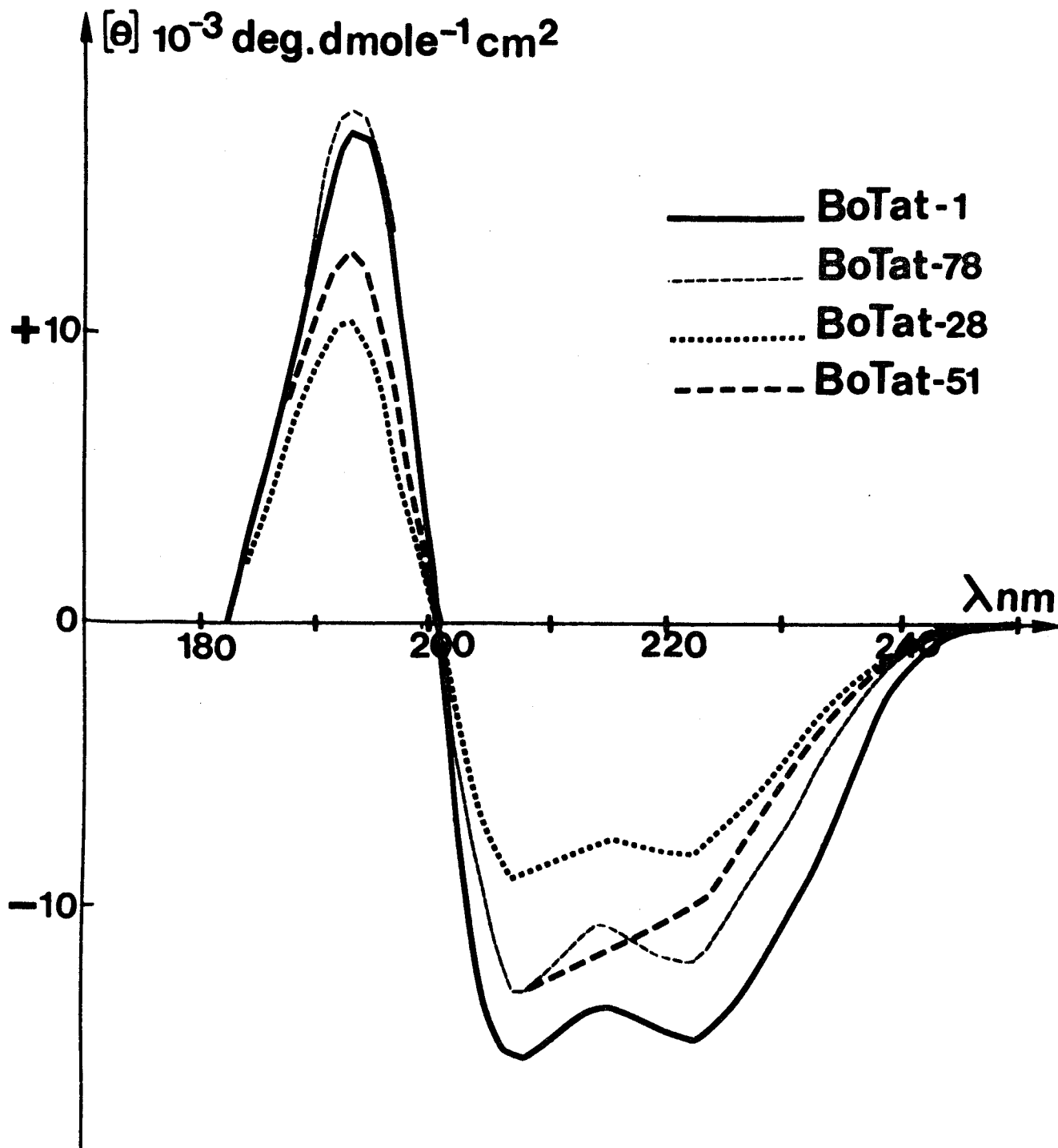


FIGURE 24

EVALUATION DE LA STRUCTURE SECONDAIRE  
DES AVS DE T. equiperdum

AVS de variants	Hélice $\alpha$	Feuillets plissés	Structure inorganisée et $\beta$ turn
Botat-28	28 %	29 %	43 %
BoTat-2, 3, 4, 78, 100	35 %	33 %	32 %
BoTat-20, 51	33 %	49 %	18 %

TABLEAU 20

### 3- Composition amino-acide

L'analyse des résultats (Tableau 21) nous permet de noter un profil comparable à celui de BoTat-1 avec prédominance des mêmes résidus amino-acides : acide aspartique et/ou asparagine, acide glutamique et/ou glutamine, alanine et lysine.

L'AVS Botat-1 possède la teneur la plus élevée en résidus de leucine. Dans l'ensemble, cette teneur baisse progressivement suivant l'ordre d'apparition des variants, exceptés les AVS BoTat-20 et 51.

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus en dichroïsme circulaire. En effet, il est établi que les résidus de leucine sont les meilleurs stabilisateurs de la structure hélicoïdale. Ainsi, l'AVS BoTat-1 qui possède la plus forte teneur en résidus de leucine est caractérisé par le taux d'hélicité le plus élevé (49 %), alors que celui de BoTat-28 n'atteint que 28 %.

### 4- Composition glucidique

Les résultats présentés dans le tableau 22 montrent que les AVS BoTat-2, -28 et -78 ont la même composition que l'AVS BoTat-1. Il faut souligner l'absence de galactose dans les AVS BoTat-4 et BoTat-100. D'autre part, des taux élevés de galactose sont trouvés pour l'AVS BoTat-20. Le rapport molaire par rapport à la N-acétylglucosamine trouvé dans l'AVS BoTat-1 est le même pour BoTat-2, 28, et -78. Par contre, seulement 2 résidus de N-acétylglucosamine sont trouvés dans BoTat-4, ceci en rapport avec la faible teneur en mannose. Ces données expriment sans aucun doute possible la variation du nombre de sites de glycosylation de type mannosidique à l'autre. L'absence de galactose pour certains AVS montrerait le caractère parfois incomplet de la structure phospholipidique C-terminale.

### 5- Teneur en phosphore et en glycérol

Comme dans le cas de BoTat-1, les autres AVS contiennent une mole de phosphore par mole de glycoprotéine. Pour ce qui est du glycérol les faibles quantités de matériel disponible ne nous permettent pas dans tous les cas étudiés de le doser pour affirmer sa présence équimolaire par rapport au phosphore. Il est cependant présent dans la plupart des cas.

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
‡ 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 21

COMPOSITION GLUCIDIQUE DES AVS DE T. equiperdum

Monosaccharides	BoTat-2	BoTat-4	BoTat-20	BoTat-28	BoTat-78	BoTat-100
Mannose	200	80	178	195	200	122
Galactose	130	0	178	136	133	0
Glucose	16	5	11	22	17	11
N-acétyl glucosamine	97	40	58	90	115	75

Valeurs exprimées en nombre de  $\mu$ moles/g de glycoprotéines

TABLEAU 22

## 6- Etude des acides gras

Les AVS suivants ont été testés : BoTat -2, -4, -20, -28, -78, -100. Les résultats du Tableau 23 indiquent que l'AVS BoTat-20 a le taux en acide gras le plus élevé comparable à celui de BoTat-1. Au contraire, la proportion pour BoTat-2 et -28 était faible (1/3 et 1/6 respectivement). Aucun acide gras n'était identifié dans les AVS BoTat-4, -78 et -100. Les mêmes acides gras que pour BoTat-1 ont été caractérisés : l'acide palmitique (C16 : 0), l'acide stéarique (C18 : 0) et l'acide oléique (C18 : 1).

## 7- Conclusion

Au terme de cette étude des AVS de T. equiperdum, nous pouvons noter l'existence de caractéristiques communes.

L'axe glycopeptidique présente le même profil avec prédominance des mêmes résidus amino-acides et des mêmes sucres.

L'extrémité C-terminale des AVS se caractérise par l'existence d'une structure glycérophospholipidique, comportant les acides gras suivants : acide palmitique, stéarique et oléique. Toutefois dans certains AVS (Botat -4, -78 et -100), aucun acide gras n'a été identifié et BoTat-4 et BoTat-100 ont une composition glucidique différente puisqu'ils apparaissent dépourvus de galactose.

Parmi les AVS possédant du galactose, de grandes différences de composition lipidique sont observées. Celles ci seraient dues à une différence de sensibilité vis à vis d'une coupure enzymatique qui se produirait lors de l'étape de libération des AVS depuis le manteau plasmique du parasite traité par le tampon pH 5,5. Considérant cette éventualité, la variation de composition glucidique s'expliquerait par le fait de clivage ou non de la structure glycoglycérophospholipidique de l'AVS.

Les conditions de libération du manteau activeraient donc vraisemblablement un enzyme qui dégraderait l'extrémité C-terminale. Signalons que cette hypothèse d'une réaction enzymatique a été également formulée par VOORHEIS et Coll. (1982) (167) pour T. b. brucei.



REPARTITION RELATIVE DES ACIDES GRAS (moles %) DANS LES AVS DE  
I. equiperdum

Acide gras	BoTat-1	BoTat-2	BoTat-20	BoTat-28
C 16 : 0	38.4	33.4	32.8	40.2
C 18 : 0	37.5	40.4	47.9	39.2
C 18 : 1	24.1	26.2	19.3	20.6



TABLEAU 23

L'on ne peut dire si la structure C-terminale de BoTat-1 est le matériel "natif" normalement libéré après enzyme membranaire activé ou s'il correspond à une proportion d'AVS libéré sans action de l'enzyme.

Dans cette seconde hypothèse la structure C-terminale serait la zone d'attache membranaire, dans le premier cas nous n'aurions identifié que le résiduel après coupure et alors la partie enfouie dans la membrane y serait restée en place.

Ce point précis est d'une importance capitale si l'on veut comprendre le mode de libération exacte des AVS de Trypanosoma equiperdum.

## ETUDE COMPARATIVE VIS A VIS DES AVS DE T. b. brucei

La définition physico-chimique des AVS de T. equiperdum établie ci-dessus présente des points de similitude avec celle que nous trouvons pour T. b. brucei dans la littérature.

### 1- Point isoélectrique

Une propriété commune des AVS de T. b. brucei avec des AVS de T. equiperdum est l'existence d'une microhétérogénéité de valeur de points isoélectriques pour chacun. En effet, Cross en 1975 (39) avait purifié des AVS par isoélectrofocalisation. Il isolait toujours un pic majeur et des pics de moindre importance quantitative, présentant la même taille moléculaire que le pic majeur, mais ayant des charges différentes. Il peut d'ailleurs être noté que la dispersion des valeurs enregistrées pour T. b. brucei semble plus limitée que nous l'avons constaté pour T. equiperdum. Dans le cas de T. b. brucei, les valeurs s'échelonnent entre pH 6 et pH 8 mais avec une dominance à pH 7 - 7,5. Pour T. equiperdum, nous avons vu plus haut que ces valeurs s'échelonnent entre pH 5 et pH 8,5.

### 2- Composition amino-acide

Le tableau 24 présente les compositions amino-acide calculées à partir des identifications établies par séquence DNA sur les AVS suivants :

- VSG 117 (BOOTHROYD et coll. (1982) (20), également analysé en parallèle en séquence amino-acide (ALLEN et coll. (1982) (2)).
- AnTat 1.1, 1.1B, 1.10 (PAYS et coll. (1983c) (129)).

Les résultats se définissent dans une composition globale voisine, au point que l'on se trouve dans l'impossibilité en fonction de l'examen d'une composition, de savoir si l'on a affaire à un variant de T. equiperdum ou de T. b. brucei. Ceci est particulièrement évident dans la comparaison d'AnTat 1.1 et BoTat-1.

