

Numéro d'ordre : 726

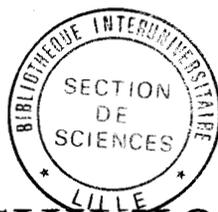
50376
1987
247

50376
1987
247

THESE DE DOCTORAT D'ETAT
ès Sciences Naturelles
Option BIOCHIMIE

présentée à
L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DE LILLE-FLANDRES ARTOIS

par
Guillemette HUET-DUVILLIER



DEFINITION BIOCHIMIQUE, ORGANISATION
MOLECULAIRE ET ETATS POLYMERES
DES ANTIGENES VARIABLES
DE TRYPANOSOMES

Trypanosoma equiperdum - Trypanosoma brucei brucei

soutenu le 30 mai 1987 devant le Jury composé de :

Président : Professeur J. MONTREUIL
Rapporteurs : Professeur P. DEGAND
Professeur J.P. DESSAINT
Professeur B. FOURNET
Examineurs : Professeur G. SPIK
Professeur N. VAN MEIRVENNE

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, GONTIER, 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 - 1ère CLASSE

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BEAUFILS Jean Pierre	Chimie physique
M. BLAYS 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. 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 démograph
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

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

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

Monsieur le Professeur MONTREUIL nous fait l'honneur d'accepter d'argumenter et d'apprécier ce travail, qu'il veuille trouver ici l'expression de notre respectueuse gratitude.

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

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

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

Je remercie aussi en particulier :

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

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

Monsieur VERVOORT du laboratoire de sérologie de l'Institut de Médecine Tropicale de Anvers de nous avoir confié des stabilats de T. b. brucei et de sa collaboration dans le domaine immunologique en particulier pour la préparation d'immunsérums à partir d'antigènes purifiés.

Madame DELECROY qui a dactylographié cette thèse avec beaucoup de gentillesse.

Monsieur EISEN, de m'avoir accueillie dans son laboratoire pour la réalisation d'un stage sur la préparation et le clonage de cDNA.

Monsieur STEINERT et Monsieur PAYS pour leur fructueuse collaboration.

Nos recherches s'inscrivent dans le cadre d'un Contrat de la Commission des Communautés Européennes (TSD- F-146) et bénéficient d'une aide financière de la Fondation pour la Recherche Médicale Française.

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

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

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

The variable surface glycoproteins of Trypanosoma equiperdum are phosphorylated.

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

EMBO J., 1, 1393-1398.

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

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

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

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

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

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

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

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

FEBS Letters, 158, 174-178.

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

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

Biochem. Biophys. Res. Comm., 114, 119-125.

Trypanosoma brucei : the extent of conversion in antigen genes may be related to the DNA coding specificity.

PAYS E., HOUARD S., PAYS A., VAN ASSEL S., DUPONT F., AERTS D., HUET-DUVILLIER G., GOMES V., RICHEL C., DEGAND P., VAN MEIRVENNE N. and STEINERT M. (1985)

Cell, 42, 821-829.

Physical and immunological analysis of two domains isolated from a variant surface glycoprotein of Trypanosoma brucei.

GOMES V., HUET-DUVILLIER G., AUBERT J.P., DIRAT I., TETAERT D., MONCANY M.L.J., RICHEL C., VERVOORT T., PAYS E. and DEGAND P. (1986)

Archives of Biochemistry and Biophysics, 249, 427-436.

Heterogeneity in high performance liquid chromatography of a variant surface glycoprotein of Trypanosoma brucei.

TETAERT D., GOMES V., HUET-DUVILLIER G., DEMEYER D., HUBLART M., BOERSMA A. and DEGAND P. (1987)

Biochem. Biophys. Res. Comm., 144, 1222-1228.

ABREVIATIONS UTILISEES DANS LE TEXTE

AVS	antigène spécifique de variant
AnTat	Anvers Trypanozoon antigenic-type
BoTat	Bordeaux Trypanozoon antigenic-type
BrCn	bromure de cyanogène
CRD	Cross Reacting Determinant
DMAA	dimethylallylamine
EATRO	East African Trypanosomiasis Research Organization
HDL	lipoprotéines de haute densité
HFBA	acide heptafluorobutyrique
LDL	lipoprotéines de basse densité
NEM	N-éthylmaléimide
pHi	point isolélectrique
PITC	phénylisothiocyanate
PMSF	phénylméthylsulfonylfluorure
PTH	phénylthiohydantoïne
RPSC	colonne de silice en phase inverse
SDS	sodium dodecyl sulfate
TFA	acide trifluoroacétique
TLCK	N- -p-Tosyl-L-Lysyl Chlorométhyl Cétone

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

<u>CHAPITRE I - GENERALITES</u>	16
A- <u>Intéractions entre surface parasitaire et composants sériques ou éléments cellulaires de l'hôte infesté</u>	16
B- <u>La surface des trypanosomes africains</u>	20
1- Evolution du manteau de surface en fonction de la vie cyclique du parasite	20
2- Immunologie de la variation antigénique	23
a) évolution de la variation antigénique	23
b) hétérogénéité des populations trypanosomales	24
c) succession des antigènes variables au cours de l'infection chronique	25
d) variation antigénique et réponse immunitaire de l'hôte	27
C- <u>Résistance naturelle et pléomorphisme</u>	28
1- Résistance naturelle pour un trypanosome	28
a) levée possible de la résistance naturelle par le sérum d'un hôte sensible	29
b) étude des facteurs sériques naturels toxiques pour une espèce de trypanosome	30
* <u>T. vivax</u>	30
* <u>T. musculi</u>	30
* <u>T. b. brucei</u>	31
- recherche de l'activité après fractionnement du sérum	31
- rôle du manteau de surface	34
- rôle du calcium	36
- influence de monosaccharides et du glycérol	37
2- Pléomorphisme	37
D- <u>Contrôle génétique - mécanisme de la variation antigénique</u>	38
1- Duplication - transposition	39
a) mise en évidence d'une copie de base (BC, Basic Copy) et d'une copie liée à l'expression (ELC, Expression-Linked Copy)	39
b) l'ELC représente le gène actif	40
c) caractéristiques du processus de transposition	41
d) analyse du site d'expression	47
2- Activation de gènes télomériques par conversion génique	48
a) localisation de certains gènes à l'extrémité d'un chromosome	48
b) la conversion télomérique de gènes	50

c)	la conversion génique "partielle"	50
d)	longueur variable du segment converti	56
3-	Activation de gènes télomériques sans duplication - transposition	56
a)	mise en évidence	56
b)	les gènes ont tous une localisation télomérique	57
c)	présence du même mini-exon de nucléotides	57
d)	mécanisme proposé : l'échange réciproque de télomère	58
e)	évolution des répertoires	59
f)	relations entre les deux mécanismes	60
g)	observations non corrélées avec le mécanisme d'échange réciproque	62
4-	Relations entre les différents mécanismes et le schéma de variation antigénique	63
II-	<u>ISOLEMENT ET CARACTERISATION DE LA FORME SOLUBLE DE L'ANTIGENE VARIABLE</u>	64
A-	Isolement	64
1-	Techniques faisant appel à une rupture cellulaire	65
2-	Technique sans rupture cellulaire	67
3-	Purification de la forme soluble de l'antigène variable de surface	67
a)	chromatographie échangeuse d'ions - isoélectrofocalisation	68
b)	chromatographie d'affinité sur lectines	68
c)	chromatographie liquide de haute performance	69
B-	Caractérisation	70
C-	Structure	70
1-	L'axe peptidique	70
a)	structure primaire	71
1.	extension C-terminale hydrophobe	71
2.	acide aminé C-terminal de glycoprotéines isolées	71
3.	région C-terminale	72
4.	région N-terminale	78
5.	séquence N-terminale "signal"	78
6.	état actuel des connaissances sur la structure peptidique des AVS de <u>T. b. brucei</u>	78
b)	structure secondaire	80
2-	Copules glycaniques	83
a)	composition	83
b)	glycosylation des molécules d'AVS	84

III-	<u>ISOLEMENT ET CARACTERISATION DE LA FORME MEMBRANAIRE DE L'ANTIGENE VARIABLE</u>	88
A-	Isolement	88
B-	Structure	91
C-	Relation avec le métabolisme des lipides dans le trypanosome	94
D-	Comparaison avec d'autres modèles membranaires	94
1-	Exemples d'acylation	94
2-	Exemples de liaison covalente entre le lipide et le groupement amino-terminal de la protéine	98
	CHAPITRE II - TRAVAUX PERSONNELS	100
I-	<u>ISOLEMENT, PURIFICATION ET CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE DES ANTIGENES VARIABLES</u>	100
A-	<u>Introduction</u>	100
B-	<u>Préparation des antigènes variables</u>	101
1-	Isolement des trypanosomes	103
2-	Libération du manteau de surface	104
3-	Purification de l'antigène variable	104
C-	<u>Etude des propriétés physico-chimiques des antigènes préparés</u>	106
1-	Etude en gel de polyacrylamide en présence de SDS	106
2-	Détermination de la valeur du point isoélectrique par isoélectrofocalisation en gradient de pH	110
3-	Etude en dichroïsme circulaire	110
4-	Composition amino acide	119
5-	Composition glucidique	119
6-	Dosage du phosphore	124
II-	<u>ETUDE STRUCTURALE COMPARATIVE ENTRE UN ANTIGENE DE TRYPANOSOMA EQUIPERDUM (Variant BoTat-1) ET UN ANTIGENE DE TRYPANOSOMA BRUCEI BRUCEI (variant AnTat 1.1)</u>	127
A-	<u>Sites de glycosylation</u>	127
1-	AVS BoTat-1 de <u>T. equiperdum</u>	127
a)	clivage de la molécule réduite et S-alkylée par le bromure de cyanogène	128
b)	clivage de la molécule native par la trypsine	131
2-	AVS AnTat 1.1 de <u>T. b. brucei</u>	141

B-	<u>Organisation moléculaire</u>	148
1-	<u>Etude de l'AVS AnTat 1.1</u>	148
	a) étude physico-chimique	148
	1) électrophorèse et analyse amino acide et glucidique	149
	2) dichroïsme circulaire	149
	b) étude immunologique	151
	c) étude prédictionnelle de structure issue des données de séquence DNA	155
2-	<u>Etude comparative avec d'autres variants issus de T. b. brucei et de T. equiperdum</u>	159
	a) sensibilité aux enzymes protéolytiques	159
	b) organisation moléculaire	159
C-	<u>Polymorphisme</u>	161
1-	<u>Aspects de polymérisation des antigènes variables purifiés</u>	161
	a) comportement de l'antigène variable purifié en présence de SDS	163
	b) mise en évidence de la présence et de l'absence d'un thiol libre respectivement dans les formes monomériques et dimériques	165
	c) mise en évidence d'une hétérogénéité moléculaire par chromatographie HPLC en phase inverse	168
	d) comportement de l'antigène variable purifié en l'absence de SDS	170
	1) résultats électrophorétiques	170
	2) résultats chromatographiques	174
2-	<u>Aspects de polymérisation de l'antigène du variant AnTat 1.1 de T. b. brucei avant purification</u>	176
	CONCLUSION	188
	APPENDICE TECHNIQUE	
	BIBLIOGRAPHIE	

INTRODUCTION

Dans le domaine de la biologie parasitaire, on décrit un nombre croissant de mécanismes permettant aux parasites de se multiplier chez l'hôte infesté malgré l'activation de ses systèmes de défense. Les trypanosomes africains, agents de la maladie du sommeil chez l'homme, en constituent un exemple remarquable qui a suscité un grand intérêt depuis de nombreuses années. En effet ces parasites sont capables de changer de spécificité antigénique de surface au cours de la parasitose et d'échapper ainsi à la défense immunitaire développée par l'hôte. La structure de ces antigènes, leur organisation moléculaire à la surface de la membrane plasmique parasitaire, leurs relations avec l'hôte, et les mécanismes de "variation" d'antigènes ont fait l'objet d'une recherche intensive dont le but est l'approche de moyens diagnostiques et thérapeutiques.

Les agents pathogènes de la trypanosomiase africaine humaine sont Trypanosoma brucei gambiense en Afrique Occidentale et Centrale et Trypanosoma brucei rhodesiense en Afrique Orientale. Les deux sous-espèces se caractérisent par une symptomatologie différente : une évolution chronique à réservoir de virus humain pour T. b. gambiense et une évolution aiguë avec réservoir de virus animal pour T. b. rhodesiense.

De nombreuses autres espèces sont pathogènes pour des animaux. Parmi celles-ci se situent les deux espèces qui ont constitué successivement notre modèle d'étude : Trypanosoma equiperdum en collaboration avec le laboratoire d'Immunologie et de Biologie Parasitaire de Bordeaux et Trypanosoma brucei brucei en collaboration avec le laboratoire de Médecine Tropicale de Anvers.

CHAPITRE I - GENERALITES

La recherche en parasitologie s'intéresse de plus en plus à l'étude de l'organisation et des propriétés physiologiques de la surface membranaire des parasites qui est en contact direct avec l'hôte infesté. Les résultats acquis pour différents parasites semblent démontrer un rôle parfois essentiel des éléments de surface dans la nature même de la parasitose.

Ce premier chapitre sera consacré à la description de ces aspects biologiques illustrés chez différents parasites dont le trypanosome.

A- Interactions entre surface parasitaire et composants sériques ou éléments cellulaires de l'hôte infesté

Nous présenterons différents exemples d'interactions parasite-composant sérique, parasite-cellule en faisant appel à des modèles de parasitismes très diversifiés : microfilaires, schistosomes, trypanosomes et plasmodium.

La présence d'albumine de l'hôte a été montrée sur la gaine des microfilaires circulantes L. Carinii (PHILIPP et coll. (1983) (205)) et W. bancrofti (MAIZELS et coll. (1983) (164)). Des déterminants antigéniques de nature glycolipidique issus de l'hôte ont été décelés à la surface des microfilaires wuchereria et loa (RIDLEY et HEDGE (1977) (218)). Les nématodes pourtant semblent faire exception jusqu'ici dans la mesure où l'on n'a pas encore pu mettre en évidence de rôle particulier pour ce type d'association dans la relation hôte-parasite.

Chez S. mansoni, aux stades larvaire et adulte, la présence en surface de déterminants antigéniques identiques à ceux de l'hôte a été largement décrite (revu par Mc LAREN (1980) (170)). Dans ce cas, il semble que l'acquisition de molécules venant de l'hôte protège les parasites contre les réponses immunitaires. En effet des vers adultes qui survivent chez des hôtes immuns sont tués in vivo en présence d'anticorps dirigés contre les déterminants antigéniques de l'hôte (SMITHERS et coll. (1969) (243)) et in vitro en présence d'anticorps anti-hôte et de leucocytes (PEREZ et TERRY (1973) (204), Mc LAREN et TERRY (1982) (171)). In vivo, le phénomène a été démontré par le transfert de vers, cultivés chez des souris, dans le système porte hépatique de singes précédemment immunisés avec des cellules de souris : une destruction rapide de ces vers par traumatisme du tégument indiquait que ceux-ci possédaient en

surface des antigènes type souris. RAMALHO-PINTO et coll. (1978) (209) ont observé que le schistosomule, au bout de 5 jours d'infection, incorpore au niveau de sa surface des déterminants de l'hôte et simultanément, cesse de se lier in vitro à un anticorps dirigé contre la larve précoce et d'activer le complément par la voie alterne.

Ainsi, le ver semble se protéger des effets de la réaction immunitaire de l'hôte par adsorption de molécules contre lesquelles l'hôte ne réagit pas immunologiquement. Ces antigènes de l'hôte masquent les antigènes de surface des parasites contre lesquels la réponse immunitaire pourrait avoir lieu. Actuellement, le mode de liaison de ces molécules n'est pas réellement connu mais l'on soupçonne qu'il met en jeu des mécanismes relativement spécifiques qui contribueraient à augmenter la sélectivité et l'efficacité des processus de transport. En d'autres termes, il ne s'agirait pas d'interactions hydrophobes aspécifiques mais de l'intervention en surface de récepteurs qui permettraient au parasite de puiser des substances nécessaires par le biais de ces associations. C'est une hypothèse émise en particulier par RUMJANEK et coll. (1985) (233) sur la base de leurs travaux réalisés in vitro sur le schistosomule en présence de sérum humain .

RUMJANEK et Mc LAREN (1981) (231) ont en effet montré que le schistosomule avait un besoin absolu en cholestérol et triglycérides en tant que composants de structure des membranes, les parasites étant incapables de synthétiser de novo des acides gras ou des stérols (MEYER et coll. (1970) (173)). Le cholestérol dans le sérum humain étant principalement transporté par les LDL, les auteurs ont pensé que cette classe de lipoprotéines participait directement dans le mécanisme d'absorption des lipides par les parasites.

RUMJANEK et coll. (1983) (232) ont montré que les membranes de schistosomules contiennent des protéines qui ne sont exposées en surface qu'après contact avec le sérum humain : il s'agit essentiellement de deux protéines formant un doublet dont la masse moléculaire en gel de polyacrylamide est voisine de 45 000. La recherche d'un rôle de récepteur de LDL pour ces protéines migrantes de taille moléculaire 45 000 fut alors envisagée et RUMJANEK et coll. (1985) (233) ont pu confirmer l'hypothèse en faisant passer sur une colonne de LDL-sépharose les protéines parasitaires marquées par radioiodination des schistosomules. Le doublet 45 000 ainsi qu'une protéine de poids moléculaire plus élevé restaient fermement attachés au gel. L'EDTA était capable de dissocier l'interaction indiquant par conséquent que le Ca^{++}

était impliqué dans cette liaison. Le ou les facteurs du sérum responsables de cette "migration" des protéines en surface n'est pas élucidé. Il est possible selon les auteurs qu'il s'agisse d'enzymes sériques (phospholipases et/ou lipases) qui dégraderaient des lipides en surface. Il faut préciser que seul le sérum humain semble provoquer ce phénomène, fait qui pourrait être à la base de la spécificité hôte-parasite.

Sur le schistosomule de S. Mansoni, la présence de récepteurs pour les IgG (fragment Fc) et la β_2 -microglobuline humaine a été démontrée par Torpier et coll. (1979) (272bis).

Chez T. cruzi, il a également été décrit que l'adsorption de composants de l'hôte pourrait jouer un rôle dans l'échappement du parasite vis-à-vis du système de défense immunitaire de l'hôte. CHESS et coll. (1983) (37) ont observé que T. cruzi, pendant sa réplication dans les cellules mésodermes, incorpore de façon réversible au niveau de sa surface membranaire un antigène associé au sarcome. Ce phénomène d'acquisition réversible d'un antigène de l'hôte à la surface du parasite durant le stade intracellulaire (amastigote) s'il se produit d'une façon naturelle, pourrait fournir à T. cruzi un mécanisme d'évasion à l'attaque immunitaire. La présence d'antigènes de l'hôte sur la surface des trypanomastigotes émergents représenterait un avantage pour l'étape extracellulaire de la vie cyclique des parasites en leur permettant d'échapper aux défenses immunitaires par le masquage de leurs propres antigènes.

Des travaux plus anciens ont mis en évidence à l'intérieur du parasite des déterminants antigéniques spécifiques présents dans le muscle strié (SADIGURSKY (1982) (234)), les neurones (WOOD et coll. (1982) (273)) et le tissu conjonctif (SZARFMAN et coll. (1982) (251)). Dans ce cas, il a été suggéré que cette communauté d'antigènes pourrait jouer un rôle dans l'immunopathogénie caractérisant les lésions observées chez les patients atteints d'une infection par T. cruzi.

Un autre aspect des interactions de T. cruzi avec l'hôte concerne l'étape d'invasion intracellulaire du parasite. OUAISSI et coll. (1984) (186) ont montré que la fibronectine interagissait avec la surface des formes trypanomastigotes de T. cruzi. La réaction est spécifique, réversible et saturable témoignant de la présence de récepteurs spécifiques de la fibronectine à la surface des parasites. La fibronectine est une glycoprotéine de haut poids moléculaire présente dans le sang mais aussi dans le tissu conjonctif et à la surface des cellules (HYNES et YAMADA (1982) (127)). Cette dernière localisation a amené les auteurs à

envisager un rôle éventuel de cette glycoprotéine dans l'interaction parasite-cellule. Des expériences réalisées in vitro avec des fibroblastes de rat ont en effet montré que l'addition d'anticorps anti-fibronectine au milieu de culture inhibait de façon significative l'infection des cellules par des formes trypomastigotes de T. cruzi. L'anticorps, en se liant à la fibronectine de la surface cellulaire, empêchait les trypomastigotes de s'attacher à la surface des fibroblastes. Comme chez les bactéries (OFEK et BEACHEY (1980) (182)), les protozoaires parasites intracellulaires se lient aux cellules de mammifères dans la phase initiale de l'infection. Le phénomène pourrait être basé sur la reconnaissance spécifique de composants au niveau de la surface cellulaire. Il a été montré pour T. cruzi que l'infection des cellules est inhibée par des lectines (HENRIQUEZ et coll. (1981) (113)) et des sucres, en particulier la N-acétylglucosamine (ANDREWS et COLLI (1981) (6) ; St MARK et DVORAK (1982) (246)). Ces derniers auteurs ont suggéré que les formes trypomastigotes de T. cruzi se lient à des récepteurs impliquant la N-acétylglucosamine. Les résultats de OUAISSI et coll. (1984) (186) suggèrent que la fibronectine de la surface cellulaire, dont la copule glycanique est du type N-acétylactosamine (CARTER et coll. (1978) (35)), pourrait représenter un élément de reconnaissance de la surface cellulaire par les formes trypomastigotes de T. cruzi.

Parallèlement, DE ARAUJO JORGE et DE SOUZA (1984) (50) ont observé que l'interaction de T. cruzi avec les macrophages pouvait être inhibée par des sucres (galactose, mannose, fucose, N-acétylglucosamine et N-acétylgalactosamine). Leurs résultats montraient que l'effet des différents sucres variait selon la forme parasitaire (trypomastigote sanguicole ou épimastigote de culture), la souche, et le milieu de culture pour les formes épimastigotes. Ils ont aussi en particulier pu remarquer que l'incorporation des formes épimastigotes par les macrophages était inhibée d'environ 50 % par le LPPG, principal glycoconjugué isolé de T. cruzi (15 % de la membrane plasmique (COLLI et coll. (1981) (44))). L'ensemble de ces résultats suggère que les glycoprotéines et/ou glycolipides sur le parasite et/ou sur la surface des cellules soient impliqués dans le processus d'interaction.

Enfin, en ce qui concerne Plasmodium falciparum, les travaux à l'heure actuelle suggèrent fortement que la membrane des globules rouges possède des récepteurs pour le parasite et que ces récepteurs sont spécifiques d'espèce (MILLER et coll. (1977) (180)). P. falciparum peut seulement envahir les globules rouges qui contiennent en surface les sialoglycoprotéines :

glycophorine A, B et peut-être C (MILLER et coll. (1978) (181) ; PASVOL et coll. (1981) (1982) (190) (191)). Les parasites semblent aussi se lier aux globules rouges à la façon d'une affinité lectine puisque N-acétylglucosamine, N-acétylgalactosamine et acide N-acétylneuraminique sont capables in vitro de gêner l'invasion parasitaire, le plus efficace étant la N-acétylglucosamine qui peut complètement bloquer l'invasion parasitaire. De plus, le couplage de la N-acétylglucosamine à la sérum albumine bovine augmentait l'efficacité de blocage.

La description de toutes ces observations permet d'avoir à l'esprit le rôle très important de la "surface" dans la biologie parasitaire et ses rapports avec l'hôte. Le trypanosome africain dans cette approche représente un modèle privilégié.

B- La surface des trypanosomes africains

A certains stades de son cycle de développement, la membrane plasmique du trypanosome est recouverte d'une pellicule formée d'une matrice de glycoprotéines étroitement associées. Ce manteau de surface possède un rôle essentiel dans le parasitisme des trypanosomes africains.

1- Evolution du manteau de surface en fonction de la vie cyclique du parasite (Fig. 1)

a) chez l'hôte définitif

Les formes trypomastigotes sanguicoles sont pléomorphiques : le trypanosome peut passer d'une forme longue et élancée avec flagelle libre à une forme intermédiaire puis à une forme courte et massive dépourvue de flagelle libre. Les formes élancées possèdent un tube mitochondrial peu développé. Lorsqu'elles se transforment en formes massives, le mitochondrion commence alors à proliférer et à devenir plus actif. Les formes élancées se multiplient par fission binaire, en revanche les formes massives ne se multiplient pas chez l'hôte définitif et semblent représenter un stade de "préadaptation" à la survie chez l'hôte intermédiaire. Elles sont en effet seules capables de se développer chez l'insecte vecteur et donc d'initier le cycle.

Ces formes sanguicoles, différentes sur le plan morphologique, sont toutes recouvertes par un manteau de surface.

CYCLE EVOLUTIF DE Trypanosoma brucei
(VICKERMAN, 1969)

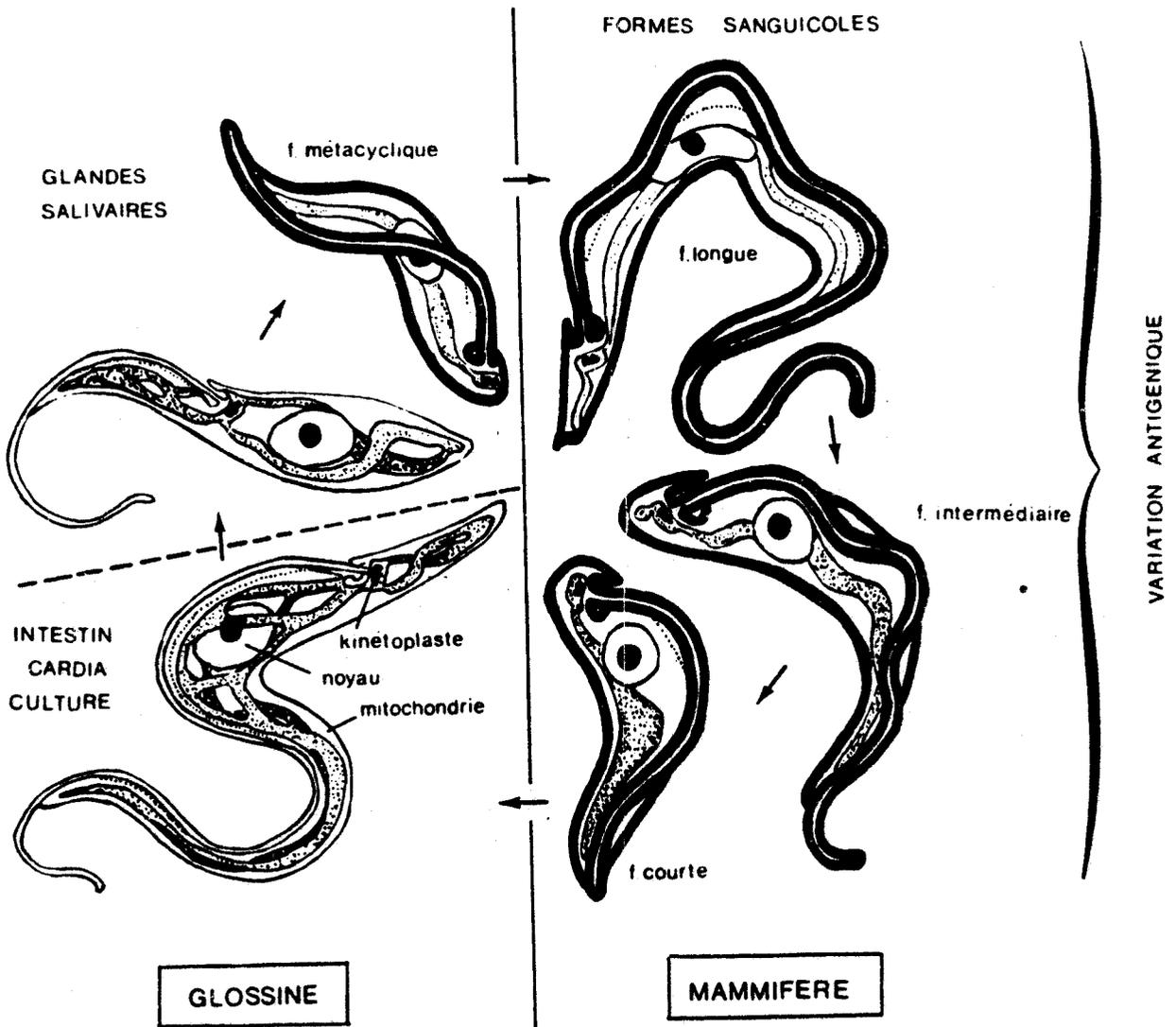


FIGURE 1



b) chez l'hôte intermédiaire

L'agent vecteur est la glossine ou mouche tsé-tsé. L'insecte se contamine lors d'un repas sanguin chez un hôte infesté. Au niveau de l'intestin de la mouche, le parasite adopte une forme épimastigote, caractérisée par un réseau extensif de tubes mitochondriaux et la perte du manteau de surface. Après trois semaines de séjour intestinal, les parasites migrent vers les glandes salivaires de l'insecte où ils vont adopter une forme trypomastigote appelée métacyclique et se recouvrir à nouveau d'un manteau de surface. Les trypanosomes métacycliques infestants s'engagent dans la trompe de la glossine et sont entraînés par la salive lors de la piqûre. La plupart des trypanosomes sont donc caractérisés par un stade de développement chez la glossine à l'exception toutefois de T. evansi transmis par les tabanidés et T. equiperdum transmis par contact "vénérien".

Le manteau de surface représente un élément essentiel dans le développement de la parasitose :

- les études d'inoculation de parasites par seringue ont montré que le pouvoir infestant d'une souche était lié à la présence du manteau de surface (DIFFLEY (1985) (59)).

- chez l'hôte définitif, le trypanosome exprime un phénomène de variation antigénique qui se rapporte au manteau de surface des formes sanguicoles trypanosomales ; VICKERMAN et LUCKINS (1969) (265) ont en effet pu montrer une localisation à ce niveau à l'aide d'anticorps spécifiques de variants marqués à la ferritine.

CROSS en 1975 (46) a montré que le "manteau de surface" des trypanosomes était d'ailleurs principalement constitué d'un composant de nature glycoprotéique, couvrant la surface cellulaire en une couche uniforme. Ce manteau de surface est seul responsable de la spécificité immunologique des variants antigéniques.

Les antigènes impliqués dans ce processus sont appelés antigènes variables ou antigènes spécifiques de variants (AVS). Ils déterminent par conséquent une spécificité propre à chaque variant de trypanosome. Néanmoins les antigènes variables isolés peuvent présenter une réaction immunologique croisée (BARBET et Mc GUIRE (1978) (10) ; CROSS (1979) (47) ; LABASTIE et coll. (1981) (140)) dont le site est appelé CRD (Cross-Reacting Determinant). Ce site ne correspond pas à un épitope de surface mais est profondément enfoui au

contact de la membrane plasmique du parasite.

2- Immunologie de la variation antigénique

Après l'infestation de l'hôte, les trypanosomes se multiplient rapidement mais le plus grand nombre sera détruit en fonction de l'activation du système immunitaire de l'hôte. Seul un petit nombre de parasites, qui au niveau membranaire aura changé "d'enveloppe" donc de spécificité antigénique, va pouvoir échapper à ces mécanismes naturels de défense et proliférer pour donner une nouvelle vague parasitémique. Cette "variation antigénique" est une dynamique biologique qui a été démontrée pour la plupart des espèces trypanosomales de la section Salivaria : T. b. brucei (RITZ, 1916) (223), T. b. rhodesiense (LOURIE et O'CONNOR, 1937) (157), T. b. gambiense (OSAKI, 1959) (185), T. vivax (CLARKSON et AWAN, 1967) (42), T. congolense (WILSON et CUNNINGHAM, 1972) (272), T. equiperdum (CAPBERN et coll., 1977) (33).

Elucider le mécanisme biologique responsable de ce phénomène de variation antigénique pourrait représenter une voie thérapeutique, ce problème s'est révélé en fait très difficile.

a) évolution de la variation antigénique

Plusieurs étapes marquent l'évolution des concepts.

Dans un premier temps avec les travaux de GRAY et coll. (1964), (88), (1965a) (89), (1965b) (90), (1967) (91), (1972) (92), (1975) (93), (1976) (94), les observations suivantes ont été établies :

* certains antigènes de clones sont plus souvent rencontrés pendant les périodes précoces de l'infection. Ils furent désignés sous le nom "d'antigènes prédominants".

* il y a réversion à un type antigénique de base (antigène basique de la souche) après accomplissement du cycle de développement dans l'insecte vecteur. Ce phénomène fut également observé par JENNI en 1977 (132) (133), et confirmé par HUDSON et coll. en 1980 (125).

* il existe un ordre d'apparition des variants antigéniques pendant les premières étapes de l'infection. Aux stades plus tardifs (après plus d'un mois d'évolution de la parasitémie), la séquence n'est plus toujours aussi

rigoureusement identique et prévisible ; toutefois des types antigéniques identiques peuvent être reconnus dans des infections différentes. Cette reproductibilité du phénomène biologique en partant d'une souche donnée a été aussi démontrée par les études d'inoculation expérimentale à la seringue.

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

Cette théorie n'a pu être entièrement confirmée par les observations ultérieures où les techniques d'immunofluorescence et d'immunolyse (VAN MEIRVENNE et coll. (1975a) (260)) ont permis une analyse encore plus précise des populations trypanosomales et de leur évolution.

b) hétérogénéité antigénique des populations trypanosomales

LE RAY et coll. (1977) (148) et encore JENNI (1977b) (133) ont montré que les populations trypanosomales de première parasitémie après transmission cyclique étaient antigéniquement hétérogènes. Selon JENNI (1977) (132) (133), qui avait mis en évidence une réversion vers un type de base au cours de la transmission cyclique, l'hétérogénéité apparaissait chez l'hôte définitif. Au contraire LE RAY et coll. (1977) (148) pensaient pour leur part que cette hétérogénéité pouvait être préexistante chez l'hôte intermédiaire, notamment au niveau des glandes salivaires de la mouche. LE RAY et coll. (1978) (149) puis BARRY et coll. (1979) (11) ont très largement ensuite confirmé cette notion fondamentale d'hétérogénéité initiale au niveau des types antigéniques variables métacycliques.

A la suite des travaux de HAJDUK et VICKERMAN (1981a) (102) ; HAJDUK et coll. (1981) (103) et BARRY et coll. (12) plusieurs règles fondamentales

définissant la variation antigénique sont venues compléter les notions introduites par JENNI et LE RAY.

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

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

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

. Pour chaque sérodème existe un répertoire distinct de types métacycliques et dans chaque population métacyclique, une partie seulement du répertoire antigénique est exprimée. L'exemple le plus représentatif a été décrit par CROWE (1983) (48) qui a caractérisé chez T. congolense un répertoire métacyclique composé uniquement de douze types antigéniques.

c) succession des antigènes variables au cours de l'infection chronique

L'observation de GRAY concernant le schéma d'apparition des variants antigéniques au cours de l'infection chronique a été nuancée par VAN MEIRVENNE et coll. (1975) (260) (261), (1977) (262) qui ont étudié la variation antigénique induite par inoculation expérimentale à la seringue d'un clone déterminé de T. b. brucei. Les auteurs ont observé que lors de la première parasitémie, la population trypanosomale était homogène à 99 % et constituée par un type antigénique majeur (homotype). Après la destruction immunitaire de l'homotype, un ou plusieurs des sérotypes mineurs (hétérotypes) se mettaient à proliférer, et ainsi les pics successifs de parasitémies pouvaient contenir un ou plusieurs sérotypes majeurs. VAN MEIRVENNE et coll. ont pu établir avec le protocole de transmission éliminant le facteur hôte intermédiaire, que toutes les infections étaient caractérisées par le développement en premier lieu de certains sérotypes "prédominants".

Une même démarche expérimentale a été réalisée chez T. equiperdum par CAPBERN et coll. (1977) (33) qui ont rapporté les éléments suivants :

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

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

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

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

* les types précoces apparaissent dans un ordre relativement stable.

En conclusion de l'ensemble de ces travaux, il semblerait que l'on puisse finalement retenir l'idée d'une tendance à l'expression plus ou moins rapide selon les variants.

Pour expliquer cet ordre relatif dans l'apparition des variants antigéniques, plusieurs auteurs ont évoqué des différences existant au niveau des taux de croissance selon les variants, différences dues à des effets de compétition s'exerçant entre les variants d'un même stock (SEED et coll. (1977) (240) ; SEED (1978) (241)).

KOSINSKI (1980) (139) s'est livré à un calcul mathématique portant sur un modèle de 90 variants possédant des taux de croissance largement différents. D'après son étude, une production spontanée de variants suivie d'une sélection s'opérant uniquement à travers le taux de croissance ne semble pas capable de donner le degré d'ordre jusqu'ici rapporté dans la littérature. D'autres travaux laissent d'ailleurs entendre que l'ordre d'apparition ne dépend pas uniquement des taux de croissance : MILLER et TURNER (1981) (177) se sont intéressés à une analyse plus approfondie des types antigéniques des premières populations de rechute initiées par différents inoculum clonés de T. b. Brucei appartenant au même sérodème. Ils ont signalé que les types antigéniques pouvaient être groupés en 3 catégories selon leur fréquence d'expression dans les différentes rechutes : certains variants sont exprimés dans la majorité des cas, d'autres sont seulement décelés occasionnellement et d'autres enfin ne sont apparus que pour un seul clone. Les auteurs ont ainsi proposé que chaque type antigénique

nouveau soit exprimé selon un ordre de priorité statistiquement définissable, différent pour chaque variant initial. Selon eux, les variants prédominants représentent un groupe de types antigéniques qui possèdent une forte probabilité de dérivation à partir des autres types antigéniques.

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

d) variation antigénique et réponse immunitaire de l'hôte

Le processus de variation antigénique a été longtemps décrit comme une réponse du parasite vis à vis des anticorps synthétisés par l'hôte afin d'échapper à la destruction immunitaire. Plusieurs observations permettent maintenant d'éliminer cette hypothèse :

VAN MEIRVENNE et coll. (1975)a (260) ont remarqué que la variation antigénique existait dans les premières phases de l'infection, avant même l'apparition d'une défense immunitaire.

LE RAY et coll. (1978) (149) ont montré que des glossines infectées par un clone donné, exhibaient au bout de 2 semaines une diversité de types antigéniques au niveau de leurs glandes salivaires. Cette observation suggérait pour les auteurs que les anticorps ne jouaient pas un rôle indispensable dans l'induction du processus.

Avec l'utilisation du protocole de culture de formes trypomastigotes sur support cellulaire développé par HIRUMI et coll. (1977) (115) (116), DOYLE et coll. (1980) (62) ont démontré que la variation antigénique était capable de se produire "in vitro" et avec une direction similaire à celle rencontrée "in vivo". Les auteurs ont d'autre part obtenu, de la même façon que "in vivo", et à partir de populations clonées, des populations de rechute antigéniquement hétérogènes. Ils ont toutefois souligné qu'il existait une différence entre le temps nécessaire pour détecter un type antigénique nouveau "in vivo" et "in vitro" :

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

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

Ces résultats montrent donc que la variation antigénique ne répond pas à un mécanisme adaptatif selon lequel le parasite change d'antigène au fur et à mesure de la réponse immunitaire de l'hôte mais laissent envisager que la variation antigénique se produirait à basse fréquence dans une population de trypanosomes, et les nouveaux variants deviendraient apparents dans les rechutes successives alors que les précédents seraient finalement éliminés par les anticorps de l'hôte.

Enfin, HAJDUK et VICKERMAN (1981b) (104) ont montré l'existence du phénomène de variation antigénique chez l'animal immuno-déprimé.

L'on s'accorde finalement à dire que les anticorps de l'hôte n'interviennent pas dans le déclenchement du changement d'antigène.

C- Résistance naturelle et pléomorphisme

1- La résistance naturelle pour un trypanosome

D'une façon générale, l'on parle de résistance innée pour un animal lorsque celui-ci n'a jamais rencontré une infection par l'organisme pathogène ou par un variant proche non pathogène (HUMPHREY et WHITE (1970) (123)). En conséquence, les divers mécanismes responsables de cette résistance constituent une première lignée éventuelle de défenses contre l'invasion par un organisme étranger ; si ce dernier échappe à de tels mécanismes, le système immunitaire de l'hôte sera alors sollicité pour son élimination.

L'origine de la résistance innée est peu étudiée en général en raison des multiples facteurs susceptibles d'entrer en jeu. Il faut aussi ajouter que les travaux à ce sujet n'ont pas abouti jusqu'ici à des applications pratiques importantes. Néanmoins, le cas de la trypanosomiase africaine revêt un intérêt particulier étant donné l'échec du système immunitaire vis-à-vis de l'espèce parasitaire. A ce titre, nous évoquerons différents travaux entrepris dans ce domaine.

Une première partie sera consacrée aux observations mettant en évidence l'inhibition de la résistance naturelle par le sérum d'un hôte sensible. En seconde partie nous parlerons des divers éléments apparaissant impliqués dans le mécanisme de résistance naturelle.

a) la levée possible de la résistance naturelle par le sérum d'un hôte sensible.

Un hôte naturellement résistant pour une espèce de trypanosome peut néanmoins subir une infection par le parasite s'il y a adjonction à l'inoculum de sérum issu d'un hôte sensible pour la même espèce :

* Le cas de la résistance du rat de laboratoire pour T. vivax a été étudié par DESOWITZ et WATSON (1951) (54). Les auteurs ont montré que la présence dans un inoculum de T. vivax de sang issu du mouton ou d'un autre hôte réceptif permettait le déclenchement d'une infection persistante chez le rat. Ultérieurement (DESOWITZ (1954) (55)), le principe actif du sérum de mouton a pu être caractérisé comme étant une protéine, ou éventuellement un facteur lié à une protéine. Après utilisation de protocoles de fractionnement disponibles à cette époque, diverses protéines (albumine, γ -globulines, fibrogène) apparurent pouvoir enrayer la résistance naturelle. Cela demandait à être précisé.

* Un autre exemple concerne T. lewisi et la souris de laboratoire chez laquelle ce trypanosome peut survivre quelques temps mais sans pouvoir néanmoins se multiplier. LINCICOMBE (1955, 1958) (152) (153) montra que l'inoculation journalière de sérum de rat permettait à l'espèce de se multiplier lentement et de survivre jusqu'à 2 semaines. Pour essayer d'identifier les principes actifs, GREENBLATT et LINCICOMBE (1966) (95) ont utilisé différents protocoles de fractionnement : chromatographie sur DEAE cellulose ou séphadex G200, ultracentrifugation. Les résultats indiquaient une activité au niveau des immunoglobulines et des macroglobulines. Selon les travaux ultérieurs, les IgG semblaient représenter le facteur responsable (GREENBLATT et coll. (1969) (96)).

Parmi les hypothèses envisagées pour expliquer ce mécanisme, nous évoquerons uniquement celle qui se révèle la plus satisfaisante en fonction de l'ensemble des données de la littérature et des résultats les plus récents. Les facteurs sériques actifs viendraient se lier aux parasites et les protégeraient ainsi des défenses de l'hôte (DESOWITZ (1954) (1963) (55) (56)). Les protéines en cause seraient donc capables de se fixer sur les récepteurs de surface du trypanosome et empêcheraient la liaison des anticorps cytolytiques. Cette hypothèse a été renforcée par des travaux ultérieurs qui démontrent l'interaction possible de composants sériques de l'hôte réceptif au niveau de la surface de ces espèces parasitaires : des sialoglycoprotéines du rongeur hôte se lient fermement à la surface de T. vivax (KETTERIDGE (1970) (136), (1972)

(137)) ; des protéines sériques du rat hôte, non-anticorps, sont présentes à la surface de formes sanguicoles de T. lewisi (D'ALESSANDRO (1972) (49)). De façon plus précise après isolement du manteau de surface de T. lewisi par trypsinisation, DWYER (1976) (64) a pu identifier en particulier l'albumine, l' α_2 -macroglobuline et les IgG. L'auteur a pu estimer la quantité de ces protéines adsorbées à environ 5 % (en poids) du manteau de surface.

La fixation de protéines sériques de l'hôte au niveau de la surface parasitaire a pu aussi être remarquée chez le trypanosome américain T. cruzi ainsi que chez d'autres parasites en particulier Schistosoma mansoni. Ces interactions ont d'ailleurs être détaillées au début de ce mémoire.

b) Etude des facteurs sériques naturels toxiques pour une espèce de trypanosome :

* T. vivax

Un premier exemple concerne T. vivax et le rat Cotton (TERRY (1957) (252)). Le rat Cotton est réfractaire à l'infection par T. vivax. L'addition du sérum de l'animal à des suspensions parasitaires de ce trypanosome entraîne en premier lieu un phénomène d'agglutination, puis une lyse parasitaire. L'agglutinine semblait spécifique de l'espèce puisque d'autres espèces testées n'étaient pas affectées par le sérum du rat Cotton. Enfin l'agglutinine sédimente avec les macroglobulines, a un poids moléculaire de 550 000, résiste au β -mercaptoéthanol et ne fixe pas le complément.

* T. musculi

FERRANTE (1984) (75) a pu aussi mettre en évidence à la fois une activité trypanolytique, et des agglutinines spécifiques vis à vis de T. musculi dans le sérum d'hôtes réfractaires à cette espèce. T. musculi, parasite de la souris, est lysé en présence de sérum humain ou de sérum d'autres mammifères notamment le rat. Dans le sérum humain, l'activité trypanolytique met en jeu la voie alterne d'activation. En plus d'une activité trypanolytique, la présence d'agglutinines spécifiques a aussi été mise en évidence dans le sérum des mammifères réfractaires excepté le rat. Ces résultats indiquaient que la spécificité d'hôte pour T. musculi dépendait en partie d'une activité trypanolytique et/ou d'anticorps spécifiques chez les mammifères.

De plus, l'on ajoute que le sérum normal de souris ne contient ni agglu-

tinine ni activité trypanolytique et que l'addition de ce sérum de souris empêche la lyse de T. musculi par le sérum humain alors que le sérum de rat ne possède pas cette propriété. Ceci semble montrer l'existence dans le sérum de souris de facteurs qui gênent l'activation du complément par ce trypanosome. L'auteur a évoqué que des facteurs sériques viendraient se lier à la membrane plasmique et empêcheraient le dépôt des composants du complément activé sur cette membrane.

FERRANTE et ALLISON (1983a) (73) ont aussi montré que les espèces T. congolense et T. b. brucei étaient aussi capables lorsqu'elles sont dépourvues de leur manteau de surface, d'activer le complément par la voie alterne. De plus, des agglutinines spécifiques de chacune de ces espèces ont pu être mises en évidence chez des mammifères (FERRANTE et ALLISON (1983b) (74)).

* T. b. brucei

Le cas le plus étudié demeure celui de T. b. brucei et de l'homme. Ce parasite est une sous-espèce de T. brucei non pathogène pour l'homme bien qu'elle soit morphologiquement semblable à deux autres sous espèces de T. brucei pathogènes pour l'homme : T. b. rhodesiense et T. b. gambiense. Dès 1902, LAVERAN (146) et LAVERAN et MESNIL (147) ont réussi à guérir des souris infectées par le parasite grâce à l'injection de petites quantités de sérum humain. Une recherche fut menée dès les années 60 pour connaître la nature du principe actif trypanocide.

- recherche de l'activité après fractionnement du sérum

YAMAGUCHI (1960) (274) a ainsi localisé une activité trypanocide au niveau de la fraction IV-1 de COHN. Ensuite des tentatives de fractionnement en chromatographie de gel filtration attribuaient cette activité à une globuline de haut poids moléculaire particulièrement au niveau des α 2 macroglobulines (AARONOVITCH et TERRY (1972) (1) ; HAWKING (1973) (110)). Puis, en 1978, RIFKIN (219) a pu associer l'activité cytotoxique du sérum humain aux lipoprotéines de haute densité (HDL). Après séparation des trois classes principales de lipoprotéines par ultracentrifugation de flottaison l'auteur a retrouvé une activité uniquement dans les fractions 1,067 - 1,216 g/ml. La fraction HDL ainsi recueillie, encore contaminée à ce stade par de l'albumine et d'autres protéines sériques a été purifiée par une chromatographie de gel filtration sur Bio-gel A-5m. A l'issue de ces protocoles, la fraction correspondant aux HDL possédait toujours une activité cytotoxique néanmoins fortement diminuée (10 % de l'activité initiale en dépit de la récupération de

plus de 70 % de lipoprotéine). Aucune augmentation de l'activité n'a pu être obtenue après addition de VLDL, de LDL ou de sérum débarrassé de lipoprotéines. Pour l'auteur par conséquent, la baisse du pouvoir trypanocide résultait d'une "destruction" de l'activité biologique associée avec les HDL pendant le protocole de purification plutôt que de la perte d'autres composants sériques indispensables à l'activité trypanocide. L'ultracentrifugation en présence de fortes concentrations en sel peut en effet entraîner une délipidation partielle des HDL (LEVY et FREDERICKSON (1965) (151)). Ainsi, RIFKIN a évoqué l'hypothèse que l'activité biologique soit liée aux HDL dans leur état natif, état difficile à conserver au cours des étapes de purification et de conservation de la fraction de sérum.

L'auteur a précisé aussi qu'aucune activité trypanocide in vivo ou in vitro ne pouvait être décelée dans le sérum recueilli chez des malades atteints de la maladie de Tangier, caractérisée par un déficit sévère en HDL.

D'un point de vue qualitatif, les propriétés cytotoxiques des HDL humaines purifiées se sont révélées identiques à celles du sérum humain sur les points suivants :

- la cinétique de lyse in vitro, présentant une phase de latence de 45 minutes au cours de laquelle les cellules s'arrondissent

- l'activité trypanocide in vivo chez la souris infectée : après 15 heures, l'on observe une lenteur dans les mouvements des parasites ainsi que l'apparition de formes massives. Après 24 heures, seuls quelques trypanosomes peuvent être détectés sous forme massive. Après, 4 à 5 jours de délai, la parasitémie peut s'élever à nouveau et entraîner la mort de l'animal.

De même, une résistance relative de T. b. rhodesiense à la lyse par le sérum humain in vitro a pu être retrouvée avec des HDL humaines purifiées.

Toutefois dans l'ensemble de ces travaux, il ne ressort aucune corrélation pour un sérum donné, entre la quantité de HDL et le titre trypanocide. Ceci va à l'encontre de l'identification absolue de la substance trypanocide aux HDL. En réalité, le phénomène est certainement plus complexe encore. L'auteur a en effet aussi observé que des sérums manifestant in vitro une activité négligeable renferment un inhibiteur de la réaction trypanocide puisque l'élimination des LDL de tels sérums en augmentait le pouvoir de lyse parasitaire.

Ainsi, l'addition d'un excès de LDL à un sérum actif en diminue l'activité et le rapport LDL/HDL rend-t-il mieux compte finalement du titre trypanocide. Toutefois des sérums échappent encore à cette tentative de corrélation et incitent à évoquer d'autres facteurs parmi lesquels la définition structurale précise des lipoprotéines à l'intérieur d'une même classe. Les lipoprotéines, définies selon des critères de densité et de migration électrophorétique sont en réalité très hétérogènes ; elles sont constituées de ce que l'on appelle les "particules lipoprotéiques", caractérisées par l'existence d'une seule apoprotéine (particules simples) ou de plusieurs (particules complexes). Les différentes apolipoprotéines au sein d'une classe de lipoprotéine confèrent ainsi une profonde hétérogénéité de définition que l'on peut visualiser par isoélectrofocalisation.

RIFKIN a apporté certains éléments sur le facteur trypanocide, par exemple son inactivation par un chauffage à 65° C, par un traitement par le dithiothreitol, l'urée ou la trypsine. Ceci évoque le rôle certain de la structure secondaire, tertiaire, quaternaire du ou des ensembles lipoprotéiques actifs. L'action de la trypsine souligne la participation des apolipoprotéines.

En fonction des résultats d'une purification du facteur par chromatographie sur sépharose 6B, le facteur actif est associé à une classe spécifique de HDL s'éluant plus tôt que le pool des HDL. A cela peut être rapprochée, l'observation de GLOMSET et coll. (1966) (85) qui avaient signalé que des molécules de HDL, ayant subi l'action de la lécithine-cholestérol acyl transférase plasmatique, étaient associées aux premières fractions chromatographiques de HDL.

Finalement, RIFKIN (1978) (220) localise l'activité trypanocide au niveau d'un pic unique, correspondant à un poids moléculaire de 500 000 et qui dans son comportement chromatographique s'apparente au facteur anti T. vivax du sérum du rat Cotton (TERRY (1957) (252) ; HUDSON (1972) (122)). Le facteur anti T. vivax, à la différence du facteur anti T. brucei, agglutine les trypanosomes et n'est pas modifié par les agents réducteurs (HUDSON (1972) (122)).

Une observation importante réside dans l'influence de la température sur le phénomène de lyse : la lyse par le sérum humain ne se produit pas à 0° C et disparaît à des température de l'ordre de 65° C. Cette dépendance a amené l'auteur à suggérer l'intervention d'une réaction d'ordre enzymatique.

RIFKIN (1984) (222) s'est attaché à étudier également le mode d'action de ce facteur anti T. b. brucei. Rappelons que pendant la phase prélytique, les cellules se gonflent et s'arrondissent. Le manteau de surface, qui était initialement de 15 nm augmente en épaisseur d'un facteur 4 puisqu'il atteint entre 55 et 60 nm. Les études de marquage de surface suggèrent que cette "augmentation d'épaisseur du manteau de surface" correspond à un "dépliage" de la glycoprotéine plutôt qu'à l'adsorption de protéines environnantes. Ce phénomène de gonflement refléterait une altération sensible de la fonction membranaire qui entre autres conséquences affecterait les mouvements Ca^{++}/K^+ . Il a pu être montré que l'incubation de parasites en présence de sérum humain à 37° C interférait sur la perméabilité membranaire normale et entraînait une fuite du K^+ intracellulaire avec pénétration de Ca^{++} extracellulaire. Il n'était observé aucun effet au niveau du système contrôlant la sortie du Ca^{++} . L'on sait que l'addition de solutés non pénétrants tels que le dextran (SEARS et coll. (1964) (239) ; HENNEY (1974) (112) ; FERLUGA et ALLISON (1974) (72)) ou le sucrose (JACOB et JANDL (1962) (130) peut empêcher la lyse osmotique en contrebalançant la pression osmotique intracellulaire. Dans le cas du modèle trypanosome cet effet a pu être observé uniquement avec le sucrose, qui s'il est ajouté au sérum humain lors de l'incubation n'empêche pas l'atteinte membranaire.

En conclusion de cette analyse, RIFKIN suggéra que les HDL humaines pourraient interagir avec la membrane plasmique des parasites et en prélever du cholestérol ou des phospholipides, ce qui provoquerait une altération de la perméabilité membranaire impliquant la lyse du parasite.

- rôle du manteau de surface

Une question importante était le rôle possible du manteau de surface vis-à-vis du facteur trypanocide. Posant l'hypothèse de l'existence de récepteurs pour les HDL à la surface du parasite, RIFKIN (1983) (221) entreprit différentes études à l'aide de HDL marquées à l'iode ¹²⁵I qui

montrèrent que la liaison HDL-trypanosome est immédiate, non saturable avec réversibilité faible à 4° C et très facile à 37° C. La présence d'un récepteur de surface à forte affinité pouvait dès lors être écartée. De plus, l'addition d'AVS purifié au milieu d'incubation n'amenait aucune perturbation au phénomène lytique.

La possibilité de formation d'un complexe HDL-AVS a aussi été envisagée : HDL et AVS marqué à la leucine ^3H sont incubés séparément à 37° C pendant 1 heure dans un milieu minimum (Eagle's) puis soumis à une chromatographie sur séphacryl S-300. La glycoprotéine membranaire est éluée sous trois formes moléculaires correspondant à des agencements tétramériques, dimériques et monomériques. Le pic d'éluion des HDL recouvre en grande partie la zone d'éluion de la forme tétramérique tout en ayant un sommet légèrement décalé vers l'exclusion. Si HDL et AVS sont incubés ensemble à 37° C pendant 1 heure dans le milieu minimum puis soumis au même protocole chromatographique, aucun complexe stable ne peut être établi avec certitude. Néanmoins, l'éluion des HDL vient coïncider plus exactement avec l'éluion de la forme tétramérique.

L'hypothèse que le manteau de surface empêcherait l'interaction HDL-trypanosome a ainsi été soulevée. Effectivement, le traitement des trypanosomes par le diméthylsubérimidate rend les parasites résistants à la lyse par les HDL, et des cellules trypsinisées ou des cellules procycliques de culture, lient beaucoup plus rapidement les HDL.

Enfin, l'addition de substances stabilisatrices de membrane telles que les cytochalasines C, D et E, les anesthésiques locaux (dibucaïne, tétracaïne et procaïne) et le zn^{++} inhibent aussi la lyse par les HDL.

Au total, on retiendra 1- que la glycoprotéine de surface n'est pas un récepteur pour les HDL et ne participe pas activement dans l'interaction HDL-trypanosome. 2- que le phénomène de lyse est inhibé par une basse température (4° C), par la formation de pontages entre les composants membranaires de surface, et par l'action de stabilisants de membranes. Les facteurs diminuant la mobilité des glycoprotéines en surface ou rendant leur ancrage plus ferme dans la double couche phospholipidique augmentent le rôle de "barrière" joué par le manteau de surface.

Un trypanosome résistant se caractériserait par un AVS qui agirait comme une barrière empêchant ou gênant l'interaction HDL-membrane plasmique. Ceci

peut être en effet envisagé à travers une conformation particulière de l'AVS ou un agencement différent des AVS distribués en surface.

Sur un plan général, le mécanisme par lequel le cholestérol et les phospholipides des HDL s'échangent avec les lipides correspondants des membranes plasmiques cellulaires demeure un sujet de controverses. L'échange pourrait avoir lieu pendant les collisions transitoires se produisant entre les lipoprotéines et les membranes cellulaires (théorie de la collision (PHILIPS et coll. (1980) (206)). L'échange pourrait aussi se produire par diffusion de ces molécules depuis un "donneur" (les HDL) vers un "accepteur" (les membranes) (Théorie de la partition de phase (BRUCKDORFER et coll. (1967) (30)). Dans cette dernière hypothèse, il existerait des interactions spécifiques entre la cellule et la molécule lipoprotéique pour rendre ce transfert plus sélectif.

- Rôle du calcium

Le laboratoire de sérologie de ANVERS s'est également intéressé à la réaction trypanocide du sérum humain en publiant en particulier le rôle essentiel du Ca^{++} dans la réaction anti T. brucei (D'HONDT et coll. (1979) (57)). Les auteurs ont d'abord remarqué que la dialyse du sérum humain normal diminuait considérablement le pouvoir trypanocide sur le variant AnTat 1.8 de T. b. brucei. L'addition au sérum dialysé de Ca^{++} depuis une millimolarité de 7,6 à 12,8 se traduisait par une restauration de l'activité trypanocide directement liée à la quantité de Ca^{++} . Le calcium stimule aussi le pouvoir trypanocide d'un sérum non dialysé. Néanmoins, l'inactivation du pouvoir trypanocide par la chaleur ne peut être réactivée de façon significative par l'addition de Ca^{++} . Ce résultat montre que le calcium seul n'est pas suffisant mais représente un cofacteur de la réaction trypanocide. Les auteurs ont aussi pensé à un rôle éventuel de l' α -2-macroglobuline en tant que transporteur de Ca^{++} . Si le sérum humain était mis en contact avec un antisérum anti α -2-macroglobuline puis dialysé, le pouvoir trypanocide disparaissait complètement. L'addition de Ca^{++} 0,8 mM permettait de récupérer entre 60 et 70 % de l'activité du sérum initial. Ce résultat témoignait donc du rôle actif de l' α -2-macroglobuline dans la réaction trypanocide, par l'intermédiaire de son calcium lié.

Le calcium manifeste aussi d'autres influences sur T. b. brucei : il agit au niveau de la cytotoxicité en synergie avec l'association SHAM-glycérol utilisée en thérapeutique et aussi avec le médicament mélarsoprol, utilisé dans le traitement de la maladie du sommeil avec atteinte du système nerveux central (CLARKSON et AMOLE (1982) (41)). VOORHEIS et coll. (1982) (66) ont aussi soulevé le rôle

stimulant du calcium dans la libération du manteau de surface à partir d'une suspension parasitaire.

- Influence de monosaccharides et du glycérol

Les auteurs ont montré que la présence de D-glucose ou de D-fructose ou encore de D-mannose diminuait fortement l'activité trypanocide et de façon proportionnelle à la concentration. A l'opposé, le glycérol augmente le pouvoir cytotoxique. A ce propos GRUENBERG et coll. (1978) (98) ont signalé pour les formes sanguicoles de T. b. brucei que le D-glucose et le glycérol n'utilisaient pas le même site de transport. Ceci incitait à évoquer la possibilité d'une interaction entre les HDL humaines et les sites spécifiques du transport des sucres. D'HONDT et coll. (1979) (57) ont aussi suggéré un site de fixation du Ca^{++} au niveau des phospholipides des HDL. D'autre part, les auteurs étaient aussi en faveur de l'hypothèse de RIFKIN concernant finalement une altération de la structure membranaire par l'absorption de certains de ses constituants lipidiques.