### 3- Composition glucidique

Une étude de la composition en sucres a été faite par JOHNSON et CROSS (1977) (92). Les résultats illustrés dans le tableau 25

COMPOSITION EN ACIDES AMINES DES GLYCOPROTEINES PURIFIEES DE VARIANTS DE Trypanosoma brucei DETERMINEE A PARTIR

DES SEQUENCES PEPTIDIQUES COMPLETEES

① D'après PAYS et coll (1983)

② D'après BOOTHROYD et coll ; ALLEN et coll (1982)

Acides aminés*	① AnTat 1.1	① AnTat 1.1B	① AnTat 1.10	② VSG 117
Asx	47	48	50	40
Thr	42	42	41	43
Ser	32	30	28	27
Glu	53	51	50	62
Pro	14	17	15	12
Gly	35	32	32	42
Ala	70	69	66	58
Val	10	10	9	17
Cys	13	13	13	13
Met	4	4	5	7
Ile	16	16	20	15
Leu	38	38	34	41
Tyr	10	9	9	10
Phe	5	7	6	8
Lys	43	47	51	56
His	8	7	9	9
Trp	3	3	3	5
Arg	<u>8</u>	<u>8</u>	<u>10</u>	<u>5</u>
	451	451	451	471

\* Valeurs exprimées en résidus par mole de glycoprotéine

TABLEAU 24

TABLEAU 25

## COMPOSITION GLUCIDIQUE AVEC DES AVS DE VARIANTS DE

Trypanosoma brucei  
(D'après JOHNSON et CROSS, 1977)

Variants	55	060	099	100	104	D12
Monnosaccharides*						
Mannose	13	12	28	18	8	8
Galactose	15	9	6	13	5	8
Glucose	5	3	15	8	8	20
N-acétyl glucosamine	10	7	14	8	4	6

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

montre une composition en sucres qui varie de 7 à 17 %. Les mêmes monosaccharides sont caractérisés : mannose, galactose, et N-acétyl-glucosamine. La variation de pourcentage des sucres à elle seule, laisse préjuger d'un nombre variable de sites de glycosylation.

#### 4- Caractérisation à l'éthanolamine

HOLDER (1983a) (82) a isolé les deux glycopeptides C-terminaux de deux AVS appartenant à des familles différentes (VSG 55 et VSG 221), caractérisés au niveau de l'acide aminé C-terminal respectivement par une sérine ou un acide aspartique. Du point de vue analytique, les glycopeptides ont été hydrolysés par l'HCl 6M à 110° C pendant 20 h, puis soumis à la réaction de dansylation. Ce processus leur a permis de mettre en évidence la présence d'éthanolamine au niveau du glycopeptide le plus C-terminal, ceci dans chaque cas (Tableau 26).

Dans le cas de BoTat-1, nos résultats nous ont permis également de démontrer la présence d'éthanolamine en situation C-terminale et même de compléter cela, puisque pour ce qui nous concerne, BoTat-1 possède une substitution par le phosphore et un glycolipide. Ce constat nous laisse envisager une communauté structurale possible entre les deux modèles cellulaires.

#### 5- Conformation des AVS de T. b. brucei par la méthode de Chou et Fasman à partir des séquences complètes publiées

Des travaux très récents réalisés par LALOR et coll. (1984) (99) puis COHEN et coll. (1984) (37), rapportent les résultats d'étude prévisionnelle de structure pour toute une série d'antigènes spécifiques de variant. Ces données montrent une relative homogénéité de définition moléculaire. Le nombre limité d'exemples ne permet toutefois pas encore d'aboutir à une représentation précise et cela d'autant plus que, aucun contrôle expérimental par dichroïsme ne vient conforter ces hypothèses.

Le seul point sur lequel nous voudrions insister est la découverte comme nous avons pu le constater dans BoTat-1 mais cette fois au niveau de ITat 1.3 et AnTat 1.1, de régions hélicoïdales importantes dans la zone N-terminale de la molécule.

CARACTERISATION DE L'ETHANOLAMINE  
DANS DEUX AVS DE T. b. brucei

---

Dansyl-dérivé dosé *	Variant VSG 55	Variant VSG 121
Asp	-	1,00
Ser	1,00	-
Ethanolamine	1,10	1,01
Glucosamine	1,16	1,08

---

\* Résultats en résidus par mole de glycoprotéine

TABLEAU 26

## 6- Conclusion

Les différentes propriétés que nous venons rapidement de présenter, laissent entrevoir une communauté structurale qui autorise une extrapolation des résultats entre les deux espèces qui appartiennent au même sous-genre.

### ETUDE COMPARATIVE VIS A VIS DES AVS DE T. congolense

Cette étude est d'un grand intérêt puisque T. equiperdum et T. b. brucei d'une part, et T. congolense d'autre part, représentent des espèces appartenant à deux sous-genres différents.

#### 1- Point isoélectrique

Les AVS de T. congolense sont caractérisés par une hétérogénéité au niveau du point isoélectrique comparable à celle des AVS de T. equiperdum (ONODERA et coll. (1981) (120). Si l'on peut suspecter une responsabilité de l'axe peptidique, pour RAUTENBERG et coll. (1981) (132), celle-ci serait en partie due à la présence d'acide sialique dans la copule glucidique des antigènes.

#### 2- Composition amino-acide

Les compositions amino-acide présentées dans le tableau 27, proviennent de deux équipes différentes (ONODERA et coll. (1981) (120) ; SAVAGE et coll. (1984) (143)).

L'examen des résultats montre que, les AVS de T. congolense présentent globalement le même profil que les AVS de T. equiperdum ou T. b. brucei. Toutefois, l'on peut noter une teneur en résidus de sérine relativement plus élevée chez T. congolense. En outre, SAVAGE et coll. (1984) (143) ont pu aussi détecter la présence de traces d'éthanolamine dans les AVS de cette espèce.

#### 3- Etude de la copule glucidique

SAVAGE et coll. (1984) (143) ont réalisé très récemment, une étude structurale détaillée des oligosaccharides trouvés dans un antigène



TABLEAU 27

COMPOSITION EN ACIDES AMINES DES GLYCOPROTEINES PURIFIEES DES AVS DE T. congolense

① d'après ONODERA et coll. (1981)

② d'après SAVAGE et coll. (1984)

* Acides aminés	① VSG 1	① VSG 2	② Clone Tc 428			
			Isotype I	Isotype II	Isotype III	Isotype IV
Acide cystéique	3,08	2,52	-	-	-	-
Asx	10,8	11,14	13,3	13,9	13,9	15,0
Thr	6,9	8,08	6,8	7,4	7,1	7,4
Ser	9	8,34	9,1	8,8	8,3	8,1
Glu	11,38	10,66	12,7	12,2	12,0	12,9
Pro	3,04	2,78	1,3	3	2,2	ND
Gly	8,32	8,34	12,6	12,3	12,4	11,8
Ala	13,36	10,78	9,5	9,3	9,7	8,9
Val	3,74	5,84	5,1	5,2	5,1	5,2
Met	0,54	1,24	1,6	1,4	1,6	1,9
Ile	3,52	5,72	6,4	5,7	5,7	5,0
Leu	9,3	6,94	7,8	7,8	8,1	8,0
Tyr	1,64	2,36	1,5	1,4	1,5	2,0
Phe	2,42	1,8	2,1	1,8	2,3	2,7
His	1,52	2,04	1,8	1,4	1,9	2,6
Lys	6,94	8,16	6,4	5,9	6,1	6,6
Arg	3,3	2,42	2,0	2,5	2,1	1,9
Trp	1,08	1,08	ND	ND	ND	ND

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

variable de T. congolense. Ces auteurs ont utilisé comme matériel de base 4 isotopes issus d'un clone de T. congolense.

a) Analyse quantitative

Les sucres sont présents en proportion de 15 %. La composition glucidique est illustrée dans le tableau 27. Parmi les monosaccharides identiques à ceux déjà caractérisés pour T. equiperdum et T. b. brucei, les auteurs ont pu caractériser : le mannose, la N-acétylglucosamine et le galactose. Les rapports molaires rapportés au galactose sont respectivement pour le mannose de 3,9 et pour la N-acétylglucosamine de 3,6 dans le cas des isotopes I, II et III ; les valeurs dans le cas des isotopes IV sont de 2,4 pour la N-acétylglucosamine et le mannose, par rapport au galactose.

La différence essentielle avec les deux espèces précédentes est, l'existence d'acide sialique (RAUTENBERG et coll. (1981) (132) ; SAVAGE et coll. (1984) (143), dont la présence a été démontrée mais qui n'a pas encore pu être estimé quantitativement avec précision.

b) Analyse qualitative

Les glycanes des AVS ont été marqués in vitro par la D-glucosamine tritiée puis soumis à une digestion pronasique. Les glycopeptides obtenus ont alors été traités par l'endo-N-acétylglucosaminidase H. L'hydrolysate a été fractionné sur une colonne de Biogel P4, et le protocole a permis de séparer les deux groupes d'oligosaccharides, respectivement sensibles ou non à cet enzyme.

Les oligosaccharides sensibles ont été à nouveau purifiés par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC). 6 fractions d'oligosaccharides ont été individualisées, parmi celles-ci, 5 se sont révélées d'une structure de type oligomannosidique classique ( $\text{Man}_{5-9}$  GlcNAc), constatation basée sur l'action positive de l' $\alpha$ -mannosidase. La fraction restante possède une structure oligomannosidique mixte, car elle contient un galactose en position terminale.

Les oligosaccharides résistants à l'endo-N-acétylglucosaminidase H ont été libérés par hydrazinolyse, puis soumis à un fractionnement sur une

colonne de sépharose-sérotonine. Deux sous-groupes d'oligosaccharides ont été obtenus, puis purifiés sur une colonne de Biogel P4.

Le premier sous-groupe est constitué d'oligosaccharides non sialidés de type N-acétyl - lactosaminique complexe, biantennés!

Le second sous-groupe est représenté par des oligosaccharides sialidés. Leur analyse structurale n'a pu être menée à terme, à cause de leur résistance partielle à la neuraminidase. En effet, 30 % seulement des glycannes sialidés sont apparus sensibles à cet enzyme.

Ces différentes données laissent entendre que pour T. congolense, il existerait aussi plusieurs sites de glycosylation possibles :

. les premiers de type oligomannosidique comme nous avons pu le décrire dans T. equiperdum.

. les autres, d'un type différent pour lesquels une situation C-terminale n'est pas à éliminer puisque des traces d'éthanolamine ont été détectées ; qui laissent donc entendre pour cette espèce encore, l'hypothèse d'une terminaison glycolipidique C-terminale.

#### 4- Conclusion

Au total, les AVS de T. congolense, bien que proches de la définition classique applicable aux AVS de T. equiperdum et T. b. brucei s'en distinguent essentiellement au niveau des substitutions glycaniques et peut être de la richesse de l'axe peptidique en sérine. Globalement, il nous semble que de grands points de similitude permettent de rapprocher ce modèle de celui que nous avons étudié.

## CONCLUSION GENERALE

Depuis une dizaine d'années, les données expérimentales concernant le phénomène de variation antigénique des trypanosomes se sont accumulées à un point tel que l'on est maintenant capable :

- de proposer au moins trois mécanismes génétiques, permettant au parasite de faire "varier" la qualité physico-chimique de l'antigène variable constituant le manteau cellulaire.

- de donner une définition structurale de l'axe peptidique de différents antigènes, appartenant à des espèces différentes de trypanosomes.

- d'entrevoir l'organisation moléculaire des antigènes variables.

L'ensemble de ces acquis a fait progresser de manière considérable le concept de variation antigénique, qui en a souligné l'extrême importance pour la vie du parasite, et ses relations avec son hôte intermédiaire et/ou son hôte définitif.

Il existe pourtant encore un certain nombre de points obscurs, qui se doivent d'être résolus pour parvenir au stade des retombées pratiques. Parmi ces approches expérimentales qu'il est fondamental d'aborder, nous retiendrons :

- 1- La description du mode d'attachement des AVS au niveau de la membrane plasmique,

- 2- Le processus de biosynthèse qui partant du précurseur protéique intracellulaire, mène à l'expression en surface de l'antigène variable.

- 3- Le mécanisme membranaire qui provoque la libération de l'antigène.

Le champ d'application serait de pouvoir provoquer une libération du manteau, ou d'empêcher sa synthèse ce qui représenterait un argument thérapeutique considérable.

Le caractère pluridisciplinaire des études a été très positif. La connaissance de la structure primaire de l'axe peptidique est en soi d'un intérêt relatif. L'étude précise de la conformité moléculaire, de son agencement, de sa constance ou de sa variabilité d'un AVS à l'autre est une question qui, si elle était résolue, serait d'un grand intérêt et trouverait application. C'est en effet de cette manière que l'on situera progressivement les zones "fonctionnelles" importantes, qui nous permettront par exemple :

- une reconnaissance des sites antigéniques utilisables à des fins diagnostiques ou thérapeutiques.