L'étude de l'activité trypanocide d'un sérum normal vis-à-vis d'une espèce de trypanosome représente un aspect fondamental des interactions hôte-parasite. Un autre aspect de ces interactions porte sur le pléomorphisme et en conséquence la virulence.

2- Pléomorphisme

BLACK et coll. (1982) (16) ont observé que le taux de croissance parasitaire dépend directement du taux de différenciation des parasites sanguicoles depuis des formes allongées se divisant rapidement vers des formes intermédiaires, des formes massives puis des parasites sénescents. BLACK et coll. (1983) (17) ont ensuite mis en oeuvre plusieurs tests qui concourent à montrer que l'hôte intervient dans la régulation de la différenciation parasitaire :

Les auteurs ont observé que des clones de parasites monomorphiques chez la souris devenaient pléomorphiques chez le veau. Néanmoins, l'injection de plasma de veau à la souris n'était pas capable d'induire la différenciation des parasites. Ceci suggérait que le plasma bovin ne contenait pas de molécules stimulant la différenciation de T. brucei. Les auteurs ont par conséquent proposé que celle-ci soit régulée de façon négative par l'hôte. En d'autres termes, il existerait selon les hôtes des concentrations différentes de molécules

qui encourageraient la croissance des parasites et empêcheraient la différenciation. Pour les auteurs, les clones de T. brucei monomorphiques chez la souris résultent d'une interaction puissante entre les formes allongées et les molécules de l'hôte qui empêche la différenciation de ces parasites.

L'ensemble des données concernant les trypanosomes et autres parasites met en évidence l'influence essentielle du milieu que constitue l'hôte vis-à-vis de l'évolution de la parasitose.

D- Contrôle génétique - Mécanismes de la variation antigénique

L'utilisation des techniques de la Biologie Moléculaire depuis 1979 a permis une connaissance des bases moléculaires de la variation antigénique.

Les premiers résultats enregistrés concernaient ce que l'on appelle le répertoire des différents types antigéniques pouvant être exprimés par un trypanosome. Deux points ont été établis :

1. Pour un sérodème donné, chaque variant antigénique contient le répertoire entier des gènes codant pour les AVS de ce sérodème (WILLIAMS et coll. (1979) (269) ; HOEIJMAKERS et coll. (1980b) (117) ; BORST et coll. (1980a) (23) ; PAYS et coll. (1981a) (193)).

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

Les expériences d'hybridation avec les hydrolysats endonucléasiques de DNA nucléaire issu de plusieurs variants ont révélé que chaque DNA complémentaire spécifique d'un AVS s'hybridait, selon une intensité variable, avec plusieurs bandes. Par conséquent, chaque DNA complémentaire spécifique d'un AVS reconnaissait une famille de gènes différents mais apparentés. Le nombre des "isogènes" était variable selon les familles (HOEIJMAKERS et coll. (1980b) (118) ; PAYS et coll. (1981a) (193)).

BORST et coll. (1980b) (24) ainsi que FRASCH et coll. (1980) (77) ont montré avec l'utilisation de segments de DNA complémentaire, que le degré

d'homologie entre les gènes d'une même famille augmentait depuis l'extrémité 5' vers l'extrémité 3'. Selon les auteurs par conséquent, au cours de l'évolution des gènes, le taux d'acceptation de mutations diminue dans le même sens.

La taille d'un répertoire n'est pas encore précisément connue à l'heure actuelle. Cependant, chez T. equiperdum, l'existence déjà de plus de 100 variants immunologiquement distincts a été rapportée (CAPBERN et coll. (1977) (33)).

L'on a pu mettre en évidence jusqu'à présent différents mécanismes à l'origine d'un changement d'antigène. Nous les envisagerons successivement :

1- Duplication - transposition

L'expression de certains AVS est liée à une duplication du gène et à la transposition de la "copie" au niveau d'un site d'expression (HOEIJMAKERS et coll. (1980b) (118) ; BORST et coll. (1980a) (23), (1980b) (24) ; FRASCH et coll. (1980) (77) ; PAYS et coll. (1981a) (193), (1981b) (194) ; BERNARDS et coll. (1981) (13) ; MAJIWA et coll. (1982) (165)).

- a) Mise en évidence d'une copie de base (BC, Basic Copy) et d'une copie liée à l'expression (ELC, Expression-Linked Copy).

HOEIJMAKERS et coll. (1980) (117) (118) ont montré que :

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

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

PAYS et coll. (1981) (193) (194) ont aussi démontré que l'expression des sérotypes AnTat 1.1 et AnTat 1.8 était liée à la synthèse d'une copie

additionnelle du gène et à la transposition de l'ELC au niveau d'un autre site dans le chromosome. Ils ont aussi montré que les formes procycliques de culture "in vitro" du sérotype AnTat 1.1 ne contenaient plus l'ELC. Le fait est corrélé avec l'absence de synthèse du revêtement glycoprotéique dans les cellules procycliques cultivées "in vitro".

De façon analogue, l'ELC du gène spécifique du variant 118 disparaît lorsque ce variant, après inoculation à un lapin donne naissance à de nouveaux types antigéniques (MICHELS et coll. (1982) (174)).

b) l'ELC représente le gène actif

Cette copie additionnelle, dont on a vu que l'existence était corrélée avec l'expression, représente donc très vraisemblablement la séquence effectivement transcrite en RNA messenger, et les premiers travaux entrepris dans ce sens par PAYS et coll. (1981c) (195) sur AnTat 1.1 ont étudié la sensibilité d'une copie de base (BC) et de sa copie additionnelle liée à l'expression (ELC) à la DNase I enzyme caractérisé par une action plus marquée au niveau de la chromatine active que de la chromatine inactive chez les eucaryotes (WEINTRAUB et GROUDINE (1976) (267)). Leurs résultats ont montré que l'ELC se trouvait dans une configuration chromatinienne plus sensible à l'action de l'enzyme que BC et les auteurs ont de ce fait suggéré que l'ELC était la séquence utilisée pour la transcription. Des confirmations furent ensuite apportées par BERNARD et coll. (1981) (13) qui ont fait agir la S1 nucléase sur des hybrides mRNA-BC. Ils ont ainsi montré que les mRNA spécifiques des variants 117 et 118 différaient des copies de base correspondantes au niveau des 100 à 150 derniers nucléotides précédant l'extension poly A. Les auteurs ont aussi comparé pour l'AVS 117 la séquence 3'-terminale de la copie de base avec celle du DNA complémentaire et ont observé au niveau de cette région des différences par mutation ponctuelle, insertion et délétion, différences qui commençaient à l'intérieur de la séquence code et amenaient à conclure que la création de l'ELC était issue d'un mécanisme de duplication - transposition au cours duquel l'extrémité 3' du gène était remplacée.

c) Caractéristiques du processus de transposition

* Limite 3' de la recombinaison

. D'après les résultats de BERNARDS et coll. (1981) (13) sur le variant 117, la transposition du segment calqué à partir de la copie de base s'accompagne d'un remaniement au cours duquel l'extrémité 3' du segment est remplacée par une extrémité 3' nouvelle, différente de celle de BC, vraisemblablement déjà présente dans le site d'expression. La séquence remplacée correspond à l'étendue 3' non traduite et aussi à une partie de l'extrémité C-terminale traduite.

La copie de base du variant 117, en dépit de ses différences avec la séquence de remplacement apparaissait munie d'une extrémité 3' pleinement fonctionnelle, capable de coder pour des protéines tout à fait caractéristiques au niveau de la région C-terminale, et pourvue du prolongement non traduit comprenant les groupes de séquences homologues habituellement rencontrées au niveau des mRNA spécifiques d'AVS (Figure 2). Les mêmes observations ont pu ensuite être faites avec le variant 118 (revu par BORST et CROSS (1982) (25).

Pour BERNARDS et coll. (1981) (13), la recombinaison entre la copie de base et le site d'expression pour la formation de l'ELC peut se produire en n'importe quel point dans la séquence conservée des 150 derniers nucléotides des gènes.

D'autres travaux sont venus confirmer le fait (MICHELS et coll., 1982) (174)). Par exemple, pour un mRNA et sa copie de base l'on a trouvé la même extrémité 3'. L'échange a eu lieu cette fois à la fin du gène. Il a pu être conclu finalement que la limite 3' de la recombinaison pouvait se trouver devant, à l'intérieur ou derrière la partie 3' non traduite du mRNA.

* Taille de l'élément transposé

PAYS et coll. (1981b) (194) ont démontré pour les variants AnTat 1.1 et AnTat 1.8 que l'élément transposé était d'une taille supérieure à celle des mRNAs correspondants (la taille des cDNA des variants AnTat 1.1 et 1.8 avoisinait respectivement 1700 et 1850 paires de bases (PAYS et coll. (1980) (192))). En conséquence, un segment supplémentaire de DNA semblait calqué et cotransposé avec la séquence caractéristique du mRNA. Par la suite, VAN DER PLOEG et coll. (1982a) (257) ont signalé la même observation pour les variants 117 et 118 : Dans les deux cas, le segment transposé

AnTat 1.1 TCCTCTATTCTACTAACAAGAAGAACTTCGCCCTCAGCGTGGTTCTGCTGCGTTAGTGGCACTGCTGTTCTAA
 AnTat 1.8 TCCTCTATTCTAGTAAACAACAATTAGCCCTCAGCGTGGTTCTGCTGCAATTTGGGGCCTTGCTTTTTTAA
 117 TCCTCTATTCTAGTAAACCAAGAAATTGCGCCCTCACGGTGGTTCTGCTGCAATTTGGGGCCTTGCTTTTTAA
 118 GGTAGTTTTCTAACAGCAACAATTGCGCCCTCAGCGTGGTTCTGCTGCAATTTGGGGCCTTGCTTTTTCTAA
 221 AACACCACAGGAAGCAAACTTCTTTGTCATTAGCAAGACCCCTCTTTGGCTTGCAGTTTTGCTTTTTTAA
 11Tat 1.3 TCCACTTTTATCCTAAACAACAATTGCGCCCTCAGCGTGGTTCTGCTGCAATTTGGGGCCTTGCTTTTTTAA
 11Tat 1.1 AATTCTTTTGCATTATAGGCCACCA---CTT-----TTTCT-----TGGTTTTTGCTTTTTAA
 117BC-1 TCCTCTATTCTAGTAAACCAAAAATTGCGCCCTCA--GTG----CTGCTGCGTTTTGGGGCCTTGCTTTTTTAA

AnTat 1.1 ACA-----CCTTCTTCCCCTCT---CTTT---AAAATTTTCC-----TTGCTACTGAAAACTT-----CTGATATATTTTAAACACCTT----- (A)
 AnTat 1.81 TTAGCC-----CCCTCTTT--CT---AAAAATTTTCCCCTGCTAAAA--TTTTCCTACT-----CTGATATATTTTAAACACCT----- (A)
 AnTat 1.8r TTAGCC-----CCCTCTTT--CT---AAAAATTTTCCCCTGCTAAAA--TTTTCCTACT-----CTGATATATTTTAAACACCT---AAAAAATTCCTGG(A)
 117 -----TTTTCCCCTCTTTTTCTT---AAAATTC-----TTGCTACTGAAAA-C-TC-----CTGATATATTTTAAACAC-----GCAAAAT----- (A)
 118 AA-----CAAATTTTCCCCTCAATTT---AAAATTC-----TTGCTACTGAAAACTTT-----CTGATATATTTTAAACAC-----GTAAGTT----- (A)
 221 TTTCCCCTCAAATTTCCCCTCTTTT---AAAATTTTCC-----TTGCTACTGAAAA-CTTT-----TTGATATATTTTAAACACCAAAACC----- (A)
 11Tat 1.3 ---TCCCTT-----CCCTCTTTTTCCATGCTAAAAATTC---TGCTAAAAATTTGCTACTGAAAA-CTTT-----CTGATATATTTTAAACACCT----- (A)
 11Tat 1.1 TTTTCCCCTTAAAAATTT---CCTCCTTTAAAAAC---AAAATTT-----TT-CTACTGAAAA-CTTCTGATATTTGATATATTTTAAACACCTT----- (A)
 117BC-1 CATAACG-----TTCCCCTCAACTTTTTCTTAANGAACT-----TTGCCACT-----CTGATATATTTTAAACCTT.....

Séquences nucléotidiques correspondant à l'extrémité hydrophobe du précurseur de l'AVS et aux régions 3' non traduites du cDNA de 7 variants (d'après Borst et Cross, (1982))

FIGURE 2



commençait entre 1 et 2 kb avant la région codante. La taille moyenne de l'élément transposé était donc de 3 kb. Une observation similaire a été décrite chez d'autres espèces de trypanosomes pour 3 isotypes d'AnTat 1.8 : LiTat 1.6 de T. b. gambiense, AnTat 12.2 de T. b. rhodesiense et AnTat 3.3 de T. evansi (PAYS et coll. (1981d) (196) ; VERVOORT et coll. (1981) (264)).

* L'élément transposé est encadré de séquences répétées dans le génome

L'existence d'une séquence 3' répétée dans le génome a été mise en évidence par les expériences d'hybridation avec une sonde contenant cette partie du gène. Pour AnTat 1.1 et AnTat 1.8 par exemple, PAYS et coll. (1981a) (193) ont trouvé que cette sonde était capable de s'hybrider avec un nombre considérable de fragments de DNA nucléaire non susceptibles de partager des séquences communes avec celles-ci.

Nous avons vu précédemment que la limite 3' du segment transposé est localisée au niveau des 150 dernières paires de base du gène. Il a été évoqué que les groupes homologues de l'extrémité 3' pourraient avoir un rôle au niveau du processus de duplication-transposition. Cette proposition s'accorde avec la nature conservée des séquences 3' non traduites des mRNAs de VSG (BOOTHROYD et coll. (1981) (20), MAJUMDER et coll. (1981) (166)).

La présence également du côté 5' d'une séquence présente dans de multiples copies dans le génome, a été décrite pour plusieurs variants (LiTat 1.6 de T. b. gambiense (PAYS et coll. (1982) (197)), variants 117 et 118 de T. b. brucei (VAN DER PLOEG et coll. (1982a) (257)). Néanmoins, les sondes caractérisant l'extrémité 5' ne s'hybridaient pas aux fragments de DNA contenant les parties 3' des gènes. Par conséquent, des séquences homologues différentes étaient présentes aux côtés du segment transposé. Pour le variant 118, l'analyse en séquence DNA a montré que l'environnement 5' du segment transposé consistait en une série de 5 éléments répétitifs d'environ 70 paires de base (LIU et coll. (1983) (154)). Les expériences d'hybridation ont montré que l'on retrouvait de tels éléments répétitifs devant les autres gènes.

VAN DER PLOEG et coll. (1982a) (257) ont alors proposé que la duplication transposition des gènes de VSG implique une conversion génique unidirectionnelle au cours de laquelle l'appariement initial de la copie de base et du site d'expression dépendrait d'une homologie limitée existant entre les environnements du segment transposé et des séquences présentes dans le site d'expression.

* Limite 5' de la recombinaison

Par comparaison des séquences de la copie de base et de l'ELC pour le variant 117 CAMPBELL et coll. (1984) (32) ont pu localiser la limite 5' de la transposition de ce variant : parmi les trois éléments répétitifs de 76 paires de bases mis en évidence au voisinage de la copie de base, la limite se situait à l'intérieur de celui le plus proche du gène. Ces éléments répétitifs ont aussi été mis en évidence dans le site d'expression, avant le segment transposé. Dans ce cas, néanmoins, l'on trouvait plus de 17 éléments répétitifs avec aussi une interruption au milieu de l'un d'entre eux par une séquence de 270 paires de bases consistant en une succession du triplet TAA.

PAYS et coll. (1983a) (198) ont trouvé, pour un clone AnTat 1.1, que l'ELC du gène pouvait être associée du côté 5' à une séquence additionnelle, copie transposée également d'une autre séquence localisée au niveau d'une région terminale dans le DNA. Cette séquence appelée "companion sequence" était conservée dans les clones successifs AnTat 1.10 et AnTat 1B. Etant donnée la petite taille de la séquence co-transposée pour AnTat 1.1 (432 paires de bases), les auteurs pensent que cette séquence additionnelle (de 1,2 kb) remplace la partie manquante de la séquence co-transposée de AnTat 1.1 dans les clones AnTat 1.1, 1.10 et 1.1B. En effet, pour d'autres clones spécifiant le type antigénique AnTat 1.1 (AnTat 1.10 et 1.1E) et où il n'y a pas de séquence additionnelle, la séquence co-transposée est de 1,5 kb. D'autres observations suggèrent également que cette séquence additionnelle représenterait un fragment résiduel 5' d'une ELC précédente.

Nous avons vu que le lieu 3' de la recombinaison n'est pas exactement défini. Les résultats présents montrent que le site de recombinaison 5' est aussi variable : des longueurs différentes des mêmes copies de base peuvent être dupliquées et transposées vers le site d'expression.

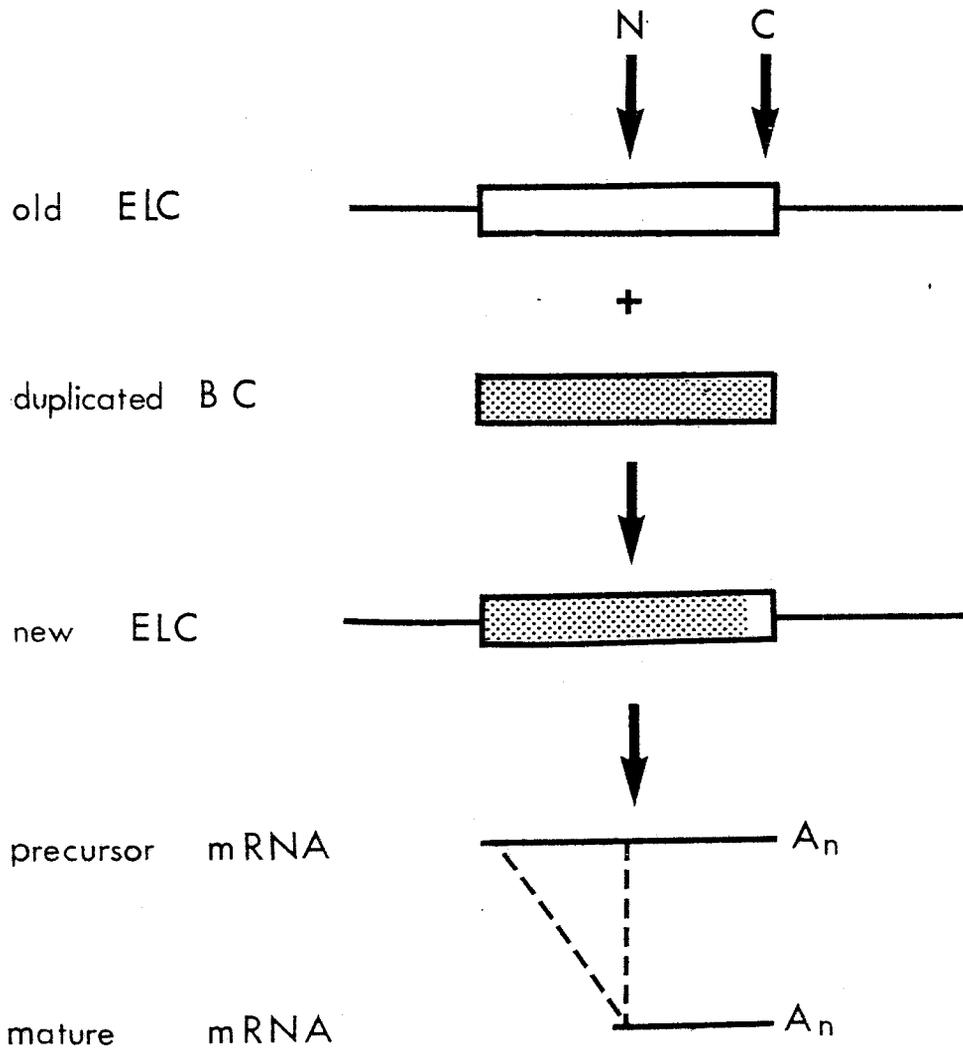
* Présence à l'extrémité 5' des mRNA d'un mini-exon de 35 nucléotides dérivé du site d'expression

PAYS et coll. (1982) (197) avaient montré que la sonde caractéristique de l'extrémité 5' de l'élément transposable pour le variant LiTat 1.6 ne reconnaissait pas le mRNA mature, mais reconnaissait spécifiquement des transcriptats à la fois plus grands et plus petits que le mRNA. Ils ont de ce fait proposé que le gène serait d'abord transcrit sous forme d'un précurseur de plus grande taille, qui serait ensuite clivé. Dans ce modèle, le promoteur serait donc fourni par le site d'expression.

En parallèle avec ces observations, d'autres travaux (BERNARDS et coll. (1981) (13) ; VAN DER PLOEG et coll. (1982) (258)) ont permis aussi de détecter avec une sonde caractéristique du segment 5' co-transposé du variant 118 des transcriptats spécifiques plus courts et plus longs que le mRNA mature. L'un de ces transcriptats, en particulier, représentait la totalité du segment co-transposé. En comparant la séquence de l'extrémité 5' du mRNA avec celle de la copie de base du gène, les auteurs ont aussi démontré que les 34 nucléotides 5'-terminaux étaient différents. Par conséquent, cette extrémité 5' du mRNA mature n'est pas codée par la séquence correspondante de BC et les auteurs ont ainsi montré qu'elle viendrait se lier au reste de la séquence par la découpe d'un précurseur de plus grande taille. BERNARDS (1982) (14) a proposé (Figure 3) un schéma de remaniement moléculaire répondant à ces observations. Selon ce schéma, la transcription démarre avant le segment transposé et donc le site d'expression fournit le promoteur requis pour initier la transcription du gène. Le premier produit de transcription est remanié pour donner naissance au mRNA mature muni d'une extrémité 5' nouvelle indépendante du segment co-transposé. BOOTHROYD et CROSS (1982) (22) se sont également attachés à l'étude de la séquence nucléotidique des extrémités 5' du mRNA et de BC du variant 117. Comme il a été démontré pour le variant 118, les auteurs ont également mis en évidence l'existence d'un exon de 35 nucléotides à l'extrémité 5' du mRNA. De surcroît, la séquence de l'exon pour ce variant s'est révélée absolument identique à celle de l'exon du variant 118 déterminée par VAN DER PLOEG et coll. (1982b) (258).

L'analyse en séquence DNA a confirmé que le segment transposé du variant 118 ne contenait pas le mini-exon de 35 nucléotides : l'exon était donc issu du site d'expression (LIU et coll. (1983) (154)). En conséquence, la transposition active les gènes de VSG par l'addition d'un promoteur. Ces derniers résultats éliminent définitivement la possibilité que chaque gène de VSG transporte son propre promoteur et que l'activation résulte d'une combinaison nouvelle de séquences apportée par le site d'expression.

DE LANGE et coll. (1983) (194) ont montré que le génome de T. b. brucei contenait près de 200 copies de ce mini-exon. Ces dernières sont répétées de façon régulière sur une distance de 35 kb. Pour les auteurs, chacun de ces mini-exons pourrait initier la synthèse du RNA, et cette organisation répétitive serait élaborée pour permettre une proportion élevée de transcription du gène présent dans le site d'expression.



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

FIGURE 3

d) Analyse du site d'expression

PAYS et coll. (1981b) (194) ont étudié les ELCs de deux clones différents exprimant le même type antigénique (AnTat 1.1) ; leurs résultats suggéraient que les séquences du gène ainsi que leurs prolongements semblaient similaires. Les auteurs avaient donc démontré que les copies additionnelles avaient été calquées à partir de la même copie de base, et transposées au niveau de sites d'expression similaires.

A ce sujet, VAN DER PLOEG et coll. (1982a) (257) ont comparé les cartes de restriction endonucléasique des 2 ELCs des gènes des variants 117 et 118 et d'après les profils obtenus, il semblait que les gènes avaient été transposés au niveau du même site chromosomal caractéristique. Ce site était caractéristique par le fait qu'il était dépourvu de tout site enzymatique de restriction sur une importante distance de part et d'autre du segment transposé (6 kb à l'avant et 8 kb à l'arrière). L'absence de sites potentiels de clivage sur une telle longueur révélait l'existence de régions riches en succession d'adénine et de thymine, ou de séquences simples de DNA relativement homogènes. En outre, la séquence de 8 kb se terminait par une position qui représentait un site de clivage pour 15 endonucléases de restriction différentes. Les auteurs ont interprété le fait en suggérant que cette position représentait la fin de la molécule de DNA.

DE LANGE et BORST (1982) (51) ont aussi montré que cette région était préférentiellement dégradée par l'exonucléase Bal 31 et ont donc pu conclure que ce groupe apparent de sites de restriction représentait réellement une discontinuité dans le DNA. En fonction de l'ensemble de ces caractéristiques, les ELCs semblaient être localisées près de la fin d'un chromosome.

De nombreux auteurs se sont penchés sur la question de savoir s'il existait un seul ou plusieurs sites d'expression. Avec un unique site, l'expression d'un seul gène du répertoire s'expliquait alors facilement.

De la comparaison des cartes de restriction des ELCs (VAN DER PLOEG et coll. (1982a) (257) ou de la séquence des mini-exons (BOOTHROYD et CROSS (1982) (22), se dégagait plutôt l'idée d'un site d'expression unique. Sur la base de données semblables, d'autres auteurs ont aussi proposé la même hypothèse (BORST et CROSS (1982) (25) ; MICHELS et coll. (1983) (175) ; LAURENT et coll. (1983) (144) ; PAYS et coll. (1983b) (198) ; PAYS et coll. (1983c) (199)).

MICHELS et coll. (1983) (175) ont cherché à savoir si les gènes des variant 117 et 118 étaient, chaque fois qu'ils étaient exprimés, transposés au niveau du même site d'expression. Les auteurs ont analysé le DNA nucléaire de 4 clones exprimant le variant 118 et de 2 clones exprimant le variant 117. Sur la base de la correspondance de 5 sites enzymatiques de restriction en amont de chacune des 6 ELCs, les auteurs ont conclu que le même site d'expression était utilisé dans chaque cas. Néanmoins, selon les variants, la taille des régions environnantes 3' et 5', dépourvues de sites de restriction, variait considérablement (de plus de 10 000 paires de bases). A partir de cette observation les auteurs ont suggéré que ces régions de DNA consisteraient en de courtes séquences répétitives et la différence de taille selon les variants pourrait alors être expliquée par les mécanismes suivants :

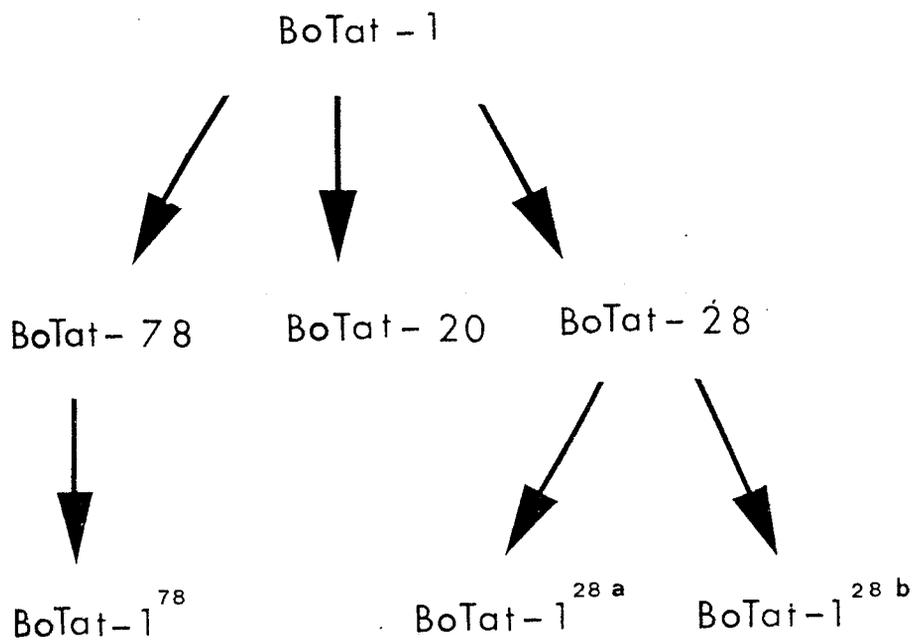
- l'allongement de l'extrémité du chromosome (environ 10 paires de base par division cellulaire)
- la possibilité de délétion au niveau de la région située entre l'ELC et l'extrémité du DNA
- Toutefois, la région située en amont demeure constante après plus de 300 générations de trypanosomes et donc la variation de longueur pourrait être liée dans ce cas au changement de gène.

Chez T. equiperdum LONGACRE et coll. (1983a) (155) ont étudié l'activation des variants BoTat 1 et BoTat 28. Les auteurs ont observé que chaque variant était exprimé par le biais d'un mécanisme de duplication - transposition. De façon analogue à T. brucei brucei, l'ELC représentait la copie exprimée. Les auteurs ont également analysé les cartes de restriction des ELCs pour 4 clones spécifiant le type antigénique basal BoTat 1, obtenu différemment selon le schéma détaillé dans la figure 4 : aucune des cartes ne s'est révélée identique à une autre. A l'opposé des résultats précédents il se dégageait ici pour T. equiperdum la notion de différents sites d'intégration pour les ELCs.

2- Activation de gènes télomériques par conversion génique

a) Localisation de certains gènes à l'extrémité d'un chromosome

LAURENT et coll. (1983) (144) ont signalé la localisation télomérique de la copie de base d'AnTat 1.3. Les auteurs ont aussi observé que l'environnement de la copie de base apparaissait identique à celui de la copie



Origine des différents clones de T. equiperdum
(D'après Longacre et coll., (1983))

FIGURE 4

liée à l'expression avec en particulier la présence de part et d'autre d'étendues de DNA dépourvues de sites enzymatiques de restriction. De plus, les sites qui ont pu être caractérisés en amont étaient identiques à ceux présents dans l'environnement 5' de l'ELC du variant correspondant ainsi que de deux autres variants (AnTat 1.1 et 1.8). L'analyse de la copie de base du variant AnTat 1.3 au niveau de différents clones (AnTat 1.1A ; 1.1B ; 1.18 et 1.13) a montré que son environnement 3' est sujet, comme pour le site d'expression, à des variations de taille par insertions et délétions. Ce phénomène, indépendant de l'expression du type antigénique AnTat 1.3, était induit d'après les auteurs par chaque changement d'antigène. Une observation similaire a pu être faite chez T. equiperdum avec le variant basal BoTat 1 (LONGACRE et coll. (1983b) (156)).

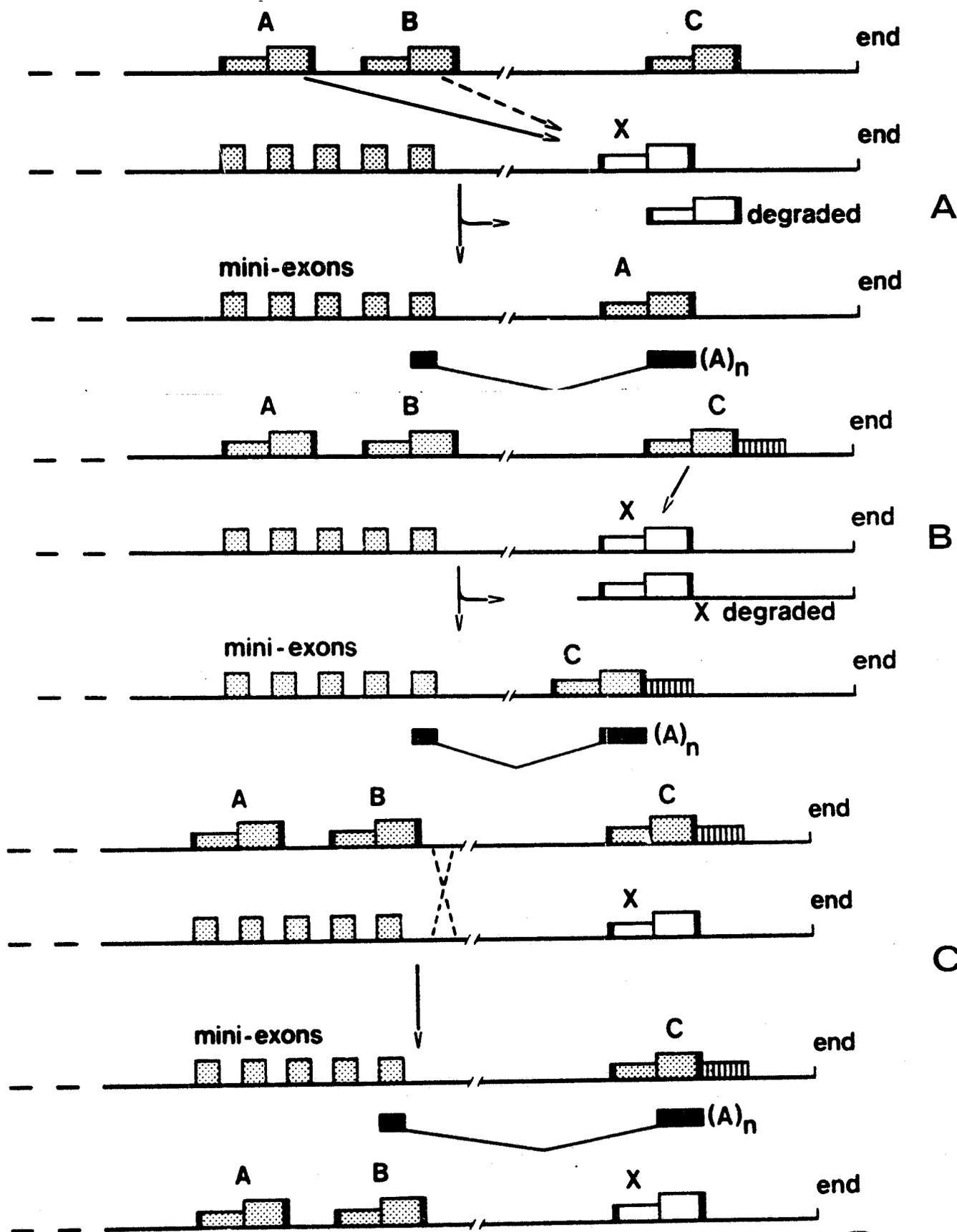
b) La conversion télomérique de gènes

De tels gènes peuvent aussi migrer vers le site d'expression par le mécanisme de duplication transposition mais ce procédé diffère de la transposition des gènes internes comme l'indique la figure 5. Nous avons vu que le segment transposé pour les gènes internes se termine toujours à l'intérieur ou à l'extrémité du gène. Dans le cas des gènes télomériques, le transfert concerne aussi un segment supplémentaire en aval englobant probablement le télomère entier. Pour BORST et coll. (1983) (26), la conversion de gène télomérique est une variante de la duplication - transposition des gènes internes.

c) La conversion génique "partielle"

PAYS et coll. (1983) (200) ont analysé deux remplacements successifs de la copie liée à l'expression au cours de changement de spécificité antigénique AnTat 1.1 → AnTat 1.10 → AnTat 1.1B. En effectuant des expériences de digestion par la DNase I selon les conditions décrites par WEINTRAUB et GROUDINE (1976) (267) les auteurs ont trouvé que dans les clones AnTat 1.10 et 1.1B l'ELC spécifique du variant AnTat 1.1 semblait rester dans une configuration chromatiniennne active.

Néanmoins, dans les deux clones dérivés du variant AnTat 1.1, cette ELC était modifiée : ceci était démontré par hybridation comparative pour chaque clone du fragment Pst I de 2 kb de l'ELC avec la sonde de cDNA homologue et les deux autres sondes hétérologues. Dans chaque cas le marquage du fragment



A- Duplication - transposition

B- Activation de gènes télomériques par conversion génique

C- Recombinaison réciproque entre télomères

D'après BORST et COLL (1983)

FIGURE 5



était plus intense avec la sonde de cDNA homologue suggérant l'existence de modifications de séquence.

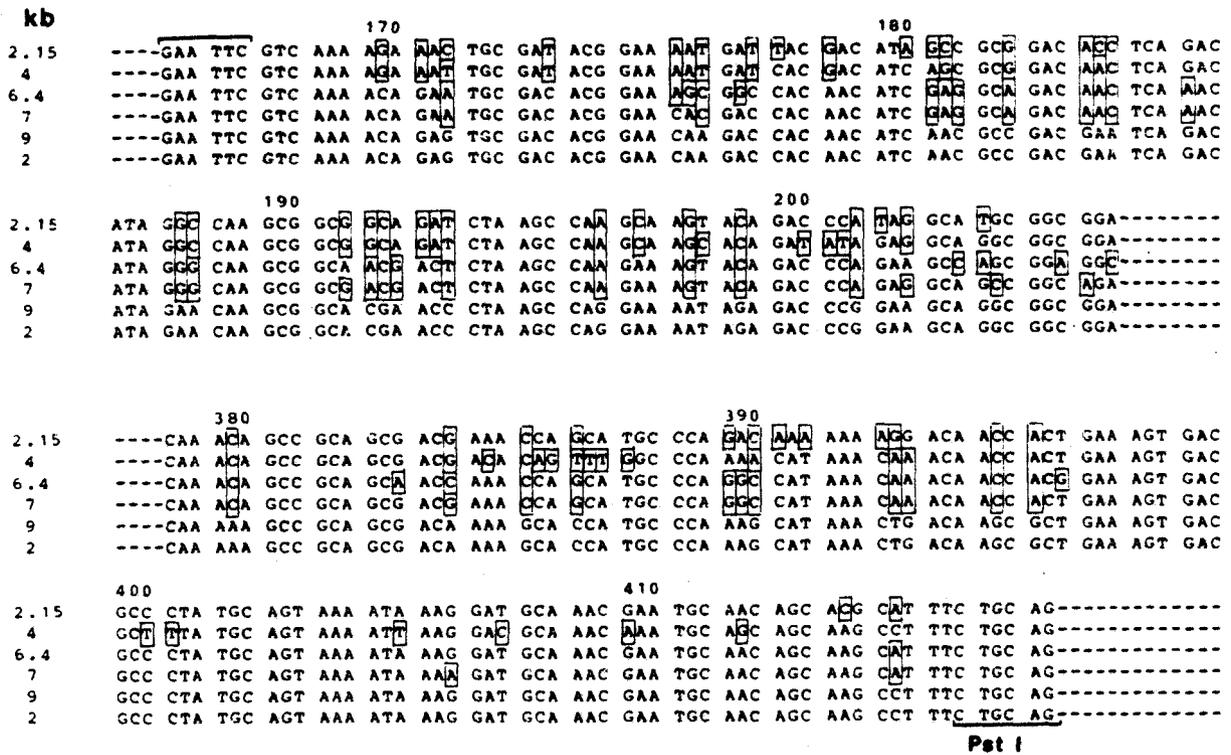
Pour connaître la nature des modifications observées, les auteurs ont comparé les séquences des cDNA spécifiques des variants AnTat 1.10 et 1.1B avec celle du variant AnTat 1.1. En ce qui concerne AnTat 1.10, il existait de nombreux changements intéressant une seule base ainsi que quelques additions ou délétions de codons. Ces modifications représentaient globalement 21 % de la séquence totale du variant AnTat 1.1.

Fait caractéristique, les mêmes modifications étaient retrouvées au niveau de la partie 3' du cDNA du variant AnTat 1.1B alors que la première moitié de la séquence (876 nucléotides) était identique à celle du variant AnTat 1.1. Deux hypothèses pouvaient être alors émises :

1- lors de la variation AnTat 1.1 \rightarrow AnTat 1.10, il y aurait eu des mutations tout le long de la séquence puis seulement sur une partie de celle-ci lors du passage AnTat 1.10 \rightarrow AnTat 1.1B.

2- Une séquence nouvelle légèrement différente constituerait le modèle pour l'ELC du variant AnTat 1.10 qui serait ensuite remplacée en partie par une nouvelle copie partielle de la copie de base du variant AnTat 1.1. C'est cette deuxième hypothèse qui a pu être confirmée par l'analyse en séquence des 5 gènes de la famille AnTat 1.1 (fragments Pst I 2.15 Kb, 4 Kb, 6,4 Kb, 7 Kb, et 9 Kb) clonés à partir du DNA génomique à la fois de AnTat 1.1 et AnTat 1.1B, comparée à celle de l'ELC du variant de AnTat 1.10 (fragment Pst I 2 Kb) (Figure 6). Les résultats montraient que l'ELC d'AnTat 1.10 était copiée à partir du fragment 9 kb et que la copie de base d'AnTat 1.1 était représentée par le fragment 6,4 kb. PAYS et coll. ont donc pu conclure que lors du changement AnTat 1.1 vers AnTat 1.10, une copie du membre 9 kb remplaçait l'ELC d'AnTat 1.1 copie elle-même du membre 6,4 kb. Lors de la variation suivante vers AnTat 1.1B, l'ELC 9 kb était partiellement déplacée par une nouvelle copie, incomplète seulement, du membre 6,4 kb. Leurs résultats indiquaient également que l'ELC d'AnTat 1.1B différait à la fois des séquences 9 kb et 6,4 kb sur une longueur de 133 paires de base. Ceci pouvait indiquer qu'un troisième gène avait servi de modèle pour le segment.

Pour les auteurs, la nature de ce réarrangement de DNA relève probablement d'une conversion génique et non pas d'un échange réciproque puisque les membres 6,4 kb et 9 kb de la famille demeurent inchangés dans les



Comparaison des séquences partielles des membres de la famille génique AnTat 1.1 (Fragments Pst I 2.15 Kb, 4 Kb, 6.4 Kb, 7 Kb, 9 Kb) avec celle de l'ELC du variant AnTat 1.10 (fragment Pst I 2 Kb)
(D'après Pays et coll. (1983))

FIGURE 6

3 clones. Il a aussi été observé que ces deux copies de base étaient les seuls membres de la famille génique localisés au niveau d'une région télomérique.

PAYS et coll. ont pu conclure de ces travaux :

- d'une part que la duplication transposition était effectuée par une conversion génique pouvant affecter une étendue variable des mêmes copies de base.

- d'autre part que différents membres d'une même famille de gènes de surface pouvait contribuer à la diversité d'un répertoire.

Un autre exemple de conversion génique partielle pour la spécificité antigénique AnTat 1.1 a encore été décrit au niveau du clone AnTat 1.1H (PAYS et coll. (1985) (202)). Il s'agit d'un clone dérivé toujours du variant AnTat 1.10, isolé dans la séquence AnTat 1.1A→1.10A→1.1B→1.10B→1.1H→1.10E, où les gènes des variants AnTat 1.1 et 1.10 interagissent au niveau du même site d'expression. Ce dernier est localisé à l'extrémité d'un minichromosome de 225 kb (GUYAUX et coll. (1985) (100)).

Cette succession de variations antigéniques a été sélectionnée expérimentalement car l'apparition d'un même type antigénique chez un hôte est rendue impossible par la réponse immunitaire. L'analyse des différentes conversions géniques a révélé que les limites de recombinaison n'étaient pas distribuées au hasard (Figure 7). L'on a également schématisé sur cette figure un troisième clone du type antigénique AnTat 1.1 (AnTat 1.1C) issu d'un processus de conversion génique partielle légèrement différent, et qui sera détaillé ultérieurement. Les limites 5' qui ont pu être déterminées relativement précisément pour AnTat 1.10A, 1.10B, 1.10E et 1.1C étaient regroupées près du codon d'initiation de traduction, probablement en raison de l'existence d'une homologie seulement sur 407 paires de bases en amont de ce codon. Les limites 3' des 3 clones (AnTat 1.1B, 1.1H et 1.1C) étaient pratiquement localisées au même endroit dans la séquence code, soit entre les amino-acides 290 et 299 de la protéine.

Pour les variants AnTat 1.1H et 1.1C, le membre 6,4 kb constitue le seul donneur. Pour le variant AnTat 1.1B, nous avons vu qu'un gène supplémentaire servait de modèle pour une étendue d'environ 150 nucléotides. La limite 5' de ce segment additionnel se situe entre les acides aminés 242 et 247 de la

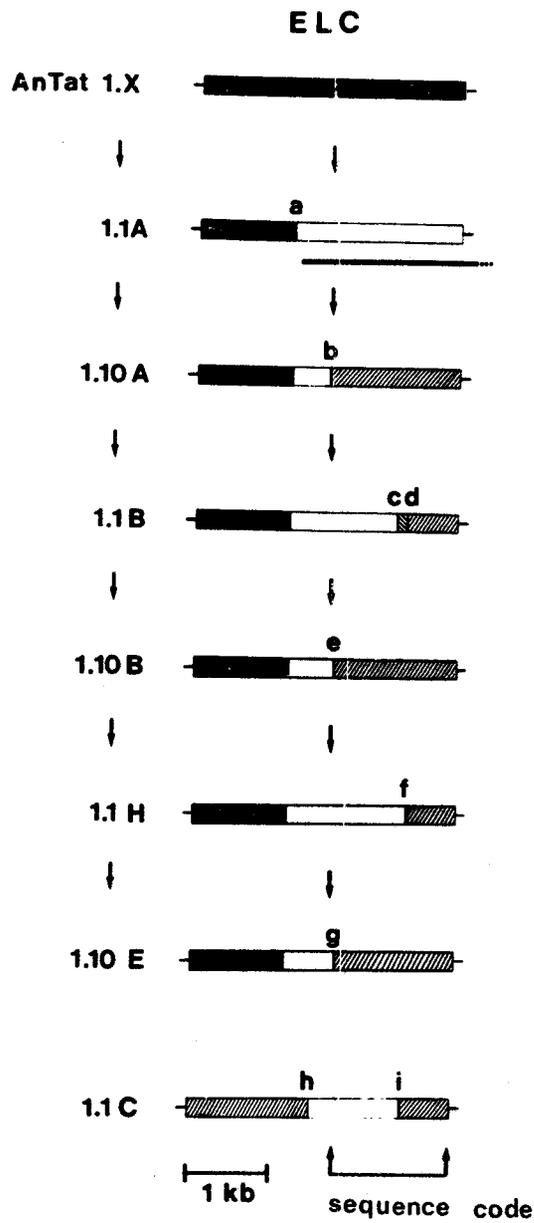


Schéma des transformations successives du gène exprimé dans une série de clones de T. b. brucei

-  Copie du membre 9 Kb
-  Copie du membre 7 Kb
-  Copie du membre 6,4 Kb

(D'après Pays et coll., 1985)

FIGURE 7

protéine. Les relations de ces localisations avec l'organisation de la molécule seront décrites dans le chapitre des Travaux Personnels. Les auteurs ont suggéré qu'une sélection post-recombinatoire puisse limiter le nombre des réarrangements possibles entre les gènes.

d) Longueur variable du segment converti

Au cours de la duplication-transposition des gènes internes, tels que les gènes des variants 117 et 118, nous avons évoqué précédemment que la taille de l'élément transposé était proche de 3 kb, ceci semblant provenir d'homologies de séquence de part et d'autre de cette étendue. La duplication-transposition des gènes télomériques diffère du mode précédent, nous l'avons vu, par l'étendue de l'élément transposé qui comprend un segment supplémentaire en aval du gène pouvant aller jusqu'à la fin du chromosome. Les vastes régions d'homologies au bout du télomère seraient vraisemblablement impliquées dans le mécanisme de recombinaison (BORST et coll. (1983) (26)).

D'un autre côté, seule une partie du gène peut aussi être recombinée et le phénomène de conversion génique partielle s'explique aussi selon PAYS et coll. (1983c) (200) par la proportion élevée d'homologies existant entre les séquences mises en jeu.

A l'opposé, la transposition peut affecter une vaste séquence : lors de la variation AnTat 1.1C AnTat 1.1B, la copie transposée du gène télomérique AnTat 1.3 est d'une taille supérieure à 40 kb (PAYS et coll. (1983d) (201)). Pour les auteurs, les homologies du côté 5' entre les télomères "AnTat 1.1C" et "AnTat 1.3B" seraient restreintes à une région très éloignée des 2 gènes de telle sorte que la duplication aurait à parcourir une étendue plus longue avant d'atteindre le site recombinationnel d'homologie. Dans ce cas, le promoteur se trouverait à une distance relativement éloignée du gène.

3- Activation de gènes télomériques sans duplication-transposition

a) Mise en évidence

Certains gènes spécifiques sont exprimés sans qu'il soit possible de détecter une copie liée à l'expression.

WILLIAMS et coll. s'étaient attachés dès 1979 (269) à étudier les hybridations du DNA complémentaire spécifique d'un variant (IITat 1.2) avec des fragments génomiques de restriction du variant homologue et de deux autres clones. Leurs résultats n'avaient pas mis en évidence la formation d'une ELC. Ils avaient observé en revanche que le DNA complémentaire s'hybridait avec des fragments nucléaires donc les tailles étaient différentes selon les variants, preuve de l'existence d'arrangements différents de séquences de DNA autour de ces gènes selon les clones. Leurs résultats indiquaient que la variation antigénique mettait en oeuvre un type autre de réarrangement au niveau du génome, qui n'avait en apparence aucune relation directe avec l'expression du gène. La poursuite des travaux (WILLIAMS et coll. (1980) (270)) a confirmé le fait et apporté d'autres précisions :

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

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

b) Les gènes ont tous une localisation télomérique.

L'expression sans mécanisme de duplication-transposition a été retrouvée chez d'autres variants et dans chaque cas, les gènes étaient localisés à la fin du chromosome (BERNARDS (1982) (14) ; WILLIAMS et coll. (1982) (271) ; MAJIWA et coll. (1982) (165) ; PAYS et coll. (1983) (201) ; LAURENT et coll. (1984) (145) ; BERNARDS et coll. (1984) (15)).

c) Présence du même mini-exon de nucléotides

BOOTHROYD et CROSS (1982) (22) se sont aussi intéressés à l'étude de la séquence nucléotidique de l'extrémité 5' d'un mRNA spécifique d'un variant pour lequel l'expression ne s'accompagne pas de la détection d'une ELC, le variant 221. Ils ont encore trouvé pour les 35 premiers nucléotides une séquence strictement identique à celle des variants 117 et 118. En conséquence, le promoteur pour le variant 221 est suivi du même segment que celui des variants 117 et 118, et les auteurs ont proposé 2 explications pour ce fait :

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

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

L'analyse en séquence DNA a ensuite montré l'absence de ce mini-exon sur une longueur de 8,5 kb en amont de ce gène (BERNARD et coll. (1984) (15)). En conséquence, ces gènes télomériques sont aussi remaniés.

d) mécanisme proposé : l'échange réciproque de télomère

BORST et coll. (1983) (26) ont proposé un mécanisme d'échange de l'extrémité chromosomale. Selon ce modèle les gènes télomériques peuvent migrer vers le site d'expression par un échange réciproque de télomère depuis un niveau situé entre le promoteur et la séquence du gène. Ceci s'accompagne simultanément de l'activation de la transcription du gène télomérique et de la mise sous silence de l'ELC. C'est un mécanisme qui a également été proposé par PAYS et coll. (1983d) (201) et LAURENT et coll. (1984) (145). Plusieurs éléments sont en faveur de cette hypothèse.

- Pour BORST et coll. (1983) (26), l'existence du même mini-exon de 35 nucléotides au niveau du mRNA du variant 221 exprimé sans duplication-transposition (BOOTHROYD et CROSS (1982) (22).

- Pour PAYS et coll. (1983)d (201) et LAURENT et coll. (1984) (145), à la fois la persistance de l'ELC précédente dans le génome sous une forme télomérique inactive et d'autre part la perte du gène si le gène suivant est activé par le mécanisme de duplication-transposition. Les observations sont issues de l'analyse de la succession des variants suivants : AnTat 1.1→AnTat 1.3→AnTat 1.6→AnTat 1.16→AnTat 1.1C→AnTat 1.1B.

Les gènes spécifiques des clones AnTat 1.1, 1.3, 1.16 et 1.1B sont activés par le mécanisme de duplication-transposition. Les gènes spécifiques des clones AnTat 1.6 et 1.1C sont à l'opposé activés par le mécanisme hypothétique de l'échange réciproque de télomères. Les ELCs d'AnTat 1.3 et 1.16 ont été retrouvées sous une conformation inactive après le changement d'antigène. Les gènes spécifiques des variants AnTat 1.1C et 1.16 étaient respectivement perdus dans le ou les variants suivants (STEINERT et PAYS (1985) (245)).

e) Evolution des répertoires

En conséquence, un répertoire d'antigènes peut évoluer par pertes et gains de gènes. Beaucoup de gènes télomériques sont probablement des ELCs inactivées (YOUNG et coll. (1982) (275) ; PAYS et coll. (1983d) (201) ; YOUNG et coll. (1983) (276) (277) ; BORST et coll. (1983) (26)).

Une ELC partiellement modifiée par une conversion génique "partielle" peut aussi être conservée comme une "ex-ELC" venant aussi accroître la diversité de la famille de gènes (PAYS et STEINERT (1985) (245)). Cette combinaison de différents mécanismes constituerait l'un des facteurs responsables de la considérable hétérogénéité observée parmi les divers sérodèmes. Chez T. gambiense, les sérodèmes apparaissent beaucoup plus stables, et STEINERT et PAYS (1985) (245) ont évoqué la possibilité d'une moindre activation télomérique pour cette sous-espèce.

D'autres travaux montrent que certains gènes évoluent très rapidement alors que d'autres sont relativement conservés.

Des auteurs (VAN MEIRVENNE et coll. (1977) (262) ; VERVOORT et coll. (1981) (264) ; MAGNUS et coll. (1982) (163)) ont comparé par immunolyse et immunofluorescence les AVS de répertoires antigéniques issus de différents stocks de parasites et ont montré :

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

Du point de vue génétique, l'étude de l'hybridation d'une sonde spécifique du gène AnTat 1.8 avec le DNA nucléaire issu de ces différents stocks a aussi démontré la conservation de la séquence code correspondant à ce gène (PAYS et coll. (1981b) (194), (1981d) (196), (1982) (197)).

D'autre part, l'étude de la séquence nucléotidique de deux AVS isotypiques (AVS 117 (BOOTHROYD et coll. (1980) (19), (1982) (22)) et AnTat 1.8

(MATTHYSSENS et coll. (1981) (167)) a indiqué qu'il existait entre les deux gènes une homologie quasi complète des bases.

FRASCH et coll. (1982) (78) se sont intéressés, à l'étude du degré de conservation de certains gènes d'un répertoire dans 12 stocks de parasites d'origine différente. Les auteurs ont trouvé que l'AVS 117 était essentiellement conservé dans 11 de ces stocks. L'AVS 118 s'est révélé présent dans 7 stocks mais sous 4 formes différant par leurs sites enzymatiques de restriction. L'AVS 221 s'est montré absent de tous les stocks.

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

f) Relations entre les deux mécanismes

* Les 2 procédés d'activation existent à l'intérieur d'un sérodème.

Ceci, déjà évoqué précédemment, a aussi été montré par MAJIWA et coll. (1982) (165) par l'analyse de plusieurs variants d'un sérodème.

- Pour le variant IITat 1.1 du sérodème, il a été possible de détecter une ELC dans les cellules homologues. Le répertoire de base demeurait inchangé dans les autres clones étudiés (IITat 1.2 et IITat 1.3).

- A l'opposé, l'AVS IITat 1.3, comme l'AVS IITat 1.2, était exprimé sans mécanisme de duplication-transposition. La seule différence résidait dans le nombre de copies.

Par conséquent, à l'intérieur d'un sérodème donné, l'on pouvait rencontrer l'un ou l'autre type de réarrangement.

- * Un même type antigénique peut être exprimé par l'un ou l'autre mécanisme

BERNARDS et coll. (1984) (15) ont montré que le gène télomérique unique spécifique du variant 221 pouvait être activé par duplication et transposition vers un site télomérique d'expression ou bien par le mécanisme d'activation sans duplication - transposition réservé aux gènes télomériques.

- * L'expression d'un type antigénique peut résulter de la combinaison des mécanismes d'échange réciproque et de conversion génique.

PAYS et coll. (1983d) (201) ont trouvé que la spécificité antigénique AnTat 1.1 pouvait aussi dériver de cet autre mécanisme interprété comme un échange réciproque.

A partir du variant AnTat 1.16, les auteurs ont isolé un clone du variant AnTat 1.1 (AnTat 1.1C). Au niveau de ce dernier clone, l'on ne détectait pas de copie liée à l'expression. D'autre part, il existait des changements au niveau du répertoire de base. Les 5 membres sont définis, nous l'avons déjà vu, selon la taille des fragments issus de la coupure par l'enzyme de restriction Pst I soit respectivement 9 kb, 7 kb, 6,4 kb, 4 kb et 2,15 kb. Les séquences "9 kb" et "6,4 kb" représentent respectivement les copies de base des variants AnTat 1.10 et 1.1. Pour le clone AnTat 1.1C, il n'y avait pas conservation de la séquence "9 kb". L'analyse en séquence a révélé le remplacement d'une vaste étendue du gène par une copie de la séquence 6,4 kb. La jonction était localisée, nous l'avons évoqué précédemment dans une région génique correspondant à la séquence 290-299. Etant donné que la séquence "6,4 kb", était conservée dans ce clone, le réarrangement observé a été attribué à une conversion génique "partielle", analogue à celle décrite pour les variants AnTat 1.1B ou 1.1H. Néanmoins, pour ces derniers, la recombinaison affectait l'ELC de cette séquence 9 kb et non pas, cette séquence en elle-même. D'autre part, comme pour AnTat 1.1H, il n'existe pas non plus de donneur supplémentaire. L'analyse du cDNA du variant AnTat 1.1C a révélé que la transcription se faisait à partir de la séquence "9 kb" réarrangée.

Autre observation importante pour AnTat 1.1C : le télomère contenant la séquence "9 kb" ne possédait pas, sur une longueur au moins de 20 kb, le même environnement 5' précédemment décrit pour le site d'expression des gènes. Pour PAYS et coll. (1983d) (201), la variation AnTat 1.16 → AnTat 1.1C résulterait des effets combinés de 2 mécanismes différents de recombinaison : un

échange réciproque intéressant au moins une étendue de DNA télomérique de 20 kb et positionnant la séquence "9 kb" en aval du promoteur supposé unique, et une conversion génique affectant partiellement cette séquence transposée avec le membre 6,4 kb de la famille génique.

- g) observations non corrélées avec le mécanisme d'échange réciproque.

A l'opposé les résultats de VAN DER PLOEG et coll. (1985) (259) sur la base du fractionnement du DNA nucléaire semblent montrer que ce mécanisme proposé ne soit pas suivi pour le variant 221. Selon leurs conditions, le DNA était séparé en 4 fractions : 50 - 150 kb, 200-700 kb, 2 Mb et le DNA de taille moléculaire élevée restant au point de dépôt. Les copies de base des gènes des variants 118 et 221 résident dans le DNA de taille moléculaire élevée. Leurs copies liées à l'expression se trouvent dans la fraction 2 Mb montrant que l'activation implique une transposition interchromosomale du gène. Lorsque le gène du variant 221 est activé sans duplication - transposition, il reste dans le DNA de taille moléculaire élevée et ne migre donc pas vers le site d'expression chromosomique. Cette observation tend à éliminer l'hypothèse de l'échange réciproque.

Les auteurs ont aussi montré que l'ELC persistante du variant 118 résidait encore dans la fraction 2 Mb après le changement d'antigène. Ces résultats, qui n'excluent pas toutefois un transfert vers un autre chromosome, prouvent l'existence au moins de 2 sites pour l'expression des gènes de VSG. A l'appui, la présence des mini-exons 5' caractéristiques des mRNA des VSGs a pu être mise en évidence dans le DNA de taille moléculaire élevée ainsi que dans la fraction 2 Mb.

Rappelons que chez T. equiperdum, la notion de plusieurs sites d'expression avait aussi été mise en évidence (LONGACRE et coll. (1983b) (155)). La présence de plusieurs sites possibles pour l'expression implique alors un mécanisme pour contrôler l'activité de chaque site. L'hypothèse d'un promoteur mobile sautant de télomère en télomère a été évoquée (BORST et coll. (1983) (26)). Cette hypothèse ne semble pas s'accorder réellement avec certaines observations : l'activation sans duplication - transposition du gène du variant 221 ne s'accompagne pas de réarrangements sur une vaste distance (55 kb) en amont de la séquence code.

D'autres éléments pouvant peut-être avoir un rôle dans l'activation ont été mentionnés.

STEINERT et PAYS (1985) (245) ont rapporté l'existence de modifications de bases uniquement au niveau des gènes télomériques silencieux. Pour les auteurs, ces modifications participeraient à la différenciation des gènes télomériques silencieux vers des gènes actifs. Chez T. equiperdum, RAIBAUD et coll. (1983) (208) ont aussi mis en évidence l'existence de cytosines modifiées au niveau d'une fraction de DNA télomérique contenant les extrémités 3' de la copie de base et de l'ELC du variant BoTat 1.