- une mise en évidence des zones d'interactions antigène-antigène venant expliquer l'organisation en manteau de ces glycoprotéines à la surface du parasite : une simple désorganisation pouvant représenter un élément de perturbations des mécanismes de défense du parasite, et aussi de sa microphysiologie d'échange avec l'hôte définitif.

Nous voudrions conclure en rappelant les travaux très anciens de LAVERAN (1902) (102), qui montraient déjà l'effet cytotoxique du sérum humain normal sur Trypanosoma b. brucei. C'est à partir du rapprochement entre des constats biologiques de cet ordre, et une connaissance de plus en plus précise des aspects moléculaires, que l'on est en droit d'attendre des résultats déterminants dans le domaine appliqué. Il semble d'ailleurs que, cette nouvelle vision des choses puisse s'appliquer à bon nombre de parasitoses. Cette mise en commun de moyens pluridisciplinaires, a renouvelé complètement la recherche dans ses possibilités à terme.

Les aspects humains et sociaux sont évidents. Deux continents attendent beaucoup d'organisme tels que la Communauté Economique Européenne et surtout l'Organisation Mondiale de la Santé dont la charge est de sensibiliser le monde scientifique.

Notre seule fierté serait par ce mémoire d'avoir participé en toute modestie à cet effort.

APPENDICE TECHNIQUE

TABLE DES MATIERES  
DE L'APPENDICE TECHNIQUE

1ère partie : Techniques relatives à l'étude biochimique des antigènes variables purifiés

I- Méthodes d'étude physico-chimique

A- Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS

- 1- Principe
- 2- Technique
- 3- Conditions opératoires
- 4- Détermination de la masse moléculaire apparente

B- Isoélectrofocalisation analytique sur gel de polyacrylamide

- 1- Principe
- 2- Technique

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

- 1- Principe
- 2- Conditions opératoires

D- Electrophorèse d'affinité avec la concanaviline A

E. Etude en dichroïsme circulaire

F- Composition amino acide

G- Composition glucidique

H- Etude de la phosphorylation

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

I- Caractérisation de glycérol - quantification

J- Composition lipidique

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

A- Techniques de modifications chimiques

- 1- Réduction et S-carboxamidométhylation
- 2- Succinylation

B- Conditions d'utilisation des différents enzymes

- 1- Enzymes utilisés
- 2- Tampons d'incubation
- 3- Protocoles d'hydrolyse

C- Coupure chimique par le bromure de cyanogène

D- Détermination de séquence amino acide

- 1- Principe
- 2- Méthodologies
  - a) Dégradation manuelle
  - b) Dégradation automatique
  - c) Identification des PTH amino acide dérivés



## 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) (98).

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 régulée 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 <sup>(+)</sup>	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 ( $\beta$ -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 isoléctrique 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 isoéctrique.

## 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<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>.

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 sulfosalicylique 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) (139) 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  $\mu$ l d'une solution de bicarbonate de sodium 0,05 M de pH 8,2 ; 10  $\mu$ 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 $\mu$ l	10 $\mu$ l
persulfate d'ammonium 10 %	25 $\mu$ l	10 $\mu$ 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 concanavoline 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 concanavoline 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 fluoescamine

# Electrophorèse d'affinité

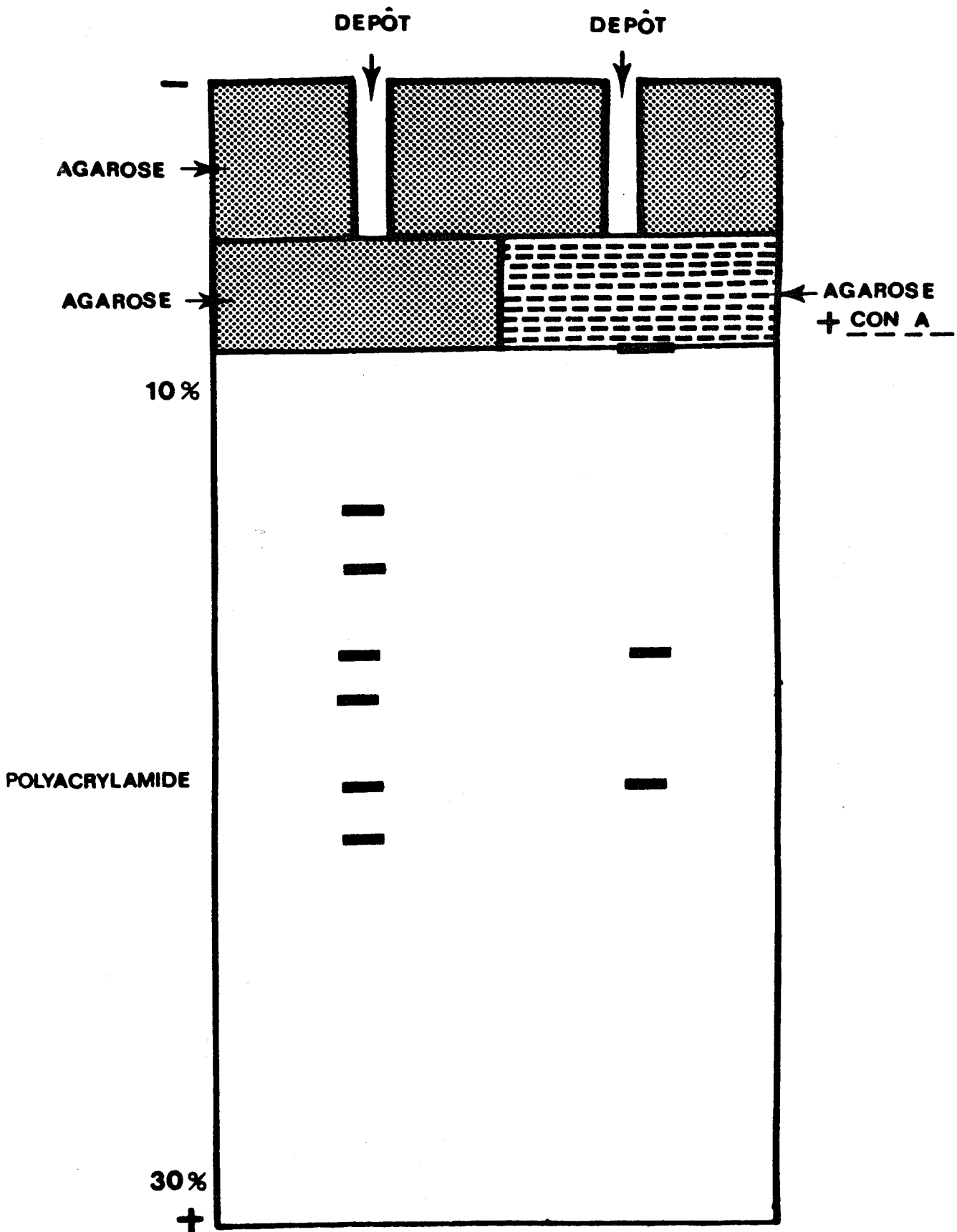


figure 1



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 µl	10 µl
persulfate d'ammonium 10 %	30 µl	15 µl

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

A	2,00 ml
E	1,00 ml
CaCl <sub>2</sub> 0.1 M	0,10 ml
MnCl <sub>2</sub> 0.1 M	0,10 ml
eau	5,30 ml
TEMED	60 µl
persulfate d'ammonium 10 %	120 µl

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

F	3,00 ml
CaCl <sub>2</sub> 0,1 M	0,30 ml
MnCl <sub>2</sub> 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 µl 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-glycolle pH 9,4 pendant une nuit sous un voltage constant de 150 volts et avec réfrigération continue à 15° C.

#### E. 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 ( $\theta$ ) 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 :

$$\theta : 3300 \frac{M \Delta s}{cd}$$

- M = masse moyenne des résidus d'acides aminés (ici 111)  
c = concentration en g/l  
d = longueur de la cuve en cm  
 $\Delta$  = nombre de mm mesurés  
s = sensibilité ( $10^{-6}$  à  $2 \cdot 10^{-4}$ )

$\theta$  est donc exprimé en deg. décimole<sup>-1</sup> cm<sup>2</sup>.

### 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  $\alpha$  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  $\beta$  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  $\beta$ . 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) (31).

### F- Composition amino acide

#### a) hydrolyse

L'échantillon en quantité de 100 à 500  $\mu$ 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) (51) 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) (131).

1 mg d'échantillon est hydrolysé 24 heures sous vide à 110° C par 1 ml d'acide -mercapto-sulfonique en présence de 500 nanomoles de norleucine. Le pH de l'hydrolysat est ensuite ajusté à pH 2,2 par de la soude 2 N et le volume ajusté à 5 ml avec un tampon pH 2,2 utilisé habituellement pour le dépôt des échantillons sur autoanalyseur. 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) (74). 1 à 2 mg d'échantillon sont repris dans 100 µl d'acide formique à 99 % et 20 µl de méthanol, puis sont laissés à - 5° C pendant 30 mn. Sont alors ajoutés 100 µl 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'hydrolysate est soumis à une analyse dans les conditions précédemment décrites.

## G- 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) (133).

### 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 µl d'anhydride acétique et de 100 µl 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 µl 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 µl de Sylon (Sylon HTP-Inc, Bellafonte, Pennsylvania, 16 823) pendant 1 heure à température ambiante. Après séchage sous azote, 100 µl d'heptane sont ajoutés. Un délai de 30 minutes est fixé avant l'injection de 1 à 2 µl 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.

## H- 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) (147).

\* 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) (6)

L'on ajoute aux précipités précédents, et à une gamme étalon préparée à partir d'une solution de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,5 M, 62,5  $\mu\text{l}$  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) (88))

- 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  $\mu$ l d'HCl 1,2 N et l'on ajoute 125  $\mu$ l de réactif, et après 5 minutes, 12,5  $\mu$ l 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  $^{32}\text{P}$  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  $^{32}\text{P}$  est incubé pendant 1 heure dans 200  $\mu$ l 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.

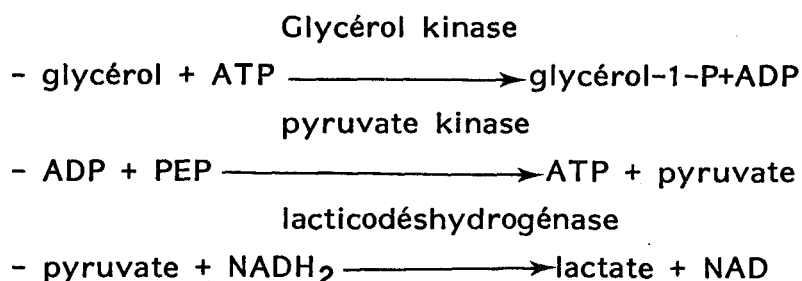
### \* Hydrolyse par la phosphatase alcaline

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

## I- Caractérisation du glycérol

Le glycérol est libéré par hydrolyse dans de l'HCl 2 N à 125° C pendant 48 heures (RENKONEN (1969) (135)). 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) (175) utilisant les réactions suivantes :



#### J- 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) (52) ; 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) (68)). 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) (56). 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) (140)). 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  $\text{NH}_2$  des résidus de lysine. La PTH succinyllysine s'exprime en HPLC sur colonne  $\mu$ -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) (95). 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.

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

## 2- Tampons d'incubation

L'hydrolyse trypsique est effectuée 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 méthyl morpholine 0,1 M de pH 8 (LEVY et Coll. (1970) (110)).

L'hydrolyse par la protéase de S. auréus est menée dans un tampon acétate d'ammonium 0,05 M pH 4 (HOUMARD et DRAPEAU) (1972) (84)).

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- Coupure chimique par bromure de cyanogène

Le principe réactionnel est détaillé dans le chapitre II. La technique utilisée est celle préconisée par STEERS et coll. (1965) (148). 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) (48) sont schématisées dans la figure 2.

### 2- Méthodologie

#### a) Dégradation manuelle

Nous suivons le protocole établi par EDMAN (1970) (49) et modifié par DEMAILLE (1979) (43).

##### - Couplage

Les différentes étapes sont les suivantes :

- . dissolution d'environ 200 nanomoles d'échantillon dans un tube conique par 100  $\mu$ 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  $\mu$ l de phénylisothiocyanate 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  $\mu$ 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

### ETAPES DE LA DEGRADATION DE EDMAN

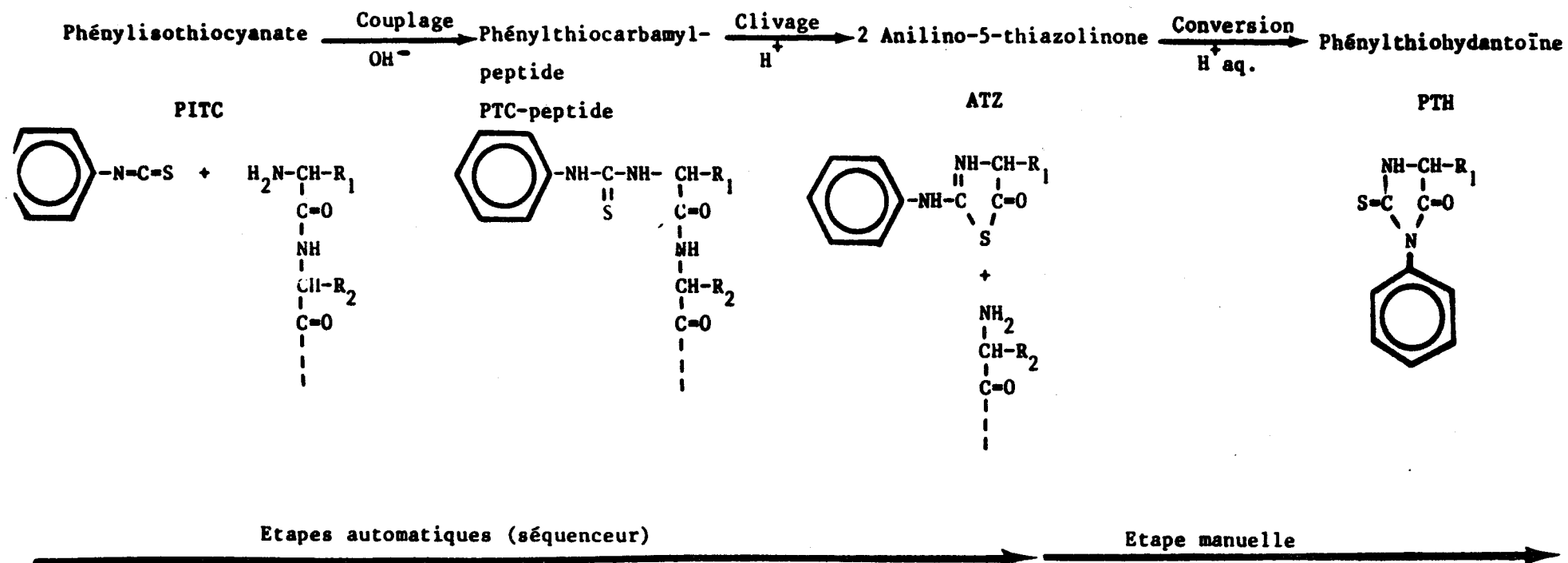


figure 2

- séchage du produit sous azote

- extraction de la thiazolinone par de l'éther dépourvu de peroxydes et contenant de l'éthylmercaptan comme antioxydant (20 µl 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 µl 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 µl 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.

**SCHEMA SIMPLIFIE DU SEQUENCEUR BECKMAN 890 C**

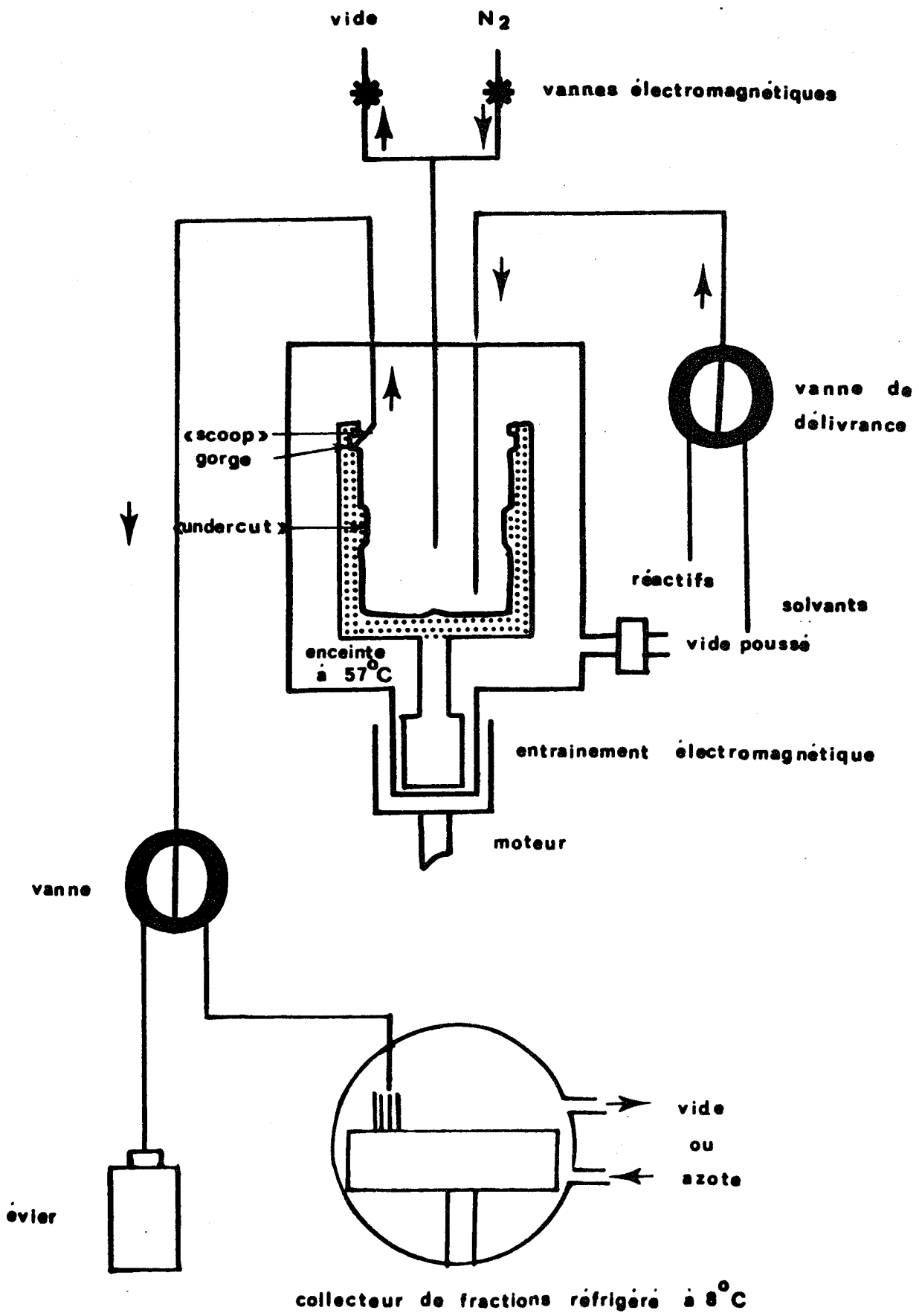


figure 3

## 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 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) (94). 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) (86).

### 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) (73), modifiée par BRIAND (1981) (25).

La séparation est réalisée sur une colonne  $\mu$ -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  $\mu$ -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.



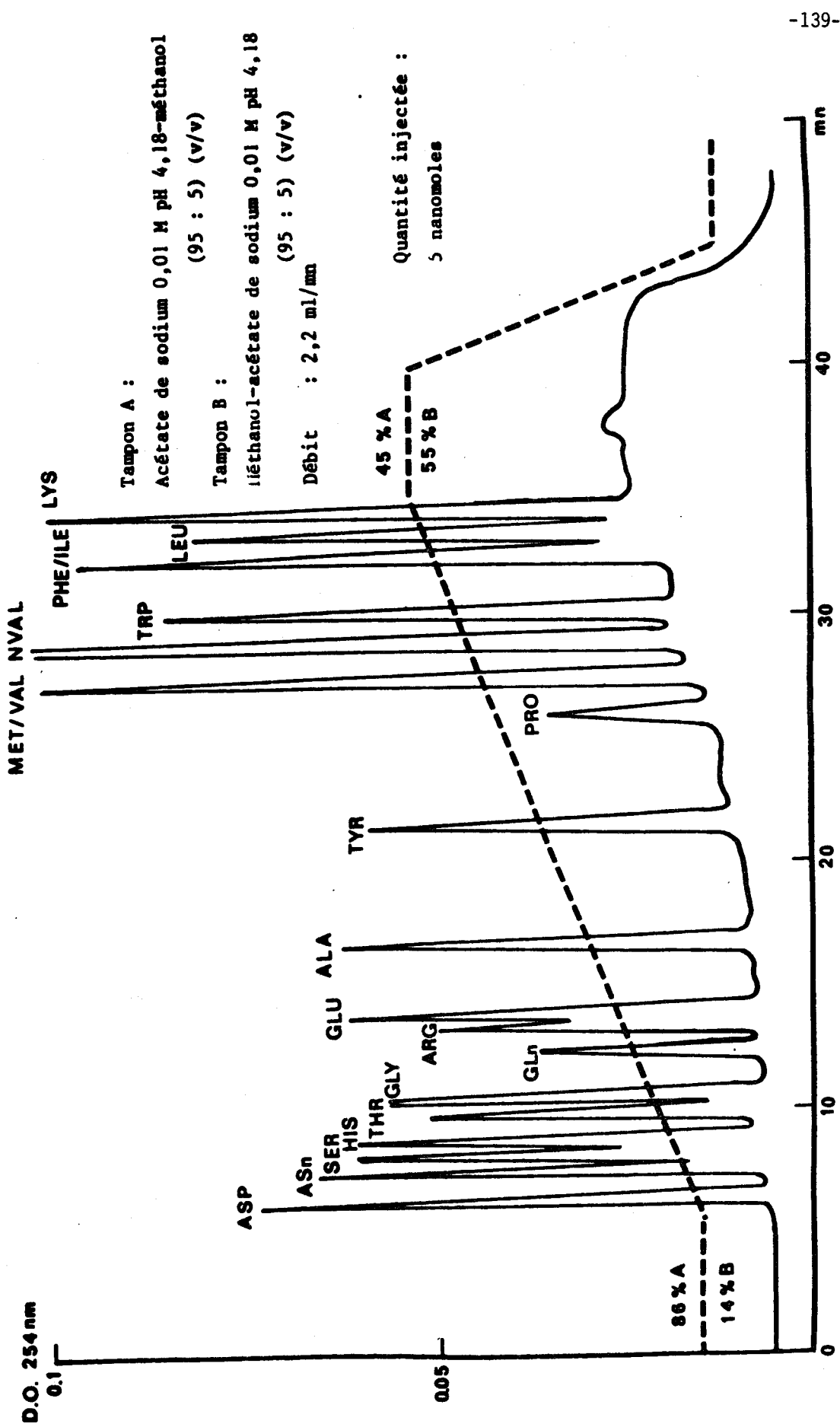


figure 4

SEPARATION DES PTH-AMINO-ACIDES PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE A HAUTE PERFORMANCE SUR COLONNE  $\mu$ BONDAPAK CN