4- Relations entre les différents mécanismes et le schéma de variation antigénique

a) Expression des types métacycliques (STEINERT et PAYS (1985) (245))

Les caractéristiques inhérentes au répertoire antigénique métacyclique, définies au cours d'un chapitre précédent, montrent qu'il existe un processus particulier pour contrôler l'activation des gènes correspondants. Les gènes spécifiques des types antigéniques métacycliques peuvent suivre l'un ou l'autre des mécanismes existants. L'activation par un trypanosome métacyclique pourrait donc être sous le contrôle d'un "marqueur métacyclique". Ce dernier ne serait pas étroitement lié au gène puisque l'on a montré, chez T. b. rhodesiense, que le répertoire métacyclique évoluait aussi (BARRY et coll. (1983) (12)).

b) Expression des types antigéniques précoces et tardifs

Les mécanismes d'activation ne semblent pas être sollicités préférentiellement en fonction du temps d'apparition d'un variant. L'on a remarqué néanmoins aussi bien chez T. b. brucei que T. equiperdum que les gènes des types antigéniques prédominants étaient localisés à la fin du chromosome (BORST et CROSS (1982) (25) ; YOUNG et coll. (1983a) (276) ; PAYS et coll. (1983d) (201) ; LAURENT et coll. (1983) (144) ; RAIBAUD et coll. (1983) (208) ; PARSONS et coll. (1984) (189)) et de plus leur environnement apparaissait très similaire à celui du site d'expression (LAURENT et coll. (1983) (144) ; LAURENT et coll. (1984) (145)). Pour PAYS et STEINERT, un type antigénique serait prédominant lorsqu'il y aurait une forte

probabilité d'activation pour le gène, en raison d'une position télomérique et d'une homologie de séquence convenable avec le site d'expression.

Un autre aspect fondamental dans l'étude de la variation antigénique est représenté par l'analyse biochimique des antigènes variables isolés.

A partir d'un clone de trypanosome, la multiplication parasitaire est effectuée sur rat qui développe une infection de type aigu sans permettre une variation d'antigène. L'isolement des trypanosomes, l'obtention de l'antigène variable purifié peuvent être effectués selon divers protocoles. Les premiers procédés décrits aboutissaient à une forme soluble dont on a pu préciser le caractère glycoprotéique. Par la suite l'antigène variable a été défini comme glycoprotéine membranaire, munie de lipides liés de façon covalente vraisemblablement impliqués dans l'ancrage de l'antigène sur la membrane plasmique.

II- ISOLEMENT ET CARACTERISATION DE LA FORME SOLUBLE DE L'ANTIGENE VARIABLE

A- Isolement

Afin de décrire l'organisation moléculaire du manteau de surface, il était essentiel d'isoler l'antigène variable, élément glycoprotéique constitutif, dans un état de pureté se prêtant à l'analyse et à la détermination structurale. Le premier stade correspond sur sang infesté recueilli en phase aiguë de parasitose, en la séparation des trypanosomes des éléments figurés du sang. Deux protocoles sont généralement utilisés.

* La chromatographie d'échange ionique : techniques de LANHAM et GODFREY (1970) (144)

Cette technique repose quant à son principe sur la différence de charge existant à la surface des parasites par rapport à celle des cellules sanguines. La chromatographie est réalisée à température ambiante par passage du sang de rat infesté hépariné sur une colonne échangeuse d'anions de type DEAE-cellulose, équilibrée en tampon phosphate glucosé de pH 8,0.

Dans les conditions utilisées, les éléments figurés du sang sont retenus sur la colonne, alors que les trypanosomes toujours en vie sont élués.

Une centrifugation de l'éluat à 1630 g pendant 20 minutes, livre les trypanosomes sous forme d'un culot de centrifugation, qui est ensuite soumis à

plusieurs cycles de lavage.

ROSEN et coll. (1979) (227) ont introduit une variante dans la technique de LANHAM et GODFREY : le sang de rats infestés (T. congolense) est traité par une solution de glycérol à 10 %, qui entraîne une hémolyse. La préparation est centrifugée à 5500 g pendant 1 minute, ce qui permet l'obtention d'un culot de trypanosomes encore contaminé par, au maximum, 5 % de cellules sanguines. Les trypanosomes repris en suspension dans un tampon très proche de celui préconisé initialement par LANHAM et GODFREY, subissent alors l'étape de purification sur colonne de DEAE-cellulose dans les conditions déjà décrites.

* La centrifugation isopycnique

L'isolement des trypanosomes de la souche T. vivax, à partir de sang de rats parasités, selon le protocole chromatographique d'échange ionique donne un rendement faible, aussi GRAB et coll. (1982) (86) ont développé une technique de centrifugation qui a permis la récupération de plus de 90 % des parasites attendus. Une suspension de Percoll (silice recouverte de polyvinylpyrrolidone) à 50 % dans un tampon isotonique est mélangée à un volume égal de sang de rat parasité. Après une centrifugation de 20 minutes à 17 500 g (4° C), les trypanosomes forment une bande très concentrée en haut du tube et sont nettement séparés des globules rouges qui sédimentent au fond du tube. Les auteurs ont aussi appliqué avec succès cette méthode à la séparation de trypanosomes de la sous-espèce T. b. brucei (GRAB et coll. (1984) (87)).

Quelque soit le mode d'obtention des parasites, différentes techniques de libération du manteau de surface ont été proposées. Parmi celles-ci, il faut distinguer les techniques qui font appel à une rupture cellulaire de celles qui respectent l'intégrité des trypanosomes.

1- Techniques faisant appel à une rupture cellulaire

La rupture cellulaire peut être obtenue selon divers procédés :

- homogénéisation en présence de billes de verre
- choc osmotique en tampon phosphate de pH 8,0
- congélations - décongélations successives
- filtration sur microseringue
- sonication
- lyse partielle par le dioxane

Le premier protocole d'isolement du manteau de surface, décrit par CROSS

(1975) (46) sur T. b. brucei, dérive d'une homogénéisation en présence de billes de verre. L'homogénat est soumis à une centrifugation à 15 000 g pendant 15 minutes, le culot obtenu était remis en suspension et recyclé. Après une nouvelle centrifugation, les surnageants réunis sont traités par centrifugation à 165 000 g pendant 2 heures, afin de sédimenter les particules ribosomales et tout débris membranaire. Le surnageant résultant de cette dernière opération contient les protéines solubles ; il est ultérieurement déposé sur colonne de Séphadex G₂₅ pour éliminer les sels.

Ce même auteur a aussi proposé un protocole de libération par lyse osmotique des parasites à 0° C soit en eau distillée enrichie en acétate de zinc soit en tampon phosphate de pH 8,0.

ROVIS et coll. (1978) (229) ont utilisé la technique de congélation-décongélation. Les cellules soumises à une série de congélations - décongélation sont ensuite centrifugées à 230 000 g pendant 60 minutes. L'addition de N-tosyl-L-lysylchlorométhyl cétone (TLCK) à la concentration de 1 mM évite une dégradation protéolytique du matériel libéré. Afin de récupérer l'antigène resté en situation membranaire après le traitement, le culot 230 000 g est solubilisé à l'aide d'un détergent non-ionique (NP 40) à 0,5 % (V/V) en 30 minutes à 0° C, puis centrifugé 60 minutes à 230 000 g.

ONODERA et coll. (1981) (184), travaillant sur l'espèce T. congolense, utilisent un culot congelé de 1 à 2 10^{10} trypanosomes qui est d'abord décongelé, remis en suspension puis filtré sur microseringue, jusqu'à ce que les trypanosomes soient réduits à de petites vésicules (vérification de la rupture cellulaire au microscope). L'étape de centrifugation est réalisée à 250 000 g pendant 1 heure à +4° C. Le surnageant 250 000 g contient le lysat de trypanosomes et donc l'ensemble du matériel membranaire plasmique.

STRICKLER et coll. (1978) (248) ont utilisé la sonication. Les trypanosomes, à concentration de 10^{10} cellules par ml, subissent une rupture par sonication. L'homogénat est soumis à une centrifugation à 12 100 g pendant 5 minutes ; le surnageant est conservé et le culot, après lavage, est centrifugé à 165 000 g pendant 1 heure à +4° C afin de sédimenter les particules ribosomales. Les deux surnageants 12 100 g et 165 000 g contiennent les éléments représentatifs du manteau glycoprotéique de surface.

REINWALD et coll. (1981) (212) sur T. congolense ont effectué une lyse partielle des trypanosomes par le dioxane à 5 % (V/V). Cette technique présentait l'avantage d'être rapide car ne nécessitant ni dialyse, ni étape de concentration de matériel.

Parmi tous ces protocoles, ceux de la lyse osmotique et de la congélation-décongélation demeurent les plus utilisés actuellement.

2- Technique sans rupture cellulaire

BALTZ et coll. (1976) (8) utilisent des préparations de T. equiperdum obtenues selon un protocole en deux temps : la suspension cellulaire tout d'abord enrichie d'un volume égal de tampon phosphate glucosé de pH 8,0 est additionnée de dextran à la concentration finale de 2 %, puis centrifugée à faible vitesse pour éliminer la plupart des hématies. Le surnageant est déposé sur une colonne de DEAE-cellulose selon la technique de LANHAM et GODFREY (1970) (143) afin d'éliminer les hématies encore contaminantes.

Les parasites sont mis en suspension en tampon phosphate 0,125 M, de pH 5,5 enrichi à 1 % de glucose. La suspension est laissée une nuit à +4° C sur agitateur de KLINE, étape qui correspond à la libération de l'antigène variable. Après centrifugation à 3000 g pendant 15 minutes, le surnageant est dialysé contre une solution de NaCl 0,5 M afin d'éliminer le glucose. Le matériel encore insoluble est alors éliminé par ultracentrifugation à 50 000 g pendant 1 heure à + 4° C. Le surnageant 50 000 g constitue l'extrait antigénique brut qui renferme, outre l'antigène variable, les antigènes solubles communs.

Le procédé de BALTZ est très efficace et doux pour la préparation de l'AVS de T. equiperdum, mais le mécanisme reste encore à ce jour, inconnu.

En conclusion, il faut souligner que le taux de libération du manteau de surface et la qualité du matériel obtenu sont déterminants dans ces étapes d'isolement de l'antigène variable. Il convient donc d'adapter un protocole en fonction de la souche étudiée.

3- Purification de la forme soluble de l'antigène variable de surface

A partir de l'extrait antigénique brut, diverses méthodes de purification ont été utilisées afin d'obtenir une préparation avec un degré de pureté permettant une approche biochimique et structurale.

Plusieurs auteurs ont défini de tels protocoles : CROSS (1975) (46) ; BALTZ et coll. (1976) (8) ; STRICKLER et coll. (1978) (248) ; REINWALD et coll. (1981) (212) ; DIFFLEY et JAYAWARDENA (1982) (58)).

a) Chromatographie échangeuse d'ions - Isoélectrofocalisation

Selon la technique de CROSS (1975) (46), l'extrait antigénique brut du variant 427 de T. b. brucei obtenu par homogénéisation en présence de billes de verres, est déposé sur une colonne de DEAE-cellulose équilibrée en tampon phosphate de sodium de pH 8,0. Dans ces conditions, 50 à 70 % des protéines de l'extrait brut se fixent sur la résine. L'antigène variable, non retenu, est élué avec le tampon d'équilibre.

Cet éluat est soumis en deuxième étape à un fractionnement par isoélectrofocalisation selon un gradient de pH 3 à 10. On observe dans le cas retenu une fraction majeure dont le point isoélectrique est de 6,9 et deux fractions mineures de point isoélectrique respectif 5,9 et 6,2. CROSS identifie la fraction majeure à l'antigène variable dont la pureté peut être également contrôlée par électrophorèse en gradient de gel de polyacrylamide en présence de SDS.

b) Chromatographie d'affinité sur lectines

Le caractère glycosylé de la molécule d'AVS autorise un protocole préparatif fondé sur la chromatographie d'affinité lectinique. BALTZ et coll. (1976) (8) ont décrit pour l'isolement des AVS de T. equiperdum, un protocole utilisant la chromatographie d'affinité lectinique directement applicable sur l'extrait brut, c'est-à-dire le surnageant de traitement des trypanosomes par le tampon de pH 5,5. L'extrait, à la concentration de 5 mg/ml, est déposé sur une colonne de concanavaleine A-Sépharose. Les composants non retenus, à savoir principalement les antigènes communs, sont recueillis dans l'éluat d'équilibre jusqu'à ce que l'absorbance, mesurée à la longueur d'onde de 280 nm, soit devenue nulle. Dans un second temps, la colonne est traitée par une solution de NaCl 0,5 M contenant 10 % (p/v) d' α -méthylmannoside ; l'éluat correspond alors à l'AVS, fraction glycoprotéique spécifique, électrophorétiquement homogène.

REINWALD et coll. (1981) (212) ont effectué la purification d'antigènes variables de T. congolense selon cette technique de chromatographie

d'affinité sur concanavaline-A-sépharose. Les auteurs ont obtenu un très faible rendement d'élution avec l' α -méthylmannoside (20 %). L'élution de la colonne par de l'éthylèneglycol à 50 % ou par du borate 0,1 M de pH 8,0 (solutions préconisées pour diminuer les interactions non spécifiques) ne modifiait en rien le rendement chromatographique, ainsi que des concentrations en α -méthylmannoside supérieures à 1 M. Seule l'élévation thermique à 22° C de l'étape chromatographique donnait un résultat légèrement supérieur (35 % de rendement). Aussi les auteurs ont-ils finalement utilisé une désorption électrophorétique des AVS de la Con A-sépharose par isoélectrofocalisation en gel préparatif.

DIFFLEY et JAYAWARDENA (1982) (58) ont associé la chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose à la chromatographie d'affinité sur lectine de lentille selon le procédé décrit par STRICKLER et coll. (1978) (248).

c) Chromatographie liquide haute performance

Une purification de l'antigène variable par chromatographie liquide haute performance a été proposée par CLARKE et coll. (1984) (39).

Après rupture mécanique des trypanosomes, le lysat parasite est repris par une solution d'acide trifluoroacétique (TFA) à 0,1 % afin d'obtenir une concentration protéique de 1 à 5 mg/ml. Après agitation rapide et centrifugation 5 minutes à 12 500 g afin d'éliminer le matériel insoluble, le surnageant contenant les protéines solubles dans le TFA, est injecté sur une colonne RPSC ultrapore C3. L'élution est réalisée en gradient linéaire d'isopropanol 0 à 60 % en une heure. Les pics du profil d'élution obtenu sont testés en ELISA avec un immunosérum anti-CRD. Seul un pic majeur correspond à l'antigène variable dans les conditions retenues.

L'intérêt essentiel de cette technique était sa rapidité, une seule étape, et aussi la limitation des processus non contrôlés de protéolyse.

Conclure quant à un protocole permettant d'obtenir l'antigène variable dans des conditions à la fois optimales pour le rendement, le degré de pureté et l'intégrité de l'antigène est donc très difficile. Au cours des étapes de préparation, il peut se produire des phénomènes de protéolyse, de glycolyse ou de perte de conformité moléculaire qui peuvent être plus ou moins importants selon les protocoles et aussi selon les variants ou les espèces de trypanosome. Il nous paraît souhaitable de travailler dans des conditions qui évitent au

maximum la dégradation par enzyme de l'AVS : température de 4° C, utilisation d'inhibiteurs de protéases. L'élution totale de l'antigène des différents supports chromatographiques demeure aussi un problème majeur mais le point essentiel sera d'adapter un protocole qui autorise sans réserve les investigations entreprises. A titre d'exemple, il nous paraît difficile de retenir pour des études de conformité, d'antigénicité des protocoles de littérature ayant fait appel à des conditions dénaturantes.

B- Caractérisation

CROSS (1975) (16) fut parmi les premiers à isoler et analyser des AVS de T. b. brucei. Les molécules étaient quelque soit le variant, caractérisées par une taille moléculaire avoisinant 65 000 en gel de polyacrylamide en présence de SDS, avec de grandes variations en revanche au niveau de leurs points isoélectriques (valeurs comprises entre 5,8 et 8,3), de leurs compositions amino acides, et de leurs séquences amino acides N-terminales (BRIDGEN et coll. (1976) (29)), ou enfin de leurs copules glucidiques qui variaient dans leur quantité (7 à 17 % p/p) avec une définition qualitative toujours représentée par des résidus de mannose, galactose, et N-acétylglucosamine (JOHNSON et CROSS (1977) (134)).

AUFFRET et TURNER (1981) (7) ont montré par les techniques de chromatographie de gel filtration, et d'électrophorèse-SDS après traitement par des réactifs bifonctionnels, que certains antigènes de T. b. brucei existaient en solution sous forme de dimères et parfois même de plus grands oligomères.

C- Structure

1- L'axe peptidique

a) structure primaire

La connaissance de la structure peptidique des antigènes de T. b. brucei a bénéficié de l'apport présenté par l'étude de la séquence du DNA complémentaire de l'ARN messenger spécifique des antigènes. Plusieurs équipes se sont attachées à la détermination de la séquence nucléotidique de telles sondes. D'autres auteurs ont effectué une analyse de la structure peptidique par séquence amino-acide à partir de l'antigène isolé et purifié. L'ensemble des résultats a permis l'acquisition d'informations sur la structure peptidique de l'antigène ainsi que de son précurseur. Les premiers éléments essentiels mis en évidence correspondaient à la partie C-terminale des molécules.

1) Extension C-terminale hydrophobe

absente des glycoprotéines de surface isolées

Les premiers travaux dans ce domaine ont été publiés par le groupe de BOOTHROYD et coll. (1980) (19) sur l'AVS 117, dont la séquence amino acide avait été déterminée en particulier dans la région C-terminale. Les auteurs avaient alors identifié la séquence des 445 nucléotides de l'extrémité 3' de l'insertion plasmidique. En comparant ces derniers résultats avec l'analyse en séquence peptidique, ils ont montré que la glycoprotéine isolée était exempte de la séquence hydrophobe correspondant aux 23 derniers codons avant le codon stop du DNA.

BOOTHROYD et coll. (1981) (20) ont par la suite procédé à la détermination des séquences nucléotidiques codant pour l'extrémité C-terminale d'un autre AVS (221) appartenant au même stock cloné que l'AVS 117. Ils purent mettre en évidence à nouveau l'absence d'un "prolongement C-terminal hydrophobe" de 23 résidus dans la glycoprotéine isolée ; les 2 extensions se terminaient par les 3 mêmes résidus : Leu-Leu-Phe. 5 autres AVS ont par la suite été caractérisés dans cette même région (MAJUMDER et coll. (1981) (166) ; MATTHYSSENS et coll. (1981) (167) ; RICE-FICHT et coll. (1981) (216)). Il s'est dégagé que toutes ces zones C-terminales se terminaient par 8 résidus hydrophobes avec en position ultime 3 résidus Leu-Leu-Phe ou Leu-Leu-Leu. On pouvait cependant noter qu'elles se distinguaient en deux groupes suivant leur taille : 23 résidus pour les AVS 117, 118, IITat 1.3, AnTat 1.1, AnTat 1.8 ; 17 résidus pour les AVS 221 et IITat 1.1.

La fonction précise de cette extension ainsi que les conditions de son élimination dans le processus de maturation de l'AVS restent encore à élucider, nous reviendrons sur les hypothèses susceptibles d'être formulées dans ces deux domaines.

2) Acide aminé C-terminal des glycoprotéines isolées

Au delà de l'observation précédente l'étude menée par BOOTHROYD et coll. (1980) (19) a permis d'obtenir des informations très originales au sujet de l'acide aminé C-terminal de la glycoprotéine mature de l'AVS 117 ; A partir d'un glycopeptide tryptique C-terminal de l'AVS, il a été possible d'identifier dans un premier temps le résidu terminal à une asparagine ou à un acide aspartique, les conditions d'hydrolyse acide avant composition amino acide ne permettant pas de faire la distinction. La séquence nucléotidique

précisait bientôt que le codon responsable de ce résidu était celui d'un acide aspartique, amino acide inhabituel en tant que site porteur d'une chaîne glycanique. L'originalité résidait en effet dans le fait que cet amino acide C-terminal était porteur d'un glycanne non encore décrit à l'époque dans un autre modèle moléculaire.

L'étude était menée en parallèle sur d'autres AVS du même stock (55,60,118,121,221) (HOLDER et CROSS (1981) (118) ; BOOTHROYD et coll (1980) (19) (1981) (21) ; MAJUMDER et coll (1981) (166)).

Sur la base de l'ensemble de ces données et de celles fournies d'autre part par MATTHYSSENS et coll (1981) (167) et RICE-FICHT et coll (1981) (216), les AVS peuvent être classés en catégories suivant l'identité de l'acide aminé C-terminal (acide aspartique, asparagine, sérine) (Figure 8). Cette notion de trois groupes n'est peut-être pas définitive. La spécificité des AVS et le rôle qui leur est propre n'est pas connue.

3) Région C-terminale

L'existence d'une haute similarité de structure peptidique au niveau de la portion C-terminale a été premièrement suspectée par MAJUMDER et coll (1981) (166). Deux autres équipes l'ont ensuite plus largement cernée et décrite.

a) le groupe de MATTHYSSENS et coll (1981) (167) travaillant sur les AVS AnTat 1.1 et 1.8 (Figure 9)

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

Fait important, les auteurs ont mis en évidence la position quasi invariante des résidus de cystéine : ils ont trouvé en effet que le nombre d'acides aminés entre 2 résidus de cystéine consécutifs était conservé, sauf entre les positions 77 et 83 (Figure 9) où il existait un décalage de 2 résidus. Cette caractéristique suggèrait que cette partie de la molécule doive se plier à des exigences conformationnelles strictes, maintenues par plusieurs ponts disulfure.

AVS

AVS 117	Trp	Glu	Asn	Asn	Ala	Cys	Lys	Asp	*
AVS 121	Trp	Glu	Gly	Glu	Thr	Cys	Lys	Asp	*
IIATat 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	*
AVS 55				Asn	Thr	Thr	Gly	Ser	*
AVS 60				Asn	Thr	Thr	Gly	Ser	*
AVS 221	Gly	Asn	Thr	Asn	Thr	Thr	Gly	Ser	Ser
IIATat 1.1	Lys	Thr	Thr	Asn	Thr	Thr	Gly	Ser	*
TxTat 1	Lys	Thr	Ser	Asn	Thr	Thr	Ala	Ser	*
AVS 118	Pro	Asp	Lys	Glu	Lys	Cys	Arg	Asn	*

Répartition des AVS en fonction du résidu C-terminal
(D'après Borst et Cross (1982))

FIGURE 8

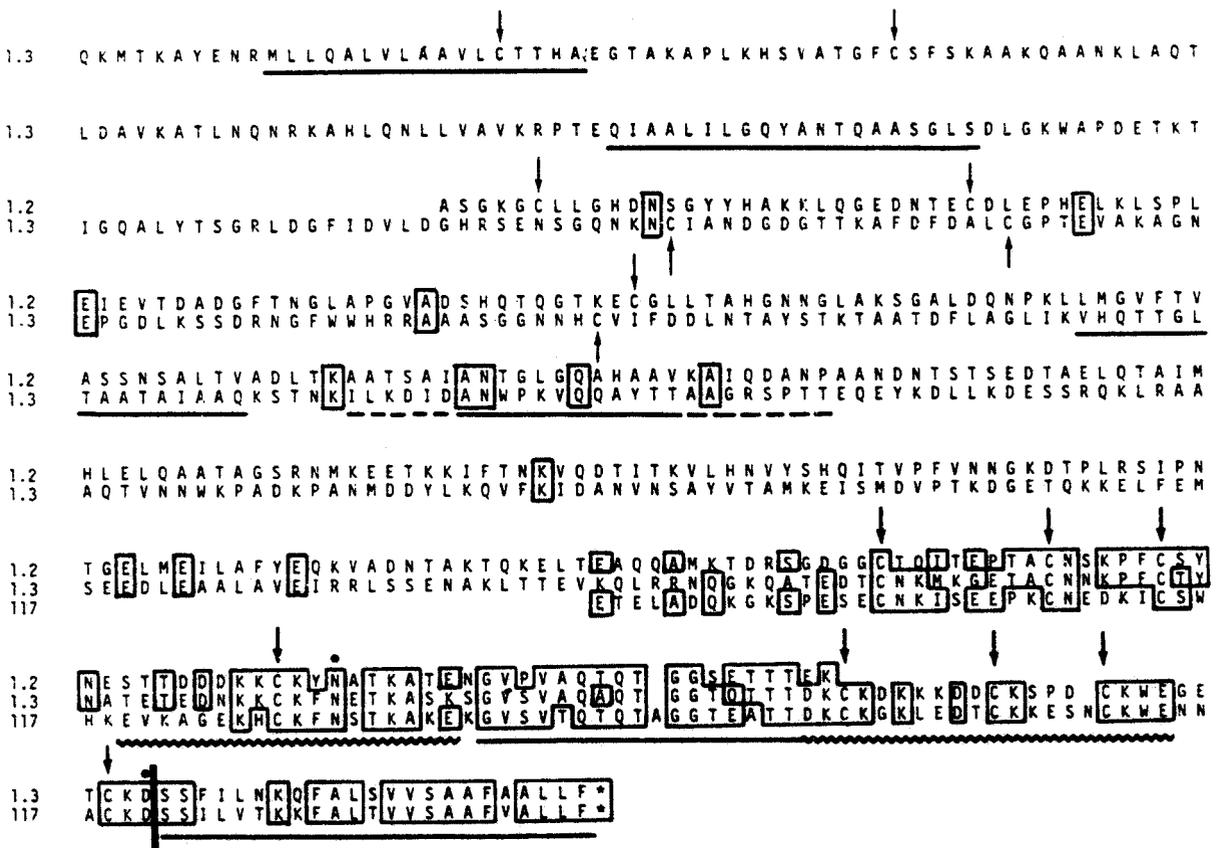


b) le groupe de RICE-FICHT et coll (1981) (216) sur les AVS IITat 1.2, IITat 1.3 et l'AVS 117 (Figure 10)

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

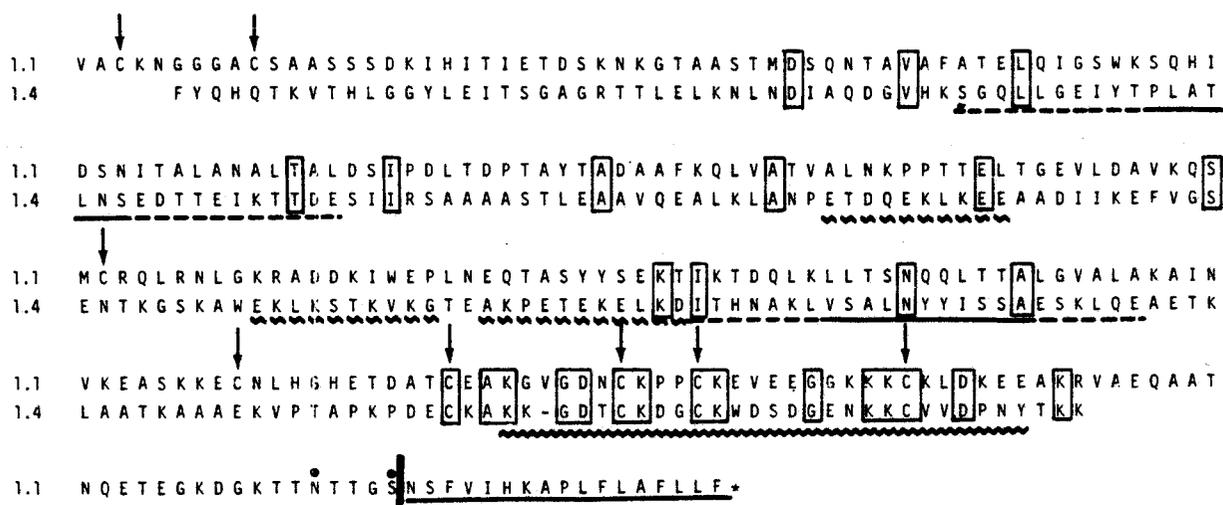
Toutefois, un autre AVS étudié (IITat 1.1) s'est montré plus éloigné dans sa définition par rapport à cette "famille" de variants. Avec l'AVS IITat (1.4), dont la séquence correspondant à cette région était partiellement déterminée, une deuxième "famille" semblait se dessiner (Figure 11). Les auteurs ont pu aligner en effet les séquences de DNA de telle sorte que parmi les 100 derniers nucléotides identifiés de l'AVS IITat 1.4, 56 étaient semblables à ceux de l'AVS IITat 1.1. En supposant que l'homologie se poursuive jusqu'au codon stop, elle concernerait alors 225 nucléotides. Dans cette "deuxième famille", seules les positions les plus C-terminales des 4 résidus de cystéine étaient conservées et retrouvées aussi dans une région très hydrophile. Il existait des résidus de cystéine supplémentaires dans la séquence de l'AVS IITat 1.1 non retrouvés dans celle de l'AVS IITat 1.4.

En conclusion, il se dégage de ces travaux l'existence d'une constance au niveau de la région C-terminale, témoignant de sa participation dans la conformation de la molécule à la surface du parasite, principalement imposée par des ponts disulfure. En plus, certains gènes, même issus de répertoires différents sont caractérisés par une similitude très accentuée au niveau de leurs 100 derniers codons environ. Il semble donc que les gènes se répartissent en plusieurs familles, dont les membres présentent au niveau du dernier quart de la molécule un degré élevé d'homologie. D'ailleurs, cette répartition s'accorde et donc renforce la classification précédemment évoquée (Figure 8) sur la base de la qualité de l'acide aminé C-terminal.



Séquences amino acides des AVS 117, H1at 1.2 et 1.3
 (D'après Rice Ficht et coll. (1981))

FIGURE 10



Comparaison des régions C-terminales des AVS IITat 1.1 et IITat 1.4
 (D'après Rice Ficht et coll. (1981))

FIGURE 11

4) Région N-terminale

Au niveau de l'extrémité N-terminale des antigènes matures, un certain degré d'homologie a pu être caractérisé par comparaison de séquences amino-acides N-terminales de différentes glycoprotéines isolées chez diverses espèces de trypanosome (Figure 12).

5) Séquence N-terminale "signal"

Les travaux de Mc CONNELL et coll. (1981) (168) et BOOTHROYD et coll. (1981) (20), (1982) (21) ont montré que les AVS étaient synthétisés comme le sont généralement les protéines de surface cellulaire et les protéines sécrétées (BLOBLEL et DOBBERSTEIN (1975) (18), c'est-à-dire sous forme d'un précurseur muni d'une extension N-terminale. Dans le cas de l'AVS, cette séquence "signal" est particulièrement longue (au moins 25 résidus).

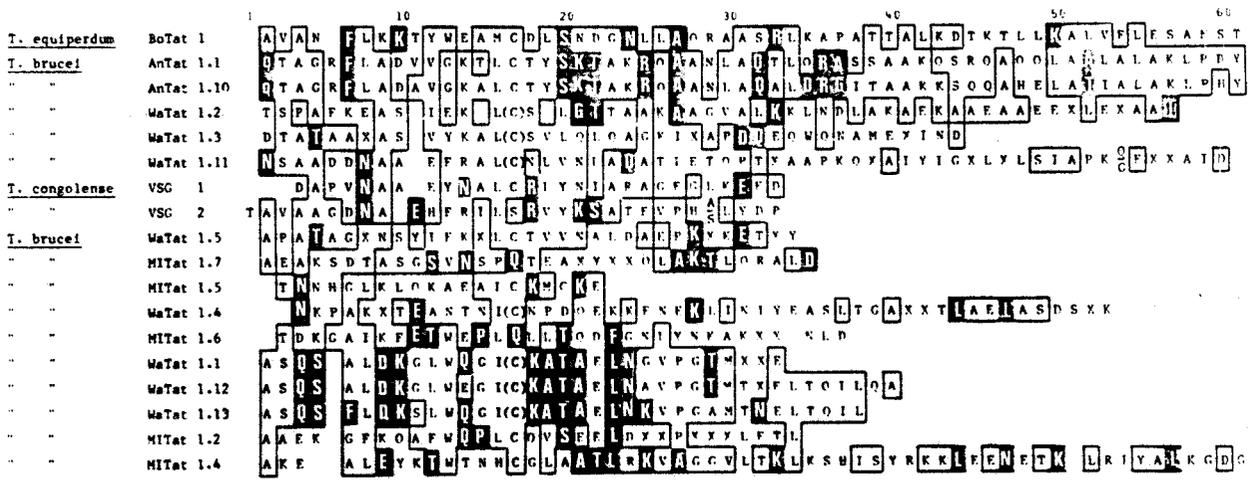
6) Etat actuel des connaissances sur la structure peptidique des AVS de T. b. brucei

Les séquences nucléotidiques ont été déterminées déjà pour toute une série de variants : variant 117 (BOOTHROYD et coll. (1982) (21)), AnTat 1.1 et 1.8 (MATTHYSSENS et coll. (1981) (167) ; MICHIELS et coll. (1983c) (176), PAYS et coll. (1983c) (200)), AnTat 1.10 (PAYS et coll. (1983c) (200)), IITat 1.1 (RICE FICHT et coll. (1981) (216), (1982) (217)), IITat 1.2 et 1.3 (RICE FICHT et coll. (1981) (216)), IITat 1.4 (RICE FICHT et coll. (1981) (216), DONELSON et coll. (1982) (61)), TxTat 5.28 (MERRIT et coll. (1983) (172)).

La structure primaire de l'AVS 117 a été aussi déterminée par séquence amino-acide (ALLEN et coll. (1982) (3)). ALLEN et GURNETT (1983) (4) ont également étudié la localisation des ponts disulfure dans la molécule.

Les traits caractéristiques de cet axe protéique sont les suivants :

- * une longueur de 470 amino-acides
- * la présence d'un segment (8-40) contenant 10 résidus basiques et aucun résidu acide.
- * la nature très hydrophile des 112 résidus C-terminaux, avec une richesse particulière en lysine (24 résidus) et en acide glutamique (17 résidus)
- * la présence de 8 résidus de demi cystine dans la région C-terminale, engagés entre eux dans la formation de deux groupes de ponts disulfure



Comparaison des régions N-terminales d'AVS issus de différentes espèces de trypanosomes
(D'après Olafson et coll. (1984))

FIGURE 12

respectivement de part et d'autre d'une chaîne glycanique (Figure 13). Parmi ces résidus, les cinq derniers sont suivis d'une lysine.

* l'existence de deux autres ponts disulfure dans la partie N-terminale, et d'un groupement thiol au centre de la molécule non impliqué dans un pont disulfure (Figure 13).

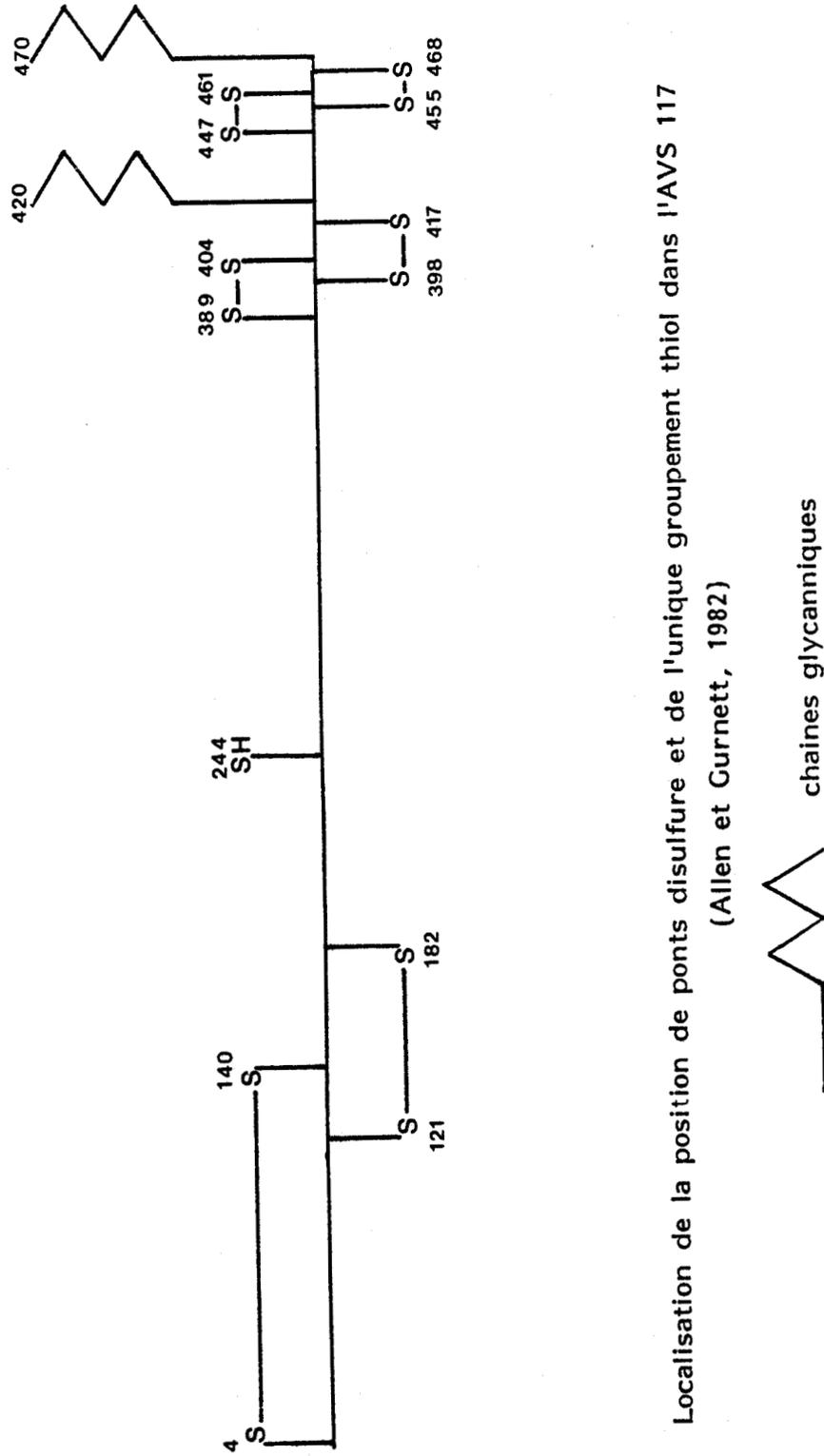
* l'absence de régions hydrophobes susceptibles d'association avec la double couche lipidique.

b) structure secondaire

Les résultats de séquences pour différents AVS ont été utilisés par LALOR et coll. (1984) (142) pour établir les prédictions de structure secondaire obtenues selon la méthode de GARNIER et coll. (1978) (84) et de ROBSON et PAIN (1974) (225). Les auteurs ont établi aussi que tous les AVS analysés (IITat 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, AnTat 1.1 et 1.8 et TxTat 5.28) possédaient un pourcentage élevé de conformité en hélice α , particulièrement au niveau de la région amino-terminale. De plus, au niveau des 100 amino acides C-terminaux, les homologies constatées étaient attendues en fonction de la conservation de la structure primaire. Dans la partie centrale enfin, la répartition de la structure hélicoïdale était très variable, diversité significative et en rapport pour les auteurs avec la notion d'une structure tertiaire différente.

Toujours dans le domaine de la prédiction conformationnelle, COHEN et coll. (1984) (43) ont montré pour 4 AVS (AVS 117, AnTat 1.1, IITat 1.1 et IITat 1.4) la présence dans la partie amino-terminale de séquences répétitives de 7 amino acides dans lesquelles le premier et le 4ème résidu étaient des résidus apolaires, une telle configuration permettant selon PARRY et coll. (1979) (187) ; (1982) (188) l'entrecroisement des hélices α pour former la structure super-enroulée décrite par CRICK (1953) (45) (Figure 14).

D'un point de vue expérimental, FREYMAN et coll. (1984) (79) ont réussi à cristalliser pour l'AVS MiTat 1.2 le dimère d'un fragment amino-terminal comprenant environ 300 résidus. L'analyse cristallographique a montré une conformation en faisceau d'hélice α : chaque monomère contenait 2 hélices α réunies, longues de 80 Å. Une telle structure était caractéristique selon les auteurs d'une structure hélicoïdale s'étendant environ sur 120 amino acides, et interrompue par une seule crevasse.



Localisation de la position de ponts disulfure et de l'unique groupement thiol dans l'AVS 117
(Allen et Gurnett, 1982)



FIGURE 13

Residu	a	b	c	d	e	f	g
AVS 117 (MITat 1.4)							
7 heptades		Cys	Gly	Leu	Ala	Ala	Thr
	Leu	Arg	Lys	Val	Ala	Gly	Gly
	Val	Leu	Thr	Lys	Leu	Lys	Ser
	His	Ile	Ser	Tyr	Arg	Lys	Lys
	Leu	Glu	Glu	Met	Glu	Thr	Lys
	Leu	Arg	Ile	Tyr	Ala	Leu	Lys
	Gly	Asp	Gly	Val	Gly	Glu	Gln (Lys Ser)
2½ heptades	Ala	Glu	Ile	Leu	Ala	Thr	Thr
	Ala	Ala	Leu	Met	Arg	Gln	Lys
	Ala	Leu	Thr	(Pro	Glu	Glu	Ala Asn)
3½ heptades	Leu	Lys	Thr	Ala	Leu	Lys	Ala
	Ala	Gly	Phe	Ala	Gly	Glu	Gly
	Ala	Ala	Ala	Val	Ser	Ser	Tyr
	Leu	Met	Thr	Leu	(Gly	Thr	Leu
	Thr	Thr	Ser	Gly	Ser	Ala	His Cys)
AnTat 1.1							
6 heptades		Cys	Thr	Tyr	Ser	Lys	Thr
	Ala	Lys	Arg	Gln	Ala	Ala	Asn
	Leu	Ala	Gln	Thr	Leu	Gln	Arg
	Ala	Ser	Ser	Ala	Ala	Lys	Gln
	Ser	Arg	Gln	Ala	Gln	Gln	Leu
	Ala	Ala	Leu	Ala	Leu	Ala	Lys
2 heptades	Leu	(Pro	Asp)				
	Tyr	Lys	Glu	Ala	Ala	Ala	Thr
5 heptades	Leu	Leu	Ile	Tyr	Ala	Thr	His (Lys)
	Ile	Gln	Asp	Ala	Gln	Ala	Ser
	Ile	Glu	Asn	Trp	Thr	Gly	Glu
	Asn	Thr	Lys	Leu	Val	Gly	Gln
	Ala	Met	Tyr	Ser	Ser	Gly	Arg
	Ile	Asp	Glu	Leu	Met	Leu	Leu
	Leu	Glu	(Gly	His	Arg	Glu	Asp
Gly	Ala	Asn	Gly	Gln	Asp	Lys Thr Cys)	



Représentation des heptades dans les AVS 117 et AnTat 1.1
(D'après Cohen et coll. (1984))

FIGURE 14

Les images en microscopie électronique à partir de l'antigène entier étaient en accord avec les résultats (COHEN et coll. (1984) (43)). La molécule apparaissait formée d'un grand domaine allongé (100 Å X 70 Å) muni d'une queue fibreuse. Un autre AVS examiné (DiTat 1.3) s'est montré d'une configuration légèrement différente et constitué de 3 parties : une région globulaire (60 Å de diamètre), une queue (100 Å de long et 30 Å d'épaisseur) et une région globulaire plus petite.

2- Copules glycaniques

a) Composition

Les premières compositions glucidiques réalisées sur les AVS de T. b. brucei (JOHNSON et CROSS (1977) (134)) ont montré de grandes différences d'un antigène à l'autre sur le plan quantitatif (7 à 17 % p/p) mais une distribution qualitative constante composée de mannose, galactose et N-acétylglucosamine. L'absence d'acide sialique a été établie. HOLDER et CROSS (1981) (118) ont isolé les glycopeptides tryptiques de 5 variants antigéniques et ont montré qu'ils se répartissent en 2 groupes :

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

* Un deuxième groupe dit "C-terminal" comprenant dans tous les cas un oligosaccharide branché sur l'acide aminé en position C-terminale et lorsque ce dernier est un résidu de sérine un oligosaccharide subterminal lié à un résidu d'asparagine. Ici encore, les éléments osidiques sont composés de mannose, de galactose, de N-acétylglucosamine et de glucosamine : la présence d'un résidu de glucosamine non acétylé a en effet été démontrée au niveau de l'oligosaccharide C-terminal (STRANG et coll. (1986) (247)).

Pour certains AVS se terminant par un résidu de sérine, il existe plusieurs glycopeptides tryptiques identiques en composition et séquence amino-acide mais très différents en composition glucidique : par exemple, 4 glycopeptides ont été caractérisés pour MiTat 1.7 et 2 pour MiTat 1.1 (Figure

15). D'ailleurs, les préparations d'antigènes natifs correspondant à ces variants donnaient un profil hétérogène en électrophorèse en présence de SDS. Cette dispersion était probablement en relation avec l'hétérogénéité de composition glucidique.

HOLDER (1983a) (119) a isolé et identifié, pour les variants MiTat 1.7 et MiTat 1.6, les acides aminés glycosylés C-terminaux. Dans chaque cas, l'auteur a montré que l'oligosaccharide était attaché au niveau du résidu C-terminal (sérine ou acide aspartique) par l'intermédiaire d'une éthanolamine branchée au niveau de la fonction α -carboxylique par une liaison amide.

Chez T. congolense, le pourcentage glucidique est élevé, près de 15% (SAVAGE et coll. (1984) (237)). A la différence de T. b. brucei, cette espèce contient des résidus d'acide sialique qui sont en partie responsables d'une microhétérogénéité de charge observée en isoélectrofocalisation (RAUTENBERG et coll. (1981) (210)). Des études structurales ont démontré la présence d'oligosaccharides oligomannosidiques comprenant entre 5 et 9 résidus de mannose et également d'oligosaccharides biantennés de type N-acétyl-lactosaminique (SAVAGE et coll. (1984) (237)). Les auteurs ont aussi observé que seulement 30% de l'acide sialique peut être libéré par la neuraminidase.

b) Glycosylation des molécules d'AVS

STRICKLER et PATTON (1980) (249) ont analysé l'effet de la tunicamycine sur la glycosylation des AVS de T. b. brucei. Leur travail a consisté à mesurer l'incorporation de mannose radioactif au niveau de variants cultivés en présence de l'antibiotique. Dans leurs conditions expérimentales retenues la tunicamycine inhibe totalemment l'incorporation du mannose au niveau de l'AVS, ce qui permet de déduire que le monosaccharide faisait partie d'un glycanne branché par une liaison de type N-osidique. L'absence de cette glycosylation se traduit en électrophorèse-SDS par une diminution de la taille moléculaire apparente de 58 000 à 55 000.

ROVIS et DUBE (1981) (220) ont comparé l'action de la tunicamycine avec la réactivité immunologique croisée des AVS. Ils ont abouti à des résultats en accord avec ceux obtenus par HOLDER et CROSS (1981) (118), à savoir la distinction de deux types de chaînes oligosaccharidiques :

Peptide	Asx	Thr	Ser	Glx	Gly	Ala	GlcN	Man	Gal
55 B	1.00 (1)	3.55 (4)	1.08 (1)	2.07 (2)	1.94 (2)	1.00 (1)	13.05	2.1	9.2
55 C	1.00 (1)	3.52 (4)	0.89 (1)	2.01 (2)	1.74 (2)	1.07 (1)	9.44	2.2	6.9
55 D	1.00 (1)	3.13 (4)	0.85 (1)	1.96 (2)	1.83 (2)	1.15 (1)	3.55	4.4	3.5
55 E	0.90 (1)	3.42 (4)	0.91 (1)	2.02 (2)	1.76 (2)	1.05 (1)	1.21	1.7	8.0
60 A	1.15 (1)	1.66 (2)	0.72 (1)	0.60	1.10 (1)	1.0 (1)	4.55	4.4	5.4
60 C	1.01 (1)	1.78 (2)	1.04 (1)	-	0.99 (1)	0.95 (1)	1.21	2.2	8.2

Hétérogénéité des copules glucidiques des glycopeptides C-terminaux des variants
 MiTat 1.7 (55) et MiTat 1.1 (60)
 (D'après Holder et Cross (1981))



FIGURE 15

- un premier type dont la biosynthèse est totalement inhibée par la tunicamycine, et dont le transfert sur l'axe peptidique se produit de façon concomittante avec la synthèse protéique.

- un second type impliqué dans la structure du déterminant antigénique commun, qui n'a aucune influence sur la taille moléculaire apparente de l'AVS, et dont le transfert s'effectue après la traduction.

En dehors de ces observations, ROVIS et DUBE (1981) (230) ont apporté d'autres éléments :

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

. L'effet de l'antibiotique se traduit par une diminution de la quantité d'AVS pouvant être détectée par immunoprécipitation, ce fait étant rapproché par les auteurs d'un phénomène de protéolyse du manteau du fait de l'absence des glycanes de surface.

Enfin, en présence de tunicamycine les AVS testés pour leur potentiel d'inhiber une immunoprécipitation hétérologue ont montré des capacités d'inhibition très variables allant de 0 à 63 %. Ces résultats indiqueraient que le déterminant antigénique commun pourrait englober en partie les glycanes N-liés. Cette hypothèse est à rapprocher de la présence possible près du résidu C-terminal d'un site asparaginique de glycosylation comme l'ont démontrés HOLDER et CROSS (1981) (118) pour certains AVS de T. b. brucei (groupe des AVS possédant un résidu de sérine C-terminal).

D'autres points comparables peuvent être soulignés : la tunicamycine bloque l'addition de sucres sur les résidus d'asparagine internes sans inhiber la glycosylation C-terminale (FERGUSON et OVERATH (revu par BORST et CROSS (1982) (25)) .

La tunicamycine a aussi permis de montrer que les oligosaccharides liés N-glycosidiquement sont indispensables pour la formation de dimères d'AVS visualisés sur gel de polyacrylamide SDS après action d'un réactif bifonctionnel (dithiobis-succinimidyl propionate) (STRICKLER et PATTON (1982) (250)).

La tunicamycine possède une influence sur l'hétérogénéité décrite en gel de polyacrylamide SDS pour les AVS des variants MiTat 1.7 et IITat 1.21 (Mc CONNEL et coll. (1983) (169)). Des expériences de chasse comparativement en absence et présence de tunicamycine ont été envisagées. Le temps nécessaire pour la synthèse et l'expression d'une molécule d'antigène ayant été déterminé comme proche de 40 minutes, des prélèvements ont été réalisés à des temps de 10, 30, 45 et 60 minutes.

L'AVS IITat 1.21 se présente en électrophorèse en milieu SDS d'emblée sous forme de deux bandes qui sont ensuite modifiées de la même façon par l'addition d'autres sucres. En présence de tunicamycine, il n'existe qu'une seule bande de taille moléculaire inférieure. En conclusion pour cet AVS, l'hétérogénéité est créée au départ par l'addition, soit de un soit de deux branchements qui subissent ensuite un processus analogue de modification.

L'AVS MiTat 1.7 apparaît dès 10 minutes sous forme d'un doublet de bandes avec ou sans tunicamycine. Ce doublet est d'une taille plus petite en présence de l'antibiotique. Ensuite, en l'absence de tunicamycine, le doublet apparaît modifié selon des façons différentes pour donner finalement les formes multiples de l'antigène. Les auteurs ont suggéré un phénomène de processing tel que par exemple l'absence ou la présence de la queue hydrophobe. En conclusion, l'on peut observer une hétérogénéité moléculaire affectant soit le nombre de branchements soit la longueur des chaînes. L'exemple de l'AVS MiTat 1.7 montre que d'autres facteurs peuvent aussi intervenir.

Un autre variant (IITat 1.2) se caractérise par une population hétérogène d'AVS contenant soit une soit deux chaînes oligosaccharidiques (PRESPER et HEATH (1986) (207)). Dans ce cas précis, les branchements possibles étaient localisés au niveau de résidus d'asparagine en position 46 et 443 de la chaîne polypeptidique de 447 amino acides terminée par un résidu de sérine.

Chez U. congolense, la tunicamycine empêche complètement l'incorporation de sucres (REINWALD et coll. (1984) (213)) et rend la molécule beaucoup plus sensible à la protéolyse (REINWALD (1985) (214)).

III- ISOLEMENT ET CARACTERISATION DE LA FORME MEMBRANAIRE DE L'ANTIGENE VARIABLE

A- Isolement

Plusieurs protocoles d'isolement de la forme "membranaire" ont été publiés avec différents variants antigéniques de T. b. brucei.

Le premier protocole permettant d'isoler cette forme complexe a été proposé par CARDOSO DE ALMEIDA et TURNER (1983) (34). La forme membranaire était obtenue par ébullition d'une suspension de trypanosomes en tampon phosphate salin contenant 2 % de SDS. Après refroidissement, le détergent Triton X-100 était ajouté au lysat à la concentration finale de 2 %.

La forme obtenue, analysée en électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS, avait une masse moléculaire apparente inférieure d'environ 800 à 2000 par rapport à celle observée pour la forme soluble de l'antigène obtenue de façon classique selon le protocole de purification de CROSS (1975) (46).

Cette préparation d'AVS s'est confirmée être biochimiquement et immunologiquement différente de la forme soluble et répond à une forme dite membranaire (mf AVS).

Les auteurs ont montré que dans la libération de la glycoprotéine de surface, un processus enzymatique pouvait être impliqué : la forme membranaire, par incubation à 23° C avec un lysat parasite peut être convertie en forme soluble. Cette transformation est dépendante de la température, n'a pas lieu à 100° C, et peut être inhibée par ébullition en présence de détergents.

VOORHEIS et coll. (1982) (266) ont montré que la libération du manteau de surface était inhibée en présence de Zinc. CARDOSO de ALMEIDA et TURNER (1983) (34) ont confirmé l'absence de conversion de la forme membranaire en forme soluble dans un lysat parasite enrichi en zinc (10 mM). Cependant, le zinc utilisé à forte concentration ne s'est pas révélé un inhibiteur spécifique de l'enzyme responsable de la conversion.

L'incubation de la forme membranaire purifiée avec un lysat parasitaire provenant de clones hétérologues, fournissait les mêmes résultats suggérant donc l'existence d'un substrat enzymatique présentant une structure commune pour toutes les formes membranaires.

D'autres détergents ont été utilisés dans les protocoles d'isolement de la forme membranaire. FERGUSON et CROSS (1984) (68) ont testé le déoxycholate de sodium. Les cellules sont lavées en tampon Hepes salin de pH 7.4 puis rapidement transférées dans une solution à ébullition de déoxycholate de sodium à 1 % (p/v) enrichie en antiprotéase (TLCK 0,1 mM). Après 5 minutes la suspension est refroidie à 0° C, transférée dans une solution de NaCl 0,125 M, et centrifugée à 100 000 g pendant 40 minutes. Le surnageant résultant est purifié par chromatographie d'affinité sur colonne de concanavoline A-Sépharose préalablement prétraitée par une solution de bicarbonate d'ammonium 20 mM contenant 0.3 % de Nonidet NP-40. Les fractions retenues sur la colonne sont éluées par le tampon d'équilibre enrichi en urée 8 M. L'AVS sous forme membranaire est alors obtenu par précipitation à l'éthanol.

JACKSON et coll. (1985) (131) ont proposé une méthode rapide et quantitativement performante. La suspension de formes sanguicoles de T. b. brucei est soumise à une précipitation par l'acide trichloroacétique à 10 % à 0° C. Après centrifugation pendant 1 nuit à 5° C, le culot remis en suspension dans l'eau est extrait par 20 volumes d'une solution organique de chloroforme-méthanol (2/1, V/V). Une séparation en phases est possible par addition d'une solution de NaCl à 0,9 %. Après centrifugation à 12 000 g pendant 1 heure, la phase aqueuse contient 90 % de forme membranaire.

Les auteurs pensent que le traitement des cellules par l'acide trichloroacétique inactive complètement l'enzyme responsable "in vivo" du processus de libération du manteau et empêche la protonation de plusieurs groupes fonctionnels de l'AVS et le dépliement de la structure tertiaire et/ou secondaire de la molécule, facilitant ainsi sa solubilité dans le mélange organique.

GURNETT et coll. (1986) (99) ont purifié la forme membranaire des variants Mitat 1.6 et MiTat 1.2 de T. brucei par lyse des parasites en tampon phosphate salin (PBS) en présence d'acide para-mercuriphenylsulfonique (pCMPSA) inhibiteur de thiol-protéase, en concentration de 10 mM pendant 30 minutes à 4° C. L'étape lytique est effectuée par 3 cycles de congélation - décongélation successifs. La suspension est centrifugée à 100 000 g pendant 1 heure. Le culot 100 000 g est repris dans un tampon Hepes enrichi en antiprotéases (TLCK 1 mM, PMSF 0,1 mM) contenant 1 % de n-octylglucopyranoside (nOG). Après une nouvelle centrifugation, le surnageant contient la forme membranaire purifiée identifiable à celle obtenue par JACKSON et coll. (1985) (131).

GRAB et coll. (1984) (87) ont comparé l'activité de divers détergents. Les trypanosomes sont isolés par centrifugation en gradient de Percoll. L'antigène est solubilisé en tampon hepes 20 mM de pH 7,4, à 5° C enrichi en antiprotéases (PMSF 1 mM, TLCK 1 mM) et contenant 1 % de NP-40. La purification de l'antigène s'effectue ensuite par centrifugation en gradient de sucrose 15 % - 40 % à 60 000 rpm pendant 16 heures à 5° C. La constante de sédimentation de la fraction purifiée obtenue par le traitement au NP-40 est d'environ 5 S. Cette fraction contient le site antigénique de réaction croisée (CRD) et ne correspond pas à une protéine membranaire.

Dans des conditions analogues l'utilisation du zwittergent TM 3-14, permet en plus de la fraction précédente de caractériser plusieurs fractions de constante de sédimentation supérieure à 5 S et ne contenant pas le CRD. Cette absence de CRD dans les fractions de constante de sédimentation supérieure à 5 S suggèrait que le déterminant était masqué par formation de polymères ou encore que ces fractions représentaient la forme membranaire précédemment décrite par CARDOSO de ALMEIDA et TURNER (1983) (34). Il faut souligner que le zwittergent utilisé n'induisait en aucune façon la formation d'agrégats de l'antigène soluble.

CLARKE et coll. (1985) (40) ont décrit un autre protocole de purification de la forme membranaire. Après obtention des trypanosomes selon la méthode classique par DEAE-cellulose (LANHAM (1970) (143)), les parasites sont solubilisés dans une solution d'acide trifluoroacétique (TFA) à 0,1 %. La purification du matériel libéré par cet acide s'effectue par chromatographie HPLC dans les mêmes conditions que celles décrites pour la purification de la forme soluble (CLARKE et coll. (1984) (39)). Le pic majeur élué en 40 minutes

est identifiable en électrophorèse à la fraction provenant d'un lysat total. Les auteurs considèrent que la solubilisation de l'antigène dans le TFA à 0,1 % est plus efficace que les détergents neutres ou zwitterioniques classiquement utilisés pour déstabiliser des membranes lipidiques et solubiliser des constituants membranaires, ce traitement par le TFA permettant d'éviter le phénomène d'hydrolyse spontanée de l'AVS.

Ce dernier protocole a été modifié par HAMBREY et coll. (1986) (106) afin d'obtenir une fraction, correspondant à la forme membranaire, directement applicable en chromatographie HPLC.

Les parasites sont traités par un mélange acétonitrile à 20 % - acide trifluoroacétique à 0,1 %. L'extrait obtenu est déposé sur la colonne en phase inverse et l'élution est réalisée par un gradient d'acétonitrile. Le pic majeur exclu correspond à la forme membranaire de l'antigène dont la taille moléculaire en électrophorèse est estimée à 66 000. Ces résultats sont éloignés de ceux obtenus par FERGUSON et CROSS (1984) (68) et CARDOSO DE ALMEIDA et TURNER (1983) (34).

De cet ensemble de méthodes, nous soulignerons la difficulté d'analyser les résultats de manière comparative quant à l'efficacité des protocoles proposés et aussi à la qualité des formes moléculaires obtenues. Ceci relève essentiellement à nos yeux de l'impossibilité d'extrapoler les résultats d'un variant à un autre variant, l'hétérogénéité cellulaire d'une population de parasites ne pouvant non plus être totalement éliminée.

B- Structure

La forme membranaire de l'antigène variable est une entité complexe de nature "glycophospholipidique" qui, à la différence de la forme soluble, possède encore selon sa définition son site d'ancrage dans la double couche lipidique de la membrane plasmique parasitaire.

Différents éléments de structure ont déjà été établis et permettent une approche dans la complexité de cette entité.

La présence de phosphore (BALTZ et coll. (1982) (9)), de glycérol et d'acides gras (DUVILLIER et coll. (1983) (63)) a été mise en évidence pour plusieurs antigènes de T. equiperdum suggérant l'existence d'une copule glycérphospholipidique.

CARDOSO DE ALMEIDA et TURNER (1983) (34) ont montré que la différence entre forme membranaire et forme soluble était localisée au niveau du peptide C-terminal possédant le site antigénique commun (CRD).

FERGUSON et CROSS (1984) (68) à partir des formes membranaires du variant MiTat 1.4 ont montré la présence d'un acide gras caractéristique de cette forme moléculaire de l'AVS : l'acide myristique, dont la labilité en présence de soude 0.05 M dans l'éthanol à 23° C indiquait sa participation à la structure phosphoglycérolipidique par l'intermédiaire d'une liaison ester. L'analyse chimique comparative (FERGUSON et coll. (1985) (69)) du peptide pronasique myristylé issu de la forme membranaire et du glycopeptide C-terminal issu de la forme soluble, permettait aussi de localiser le site d'acylation au niveau de la structure oligosaccharidique C-terminale. Un traitement à 105° C par un mélange d'acide acétique anhydre et anhydride acétique (3/2) du peptide myristilé a libéré un composant de comportement chromatographique identique à celui du 1, 2-dimyristyl-3-acétylglycérol témoin.

Cette structure était sensible aux phospholipases :

La phospholipase A₂ libérait 50 % d'acide myristique et la phospholipase C libérait 100 % de 1,2-dimyristyl diglycéride, ce qui témoignait de la présence d'une liaison phosphodiester, et d'autre part de l'existence de l'énantiomère sn 1,2-dimyristyl glycérol. La lipase pancréatique et la phospholipase D se sont révélées inactives.

Ainsi, lors de la conversion de la forme membranaire, l'enzyme endogène permettant la libération de l'antigène soluble avait une activité de type phospholipase C libérant le 1,2-dimyristyl glycérol à partir de la structure native complète.

FERGUSON et coll. (1985b) (70) se sont attachés à déterminer la structure du glycolipide de C-terminal. Plusieurs points sont établis :

La désamination par l'acide nitreux du glycopeptide C-terminal issu de la forme soluble convertit l'unique résidu de glucosamine en 2,5-anhydromannose. Cette conversion (HORTON et PHILIPS (1973) (121)) implique aussi, si le résidu de glucosamine est intégré dans une structure oligosaccharidique, un clivage au niveau de cette osamine (HORTON et PHILIPS (1973) (121) ; WILLIAMS (1978) (268)) et la libération du mono- ou du polysaccharide de voisinage. Aucune

libération n'ayant pu être mise en évidence, la seule possibilité était de situer l'osamine à l'extrémité réductrice du glycanne.

Pour préciser si le groupement hydroxyle en C1 du résidu de glucosamine était libre ou engagé avec un constituant autre qu'un sucre, les auteurs ont effectué une réduction du glycopeptide C-terminal par le borohydrure tritié suivie d'une hydrolyse acide et d'une recherche de glucosaminitol marqué. L'absence de glucosaminitol marqué a révélé que le groupement hydroxyle en C1 de la glucosamine était engagé dans une liaison impliquant vraisemblablement, directement ou indirectement, le dimyristyl glycérol.

Pour déterminer si les lipides étaient liés par l'intermédiaire de la glucosamine à la structure C-terminale, les auteurs ont appliqué la désamination par l'acide nitreux à la forme membranaire marquée avec de l'acide 9, 10 ³H myristique.

Le traitement a libéré un composant dont le comportement chromatographique sur couche mince était identique à celui du phosphatidylinositol.

En conséquence, le 1,2-dimyristyl glycérol fait partie d'un phosphatidyl inositol substituant à la glucosamine. Une dernière confirmation a été apportée par l'incubation de la forme membranaire avec une phospholipase spécifique du phosphatidylinositol qui a permis la libération attendue de 1,2 dimyristylglycérol.

Avec ces éléments de structure et sachant que la phospholipase C du trypanosome libère du dimyristyl glycérol, il était possible de prévoir la présence d'un inositol monophosphate dans la forme soluble de l'antigène.

Après hydrolyse acide du glycopeptide C-terminal, l'analyse en chromatographie en phase gazeuse a révélé la présence d'un pic majeur dont le temps de rétention était identique à celui du triméthylsilyl myo-inositol. Pour établir l'état de phosphorylation du myo-inositol, le glycopeptide a été soumis à une hydrolyse par la phosphatase alcaline dans des conditions où des standards de myo-inositol 1 et 2 phosphate étaient hydrolysés quantitativement. Les résultats de chromatographie sur DEAE-cellulose suggéraient que le glycopeptide n'avait pas été modifié. Un échantillon de glycopeptide traité fut soumis à une désamination par l'acide nitreux puis à une réduction. L'analyse en chromatographie en phase gazeuse a montré que la désamination a libéré le

myo-inositol 1 phosphate et non le myo-inositol libre. La résistance du glycopeptide à la phosphatase alcaline suggérait aussi que le groupement phosphate était présent à l'origine sous une forme autre que monoester. Les auteurs ont alors proposé l'hypothèse d'un myo-inositol 1,2-monophosphate cyclique. L'hypothèse semblait être confirmée par la sensibilité du groupement phosphate à la phosphatase alcaline après une courte hydrolyse acide favorisant la formation de myo-inositol monophosphate à partir de la forme phosphate 1,2 cyclique.

Une schématisation de la structure C-terminale de la forme membranaire de l'antigène a été proposée par LOW et coll. (1986) (161) (Figure 16).

Les études de biosynthèse avec des précurseurs radioactifs suggéraient que cette structure particulière formée par l'association complexe éthanolamine glycosyl-dimyristyl phosphatidylinositol serait transférée "en bloc" en moins d'une minute après l'achèvement du polypeptide (FERGUSON et coll. (1986) (71)).

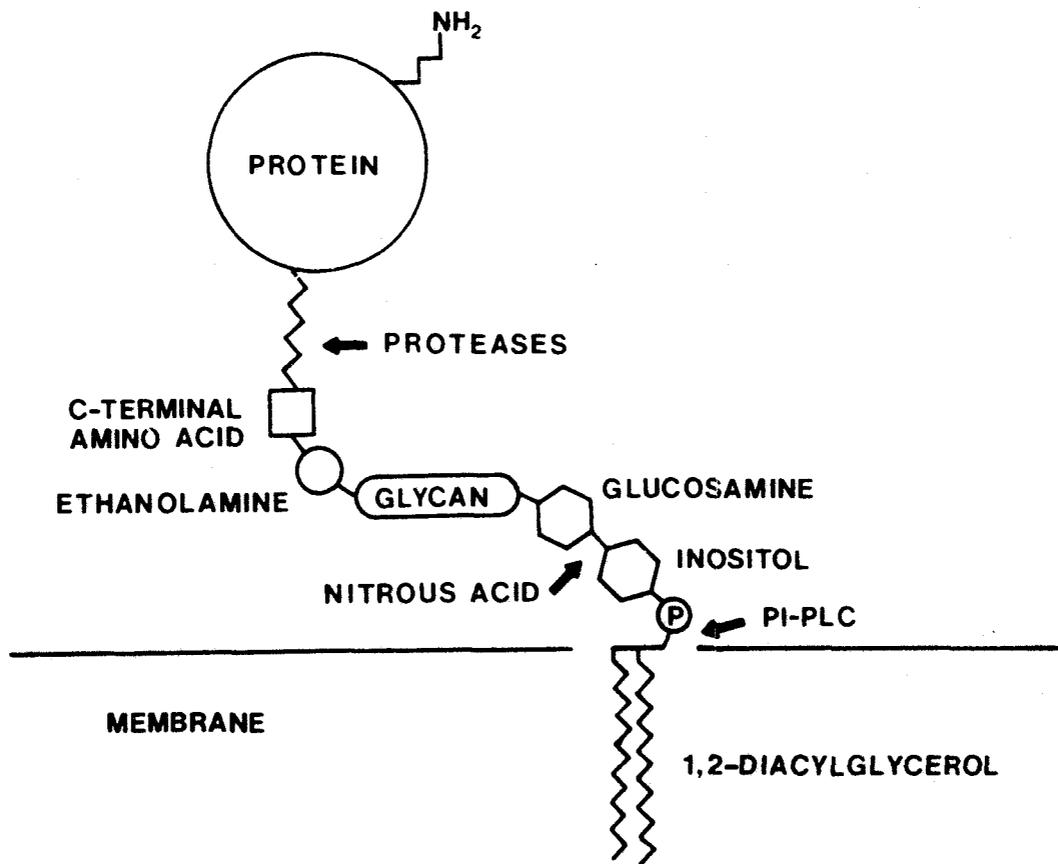
C- Relation avec le métabolisme des lipides dans le trypanosome

Les analyses comparatives de composition lipidique sur les formes allongées ou massives ont signalé une élévation relative de phosphatidylinositol dans la forme allongée et de cholestérol dans la forme massive des trypanosomes (VENKATESAN et ORMEROD) (1976) (263). Dans les formes allongées, l'augmentation de phosphatidylinositol s'explique par une activité expressive intense de l'antigène de surface. Dans les formes massives, les esters de cholestérol s'accumulent en raison de l'inhibition des processus métaboliques. Le contenu lipidique global est aussi supérieur dans la forme massive (30 mg/g) par rapport à celui de la forme allongée (17,5 mg/g).

D- Comparaison avec d'autres modèles membranaires

1- Exemple d'acylation

* D'autres protéines membranaires sont libérées spécifiquement par une phospholipase C purifiée spécifique du phosphatidylinositol :



Schématisation de la structure C-terminale de l'AVS MiTat 1.4 (117)
(D'après Low et coll. (1986))

FIGURE 16

La phosphatase alcaline (LOW et FINEAN (1978) (159)), l'acétylcholinestérase (LOW et FINEAN (1977) (158), FUTERMAN et coll. (1983) (80), (1985) (81)), la 5' nucléotidase (LOW et FINEAN (1978) (159) ; SHUKLA et coll. (1980) ()), la glycoprotéine Thy-1 de thymocytes de rats (LOW et KINCADE (1985) (160)). Les données connues de ce groupe de protéines membranaires sont résumées dans le tableau 1. La zone d'ancrage pour la glycoprotéine thy-1 contient les éléments suivants : éthanolamine, glucosamine, mannose, phosphore, myo-inositol, glycérol, acide stéarique (TSE et coll. (1985) (254)).

L'acétylcholinestérase de Torpedo California libère un diacyl glycérol après action d'une phospholipase spécifique du phosphatidyl inositol (FUTERMAN et coll. (1985) (81)). Pour l'acétylcholinestérase d'érythrocyte humain la présence de glucosamine, d'éthanolamine et d'acides gras a été montrée (ROBERTS et ROSENBERRY (1985) (224)). Toutefois, seule une petite proportion de l'enzyme est libérée par la phospholipase C spécifique du phosphatidylinositol (LOW et FINEAN (1977) (158), FUTERMAN et coll. (1985b) (82)). Cette différence serait due à une spécificité sélective de la lipase vis-à-vis de la longueur des acides gras impliqués dans le glycolipide.

* Des antigènes membranaires de structure complexe ont aussi été découverts récemment chez d'autres parasites.

L'on a décrit chez Leishmania major (HANDMAN et coll. (1984) (107), HANDMAN et GODING (1985) (108)) un conjugué membranaire de nature amphiphile qui est aussi libéré dans le milieu de culture in vitro sous une forme hydrophile. Ce glycoconjugué se présentait en gel de polyacrylamide-SDS comme un ensemble polydispersé de bandes s'étendant entre les tailles moléculaires 20 000 et 67 000. Une telle hétérogénéité en gel-SDS a déjà été décrite par exemple pour un lipopolysaccharide bactérien (TSAI et FRASCH) (1982) (253)) et aussi pour un glycoconjugué de Leishmania donovani (TURCO et coll. (1984) (255)).

Les expériences d'incorporation de molécules marquées par des formes promastigotes de culture ont permis de mettre en évidence la présence de glucose, galactose, phosphate, sulfate et acide palmitique, ce dernier n'étant pas retrouvé dans la forme extracellulaire. Il a également été suggéré que la nature amphiphile de la forme cellulaire était due à la présence d'un lipide lié de façon covalente et l'action d'une phospholipase endogène a été soulevée. Le glycoconjugué représente pour l'espèce le récepteur parasite pour les

	Phosphatase alcaline	Acétyl cholinesterase	5'- nucléotidase	AVS	Thy-1
. Taille moléculaire apparente (Kda)	70	65	70	57	18
. Libération des membranes par la phospholipase C de <i>S. aureus</i> spécifique du phosphatidylinositol	+	+	+	-	+
. Libération des membranes par une phospholipase C endogène spécifique du phosphatidylinositol	-	?	?	+	?
. Domaine hydrophobe C-terminal responsable de l'attachement membranaire	+	+	?	+	+
. Séquence amino acide C-terminale hydrophobe déduite de la séquence cDNA	?	?	?	+	+
. Composition du domaine hydrophobe C-terminal					
(a) absence d'amino-acides hydrophobes	?	+	?	+	+
(b) éthanolamine	?	+	?	+	
(c) glucosamine	?	+	?	+	
(d) autres sucres	?	?	?	+	+
(e) phosphatidylinositol/inositol	?	+	?	+	+
(f) acides gras	?	+	?	+	



Données actuelles sur les structures C-terminales proches de celle de l'AVS

TABEAU 1

macrophages et serait donc la molécule directement impliquée dans l'initiation de l'infection.

D'autre part, l'on a aussi décrit chez Leishmania major, une glycoprotéine membranaire amphiphile, de taille moléculaire 63 000 contenant de l'acide myristique (BOUVIER et coll. (1985) (27)). A l'issue du protocole de purification comprenant une solubilisation en présence d'un détergent non ionique (Triton X 114), une molécule hydrophile est encore retrouvée.

Chez plasmodium falciparum du dialcylglycérol a été trouvé dans une protéine de surface (HALDAR et coll. (1985) (105)).

* Enfin, l'on a également décrit pour une glycoprotéine virale (SCHMIDT et coll. (1979) (238)) l'acylation par plusieurs acides gras (C16 : 0; C18 : 1 et C18 : 2) selon un rapport molaire compris entre 1 et 2.

2- Exemples de liaison covalente entre le lipide et le groupement amino-terminal de la protéine :

La sous-unité B de la calcineurine (AITKEN et coll. (1984) (2)) ainsi qu'une protéine virale (HENDERSON et coll. (1983) (111)) sont bloquées en N-terminal par de l'acide myristique ; les molécules lipoprotéiques complexées au peptidoglycane au niveau de la membrane externe d'E. coli sont liées en position N-terminale à plusieurs acides gras dont essentiellement l'acide palmitique (HANTKE et BROWN (1973) (109)).

CHAPITRE II



TRAVAUX PERSONNELS

Chapitre II : TRAVAUX PERSONNELS

I- ISOLEMENT, PURIFICATION ET CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE DES ANTIGENES VARIABLES

A- Introduction

Notre première approche biochimique a été réalisée sur le modèle T. equiperdum, agent pathogène du cheval. La souche princeps de T. equiperdum à la base de cette étude a été fournie en 1961 au laboratoire d'Immunologie Parasitaire de Bordeaux par l'Institut Pasteur. L'équipe de Bordeaux a isolé par clonage en 1971 un type antigénique prédominant dénommé selon la nomenclature proposée par LUMSDEN et coll. (1967) (162) BoTat 1 (Bordeaux Trypanozoon antigenic type 1). Partant de ce stabilat, CAPBERN et coll. (1977) (33) ont cloné toute une série de types antigéniques différents. La variation antigénique était produite chez le lapin qui développe une infection de type chronique évoluant sous forme de vagues parasitémiques.

A l'opposé, chez la souris ou chez le rat, l'infection est de type aiguë et entraîne rapidement la mort de l'animal sans permettre le changement de type antigénique. Le clonage a été réalisé selon la technique de INOKI (1960) (129). Le sang de lapin parasité, prélevé à différents moments de l'infection, est inoculé à la souris. Dès l'apparition de parasites chez la souris, un prélèvement de sang est réalisé, un unique parasite est alors isolé par dilution en goutte pendante et repris à la seringue en tampon phosphate glucosé additionné de sérum de lapin normal. L'inoculation à une nouvelle souris du seul parasite suffit pour entraîner une infection aiguë dont tous les trypanosomes sont porteurs du même type antigénique. Afin d'éviter l'action éventuelle d'anticorps apparus chez la souris, le sang est réinjecté à une nouvelle souris chez laquelle les trypanosomes se multiplient rapidement.

CAPBERN et coll. ont ainsi isolé plus de 100 types antigéniques qu'ils ont classés de la façon suivante :

- types précoces, apparaissant dans les trois premières semaines de la maladie. Le groupe de Bordeaux a précisé, en particulier, la réversion au type antigénique BoTat 1 lors d'une infestation par l'un de ces clones et a en conséquence défini BoTat-1 comme le type antigénique de base.

- types semi-tardifs se développant au delà des trois premières semaines.
- types tardifs apparaissant seulement chez les lapins ayant survécu plus d'un mois.

Notre étude biochimique des antigènes variables a porté sur quelques uns de ces clones répartis en antigènes précoces, semi-tardifs ou tardifs avec une attention particulière au type antigénique de base BoTat 1.

Nous nous sommes rapprochés également du laboratoire de sérologie de l'Institut de Médecine Tropicale de Anvers qui a isolé des clones de T. brucei brucei, variété de trypanosome possédant un cycle biologique beaucoup plus proche de celui des trypanosomes pathogènes pour l'homme. Le protocole suivi, schématisé dans la figure 17 consiste, à partir d'un prélèvement sanguin sur une antilope infestée naturellement, à réaliser une adaptation sur souris par 13 passages successifs souris-souris selon les intervalles décroissants précisés dans la figure. La préparation obtenue a été dénommée EATRO 1125 (East African Trypanosomiasis Research Organization). Après 10 nouveaux passages souris-souris tous les 3 à 4 jours, le clonage est réalisé, et suivi de 7 passages souris-souris tous les 2 à 3 jours. Le variant obtenu a été appelé AnTat 1.1 (Anvers Trypanozoon antigenic type 1.1). Le clonage des autres types antigéniques a été réalisé à partir du stabilat AnTat 1.1 après neutralisation de l'infection par différents immunsérums spécifiques de clones (Figure 17). Une exception à ce protocole est à signaler pour le type antigénique (AnTat 1.13) qui a été obtenu après passage sur lapin.

Le laboratoire de sérologie de Anvers nous a fourni des stabilats correspondant aux clones AnTat 1.1, AnTat 1.10 et AnTat 1.8, modèles également adoptés pour l'étude génétique menée par le groupe de STEINERT du Département de Biologie Moléculaire de l'Université de Bruxelles.

B- Préparation des antigènes variables

Les antigènes de T. equiperdum ont été préparés par le groupe de Bordeaux selon la technique décrite par Baltz et coll. (1976) (8). Les antigènes de T. brucei brucei ont été isolés dans notre laboratoire, et pour ces préparations nous avons apporté quelques modifications au protocole mis au point pour T. equiperdum.

Clonage de différents variants de T. b. brucei

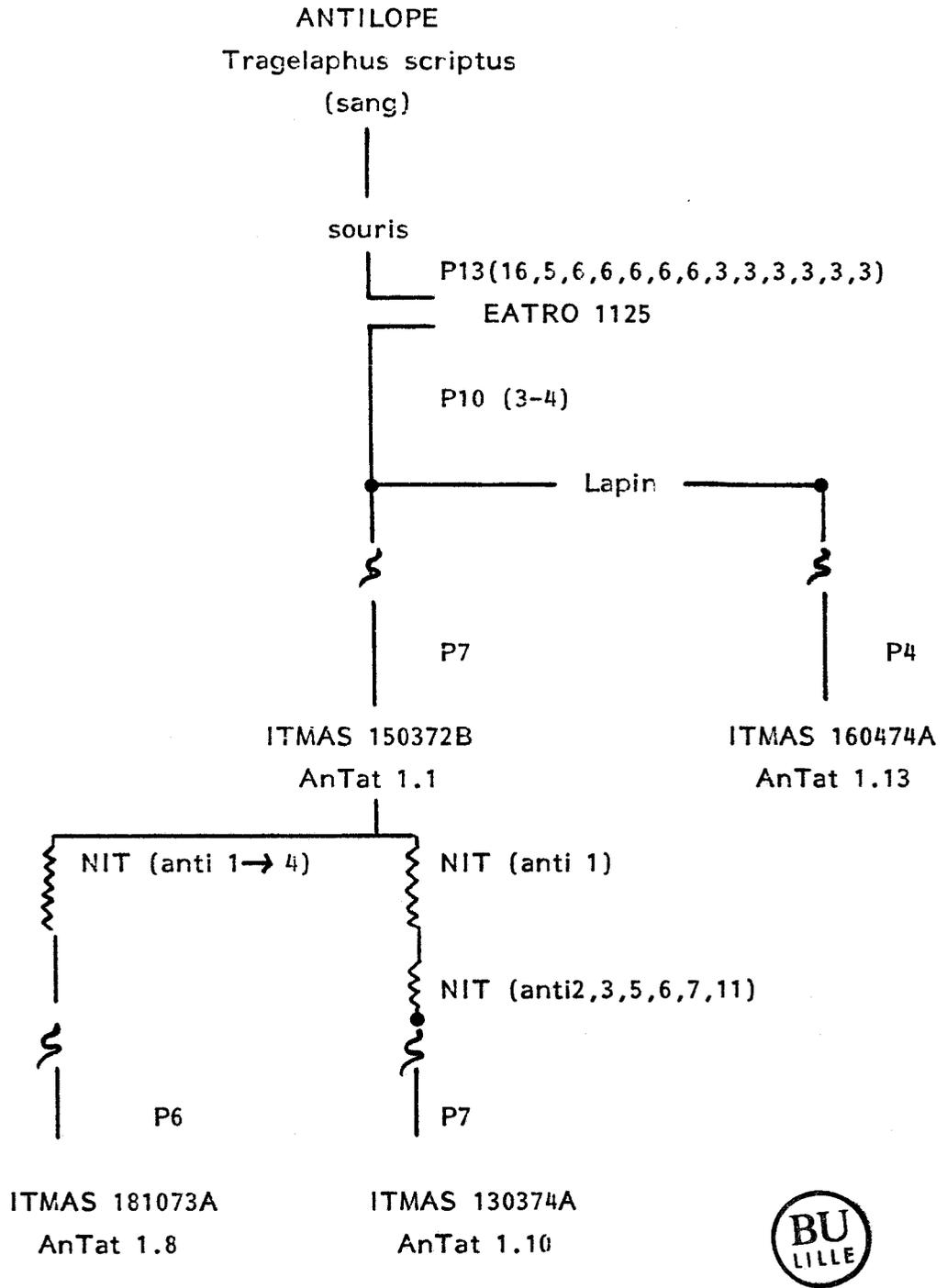


FIGURE 17

L'obtention d'une préparation antigénique purifiée comporte plusieurs étapes :

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

1- Isolement des trypanosomes

L'obtention en quantité d'une population parasitaire clonée s'effectue par infestation intrapéritonéale de rats Wistar de poids compris entre 250 et 400 g.

T. equiperdum

La préparation d'antigène variable est obtenue à partir de trypanosomes recueillis chez 30 rats inoculés 48 heures auparavant par 10^8 parasites issus d'une population clonée conservée sous forme de stabilat à -196° C dans l'azote liquide. Le sang de rat prélevé par ponction abdominale sur héparine est additionné d'un égal volume de tampon phosphate glucosé (PSG) de pH 8 (NaCl 44 mM, Na_2HPO_4 57 mM, NaH_2PO_4 3 mM, glucose 0.1 %). L'élimination de la majorité des hématies est obtenue par addition de dextran (Pharmacia T500) en concentration finale de 2 %. Le surnageant est recueilli après centrifugation à basse vitesse. Le protocole décrit en 1970 par LANHAM et GODFREY (144) élimine les hématies restantes, les éléments figurés, et livre une suspension de trypanosomes qui est ensuite centrifugée puis lavée avec le même tampon.

T. brucei brucei

A partir d'une souris infestée par un stabilat conservé à -70° C, un volume de sang équivalant à environ $2,5 \cdot 10^8$ trypanosomes est prélevé après développement d'une parasitémie estimée par observation microscopique. Le sang est dilué par 10 volumes de tampon phosphate salin (NaCl, 0.123 M, Na_2HPO_4 12 mM, KH_2PO_4 3 mM) de pH 7,25 (PBS). Une quantité de parasites comprise entre $50 \cdot 10^6$ et $70 \cdot 10^6$ est injectée au rat par voie intrapéritonéale.

Au bout de 3 jours, les rats ayant subi préalablement une administration d'héparine sont sacrifiés. Le sang de l'animal (15 ml) est recueilli dans un mélange constitué de PSG (7,5 ml), d'héparine (0,3 ml) et d'une solution 0,02 mM en antiprotéases, TLCK, NEM et PMSF (0,25 ml).

Les trypanosomes sont séparés des éléments figurés du sang directement par la technique de LANHAM et GODFREY (1970) (144) soit une chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose équilibrée en tampon PSG. L'élution est réalisée selon un débit de 100 ml par heure au maximum. Une centrifugation de l'éluat à 1 500 g pendant 15 minutes livre un culot de parasites . Ce dernier sera soumis à deux lavages par le PSG suivis de centrifugations à 1500 g.

2- Libération du manteau de surface

La libération de l'antigène est obtenue sans rupture cellulaire.

T. equiperdum

Le culot de trypanosomes est mis en suspension dans 120 ml de tampon phosphate 0,125 M de pH 5,5 enrichi de glucose à la concentration de 1 %. Les parasites en suspension sont laissés une nuit à 4° C sur agitateur de Kline. A l'issue de ce traitement, l'antigène de surface est solubilisé dans le milieu et les trypanosomes encore intacts sont sédimentés par centrifugation 15 minutes à 3000 g. Le surnageant est dialysé contre une solution de NaCl 0,5 M afin d'éliminer le glucose. Une étape d'ultracentrifugation (50 000 g, 1 h, 4° C) lui succède et permet d'éliminer les débris cellulaires provenant de la lyse inévitable d'un faible pourcentage de parasites. Le surnageant constitue l'extrait antigénique brut qui contient l'antigène variable ainsi qu'un certain nombre d'antigènes communs retrouvés qualitativement et quantitativement quelque soit le variant de trypanosomes.

T. brucei brucei

Après mise en suspension pendant une nuit des parasites selon des conditions analogues à celles décrites pour T. equiperdum, le surnageant de centrifugation 3000 g est directement soumis à une ultracentrifugation (165000 g, 1 h, 4° C). L'extrait antigénique est alors dialysé contre un tampon phosphate 0,01 M, NaCl 0,5 M, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 1 mM de pH 8.

3- Purification de l'antigène variable

La purification de l'antigène variable selon les conditions de BALTZ et coll. (1976) (8) fait appel à la chromatographie d'affinité sur colonne de sépharose concanavoline A.

T. equiperdum

Le gel est équilibré en NaCl 0,5 M. La lectine retient sélectivement l'antigène de surface. L'élution est réalisée par une solution de NaCl 0.5 M enrichie par de l' α -méthyl-D-mannoside en concentration de 10 % (p/v). L'éluat est dialysé contre de l'eau désionisée puis lyophilisé.

Une série d'antigènes spécifiques de T. equiperdum a ainsi été préparée

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

Notre intérêt à ce stade était essentiellement tourné vers une approche structurale comparative de différents antigènes variables en fonction de leur moment d'apparition.

T. brucei brucei

La chromatographie sur colonne de Concanavoline A-Sépharose est réalisée en tampon phosphate 0,01 M, NaCl 0,5 M, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 1 mM de pH 8.

Dans le but de déceler et éluer des formes moléculaires de l'antigène à haute affinité pour le gel de concanavoline A-Sépharose, nous avons étendu les conditions d'élution. Après recueil de la fraction non retenue (F1) par le tampon d'équilibre, le gel a été soumis successivement :

- à une première élution par le tampon enrichi en α -méthyl-D-mannoside (10 %) : fraction F2
- puis à une seconde élution par le tampon enrichi en α -méthyl-D-mannoside (10 %) et en β -mercaptoéthanol (1 %) : fraction F3

L'analyse en gel de polyacrylamide-SDS a permis de nous assurer que les fractions F2 et F3 correspondaient bien à l'antigène variable. Ce protocole de "gradient discontinu" d'élution permettait d'isoler des fractions antigéniques différemment liées au gel de concanavoline A-Sépharose, ce qui pouvait laisser supposer dès ce stade de notre travail des différences structurales entre ces fractions, représentatives peut être, d'un stade de maturation, ou d'une organisation différente de l'antigène. Pour répondre à ces interrogations, une étude analytique a été menée parallèlement sur chaque fraction.

Trois clones de T. b. brucei (AnTat 1.1, 1.10 et 1.8) ont été retenus et se sont vus appliquer le protocole préparatif dans le but d'une approche structurale des antigènes variables.

Pour AnTat 1.1 et 1.10 les objectifs de recherche se sont rapidement orientés vers une tentative de rapprochement entre structure, épitopes spécifiques de variant et mécanismes de conversion génique. Nous avons évoqué dans le chapitre bibliographique que les séquences spécifiques des gènes 1.1 et 1.10 partagent plus de 70 % d'homologie bien qu'elles confèrent une spécificité antigénique différente aux variants. De plus, la séquence spécifique de AnTat 1.10 peut être transformée partiellement par une conversion génique avec le gène 1.1. Ces données fondamentales ont d'ailleurs permis à Steinert et son groupe d'isoler plusieurs clones "chimériques" quant à leur séquence et possédant une spécificité antigénique de type 1.1. La collaboration qui s'est établie alors avec le Département de Biologie Moléculaire de l'Université de Bruxelles avait comme objectif premier de situer l'influence de ces sites de conversion sur l'organisation moléculaire de l'antigène variable et leur définition immunologique.

Pour AnTat 1.8, son choix dans notre étude se justifie essentiellement dans le fait que sa "définition" antigénique est aussi retrouvée dans de nombreuses souches pathogènes pour l'homme, aussi bien chez T. b. gambiense que T. b. rhodesiense. Ce clone possède un intérêt diagnostique et des tests commercialisés utilisent déjà cette propriété pour assurer des dépistages en zone endémique. Une meilleure connaissance de l'antigène variable 1.8 est toutefois nécessaire pour améliorer la qualité des tests immunologiques.

C- Etudes des propriétés physico-chimiques des antigènes préparés

1- Etude en gel de polyacrylamide en présence de SDS.

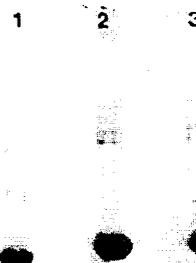
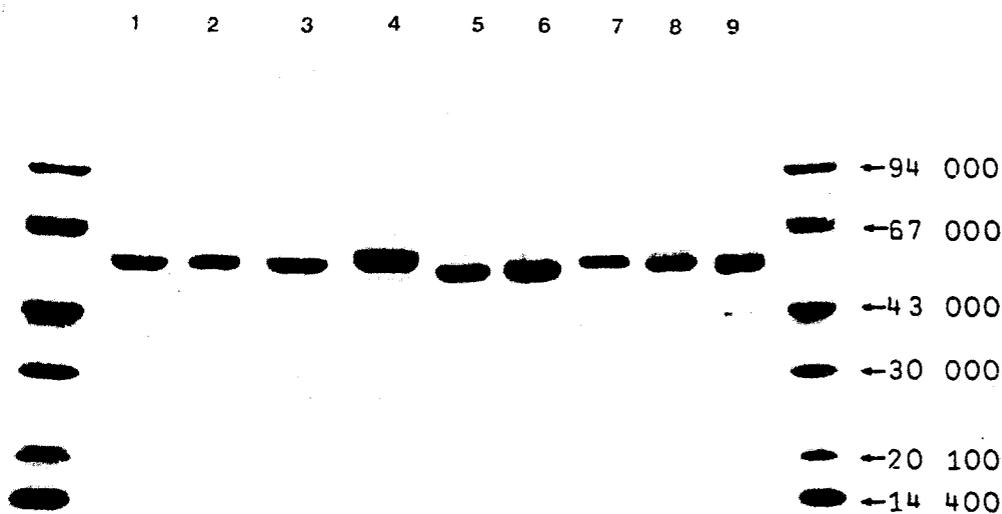
L'analyse des préparations antigéniques selon la technique de LAEMMLI (1970) (142) a permis de déterminer la masse moléculaire apparente des différents antigènes mais aussi de contrôler leur intégrité et leur état de pureté.

T. equiperdum

L'étude comparative des antigènes de T. equiperdum est illustrée dans la figure 18. Les tailles moléculaires apparentes sont comprises entre 52 000 et 59 000. Il a pu être constaté que la réduction des ponts disulfure préalablement à une migration électrophorétique dans les mêmes conditions entraîne une "augmentation" d'environ 8000 de la taille moléculaire apparente. Ce résultat témoigne de l'importance des ponts disulfure dans la conformation des antigènes et de leurs propriétés vis-à-vis du support d'électrophorèse.

DETERMINATION DE LA MASSE MOLECULAIRE
DES AVS DE TRYPANOSOMA EQUIPERDUM

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



ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE GRADIENT 5-30 %,
TAMPON TRIS-GLYCOCOLLE-SDS

1- BoTat-1	4- BoTat-4	7- BoTat-51	1 en milieu non réducteur
2- BoTat-2	5- BoTat-20	8- BoTat-78	2 en milieu réducteur à 60°C
3- BoTat-3	6- BoTat-28	9- BoTat-100	3 en milieu réducteur à 100°C

FIGURE 18



T. brucei brucei

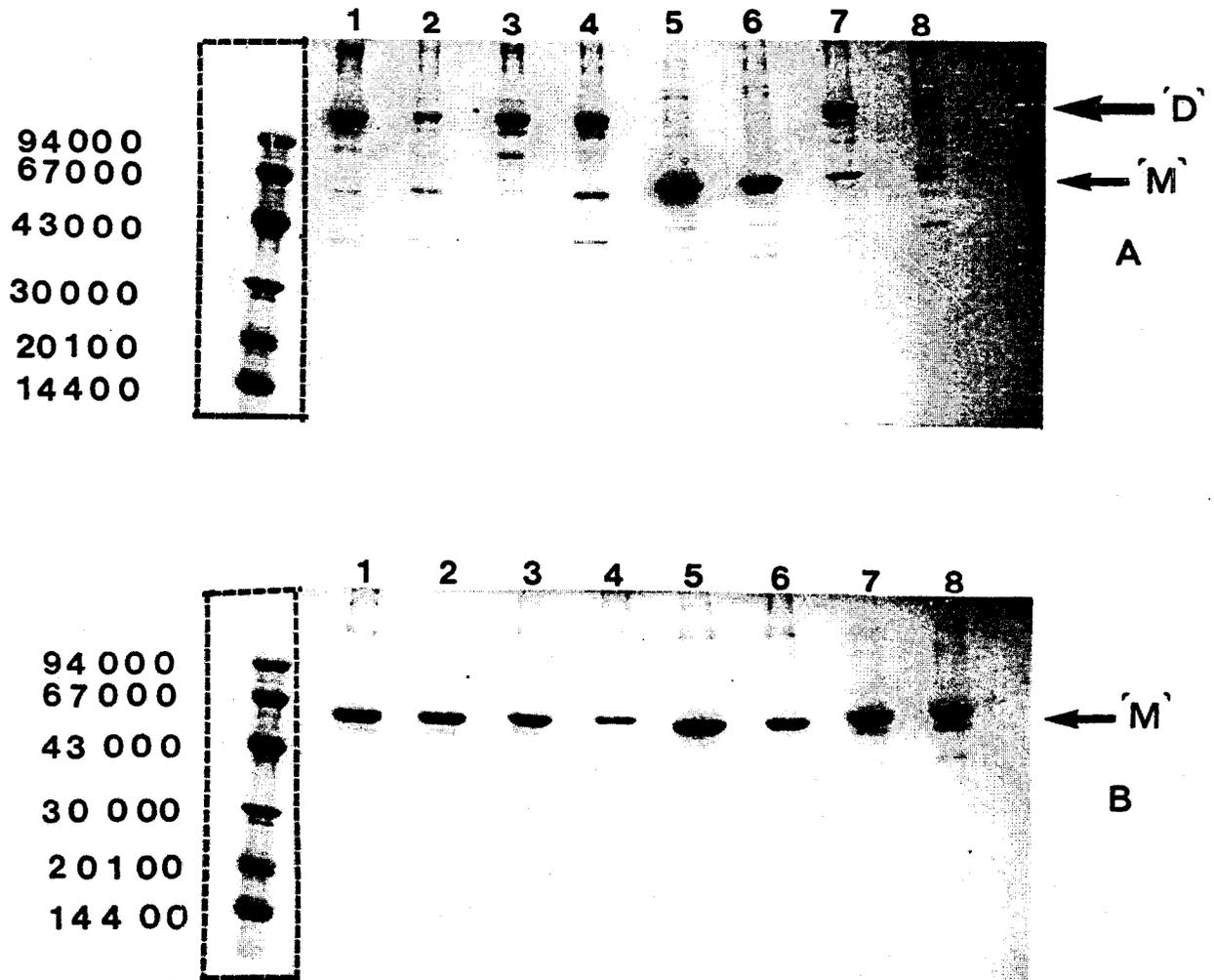
L'analyse électrophorétique des antigènes de T. b. brucei selon la technique de LAEMMLI après réduction des échantillons montre pour toutes les fractions un comportement identique à savoir une bande unique de poids moléculaire voisin de 60000.

En l'absence de traitement préalable des échantillons par le β -mercaptoéthanol les antigènes AnTat 1.1 et 1.10 ont un comportement qui conduit à la notion de dimère (Figure 19). En effet, la fraction F2 de chaque variant se présente essentiellement sous la forme d'une bande de taille moléculaire apparente voisine de 120000. Les fractions F3, obtenues rappelons-le, par élution de la colonne de Concanavaleine A-sépharose en présence de d' α -méthyl D mannoside/ β -mercaptoéthanol, se caractérisent par deux bandes représentatives respectivement d'une forme dimère et d'une forme monomère.

En ce qui concerne le variant AnTat 1.8, nous avons pu constater des profils électrophorétiques différents en fonction des lots préparatifs d'antigène bien que les protocoles de purification aient été réalisés dans les mêmes conditions expérimentales. Nous avons pu obtenir une préparation antigénique F2 apparaissant exclusivement sous forme de monomère ou bien sous forme de dimère mais dans laquelle la forme monomère est présente (Figure 19). Dans les deux cas la fraction F3 donne un profil similaire à celui de la fraction F2.

Pour toutes ces fractions antigéniques, un traitement préalable à la migration par le β -mercaptoéthanol se traduit donc par l'observation de la seule forme monomère. Dans le cas du variant AnTat 1.8, nos observations semblent montrer que la liaison de dimérisation se constituerait au cours du protocole préparatif et ne serait pas préexistante au niveau du manteau de surface.

De cette étude très préliminaire en gel de polyacrylamide en présence de SDS, l'on peut souligner déjà une profonde différence entre certaines préparations d'AVS puisque, selon les variants, on peut ou non suspecter déjà la possibilité d'un pont disulfure interantigène monomère à l'origine d'une dimérisation. L'existence de dimère de l'AVS selon ce type de liaison n'a pas encore été démontrée, à notre connaissance, pour T. brucei brucei. Il faut rappeler qu'il a été établi que l'AVS 117 contient en dehors des ponts disulfure intrachânes un résidu de cystéine libre (ALLEN et GURNETT (1983) (4)) qui pourrait donc remplir cette fonction de dimérisation.



Electrophorèse en gel de polyacrylamide gradient 5-30 %

A- Tampon de dissolution des échantillons : Tris-HCl 0,0625 M, SDS 2 %, glycérol 10 %, pH 6,8

B- Tampon de dissolution des échantillons : Tris-HCl 0,0625 M, SDS 2 %, glycérol 10 %, β -mercaptoéthanol 5 %, pH 6,8.



- | | | |
|----------------------------|---------------------------|--------------|
| 1. AnTat 1.1, Fraction F2 | 5. AnTat 1.8, Fraction F2 | |
| 2. AnTat 1.1, Fraction F3 | 6. AnTat 1.8, Fraction F3 | préparation1 |
| 3. AnTat 1.10, Fraction F2 | 7. AnTat 1.8, Fraction F2 | |
| 4. AnTat 1.10, Fraction F3 | 8. AnTat 1.8, Fraction F3 | préparation2 |

FIGURE 19

2- Détermination de la valeur du point isoélectrique par isoélectrofocalisation en gradient de pH.

La détermination de la valeur des pHi a été réalisée par isoélectrofocalisation sur gel de polyacrylamide à 5 % selon les conditions expérimentales détaillées dans l'appendice technique.

Les résultats obtenus pour les AVS de T. equiperdum sont illustrés dans la figure 20. Selon les cas, des pHi aussi extrêmes que pH 5 et pH 9 ont pu être notés.

Une autre observation est l'existence d'une hétérogénéité moléculaire plus ou moins importante selon les AVS. Ainsi, l'AVS BoTat-2 se présente en 5 bandes alors que les AVS BoTat-1 et BoTat-28 migrent essentiellement en une bande.

L'analyse en isoélectrofocalisation des fractions F2 et F3 des variants AnTat 1.1 et 1.10 et 1.8 de T. b. brucei est illustrée dans la figure 21. Comparativement aux antigènes de T. equiperdum ces fractions situées toutes dans une même zone de pHi (5,5-7,3) se sont révélées très hétérogènes.

Au regard de ces résultats, nous avons évoqué deux hypothèses

1- une microhétérogénéité des copules glycaniques, pouvant affecter le nombre de sites de glycosylation, le nombre de monosaccharides constitutifs, ou enfin la qualité des oses impliqués dans les structures osidiques.

2- plus sûrement une microhétérogénéité affectant l'axe peptidique par modifications d'acides aminés post-synthétiques. C'est une hypothèse qui est également émise par ONODERA et coll. (1981) (184) pour des antigènes de T. congolense sur la base d'une observation analogue.

3- Etude en dichroïsme circulaire

L'étude des spectres dichroïques des antigènes de T. equiperdum a permis d'établir leur grande variabilité de conformation secondaire ; les antigènes de T. brucei brucei apparaissent dans les cas étudiés beaucoup plus constants dans leur définition.

Détermination du pI des AVS de
variants de Trypanosoma equiperdum

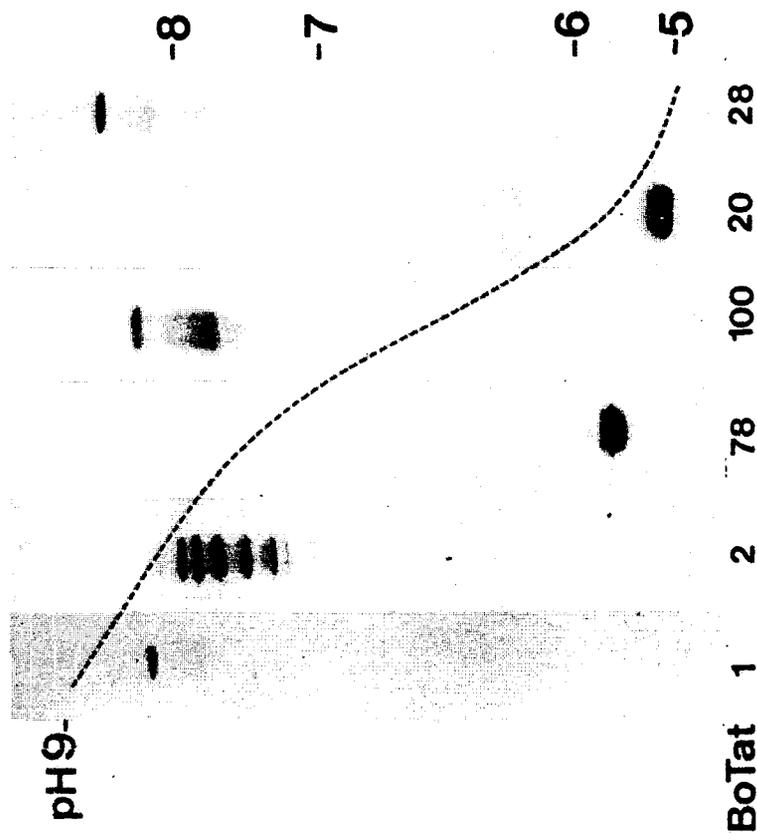


FIGURE 20

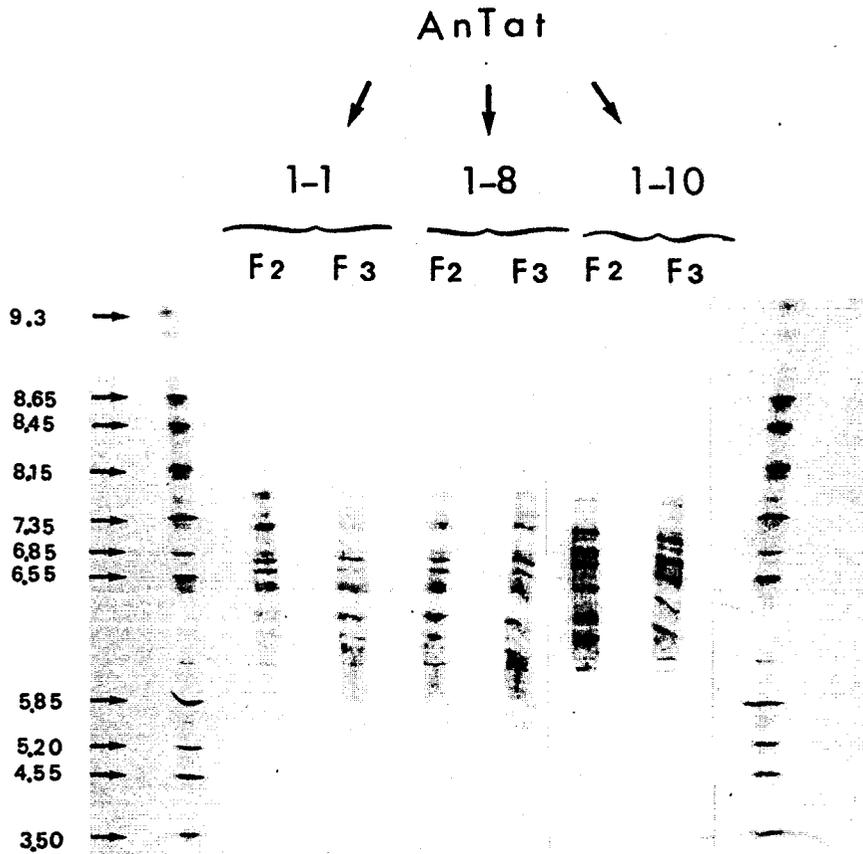
Isoélectrofocalisation des AVS de Trypanosoma brucei brucei

FIGURE 21

Ces observations ont été également confirmées par un suivi du comportement des antigènes en fonction de conditions dénaturantes et renaturantes lors de cinétiques thermiques.

T. equiperdum

Le tracé des spectres dichroïques a été réalisé sur les AVS BoTat-1, -2, -3, -4, -20, -28, -51, -78 et -100 de T. equiperdum. Les pourcentages respectifs de structure hélicoïdale et de feuillets plissés sont illustrés dans le tableau 2. Les 8 antigènes se définissent selon 4 types bien différents de structure secondaire. La figure 22 illustre le spectre dichroïque caractéristique de chacune de ces quatre catégories.

L'étude de la variation de $(\theta)_{222}$ en fonction de la température (Figure 23) a confirmé l'existence des 4 groupes. Comme attendu, la température de demi-dénaturation est en relation avec le pourcentage de structure organisée et en particulier l'importance en feuillets plissés.

Lors du retour progressif à la température initiale, une renaturation quasi totale a été observée pour l'AVS BoTat-1, et partielle pour les AVS BoTat-20 et -51. Pour les deux autres catégories, la dénaturation thermique était irréversible.

T. brucei brucei

Les études concernant les préparations antigéniques de T. brucei brucei ont toutes livré un spectre dichroïque de même aspect. L'exemple de la fraction F2 du variant AnTat 1.1 est illustré Figure 24, les pourcentages évalués en hélice α et en feuillets plissés β sont respectivement de 43 % et 8 %. Cette structure secondaire se distingue assez de celles observées avec T. equiperdum, l'originalité de T. b. brucei étant une faible teneur en feuillets plissés .

La dénaturation thermique s'est révélée irréversible pour les fractions F2 et F3 des variants AnTat 1.1 et 1.10 ainsi que pour la fraction F2 du variant AnTat 1.8 (préparation dimérique). Une renaturation partielle a été observée uniquement avec la fraction F3 de la préparation dimérique du variant AnTat 1.8 (Figure 25).

EVALUATION DE LA STRUCTURE SECONDAIRE DES AVS

DE TRYPANOSOMA EQUIPERDUM.

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



TABLEAU 2

SPECTRES DICHROIQUES DES AVS DE VARIANTS DE
TRYPANOSOMA EQUIPERDUM

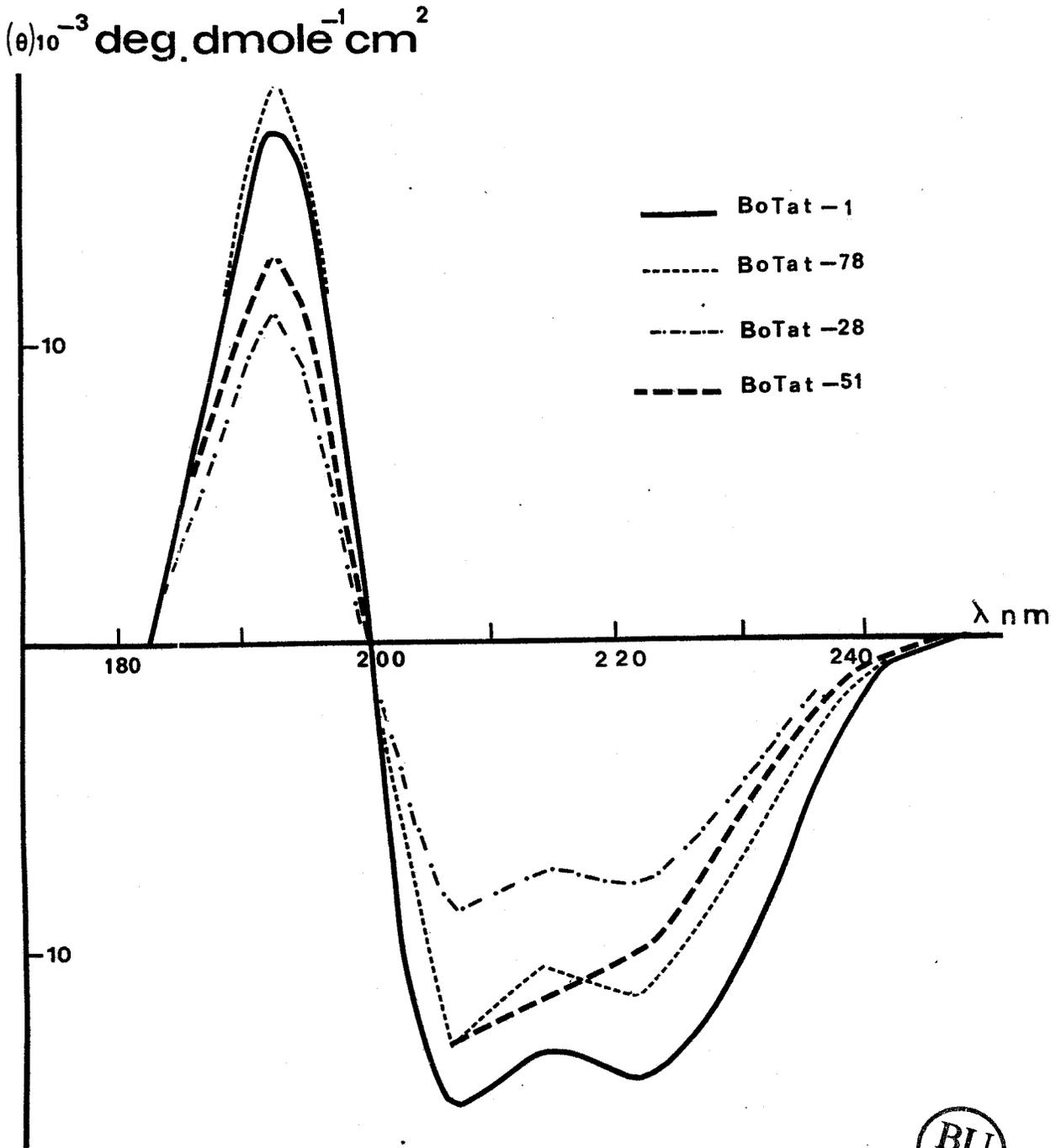


Figure 22



Dénaturation et renaturation thermiques des AVS de variants
de Trypanosoma equiperdum

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

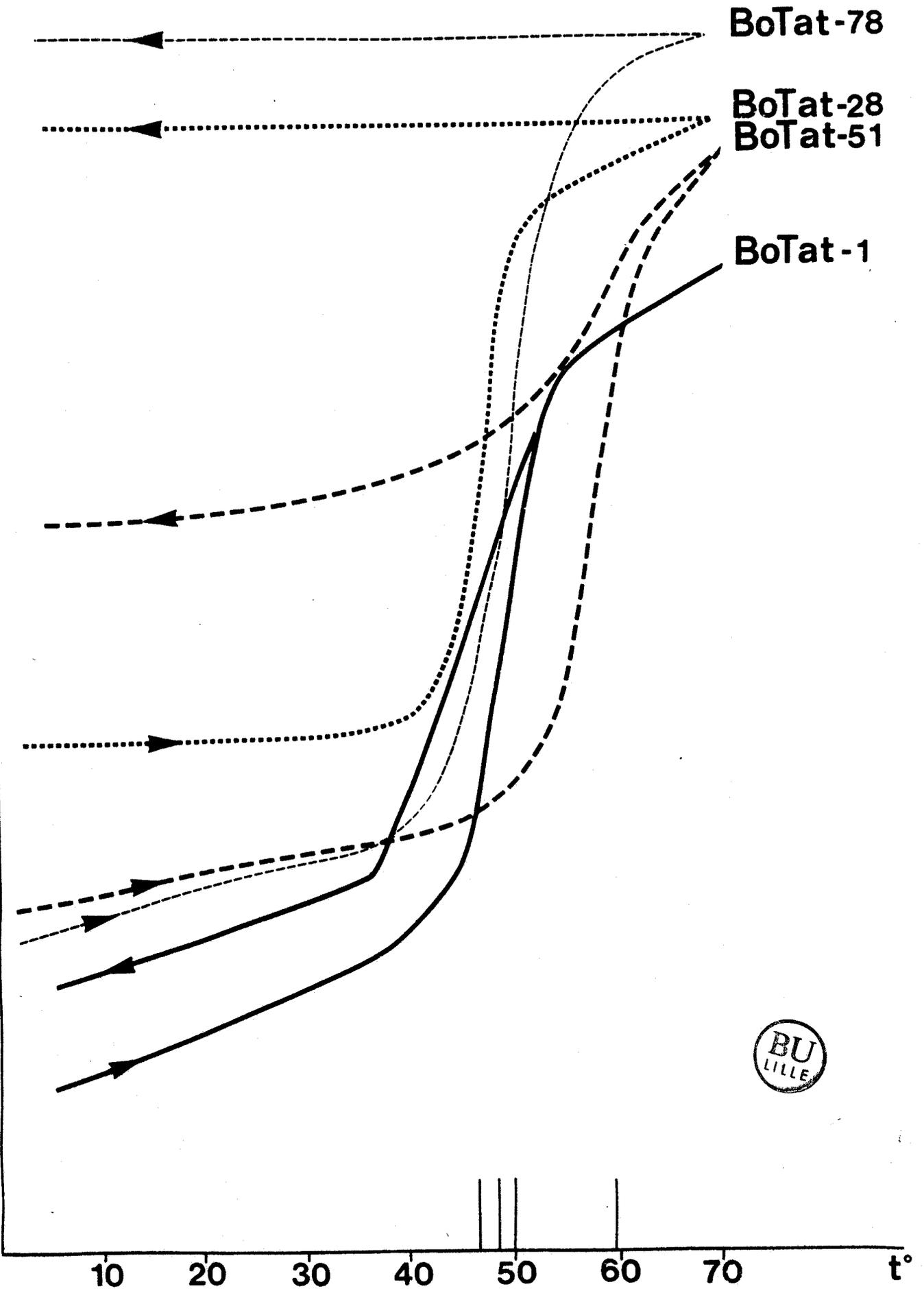


FIGURE 23

Spectre dichroïque de la fraction F2 du variant AnTat 1.1

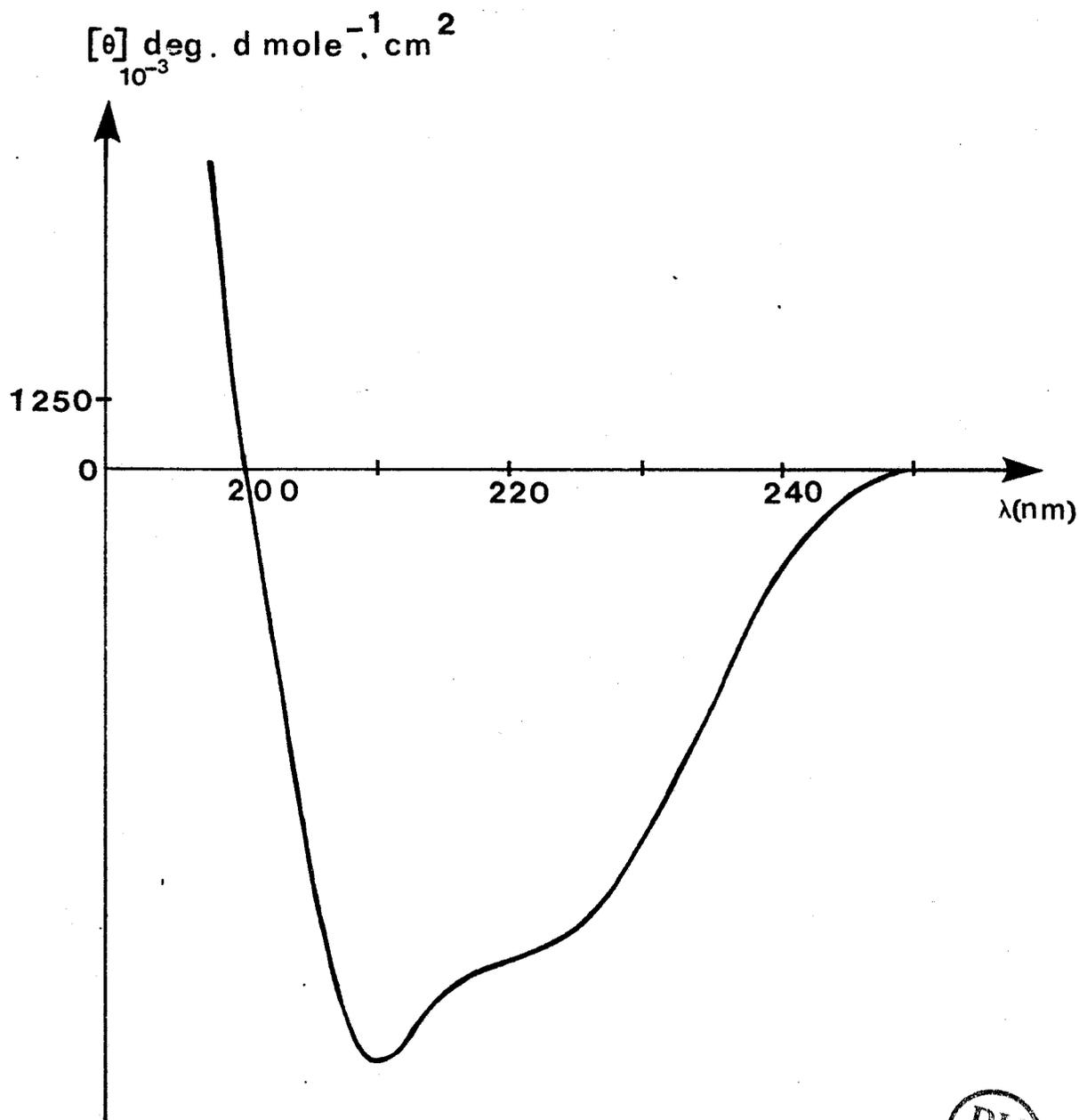


FIGURE 24

Denaturation et renaturation thermiques des fractions F2 (A) et F3 (B)
des variants AnTat 1.1, 1.10 et 1.8

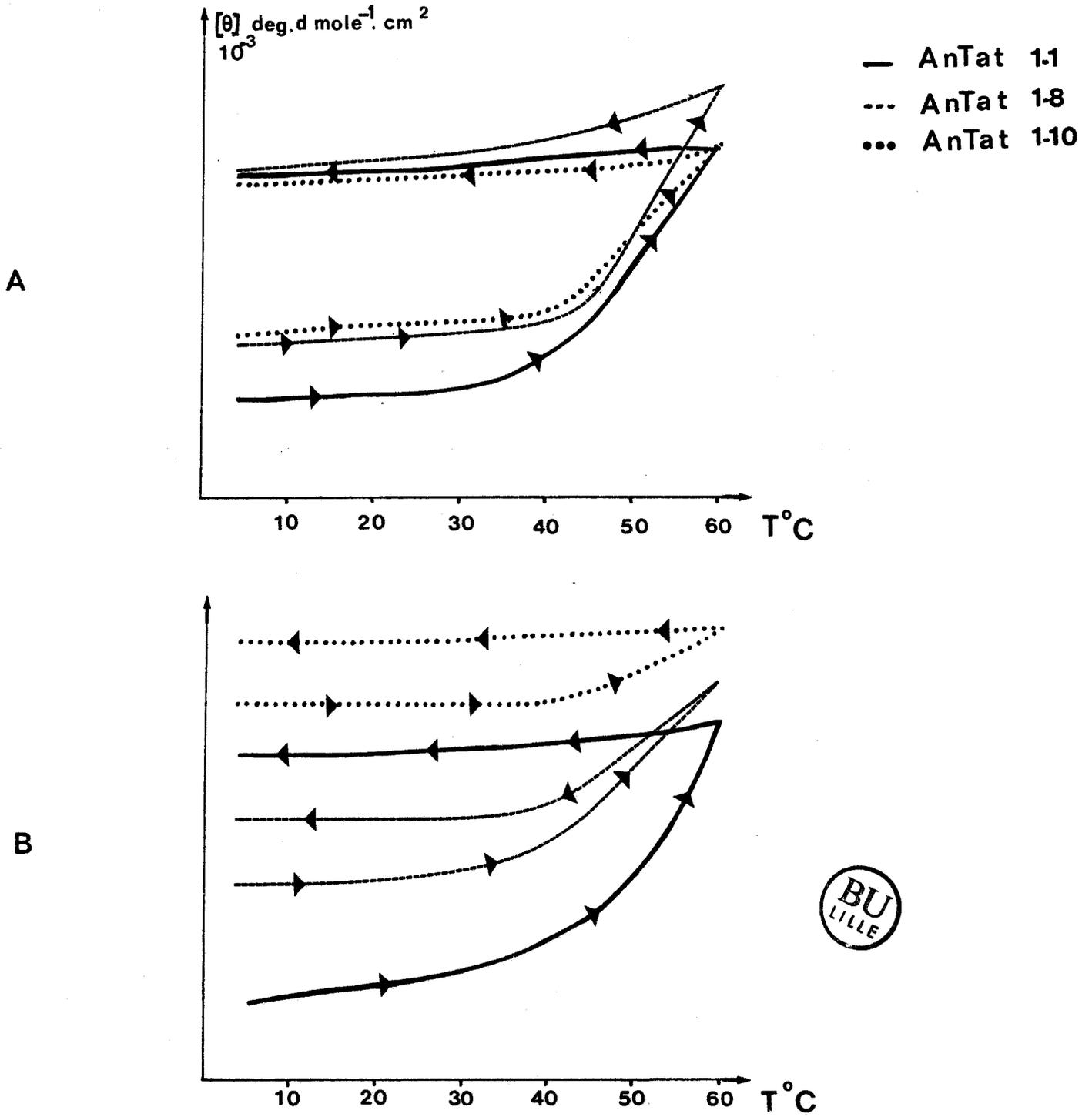


FIGURE 25

4- Composition amino-acide

Les compositions amino acides des antigènes de T. equiperdum et de T. brucei brucei figurent respectivement dans les tableaux 3 et 4. Les résultats sont exprimés en nombre de résidus pour 100 résidus dosés.