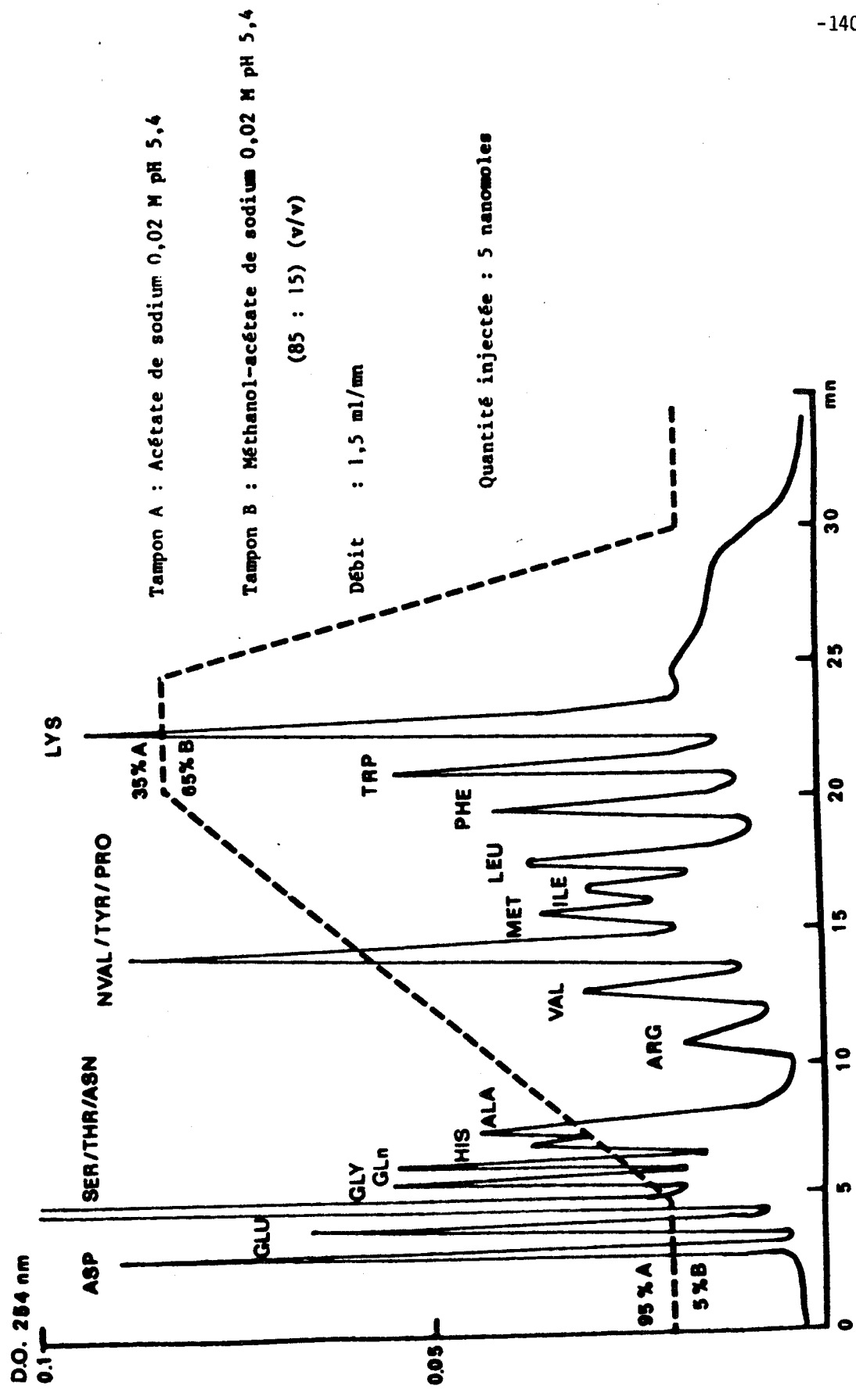


figure 5

SEPARATION DES PTH-AMINO-ACIDES NON SILYLES PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

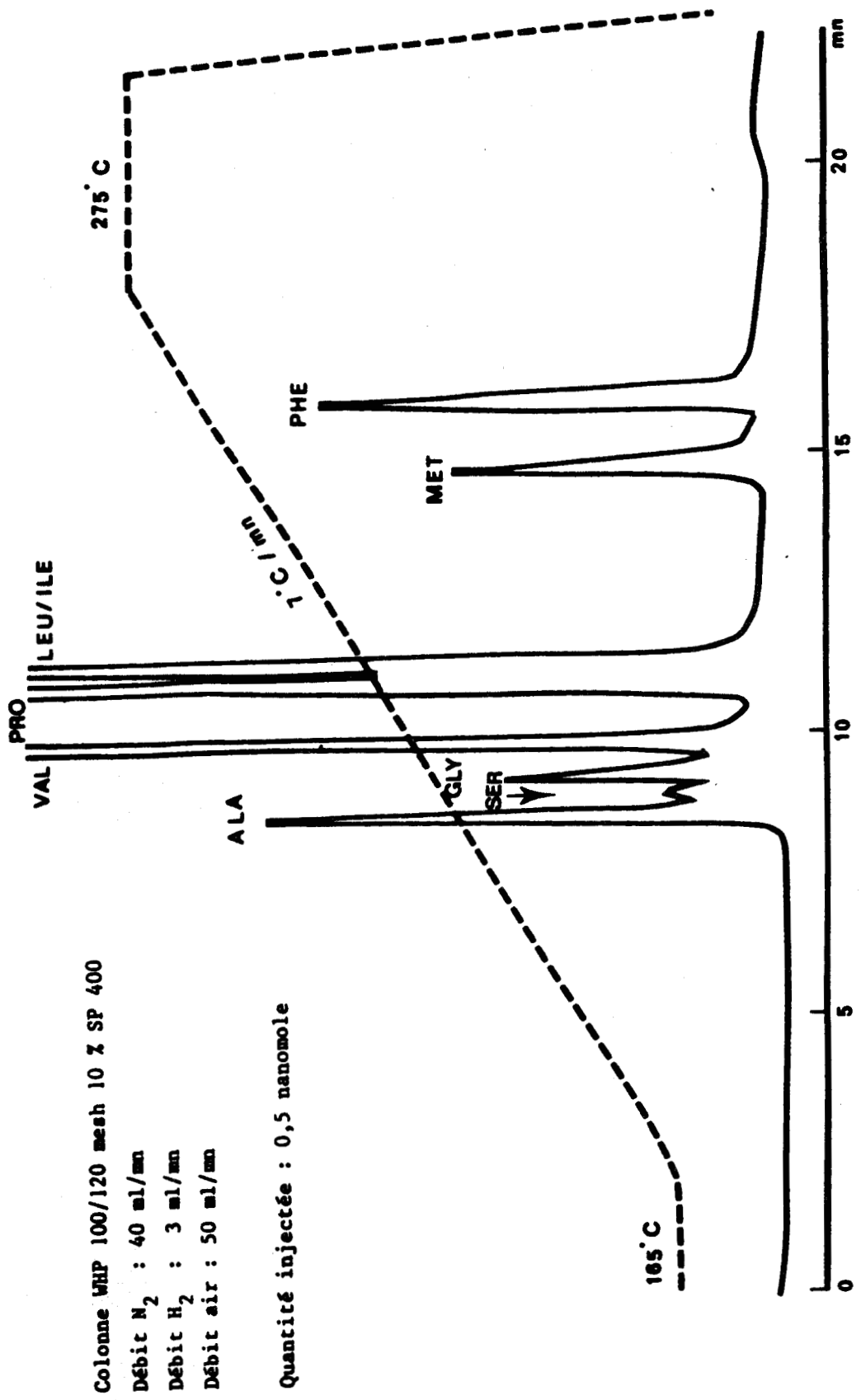


figure 6

## BIBLIOGRAPHIE

- 1- AFCHAIN, D.J., FRUIT, J., PETITPREZ, N., VAN MEIRVENNE, D., LE RAY, D., BOUT, D. & CAPRON, A. (1976).  
*Antigenic analysis of a variant specific component of T. brucei brucei.  
I. Immunological purification by affinity chromatography.  
Pathologie et Biologie, 24, 615-617. (23)*
- 2- ALLEN, G., GURNETT, L.P. & CROSS, G.A.M. (1982).  
*Complete amino acid sequence of a variant surface glycoprotein (VSG 117) from T. brucei.  
J. Mol. Biol., 157, 527-546. (25, 37, 101)*
- 3- ALLEN, G. & GURNETT, L.P. (1983).  
*Locations of the six disulphide bonds in a variant surface glycoprotein (VSG 117) from T. brucei.  
Biochem. J., 209, 481-487. (25)*
- 4- ALLSOPP, B.A., NJOGU, A.R. & HUMPHYES, K.C. (1971).  
*Nature and location of T. brucei subgroup exoantigen and its relationship to 4 S-antigen.  
Exp. parasitol., 29, 271-284. (19,22)*
- 5- ALLSOPP, B.A. & NJOGU, A.R. (1974).  
*Monosaccharide composition of the surface glycoprotein antigens of T. brucei.  
Parasitology, 69, 274-281. (22)*
- 6- AMES, B.N. (1966).  
*Assay of inorganic phosphate  
Methods enzymol., 8, 115-118. (128)*
- 7- AUFFRET, C.A. & TURNER, M.J. (1981).  
*Variant specific antigens of Trypanosoma brucei exist in solution as glycoprotein dimers.  
Biochem. J., 193, 647-650. (25)*

- 8- BALTZ, T., BALTZ, D. & PAUTRIZEL, R. (1976).  
Affinité de la concanavaline A pour T. equiperdum. Applications à l'isolement de la fraction glycoprotéique spécifique du type antigénique.  
Ann. Immunol., 127C, 761-774. (23)
- 9- BARBET, A.F. & Mc GUIRE, T.C. (1978).  
Cross reacting determinants in variant specific surface antigens of african trypanosomes.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1989-1993. (33)
- 10- BARBET, A.F., Mc GUIRE, T.C., MUSOKE, A.J. & HIRUMI, H. (1979).  
Cross reacting determinants in trypanosome surface antigens.  
Pathogenicity of trypanosomes, (LOSOS, G. and CHOUINARD, A. Eds.)  
International Development Research Centre, Ottawa, pp 38-43. (33)
- 11- BARRY, J.D., VICKERMAN, K. (1979).  
Trypanosoma brucei : loss of variable antigens during transformation from bloodstream to Procyclic form in vitro.  
Exp. Parasitol., 48, 313-324. (20)
- 12- BERNARDS, A., VAN DER PLOEG, L.H.T., CARLOS, A., FRASCH, C., BORST, P., BOOTHROYD, J.C., COLEMAN, S.L. & CROSS, G.A.M. (1981).  
Activation of trypanosomes surface glycoprotein genes involves a duplication-transposition leading to an altered 3' end.  
Cell., 27, 497-505. (38,39)
- 13- BERNARDS, A. (1982).  
Transposable genes for surface glycoproteins in trypanosomes  
TIBS, 7, 253-255. (39,40)
- 14- BIGALKE, R.D. (1966).  
Observations on the antigens of some trypanosomes with special reference to common antigens  
Underspoort Journal of Veterinary Research, 33, 277-760. (19)
- 15- BOHRINGER, S. & HECKER, H. (1974).  
Quantitative ultrastructural differences between strains of the Trypanosoma brucei subgroup during transformation in blood.  
J. Protozool., 21, 694-698. (15)

- 16- BOHRINGER, S. & HECKER, H. (1975).  
*Quantitative ultrastructural investigations of the life cycle of Trypanosoma brucei : A morphometric analysis.*  
J. Protozool., 22, 463-467. (15)
- 17- BOOTHROYD, J.C., CROSS, G.A.M., HOEIJMAKERS, J.H.J. & BORST, P. (1980).  
*A variant surface glycoprotein of Trypanosoma brucei synthesized with C. terminal hydrophobic "tail" absent from purified glycoprotein.*  
Nature, 288, 624-626. (25, 26, 37, 38)
- 18- BOOTHROYD, J.C., PAYNTER, C.A., CROSS, G.A.M., BERNARDS, A. & BORST, P. (1981).  
*Variant surface glycoproteins of Trypanosoma brucei is synthesised with cleavage hydrophobic sequences at the carboxyl and amino termini.*  
Nucl. Acids Res., 9, 4735-4743. (25, 26, 28)
- 19- 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. (25, 40)
- 20- BOOTHROYD, J.C., PAYNTER, C.A., COLEMAN, S.L. & CROSS, G.A.M. (1982).  
*Complete nucleotide sequence of complementary DNA coding for a variant surface glycoprotein from Trypanosoma brucei.*  
J. Mol. Biol., 157, 547-556. (101)
- 21- BORST, P., FRASCH, A.C.C., BERNARDS, A., VAN DER PLOEG, L.H.T. & CROSS, G.A.M. (1980b).  
*The gene for variant antigens in trypanosomes*  
Am. J. Trop. Med. Hyg. Suppl., 29, 1033-1036. (40)
- 22- BORST, P. & CROSS, G.A.M. (1982).  
*Molecular basis for trypanosome antigenic variation.*  
Cell, 29, 291-303. (31, 35, 37, 39)