L'on peut remarquer une composition globalement constante pour tous les antigènes avec prédominance de résidus d'acide aspartique et/ou d'asparagine, de thréonine, d'acide glutamique et/ou de glutamine, d'alanine et de lysine.

Par ailleurs, aucune différence significative n'existe entre les résultats obtenus avec la fraction F2 ou F3 pour un même variant.

5- Composition glucidique

L'analyse a été réalisée chez T. equiperdum sur les AVS BoTat-1, -2, -4, -20, -28, -78 et -100. Les résultats sont exprimés dans le tableau 5 en nombre de résidus osidiques par mole de glycoprotéine.

Les AVS BoTat-1, -2, -78 et -28 sont caractérisés par une composition glucidique qualitativement et quantitativement similaire. Le contenu global en sucres se situe entre 7 et 8 % (p/p). Sur le plan qualitatif l'on peut noter la présence de mannose, de galactose, de glucose et de N-acétyl glucosamine. Deux AVS, BoTat -4 et BoTat -100, se distinguent par l'absence totale de galactose. A l'inverse, l'AVS BoTat -20 comporte une teneur équivalente en galactose et en mannose. Une plus faible teneur en N-acétyl glucosamine caractérise également les AVS BoTat -4 et -20. Ces résultats témoignent d'une profonde variation de glycosylation au niveau de nos préparations d'antigènes de T. equiperdum à la fois sur les plans qualitatif et quantitatif.

La composition glucidique des fractions F2 et F3 des variants de T. brucei brucei est illustrée dans le Tableau 6. Les résultats se sont avérés très similaires entre une fraction et l'autre d'un même variant ou aussi d'un variant à l'autre. Les rapports molaires sont proches de ceux trouvés pour les AVS BoTat-1, -2 et -28 de T. equiperdum.

Composition en acides aminés des antigènes spécifiques de variants de Trypanosoma equiperdum

Acides aminés *	BoTat-1	BoTat-2	BoTat-3	BoTat-4	BoTat-78	BoTat-100	BoTat-20	BoTat-51	BoTat-28
ASP	13,36	8,41	10,32	10,32	9,16	10,99	10,49	10,99	11,05
THR	8,90	10,74	11,07	8,67	10,48	10,53	10,57	9,05	11,20
SER	5,41	6,93	5,91	5,69	5,17	4,44	3,33	5,25	6,23
GLU	11,10	12,41	13,62	13,48	14,22	13,49	16,88	14,29	11,46
PRO	3,60	3,64	2,54	5,16	3,19	5,88	3,81	4,05	3,68
GLY	7,96	6,29	6,99	6,30	6,58	7,14	7,32	6,76	8,85
ALA	15,12	15,06	13,02	14,33	14,10	13,22	11,72	12,18	15,57
VAL	2,59	3,26	3,73	1,64	3,21	2,78	4,08	2,81	3,37
½ CYS	2,19	1,21	2,15	1,20	1,25	1,32	1,17	1,45	1,90
MET	1,13	0,59	Traces	1,26	0,89	0,49	Traces	0,45	0,35
ILE	2,36	4,11	3,18	4,68	3,51	2,83	3,01	2,85	3,45
LEU	9,15	7,64	6,98	6,93	6,34	5,36	7,07	8,17	4,40
TYR	2,20	2,61	2,49	2,93	2,04	2,69	2,17	2,12	1,87
PHE	2,14	1,60	1,95	2,59	3,03	1,92	1,87	3,31	2,45
LYS	8,06	9,59	11,86	10,77	11,61	11,32	12,34	11,65	9,93
HIS	0,57	2,04	2,03	1,59	1,40	2,74	1,29	1,55	0,51
TRP	0,51	0,46	0,40	0,41	1,06	0,58	0,34	ND	0,98
ARG	3,65	3,41	1,76	2,05	2,76	2,28	2,54	3,07	2,75

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

ND : non dosé

TABLEAU 3

composition en acides aminés des antigènes spécifiques purifiés de variants de Trypanosoma brucei brucei

acides aminés*	AnTat 1.1		AnTat 1.10		AnTat 1.8	
	F2	F3	F2	F3	F2	F3
Asp	10,19	10,60	10,99	11,09	9,76	9,61
Thr	9,71	8,90	8,51	8,29	8,99	8,87
Ser	6,14	6,05	5,91	6,42	6,00	6,22
Glu	13,08	12,89	12,30	12,24	13,07	12,91
Pro	3,51	3,50	3,85	4,14	3,46	3,60
Gly	8,34	8,06	7,91	8,51	8,66	8,44
Ala	15,49	15,20	14,34	13,69	15,33	15,15
Val	2,31	2,53	2,52	2,99	2,90	2,96
1/2 Cys	2,45	2,28	1,90	1,32	1,81	1,86
Met	-	0,68	-	-	-	-
Ile	3,47	3,52	4,42	4,36	3,48	3,52
Leu	8,77	8,84	8,32	8,12	8,86	8,96
Tyr	2,11	2,34	2,11	2,13	2,32	2,29
Phe	1,42	1,52	1,68	1,98	1,60	1,56
Lys	9,55	9,02	11,05	10,31	9,93	10,11
His	1,79	1,85	1,81	1,84	1,85	1,94
Trp	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Arg	1,68	2,24	2,36	2,57	1,97	1,99

+ valeurs exprimées en résidus pour 100 résidus d'acides aminés dosés

ND : non dosé



TABLEAU 4

Composition glucidique des antigènes spécifiques de variants de Trypanosoma equiperdum

	BoTat-1	BoTat-2	BoTat-4	BoTat-20	BoTat-28	BoTat-78	BoTat-100
Mannose	13,2	11,6	4,7	10,3	12,6	12,9	7
Galactose	6,9	7,5	-	10,3	7,4	9	-
Glucose	0,6	0,9	-	0,6	1,3	1	0,6
Glucosamine	5,7	4,9	1,6	2,9	4,4	5,8	ND

- * Résultats exprimés en nombre de résidus par mole de glycoprotéine
- * La teneur en glucosamine est déterminée après hydrolyse HCl 5,6 N sur autoanalyseur d'acides aminés. Cette valeur n'est pas corrigée.

TABLEAU 5



Composition glucidique des antigènes spécifiques de variants de Trypanosoma b. brucei

	AnTat 1.1		AnTat 1.10		AnTat 1.8	
	F2	F3	F2	F3	F2	F3
Mannose	10,3	10,4	10,3	10,8	12,9	10,4
Galactose	3,8	4,3	4,7	3,6	5,5	3,8
Glucose	0,7	0,9	0,6	0,8	1,5	1,7
Glucosamine	7,8	5,8	6,1	5,7	5,1	4,1

* Résultats exprimés en nombre de résidus par mole de glycoprotéine

* La teneur en glucosamine est déterminée après hydrolyse HCl 5,6 N sur autoanalyseur d'amino acides. Cette valeur n'est pas corrigée.

TABLEAU 6



6- Dosage du phosphore

La mise en évidence de phosphore au niveau des AVS de T. equiperdum a été établie à l'aide de méthodes isotopiques utilisant le marquage des parasites in vivo au ^{32}P . L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS suivie d'une autoradiographie a montré le caractère phosphorylé d'une protéine de taille moléculaire correspondant à celle de l'AVS.

Le dosage du phosphore a été ensuite réalisé sur la série d'antigènes de T. equiperdum selon les conditions décrites dans l'appendice technique. Rappelons que le protocole comporte un traitement préalable des préparations par plusieurs étapes de précipitations successives par l'acide trichloracétique dont une suivie d'un chauffage à 80°C pendant 20 minutes. Ces étapes permettent d'éliminer toute contamination éventuelle de l'antigène dosé par du phosphore inorganique ou par un composé phosphorylé de nature non protéique. Le dosage du phosphore dans ces conditions (ITAYA et MICHIO (1966) (129)) a mis en évidence pour tous les antigènes étudiés la présence de une mole de phosphore par mole de glycoprotéine.

Dans les mêmes conditions expérimentales les préparations antigéniques de variants AnTat 1.1, 1.10 et 1.8 apparaissent également phosphorylées selon un rapport de une mole de phosphore par mole d'antigène.

Nous avons également réalisé le dosage du phosphore en omettant le traitement du précipité trichloracétique par chauffage à 80°C . Dans ces conditions et quelque soit l'antigène dosé (variant de T. equiperdum ou variant de T. b. brucei (Tableau 7)), près de 2 moles de phosphore par mole d'antigène ont été chaque fois trouvées. Ce résultat laisserait envisager non pas un phosphore contaminant mais l'existence au niveau des AVS de deux résidus de phosphore dont l'un serait labile en milieu acide à 80°C et dont l'autre résisterait à ces conditions d'hydrolyse.

La présence de deux moles de phosphore est également signalée par Ferguson et coll. (1985)b (70) pour des antigènes de T. brucei brucei.

Teneur en phosphore des AVS de

T. d. brucei et T. equiperdum

	AnTat 1.1		AnTat 1.10		AnTat 1.8		BoTat 1
	F2	F3	F2	F3	F2	F3	
Précipitation par l'acide trichloracétique	2,0	1,7	2,0	1,8	2,0	1,8	1,7
Précipitation par l'acide trichloracétique et chauffage du précipité à 80° C pendant 20 minutes.	1,2	1,0	1,3	0,9	1,2	1,2	1,2

* Résultats exprimés en résidus par mole de glycoprotéine

TABLEAU 7



Conclusions

Cette étude comparative analytique d'antigènes issus de 2 espèces différentes de trypanosomes a mis en évidence certaines caractéristiques communes qui, en fonction également des données bibliographiques, peuvent être considérées comme des éléments typiques de définition des antigènes variables en rapport sans doute avec leur fonctionnalité in situ. Parmi ces éléments, on notera :

- une taille moléculaire apparente en électrophorèse en milieu réducteur voisine de 60 000
- une représentation assez constante des différents acides aminés constitutifs de l'axe peptidique de l'antigène
- enfin la présence de deux résidus de phosphore par molécule

Sur le plan glucidique, nous avons observé pour la plupart des AVS de T. equiperdum une constance de définition sur un plan qualitatif et quantitatif globalement retrouvée pour les antigènes de T. b. brucei étudiés. Quelques antigènes de T. equiperdum font exception à la règle soit par l'absence totale de galactose soit par un rapport molaire d'hexoses différent. Ces résultats laissent envisager une dégradation relative des antigènes plutôt qu'une structure originale, "dégradation" limitée aux sites de glycosylation puisque taille moléculaire apparente et composition amino-acide semblent indiquer une intégrité de l'axe peptidique. Plus avant dans ce mémoire sera exposée la relation entre la composition glucidique, la présence de phosphore, et l'existence d'une structure C-terminale glycolipidique complexe.

Sur le plan structure secondaire, les résultats acquis signalent une profonde diversité possible selon les antigènes avec semble-t-il la notion d'un certain regroupement vers des structures types. Toutefois, le faible nombre d'antigènes étudiés particulièrement chez T. brucei brucei ne permet pas une conclusion définitive.

Signalons toutefois que les études prédictives de conformation réalisées par LALOR et coll. (1984) (142) sur une série d'antigènes de T. brucei brucei avaient également mis en évidence l'existence d'une diversité au niveau des pourcentages de structures hélicoïdales.

II- ETUDE STRUCTURALE COMPARATIVE ENTRE UN ANTIGENE DE TRYPANOSOMA EQUIPERDUM (variant BoTat 1) ET UN ANTIGENE DE TRYPANOSOMA BRUCEI BRUCEI (variant AnTat 1.1)

Une étude structurale comparative a été réalisée sur des antigènes issus de chacune des espèces étudiées : T. equiperdum et T. b. brucei. Ceci nous a permis de percevoir plus précisément les homologues et les différences entre ces deux espèces qui, rappelons-le, ne subissent pas le même mode de transmission naturel.

Notre apport personnel au milieu de la concurrence internationale se situe dans le cadre précis de la localisation des sites de glycosylation et de leur définition qualitative. Au début de notre travail les séquences amino acides spécifiques de variant de T. equiperdum étaient inconnues. Pour T. b. brucei, le fait de disposer de séquences déterminées par la biologie moléculaire nous a permis d'aller plus vite dans la préparation de fractions glycosylées.

Dans les deux modèles, l'approche biochimique a été d'un grand intérêt dans l'utilisation des données de séquence en particulier pour une analyse de l'organisation générale des AVS et dans la démonstration de leur caractère polymorphique.

A- Sites de glycosylation

Notre étude a débuté par le variant basal BoTat 1 de T. equiperdum.

1- AVS BoTat 1 de T. equiperdum

La composition glucidique de l'antigène variable total laisse déjà envisager une glycosylation originale : rapport hexosamine/hexose ; rapport galactose/mannose ; présence de glucose. Les choix techniques pour la préparation des "fractions glycosylées" se devaient de respecter l'intégrité glycannique et aussi permettre d'établir la nature des liaisons peptide/glycane. Deux approches ont été retenues :

- chimique (coupure par le bromure de cyanogène)
- enzymatique à l'aide d'enzymes à activité spécifique (trypsine).

a) Clivage de la molécule réduite et S-alkylée par le bromure de cyanogène

Parmi les méthodes chimiques de clivage peptidique, la coupure par le bromure de cyanogène sur antigène réduit et S-alkylé a donné les meilleurs résultats sur le plan qualitatif et sur le plan des rendements. Au moins 4 à 5 résidus de méthionine, donc 4 à 5 points de clivage étaient attendus au regard de la composition amino acide de l'antigène.

Dans son principe, selon GROSS et WITKOP (1961) (97), le mécanisme de clivage des liaisons méthionyl implique la formation initiale d'un bromure de cyanosulfonium qui, en milieu acide, se scinde en méthyl-thiocyanate et en bromhydrate d'iminolactone d'homosérine ; ce dernier se décompose spontanément en libérant d'une part la lactone de l'homosérine et d'autre part un fragment pourvu en position N-terminale de l'acide-amino à l'origine lié à la fonction carboxylique de la méthionine.

En appliquant le protocole détaillé dans l'appendice technique, 4 fragments essentiels de tailles moléculaires apparentes respectives 13 000, 18 000, 22 000 et 29 000 (Figure 26) ont été obtenus.

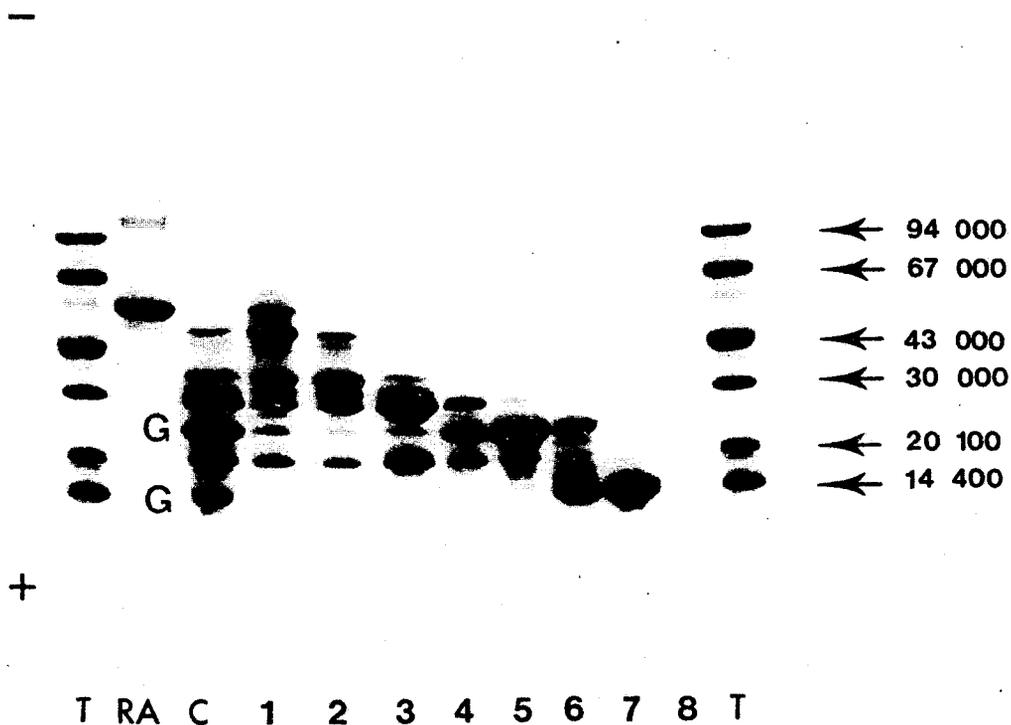
Le protocole de fractionnement en vue de leur purification a fait appel à une chromatographie de gel filtration sur Bio-gel P100. L'analyse des fractions recueillies en électrophorèse sur gel de polyacrylamide (Figure 26) a révélé un caractère hétérogène pour la plupart d'entre elles. Seule F7 semblait relativement homogène.

Dès ce stade de purification cependant, l'analyse des compositions glucidiques (Tableau 8) s'est révélée tout à fait intéressante particulièrement en ce qui concerne trois fractions, F7, F5 et F3 :

- présence dans la fraction F7 uniquement de mannose et de N-acétyl-glucosamine selon un rapport molaire 9/2,
- présence dans la fraction F5 de mannose et de galactose en proportion sensiblement équivalente,
- quasi absence de sucres dans la fraction F3.

Très aisément et par une technique électrophorétique détaillée dans l'appendice technique le caractère interactif avec la concanavine A des fragments de taille moléculaire apparente 22 000 (F5) et 13 000 (F7) pouvait être

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



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

FIGURE 26

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

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

Résultats exprimés en micromoles par gramme de glycoprotéine.



TABLEAU 8

démonstré. Dans les mêmes conditions d'études, les fragments de taille moléculaire apparente 19 000 et 29 000 ne se liaient pas avec la lectine.

Chacune des fractions apparaissant essentiellement représentative d'une partie de la molécule initiale, une analyse de séquence amino acide fut réalisée sur celles-ci. Les séquences données dans la figure 27 représentent la synthèse des résultats du traitement direct de l'AVS, du traitement des trois fractions majeures déjà citées et enfin de compléments obtenus sur des recoups de certaines d'entre elles :

- clivage de la fraction F7 par l'endoprotéinase Arg-C qui possède une spécificité vis-à-vis des liaisons arginyl-X à l'exception de la liaison arginyl-proline,

- clivage des fractions F7 et F5 par la protéase de *S. aureus* utilisée dans les conditions de coupure spécifique des liaisons glutamyl-X.

La fraction F7 s'est avérée correspondre à la partie amino-terminale de la molécule, et nous avons mis en évidence un premier site de glycosylation de type oligomannosidique substituant un résidu d'asparagine localisé en position 57 par rapport à l'acide aminé N-terminal de la molécule native.

2- Clivage de la molécule native par la trypsine

Dans le but de situer les autres sites de glycosylation de l'antigène, nous avons fait appel à des clivages par voie enzymatique. Après avoir établi à travers des cinétiques multiples les conditions optimales en vue de l'obtention de fragments de taille moléculaire intéressante pour des déterminations de séquence, nous avons retenu l'hydrolyse par la trypsine. Une hydrolyse prolongée a conduit à des fragments qui ont été séparés en faisant appel successivement à des étapes de chromatographie sur colonne de Biogel P60 et Biogel P10 (Figure 28).

Nous avons recherché tout particulièrement dans ces différentes fractions la présence d'éthanolamine démontrée au cours de notre travail comme substituant le carboxyl terminal des AVS (HOLDER, (1983)a (119)). Le dosage de ce composé a pu être réalisé sur autoanalyseur d'acides aminés selon les conditions décrites dans l'appendice technique. Les résultats nous ont montré que la fraction appelée b1 était seule représentative de la région C-terminale de l'AVS (Tableau 9). La composition chimique du glycopeptide C-terminal ainsi

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				
	65			
LYS-GLU-LYS-GLU-CYS-ASN-THR-LYS-GLY				

*1^{er} site de glycosylation

FIGURE 27

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

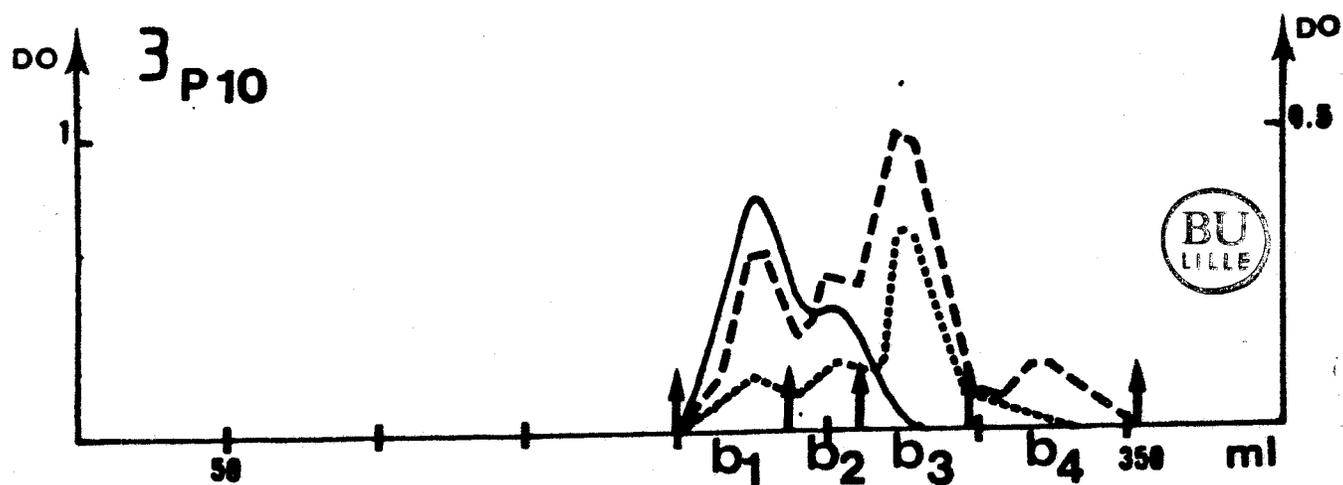
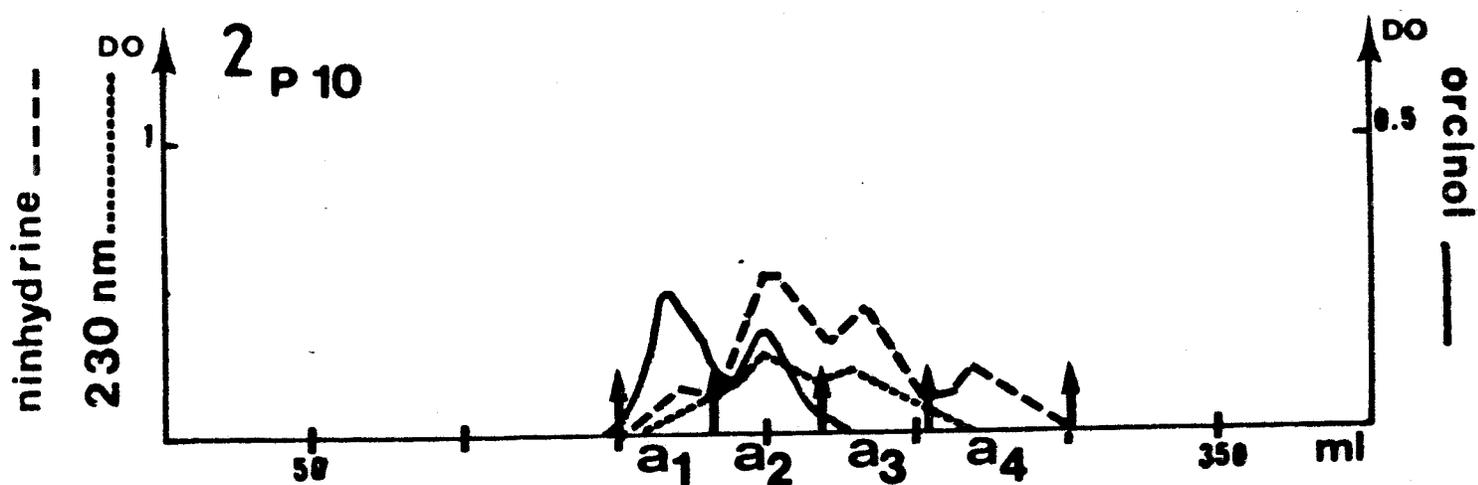
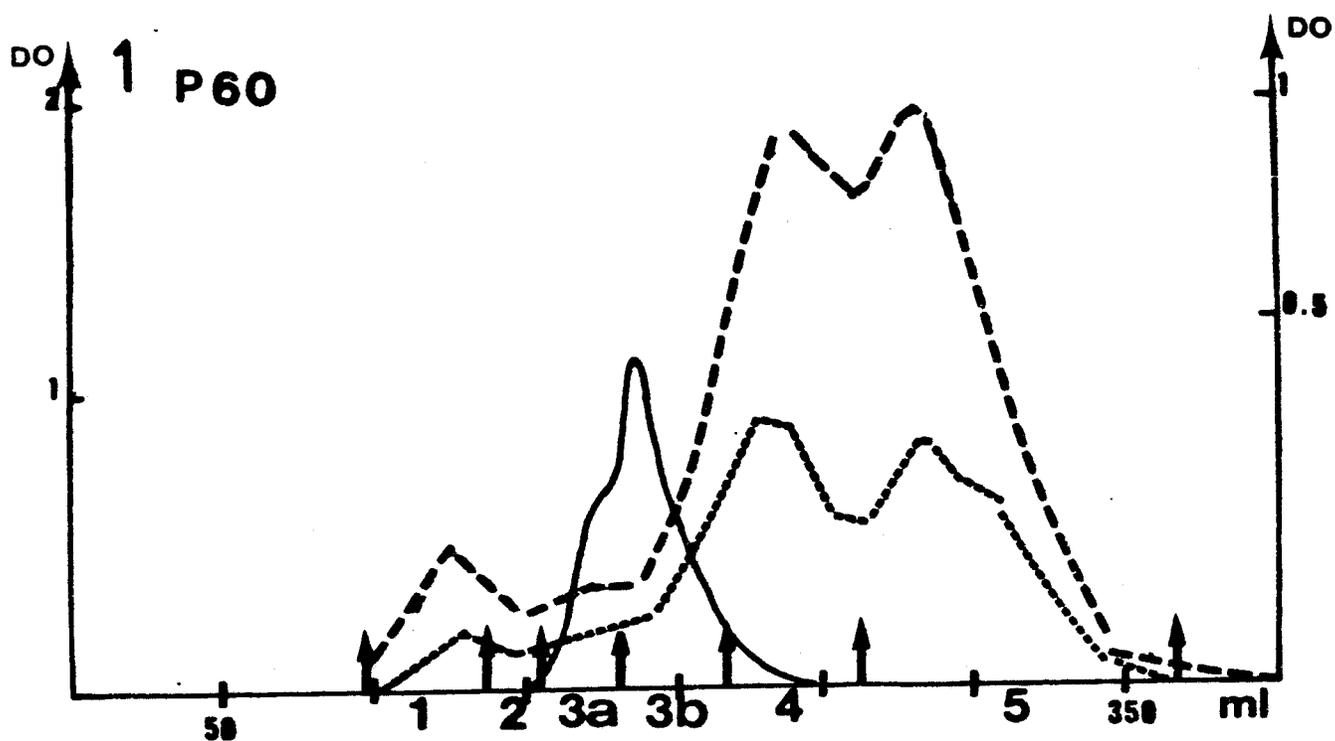


FIGURE 28

COMPOSITION EN ACIDES AMINES DES FRACTIONS TRYPSIQUES GLYCOSYLEES

	a ₁	a ₂	b ₁	b ₂
Asx	300	769	399	424
Thr	447	722	741	441
Ser	200	563	203	414
Glx	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 9

purifié est présentée dans le Tableau 10. Le glycolle était pris comme base de calcul. La présence de 2 résidus de glucosamine est démontrée. Mannose et galactose ont tous deux été trouvés dans un rapport 6 : 1. Enfin, un résidu de phosphore est dosé dans cette fraction C-terminale.

La présence conjointe de phosphore et d'éthanolamine dans un rapport 1/1 nous a incité à suggérer une structure de type phosphatidyléthanolamine. Dans cet esprit nous nous sommes alors orientés vers la recherche et le dosage de glycérol. La technique de dosage, détaillée dans l'appendice technique, était fondée sur la phosphorylation spécifique du glycérol par la glycérophosphokinase en présence d'ATP, et l'évaluation de la quantité d'ADP formée en utilisant le système lactate-pyruvate.

Pour la libération du glycérol à partir de la fraction b1, nous avons retenu une technique décrite pour restituer le glycérol à partir de glycérophospholipides (RENKONEN (1966) (215)). Il s'agit d'une hydrolyse par l'acide chlorhydrique 2N menée pendant 48 heures à 125° C sous vide en tube scellé. Nous avons appliqué la méthode d'une part sur la fraction b1, sur du glycérol standard et sur un témoin phosphatidyléthanolamine (Koch-light Laboratories). Les résultats présentés dans Tableau 11 montrent en fonction de plusieurs déterminations la présence de 1 mole de glycérol par mole de glycopeptide.

Néanmoins afin de s'assurer que le glycérol dosé ne provienne pas d'un contaminant de nature glycérolipidique adsorbé sur la molécule, nous avons procédé à la même analyse sur plusieurs lots d'AVS BoTat-1 après avoir soumis la molécule à une agitation prolongée dans un mélange chloroforme/méthanol/eau selon les conditions de FOLCH et coll. (1956) (76). Après séparation des 2 phases par centrifugation, chacune d'entre elle a fait l'objet d'une recherche de glycérol selon le protocole précédemment évoqué. Les résultats ont montré la présence essentielle de glycérol dans la phase aqueuse, phase qui contient l'antigène variable.

Toujours dans l'hypothèse d'une structure C-terminale de type phosphatidyléthanolamine, nous avons recherché la présence d'acides gras saponifiables. L'AVS a été traité par de la potasse méthanolique 0,1 M pendant 2 heures à 80° C. Après partage de FOLCH et coll. (1957) (76), l'analyse de la phase organique n'a révélé aucun acide gras. Seule, l'utilisation d'une hydrolyse chlorhydrique 5,6 N pendant 24 heures à 105° C sous vide en tube

COMPOSITION CHIMIQUE DU GLYCOPEPTIDE TRYPSIQUE C-TERMINAL

Asx	1.6
Thr	3.0
Ser	0.8
Gly	1
GlcN	1.9
ethanolamine	0.8
<hr/>	
Galactose	6.0
Mannose	6.1
<hr/>	
Phosphate	0.9

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



DOSAGE DU GLYCEROL DANS LA FRACTION b_1

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



TABLEAU 11

scellé a permis d'identifier des acides gras dans la fraction b1 et aussi dans la molécule native. Les répartitions relatives des acides gras de chaque analyse figurent dans le tableau 12.

Le fait que les acides gras ne soient pas libérables par saponification ne s'accordait pas avec l'hypothèse d'une structure glycérophospholipidique classique. Cette éventualité était aussi difficilement concevable avec la présence de sucres C-terminaux.

Pour préciser davantage l'agencement des oligosaccharides C-terminaux au niveau du glycopeptide C-terminal, une hydrolyse du composant b1 par la protéinase K fut envisagée. Cette partie de notre étude a été entreprise en collaboration avec le laboratoire d'Immunologie et de Biologie Parasitaire de Bordeaux qui a établi les conditions optimales de protéolyse.

Le protocole a été réalisé à partir d'antigène variable BoTat-1 marqué au ^{32}P . Le fragment C-terminal issu d'une hydrolyse trypsique a été soumis à une hydrolyse prolongée par la protéinase K. L'hydrolysate a été purifié par chromatographie de gel filtration sur Bio-gel P4. Deux fractions glycosylées ont alors été obtenues et parmi celles-ci une seulement était radioactive. L'analyse chimique de chaque fraction (Tableau 13) a permis de distinguer deux individualités glycaniques :

- le glycopeptide 1 contenant 5 résidus de mannose pour 2 résidus de N-acétyl glucosamine, composant non radioactif et ne contenant pas d'éthanolamine.

- le glycopeptide 2 contenant 5 résidus de galactose pour 1 résidu de mannose, composant radioactif contenant un résidu d'éthanolamine.

Il était intéressant à ce stade de confronter les différents résultats aux données apportées par séquence cDNA sur divers AVS de T. brucei brucei. L'on sait en effet que les antigènes peuvent être classés en plusieurs catégories en fonction de leur extrémité C-terminale comme il est montré dans la figure 8. En fonction de nos résultats, l'AVS BoTat-1 appartient à la deuxième catégorie dont la séquence C-terminale est la suivante.

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

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

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

TABLEAU 12

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
³² P	-	+
Man	5	1
Gal	-	5
Glc Nac	2*	-

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

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

TABLEAU 13

Le résidu d'asparagine est porteur d'un glycanne qui en fonction de nos résultats est oligomannosidique (mannose 5, N-acétylglucosamine 2). Le résidu de sérine serait le point de branchement de la structure glycophospholipidique complexe riche en galactose et caractérisée par un résidu d'éthanolamine.

Nous avons complété cette étude structurale par une étude immunologique comparative des glycopeptides sachant par des études préalables (LABASTIE et coll. (1981) (140)) qu'un site antigénique commun de localisation C-terminale existait entre les antigènes purifiés des variants BoTat-1 et BoTat-28.

Nous avons ainsi testé la capacité des glycopeptides 1 et 2 à inhiber la réaction hétérologue de l'AVS BoTat-1 avec des anticorps dirigés contre l'AVS BoTat-28. 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 phosphoglycannique C-terminale des AVS de T. equiperdum. Un résultat similaire a été obtenu par HOLDER (1981) (118), (1985)b (120) avec les AVS de T. brucei brucei.

Grâce à cette analyse structurale d'un AVS de T. equiperdum nous avons acquis plusieurs points fondamentaux au sujet de l'organisation des glycannes :

1) l'éventualité pour un antigène variable d'être glycosylé par une structure oligomannosidique dans sa portion amino-terminale, ce qui au regard de la littérature et depuis notre étude demeure un modèle d'organisation peu fréquent.

2) la présence d'une structure glycophospholipidique pour laquelle phosphore, éthanolamine, glycérol et mannose ont été trouvés à raison de 1 mole par mole et le galactose à raison de 5 résidus par mole, les acides gras étant identifiés à l'acide palmitique, l'acide oléique et l'acide stéarique. Cet ensemble participe à la réactivité immunologique croisée entre antigènes purifiés.

3) la localisation à proximité de la structure glycophospholipidique, d'un glycanne répondant à la définition d'une structure oligomannosidique 5/2.

2. AVS AnTat 1.1 de T. b. brucei

Sur le plan qualitatif la composition glycannique de l'antigène AnTat 1.1 de T. b. brucei est voisine de celle de l'antigène BoTat 1 de T.

equiperdum. Le Tableau 14 illustrant la comparaison entre ces deux antigènes montre toutefois une teneur plus faible en mannose et en galactose pour l'antigène AnTat 1.1 de T. b. brucei. La connaissance de la structure peptidique complète de l'antigène par étude en séquence cDNA (PAYS et coll. (1983)c (200)) mettait en évidence l'existence de 3 sites internes possibles pour une glycosylation en plus de la glycosylation C-terminale : Asn 84 - Trp 85 - Thr 86 ; Asn 390 - Gly 391 - Thr 392 ; Asn 403 - Ala 404 - Thr 405.

La réalité de ces sites potentiels de glycosylation fut étudiée pour cet antigène à travers les fractions tryptiques purifiées issues d'une hydrolyse de la molécule native.

La purification d'un hydrolysate tryptique de 24 heures par chromatographie de gel filtration sur Bio-gel P30 a livré deux fractions chromatographiques (Figure 29). Le profil en gel de polyacrylamide en présence de SDS de chaque fraction est illustré dans la figure 30. Ces fractions 1 et 2 correspondaient respectivement à des composants de tailles moléculaires apparentes 43 000 et 20 000 qui ont été étudiés sur les plans de leur composition amino acide, de leur séquence amino-acide N-terminale et de leur composition glucidique. Les résultats de la séquence amino-acide du fragment 43 000 ont montré que ce composant constituait le fragment amino-terminal de la molécule. A l'opposé, la présence d'éthanolamine uniquement dans le fragment 20 000 indiquait la localisation toute C-terminale de celui-ci. Selon ces études analytiques respectivement de composition et de séquence amino-acide nous pouvions préjuger : 1/ de l'étendue du fragment 43 000 jusqu'au résidu de lysine en position 293, 2/ de la localisation de l'extrémité N-terminale du fragment 20 000 en position 336. Les séquences amino-acides identifiées signalaient toutefois une certaine hétérogénéité de ce dernier fragment avec l'existence de clivages mineurs en position 362-363 et 433-434. L'ensemble de ces résultats est mentionné figure 31 sur la séquence cDNA déterminée par PAYS et coll. (1983) (200).

L'examen de la composition glucidique de chaque fragment a révélé que l'ensemble des sucres de la glycoprotéine était contenu dans le tiers C-terminal (Tableau 15). Ceci amène à établir définitivement que la séquence Asn - Trp - Thr (84-85-86) n'est pas glycosylée. Le résidu de tryptophane en position intermédiaire est d'ailleurs généralement considéré comme un "empêchement" à la glycosylation.

L'AVS AnTat 1.1 de T. b. brucei se distingue donc nettement de l'AVS

Comparaison entre les compositions glucidiques des antigènes de surface de variants BoTat-1 de T. equiperdum et AnTat 1.1 de T. b. brucei

	<u>BoTat-1</u>	<u>AnTat 1.1</u>	
		F2	F3
Mannose	13,2	10,3	10,4
Galactose	6,9	3,8	4,3
Glucose	0,6	0,7	0,9
Glucosamine	5,7	7,8	5,8

* Résultats exprimés en résidus par mole de glycoprotéine

* La teneur en glucosamine est déterminée après hydrolyse HCl 5,6 N sur auto-analyseur d'acides aminés.

TABLEAU 14



CHROMATOGRAPHIE DE GEL FILTRATION DE L'HYDROLYSAT TRYPSIQUE
DE L'AVS AnTat 1-1 .

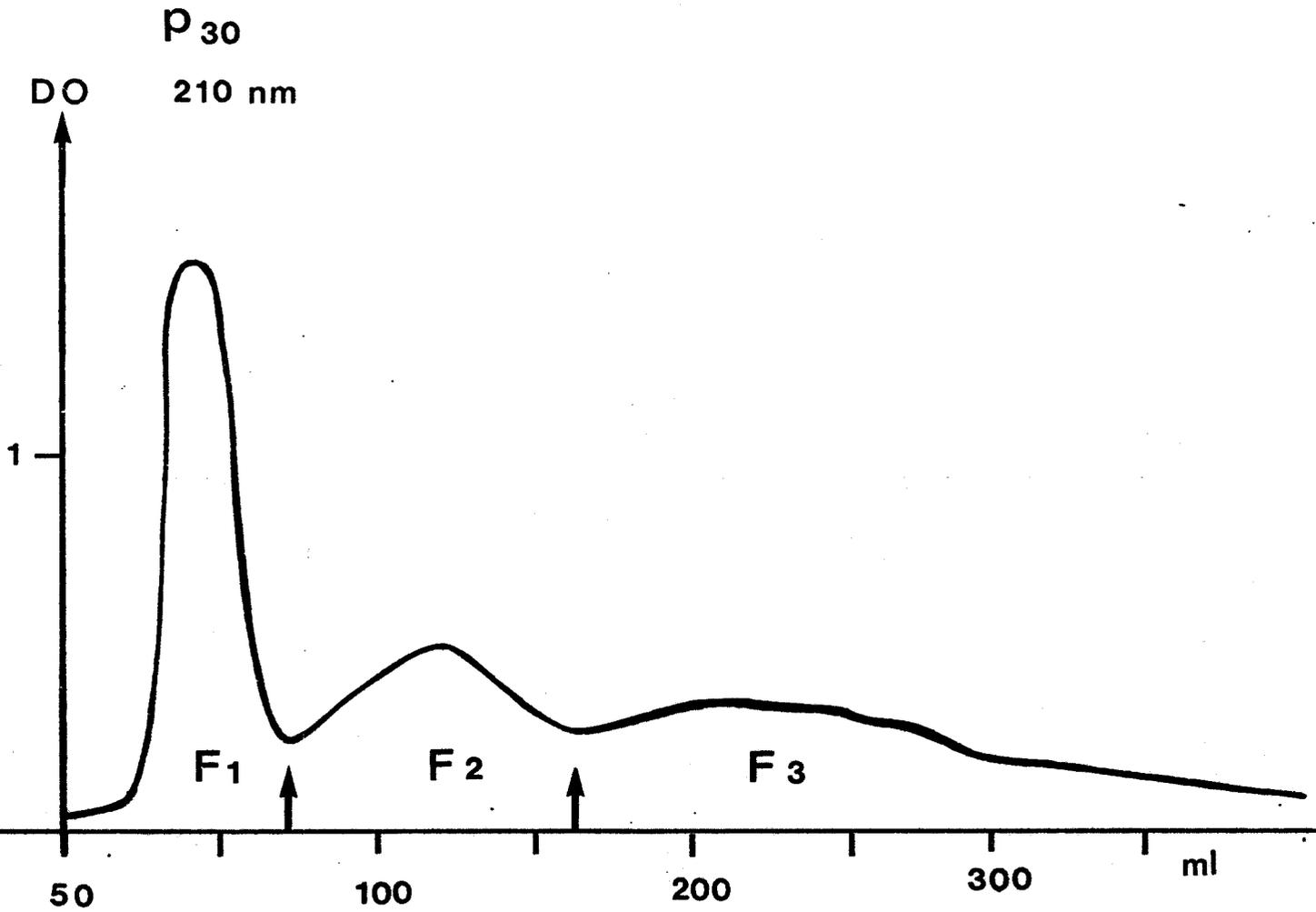
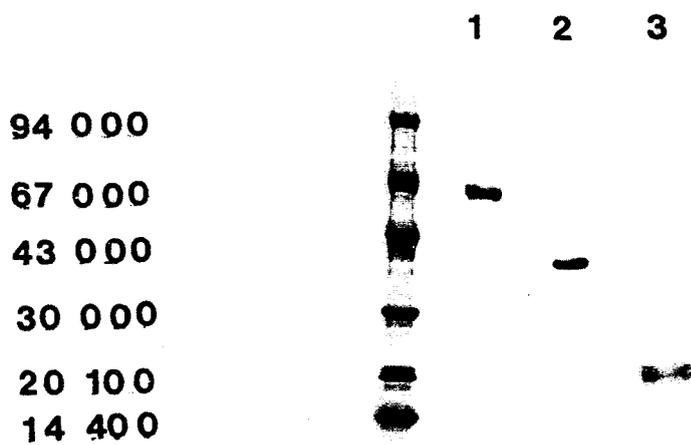


FIGURE 29

Purification des fractions tryptiques de l'AVS AnTat 1.1



Electrophorèse en gel de polyacrylamide gradient 5-30 % en présence de SDS

- 1 Antigène natif (F2)
- 2 Fraction 1
- 3 Fraction 2

FIGURE 30

LOCALISATION DES FRACTIONS TRYPSIQUES DANS L'AVS AnTat 1-1 DE T.b.brucei.

GLN-THR-ALA-GLY-ARG-PRO-LEU-ALA-ASP-VAL-VAL-GLY-LYS-THR-LEU-CYS-THR-TYR-SER-LYS-THR-ALA-LYS-ARG-GLN-ALA-ALA-ASN-LEU-ALA-	10	20	30
GLN-THR-LEU-GLN-ARG-ALA-SER-SER-ALA-ALA-LYS-GLN-SER-ARG-GLN-ALA-GLN-GLN-LEU-ALA-ALA-LEU-ALA-LEU-ALA-LYS-LEU-PRO-ASP-TYR-	40	50	60
LYS-GLU-ALA-ALA-ALA-THR-LEU-LEU-ILE-TYR-ALA-THR-HIS-LYS-ILE-GLN-ASP-ALA-GLN-ALA-SER-ILE-GLU-ASN-TRP-THR-GLY-GLU-ASN-THR-	70	80	90
LYS-LEU-VAL-GLY-GLN-ALA-MET-TYR-SER-SER-GLY-ARG-ILE-ASP-GLU-LEU-MET-LEU-LEU-LEU-GLU-GLY-HIS-ARG-GLU-ASP-GLY-ALA-ASN-GLY-	100	110	120
GLN-ASP-LYS-THR-CYS-LEU-GLY-ALA-ALA-ALA-GLY-GLY-ASN-THR-VAL-ASN-GLU-PHE-VAL-LYS-THR-GLU-CYS-ASP-THR-GLU-SER-GLY-HIS-ASN-	130	140	150
ILE-GLU-ALA-ASP-ASN-SER-ASN-ILE-GLY-GLN-ALA-ALA-THR-THR-LEU-SER-GLN-GLU-SER-THR-ASP-PRO-GLU-ALA-SER-GLY-GLY-ALA-SER-CYS-	160	170	180
LYS-ILE-THR-ALA-ASN-LEU-ALA-THR-ASP-TYR-ASP-SER-HIS-ALA-ASN-GLU-LEU-PRO-LEU-LEU-GLY-GLY-LEU-LEU-THR-ILE-HIS-ASN-ALA-GLY-	190	200	210
GLY-PHE-LYS-THR-GLY-GLN-SER-LEU-GLN-THR-ALA-ALA-PRO-THR-ASN-LYS-LEU-ILE-SER-ALA-LEU-LYS-ASN-LYS-GLY-ALA-GLY-VAL-ALA-ALA-	220	230	240
LYS-LEU-ALA-THR-VAL-THR-SER-ALA-ALA-PRO-THR-SER-LYS-GLN-GLU-LEU-LYS-THR-LEU-LEU-ALA-SER-LYS-GLY-GLU-ARG-ALA-LYS-LEU-GLN-	250	260	270
ALA-ALA-ASN-ASP-GLU-TYR-ASN-ASN-TRP-LYS-PRO-GLY-ALA-LYS-PRO-GLU-ASP-PHE-ASP-ALA-HIS-ILE-LYS- LYS-VAL-PHE-GLY-ALA-GLU-ASP-	280	290	300
GLY-LYS-ASP-SER-ALA-TYR-ALA-ILE-ALA-LEU-GLU-GLY-ILE-SER-ILE-GLU-VAL-PRO-LEU-GLY-GLY-GLY-GLN-THR-GLN-ASN-LYS-GLN-LEU-TYR-	310	320	330
SER-MET-GLN-PRO-LYS- ASP-LEU-MET-ALA-ALA-LEU-ILE-GLY-THR-ILE-ALA-GLU-LEU-GLN-THR-ALA-ALA-ALA-THR-LYS-PRO-ALA-CYS-PRO-GLY-	340	350	360
HIS-LYS-GLN-THR-THR-THR-GLU-SER-ASP-ALA-LEU-CYS-SER-LYS-ILE-LYS-ASP-ALA-ASN-GLU-CYS-ASN-SER-LYS-HIS-PHE-CYS-SER-TYR-ASN-*	370	380	390
GLY-THR-GLU-THR-ASP-SER-ALA-LYS-LYS-CYS-LYS-TYR-ASN- ALA-THR-LYS-ALA-SER-ALA-SER-ASP-ALA-PRO-VAL-THR-GLN-ALA-GLN-THR-THR-	400	410	420
SER-ARG-SER-GLU-THR-PRO-ALA-GLU-LYS-CYS-THR-GLY-LYS- LYS-LYS-ASP-ASP-CYS-LYS-ASP-GLY-CYS-LYS-TRP-GLU-ALA-GLU-THR-CYS-LYS-	430	440	450
ASP			



* Site potentiel de glycosylation

↑ Sites de clivage mineur par la trypsine

Séquence amino acide de l'antigène variable AnTat 1.1 de T. b. brucei

Résultats de séquence C DNA par PAYS et coll. (1983)

FIGURE 31

COMPARAISON ENTRE LES COMPOSITIONS GLUCIDIQUES DE L'AVS
AnTat 1-1 NATIF ET DE SA FRACTION TRYPSIQUE C-TERMINALE.

	AVS NATIF	FRACTION TRYPSIQUE C-TERMINALE
MANNOSE	10.3	11.3
GALACTOSE	3.8	6.0
GLUCOSE	0.7	1.0
GLUCOSAMINE	7.8	6.3

*Résultats exprimés en résidus par mole de glycoprotéine.

TABLEAU 15

BoTat 1 de T. equiperdum par l'absence d'une copule glycanne dans la partie amino-terminale. En fonction des résultats de composition glucidique du fragment C-terminal, et particulièrement de la teneur en glucosamine, il apparaît que les deux autres sites internes potentiels Asn 390 et Asn 403 puissent être glycosylés. La molécule serait caractérisée par l'existence de deux glycannes très rapprochés dont la structure demande à être établie : structure identique ? structure différente ?. Rappelons que dans le cas de BoTat 1 le glycanne le plus proche de l'extrémité C-terminale se caractérise par un rapport mannose/glucosamine 5/2 alors que le glycanne N-terminal le plus éloigné se caractérise par un rapport 9/2. Les quantités de mannose rapportées pour la molécule d'AVS native de AnTat 1.1 ne sont pas, nous l'avons déjà souligné, très éloignées de BoTat 1.1 et seraient donc plutôt en faveur d'une structure différente des deux glycosylations substituant les résidus d'asparagine.

B- Organisation moléculaire

La plus grande part de ce travail a été réalisé sur le modèle T. b. brucei.

L'étude de l'organisation moléculaire de l'antigène variable de T. b. brucei a été envisagée dans le cadre d'une collaboration avec le groupe de Biologie Moléculaire de Bruxelles qui a obtenu des résultats essentiels dans le domaine génétique des AVS en particulier avec les modèles AnTat 1.1 et 1.10. Rappelons que les gènes spécifiques des variants AnTat 1.1 et 1.10 sont entièrement établis, ce qui a permis d'établir pour ces derniers une homologie de séquence relativement importante qui les a fait regrouper et considérer dans une même "famille" de gène. Ajoutons aussi qu'un phénomène de conversion génique partielle a été décrit entre ces deux séquences.

Notre approche biochimique était de situer dans l'organisation des antigènes les sites internes possibles de recombinaison génique et aussi de tenter de situer les épitopes communs ou spécifiques de variant.

1- Etude de l'AVS AnTat 1.1 de T. b. brucei

a) étude physico-chimique

Nous avons testé en premier lieu la sensibilité de l'AVS AnTat 1.1 (fraction F2 de concanavaleine-A sépharose) vis à vis de diverses

enzymes protéolytiques. Une étude cinétique à 37° C a été réalisée pour chaque enzyme. Les résultats obtenus avec la trypsine, la protéase de S. aureus, la thermolysine et la chymotrypsine ont livré le même type de cinétique de dégradation. Est illustrée figure 32 la cinétique tryptique. On note que dès 1 heure d'hydrolyse, la molécule se scinde en donnant des fragments de taille moléculaire respective 55 000 et 43 000. A la fin de l'hydrolyse (24 heures) seul subsiste le fragment 43 000. Le fragment de taille moléculaire 20 000 n'est pas visualisé dans les conditions d'étude électrophorétique de l'hydrolysats total, sa moindre affinité tinctoriale pour le colorant utilisé en étant la raison.

1) électrophorèse et analyse amino-acide et glucidique

Après purification de l'hydrolysats tryptique de 24 heures sur une colonne de Biogel P30 (50-100 mesh ; 170 X 2 cm) équilibrée en bicarbonate d'ammonium 0,1 M pH 8,0, 2 fractions essentielles sont obtenues. L'analyse électrophorétique a montré que la fraction 1 s'identifie au fragment de taille moléculaire apparente 43 000 (figure 29). La visualisation de la fraction 2 par le bleu coomassie qui a nécessité un dépôt beaucoup plus important se constitue selon une bande diffuse correspondant à une taille moléculaire apparente de 20 000 (Figure 29). Nos études analytiques de ces 2 fractions ont permis d'une part de les localiser grâce à la séquence cDNA (Figure 31) et d'autre part de montrer que seule la fraction 2 était glycosylée (Tableau 15). En l'état actuel du travail, ce caractère glycosylé de la fraction 2 et la substitution C-terminale sont à l'origine de sa faible affinité tinctoriale.

L'analyse de ces résultats permettait de distinguer deux domaines dans la molécule.

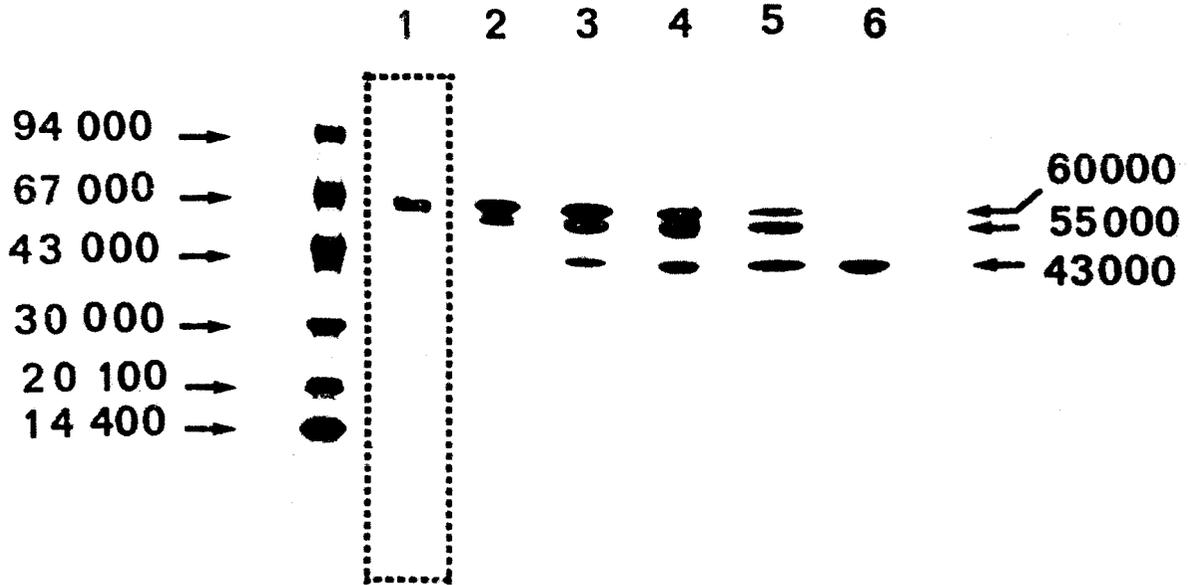
- un premier domaine, constitué des 2/3 N-terminaux, et non glycosylé,
- un deuxième domaine, constitué du tiers C-terminal, très glycosylé.

avec entre ces deux domaines une zone charnière très sensible à l'attaque protéolytique.

2) dichroïsme circulaire

Nous avons précisé l'organisation moléculaire de l'antigène par l'étude en dichroïsme circulaire de la fraction native et des fragments tryptiques représentatifs de domaines. Rappelons que l'étude du spectre dichroïque de la molécule native avait révélé une structure globale organisée

Cinétique d'hydrolyse trypsique de l'AVS natif AnTat 1.1



Etude électrophorétique en gel de polyacrylamide gradient 5-30 %
en présence de SDS

1 - t ₀	4 - t = 4 heures
2 - t = 1 heure	5 - t = 8 heures
3 - t = 2 heures	6 - t = 24 heures

FIGURE 32

avec 43 % d'hélice α et 8 % de feuillets plissés β . Nous avons analysé la contribution de chaque fraction sur le spectre dichroïque obtenu à partir de l'antigène non clivé (Figure 33). Le spectre de la fraction amino-terminale s'est révélé sensiblement identique à celui de la molécule native. A l'opposé, la fraction C-terminale apparaissait inorganisée dépourvue d'ellipticité à 214 nm et 222 nm.

Ce résultat amène à considérer que la structure secondaire de l'antigène variable est essentiellement le fait du domaine N-terminal de la molécule.

Le suivi en dichroïsme circulaire d'une hydrolyse trypsique de l'antigène (Figure 33) est démonstratif et confirme les résultats sur fractions isolées dialysées et lyophilisées. Ces derniers traitements auraient pu pour la partie C-terminale être à l'origine d'une dénaturation expliquant son caractère inorganisé. Au total, il n'y a donc pas désorganisation de la structure secondaire au cours de la coupure trypsique et la séparation des deux domaines moléculaires par une zone "intermédiaire" jouant un rôle charnière peut être retenue.

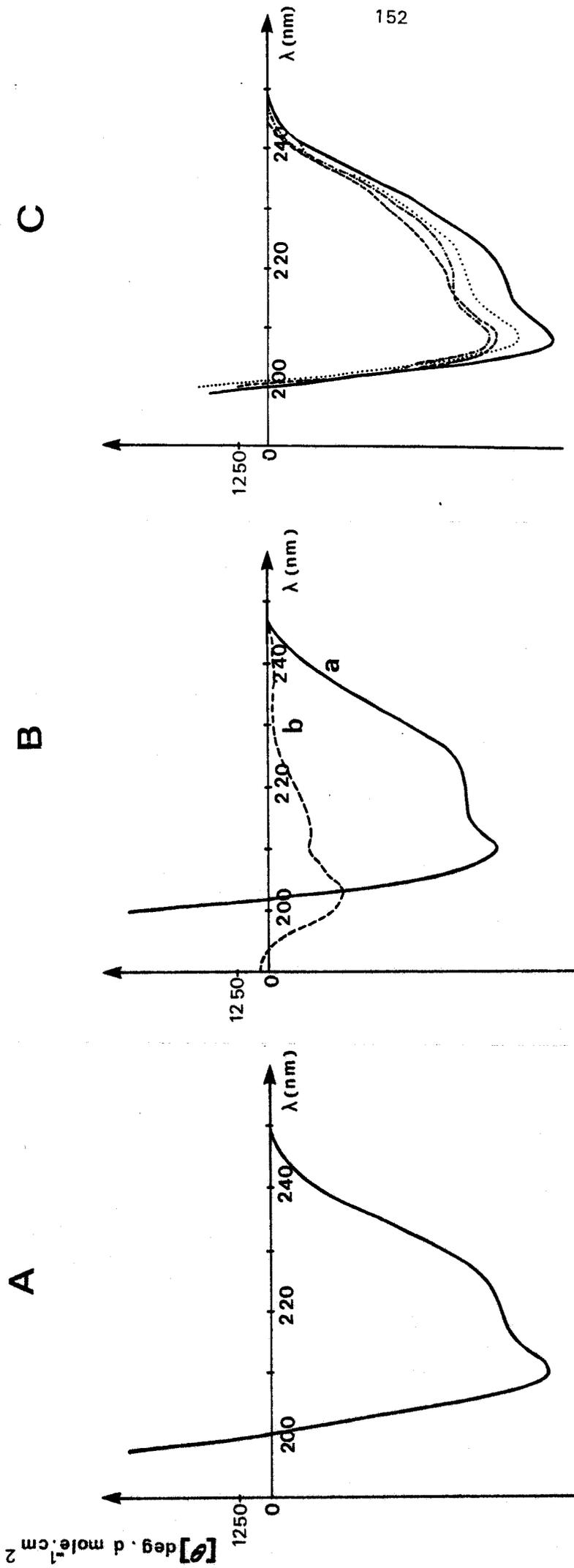
b) étude immunologique

En vue de préciser l'insertion du ou des épitopes au niveau des domaines ou de la zone charnière, nous avons entrepris une analyse immunologique comparative de chaque fraction trypsique N- et C- terminale. Différents immunosérums ont été utilisés. En particulier, une immunisation chez le lapin a été développée à partir des antigènes variables (fraction préparative F2) de variants AnTat 1.1, 1.10 et 1.8. L'antigène AnTat 1.1 natif et les fractions trypsiques ont été analysées en immunoblot vis-à-vis des immunosérums issus de chaque variant (Figure 34).

L'observation des immunoblots montre :

- que l'antigène natif AnTat 1.1 est révélé par tous les immunosérums anti-antigène utilisés soit les immunosérums anti-AVS AnTat 1.1, 1.10 et 1.8.
- que la fraction amino-terminale de l'antigène AnTat 1.1 ne réagit qu'avec les immunosérums anti-AVS AnTat 1.1 et 1.10 et pas vis-à-vis de l'immunosérum anti-AVS AnTat 1.8.

SPECTRES DICHROÏQUES



A - AVS AnTat 1-1 natif

B- Fractions tryptiques purifiées : a- 2/3 N-terminaux ; b- 1/3 C-terminal

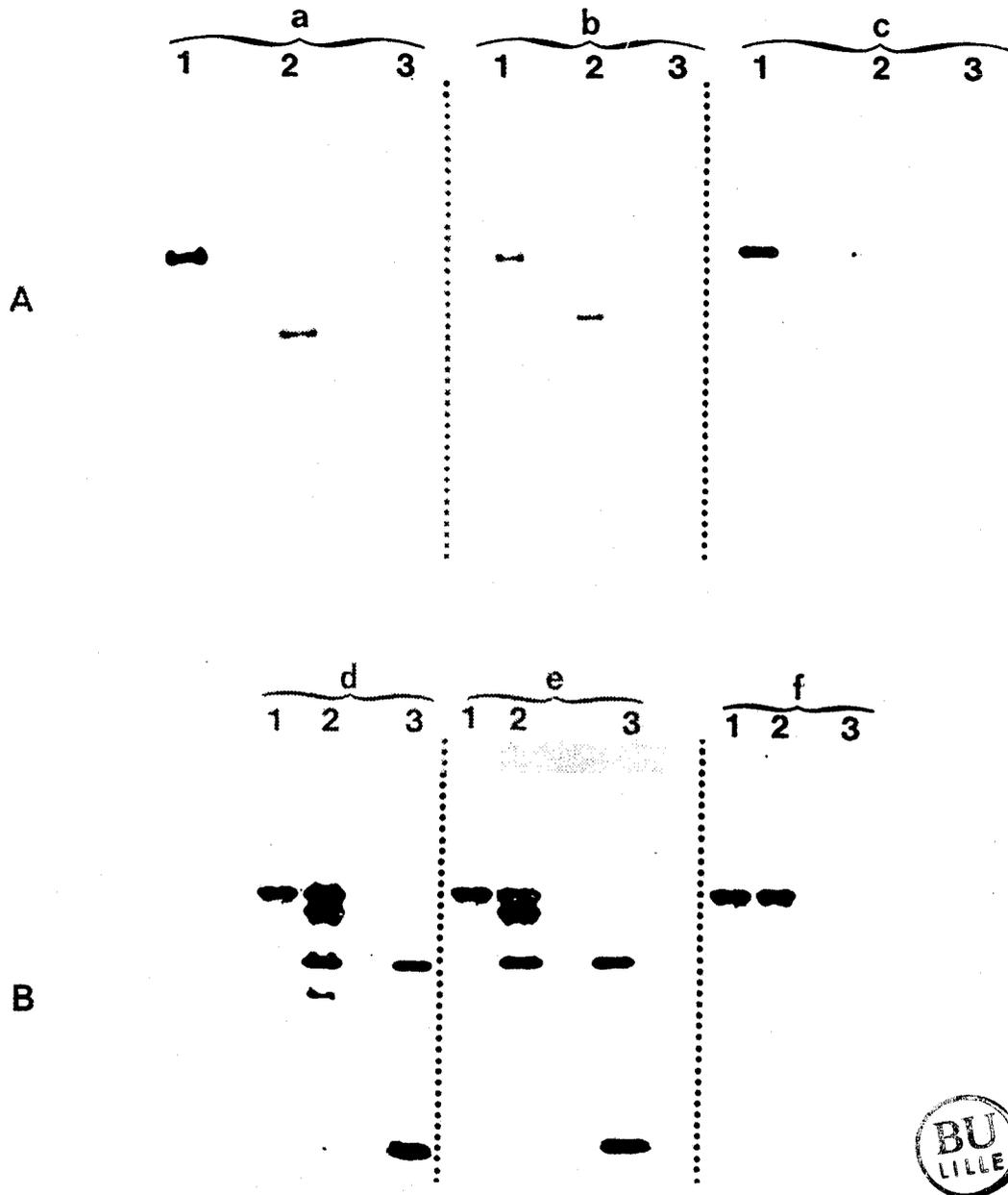
C- Hydrolysats tryptiques prélevés après différents temps d'incubation :

t₀;..... t=2 heures;---. t=8 heures;---
t=24 heures _____



FIGURE 33

Révélation immunologique après électrophorèse en gel
de polyacrylamide gradient 5-30 % en présence de SDS



- A Transfert électrophorétique de l'antigène natif (1), de sa fraction tryptique N-terminale (2), de sa fraction tryptique C-terminale (3), puis incubation respectivement avec l'antisérum anti-AVS AnTat 1.1 (a), AnTat 1.10 (b) et AnTat 1.8 (c).
- B Transfert électrophorétique de l'antigène natif (1) et de l'hydrolysats tryptique à t 4 h (2), t 24 h (3), puis incubation respectivement avec l'antisérum anti-AVS AnTat 1.1 (d), AnTat 1.10 (e) et AnTat 1.8 (f).

FIGURE 34

- que le domaine carboxy-terminal n'est révélé ni par l'immunsérum homologue ni par les immunsérums hétérologues mais on sait que l'obtention d'un immunsérum riche en anticorps dirigés contre le site antigénique commun (CRD) nécessite une immunisation particulière avec de faibles quantités d'antigène (CROSS (1979) (47)), ce qui n'a pas été le cas dans notre protocole d'immunisation.

Ces résultats mettent en évidence une immunogénicité très différente de chaque domaine moléculaire et le rôle privilégié de la région N-terminale de l'AVS. Pour confirmer signalons que MILLER et coll. (1984) (178) (179) qui ont préparé des anticorps monoclonaux à partir de l'AVS MiTat 1.6 ont aussi signalé une réactivité vis-à-vis d'épitopes uniquement localisés dans les 2/3 N-terminaux.

La réaction croisée entre les domaines N-terminaux des variants AnTat 1.1 et 1.10 peut aisément s'expliquer par les larges zones d'homologie de séquence peptidique entre les deux antigènes et au total, la réactivité immunologique hétérologue de l'AVS AnTat 1.1 vis-à-vis de l'immunsérum anti-AVS AnTat 1.10 apparaît supportée pour l'essentiel par le domaine amino-terminal des 2 antigènes.

La réponse positive de l'AVS AnTat 1.1 vis à vis de l'immunsérum anti-AVS AnTat 1.8 n'est retrouvée dans aucun des deux domaines N- et C-terminaux purifiés. Une hypothèse serait d'admettre dans ce cas une responsabilité de la zone charnière inter-domaines. Afin de préciser ce point nous avons testé différents temps d'hydrolyses trypsiques sur de l'AVS AnTat 1.1 vis-à-vis des différents immunsérums (Figure 34). L'immuno réactivité au niveau de la partie amino-terminale vis-à-vis des immunsérums anti-AVS AnTat 1.1 et 1.10 s'est vue confirmée par la révélation des fragments 55 000 et 43 000. Avec l'immunsérum anti-AVS AnTat 1.8 aucun produit de clivage n'était révélé et en particulier le fragment 55 000 était négatif. Ceci indiquerait donc que le clivage initial par la trypsine, livrant le fragment 55 000 intermédiaire a déjà détruit le site antigénique croisé ou autre hypothèse, si l'on retient la notion

Nous remercions le docteur Vervoort (Laboratoire de sérologie de Anvers) pour la préparation d'immunsérums à partir des antigènes variables purifiés.

d'une certaine renaturation au cours du transfert sur nitrocellulose, que l'épitope hétérologue 1.1/1.8 pourrait résulter d'un site conformationnel des deux domaines.

Signalons d'autre part que l'immunsérum anti-AVS AnTat 1.1 réagit contre la forme monomère de l'antigène du variant AnTat 1.8 mais pas contre la forme dimère de ce même antigène. Ce résultat tend aussi à montrer l'influence de la conformation moléculaire sur les épitopes spécifiques.

Tenter de définir l'organisation moléculaire de l'antigène variable en partant des données de structure primaire, étudier les modes d'association de cet antigène devenaient indispensables pour comprendre et préciser les sites épitopiques.

- c) étude prédictive de structure issue des données de séquence cDNA

La connaissance de la séquence cDNA du variant AnTat 1.1 permettait d'envisager

- 1- une étude statistique de l'hydrophilie/hydrophobie relative le long de l'axe peptidique
- 2- une étude prédictive de la structure secondaire selon la méthode de Chou et Fasman (1978) (38).

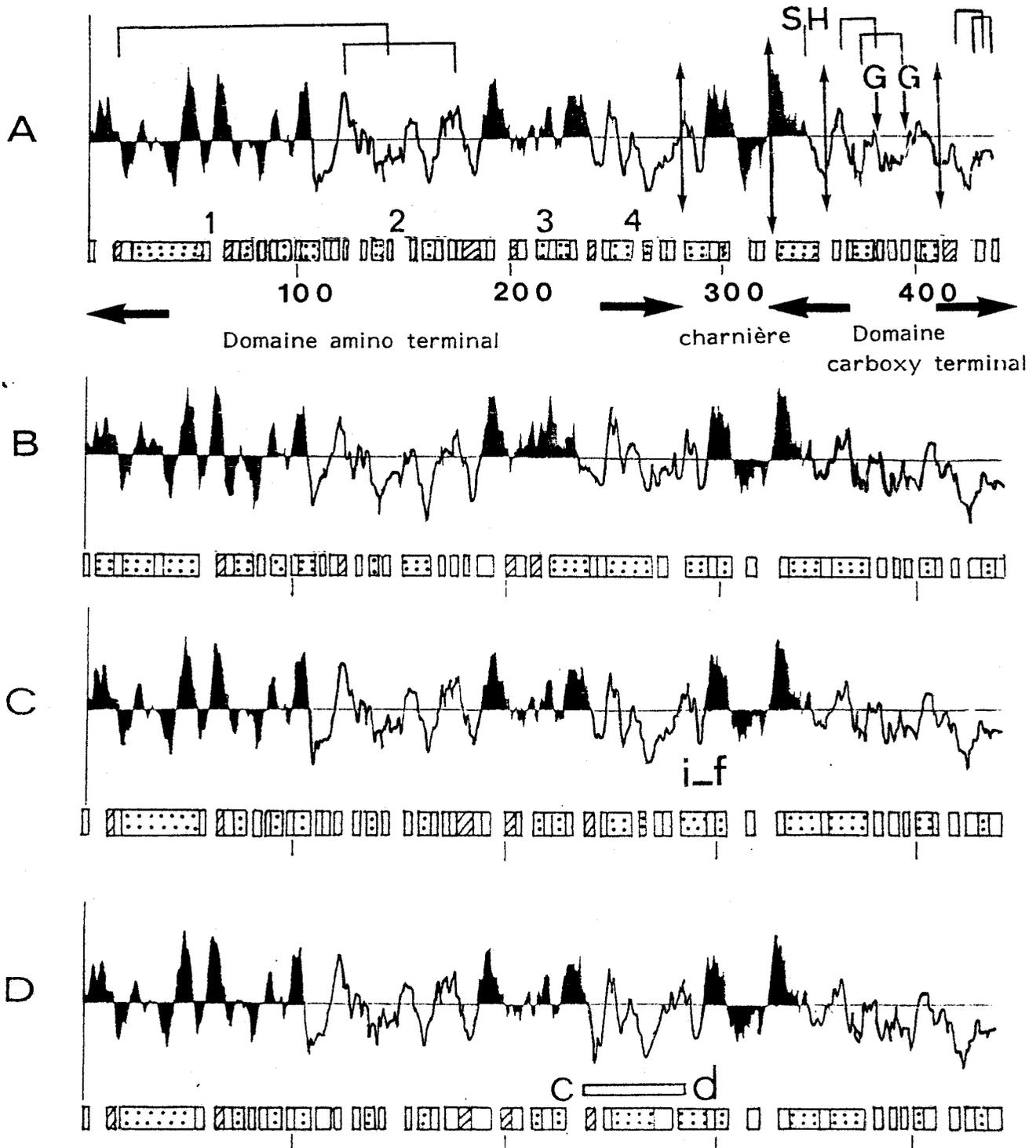
Les résultats sont présentés dans la Figure 35A.

On note une alternance de zones hydrophiles (séquences 108-193, 247-295, et 354-451) et de zones hydrophobes (séquences 194-246 et 296-353).

La structure secondaire prédite dans son ensemble comprend 36 % de structure hélicoïdale et 7 % de feuillets plissés, valeurs tout à fait confirmées par les résultats expérimentaux de spectre dichroïque (43 % et 8 % respectivement).

Nous avons indiqué sur le schéma la localisation des sites de clivage tryptique, les positions des résidus de cystéine et celle des sites de

Etude de l'hydrophilie/hydrophobie relative et de la structure secondaire prédictionnelle



- ▤ hélice
- ▨ feuilletés plissés
- coude β

A : AVS AnTat 1.1a

B : AVS AnTat 1.10

C : AVS AnTat 1.1c et AnTat 1.1h

D : AVS AnTat 1.1b

d, i et f représentent les limites internes 3' de conversion respectivement pour les clones AnTat 1.1b, 1.1h et 1.1c

c représente la limite interne 5' de conversion du clone AnTat 1.1b

FIGURE 35

glycosylation potentielle. L'ensemble de ces données met en évidence une organisation moléculaire où l'on peut retenir :

- Un domaine C-terminal (1/3 de la molécule) particulièrement hydrophile et inorganisé avec la présence d'un potentiel élevé de structure en coude. On sait que cette région, riche en résidus de cystéine, est relativement conservée dans sa séquence amino-acide pour les différents antigènes. De plus en 1983, ALLEN et GURNETT (4) ont établi sur l'AVS 117 l'appariement des thiols en ponts disulfure, appariement qui peut, par analogie, être appliqué sur l'AVS AnTat 1.1 et qui fait alors apparaître l'importance d'un 13ème thiol non engagé dans un pont disulfure.

- un domaine N-terminal (environ 2/3 de la molécule) que l'on peut partager en 4 régions en fonction de la courbe d'hydrophilie/hydrophobie.

. la région 1 (1.107) caractérisée par une variation importante de la courbe de polarité et présentant un potentiel statistique élevé pour une structure α hélicoïdale,

. la région 2 (108-193) plutôt hydrophile et présentant une densité en coudes β ,

. les régions 3 (194-246) et 4 (247-295) successivement hydrophobe et hydrophile apparaissant former une structure organisée surtout par des hélices α .

Deux ponts disulfure stabilisent les agencements respectifs des régions 1 et 2 en double boucle.

- une zone charnière entre les deux domaines, caractérisée par une crevasse hydrophile (318-333) entre 2 groupes hydrophobes. Cette crevasse coïncide avec une région inorganisée avec 2 coudes β , qui est entourée par des hélices α relativement longues. On trouve dans cette cassure le site majeur de clivage trypsique (335-336).

L'utilisation de la séquence du variant AnTat 1.10 (Figure 35B) a donné des résultats très voisins de ceux obtenus avec le variant AnTat 1.1 tant sur le plan de l'évolution de la courbe d'hydrophilie/hydrophobie que sur le plan de la répartition des structures secondaires prédites.

Nous avons rapproché ces résultats du mode d'organisation des antigènes AnTat 1.1 et 1.10 des limites partielles de conversion génique déterminées par PAYS et son groupe. Lors des variations antigéniques AnTat 1.10 \rightarrow AnTat 1.1b, AnTat 1.10 \rightarrow AnTat 1.1c et AnTat 1.10 \rightarrow AnTat 1.1h, le phénomène de

duplication-transposition n'affecte qu'une partie de la séquence code de l'AVS AnTat 1.10. Ce processus livre un antigène dont la partie carboxy-terminale reste celle de l'AVS AnTat 1.10 alors que la partie amino-terminale est copiée à partir de la séquence code de l'AVS AnTat 1.1. Pour les variants AnTat 1.1c et AnTat 1.1h, la séquence spécifique du variant AnTat 1.1 est l'unique modèle, les limites 3' de ces recombinaisons sont respectivement localisées dans les zones 291-293 et 294-298.

Pour le variant AnTat 1.1b, deux conversions successives se produisent. Il en résulte que la partie amino-terminale (1-243/246) dérive toujours de la séquence code de l'AVS AnTat 1.1 alors qu'un autre membre de la famille génique AnTat 1.1 constitue le modèle pour une conversion affectant la zone intermédiaire 243/246 - 291/293.

La concrétisation de ces recombinaisons est illustrée sur le schéma d'organisation moléculaire (figure 35C pour AnTat 1.1c et 1.1h, Figure 35D pour AnTat 1.1b). Plusieurs remarques intéressantes peuvent être déduites de cette confrontation de données.

1- les limites 3' sont toutes regroupées dans une zone correspondant à la fin du domaine amino-terminal tel que nous l'avons décrit. L'antigénicité spécifique des variants est donc supportée par ce domaine moléculaire.

2- Les limites coïncident avec une jonction entre deux régions de polarité différente. La remarque s'applique aux limites 3' mais peut être faite pour la limite 5' de la conversion additionnelle du variant AnTat 1.1b. Cette conversion additionnelle couvre en effet entièrement la région hydrophile de la fin du domaine amino terminal (région 4).

3- Les AVS AnTat 1.1c et 1.1h sont caractérisés par une même séquence peptidique et leur domaine amino-terminal est celui de l'AVS AnTat 1.1a. En revanche, l'AVS AnTat 1.1b dérive d'un autre modèle que la séquence du gène AnTat 1.1 au niveau de la région 4 d'environ 50 amino-acides. Toutefois, le variant AnTat 1.1b ne diffère dans cette région par rapport aux autres variants AnTat 1.1 que par 7 amino acides en positions respectives 247 (Ser -- Ala), 249 (Ala -- Val), 252 (Ser -- Asn), 256 (Leu -- Phe), 264 (Gly -- Ala), 274 (Asp -- Glu), et 281 (Glu -- Ala). En dépit de ces modifications, la spécificité antigénique de variant est toujours celle de AnTat 1.1. En conséquence, cette partie de la molécule est vraisemblablement enfouie à l'intérieur du manteau de surface et n'est pas une contribution épitopique potentielle.

En conclusion, il est clair que les localisations des limites de conversion génique sont en rapport avec la distinction des régions et domaines moléculaires. Les limites 3' des différentes recombinaisons sont toutes retrouvées à la fin du domaine amino-terminal et le seul remplacement de ce domaine amino-terminal suffit donc pour avoir une variation antigénique.

Le processus de recombinaison serait favorisé au niveau d'une zone jonctionnelle permettant la création d'une séquence chimérique dont seule la portion fonctionnelle au niveau de la spécificité antigénique serait modifiée par rapport à la séquence spécifique du variant précédent. Autre élément intéressant, la conversion additionnelle pour le variant AnTat 1.1b se traduit par le remplacement intégral de la région 4 hydrophile par une autre région dont les caractéristiques de polarité sont tout à fait similaires. Une configuration en régions hydrophobes et hydrophiles apparaît ainsi nécessaire pour définir des sites d'interactions spécifiques entre antigènes à la surface du parasite.

2- Etude comparative avec d'autres variants issus de T. b. brucei et de T. equiperdum

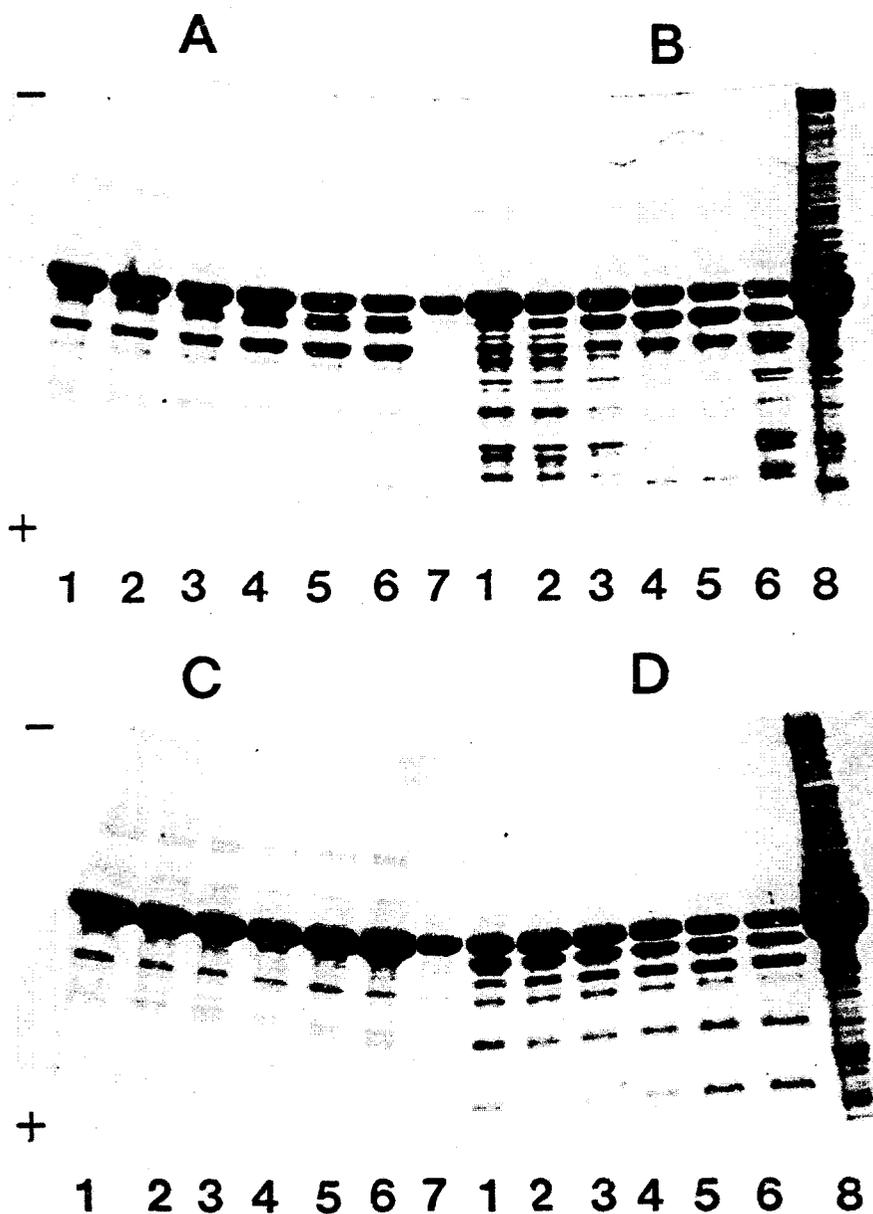
a) sensibilité aux enzymes protéolytiques

L'organisation moléculaire en deux domaines couvrant respectivement les 2/3 N-terminaux et le tiers C-terminal semble être une caractéristique retrouvée pour l'ensemble des antigènes variables de diverses espèces. Les hydrolyses enzymatiques effectuées sur d'autres AVS de T. b. brucei (JOHNSON et CROSS (1979) (135)) ainsi que sur l'AVS BoTat 1 natif (Figure 36) se traduisent par un profil de découpe moléculaire tout à fait analogue à celui de l'AVS AnTat 1.1, avec en particulier l'apparition d'un fragment de taille moléculaire proche de 43 000 résistant vis-à-vis de l'attaque protéolytique. L'originalité de l'AVS BoTat 1 concernant la présence d'une structure oligomannosidique dans la partie amino-terminale (position 57) ne semble donc pas provoquer une organisation différente des domaines moléculaires.

b) organisation moléculaire

Nous avons utilisé les résultats de séquence peptidique pour réaliser une étude comparative systématique de l'organisation moléculaire de

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



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

FIGURE 36

différents variants de T. b. brucei et de T. equiperdum. La figure 37 illustre les résultats des AVS AnTat 1.1, 117 et IITat 1.3 de T. b. brucei et de l'AVS BoTat 1 de T. equiperdum. Pour le variant BoTat 1 nos résultats de séquence amino-acide ont été complétés par ceux de séquences cDNA, résultats non publiés qui nous ont été communiqués personnellement par le Docteur EISEN (Laboratoire d'Immunoparasitologie, Institut Pasteur de Paris). Un nombre de points communs peuvent être soulignés :

- l'alternance des zones hydrophiles et hydrophobes analogue à celle décrite pour l'AVS AnTat 1.1,
- le caractère inorganisé de la partie C-terminale
- néanmoins, il existe des différences de répartition de structure secondaire dans la partie amino-terminale d'un AVS à l'autre. En particulier, l'AVS IITat 1.3 se distingue par l'absence de grandes zones hélicoïdales dans la région 1 (2 % de la protéine totale par rapport à 16 % pour l'AVS AnTat 1.1).

C- Polymorphisme

L'organisation en manteau des antigènes de surface que nous étudions est un élément déterminant si l'on veut approcher la microphysiologie membranaire du parasite et aller vers une meilleure compréhension de l'antigénicité au cours de la variation.

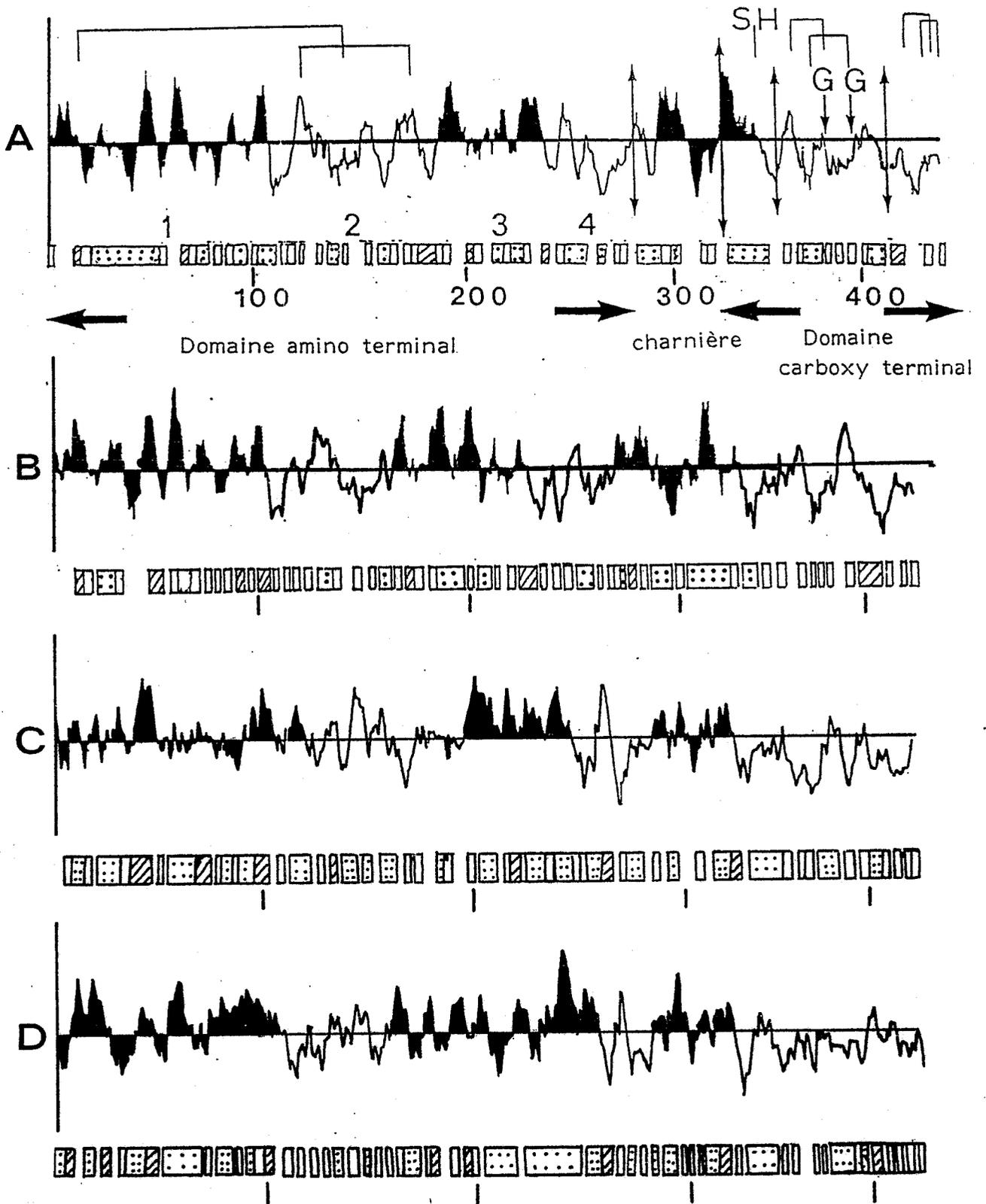
Pour aborder ces problèmes de polymérisation éventuelle de l'antigène nous avons fait appel en présence ou en l'absence de détergent à des études de gel-perméation et d'électrophorèse.

1. Aspect de polymérisation des antigènes variables purifiés

Dans un précédent chapitre où nous établissions par électrophorèse SDS le critère de pureté et la taille moléculaire apparente de l'antigène nous avons noté un comportement différent pour les variants BoTat 1 de T. equiperdum et AnTat 1.1 de T. b. brucei.

Pour BoTat 1, nous disposons seulement de la fraction glycoprotéique éluée de la colonne de concanavoline A sépharose par l' α -méthyl-D-mannoside 10 %. Pour AnTat 1.1, nous avons étudié parallèlement la fraction glycoprotéique F2 obtenue dans des conditions analogues à celle de BoTat-1 et la fraction

-162-
 Etude de l'hydrophilie/hydrophobie relative et de
 la structure secondaire prédictionnelle



 hélice
 feuillets plissés
 coude β

A : AVS AnTat 1.1
 B : AVS IIat 1.3
 C : AVS BoTat 1
 D : VSG 117



Figure 37

glycoprotéique F3 éluée par addition de β -mercaptoéthanol (1 %) à l' α -méthyl-D-mannoside 10 %.

- a) comportement de l'antigène variable purifié en présence de SDS

Rappelons qu'en électrophorèse, en présence de SDS et en l'absence d'agent réducteur, l'AVS BoTat 1 apparaît sous forme monomère tandis que l'AVS AnTat 1.1 apparaît essentiellement sous forme dimère. Ce comportement dimérique de l'antigène du variant AnTat 1.1 est supprimé par traitement préalable par le β -mercaptoéthanol (5 % v/v, 100° C 3 minutes).

Cette étude a été confirmée par une analyse en chromatographie liquide de haute performance sur colonne TSK S W G4000 équilibrée en tampon phosphate de sodium 0,1 M de pH 7 contenant 0,1 % de SDS. Les chromatogrammes sont représentés figure 38 :

. l'antigène BoTat 1 est élué selon un pic majeur correspondant à une protéine de taille moléculaire apparente proche de 60 000. Dans ces conditions, l'antigène est capable de former en faible proportion des associations polymérisées dimériques.

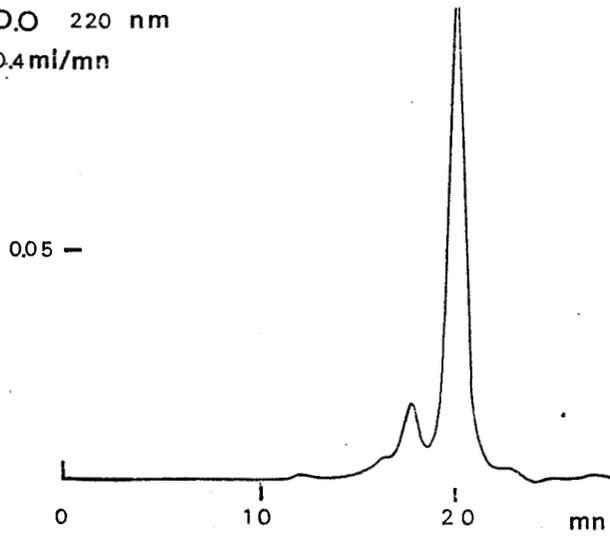
. pour l'antigène AnTat 1.1, la fraction F2 donne un pic majeur dont le temps de rétention correspond à un dimère avec en quantité plus faible des formes d'élution à degré supérieur de polymérisation. La fraction F3 se caractérise par rapport à F2 en la présence d'un pic supplémentaire correspondant au monomère.

L'ensemble des résultats suggèrent alors que pour l'AVS AnTat 1.1 à la différence de l'AVS BoTat 1, la préparation antigénique native est associée en dimère, association qui pourrait être en relation avec la notion de pontage disulfure inter-AVS.

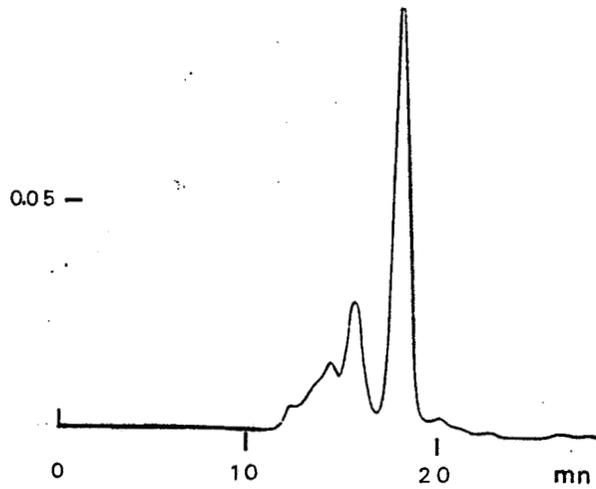
Jusqu'à présent, un seul antigène (AVS 117 de T. b. brucei) isotype de notre variant AnTat 1.8 a été étudié en ce qui concerne la position et l'organisation des ponts disulfure. La molécule contenant 13 résidus de cystéine est organisée par ponts disulfure intrachânes en "boucles" disposées respectivement dans la partie amino-terminale (2 boucles) et dans la partie carboxy-terminale (4 boucles). Le 13ème résidu de cystéine en position centrale 244 correspond à un thiol libre ; Selon ALLEN et GURNETT (1983) (4), ce

Chromatographie liquide haute performance de gel perméation
(colonne Beckman TSK SW G4000)

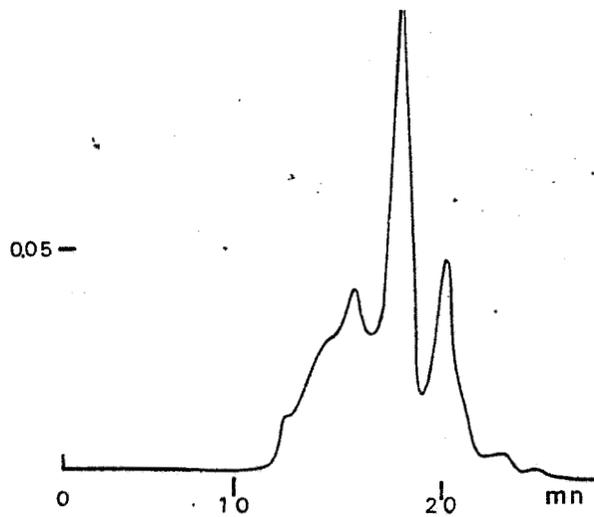
D.O 220 nm
0,4ml/mn



AVS BoTat-1



F2 AnTat 1-1



F3 AnTat 1-1



Profils d'élution en tampon phosphate de sodium 0,1 M de pH 7,0
contenant 0,1 % de SDS

résidu serait enfoui dans un repliement de la partie amino-terminale et ne se prêterait donc pas à la formation de ponts disulfure.

La figure 39 représente la position relative des résidus de cystéine dans les AVS BoTat 1 (8 résidus) et AnTat 1.1 (13 résidus) par rapport à l'AVS 117. En fonction de la position très conservatrice des résidus de cystéine, position superposable d'un variant à l'autre dans les parties amino et carboxy-terminales de l'antigène, on peut envisager pour les AVS BoTat 1 et AnTat 1.1 une organisation de ponts disulfure intrachânes analogue à celle démontrée pour l'AVS 117. Le résidu de cystéine intermédiaire qui n'existe pas dans l'AVS BoTat 1 de T. equiperdum est présent dans l'AVS AnTat 1.1 mais localisé différemment par rapport à l'AVS 117 c'est-à-dire dans une position en limite C-terminale de la zone que nous avons qualifiée de "charnière" ou région inter-domaines. Cette observation nous conduit vers l'hypothèse d'une disponibilité plus grande du 13ème thiol dans notre modèle pour permettre une liaison disulfure inter-AVS à ce niveau.

Dans le cas du variant AnTat 1.8 dont la séquence amino acide est pratiquement identique à celle de l'AVS 117, nos études électrophorétiques et chromatographiques ont montré que l'antigène selon les protocoles de purification pouvait être obtenu sous forme monomère ou dimère. Ce fait, qui témoigne d'une facilité moindre pour cet AVS à former une liaison intermoléculaire, peut être noté au crédit de notre hypothèse. L'accessibilité de dimérisation par l'intermédiaire des résidus de cystéine centraux étant différente selon leur position en séquence.

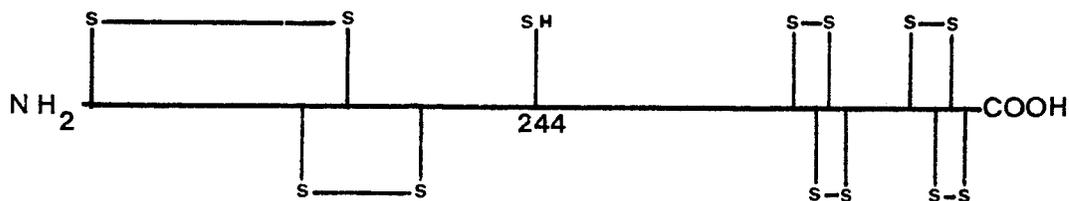
- b) mise en évidence de la présence et de l'absence d'un thiol libre respectivement dans les formes monomériques et dimériques

Nous avons traité par l'iodo ^{14}C acétamide en présence d'urée 8 M les préparations antigéniques "dimériques" des variants AnTat 1.1, 1.10 et 1.8 et une préparation antigénique "monomérique" du variant AnTat 1.8. Après dialyse, les échantillons ont été analysés en électrophorèse-SDS en présence ou en absence de β -mercaptoéthanol. Les révélations par le bleu coomassie et les autoradiographies sont illustrées figure 40.

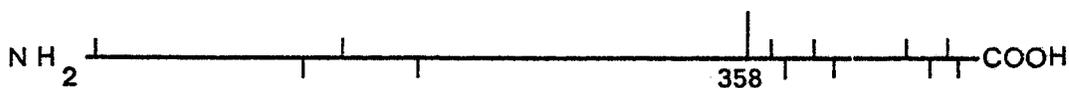
Lorsque les électrophorèses sont réalisées en l'absence de traitement préalable par un agent réducteur, on constate que les dimères ne sont jamais radioactifs, et que les monomères apparaissent marqués au prorata de leur présence dans

Position des résidus de cystéine dans les AVS 117, AnTat 1.1 et BoTat 1.

AVS 117



AVS AnTat 1-1



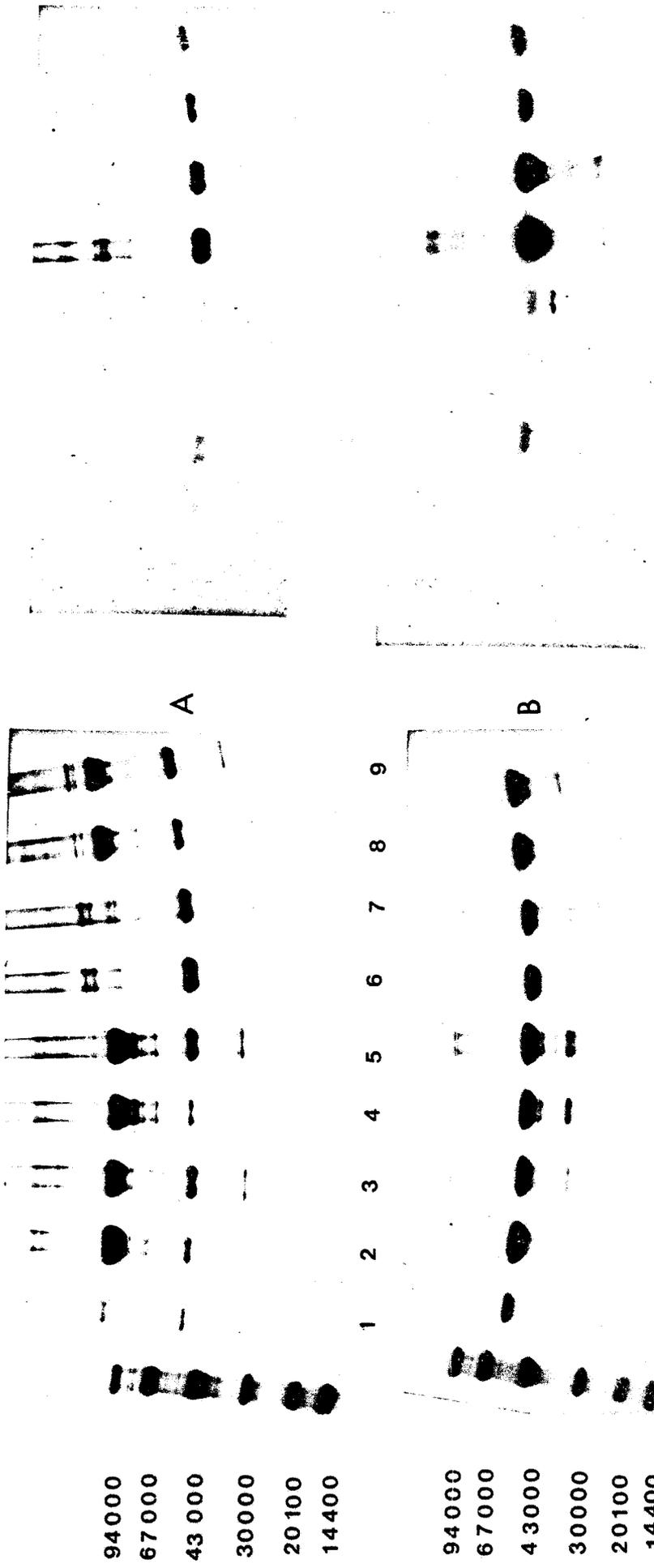
AVS BoTat 1



Organisation des ponts disulfure dans l'AVS 117 selon Allen et Gurnett (1982)

FIGURE 39

Marquage par l'iode (^{14}C) acetamide des fractions F2 et F3 des variants de *T. b. brucei*
 Etude comparative entre différentes préparations par électrophorèse sur gel
 de polyacrylamide en présence de SDS



Autoradiographie

Coloration par le bleu de Coomassie

1. Fraction F2 AnTat 1.1 non marquée
2. Fraction F2 AnTat 1.1
3. Fraction F3 AnTat 1.1
4. Fraction F2 AnTat 1.10
5. Fraction F3 AnTat 1.10
6. Fraction F2 AnTat 1.8 préparation monomérique
7. Fraction F3 AnTat 1.8 préparation monomérique
8. Fraction F2 AnTat 1.8 préparation dimérique
9. Fraction F3 AnTat 1.8 préparation dimérique

- A. Tampon de dissolution des échantillons : Tris-HCl 0,0625 M, SDS 2 %, glycérol 10 %, pH 6,8
- B. Tampon de dissolution des échantillons : Tris-HCl 0,0625 M, SDS 2 %, β -mercaptoéthanol 5 %, glycérol 10 %, pH 6,8.



FIGURE 40

l'échantillon. Si les électrophorèses sont réalisées après un traitement préalable par le β -mercaptoéthanol une radioactivité importante est mise en évidence au niveau des fractions F2 et F3 de la préparation monomérique du variant AnTat 1.8, alors que les autres fractions apparaissent marquées de façon négligeable.

Ces résultats montrent, pour les variants AnTat 1.1, 1.10 et 1.8, la présence d'un thiol libre dans les formes antigéniques monomères et l'absence de ce thiol libre dans les formes antigéniques dimères.

Dans les deux espèces de trypanosome, les résultats de chromatographie HPLC en présence de SDS avaient d'autre part montré une faible proportion :

- de formes plus hautement polymérisées que le dimère pour AnTat 1.1
- et de formes dimères pour BoTat 1.

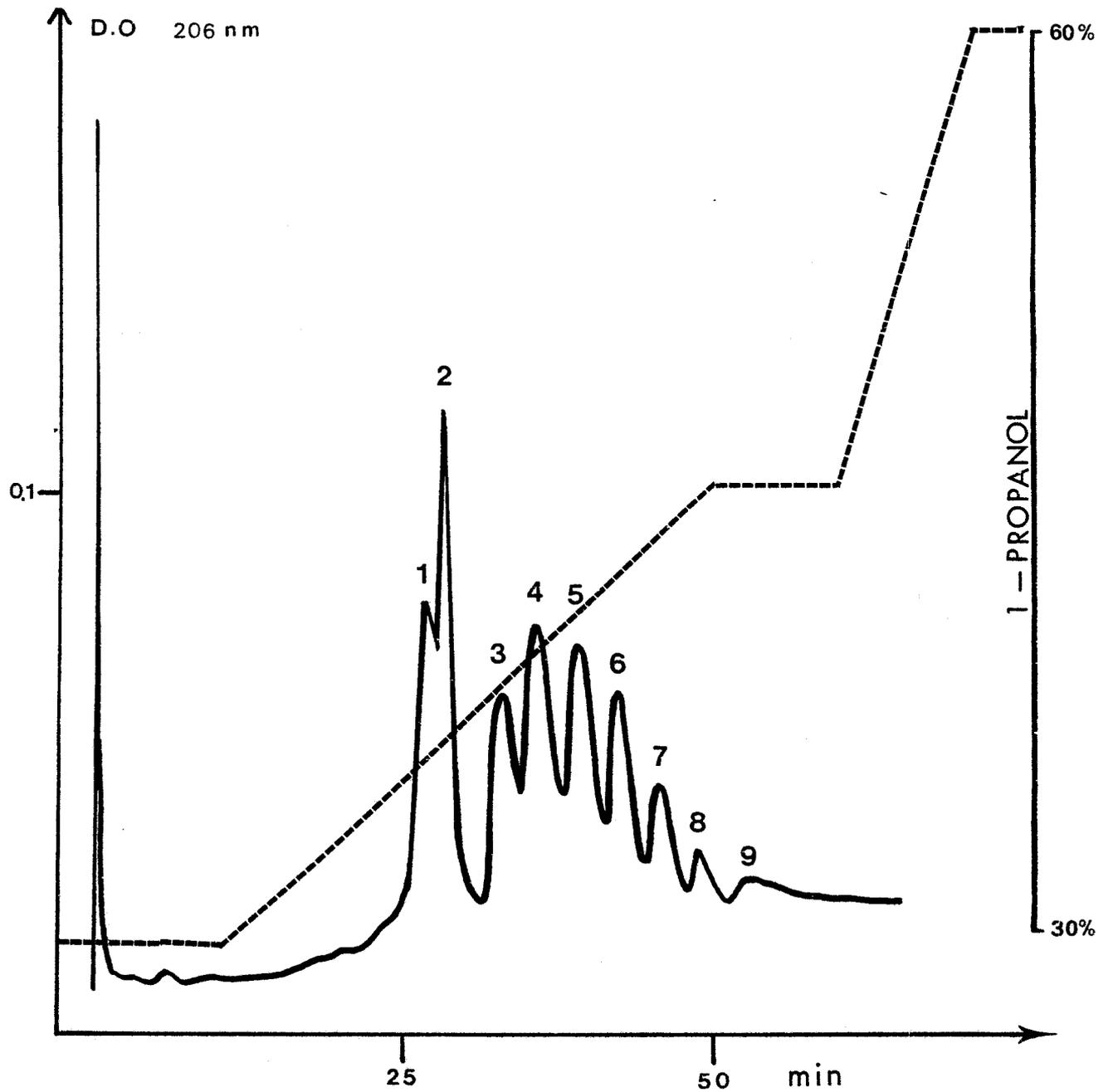
Ce constat conduisait par conséquent à envisager d'autres facteurs potentiels d'organisation des AVS, liés peut-être à une hétérogénéité moléculaire des antigènes variables.

- c) mise en évidence d'une hétérogénéité moléculaire par chromatographie HPLC en phase inverse

Nous avons utilisé une colonne type RPSC-ultrapore C₃ (taille des pores 300 Å, 4,6 X 75 mm) et retenu un gradient d'élution à l'aide d'une solution aqueuse de formiate d'ammonium 0,003 mM (solvant A) et de propanol-1 à 60 % (solvant B) selon le système suivant : 33 % B, 10 minutes ; 33-45 % B, 40 minutes ; 45 % B, 10 minutes ; 45 - 100 % B, 10 minutes. Les quantités d'échantillons déposés étaient de 100 à 150 µg. Un débit de 1 ml par minute était retenu.

Dans ces conditions, la fraction F2 du variant AnTat 1.1 s'est "dispersée" en 9 sous-fractions, séparées en deux "groupes", les sous-fractions 1 et 2 d'une part et les sous-fractions 3 à 9 d'autre part (Figure 41). Par immunoblotting vis-à-vis de l'immunsérum homologue nous avons démontré et vérifié que chaque pic correspondait bien à une fraction d'antigène variable. Les sous-fractions 1 à 7, obtenues en quantité suffisante, ont été analysées en deuxième étape en chromatographie HPLC de gel filtration en présence de SDS à 0,1 %. L'examen comparatif des profils d'élution a mis en évidence un degré de polymérisation croissant avec le caractère hydrophobe

Chromatographie liquide haute performance en phase inverse
(colonne Beckman RPSC - ultrapore C₃)



Système d'éluion : Solvant A, 0,003 mM formiate d'ammonium
Solvant B, 1-propanol a 60%



Conditions du gradient : 33 % B, 10 minutes ; 33-45 % B, 40 minutes ; 45 % B,
10 minutes ; 45 - 100 % B, 10 minutes.

FIGURE 41

des sous-fractions (Figure 42). En effet, les formes dimères diminuent progressivement et les deux fractions les plus hydrophobes (fractions 6 et 7) ne sont plus représentées pratiquement que par de très hauts polymères de poids moléculaire égal ou supérieur à 600 000, valeur limite supérieure d'efficacité de la colonne de gel-perméation utilisée.

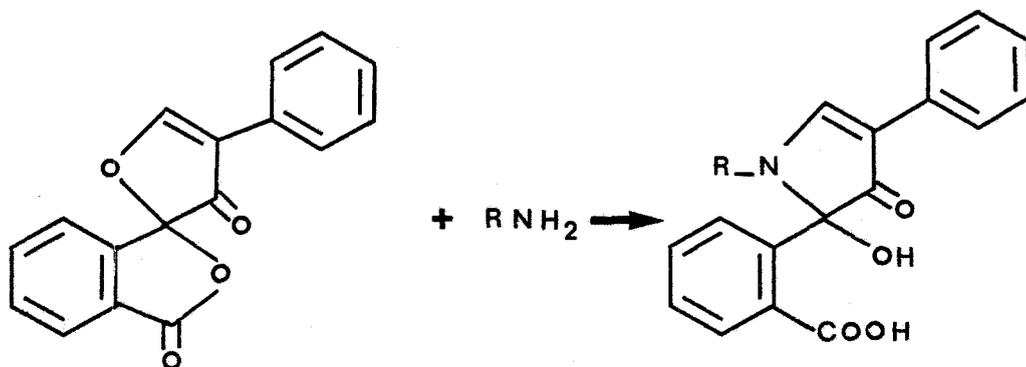
En fonction de ce résultat on peut donc émettre l'hypothèse d'une certaine "hétérogénéité" des antigènes variables au profit d'un caractère associatif intermoléculaire. Pour éviter et éliminer toute hypothèse d'artéfact lié aux étapes successives de concentration, de dialyse, de lyophilisation des antigènes variables nous avons vérifié le comportement des AVS sur colonne RPSC ultrapore C3 dès le stade de libération de l'antigène à savoir le surnageant pH 5,5 initial. Un profil tout-à-fait identique à celui présenté pour l'antigène purifié a été retrouvé. Ainsi cette deuxième possibilité associative inter-AVS lié au caractère hydrophobe variable des antigènes peut-elle être retenue dans les mécanismes moléculaires d'agencement en manteau de surface des antigènes.

d) Comportement de l'antigène variable purifié en l'absence de SDS

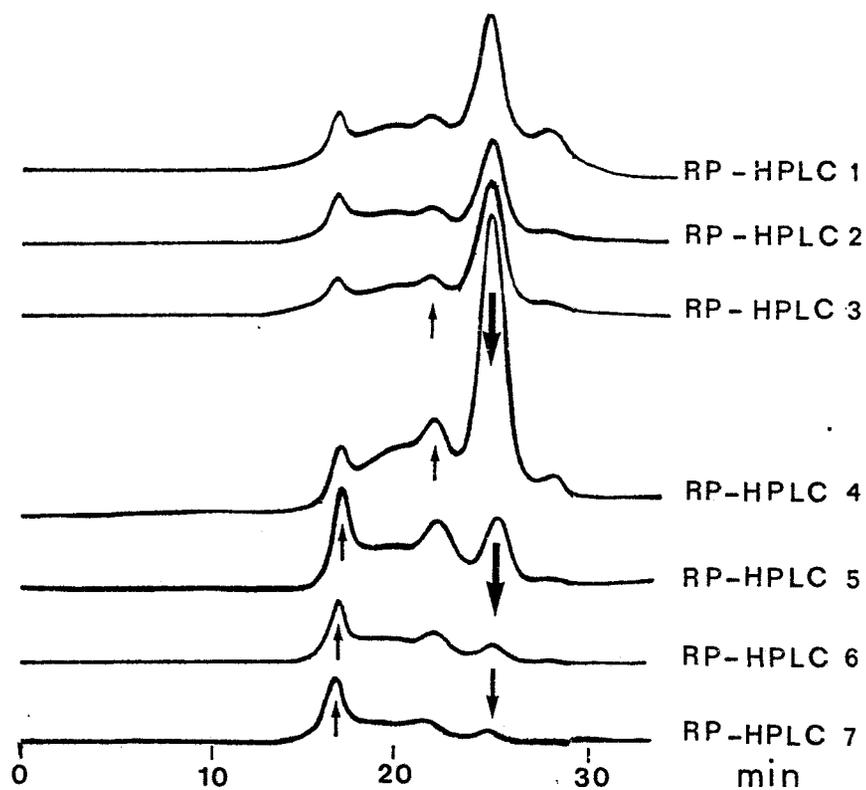
Le comportement des antigènes en l'absence de détergent a été également étudié en électrophorèse et en chromatographie HPLC. Il apparaît important d'éliminer de notre raisonnement et de nos approches expérimentales les éventuels artéfacts liés à la présence de détergent qui a lui seul pouvait provoquer des modifications de l'organisation tridimensionnelle de l'AVS.

1) résultats électrophorétiques

Une étude électrophorétique a été réalisée sur les préparations antigéniques des variants BoTat 1 et AnTat 1.1, d'une part dans leur état natif et d'autre part après modification chimique préalable des groupements aminés selon la réaction suivante avec la fluorescamine :



Chromatographie liquide haute performance de gel perméation
(colonne Beckman TSK SW G4000 équilibrée en tampon phosphate
de sodium 0,1 M de pH 7,0 contenant 0,1 % de SDS).



Profil d'élution des sous-fractions séparées par chromatographie HPLC de
phase inverse à partir de la fraction F2 AnTat 1.1

FIGURE 4 2

Ces études en milieu alcalin (migration à pH 8,3) ont permis l'acquisition d'éléments originaux quant au comportement des antigènes en solution.

- Notion d'une forme "tétramère" des échantillons natifs

Nous avons utilisé pour cette étude un gradient de gel de polyacrylamide allant de 2 à 15 % et un temps de migration de 20 heures afin de neutraliser les différences de charge électrique intrinsèque. La figure 43 représente le profil de l'AVS BoTat 1 et des fractions F2 et F3 du variant AnTat 1.1 dans leur état natif comparativement à la fraction F2 marquée par la fluorescamine. L'électrophorèse montre que les antigènes natifs se caractérisent par une bande majeure de taille moléculaire apparente très supérieure au dimère, évoquant la notion de tétramère, les limites de faisabilité du gel ne permettant pas une interprétation plus précise. On remarque aussi dans les fractions F2 et F3 du variant AnTat 1.1 la présence de bandes correspondant à des formes de degré de polymérisation supérieur.

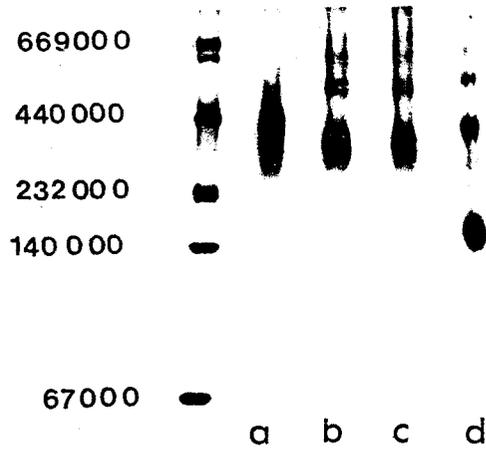
- obtention de dimère des "antigènes fluorescents"

A partir des résultats illustrés figure 43 qui montrent le comportement électrophorétique des antigènes fluorescents des variants BoTat-1 (T. equiperdum) et AnTat 1.1 (T. b. brucei), nous pouvons retenir :

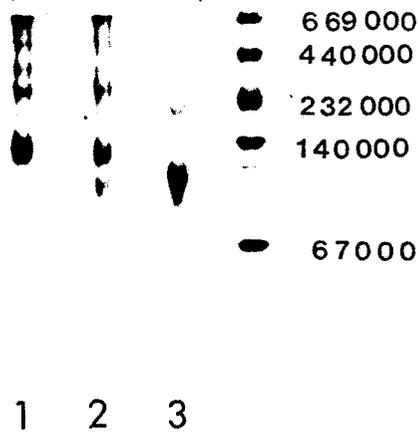
- 1- le comportement en dimère de l'AVS BoTat-1
- 2- la mise en évidence, par comparaison des profils électrophorétiques de l'AVS BoTat-1 avec la fraction F2 AnTat 1.1, d'une taille moléculaire apparente supérieure pour le dimère par liaison disulfure par rapport au dimère sans liaison covalente. Les deux types de dimère sont d'ailleurs bien individualisés au niveau de la fraction F3 AnTat 1.1 qui contient les deux types.
- 3- l'existence de formes hautement polymérisées en quantité très importante pour AnTat 1.1.

Auffret et Turner (1981) (7) ont montré par utilisation de réactifs bifonctionnels la dimérisation et parfois la polymérisation de l'antigène variable en solution. Les résultats que nous décrivons ici selon cette technique électrophorétique en l'absence de SDS sont vraisemblablement corrélés avec les phénomènes d'interaction décrits par ces auteurs, mais l'étude comparative sur molécule native et sur molécule marquée à la fluorescamine a permis de montrer l'existence de deux phénomènes différents d'association.