- 23- BORST, P., BERNARDS, A., VAN DER PLOEG, L.H.T., MICHELS, P.A.M., LIU, A.Y.C., DE LANGE, T. & KOOTER, J.M. (1983).  
*The control of variant surface antigen synthesis in trypanosomes.*  
Eur. J. Biochem., 137, 383-389. (6, 40)
- 24- BOWMAN, I.B.R. & FLYNN, I.W. (1976).  
*Oxidative metabolism of trypanosomes.*  
In : *Biology of the kinetoplastida*, Vol. 1. Edited by Lumsden WHR & Evans A.D., pp 436-467, Academic Press. (17)
- 25- BRIAND, G. (1981).  
*Histone H5 d'érythrocyte de poulet.*  
Thèse de Doctorat ès-Sciences, Lille. (138)
- 26- BRIDGEN, P.J., CROSS, G.A.M. & BRIDGEN, J. (1976)  
*N-terminal amino acid sequence of variant specific surface antigens from*  
Trypanosoma brucei.  
Nature, 263, 613-614. (25)
- 27- BROWN, K.N. & WILLIAMSON, J. (1962).  
*Antigens of brucei trypanosomes.*  
Nature, 194, 1253-1255. (18, 19)
- 28- BROWN, K.N. & WILLIAMSON, J. (1964).  
*The chemical composition of trypanosomes IV. Location of antigens in subcellular fractions of*  
Trypanosoma rhodesiense.  
Exp. Parasitol., 15, 69-86. (18)
- 29- CAPBERN, A., GIROUD, C., BALTZ, T. & MATTERN, P. (1977).  
T. equiperdum : *Etude des variations antigéniques au cours de la trypanosomiase expérimentale du lapin.*  
Parasitol., 42, 6-13. (19, 20, 21, 45)
- 30- CAPONY, J.P. & 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. (52)

- 31- CHEN, Y.H., YANG, J.T., and CHAU, K.H. (1974).  
*Determination of the helix and form of protein in aqueous solution by circular dichroism.*  
Biochemistry, 113, 3350-3359. (125)
- 32- CHOU, P.Y., FASMAN, G.D. (1974).  
*Conformational parameter for amino acids in helical sheet and random coil regions calculated from proteins.*  
Biochemistry, 13, 211-221. (80)
- 33- CHOU, P.Y. and FASMAN, G.D. (1974).  
*Prediction of protein conformation*  
Biochemistry, 13, 221-249. (80)
- 34- CHOU, P.Y. and FASMAN, G.D. (1977).  
*turns in proteins.*  
J. Mol. Biol., 115, 135-175. (82)
- 35- CHOU, P.Y. and FASMAN, G.D. (1978)  
*Empirical predictions of protein conformation*  
Ann. Rev. Biochem., 47, 251-276. (82)
- 36- CLARKSON, M.J. & AWAN, M.A.Q (1967)  
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 61, 142-145. (19)
- 37- COHEN, C., REINHARDT, B., PARRY, D.A.D., ROELANTS, G.E.,  
HIRSCH, W. & KANWE, B. (1984).  
*-helical coiled-coil structures of Trypanosoma brucei variable antigen glycoproteins.*  
Nature, 311, 169-171. (104)
- 38- 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. (22, 23, 31)



- 39- CROSS, G.A.M. & JOHNSON, J.G. (1976).  
*Structure and organisation of the variant specific surface antigens of Trypanosoma brucei.*  
*In : The Biochemistry of Parasites and Host-Parasite Relationship (VAN DEN BOSSCHE, H. Ed). North Holland Biomedical Press Amsterdam, pp. 413-420. (35)*
- 40- CROSS, G.A.M. (1977).  
*Isolation, structure and function of variant specific surface antigens.*  
*Ann. Soc. Belge. Med. Trop., 57, 389-399. (23)*
- 41- CROSS, G.A.M. (1978).  
*Antigenic variation in trypanosomes.*  
*Proc. Royal Soc. Lond. Ser., B202, 55-72. (35)*
- 42- CROSS, G.A.M. (1979).  
*Cross reacting determinants in the C-terminal region of trypanosome variant surface antigens.*  
*Nature, 277, 310-312. (33, 35)*
- 43- DEMAILLE, J. (1979)  
*Communication personnelle. (133)*
- 44- DIFFLEY, P. & JAYAWARDENA, A.N. (1982).  
*Comparative analysis of procedures used to isolate variant antigen from T. brucei rhodesiense.*  
*J. Parasitol., 68, 532-537. (23)*
- 45- DIXON, H., GINGER, C.D. & WILLIAMSON, J. (1972).  
*Trypanosome sterols and their metabolic origins.*  
*Comp. Biochem. Phys., 41B, 1-18. (4, 6)*
- 46- DOYEN, N. & LEPRESLE, C. (1979).  
*Partial non cleavage by cyanogen bromide of a methionine-cystine bond from human serum albumin and bovine-lactalbumin.*  
*Biochem. J., 177, 251-254. (58)*

- 47- DOYLE, J.J., HIRUMI, H., HIRUMI, K., LUPTON, E.N. & CROSS, G.A.M. (1980).  
*Antigenic variation in clones of animal infective Trypanosoma brucei derived and maintained in vitro.*  
Parasitology, 80, 359-369. (21°)
- 48- EDMAN, P. (1956).  
*On the mechanism of the phenyl-isothiocyanate degradation of peptides.*  
Acta Chem. Scand., 10, 761-768. (133)
- 49- EDMAN, P. (1970).  
*In : Molecular Biology Biochemistry and Biophysics, (Needleman S.B. Ed.). Springer Verlag New York, pp 211-255. (133)*
- 50- ENGLUND, P.T., HAJDUK, S.L. & MARINI, J.C. (1982).  
*The molecular biology of trypanosomes.*  
Ann. Rev. Biochem., 51, 695-726. (6)
- 51- FAUCONNET, M. & ROCHEMONT, J. (1978).  
*A single-column, amino acid analysis method which resolves hexoamines and several cysteine derivatives.*  
Anal. Biochem., 91, 403-409. (126)
- 52- FOLCH, J., LEES, M. & SLOANE-STANLEY, G.H. (1957).  
*Isolation and purification of total lipids from tissues.*  
J. Biol. Chem., 226, 497-509. (73, 130)
- 53- FRANKE, E. (1905).  
*Therapeutische versuche beitrypanosome nerkrankung.*  
Münchener Medizinische Wochenschrift, 52, 2059-2060. (19)
- 54- FRASCH, A.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 Trypanosome brucei.*  
In : The Biochemistry of Parasites and Host Parasite Relationships : The Host - Invader Interplay, H. Van den Bossche, Ed. (Amsterdam : North Holland) pp. 235-239. (38)

- 55- FRUIT, J., AFCHAIN, D., PETITPREZ, A., VAN MEIRVENNE, N., LERAY, D., BOUT, D. & CAPRON, A. (1977).  
*Antigenic analysis of a variant specific components of Trypanosoma brucei brucei : localization on the surface coat with labelled specific antibodies.*  
Parasitology, 74, 185-190. (19)
- 56- GALL, W.E., CUNNINGHAM, B.A., WAXDAL, M.J., KONISBERG, W.H. & EDELMAN, G.H. (1968).  
*The covalent structure of a human G immunoglobulin. IV The interchain disulfide bond.*  
Biochemistry, 7, 1973-1982. (130)
- 57- GHIOTTO, U., BRUN, R., JENNI, L. & HECKER, H. (1979)  
*Trypanosoma brucei : Morphogenetic changes and loss of infectivity during transformation of bloodstream form to procyclic culture form in vitro.*  
Exp. Parasitol., 48, 447-456. (15)
- 58- GRAY, A.R. (1961).  
*Soluble antigens of T. vivax and of other trypanosomes.*  
Immunology, 4, 253. (19)
- 59- GRAY, A.R. (1964).  
*The biological control of the antigenic characters of a strain of trypanosomes.*  
*In : International Scientific Committee for Trypanosomiasis research, Teeth meeting, Kampala, Commission for Technical cooperation in Africa South of the Sahara (publication n° 97), p55. (20)*
- 60- GRAY, A.R. (1965a).  
*Antigenic variation in a strain of T. brucei transmitted by Glossina morsitans and G. Palpalis.*  
J. Gen. Microbiol., 41, 195-214. (20)
- 61- GRAY, A.R. (1965b).  
*Antigenic variation in clones of T. brucei. I. Immunological relationships of the clones.*  
Ann. Trop. Med. Parasitol., 59, 27-36. (20)

- 62- GRAY, A.R. (1967).  
*Some principles of the immunology of trypanosomiasis.*  
Bull. Org. Mond. Santé, 37, 177-193. (20)
- 63- GRAY, A.R. (1972).  
*Variable agglutinogenic antigens of Trypanosoma gambiense and their distribution among isolates of the trypanosome collected in different places in Nigeria.*  
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 66, 263-264. (20)
- 64- GRAY, A.R. (1975).  
*A pattern in the development of agglutinogenic antigens of cyclically transmitted isolates of T. gambiense.*  
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 69, 131-138. (20)
- 65- GREEN, C. (1977)  
Int. Rev. Biochem., 14, 101-152. (6)
- 66- GROSS, E. and WITKOP, B. (1961).  
J. Am. Chem. Soc., 83, 1510-1511. (57)
- 67- GUTTERIDGE, W.E., and ROGERSON, G.W. (1979).  
*In : "Biology of the kinetoplastida" (LUMSDEN, W.H.R. and EVANS, D.A., Eds), Vol. 2, p. 619-652, Academic Press, New York (17)*
- 68- HAGENFELDT, L. (1966).  
*A gas chromatographic method for the determination of individual free fatty acids in plasma.*  
Clin. Chim. Acta, 13, 266-268. (130)
- 69- HAJDUK, S. & VICKERMAN, K. (1981).  
*Antigenic differentiation of Trypanosoma brucei : studies on metacyclic and first parasitaemia populations.*  
Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 75, 145. (22)

- 70- HAJDUK, S.L., CAMERON, C., BARRY, J.D., and VICKERMAN, K. (1981).  
*Antigenic variation inc cyclically transmitted Trypanosoma brucei : variable salivary glands of Glossina morsitans.*  
Parasitology, 83, 595-607. (20)
- 71- HECKER, H., BURRI, P.H., STEIGER, R.F. & GEIGY, R. (1972).  
*Morphometric data on the ultrastructure of the pleomorphic blood forms of Trypanosoma brucei.* Plimme & Bredford, 1899.  
Acta Tropica, 29, 182-188. (15)
- 72- HECKER, H., BURRI, P.H. and BORHINGER, S. (1973).  
*Quantitative ultrastructural differences in the mitochondrion of pleomorphic blood forms of Trypanosoma brucei.*  
Experientia, 29, 901-903. (15)
- 73- HERMANN, J., TITANI, K., ERICSSON, L.H., WADE, R.D., NEURATH, H. & WALSH, K.A. (1978).  
*Amino acid sequence of two cyanogen bromid fragments of glycogene phosphorylase.*  
Biochemistry, 17, 5672-5679. (138)
- 74- HIRS, C.H.W. (1967).  
*Determination of cystine as cysteic acid.*  
Methods enzymol., 11, 59-62. (126)
- 75- HIRUMI, H., DOYLE, J.J. & HIRUMI, K (1977a).  
*African trypanosomes : cultivation of animal infective Trypanosoma brucei in vitro.*  
Science, 196, 992-994. (21)
- 76- HIRUMI, H., DOYLE, J.J., and HIRUMI, K. (1977b).  
*Cultivation of bloodstream Trypanosoma brucei.*  
Bull. Org. Mond. Santé, 55, 405-409. (21)
- 77- HOARE, C.A. and WALLACE, F.G. (1966).  
*Developmental stages of trypanosomatid flagellates : a new terminology.*  
Nature (London), 212, 1385-1386. (2,7)