Electrophorèse en gradient de gel de polyacrylamide en l'absence de SDS



- a. AVS BoTat-1
 - b. Fraction F2 AnTat 1.1
 - c. Fraction F3 AnTat 1.1
 - d. Fraction F2 AnTat 1.1 marquée à la fluorescamine dans les conditions précédentes
- } échantillons repris en tampon Tris-HCl 0.5 M de pH 8,2



- 1. Fraction F2 AnTat 1.1
 - 2. Fraction F3 AnTat 1.1
 - 3. AVS BoTat-1
- } échantillons marqués à la fluorescamine en tampon bicarbonate de sodium 0,05 M de pH 8,2



FIGURE 43

- un phénomène de dimérisation des antigènes insensible au marquage par la fluorescamine pour lequel les résidus de lysine ne sont pas impliqués dans l'interaction,

- un phénomène de polymérisation sensible au traitement chimique où les résidus de lysine seraient indispensables permettant alors la formation d'un assemblage tétramère.

Ces résultats nous amènent à retenir que les stades de dimérisation et de plus haut degré de polymère isolés font intervenir des types de liaison et d'organisation inter-AVS différents.

2) résultats chromatographiques

En chromatographie HPLC, en l'absence de détergent sur colonne Beckman TSK SW G4000, les préparations antigéniques des variants BoTat 1 et AnTat 1.1 se caractérisent par un pic majeur dont le temps de rétention est représentatif d'un état dimère (Figure 44). On retrouve aussi une faible proportion de formes plus hautement polymérisées.

En électrophorèse, un comportement sous forme de dimère avait été observé non pas pour les échantillons natifs (comportement de tétramère) mais pour les échantillons marqués avec la fluorescamine.

Cette étude chromatographique montre que dans un milieu phosphate de sodium 0,1 M de pH 7,0 les antigènes se constituent seulement au stade de dimère. Ainsi le degré de polymérisation serait-il lié à l'environnement moléculaire et dans le cas particulier de cette expérimentation comparative chromatographique/électrophorétique la valeur du pH semble déterminante.

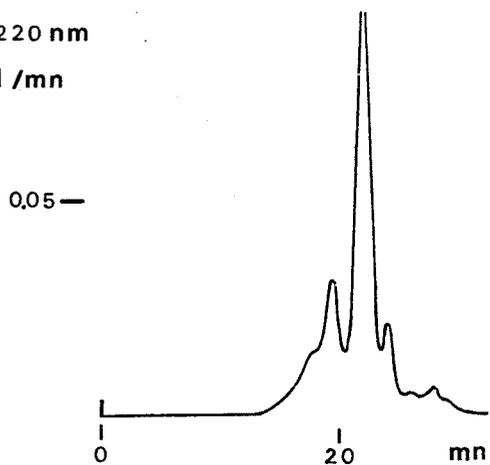
pH > 8 haut degré de polymérisation

pH 7 état de dimérisation

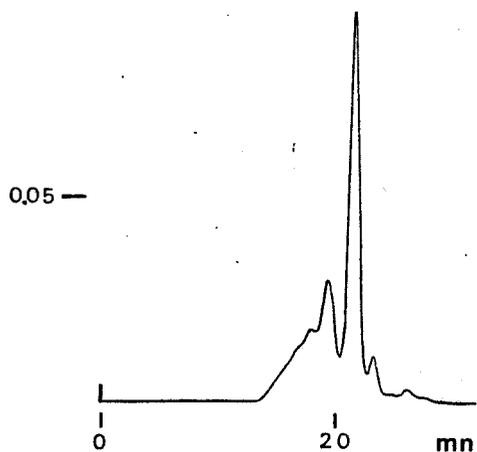
L'intervention des résidus de lysine apparaît tout à fait en accord avec cette observation, l'ionisation relative des AVS devient déterminante pour créer des "pontages" entre acides aminés dicarboxyliques et basiques par exemple. Ce constat de l'influence de l'environnement sur les AVS nous a confirmé dans la nécessité d'étudier le comportement de l'antigène dans un état le plus "natif" possible, c'est-à-dire avant même d'être soumis à l'étape de purification sur colonne de Concanavalline A-Sépharose.

Chromatographie liquide haute performance de gel perméation
(colonne Beckman TSK SW G4000)

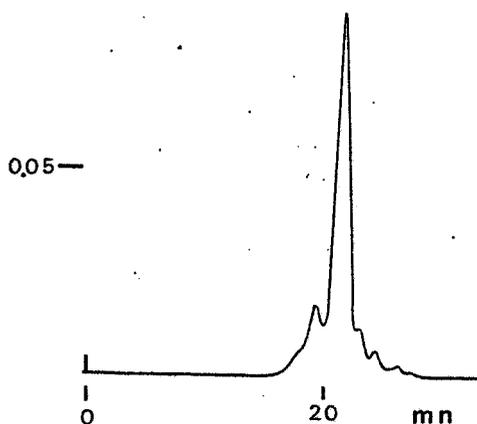
DO 220 nm
0,4 ml / mn



AVS BoTat-1



F2 AnTat 1-1



F3 AnTat 1-1



Profil d'élution en tampon phosphate de sodium 0,1 M de pH 7,0

FIGURE 44

2- Aspects de polymérisation de l'antigène du variant AnTat 1.1 de T. b. brucei avant purification

Nous nous sommes intéressés aux caractéristiques moléculaires et aux modes d'organisation de l'antigène dès sa libération du parasite. Nous avons par conséquent analysé directement l'extrait antigénique brut, soit le surnageant pH 5,5 après les deux étapes de centrifugation indispensables pour éliminer les parasites et les débris cellulaires éventuels. Cet extrait antigénique brut a simplement été dialysé avant d'être soumis aux différentes conditions électrophorétiques ; deux tampons d'équilibre ont été retenus selon les cas : le tampon Tris-HCl 0,5 M de pH 8,2 et ce même tampon enrichi en SDS à 2 %.

La figure 45A montre les résultats obtenus en électrophorèse avec l'AVS AnTat 1.1 en présence de SDS. L'antigène natif dialysé contre le tampon avec détergent est retrouvé à ce stade natif sous forme d'un mélange en majorité constitué par le dimère. Après une étape de chauffage à 100° C, l'antigène est retrouvé sous forme de monomère. Ce traitement entraîne également la formation d'un agrégat au point de dépôt et la disparition des nombreuses autres bandes correspondant à des antigènes communs. Un traitement préalable de l'extrait antigénique brut par le β -mercaptoéthanol à température ambiante ou à 100° C se traduit également par l'apparition d'un monomère, on notera cependant la "taille apparente" légèrement supérieure du monomère produit de réduction par rapport au monomère natif.

Si la dialyse est effectuée contre le tampon dépourvu de détergent, le profil électrophorétique est différent (Figure 45B) ; l'antigène natif apparaît cette fois essentiellement constitué de monomère. La faible quantité de dimère trouvée est sensible au traitement thermique et à la réduction comme nous l'avions décrit.

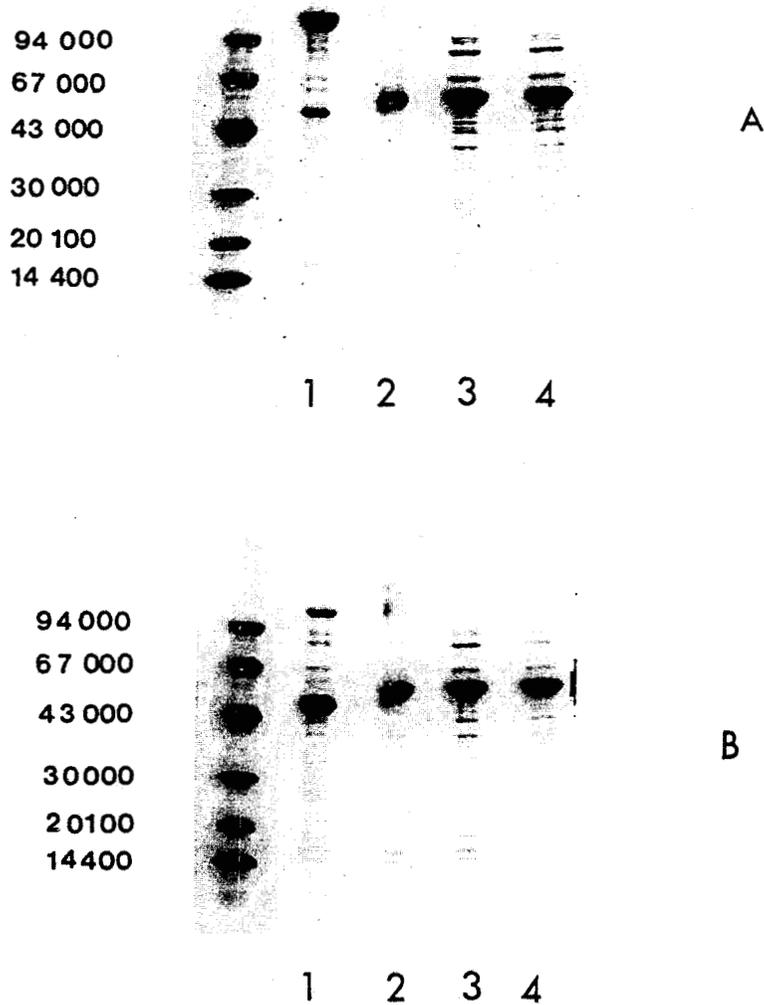
Ces résultats montrent que l'antigène natif AnTat 1.1 est retrouvé en électrophorèse-SDS sous forme d'un dimère mais que ce dimère ne relève pas d'une liaison disulfure comme c'était le cas pour l'antigène purifié puisque une simple étape de chauffage est capable de le dissocier. La liaison disulfure serait donc créée au cours du protocole de purification des AVS.

L'état moléculaire dimérique que nous décrivons peut alors résulter soit d'une association simple de deux molécules d'antigène variable, soit d'une

Electrophorèse de l'extrait antigénique brut
(gradient 5-30 % en présence de SDS)

A : dialyse contre un tampon Tris-HCl 0,5 M, SDS 2 %, pH 8,2

B : dialyse contre un tampon Tris-HCl 0,5 M, pH 8,2



1. échantillon natif
2. échantillon natif chauffé à 100° C pendant 3 minutes
3. échantillon traité par le β -mercaptoéthanol à température ambiante
4. échantillon traité par le β -mercaptoéthanol à 100° C pendant 3 minutes

FIGURE 45



association plus complexe de deux molécules d'antigène variable et d'un ou plusieurs antigène(s) commun(s) jouant un rôle de "ligand".

Pour confirmer l'une des deux hypothèses, nous avons analysé le comportement en électrophorèse-SDS, sans étape de chauffage, d'une forme antigénique purifié monomère (AVS BoTat 1) dissoute dans différents milieux. Nous avons constaté l'absence d'une dimérisation (Figure 46) après solubilisation :

1) dans le tampon Tris-HCl 0,5 M, SDS 2 %, pH 8,2, ce qui démontre qu'une concentration élevée en SDS ne crée pas d'associations dimères artéfactuelles.

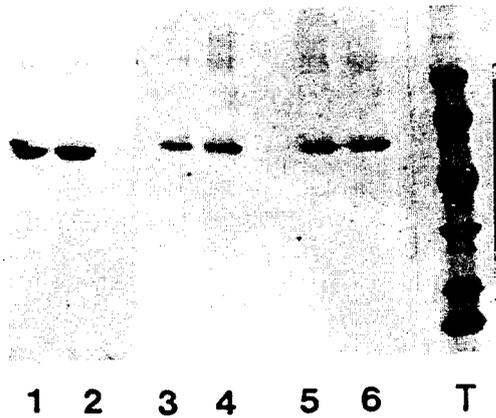
2) dans le tampon Tris-HCl 0,5 M, pH 8,2. Le polymère de l'antigène existant en milieu alcalin sans SDS se scinde bien en monomère au cours d'une électrophorèse en présence de détergent.

3) dans le tampon phosphate 0,125 M, glucose 1 %, pH 5,5 utilisé pour solubiliser le manteau de surface des trypanosomes qui n'est donc pas capable à lui seul de donner un dimère stable dans un champ électrique en présence de SDS.

Ces trois observations laissent entendre qu'il existe au niveau de l'extrait antigénique brut des éléments favorisant une association dimère des antigènes. L'état dimère serait mieux conservé lorsque le surnageant pH 5,5 est dialysé contre un tampon Tris-HCl de pH 8,2 contenant du SDS plutôt que dans le même tampon sans SDS, ceci étant vraisemblablement dû au fait que le SDS à forte concentration aurait pour effet de freiner le phénomène de dialyse.

Lorsque les électrophorèses sont réalisées en l'absence de SDS, l'antigène est retrouvé dans tous les cas sous une forme hautement polymérisée (tétramère) analogue à celle décrite dans les mêmes conditions pour l'antigène purifié (Figure 47). Néanmoins, de légères différences de migration électrophorétique existent selon les conditions utilisées : en particulier, l'étape de chauffage à 100° C entraîne une nette diminution de taille moléculaire apparente, la réduction associée ou non à un chauffage donne un comportement intermédiaire. Enfin, les antigènes communs ne sont pas visualisés dans ces conditions électrophorétiques.

Electrophorèse de l'AVS BoTat -1 de T.equiperdum
 (gradient 5-30% en présence de SDS)



- 1- échantillon natif
- 2- échantillon chauffé à 100°C, 3 minutes
- 3- échantillon natif
- 4- échantillon chauffé à 100°C, 3 minutes
- 5- échantillon natif
- 6- échantillon chauffé à 100°C, 3 minutes

tampon de dissolution

Tris-HCl 0.5M, SDS 2% pH 8.2

Tris-HCl 0.5M, pH 8.2

Phosphate de sodium 0.125M, glucose
 1% pH 5.5

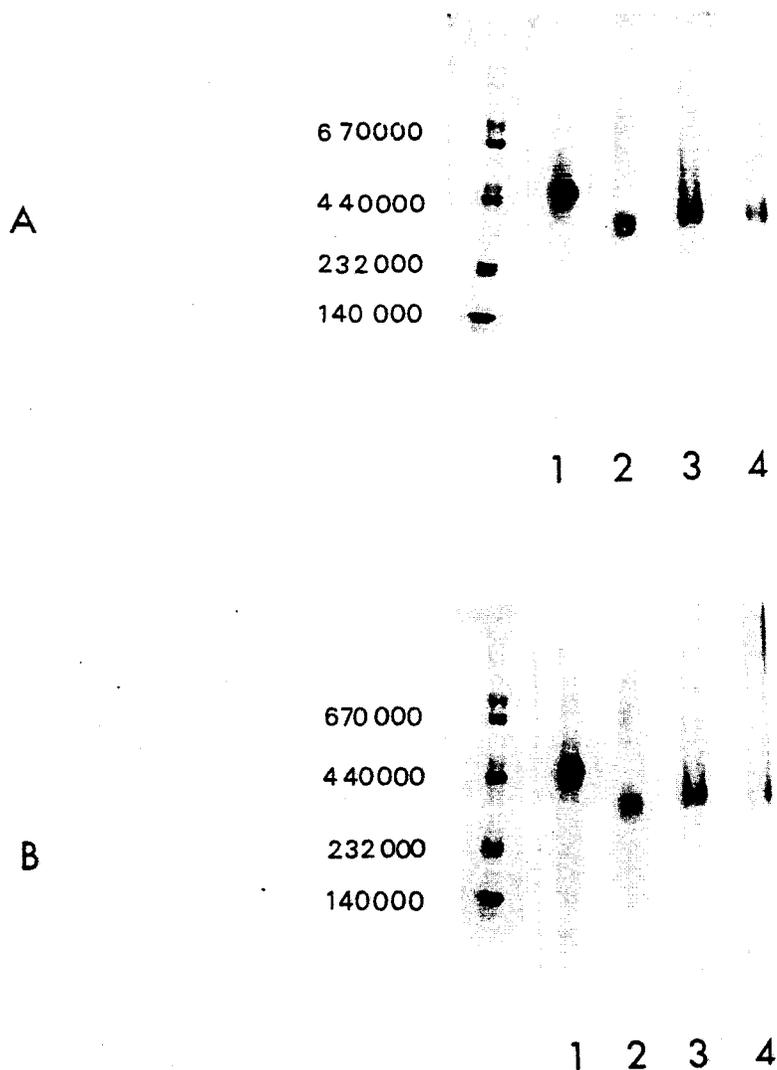


FIGURE 46

Electrophorèse de l'extrait antigénique brut
(gradient 5 - 30 % en l'absence de SDS)

A : dialyse contre un tampon Tris-HCl 0,5 M, SDS 2 % pH 8,2

B : dialyse contre un tampon Tris-HCl 0,5 M pH 8,2



1. échantillon natif
2. échantillon natif chauffé à 100° C pendant 3 minutes
3. échantillon traité par le β -mercaptoéthanol à température ambiante
4. échantillon traité par le β -mercaptoéthanol à 100° C pendant 3 minutes.

FIGURE 47

Cette diversité de polymorphisme représente un caractère fondamental des antigènes variables dont le rôle est certainement essentiel au niveau du pouvoir infestant des trypanosomes et des relations avec l'hôte.

Pour tenter d'expliquer l'évolution des formes moléculaires d'AVS au cours du protocole d'isolement, et d'en dégager les conclusions essentielles, nous avons regroupé et résumé les résultats obtenus sur extrait antigénique brut et antigène purifié (respectivement dans les tableaux 16 et 17).

* Au niveau de l'extrait antigénique brut, l'antigène existe sous une forme moléculaire dimérique spécifique du milieu de solubilisation du manteau de surface à pH 5,5 dans notre protocole préparatif. Cet extrait antigénique brut est dialysé contre un tampon phosphate 0,01 M, NaCl 0,5 M, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 1 mM de pH 8, tampon d'équilibre de la chromatographie d'affinité sur colonne de Concanavoline A-sépharose. Au cours de cette étape, et en plus de la perte de composants de petite taille moléculaire qui peuvent être considérés comme éléments d'association potentielle, l'antigène tend à adopter une organisation tétramérique. L'extrait antigénique brut est ensuite congelé avant l'étape de purification.

A ce stade, nous avons pu faire deux observations qui semblent maintenant essentielles.

1) l'analyse électrophorétique en présence de SDS de l'extrait antigénique brut dialysé, congelé, puis décongelé révèle cette fois l'existence en proportion sensiblement équivalente de 2 types de dimères :

- le dimère initial spécifique du milieu de solubilisation du manteau de surface à pH 5,5
- et le dimère par pont disulfure.

En conséquence, dès ce stade, environ 50 % du matériel antigénique a adopté une forme moléculaire nouvelle.

2) la congélation directe du surnageant pH 5,5 se traduit lors de la décongélation par un phénomène de précipitation et de formation d'aggrégat irréversible de l'antigène. Cette observation confirme donc le changement d'état moléculaire de l'antigène au cours de la dialyse puisque cette étape évite l'aggrégation.

* Reprenons le protocole de purification. A ce stade, l'extrait antigénique dialysé décongelé est déposé sur une colonne de concanavoline A-sépharose

ETUDE ELECTROPHORETIQUE EN PRESENCE DE SDS DE L'EXTRAIT ANTIGENIQUE BRUT.

NATIF	CHAUFFÉ À 100° C	RÉDUIT À T° AMBIANTE	RÉDUIT ET CHAUFFÉ À 100° C
DIMÈRE + TRACES DE MONOMÈRE	MONOMÈRE + AGGRÉGAT RESTANT AU POINT DE DÉPÔT	MONOMÈRE + TRACES D'AUTRES CONSTITUANTS	MONOMÈRE + TRACES D'AUTRES CONSTITUANTS
MONOMÈRE + TRACES DE DIMÈRE	MONOMÈRE + AGGRÉGAT RESTANT AU POINT DE DÉPÔT	MONOMÈRE + TRACES D'AUTRES CONSTITUANTS	MONOMÈRE + TRACES D'AUTRES CONSTITUANTS

EXTRAIT ANTIGÉNIQUE BRUT
DIALYSÉ CONTRE LE TAMPON
TRIS-HCL 0,5M, SDS 2%, PH 8,2

EXTRAIT ANTIGÉNIQUE BRUT
DIALYSÉ CONTRE LE TAMPON
TRIS-HCL 0,5M, PH 8,2.



TABLERAU 16

PRINCIPALES FORMES MOLÉCULAIRES OBTENUES EN ELECTROPHORÈSE ET EN CHROMATOGRAPHIE AVEC
LES ANTIGÈNES DES VARIANTS BoTat-1 ET AnTat 1-1.

COMPORTEMENT EN ELECTROPHORÈSE			COMPORTEMENT EN CHROMATOGRAPHIE		
TAMPON TRIS-GLYCOCOLLE PH 8,3			TAMPON PHOSPHATE DE SODIUM 0.1 M, PH 7.0		
EN PRÉSENCE DE SDS 0.1%		EN L'ABSENCE DE SDS		EN PRÉSENCE DE SDS 0.1%	EN L'ABSENCE DE SDS
EN PRÉSENCE D'AGENT RÉDUCTEUR	EN L'ABSENCE D'AGENT RÉDUCTEUR	MOLÉCULE NATIVE	MOLÉCULE MARQUÉE PAR LA FLUORESCAMINE	MOLÉCULE NATIVE	MOLÉCULE NATIVE
MONOMÈRE	MONOMÈRE	TÉTRAMÈRE	DIMÈRE	MONOMÈRE	DIMÈRE
MONOMÈRE	DIMÈRE	TÉTRAMÈRE	DIMÈRE	DIMÈRE	DIMÈRE
MONOMÈRE	DIMÈRE + MONOMÈRE	TÉTRAMÈRE	DIMÈRE "BoTat" + DIMÈRE "AnTat"	DIMÈRE + MONOMÈRE	DIMÈRE

AVS
BoTat - 1

F2
AnTat 1-1

F3
AnTat 1-1



équilibrée dans le tampon de pH 8. L'addition au tampon d' α -méthyl D mannoside à 10 % permet l'élution d'une partie de l'antigène (fraction F2), une partie sensiblement équivalente (fraction F3) étant ensuite éluee par addition supplémentaire de β -mercaptoéthanol à 1 %. Pour le variant AnTat 1.1, la fraction F2 est presque uniquement constituée du dimère par pont disulfure. La fraction F3 contient en plus un peu de monomère, mais précisons que cette fraction a été analysée après dialyse et lyophilisation, ce qui a pu encore favoriser le changement d'état moléculaire. On pourrait donc admettre que les fractions F2 et F3 seraient obtenues par élution de formes antigéniques d'organisation différente, dont l'une, la fraction F3 à la différence de la fraction F2, serait encore liée à des éléments associatifs.

Ajoutons que pour le variant AnTat 1.8, des fractions F2 et F3 sont obtenues à la fois pour la préparation "dimère" et pour la préparation "monomère". Le pont disulfure interchaîne n'est donc pas la cause d'une moindre élution par l' α -méthyl D mannoside. Il n'est qu'une conséquence du changement de l'état moléculaire initial lors de la modification de composition du milieu environnant. Au début de ce chapitre nous avons évoqué le fait que selon la localisation du résidu de cystéine libre dans la zone charnière de l'AVS, une liaison intermoléculaire S-S serait favorisée ou non.

Tout ceci démontre aussi que à l'état natif l'association des antigènes à la surface du variant AnTat 1.1 empêcherait cet agencement moléculaire par pont disulfure, argument très en faveur de l'existence d'éléments ligands inter-AVS au niveau du manteau de surface. Nos résultats actuels par techniques électrophorétiques indiquent qu'il s'agirait d'éléments de complexation relativement labiles.

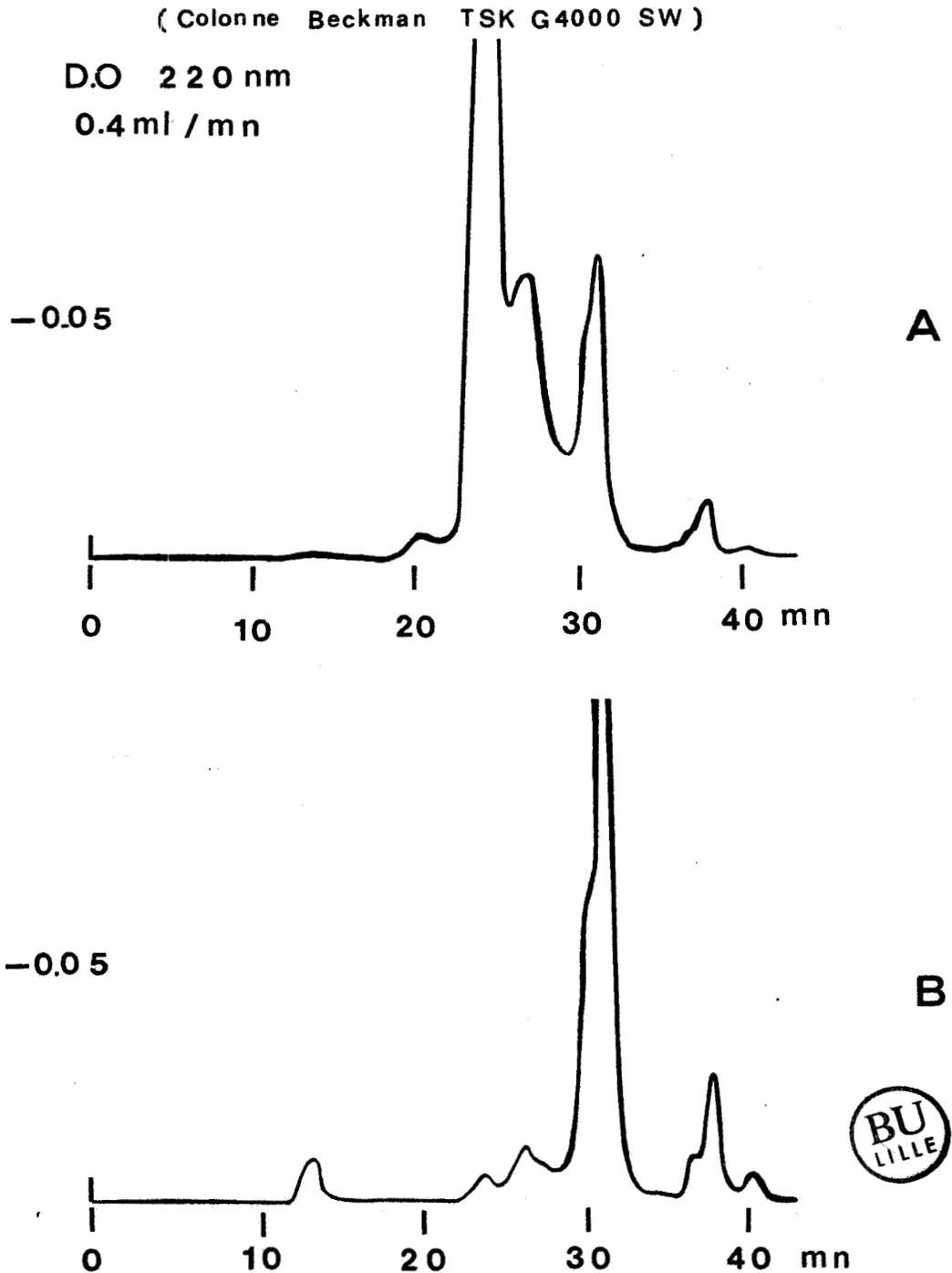
Pour vérifier les données apportées par l'électrophorèse pour aussi tenter une mise en évidence de ligand, nous avons ensuite analysé le comportement de l'extrait antigénique brut en chromatographie HPLC en présence de SDS et en absence de SDS dans des conditions identiques à celles utilisées pour les antigènes purifiés. Les résultats (Tableau 18) montrent pour l'extrait antigénique brut natif un comportement dimérique en présence ou en absence de détergent. Après chauffage à 100° C, il existe en présence de SDS un pic correspondant à un haut polymère (poids moléculaire avoisinant 600 000). Sans SDS aucun pic susceptible de correspondre à une forme monomère ou polymère de l'antigène n'apparaît, ce qui laisserait entendre que l'association inter-AVS n'a pas été éluee de la colonne TSK G4000 (figure 48).

CHROMATOGRAPHIES HPLC DE GEL PERMEATION DE L'EXTRAIT ANTIGENIQUE BRUT.

	Tampon phosphate de sodium 0.1M de pH 7.0 + 0.1% SDS		Tampon phosphate de sodium 0.1M de pH 7.0	
	Echantillon natif	Echantillon chauffé à 100 °C	Echantillon natif	Echantillon chauffé à 100 °C
Extrait antigénique brut	dimère traces de monomère constituant 10 000	haut polymère (PM = 600 000) constituant 10 000	dimère constituant 10 000	absence de pic correspondant à une forme monomère ou polymère de l'antigène constituant 10 000 ↗
Extrait antigénique brut dialysé contre un tampon phosphate 0.01M, NaCl 0.5M, MgCl ₂ 1 mM, CaCl ₂ 1 mM de pH 8	dimère traces de monomère constituant 10 000	haut polymère (PM = 600 000) constituant 10 000	dimère constituant 10 000	absence de pic correspondant à une forme monomère ou polymère de l'antigène constituant 10 000 ↗

ETUDE DE L'EXTRAIT ANTIGENIQUE BRUT DU VARIANT AnTat 1-1 de T.b.brucei.

Chromatographie HPLC de gel perméation en tampon phosphate de sodium 0.1 M de pH 7.0.



A- Extrait antigénique brut natif

B- Extrait antigénique brut chauffé à 100°C pendant 3 minutes.

FIGURE 48

En revanche, on note l'élution d'un pic important correspondant à un composant de faible taille moléculaire. Après dialyse de l'extrait antigénique brut contre le tampon de pH 8,0, les résultats sont comparables à ceci près que le composant de faible taille moléculaire apparaît diminué dans l'échantillon natif par rapport à l'extrait antigénique brut non dialysé.

L'ensemble de ces résultats apparaissent donc très en faveur de l'hypothèse d'un élément ligand qui pourrait être représenté par le constituant caractérisé à l'aide de la chromatographie liquide haute performance et dont la définition biochimique reste à établir.

CONCLUSION

L'ensemble des résultats que nous venons de présenter permet de préciser définitivement la nature biochimique de la glycoprotéine responsable de la spécificité antigénique des "variants" de trypanosomes africains.

Qu'il s'agisse en effet d'antigène variable purifié à partir de Trypanosoma equiperdum ou de Trypanosoma brucei brucei, des constantes inter-espèces se définissent :

- taille moléculaire de l'antigène voisine de 60 000
- organisation moléculaire en deux domaines et une zone charnière
- nature biochimique complexe de glycolipoprotéine
- enfin, affinité associative remarquable de ces antigènes variables

Toutefois, en dehors de ces traits communs, d'une espèce à l'autre, d'un variant à l'autre d'une même espèce, une certaine diversité peut être observée : longueur de l'axe peptidique, nombre de ponts disulfure, présence ou non d'un thiol libre, nombre, localisation et qualité des chaînes glycaniques, variabilité de conformation en fonction d'un pourcentage relatif d' α -hélicité etc.

Au total, on peut retenir au delà d'une variabilité séquentielle amino acide un conservatisme conformationnel tout-à-fait étonnant et qui, sans nul doute, préside à une potentialité fonctionnelle au centre d'une relation dynamique hôte-parasite.

Sur le plan biochimique pur, l'élément essentiel le plus original de notre travail en dehors d'une participation à une définition globale des antigènes variables demeure la mise en évidence d'une entité C-terminale substituant l'axe peptidique et représentant le système d'attache membranaire plasmique des antigènes.

Pour le variant BoTat 1 de Trypanosoma equiperdum nous avons pu isoler et analyser les différents éléments constitutifs de ce noyau glycérophospholipidique, caractérisé par : éthanolamine, phosphore, glycérol, acides gras. Ces résultats se sont trouvés rapidement confirmés par les travaux réalisés par CROSS et son groupe sur Trypanosoma brucei brucei. Ces derniers, en effet, décrivent aussi un glycérophospholipide dont ils démontrent le rôle de point d'attache de l'AVS. En obtenant selon le protocole de libération

une forme dite "soluble" ou une forme dite "membranaire", s'est faite jour l'idée d'une phospholipase C membranaire qui, clivant la structure C-terminale, libère le manteau.

Ces notions biologiques et analytiques accumulées dans les cinq dernières années sont primordiales, les données de la littérature laissant déjà entrevoir des variations fines de structure du point d'ancrage d'un variant à l'autre d'une même espèce ou d'une espèce à l'autre. Peut-être ces "différences" sont-elles à l'origine d'ordonnements membranaires adaptés au stade évolutif de parasites et à la fonction précise du manteau.

Le second élément fondamental établi dans ce mémoire concerne l'organisation polymorphique des AVS.

Nous avons pu en effet montrer l'existence de différents mécanismes d'association des antigènes. Ainsi, la possibilité de dimérisation des antigènes en dehors de toute association directe peptide-peptide soulève l'hypothèse du rôle possible de glycanes oligomannosidiques qui par un effet de type lectine, pourraient d'antigène à antigène participer à la constitution du manteau de surface parasitaire. Un deuxième type associatif semblerait relever d'une association inter-antigènes en fonction de l'existence d'intermédiaires. La notion de ligands de petite taille moléculaire pourrait être avancée.

La notion du rôle de l'organisation inter-AVS dans le manteau apparaît fondamentale dans la microphysiologie membranaire. Mieux comprendre ces phénomènes c'est rendre possible de nouvelles approches diagnostiques et thérapeutiques de la trypanosomiase à travers une immunologie mieux dirigée et des possibilités d'intervention au stade de la biosynthèse.

TABLE DES MATIERES
DE L'APPENDICE TECHNIQUE

I- Méthodes d'étude physico-chimique et immunologique

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 en l'absence de SDS

D- Immunoblotting

E- Etude en dichroïsme circulaire

- 1- Réalisation des spectres dichroïques
- 2- Application à l'étude de la dénaturation thermique

F- Chromatographie liquide de haute performance (HPLC)

G- Composition amino acide

H- Composition glucidique

I- Dosage de phosphore

J- Caractérisation de glycérol - quantification

K- Composition lipidique

II- Méthodes d'étude structurale

A- Conditions d'utilisation des différents enzymes

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

B- Réduction et S-carboxamidométhylation

C- Coupure chimique par 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

1- Méthodes d'étude physico-chimique et immunologique

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) (141).

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 ⁽⁺⁾	15 µl	10 µl
persulfate d'ammonium 10 %	25 µl	10 µl

Composition du gel supérieur

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

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

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

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

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

* Tampon d'électrophorèse

- tris 0,025 M
- glycoColle 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

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 en l'absence de SDS

Solutions

* solution d'acrylamide f

- acrylamide 15 g
- N-N' méthylènebisacrylamide 0,6 g
- eau distillée q.s.p. 50 ml

* solution d'acrylamide e

- acrylamide 12 g

- N-N' méthylènebisacrylamide 0,6 g
- eau distillée q.s.p. 100 ml

* solution d'acrylamide g

- acrylamide 8 g
- N-N'méthylènebisacrylamide 2 g

* solution tampon du gel à gradient

- Tris - HCl 1,5 M pH 8,2

- Composition du gel à gradient

	Solution à 2 %	Solution à 15 %
sucrose		2,4 g
f		6,00 ml
e	2,00 ml	
Tampon pH 8,2	3,00 ml	3,00 ml
eau	7,00 ml	3,00 ml
TEMED	5 µl	5 µl
persulfate		
d'ammonium 10 %	25 µl	25 µl

- Composition du gel supérieur

g	2,00 ml
riboflavine 4 mg/100 ml	2,00 ml
tampon pH 8,2	1,50 ml
eau distillée	2,50 ml
TEMED	25 µl
persulfate d'ammonium 10 %	50 µl

- Tampon d'électrophorèse

Tris	0,025 M
Glycocolle	0,192 M

- Tampon de dissolution des échantillons

Tris-HCl 0,5 M pH 8,2 contenant 10 % de glycérol

Dans certains cas l'échantillon est préalablement marqué avec la fluorescamine (ROSENBLATT et coll., (1975) (226)).

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

D- Immunoblotting

1- Principe

Après électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS, les protéines sont transférées sur membrane de nitrocellulose selon la méthode de VAESSEN et coll. (1981) (256). La membrane est ensuite traitée par un antisérum anti-AVS fabriqué chez le lapin. Le complexe antigène-anticorps est mis en évidence par utilisation d'un anticorps anti-IgG marqué à la peroxydase (Institut Pasteur) et révélation par le 4-chloro-1-naphtol.

2- Conditions opératoires

Après migration électrophorétique des échantillons le gel est rincé en tampon Tris 0,025 M-glycocolle 0,192 M afin d'éliminer le SDS.

Les bandes sont transférées sur nitrocellulose pendant 1 nuit en tampon Tris-glycocolle enrichi en méthanol à 20 %, sous un ampérage de 250 mA.

Après transfert, la membrane est rincée en tampon Tris 10 mM, pH 7,4 - NaCl 0,9 % pendant 15 minutes puis incubée dans ce même tampon enrichi en sérum albumine bovine à 3 % (fraction V pH 5,2, IBF) pendant 1 heure à 45° C afin de saturer les sites aspécifiques et d'inhiber les peroxydases de la préparation.

Après rinçage, l'immunotraitement s'effectue par incubation de la membrane de nitrocellulose avec l'immunsérum spécifique dilué au 1/500e en tampon Tris 10 mM pH 7,4 - NaCl 0,9 % - sérumalbumine bovine 3 % - sérum de veau, 10 %.

Après contact une nuit à 20° C, plusieurs rinçages sont réalisés en tampon Tris 10 mM pH 7,4 - NaCl 0,9 % puis dans le même tampon enrichi en Tween 20 à 0,1 %.

Le traitement à la peroxydase s'effectue par incubation de la membrane de nitrocellulose 2 heures à 37° C en tampon Tris 10 mM pH 7,4 - NaCl 0,9 % - BSA 3 % contenant l'anticorps anti-IgG marqué à la peroxydase en dilution finale 1/500.

Après une nouvelle série de rinçages, la révélation est effectuée par une incubation de 1 minute dans la solution suivante :

- Tris 50 mM pH 7,6 (200 ml)
- 4-chloro-1-naphtol (100 mg) (Sigma n° C-8890)
- H₂O₂ (240 µl)

La réaction est arrêtée par lavage abondant en eau.

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 (Θ) a été calculée pour la région du spectre correspondant au chromophore amide (entre 180 et 240 nm), en prenant la moyenne à partir de 3 à 5 spectres réalisés à 2 sensibilités différentes. La vitesse de déroulement des nanomètres était de 0,1 mm/sec. La vitesse de déroulement du papier était de 2 mm/mn. La constante de temps était égale à 10.

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

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

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

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

θ est donc exprimé en deg. décimole⁻¹ cm².

1- Réalisation des spectres dichroïques

Tous les spectres expérimentaux ont été faits dans des conditions telles que la densité optique soit toujours inférieure à 1.5. Ils ont été ensuite convertis en courbes gaussiennes à l'aide d'un convertisseur de courbes "DU PONT CURVE". On obtient ainsi des maxima négatifs à 207, 214 et 222 nm. Le contenu en hélice est apprécié à partir de la transition n 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 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 . 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) (36).

2- Application à l'étude de la dénaturation thermique

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

F- Chromatographie liquide de haute performance (HPLC)

Les chromatographies HPLC ont été réalisées sur des appareils de type WATERS 660 et VARIAN 5000.

1- Chromatographie HPLC de gel perméation

Pour ce principe de chromatographie, nous avons utilisé une colonne LKB type TSK SW G4000 (75 X 600 mm). Les échantillons sont déposés en quantité de 20 µg. L'élution est réalisée en tampon phosphate de sodium 0,1 M, de pH 7 enrichi ou non en SDS à 0,1 % selon un débit de 0,7 ml par minute. L'absorbance de l'éluat est mesurée à 220 nm.

La calibration de la colonne est effectuée par les protéines suivantes : Thyro-globuline (670 000), ferritine (440 000), catalase (232 000), lactate deshydrogénase (140 000), sérum albumine bovine (67 000), ovalbumine (44 000).

2- Chromatographie HPLC de phase inverse

Nous avons utilisé une colonne Beckman type RPSC-utrapore C3 (taille des pores 300 Å, 4,6 X 75 mm). Des quantités de l'ordre de 100 à 150 µg sont déposées. Les conditions de séparation optimales ont été obtenues avec un système d'élution allant d'une solution aqueuse de formide d'ammonium 0,003 mM (A) vers du propanol-1 à 60 %. (B) selon le gradient suivant : 33 % B, 10 minutes ; 33-45 % B, 40 minutes ; 45 % B, 10 minutes ; 45-100 % B ; 10 minutes. L'élution est réalisée selon un débit de 1 ml par minute, et suivie par mesure de l'absorbance à 206 nm.

G- Composition amino acide

a) hydrolyse

L'échantillon en quantité de 100 à 500 µg 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 phénylthiohydantoine-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) (67) 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) (203).

1 mg d'échantillon est hydrolysé 24 heures sous vide à 110° C par 1 ml d'acide β -mercapto-sulfonique en présence de 500 nanomoles de norleucine. Le pH de l'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.

H- Composition glucidique

La composition en oses neutres et en osamines est déterminée, après méthanolyse, par chromatographie en phase gazeuse selon la méthode de REINHOLD (1972) (211).

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.

1- Dosage de phosphore

Les échantillons ont été dissous dans de l'eau distillée à une concentration de l'ordre de 0,1 mg/ml.

* 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), avec redissolution des précipités dans de la soude 0,1 N à 0° C, respectivement avec ou sans une étape de chauffage du précipité à 80° C pendant 20 minutes.

* Minéralisation (AMES) (1966) (5)

L'on ajoute aux précipités précédents, et à une gamme étalon préparée à partir d'une solution de KH_2PO_4 0,5 M, 62,5 μl 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.

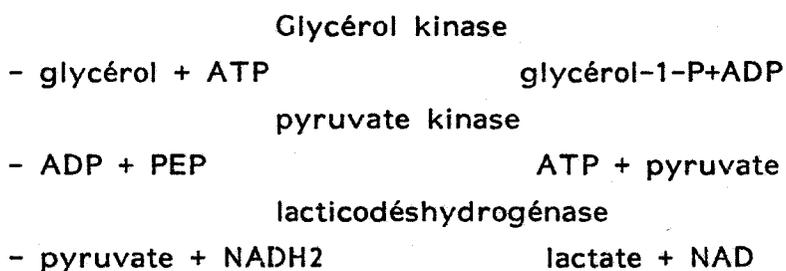
* Dosage du phosphate inorganique (ITAYA, et MICHIO, (1966) (129))

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

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

J- Caractérisation du glycérol

Le glycérol est libéré par hydrolyse dans de l'HCl 2 N à 125° C pendant 48 heures (RENKONEN (1982) (215)). 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) (278) utilisant les réactions suivantes :



K- Composition lipidique

Les acides gras sont libérés par hydrolyse HCl 5,6 N pendant 24 heures à 110° C en tube scellé sous azote. Après évaporation sous vide, les acides gras sont recueillis selon le partage de FOLCH et coll. (1957) (76) ; 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) (101)). 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

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

2- Tampons d'incubation

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

L'hydrolyse par l'endoprotéinase ARG-C est réalisée en tampon N méthyl morpholine 0,1 M de pH 8 (LEVY (1970) (150)).

L'hydrolyse par la protéase de S. aureus est menée dans un tampon acétate d'ammonium 0,05 M pH 4 (HOUMARD et DRAPEAU (1972) (125)).

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).

B- Réduction et S-carboxamidométhylation

Réduction et S-carboxamidométhylation sont effectuées selon la technique de GALL et coll (1968) (83). 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) (228)). Les réactifs sont éliminés par dialyse contre eau désionisée pendant 5 jours. La glycoprotéine est ensuite lyophilisée.

C- Coupure chimique par le bromure de cyanogène

La technique utilisée est celle préconisée par STEERS et coll (1965) (244). 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) (65) sont schématisées dans la figure 1.

2- Méthodologie

a) Dégradation manuelle

Nous suivons le protocole établi par EDMAN (1970) (66) et modifié par DEMAILLE (1979) (53).

- Couplage

Les différentes étapes sont les suivantes :

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

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

- . agitation au vortex

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

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

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

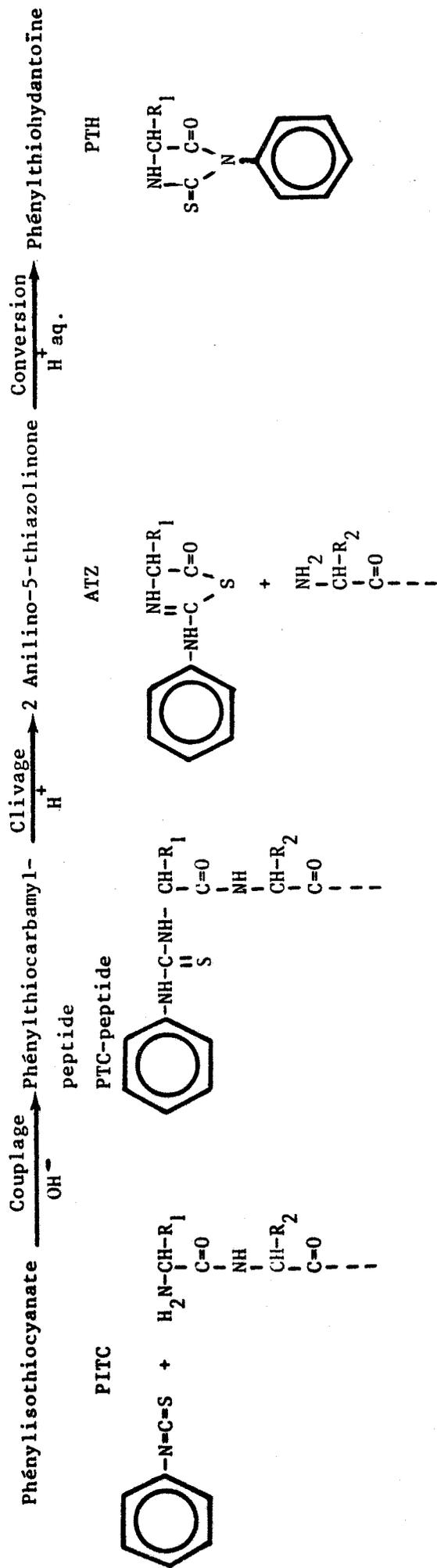
- Clivage

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

- agitation à l'aide d'un Vortex

- incubation à 50° C pendant 7 minutes

ETAPES DE LA DEGRADATION DE EDMAN



Etapes automatiques (séquenceur)

Etape manuelle



figure 1

- séchage du produit sous azote

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

- Conversion

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

- agitation à l'aide d'un Vortex

- incubation à 80° C pendant 10 minutes

- refroidissement rapide

- extraction de la phénylthiohydantoïne (PTH) par trois fois 0,5 ml d'acétate d'éthyle suivie de centrifugation 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 2. Les différentes étapes sont effectuées à 57° C en atmosphère d'azote.

1- Etalement de l'échantillon sur la coupelle

L'échantillon en quantité de 200 à 500 nanomoles est solubilisé dans 400 μ l d'eau puis déposé près du fond de la coupelle, tandis que celle-ci tourne à 1000 t/mn. L'échantillon, sous l'effet de la force centrifuge, est plaqué contre la paroi. Le séchage est ensuite effectué par une série de balayages à l'azote, et de vides progressifs.

SCHEMA SIMPLIFIE DU SEQUENCEUR BECKMAN 890 C

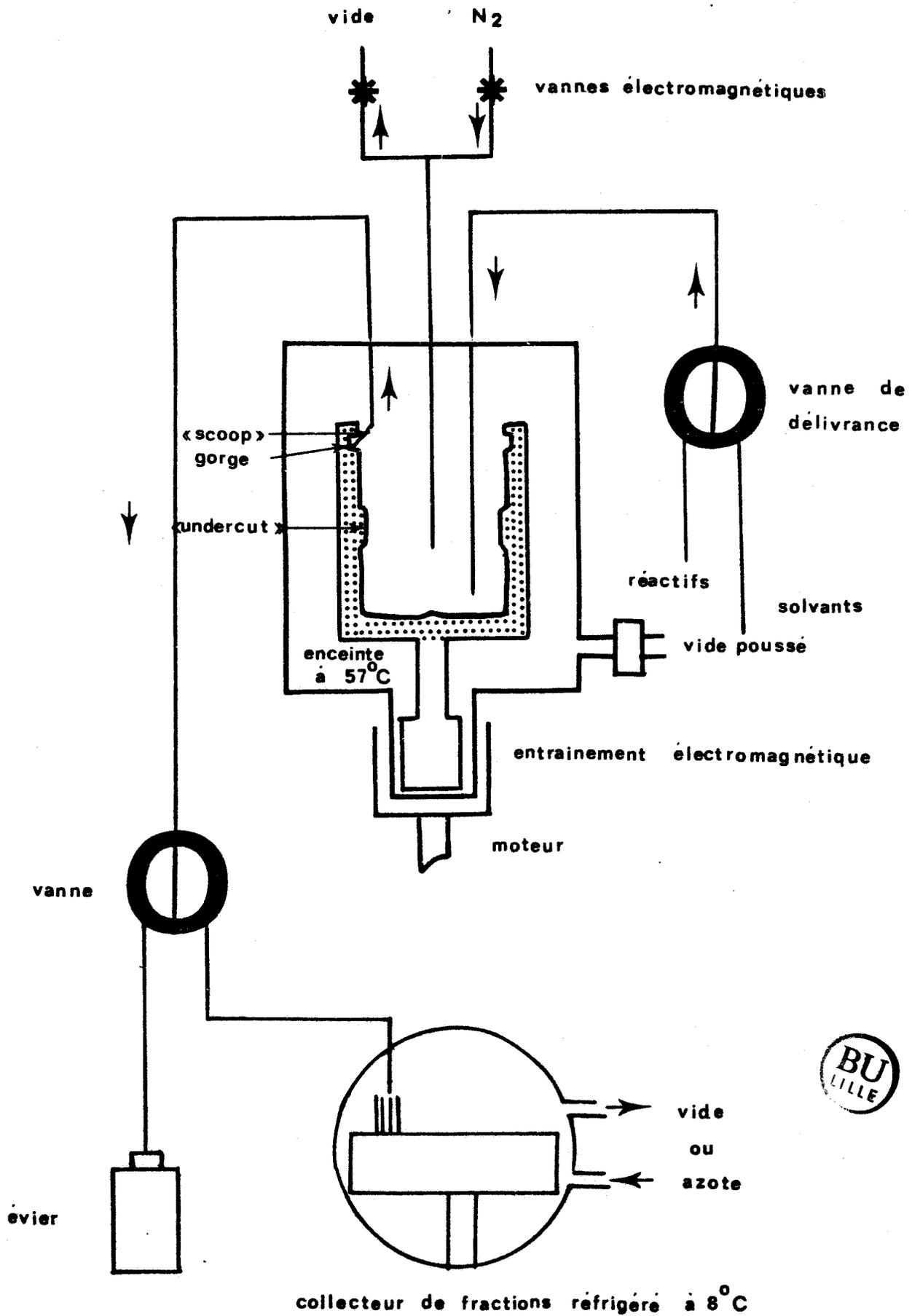


figure 2

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) (138). 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) (126).

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) (114), modifiée par BRIAND (1981) (28).

La séparation est réalisée sur une colonne μ -Bondapack C18 (Water Associates). La PTH norvaline est utilisée comme témoin interne, le diagramme obtenu ainsi que les conditions opératoires sont représentées dans la figure 3. Sur cette colonne, les PTH-méthionine et PTH-valine d'une part et les PTH-isoleucine et PTH phénylalanine d'autre part ne sont pas séparées. L'identification définitive est dans ce cas réalisée à l'aide d'une colonne μ -Bondapack CN (Waters Associates) Figure 4.

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 5.

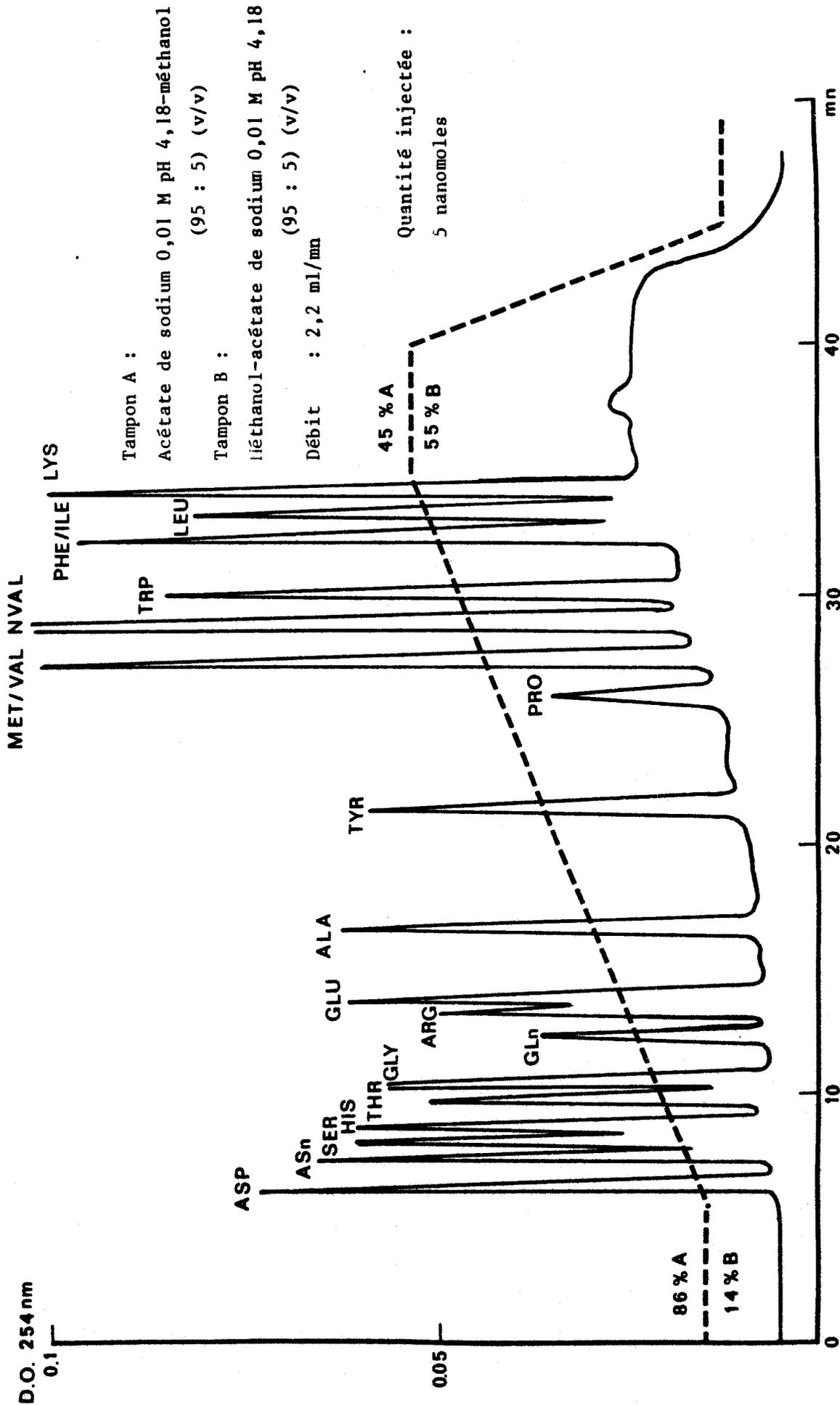


figure 3

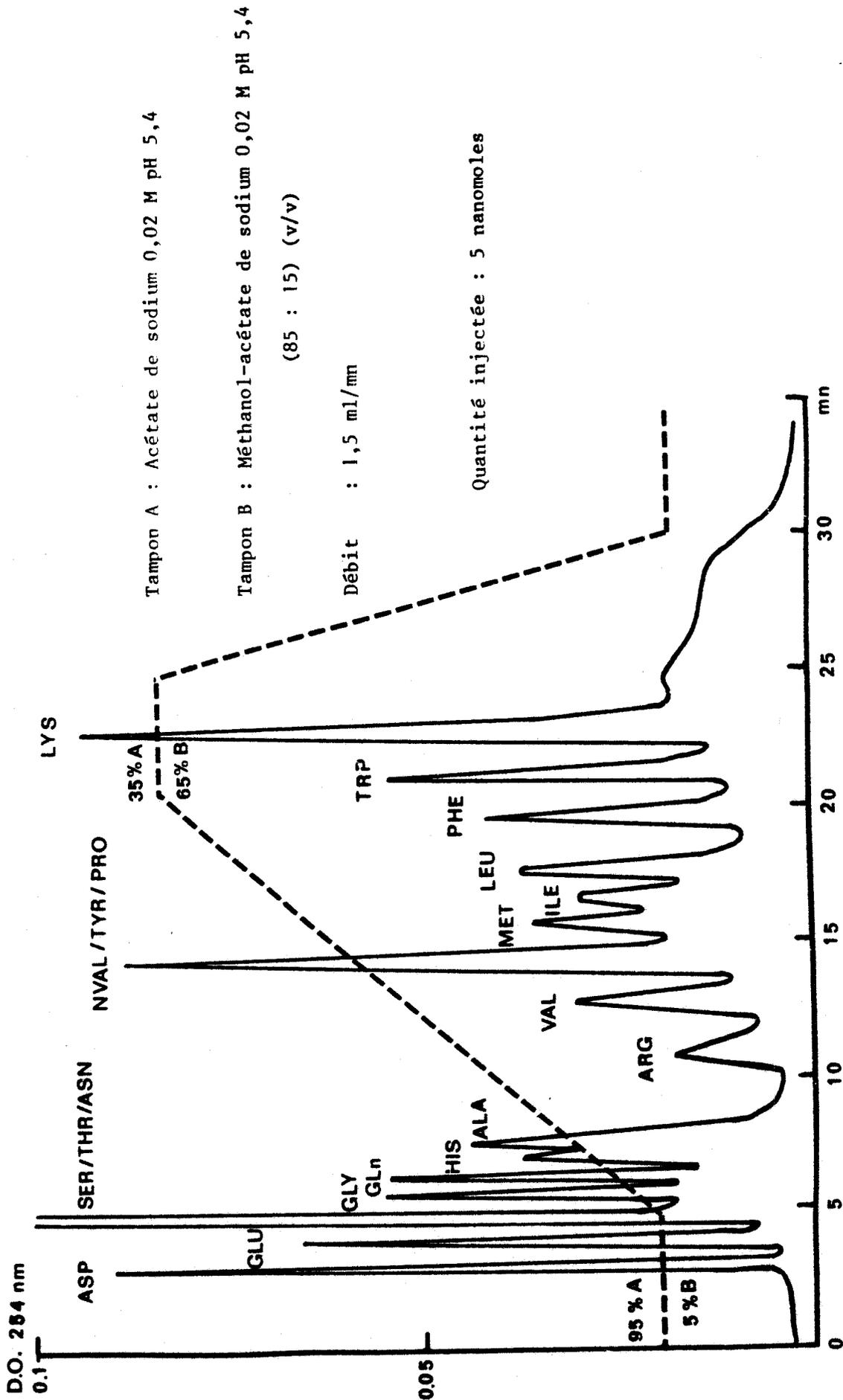


figure 4



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

Colonne WHP 100/120 mesh 10 % SP 400
Débit N₂ : 40 ml/mn
Débit H₂ : 3 ml/mn
Débit air : 50 ml/mn

Quantité injectée : 0,5 nanomole

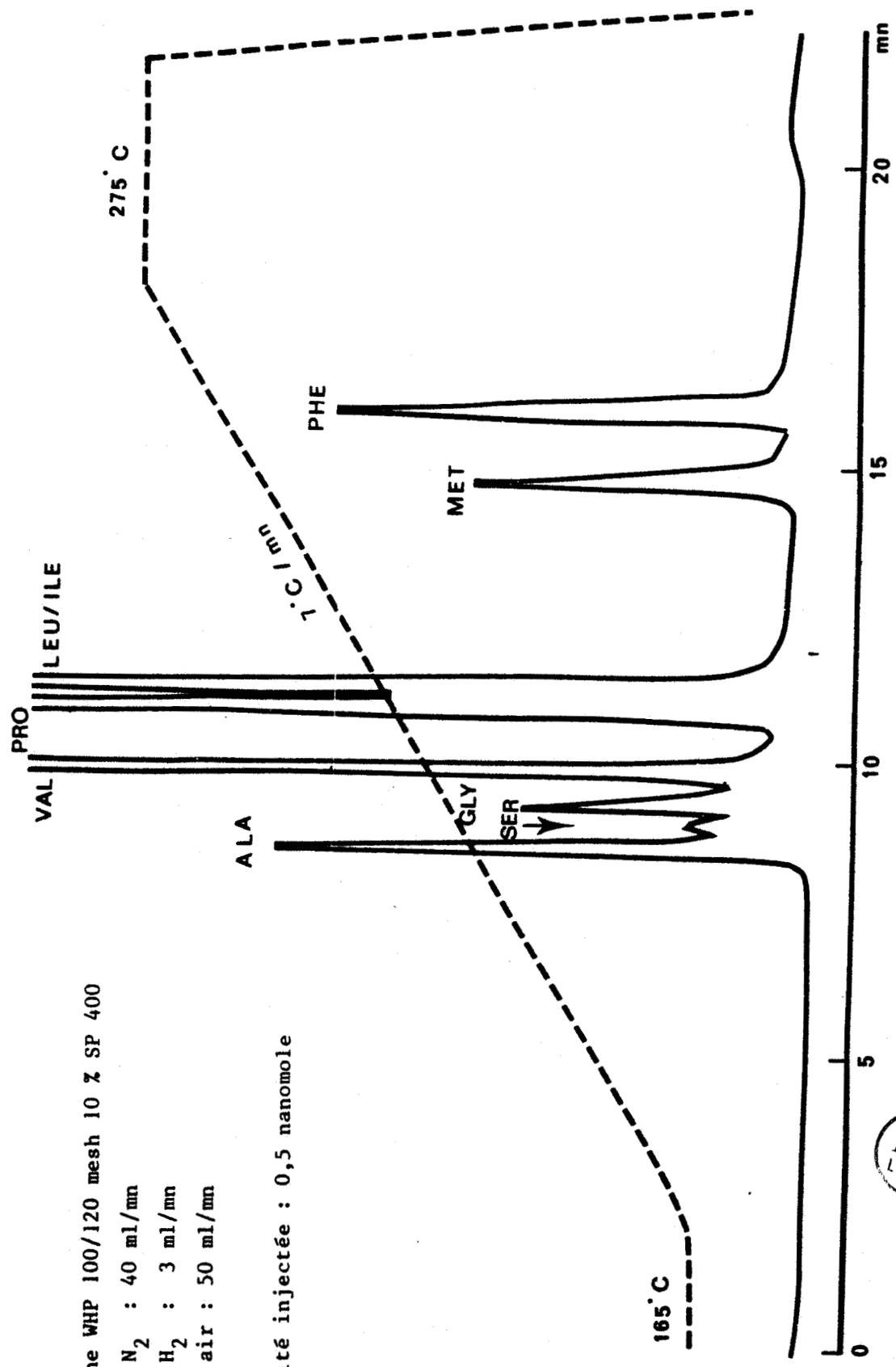


figure 5

BIBLIOGRAPHIE

- 1- AARONOVITCH, S., and TERRY, R.J. (1972)
The trypanolytic factor in normal human serum.
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 66, 344.
- 2- AITKEN, A., KLEE, C.B., and COHEN, P. (1984)
The structure of the B subunit of calcineurin.
Eur. J. Biochem., 139, 663-671.
- 3- ALLEN, G., GURNETT, L.P., and CROSS, G.A.M. (1982)
Complete amino acid sequence of a variant surface glycoprotein (VSG 117) from *Trypanosoma brucei*.
J. Mol. Biol., 157, 527-546.
- 4- ALLEN, G., and GURNETT, L.P. (1983)
Locations of the six disulphide bonds in a variant surface glycoprotein (VSG 117) from *Trypanosoma brucei*.
Biochem. J., 209, 481-487.
- 5- AMES, B.N. (1966)
Assay of inorganic phosphate.
Methods Enzymol., 8, 115-118.
- 6- ANDREWS, N.W., and COLLI, W. (1981)
8th A. Meet on Basic Research on Chagas Disease.
Caxambu, Brazil, Abstr. 104.
- 7- AUFFRET, C.A. and TURNER, M.J. (1981).
Variant specific antigens of *trypanosoma brucei* exist in solution as glycoprotein dimers.
Biochem. J., 193, 647-650.
- 8- BALTZ, T., BALTZ, D. et PAUTRIZEL, R. (1976)
Affinité de la concanavaline A pour *Trypanosoma equiperdum*. Applications à l'isolement de la fraction glycoprotéique spécifique du type antigénique.
Ann. Immunol. (Institut Pasteur), 127C, 761-774.