- 78- HOARE, C.A. (1972).  
*In* : *The trypanosomes of mammals : A zoological monograph*. Blackwell, Oxford. (2)
- 79- HOEIJMAKERS, J.H.J., BORST, P., VAN DEN BURG, J., WEISSMANN, C. & CROSS, G.A.M. (1980a).  
*The isolation of plasmides containing DNA complementary to messenger RNA for variant surface glycoproteins of Trypanosoma brucei*.  
Gene, 8, 391-417. (33)
- 80- HOEIJMAKERS, J.H.J., FRASCH, A.C.C., BERNARDS, A., BORST, P. & CROSS, G.A.M. (1980b).  
*Novel expression-linked copies of the genes for variant surface antigens in trypanosomes*.  
Nature, 284, 78-80. (37, 38)
- 81- HOLDER, A.A., & CROSS, G.A.M. (1981b).  
*Glycopeptides from variant surface glycoproteins of Trypanosoma brucei*.  
*C-terminal location of antigenically cross reacting carbohydrate moieties*.  
Mol. Biochem. Parasitol., 2, 135-150. (25, 28, 31, 33, 34)
- 82- HOLDER, A.A. (1983a).  
*Carbohydrate is linked through ethanolamine to the C-terminal amino acid of Trypanosoma brucei variant surface glycoprotein*.  
Biochem. J., 209, 261-262. (69, 104)
- 83- HOLDER, A.A. (1983b).  
*Characterization of the cross reacting carbohydrate groups on two variant surface glycoproteins of T. brucei*.  
Mol. Biochem. Parasitol., 7, 331-338. (33, 35)
- 84- HOUMARD, J. & DRAPEAU, G. (1972).  
*Staphylococcal protease : a proteolytic enzyme specific for glutamyl bonds*.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 3506-3509. (132)

- 85- HUDSON, K.M., TAYLOR, A.E.R. & ELCE, B.J. (1980).  
*Antigenic changes in Trypanosoma brucei on transmission by tse-tse fly.*  
Parasite Immunol., 2, 57-69. (20°)
- 86- HUNKAPILLER, M.W. & 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. (138)
- 87- HUNT, R.C. & ELLAR, D.J. (1974).  
*Isolation and characterization of plasma membrane of a trypanosomatid flagellate : general characterization and lipid composition.*  
Biochim. Biophys. Acta, 339, 173-189. (4)
- 88- INOKI, S. (1960).  
*Studies on antigenic variation in the welcome strain of Trypanosoma gambiense. I. Improvments in technique.*  
Biken's J., 3, 215-222. (47)
- 89- ITAYA, K. & MICHIO, U. (1966).  
*A new micromethod for the colimetric determination of inorganic phosphate.*  
Clin. Chim. Acta, 14, 361-366. (52, 69, 128)
- 90- JENNI, L. (1977a).  
*Comparisons of antigenic types Trypanosoma (T) brucei strains transmitted by Glossina morsitans and Glossina palpalis.*  
Acta Tropica, 34, 35-41. (20)
- 91- JENNI, L. (1977b).  
*Antigenic variants in cyclically transmitted strains of the T. brucei complex.*  
Ann. Soc. Belge Med. Trop., 57, 383-386. (20)
- 92- JOHNSON, J.G. & CROSS, G.A.M. (1977).  
*Carboxyhydrate composition of variant specific surface antigen glycoproteins from Trypanosoma brucei.*  
J. Protozool., 24, 584-591. (25, 101)

- 93- JOHNSON, J.G. & CROSS, G.A.M. (1979).  
*Selective cleavage of variant surface glycoproteins from Trypanosoma brucei.*  
Biochem . J., 178, 689-697. (35)
- 94- KLAPPER, D.G., WILDE, C.E. & CAPRA, J.D. (1978).  
*Automated amino acid sequence of small peptides utilizing polybrene.*  
Anal. Biochem., 85, 126-131. (137)
- 95- KLOTZ, I.M. (1967).  
*Succinylation.*  
Methods Enzymol., 11, 576-580. (131)
- 96- KOSINSKI, R.J. (1980).  
*Antigenic variation in Trypanosomes : a computer analysis of variant order.*  
Parasitology, 80, 343-357. (21)
- 97- LABASTIE, M.C., BALTZ, T., RICHEL, C., GIROUD, C., DUVILLIER, G., PAUTRIZEL, R. & DEGAND, P. (1981).  
*Variant specific glycoproteins of T. equiperdum cross reacting determinants and chemicals studies.*  
Biochem. Biophys. Res. Comm., 99, 729-736. (33, 78)
- 98- LAEMMLI, U.K. (1970).  
*Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.*  
Nature, 227, 680-685. (49, 115)
- 99- LALOR, T.M., KJELDGAARD, M., SHIMAMOTO, G.T., STRICKLER, J.E., KONIGSBERG, W.H. & RICHARDS, F.F. (1984).  
*Trypanosome variant-specific glycoproteins polygene protein family with multiple folding patterns ?*  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 998-1002. (104)
- 100- LANHAM, S.M. and GODFREY, D. (1970).  
*Isolation of salivarian trypanosomes from man and other mammals using DEAE cellulose.*  
Exp. Parasit., 28, 521-534. (48)



- 101- LANHAM, S.M. & TAYLOR, A.E.R. (1972).  
Some properties of the immunogen (protective antigens) of a single variant of Trypanosoma brucei.  
J. Gen. Microbiol., 72, 101-116. (22)
- 102- LAVERAN, A. (1902).  
De l'action du sérum humain sur les trypanosomes du ragona (Tr. brucei)  
Comptes Rend. Acad. Sci., 134, 735. (111)
- 103- LE PAGE, R.W.F. (1967).  
Studies on the variable antigens of Trypanosoma brucei.  
Trans R. Soc. Trop. Med. Hyg., 61, 139-140. (22)
- 104- LE PAGE, R.W.F. (1968).  
Further studies on the variable antigens of T. brucei.  
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 62, 131. (18, 22)
- 105- LE RAY, D., VAN MEIRVENNE, N. & JADIN, J.B. (1973).  
Immuno-electrophoretic characterization of common and variable antigens of Trypanosoma brucei.  
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 67, 273-274. (19)
- 106- LE RAY, D. (1975).  
Structures antigéniques de Trypanosoma brucei (Protozoa, Kinetoplastida).  
Analyse immunoélectrophoretique et étude comparative.  
Ann. Soc. Belge Med. Trop., 55, 129-311. (19)
- 107- LE RAY, D., BARRY, J.D., EASTON, C. & VICKERMAN, K. (1977).  
First tse tse fly transmission of the "AnTat" serodeme of Trypanosoma brucei.  
Ann. Soc. Belge. Med. Trop., 57, 369-373. (20)
- 108- LE RAY, D., BARRY, J.D. & VICKERMAN, K. (1978).  
Antigenic heterogeneity of metacyclic forms of T. brucei.  
Nature, 273, 300-302. (20, 21)

- 109- LEVINE, N.D., CORLISS, J.O., COX, F.E.G., DEROUX, G., GRAIN, J., HONIGBERG, B.M., LEEDALE, G.F., LOEBLICH, A.R., LOM, M.J., LYNN, D. MERINFELD, E.G., PAGE, F.C., POLJANSKY, G., SPRAGUE, V., VAVRA, J. & WALLACE, F.G. (1980).  
*A newly revised classification of the protozoa.*  
J. Protozool., 27, 37-58. (2)
- 110- LEVY, M., FISCHMAN, L. and SCHENKEIN, I. (1970).  
*Mouse submaxillary gland proteases.*  
Methods enzymol., 19, 672-681. (132)
- 111- LHEUREUX, M., VERVOORT, T., VAN MEIRVENNE, N. & STEINEIRT, M. (1979).  
*Immunological purification and partial characterization of variant specific surface antigen messenger RNA of T. b. brucei.*  
Nucleic Acids Res., 7, 595-609. (33)
- 112- LONGAGRE, S., HIBNER, U., RAIBAUD, A., EISEN, H., BALTZ, T., GIROUD, C. & BALTZ, D. (1983).  
*DNA rearrangements and antigenic variation in T. equiperdum : multiple expression-linked site in independent isolates of trypanosome expressing the same antigen.*  
Mol. Cell. Biol., 3, 399-409. (38)
- 113- LOURIE, E.M. & O'CONNOR, R.J. (1937).  
*A study of Trypanosoma rhodesiense relapse strains in vitro.*  
Ann. Trop. Med. Parasitol., 31, 319-340. (19)
- 114- LUMSDEN, W.H.R. (1967).  
*Trends in Research on the immunology of Trypanosomiasis.*  
Bull. Org. Mond. Santé, 37, 167-175. (19, 45)
- 115- MAJIWA, P.A.O., YOUND, J.R., ENGLUND, P.T., SHAPIRO, S.Z., & WILLIAMS, R.O. (1982).  
*Two distinct forms of surface antigen gene rearrangement in Trypanosoma brucei.*  
Nature, 297, 514-516. (38)

- 116- MATTHYSSENS, G., MICHIELS, F., HAMERS, R., PAYS, E., & STEINERT, M. (1981).  
*Two variant surface glycoproteins of Trypanosoma brucei have a conserved C-terminus.*  
Nature, 293, 230-233. (25, 26, 28)
- 117- MERRITT, S.C., TSCHUDI, C., KONISBERG, W.H. & FRICHARDS, F.F. (1983).  
*Reverse duplication of trypanosome variable antigen mRNAs initiated by a specific oligonucleotide primer.*  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 1536-1540. (28, 40)
- 118- Mc CONNELL, J., GURNETT, A.M., CORDINGLEY, J.S., WALKER, J.E. & TURNER, M.J. (1981).  
*Biosynthesis of Trypanosoma brucei variant surface glycoprotein. Part I : Synthesis, size and processing of an N-terminal peptide.*  
Mol. Biochem. Parasitol., 4, 225-242. (26)
- 119- MILLER, E.M. & TURNER, M.J. (1981).  
*Analysis of antigenic types appearing in first relapse populations of clones of Trypanosoma brucei.*  
Parasitology, 82, 63-80. (21)
- 120- ONODERA, M., ROSEN, N.L., LIFTER, J., HOTEZ, P.J., BOGUCKI, M.S., DAVIS, G., PATTON, C.L., KONISBERG, W.H. & RICHARDS, F.F. (1981).  
*Trypanosoma congolense : Surface glycoprotéins of two early bloodstream variant II- Purification and Partial chemical characterization.*  
Exp. Parasitol., 52, 427-439. (23, 25, 92, 106)
- 121- OPPERDOES, F.R. & BORST, P. (1977).  
*Localization of one glycolytic enzyme in a microbody-like organelle in Trypanosoma brucei : the glycosome.*  
FEBS Letters, 80, 360-364. (6)

- 122- OSAKI, I. (1956).  
*Studies on the immunological variation in Trypanosoma gambiense (serotype on the mode of relapse).*  
Biken's J., 2, 113-127. (19)
- 123- OVERATH, P., CZICHOS, J., STOCK, U. & NONNENGAESSER, C. (1983).  
*Repression of glycoprotein synthesis and release of surface coat during transformation of T. brucei.*  
The EMBO Journal, 10, 1721-1728. (16)
- 124- PAYS, E., LHEUREUX, M. & STEINERT, M. (1981a).  
*Analysis of the DNA and RNA changes associated with the expression of isotypic variant-specific antigens of trypanosomes.*  
Nucl. Acids Res., 9, 4225-4238. (37, 38, 39)
- 125- PAYS, E., LHEUREUX, M. & STEINERT, M. (1981b).  
*The expression-linked copy of surface antigen gene in Trypanosome is probably the one transcribed.*  
Nature, 292, 265-267. (38)
- 126- PAYS, E., VAN MEIRVENNE, N., LE RAY, D. & STEINERT, M. (1981c).  
*Gene duplication and transposition linked to antigenic variation in T. brucei.*  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 2673-2677. (38)
- 127- PAYS, E., LHEUREUX, M., VERVOORT, T., STEINERT, M. (1981b).  
*Conservation of a variant specific surface antigen gene in different trypanosome species and sub-species.*  
Mol. Biochem. Parasitol., 4, 349-357. (38)
- 128- PAYS, E., DERECK, P., VAN ASSEL, S., BABIKER, E.A., LE RAY, D., VAN MEIRVENNE, N., STEINERT, M. (1983a).  
*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. (38)
- 129- PAYS, E., VAN ASSEL, S., LAURENT, M., DARVILLE, M., VERVOORT, T., VAN MEIRVENNE & STEINERT, M. (1983c)  
*Gene conversion as a mechanism for antigenic variation in trypanosomes.*  
Cell, 34, 371-381. (25, 26, 28, 33, 40, 101)

- 130- PAYS, E., DE LAUW, M.F., VAN ASSEL, S., LAURENT, M., VERVOORT, T., VAN MEIRVENNE, M. & STEINERT, M. (1983b).  
*Modifications of a Trypanosoma b. brucei antigen gene repertoire by different DNA recombinational mechanisms.*  
Cell, 35, 721-731. (46)
- 131- PENKE, B., FERENCZI, R. & KOWACS, K. (1974).  
*A new acid hydrolysis method for determining tryptophan in peptides and proteins.*  
Anal. Biochem, 60, 45-50. (126)
- 132- RAUTENBERG, P., REINWALD, E. & RISSE, H.J. (1981).  
*Sialic acids are responsible for charge heterogeneity of the variant surface glycoprotein of Trypanosoma congolense.*  
Mol. Biochem. Parasitol., 4, 129-138. (106, 108)
- 133- REINHOLD, V.N. (1972).  
*Gas-liquid chromatographic analysis of constituent carbohydrate in glycoproteins.*  
Methods enzymol., 25, 244-249. (127)
- 134- REINWALD, E., RAUTENBERG, P. & RISSE, H.J. (1981).  
*Purification of the variant antigens of Trypanosoma congolense. A new approach to the isolation of glycoproteins.*  
Biochim. Biophys. Acta, 668, 119-131. (23)
- 135- RENKONEN, O. (1969).  
*Determination of glycerol in phosphatids.*  
Biochim. Biophys. Acta, 56, 367-369. (73, 129)
- 136- RICE-FICHT, A.C., CHEN, K.K. & DONELSON, J.E. (1981).  
*Sequence homologies near the C-termini of the variable surface glycoproteins of T. brucei.*  
Nature, 294, 53-57. (25, 26, 28)
- 137- RICE-FICHT, A.C., CHEN, K.K. & DONELSON, J.E. (1982).  
*Point mutations during generation of expression-linked extra copy of trypanosome surface glycoprotein gene.*  
Nature, 298, 676-679. (25)

- 138- RITZ, M. (1916).  
*Über rezidive bei experimenteller trypanosomiasis.*  
II. Mitteilung.  
Arch. für schiffs und Trop. Hyg., 20, 397-420. (19)
- 139- ROSEMBLATT, M.S., MARGOLIES, M.N., CANNON, L.E. & HABER, E. (1975).  
*Peptides : An analytical method for their resolution by polyacrylamide gel electrophoresis application to a wide range of sizes and solubilities.*  
Ann. Biochem., 65, 321-330. (120)
- 140- ROSNER, L. (1940).  
*The reaction between iodo acetamic acid and denatured egg albumin.*  
J. Biol. Chem. n 132, 657-661. (131)
- 141- ROVIS, L., BARBET, A.F. & WILLIAMS, R.O. (1978).  
*Characterization of the surface coat of Trypanosoma congolense.*  
Nature, 271, 654-656. (23, 26)
- 142- ROVIS, L. & DUBE, D.K. (1981).  
*Studies on the biosynthesis of the variant surface glycoprotein of T. brucei : sequence of glycosylation.*  
Mol. and Biochem. Parasitol., 4, 77-93. (34)
- 143- SAVAGE, A., GEYER, R., STIRM, S., REINWALD, E. & RISSE, H.J. (1984).  
*Structural studies on the major oligosaccharides in a variant surface glycoprotein of Trypanosoma congolense.*  
Mol. Biochem. Parasitol., 11, 309-328. (106, 108)
- 144- SCHROEDER, W.A., SHELTON, J.B. & 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. (57)
- 145- SEED, J.R. (1963).  
*The characterization of antigens isolated from Trypanosoma rhodesiense*  
J. Protozol., 10, 380-389. (22)

- 146- SEED, J.R. (1972).  
Trypanosoma gambiense and T. equiperdum : characterization of variant specific antigens.  
Exp. Parasitol., 31, 98-108. (18, 19, 22)
- 147- SPECTOR, R. (1978).  
Refinement of the coomassie blue method of protein quantification.  
Anal. Biochem., 86, 142-146. (128)
- 148- STEERS, E., CRAVEN, G.R. and ANFINSEN, C.B. (1965).  
Evidence for an identical chains in the beta galactosidase of *Escherichia coli* K12.  
J. Biol. Chem., 240, 2478-2484. (132)
- 149- STEIGER, R.F. (1973).  
On the ultrastructure of Trypanosoma (trypanozoon ) brucei in the course of its life cycle and related aspects.  
Acta Tropica, 30, 64-168. (15)
- 150- STRICKLER, J.E., MANCINI, P.E. & PATTON, C.L. (1978).  
Trypanosoma brucei brucei : Isolation of the major surface coat glycoprotein by lectin affinity chromatography.  
Exp. Parasit., 46, 262-276. (23)
- 151- STRICKLER, J.E. & PATTON, C.L. (1980).  
Trypanosome brucei brucei : inhibition of glycosylation of the major variable surface coat glycoprotein by tunicamycin.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 1529-1533. (34)
- 152- TURNER, M. (1983).  
Antics of the exclusive trypanosome.  
Nature, 303, 202-203. (40)
- 153- UILENBERG, G. & GIRET, M. (1972).  
Etudes immunologiques sur les trypanosomes. I. Existence d'un type antigénique de base chez une souche de Trypanosoma congolense. Broden, 1904. Variations après transmission cyclique.  
Rev. Elev. Med. Vet. Pays. Trop., 25, 37-52. (20)

- 154- VAN DER PLOEG, L.H.T., BERNARDS, A., RIJSEWIJK, F.A.M., & BORST, P. (1982a).  
*Characterization of the DNA duplication-transposition that controls the expression of two genes for variant surface glycoprotein in Trypanosoma brucei.*  
Nucl. Acids. Res., 10, 593-609. (38)
- 155- VAN DER PLOEG, L.H.T., LIU, A.Y.C., MICHIELS, P.A.M., DELANGE, T., BORST, P., MAJUMBER, H.K., WEBER, H., VEENEMAN, G.H., & VAN BOOM, J. (1982b).  
*RNA splicing is required to make the messenger RNA for a variant surface antigen in trypanosomes.*  
Nucl. Acids. Res., 10, 3591-3604. (39)
- 156- VAN MEIRVENNE, N., JANSSENS, P.G. & MAGNUS, E. (1975a).  
*Antigenic variation in syringe passaged populations of T. b. brucei. I. Rationalization of the experimental approach.*  
Annal. Soc. Belge Med. Trop., 55, 1-23. (20)
- 157- VAN MEIRVENNE, N., JANSSENS, P.G., MAGNUS, E., LUMSDEN, W.H.R., HERBERT, W.J. (1975b).  
*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. (21)
- 158- VAN MEIRVENNE, N., MAGNUS, E. & VERVOORT, T. (1977).  
*Comparison of variable antigenic types produced by trypanosome strain of the subgenus trypanozoon.*  
Ann. Soc. Belge Med. Trop., 57, 409-423. (21)
- 159- VICKERMAN, K. (1962).  
*The mechanism of cyclical development in trypanosomes of the Trypanosoma brucei sub-group : an hypothesis based on the ultrastructural observations.*  
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 56, 487-495. (15)



- 160- VICKERMAN, K. (1965).  
*Polymorphism and mitochondrial activity in sleeping sickness trypanosomes.*  
Nature (London), 208, 762-766. (15)
- 161- VICKERMAN, K. (1969).  
*On the surface coat and flagellar adhesion in trypanosomes.*  
J. Cell. Sci., 5, 163-193. (19)
- 162- VICKERMAN, K. & LUCKINS, A.G. (1969).  
*Localisation of variable antigens in the surface coat of T. brucei using ferritin conjugated antibody.*  
Nature, 224, 1125-1126. (19°)
- 163- VICKERMAN, K. (1970).  
*Ultrastructure of Trypanosoma and relation to function.*  
*In : The African Trypanosomiases. (Mulligan, H.W. Ed), pp. 60-66. Allen & Unwin, London. (15)*
- 164- VOORHEIS, H.P., GALES, J.S., OWEN, M.J. & EDWARDS, W. (1979).  
*The isolation and partial characterization of plasma membrane from Trypanosoma brucei.*  
Biochem. J., 180, 11-24. (6)
- 165- VOORHEIS, H.P. & MARTIN, B.R. (1980).  
*Swell dialysis' demonstrates that adenylate cyclase in Trypanosoma brucei is regulated by calcium ions.*  
Eur. J. Biochem., 113, 223-227. (23)
- 166- VOORHEIS, H.P. & MARTIN, B.R. (1981).  
*Characteristics of the calcium-mediated mechanism activating adenylate cyclase in Trypanosoma brucei.*  
Eur. J. Biochem., 116, 471-477. (23)
- 167- VOORHEIS, H.P. & MARTIN, B.R. (1982).  
*Local anesthetics including benzyl alcohol activate the adenylate cyclase in Trypanosoma brucei by a calcium-dependant mechanism.*  
Eur. J. Biochem., 123, 371-376. (23, 98)

- 168- WEINTRAUB, H. & GROUDINE, M. (1976).  
*Chromosomal subunit in active genes have an altered conformation.*  
Science, 193, 848-856. (38)
- 169- WEITZ, B.G.F. (1960).  
*The properties of some antigens of Trypanosoma brucei.*  
J. Gen. Microbiol., 23, 589-600. (18, 19)
- 170- WILLIAMS, R.O., YOUNG, J.R. & MAJIWA, P.A. (1979).  
*Genomic rearrangements correlated with antigenic variation in Trypanosoma brucei.*  
Nature, 282, 847-849. (37, 40)
- 171- WILLIAMS, R.O., YOUNG, J.R., MAJIWA, P.A.O., DOYLE, J.J. & SHAPIRO, S.L. (1980).  
*Analyses of variable antigen gene rearrangements in Trypanosoma brucei.*  
Ann. J. Trop. Med. Hyg., 29, 1037-1042. (40)
- 172- WILSON, A.J. & CUNNINGHAM, M.P. (1970).  
*Immunological aspects of bovine trypanosomiasis. I. Antigenic variation in a chain of Trypanosoma congolense transmitted by Glossina morsitans.*  
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 64, 818-821. (19, 20)
- 173- WILSON, A.J. & CUNNINGHAM, M.P. (1972).  
*Immunological aspects of bovine trypanosomiasis. II. Immune response of cattle to infection with Trypanosoma congolense and the antigenic variation of the infecting organisms.*  
Exp. Parasitol., 32, 165-173. (20)
- 174- YOUNG, J.R., SHAH, J.S., MATTHYSSENS, G. & WILLIAMS, R.O. (1983).  
*Relationship between multiple copies of a T. brucei variable surface glycoprotein gene whose expression is not controlled by duplication.*  
Cell, 32, 1149-1159. (40)
- 175- ZIEGENHORN, J. (1975).  
*Improved method for enzymatic determination of serum triglycerides.*  
Clin. Chem., 21, 1617-1629. (130)





**DIRAT Isabelle**

**LES ANTIGÈNES VARIABLES DE TRYPANOSOMES**

THÈSE de Doctorat de 3ème Cycle  
spécialité : Biologie et Physiologie Animales  
LILLE - 1984 - N° 1223

Cadre de classement :

Mots-clefs : Trypanosomes africains  
Glycoprotéine spécifique de variant

**RÉSUMÉ DE LA THÈSE**

Les trypanosomes africains ont la particularité d'échapper au système immunitaire de leurs hôtes, en modifiant leur revêtement membranaire et partant, leur antigénicité de surface. Ainsi dans les stades évolutifs métacycliques (chez l'insecte) ou sanguicoles (chez les mammifères, hôtes définitifs) se réalise une «variation antigénique» : phénomène qui correspond à une modification structurale des glycoprotéines qui matérialisent l'interface entre le parasite et son hôte.

Choisissant le modèle *Trypanosoma equiperdum*, l'analyse biochimique d'un antigène variable nous a permis de déterminer la nature de cette entité constitutive du manteau, qui s'est trouvée être une lipophosphoglycoprotéine dont la substitution glycolipidique, de situation C-terminale, est d'une grande originalité et autorise des hypothèses fonctionnelles comme par exemple son rôle dans l'ancrage du manteau au niveau de la membrane plasmique.

Une étude comparative d'autres antigènes variables de la même espèce et d'antigènes variables d'espèces différentes, nous a conduit à observer de grandes homologies dans la définition globale des antigènes variables. La caractérisation de l'éthanolamine dans les autres espèces étudiées par d'autres groupes de recherche, nous laisse supposer également une certaine constance de définition de la partie toute C-terminale des antigènes variables, ce qui permettrait une généralisation de nos résultats.

**JURY**

Président : Monsieur PORCHET  
Rapporteur : Monsieur DEGAND  
Examineur: Monsieur BOERSMA  
Monsieur DHAINAUT