9- BALTZ, T., GIROUD, C.H., BALTZ, D., DUVILLIER, G., DEGAND, P., DEMAILLE, J. et PAUTRIZEL, R. (1984).

The variable surface glycoproteins of trypanosoma equiperdum are phosphorylated.

EMBO J., 1, 1393-1398.

10- BARBET, A.F., and Mc GUIRE, T.C. (1978)

Cross-reacting determinants in variant specific surface antigens of African trypanosomes.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1989-1993.

11- BARRY, J.D., HAJDUK, S.L., VICKERMAN, K. and LE RAY, D. (1979)

Detection of multiple variable antigen types in metacyclic populations of Trypanosoma brucei.

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

12- BARRY, J.D., CROWE, J.S., and VICKERMAN, K. (1983)

Instability of the trypanosoma brucei rhodesiense metacyclic variable antigen repertoire.

Nature, 306, 699-701.

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

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

Cell, 27, 497-505.

14- BERNARDS, A. (1982)

Transposable genes for surface glycoproteins in trypanosomes.

TIBS, 7, 253-255.

15- BERNARDS, A., DE LANGE, T., MICHELS, P.A.M., LIU, A.Y.C., HUISMAN, M.J., et BORST, P. (1984)

Two modes of activation of a single surface antigen gene of trypanosoma brucei.

Cell, 36, 163-170.

- 16- BLACK, S.J., HEWETT, R.S., and SENDASHONGA, C.N. (1982)
Trypanosoma brucei variable surface coat is released by degenerating parasites but not by actively dividing parasites.
Parasite Immunol., 4, 233-244.
- 17- BLACK, S.J., JACK, R.M., and MORRISON, P. (1983)
Host-parasite interactions which influence the virulence of trypanosoma (trypanozoon) brucei brucei organisms.
Acta Tropica, 40, 11-18.
- 18- BLOBEL, G. and DOBBERSTEIN, B. (1975)
Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma.
J. Cell. Biol., 67, 835-851.
- 19- BOOTHROYD, J.C., CROSS, G.A.M., HOEIJMAKERS, J.H.J., and BORST, P. (1980)
A variant surface glycoprotein of Trypanosoma brucei synthesized with a C-terminal hydrophobic "tail" absent from purified glycoprotein.
Nature, 288, 624-626.
- 20- BOOTHROYD, J.C., PAYNTER, C.A., CROSS, G.A.M., BERNARDS, A., and BORST, P. (1981)
Variant surface glycoproteins of Trypanosoma brucei are synthesized with cleavable hydrophobic sequences at the carboxyl and amino termini.
Nucl. Acids. Res., 9, 4735-4743.
- 21- BOOTHROYD, J.C., PAYNTER, C.A., COLEMAN, S.L. and CROSS, G.A.M (1982)
Complete nucleotide sequence of cDNA coding for a variant surface glycoprotein from Trypanosoma brucei.
J. Mol. Biol., 157, 547-556.
- 22- 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.

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

The genes for variant antigens in trypanosomes.

Am. J. Trop. Med. Hyg., 29, 1033-1036.

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

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

Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 45, 935-943.

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

Molecular basis for trypanosome antigenic variation.

Cell, 29, 291-303.

26- BORST, P., BERNARDS, A., VAN DER PLOEG, L.H.T., MICHELS, P.A.M., LIU, A.Y.C., DE LANGE, T., and KODER, J.M. (1983)

The control of variant surface antigen synthesis in trypanosomes.

Eur. J. Biochem., 137, 383-389.

27- BOUVIER, J., ETGES, R.J., and BORDIER, C. (1985)

Identification and purification of membrane and soluble forms of the major surface protein of *Leishmania promastigotes*.

J. Biol. Chem., 260, 15504-15509.

28- BRIAND, G. (1981)

Histone H5 d'érythrocyte de poulet.

Thèse de Doctorat ès-sciences Lille.

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

N-terminal amino acid sequences of variant specific surface antigens from *Trypanosoma brucei*.

Nature, 263, 613-614.

30- BRUCKDORFER, K.R., and GREEN, C. (1967)

The exchange of unesterified cholesterol between human low-density lipoproteins and rat erythrocyte "ghosts".

Biochem. J., 104, 270.

31- BURNETTE, N.W. (1981)

"Western blotting" electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A.

Anal. Biochem., 112, 195-203.

32- CAMPBELL, D.A., VAN BREE, M.P., and BOOTHROYD, J.C. (1984)

The 5' limit of transposition and upstream barren region of a trypanosome VSG gene : tandem 76 base-pair repeats flanking (TAA) 90.

Nucl. Acids. Res., 12, 2759-2774.

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

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

Exp. Parasit., 42, 6-13.

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

The membrane form of variant surface glycoproteins of *Trypanosoma brucei*.

Nature, 302, 349-352.

35- CARTER, W.G., FUKUDA, M., LINGWOOD, C., and HAKOMORI, S. (1978)

Ann. N.Y. Acad. Sci., 312, 160-177.

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

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

Biochemistry, 113, 3350-3359.

37- CHESS, Q., ACOSTA, A.M., SETHI, J.K., and SANTOS-BUCH, C.A. (1983)

Reversible acquisition of a host cell surface membrane antigen by *trypanosoma cruzi*.

Infection and Immunity, 40, 299-302.

38- CHOU, P.Y., and FASMAN, G.D. (1978)

Empirical predictions of protein conformation.

Ann. Rev. Biochem., 47, 251-276.

- 39- CLARKE, M.W., OLAFSON, R.W., and PEARSON, T.W. (1984)
Purification of major variable surface glycoproteins from african trypanosomes by reverse-phase high performance liquid chromatography.
Anal. Biochem., 142, 360-368.
- 40- CLARKE, M.W., OLAFSON, R.W., and PEARSON, T.W. (1985)
Rapid preparative scale purification of myristilated variant surface glycoprotein from african trypanosomes.
Mol. Biochem. Parasitol., 17, 19-34.
- 41- CLARKSON, A.B., and AMOLE, B.O. (1982)
Role of calcium in trypanocidal drug action.
Sciences, 216, 1321-1323.
- 42- CLARKSON, H.J., and AWAN, M.A.Q. (1967)
Immunological studies on *Trypanosoma vivax* in the sheep.
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 61, 142-145.
- 43- COHEN, C., REINHARDT, B., PARRY, D.A.D., ROELANTS, G.T., HIRSCH, W., and KANWE, B. (1984)
-helical coiled-coil structures of *trypanosoma brucei* variable surface glycoproteins.
Nature, 311, 169-171.
- 44- COLLI, W., ANDREWS, N.W., and ZINGALES, B. (1981)
Surface determinants in american trypanosomes. In : International Cell Biology (Schweiger H.D. Ed.) Springer Verlag, Berlin/Heidelberg/New York, pp 401-410.
- 45- CRICK, F.H.C. (1953)
Acta crystallogr., 6, 689-697.
- 46- 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.

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

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

Nature, 277, 310-312.

48- CROWE, J.S., BARRY, J.D., LUCKINS, A.G., ROSS, C.A., and VICKERMAN, K. (1983)

All metacyclic variable antigen types of trypanosoma congolense identified using monoclonal antibodies.

Nature, 306, 389-391.

49- D'ALESSANDRO, P.A. (1972)

Trypanosoma lewisi : production of exoantigens during infection in the rat.

Exp. Parasitol., 32, 149-164.

50- DE ARAUJO JORGE, T.C., and DE SOUZA, W. (1984)

Effect of carbohydrates, periodate and enzymes in the process of endocytosis of trypanosoma cruzi by macrophages.

Acta Tropica, 41, 17-28.

51- DE LANGE, T., and BORST, P. (1982)

Genomic environment of the expression-linked extra copies of genes for surface antigens of trypanosoma brucei resembles the end of a chromosome.

Nature, 299, 451-453.

52- DE LANGE, T., LIU, A.Y.C., VAN DER PLOEG, L.H.T., BORST, P., TROMP, M.C., and VAN BOOM, J.H. (1983)

Tandem repetition of the 5' mini exon of variant surface glycoprotein genes : a multiple promoter for VSG gene transcription ?

Cell, 34, 891-900.

53- DEMAILLE, J. (1979)

Communication personnelle.

54- DESOWITZ, R.S., and WATSON, H.C.J. (1951)

Studies on trypanosoma vivax. 1. Susceptibility of white rats to infection.

Annals of Tropical Medicine and Parasitology, 45, 207-219.

55- DESOWITZ, R.S. (1954)

Studies on *Trypanosoma vivax*. The activity of some blood fractions in facilitating infection in the white rat.

Annals of Tropical Medicine and Parasitology, 48, 142-141.

56- DESOWITZ, R.S. (1963)

Adaptation of trypanosomes to abnormal hosts.

Annals of the New York Academy of Sciences, 113, 74-87.

57- D'HONDT, J., VAN MEIRVENNE, N., MOENS, et KONDO, M. (1979).

Ca²⁺ is essential cofactor for trypanocidal activity of normal human serum.

Nature, 282, 613-615.

58- DIFFLEY, P., and JAYAWARDENA, N. (1982)

Comparative analysis of procedures used to isolate variant antigen from *trypanosoma brucei rhodesiense*.

J. Parasitol., 68, 532-537.

59- DIFFLEY, P. (1985)

Trypanosoma brucei : Immunogenicity of the variant surface coat glycoprotein of virulent and avirulent subspecies.

Exp. Parasitol., 59, 93-107.

60- DIXON, H., GINGER, C.D., and WILLIAMSON, J. (1972)

Trypanosome sterols and their metabolic origins.

Comp. Biochem. Physiol., 41, 1-18.

61- DONELSON, J.E., YOUNG, J.R., DORFMAN, S., MAJIWA, P.A.O., and WILLIAMS, R.O. (1982)

The ILtat 1.4 surface antigen gene family of *Trypanosoma brucei*.

Nucl. Acids Res., 10, 6581-6595.

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

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

Parasitology, 80, 359-369.

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

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

Biochem. Biophys. Res. Commun., 114, 119-125.

64- DWYER, D.M. (1976)

Immunologic and fine structure evidence of avidly bound host serum proteins in the surface coat of a bloodstream trypanosome.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73, 1222-1226.

65- EDMAN, P. (1956)

On the mechanism of the phenylisothiocyanate degradation of peptides.

Acta Chem. Scand., 10, 761-768.

66- EDMAN, P. (1970)

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

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

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

Anal. Biochem., 91, 403-409.

68- FERGUSON, M.A.J., and CROSS, G.A.M. (1984)

Myristylation of the membrane form of a trypanosoma brucei variant surface glycoprotein.

J. Biol. Chem., 259, 3011-3015.

69- FERGUSON, M.A.J., HALDAR, K., and CROSS, G.A.M. (1985a)

Trypanosoma brucei variant surface glycoprotein has a sn-1,2-dimyristyl glycerol membrane anchor at its COOH terminus.

J. Biol. Chem., 260, 4963-4968.

70- FERGUSON, M.A.J., LOW, M.G., and CROSS, G.A.M. (1985b)

Glycosyl-sn-1,2-dimyristylphosphatidylinositol is covalently linked to trypanosoma brucei variant surface glycoprotein.

J. Biol. Chem., 260, 14547-14555.

71- FERGUSON, M.A.J., DUSZENKO, M., LAMONT, G.S., OVERATH, P., and CROSS, G.A.M. (1986)

Biosynthesis of trypanosoma brucei variant surface glycoproteins.
J. Biol. Chem., 261, 356-362.

72- FERLUGA, J., and ALLISON, A.C. (1974)

Observations on the mechanism by which T-lymphocytes exert cytotoxic effects.
Nature (London), 250, 673-675.

73- FERRANTE, A., and ALLISON, A.C. (1983)a

Alternative pathway activation of complement by african trypanosomes lacking a glycoprotein coat.
Parasite Immunol., 5, 491.

74- FERRANTE, A., and ALLISON, A.C. (1983)b

Natural agglutinines to african trypanosomes.
Parasite Immunol., 5, 539.

75- FERRANTE, A. (1984)

The role of natural agglutinins and trypanolytic activity in host specificity of Trypanosoma musculi.
Parasite Immunol., 6, 509-517.

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

Isolation and purification of total lipids from tissues.
J. Biol. Chem., 226, 497-509.

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

The genes for the variable surface glycoproteins of Trypanosoma brucei.
In : The Biochemistry of Parasites and Host-Parasite Relationships (Van den Bossche, H., Ed.) the Host-Invader- Interplay, North-Holland, Amsterdam, pp.235-239.

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

Rapid evolution of genes coding for variant surface glycoproteins in trypanosomes.
Gene, 17, 197-211.

79- FREYMAN, D.M., METCALF, P., TURNER, M., and WILEY, D.C. (1984)
6 Å - resolution X-ray structure of a variable surface glycoprotein from trypanosoma brucei.

Nature, 311, 167-169.

80- FUTERMAN, A.H., LOW, M.G., and SILMAN, I. (1983)

A hydrophobic dimer of acetylcholinesterase from *Torpedo Californica* electric organ is solubilized by phosphatidylinositol-specific phospholipase C.

Neurosci. Lett., 40, 85-89.

81- FUTERMAN, A.H., LOW, M.G., ACKERMAN, K.E., SHERMAN, W.R., and SILMAN, I. (1985)

Identification of covalently bound inositol in the hydrophobic membrane anchoring domain of *Torpedo* acetylcholinesterase.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 129, 312-317.

82- FUTERMAN, A.H., LOW, M.G., MICHAELSON, D.M., and SILMAN, I. (1985)

Solubilization of membrane-bound acetylcholinesterase by a phosphatidylinositol-specific phospholipase C.

J. Neurochem., 45, 1487-1494.

83- GALL, W.E., CUNNINGHAM, B.A., WAXDAL, M.J., KONISBERG, W.H. and EDELMAN, G.H. (1968)

The covalent structure of a human G Immunoglobulin. IV the interchain disulfide bond.

Biochemistry, 7, 1973-1982.

84- GARNIER, J., OSGUTHORPE, D.J., and ROBSON, B. (1978)

Analysis of the accuracy and implications of simple methods for predicting the secondary structure of globular proteins.

J. Mol. Biol., 120, 97-120.

85- GLOMSET, J.A., JANSSEN, E.T., KENNEDY, R., and DOBBINS, J. (1966)

Role of plasma lecithin : cholesterol acyltransferase in the metabolism of high density lipoprotein.

J. Lipid. Res., 7, 638-648.

86- GRAB, D.J., and BWAJO, J.J. (1982)

Isopycnic isolation of african trypanosomes on percoll gradients formed in situ
Acta Tropica, 39, 363-366.

87- GRAB, D.J., WEBSTER, P., and VERJEE, Y. (1984)

The intracellular pathway and assembly of newly formed variable surface glycoprotein of trypanosoma brucei.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 7703-7707.

88- GRAY, A.R. (1964)

Soluble antigens of Trypanosoma vivax and of other trypanosomes.

Immunology, 4, 253-261.

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

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

J. Gen. Microbiol., 41, 195-214.

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

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

Ann. Trop. Med. Parasit., 59, 27-36.

91- GRAY, A.R. (1967)

Some principles of the immunology of trypanosomiasis.

Bull. Org. Mond. Santé, 37, 177-193.

92- GRAY, A.R. (1972)

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

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

93- GRAY, A.R. (1975)

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

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

- 94- GRAY, A.R. and LUCKINS, A.G. (1976)
Antigenic variation in salivarian trypanosomes
In : Biology of the Kinetoplastida (LUMSDEN, W.H.R. and EVANS, D.A.,
Eds.) Academic Press, London, pp 493-542.
- 95- GREENBLATT, C.L., and LINCICOMBE, D.R. (1966)
Identity of trypanosome growth factors in serum. II. Active globulin
components.
Exp. Parasitol., 19, 139-150.
- 96- GREENBLATT, C.L., JORI, L.A., and CAHNMANN, H.J. (1969)
Chromatographic separation of a rat serum growth factor required by
trypanosoma lewisi.
Exp. Parasitol., 24, 228-242.
- 97- GROSS, E. and WITKOP, B. (1961)
Nonenzymatic cleavage of peptide bonds : the methionine residues in bovine
pancreatic ribonuclease.
J. Am. Chem. Soc., 83, 1510-1511.
- 98- GRUENBERG, J., SHARMA, P.R., and DESHUSSES, J. (1978)
D-glucose transport in Trypanosoma brucei. D-glucose transport is the rate-
limiting step of its metabolism.
Eur. J. Biochem., 89, 461-464.
- 99- GURNETT, A.M., WARD, J., RAPER, J., and TURNER, M.J. (1986)
Purification and characterization of membrane-form variant surface glycoproteins
of trypanosoma brucei
Mol. Biochem. Parasitol., 20, 1-13.
- 100- GUYAUX, H., CORNELISSEN, A.W.C.A., PAYS, E., STEINERT, M. and
BORST, P. (1985)
T. brucei : a surface antigen mRNA is discontinuously transcribed from two
distinct chromosomes.
EMBO J., 4, 995-998.

101- HAGENFELDT, L. (1966)

A gas chromatographic method for the determination of individual fatty acids.
Clin. Chim. Acta, 13, 266-268.

102- HAJDUK, S. and VICKERMAN, K. (1981)a

Antigenic differentiation of *Trypanosoma brucei* : studies on metacyclic and first parasitemia populations.
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 75, 145-146.

103- HAJDUK, S.L., CAMERON, C., BARRY, J.D. and VICKERMAN, K. (1981)
Antigenic variation in cyclically transmitted *Trypanosoma brucei*. Variable antigen type composition of metacyclic trypanosome populations from the salivary glands of *Glossina morsitans*.

Parasitology, 83, 595-607.

104- HAJDUK, S.L., and VICKERMAN, K. (1981)b

Antigenic variation in cyclically transmitted *Trypanosoma brucei*. Variable antigen type composition of the first parasitemia in mice bitten by trypanosome-infected *Glossina morsitans*.

Parasitology, 83, 609-621.

105- HALDAR, K., FERGUSON, M.A.J., and CROSS, G.A.M. (1985).

Acylation of a plasmodium falciparum merozoites surface antigen via sn-1,2-diacyl glycerol

J. Biol. Chem., 260, 4969-4971.

106- HAMBREY, P.N., FORSBERG, C.M., MELLORS, A. (1986)

The phospholipase A1 of *trypanosoma brucei* does not release myristate from the variant surface glycoprotein.

J. Biol. Chem., 261, 3229-3232.

107- HANDMAN, E., GREENBLATT, C.L., et GODING, J.W. (1984)

An amphipathic sulphated glycoconjugate of *Leishmania* : characterization with monoclonal antibodies.

EMBO J., 3, 2301-2306.

108- HANDMAN, E., and GODING, J.W. (1985)

The *leishmania* receptor for macrophages is a lipid containing glycoconjugate.

EMBO J., 4, 329-336.

109- HANTKE, K., and BRAUN, V. (1973)

Covalent binding of lipid to protein. Diglyceride and amide-linked fatty acid at the N-terminal end of the murein lipoprotein of the Escherichia coli outer membrane.

Eur. J. Biochem., 34, 284-286.

110- HAWKING, F. (1973)

Trypanocidal substance in human serum.

Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 67, 262.

111- HENDERSON, L.E., KRUTZSCH, H.C., and OROSZLAN, S. (1983)

Myristyl amino-terminal acylation of murine retrovirus proteins : an unusual post-translational protein modification.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 339-343.

112- HENNEY, C.S. (1974)

Estimation of the size of a T. cell induced lytic lesion.

Nature (London), 249, 456-458.

113- HENRIQUEZ, D., PIRAS, R., and PIRAS, N.M. (1981)

The effect of surface membrane modifications of fibroblastic cells on the entry process of trypanosoma cruzi trypanomastigotes.

Mol. Biochem. Parasit., 2, 359-366.

114- HERMANN, J., TITANI, K., ERICSSON, L.H., WADE, R.D., NEURATH, H., and WALSH, K.A. (1978)

Amino acid sequence of two cyanogen bromide fragments of glycogene phosphorylase.

Biochemistry, 17, 5672-5679.

115- HIRUMI, H., DOYLE, J.J., and HIRUMI, K., (1977)a

African trypanosomes : cultivation of animal infective Trypanosoma brucei in vitro.

Science, 196, 992-994.

116- HIRUMI, H., DOYLE, J.J., and HIRUMI, K. (1977)b

Cultivation of bloodstream Trypanosoma brucei

Bull. Org. Mond. Santé, 55, 405-409.

117- HOEIJMAKERS, J.H.J., FRASCH, A.C.C., BERNARDS, A., BORST, P., and CROSS, G.A.M. (1980)b

Novel expression-linked copies of the genes for variant surface antigens in trypanosomes.

Nature, 284, 78-80.

118- HOLDER, A.A., and CROSS, G.A.M. (1981)

Glycopeptides from variant surface glycoproteins of *Trypanosoma brucei*.

C-terminal location of antigenically cross-reacting carbohydrate moieties.

Mol. Biochem. Parasitol., 2, 135-150.

119- HOLDER, A.A. (1983)a

Carbohydrate is linked through ethanolamine to the C-terminal amino acid of *T. brucei* variant surface glycoprotein.

Biochem. J., 209, 261-262.

120- HOLDER, A.A. (1983)b

Characterization of the cross-reacting carbohydrate groups on two variant surface glycoproteins of *Trypanosoma brucei*.

Mol. Biochem. Parasitol., 7, 331-338.

121- HORTON, D., and PHILIPS, D. (1973)

The nitrous acid deamination of glycosides and acetates of 2-amino-2-deoxy-D-glucose

Carbohydr. Res., 30, 367-374.

122- HUDSON, K.M. (1972)

Further studies on the cotton rat and the action of its serum on *trypanosoma vivax*.

Trans. R. Soc. Trop. Med., 66, 344.

123- HUDSON, K.M., TAYLOR, A.E.R. and ELCE, B.J. (1980)

Antigenic changes in *Trypanosoma brucei* on transmission by Tsetse fly.

Parasit. Immunol., 2, 57-69.

124- HUMPHREY, J.H., and WHITE, R.G. (1970)

"Immunology for students of Medicine" (3rd), Blackwell, Oxford.

125- HOUMARD, J. and DRAPEAU, G. (1972)

Staphylococcal protease : a proteolytic enzyme specific for glutamyl bonds.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 3506-3509.

126- HUNKAPILLER, M.W. and HOOD, L.E. (1978)

Direct microsequence analysis of polypeptides using an improved sequenator, a non protein carrier (polybrene), and high pressure liquid chromatography.

Biochemistry, 17, 2124-2133.

127- HYNES, R.O., and YAMADA, K.M. (1982)

Fibronectins : multifunctional modular glycoproteins.

J. Cell. Biol., 95, 369-377.

128- INOKI, S. (1960)

Studies on antigenic variation in the Welcome strain of *Trypanosoma gambiense* I. Improvements in technique.

Biken's J., 3, 215-222.

129- ITAYA, K. and MICHIO, U. (1966)

A new micromethod for the colorimetric determination of inorganic phosphate

Clin. Chim. Acta, 14, 361-366.

130- JACOB, H.S., and JANDL, J.H. (1962)

Effects of sulfhydryl inhibition on red blood cells. I. Mechanism of hemolysis.

J. Clin. Inv., 41, 779-792.

131- JACKSON, D.G., OWEN, M.J., and VOORHEIS, H.P. (1985)

A new method for the rapid purification of both the membrane bound and released forms of the variant surface glycoprotein from *trypanosoma brucei*.

Biochem. J., 230, 195-202.

132- JENNI, L. (1977)a

Antigenic variants in cyclically transmitted strains of the *T. brucei* complex.

Ann. Soc. Belge Med. trop., 57, 383-386.

133- JENNI, L. (1977)b

Comparisons of antigenic types of *Trypanosoma brucei* strains transmitted by *Glossina morsitans*.

Acta tropica, 34, 35-39.

134- JOHNSON, J.G., and CROSS, G.A.M. (1977)
Carbohydrate composition of variant specific surface antigen glycoproteins from *Trypanosoma brucei*.
J. Protozool., 24, 587-591.

135- JOHNSON, J.G., and CROSS, G.A.M. (1979)
Selective cleavage of variant surface glycoproteins from *Trypanosoma brucei*.
Biochem. J., 178, 689-697.

136- KETTERIDGE, D. (1970)
The presence of host serum components on the surface of rodent adapted *trypanosoma vivax*.
J. Protozol., 17, 24.

137- KETTERIDGE, D. (1972)
Trypanosoma vivax : surface interrelationships between host and parasite.
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 66, 324.

138- KLAPPER, D.G., WILDE, C.E. and CAPRA, J.D. (1978)
Automated amino acid sequence of small peptides utilizing polybrene.
Anal. Biochem., 85, 126-131.

139- KOSINSKI, R.J. (1980)
Antigenic variation in trypanosomes : a computer analysis of variant order.
Parasitology, 80, 343-357.

140- LABASTIE, M.C., BALTZ, T., RICHEL, C., GIROUD, C., DUVILLIER, G., PAUTRIZEL, R. and DEGAND, P. (1981)
Variant specific glycoproteins of *Trypanosoma equiperdum* : cross-reacting determinants and chemical studies.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 99, 729-736.

141- LAEMMLI, U.K. (1970)
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄.
Nature, 227, 680-681.

142- LALOR, T.M., KJELDGAARD, M., SHIMAMOTO, G.T., STRICKLER, J.E., KONIGSBERG, W.H., and RICHARDS, F.F. (1984)

Trypanosome variant-specific glycoproteins : a polygene protein family with multiple folding patterns ?

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 998-1002.

143- LANHAM, S.M. and GODFREY, D.G. (1970)

Isolation of salivarian trypanosomes from man and other mammals using DEAE-cellulose.

Exp. Parasit., 28, 521-534.

144- LAURENT, M., PAYS, E., MAGNUS, E., VAN MEIRVENNE, N. MATTHYSSENS, G., WILLIAMS, R.O. and STEINERT, M. (1983)

DNA rearrangments linked to expression of a predominant surface antigen gene of trypanosomes.

Nature, 302, 263-266.

145- LAURENT, M., PAYS, E., DELINTE, K, MAGNUS, E., VAN MEIRVENNE, N., and STEINERT, M. (1984)

Evolution of a trypanosome surface antigen gene repertoire linked to non-duplicative gene activation.

Nature, 308, 370-373.

146- LAVERAN, A. (1902)

De l'action du sérum humain sur les trypanosomes du nagana (Tr. brucei).

Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, 134, 735.

147- LAVERAN, A., et MESNIL, F. (1902)

Recherches sur le traitement et la prévention du nagana.

Annales de l'Institut Pasteur, 16, 785-817.

148- LE RAY, D., BARRY, J.D., EASTON, C. and VICKERMAN, K. (1977)

First Tsetse fly transmission of the "AnTat" serodeme of *Trypanosoma brucei*.

Ann. Soc. Belge. Med. Trop., 57, 369-373.

149- LE RAY, D., BARRY, J.D., and VICKERMAN, K. (1978)

Antigenic heterogeneity of metacyclic forms of *Trypanosoma brucei*.

Nature, 273, 300-302.

150- LEVY, M., FISCHMAN, L. and SCHENKEIN, I. (1970)

Mouse submaxillary gland proteases.

Methods Enzymol., 19, 672-681.

151- LEVY, R.I., and FREDERICKSON, D.S. (1965)

Heterogeneity of plasma high density lipoproteins.

J. Clin. Inv., 44, 426-441.

152- LINCICOMBE, D.R. (1955)

Growth factor in normal rat serum for trypanosoma lewisi.

J. Parasitol., 41 (6, sect. 2), 15.

153- LINCICOMBE, D.R. (1958)

Growth of trypanosoma lewisi in the heterologous mouse host.

Exp. Parasitol., 7, 1-13.

154- LIU, A.Y., VAN DER PLOEG, L.H.T., RIJSEWIJK, F.A.M., and BORST, P. (1983)

The transposition unit of variant surface glycoprotein gene 118 of Trypanosoma brucei. Presence of repeated elements at its border and absence of promoter associated sequence.

J. Mol. Biol., 167, 57-75.

155- LONGACRE, S., HIBNER, U., RAIBAUD, A., EISEN, H., BALTZ, T., GIROUD, C., and BALTZ, D. (1983)a

DNA rearrangements and antigenic variation in Trypanosoma equiperdum : multiple expression-linked sites in independant isolates of trypanosomes expressing the same antigen.

Mol. Cell. Biol., 3, 399-409.

156- LONGACRE, S., RAIBAUD, A., HIBNER, U., BUCK, G., EISEN, H., BALTZ, T., GIROUD, C., and BALTZ, D. (1983)b

DNA rearrangements and antigenic variation in Trypanosoma equiperdum : Expression-independant DNA rearrangements in the basic copy of a variant surface glycoprotein gene.

Mol. Cell. Biol., 3, 410-414.

157- LOURIE, E.N. and O'CONNOR, R.J. (1937)

Ann. Trop. Med. Parasit., 31, 319-340.

158- LOW, M.G., et FINEAN, J.B. (1977)

Non-lytic release of acetylcholinesterase from erythrocytes by a phosphatidylinositol-specific phospholipase C.

FEBS Letters, 82, 143-146.

159- LOW, M.G., et FINEAN, J.B. (1978)

Specific release of plasma membrane enzymes by a phosphatidylinositol-specific phospholipase C.

Biochim. Biophys. Acta, 508, 565-570.

160- LOW, M.G., and KINCADE, P.W. (1985)

Phosphatidylinositol is the membrane anchoring domain of the Thy-1 glycoprotein.

Nature, 318, 62-64.

161- LOW, M.G., FERGUSON, M.A.J., FUTERMAN, A.H. and, SILMAN, I. (1986)

Covalently attached phosphatidyl inositol as a hydrophobic anchor for membrane proteins.

TIBS, 212-215.

162- LUMSDEN, W.H.R. (1967)

Trends in research on the immunology of trypanosomiasis.

Bull. Org. Mond. Santé, 37, 167-175.

163- MAGNUS, E., VERVOORT, T. and VAN MEIRVENNE, N. (1982)

Serological cross-reaction among Trypanosome variable antigen isotype of the subgenus Trypanozon.

Ann. Soc. Belge Med. Trop., 62, 25-39.

164- MAIZEL, R.H., PHILIPP, M., DASGUPTA, A., et PARTONO, P. (1983)

Human serum albumin is a major component on the surface of microfilariae of wuchereria bancrofti.

Parasite Immunol.,

165- MAJIWA, P.A.O., YOUNG, J.R., ENGLUND, P.T., SHAPIRO, S.Z., and WILLIAMS, R.O. (1982)

Two distinct forms of surface antigen gene rearrangement in Trypanosoma brucei.

Nature, 297, 514-516.

166- MAJUMDER, H.J., BOOTHROYD, J.C. and WEBER, H. (1981)
Homologous 3' terminal regions of mRNAs for surface antigens of different antigenic variants of *Trypanosoma brucei*.

Nucl. Acids. Res., 9, 4745-4753.

167- MATTHYSSENS, G., MICHIELS, F., HAMERS, R., PAYS, E. and STEINERT, M. (1981)

Two variant surface glycoproteins of *Trypanosoma brucei* have a conserved C-terminus.

Nature, 293, 230-233.

168- Mc CONNEL, J., GURNETT, A.M., CORDINGLEY, J.S., WALDER, J.E., and TURNER, M.J. (1981)

Biosynthesis of *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein. Part I : synthesis size and processing of an N-terminal signal peptide.

Mol. Biochem. Parasitol., 4, 225-242.

169- Mc CONNEL, J., TURNER, M., and ROVIS, L. (1983)

Biosynthesis of *Trypanosoma brucei* variant surface glycoproteins-Analysis of carbohydrate heterogeneity and timing of post-translational modifications.

Mol. Biochem. Parasitol., 8, 119-135.

170- Mc LAREN, D.J. (1980)

Schistosoma mansoni. The parasite surface in relation to host immunity.

In *Tropical Medicine Research Studies, Series* (Brown K.N. ed.) Research Studies Press, John Wiley and Sons, Chichester, New York, Brisbane, Toronto.

171- Mc LAREN, D.J., and TERRY, R.J. (1982)

The protective role of acquired host antigens during schistosome maturation.

Parasite Immunol., 4, 129-148.

172- MERRIT, S.C., TSCHUDI, C., KONIGSBERG, W.H., and RICHARDS, F.F. (1983).

Reverse transcription of trypanosome variable antigen mRNAs initiated by a specific oligonucleotide primer.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 1536-1540.

173- MEYER, F., MEYER, H., and BUEDING, E. (1970)

Lipid metabolism in the parasitic and free-living flat worms.

Biochem. Biophys. Acta, 210, 256-266.

174- MICHELS, P.A.M., BERNARDS, A., VAND DER PLOEG, L.H.T., and BORST, P. (1982)

Characterization of the expression-linked gene copies of variant surface glycoprotein 118 in two independently isolated clones of *Trypanosoma brucei*.
Nucl. Acids Res., 10, 2353-2366.

175- MICHELS, P.A.M., LIU, A.Y.C., BERNARDS, A., SLOOF, P., VAN DER BIJL, M.M.W., SCHINKIEL, A.H., MENKE, H.H. and BORST, P. (1983)

Activation of the gens for variant surface glycoproteins 117 and 118 in *Trypanosoma brucei*.
J. Mol. Biol., 166, 537-556.

176- MICHELS, F., MATTHYSSENS, G., KRONENBERGER, P., PAYS, E., DERO, B., VAN ASSEL, S., DARVILLE, M., CRAVADOR, A., STEINERT, M., and HAMERS, R. (1983)

Gene activation and re-expression of a *trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein.
EMBO J., 2, 1185-1192.

177- MILLER, E.N., and TURNER, M.J. (1981)

Analysis of antigenic types appearing in first relapse populations of clones of *Trypanosoma brucei*.
Parasitology, 82, 63-80.

178- MILLER, E.N., ALLAN, L.M., and TURNER, M.J. (1984)

Topological analysis of antigenic determinants on a variant surface glycoprotein of *Trypanosoma brucei*
Mol. Biochem. Parasitol., 13, 67-81.

179- MILLER, E.N., ALLAN, L.M., and TURNER, M.J. (1984)

Mapping of antigenic determinants within peptides of a variant surface glycoprotein of *Trypanosoma brucei*.
Mol. Biochem. Parasitol., 13, 309-322.

180- MILLER, L.H., HAYNES, J.D., Mc AULIFFE, F.M., SHIROISHI, T., DUROCHEN, J.R., and Mc GINNIS, M.H. (1977)

Evidence for differences in erythrocyte surface receptors for the malarial parasites *plasmodium falciparum* and *plasmodium knowlesi*.
J. Exp. Med., 146, 277-281.

181- MILLER, L.H., Mc AULIFFE, F.M., and MASON, S.J. (1978)

The duffy blood group phenotype in american blacks infected with plasmodium vivax in Vietnam.

Am. J. Trop. Med. Hyg., 27, 1069-1072.

182- OFEK, I., and BEACHEY, E.H.

In : Bacterial adherence (Beachey E.H. Ed.) 1 (Chapman and Hall, 1980)

183- OLAFSON, R.W., CLARKE, M.W., KIELLAND, S.L., PEARSON, T.W., BARBET, A.F., and Mc GUIRE, T. (1984)

Amino terminal sequence homology among variant surface glycoproteins of african trypanosomes.

Mol. Biochem. Parasitol., 12, 287-298.

184- ONODERA, M., ROSEN, N.L., LIFTER, J., HOTEZ, P.J., BOGUCKI, M.S., DAVIS, G., PATTON, C.L., KONISBERG, W.H., and RICHARDS, F.F. (1981)

Trypanosoma congolense : surface glycoproteins of two early bloodstream variants. II. Purification and partial chemical characterization.

Exp. Parasit., 52, 427-439.

185- OSAKI, I. (1959)

Studies on the immunological variation in Trypanosoma gambiense (serotypes on the mode of relapse)

Biken's J., 2, 113-127.

186- OUAISSI, M.A., AFCHAIN, D., CAPRON, A., and GRIMAUD, J.A. (1984)

Fibronectin receptors on trypanosoma cruzi trypomastigotes and their biological function.

Nature, 308, 380-382.

187- PARRY, D.A.D. (1979)

In Fibrous proteins : scientific industrial and medical aspects. Vol. 1 (PARRY, D.A.D and CRAMER, L.K. Eds), Academic Press, London, pp393-427.

188- PARRY, D.A.D. (1982)

Coiled-coils in alpha-helix containing proteins : analysis of the residue types within the heptad repeat and the use of these data in the prediction of coiled-coils in other proteins.

Biosci. Rep., 2, 1017-1024.

189- PARSONS, M., NELSON, R.G., NEWPORT, G., MILHAUSEN, M., STUART, K., and AGABIAN, N. (1984)

Genomic organization of *Trypanosoma brucei* variant antigen gene families in sequential parasitemias.

Mol. Biochem. Parasitol., 9, 255-269.

190- PASVOL, G., WAINSCOAT, J.W., and WEATHERALL, D.J. (1981)

Erythrocytes deficient in glycophorin resist invasion by the malarial parasite *Plasmodium falciparum*.

Nature, 297, 64-66.

191- PASVOL, G., JUNGERY, M., WEATHERALL, D.J., PARSON, S.F., ANSTEE, D.J., TONNER, M.J.A. (1982)

Glycophorin as a possible receptor for *plasmodium falciparum*.

Lancet, 2, 947-950.

192- PAYS, E., DELRONCHE, M., VERVOOT, T., BLOCK, J., CANNON, F., and STEINERT, M. (1980)

Cloning and characterization of DNA sequences complementary to messenger ribonucleic acids coding for the synthesis of two surface antigens of *Trypanosoma brucei*.

Nucl. Acids Res., 8, 5965-5981.

193- PAYS, E., VAN MEIRVENNE, N., LE RAY, D. and STEINERT, M. (1981)a
Gene duplication and transposition linked to antigenic variation in *Trypanosoma brucei*.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 2673-2677.

194- PAYS, E., LHEUREUX, M. and STEINERT, M. (1981)b

Analysis of the DNA and RNA changes associated with the expression of isotypic variant specific antigens of trypanosomes.

Nucl. Acids Res., 9, 4225-4238.

195- PAYS, E., LHEUREUX, M. and STEINERT, M. (1981)c

The expression-linked copy of surface antigen gene in *Trypanosoma* is probably the one transcribed.

Nature, 292, 365-367.

196- PAYS, E., LHEUREUX, M., VERVOORT, T. and STEINERT, M. (1981)d
Conservation of a variant specific surface antigen gene in different trypanosomes species and sub-species.

Mol. Biochem. Parasitol., 4, 349-357.

197- PAYS, E., LHEUREUX, M. and STEINERT, M. (1982)
Structure and expression of *Trypanosoma brucei* gambiense variant specific antigen gene.

Nucl. Acids Res., 10, 3149-3163.

198- PAYS, E., VAN ASSEL, S., LAURENT, M., DERO, B., MICHIELS, F., KRONENBERGER, P., MATTHYSSENS, G., VAN MEIRVENNE, N., LE RAY, D., and STEINERT, M. (1983)a

At least two transposed sequences are associated in the expression site of a surface antigen gene in different trypanosome clones.

Cell, 34, 359-369.

199- PAYS, E., LAURENT, M., DELINTE, K., VAN MEIRVENNE, N., and STEINERT, M. (1983)b

Differential size variations between transcriptionally active and inactive telomeres of *Trypanosoma brucei*.

Nucl. Acids Res., 11, 8137-8147.

200- PAYS, E., VAN ASSEL, S., LAURENT, M., DARVILLE, M., VERVOORT, T., VAN MEIRVENNE, N., and STEINERT, M. (1983)c

Gene conversion as a mechanism for antigenic variation in trypanosomes.

Cell., 34, 371-381.

201- PAYS, E., DELAUW, M.F., VAN ASSEL, S., LAURENT, M., VERVOORT, T., VAN MEIRVENNE, N., and STEINERT, M. (1983)d

Modifications of a trypanosoma *b. brucei* antigen gene repertoire by different DNA recombinational mechanisms (1983d).

Cell, 35, 721-731.

202- PAYS, E., HOUARD, S., PAYS, A., VAN ASSEL, S., DUPONT, F., AERTS, D., HUET-DUVILLIER, G., GOMES, V., RICHEL, C., DEGAND, P., VAN MEIRVENNE, N., and STEINERT, M. (1985)

Trypanosoma brucei : the extent of conversion in antigen genes may be related to the DNA coding specificity.

Cell, 42, 821-829.

203- PENKE, B., FERENCZI, R. and KOWACS, K. (1974)

A new acid hydrolysis method for determining tryptophan in peptides and proteins.

Analytical Biochemistry, 60, 45-50.

204- PEREZ, H., and TERRY, R.J. (1973)

The killing of adult schistosoma mansoni in vitro in the presence of host antigenic determinants and peritoneal cells.

Int. J. Parasitol., 3, 499-503.

205- PHILIPP, N., WORMS, M.J., Mc LAREN, D.J., OGILVIE, B.M., PARKHOUSE, R.M.E., and TAYLOR, P.M. (1983)

A single parasite antigen and a host component on the surface of *litomosoïdes Carinii*.

Parasite Immunol.,

206- PHILIPS, M.C., Mc LEAN, L.R., STOUDL, G.W., ROTHBLAT, G.H. (1980)

Mechanism of cholesterol efflux from cells.

Atherosclerosis, 36, 409.

207- PRESPEER, K.A., and HEATH, E.C. (1986)

Biosynthesis and processing of a variant surface glycoprotein from *trypanosoma brucei brucei*.

Arch. Biochem. Biophys., 246, 460-468.

208- RAIBAUD, A., GAILLARD, C., LONGACRE, S., HIBNER, U., BUCK, G., BERNARDS, G., and EISEN, H. (1983)

Genomic environment of variant surface antigen genes of *trypanosoma equiperdum*.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 50, 4306-4310.

209- RAMALHO-PINTO, F.J., Mc LAREN, D.J., and SMITHERS, S.R. (1978).

Complement mediated killing of schistosomula of *schistosoma mansoni* by rat eosinophiles in vitro.

J. Exp. Med., 147, 147-156.

210- RAUTENBERG, P., REINWALD, E., and 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.

211- REINHOLD, V.N. (1972)

Gas-liquid chromatographic analysis of constituent carbohydrate in glycoproteins.

Methods Enzymol., 25, 244-249.

212- REINWALD, D.E., RAUTENBERG, P., and RISSE, H.J. (1981)

Purification of the variant antigens of trypanosoma congolense. A new approach to the isolation of glycoproteins.

Biochem. Biophys. Acta, 668, 119-131.

213- REINWALD, E., HEIDRICH, C., and RISSE, H.J. (1984)

In vitro studies on the biosynthesis of the surface glycoprotein of trypanosoma congolense.

J. Protozol., 31, 300-306.

214- REINWALD, E. (1985)

Role of carbohydrates within variant surface glycoprotein of trypanosoma congolense. Protection again proteolytic attack.

Eur. J. Biochem., 151, 385-391.

215- RENKONEN, O. (1969)

Determination of glycerol in phosphatides.

Biochem. Biophys. Acta, 56, 367-369.

216- RICE-FICHT, A.C., CHEN, K.K., and DONELSON, J.E. (1981)

Sequence homologies near the C-termini of the variable surface glycoproteins of Trypanosoma brucei.

Nature, 294, 53-57.

217- RICE-FICHT, A.C., CHEN, K.C., and DONELSON, J.E. (1982)

Point mutations during generation of expression-linked extra copy of trypanosome surface glycoprotein gene.

Nature, 298, 676-679.

218- RIDLEY, D.S., and HEDGE, E.C. (1977)

Immunofluorescent reactions with microfilariae 2 : Bearing on host-parasite relations.

Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 71, 522-525.

219- RIFKIN, M.R., (1978)a

Identification of the trypanocidal factor in normal human serum : high density lipoprotein.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 3450-3454.

220- RIFKIN (1978)b

Trypanosoma brucei. Some properties of the cytotoxic reaction induced by normal human serum.

Exp. Parasitol., 46, 189-206.

221- RIFKIN, M.R. (1983)

Interaction of high-density lipoprotein with trypanosoma brucei : Effect of membrane stabilizers.

J. Cell. Biochem., 23, 57-70.

222- RIFKIN, M.R. (1984)

Trypanosoma brucei : biochemical and morphological studies of cytotoxicity caused by normal human serum.

Exp. Parasitol., 58, 81-93.

223- RITZ, M. (1916)

Mitteilung arch. F. Schiffs. U. Trop. Hyg., 20, 387-420.

224- ROBERTS, W.L., and ROSENBERRY, T.L. (1985)

Identification of covalently attached fatty acids in the hydrophobic membrane-binding domain of human erythrocyte acetylcholinesterase.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 133, 621-627.

225- ROBSON, B., and PAIN, R.H. (1974)

Analysis of the code relating sequence to conformation in globular proteins.

Biochem. J., 141, 869-904.

226- ROSEMBLATT, M.S., MARGOLIES, M.N., CANNON, L.E. and HABER, E. (1975)

Peptides : an analytical method for their resolution by polyacrylamide gel electrophoresis applicable to a wide range of sizes and solubilities.

Ann. Biochem., 65, 321-330.

227- ROSEN, N.L., ONODERA, M., PATTON, C.L., LIPMAN, M.D.,
RICHARDS, F.F. (1979)

Trypanosoma congolense. I. Isolation and purification.

Exp. Parasitol., 47, 378-383.

228- ROSNER, L. (1940)

The reaction between iodo acetamic acid and denatured egg albumin.

J. Biol. Chem., 132, 657-661.

229- ROVIS, L., BARBET, A.F., WILLIAMS, R.O. (1978)

Characterization of the surface coat of trypanosoma congolense.

Nature, 271, 654-656.

230- ROVIS, L., and DUBE, D.K. (1981)

Studies on the biosynthesis of the variant surface glycoprotein of T. brucei :
sequence of glycosylation.

Mol. Biochem. Parasitol., 4, 77-93.

231- RUMJANEK, F.D., and Mc LAREN, D.J. (1981)

Schistosoma mansoni : defined medium for stepwise transformation of cercariae
to schistosomule in vitro.

Exp. Parasitol., 36, 360-372.

232- RUMJANEK, F.D., and Mc LAREN, D.J., and SMITHERS, S.R. (1983)

Serum-induced expression of a surface protein in schistosomula of schistosoma
mansoni : a possible receptor for lipid uptake.

Mol. Biochem. Parasitol., 9, 337-350.

233- RUMJANEK, F.D., PEREIRA, M.A., C. and SILVEIRA, A.M.V. (1985)

The interaction of human serum with the surface membrane of schistosomula of
schistosoma mansoni.

Mol. Biochem. Parasitol., 14, 63-73.

234- SADIGURSKY, M., ACOSTA, A.M., and SANTOS-BUCH, C.A. (1982)

Muscle sarcoplasmic reticulum antigen shared by trypanosoma cruzi.

Am. J. Trop. Med. Hyg., 43, 934-941.

235- SAGE, L., HAMBREY, P.N., WERCHOLA, C.M., MELLORS, A., and
TIZARD, I.R. (1981)

Lysophospholipase 1 in Trypanosoma brucei.

Tropenmed. Parasit., 32, 215-220.

236- SANTOS-BUCH, C.A. (1979)

American trypanosomiasis : chagas' disease.

Int. Rev. Exp. Pathol., 19, 63-100.

237- SAVAGE, A., GEYER, R., STIRM, S., REINWALD, L., and RISSE, H.J. (1984)

structural studies on the major oligosaccharides in a variant surface glycoprotein of trypanosoma congolense.

Mol. Biochem. Parasitol., 11, 309-328.

238- SCHMIDT, M.F.G., and SCHLESINGER, M.J. (1979)

Fatty and binding to vesicular stomatitis virus glycoprotein : a new type of post-translational modification of the viral glycoprotein.

Cell, 17, 813-819.

239- SEARS, D.A., WEEDL, R.I., and SWISHER, S.N. (1964)

Differences in the mechanism of in vitro immune hemolysis related to antibody specificity.

J. Clin. Inv., 43, 975-985.

240- SEED, J.R., KEMP, W.M. and BROWN, R.A. (1977)

Antigenic variation in the african trypanosomes : number and sequence.

In : Symposium on Experimental Parasitology of Host Parasite Interfaces. Texas J. Sci. Special. Publ., n°2, pp1.13.

241- SEED, J.R. (1978)

Competition among serologically different clones of Trypanosoma brucei gambiense in vivo.

J. Protozool., 25, 526-529.

242- SHUKLA, S.D., COLEMAN, R., FINEAN, J.B., and MICHELL, R.H. (1980)

Selective release of plasma-membrane enzymes from rat hepatocytes by a phosphatidylinositol-specific phospholipase C.

Biochem. J., 187, 277-280.

243- SMITHERS, S.R., TERRY, R.J., and HOCKLEY, D.J. (1969)

Host antigens in schistosomiasis.

Proc. R. Soc. B., 174, 483-494.

244- STEERS, E., CRAVEN, G.R. and ANFINSEN, C.B. (1965)
Evidence for non identical chains in the beta galactosidase of Escherichia coli K 12.

J. Biol. Chem., 240, 2478-2484.

245- STEINERT, M., and PAYS, E. (1985)
Genetic control of antigenic variation in Trypanosomes.

British Medical Bulletin, 41, 149-155.

246- St MARK, J.C., and DVORAK, J.A. (1982)
Influence of monosaccharides on the infection of vertebrate cells by Trypanosoma cruzi and Toxoplasma gondii.

Mol. Biochem. Parasitol., 5, 333-341.

247- STRANG, A.M., WILLIAMS, J.M., FERGUSON, M.A.J., HOLDER, A.A., and ALLEN, A.K (1986).

Trypanosoma brucei brucei variant surface glycoprotein contains non-N-acetylated glucosamine.

Biochem. J., 234, 481-484.

248- 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. Parasitol., 46, 262-276.

249- STRICKLER, J.E. and PATTON, C.L. (1980)

Trypanosoma brucei brucei : inhibition of glycosylation of the major variable surface coat glycoprotein by tunicamycin.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 3, 1529-1533.

250- STRICKLER, J.E., and PATTON, C.L. (1982)

Trypanosoma brucei : effect of inhibition of N-linked glycosylation on the neighbor analysis of the major variable surface coat glycoprotein.

Mol. Biochem. Parasitol., 5, 117-131.

251- SZARFMAN, A., TERRANOVA, V.P., RENNARD, S.I., FOIDART, J.M., FATIMA-LIMA, M., SCHEINMAN, J.I., and MARTIN, G.R. (1982)

Antibodies to laminin in chagas disease.

J. Exp. Med., 155, 1161-1171.

252- TERRY, R.J. (1957)

Antibody against trypanosoma vivax present in normal cotton rat serum.
Exp. Parasitol., 6, 404-411.

252bis- TORPIER, G., CAPRON A., and OUAISSI M.A.

Receptor for IgG (Fc) and human γ_2 -microglobulin on *S. mansoni* schistosomula.
Nature, 278, 447-449.

253- TSAI, C.M., and FRASCH, C.E. (1982)

A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels.
Anal. Biochem., 119, 115-119.

254- TSE, A.G.D., BARCLAY, A.N., WATTS, A., and WILLIAMS, A.F. (1985)

A glycopospholipid tail at the carboxyl terminus of the thy-1 glycoprotein of neurons and thymocytes.
Science, 230, 1003-1008.

255- TURCO, S.J., WILKERSON, M.A., and CLAWSON, D.R. (1984)

Expression of an unusual acidic glycoconjugate in *leishmania donovani*.
J. Biol. Chem., 259, 3883-3889.

256- VAESSEN, R.T.M.J., KREIKE, J., GROOT, G.S.P. (1981)

Protein transfer to nitrocellulose filters.
FEBS Lett., 124, 193-196.

257- VAN DER PLOEG, L.H.T., BERNARDS, A., RIJSEWIJK, F.A.M. and BORST, P. (1982)a

Characterization of the DNA duplication-transposition that controls the expression of two genes for variant surface glycoproteins in *Trypanosoma brucei*.
Nucl. Acids Res., 10, 593-609.

258- VAN DER PLOEG, L.H.T., LIU, A.Y.C., MICHELS, P.A.M., DE LANGE, T., BORST, P., MAJUMBER, H.K., WEBER, H., VEENEMAN, G.H., and VAN BOOM, J. (1982)b

RNA splicing is required to make the messenger RNA for a variant surface antigen in trypanosomes.
Nucl. Acids Res., 10, 3591-3604.

259- VAN DER PLOEG, L.H.T., SCHWARTZ, D.C., CANTOR, C.R., and BORST, P. (1985)

Antigenic variation in *Trypanosoma brucei* analyzed by electrophoretic separation of chromosome-sized DNA molecule.

Cell, 37, 77-84.

260- VAN MEIRVENNE, N., JANSSENS, P.G., and MAGNUS, E., (1975)a

Antigenic variation in syringe passaged populations of *Trypanosoma* (Trypanozoon) *brucei*. I. Rationalization of the experimental approach.

Ann. Soc. Belge. Med. Trop., 55, 1-23.

261- VAN MEIRVENNE, N., JANSSENS, P.G., MAGNUS, E., LUMSDEN, W.H.R., and HERBERT, W.J. (1975)b

Antigenic variation in syringe passaged populations of *Trypanosoma* (Trypanozoon) *brucei*. II. Comparative studies on two antigenic-type collections.

Ann. Soc. Belge Med. Trop., 55, 25-30.

262- VAN MEIRVENNE, N., MAGNUS, E. and VERVOORT, T. (1977)

Comparisons of variable antigenic types produced by *Trypanosoma* strains of the sub-genus trypanozoon.

Ann. Soc. Belge Med. Trop., 57, 409-423.

263- VENKATESAN, S., and OMERAD, W.E. (1976)

Lipid content of the slender and stumpy forms of *trypanosoma brucei rhodesiense* : a comparative study.

Comp. Biochem. Physiol., 53, 481-487.

264- VERVOORT, T., BARBET, A.F., MUSOKE, A.J., MAGNUS, E., MPLIMBAZA, G. and VAN MEIRVENNE, N. (1981)

Isotypic surface glycoproteins of trypanosomes.

Immunology, 44, 223-232.

265- VICKERMAN, K. and LUCKINS, A.G. (1969)

Localization of variable antigens in the surface coat of *Trypanosoma brucei* using ferritin-conjugated antibody.

Nature, 224, 1125-1126.

266- VOORHEIS, H.P., BOWLES, D.J., SMITH, G.A. (1982)
Characterization of the release of the surface coat protein from blood stream forms of *Trypanosoma brucei*.

J. Biol. Chem., 257, 2300-2304.

267- WEINTRAUB, H. and GROUDINE, M. (1976)
Chromosomal subunit in active genes have an altered conformation.

Science, 193, 848-856.

268- WILLIAMS, J.M. (1975)
Deamination of carbohydrate amines and related compounds.

Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 31, 9-79.

269- WILLIAMS, R.O., YOUNG, J.R. and MAJIWA, P.A.O. (1979)
Genomic rearrangements correlated with antigenic variation in *Trypanosoma brucei*.

Nature, 282, 847-849.

270- WILLIAMS, R.O., YOUNG, J.R., MAJIWA, P.A.O., DOYLE, J.J. and SHAPIRO, S.Z. (1980)

Analyses of variable antigen gene rearrangements in *Trypanosoma brucei*.

Am. J. Trop. Med. Hyg., 29 (5), 1037-1043.

271- WILLIAMS, R.O., YOUNG, J.R. and MAJIWA, P.A.O. (1982)
Genomic environment of *T. brucei* VSG genes : presence of a mini chromosome.

Nature, 299, 417-421.

272- WILSON, A.J., and CUNNINGHAM, M.P. (1972)
Immunological aspects of bovine trypanosomiasis I. Immuno response of cattle infection with "*Trypanosoma congolense*" and the antigenic variation of the infecting organisms.

Exp. Parasitol., 32, 165-173.

273- WOOD, J.N., HUDSON, L., JESSELL, T.M., and YAMAMOTO, M. (1982)
A monoclonal antibody defining antigenic determinants on subpopulations of mammalian neurons and *Trypanosoma cruzi* parasites.

Nature (London), 296, 34-38.

274- YAMAGUCHI, Y. (1960)
Nihon Univ. J. Med., 2, 59-72

275- YOUNG, J.R., DONELSON, J.E., MAJIWA, P.A.O., SHAPIRO, S.Z., and WILLIAMS, R.O. (1982)

Analysis of genomic rearrangements associated with two variable antigen genes of trypanosoma brucei.

Nuc. Acids. Res., 10, 803-819.

276- YOUNG, J.R., SHAH, J.S., MATTHYSSENS, G., and WILLIAMS, R.O. (1983)a

Relationship between multiple copies of a T. brucei variable surface glycoprotein gene whose expression is not controlled by duplication.

Cell, 32, 1149-1159.

277- YOUNG, J.R., MILLER, E.N., WILLIAMS, R.O., and TURNER, M.J. (1983)b

Are there two classes of VSG gene in Trypanosoma brucei.

Nature, 306, 196-198.

278- ZIEGENHORN, J. (1975)

Improved method for enzymatic determination of serum triglycerides.

Clin. Chem., 21, 1617-1629.



RÉSUMÉ

Les trypanosomes de la section *Salivaria* ont la particularité de pouvoir échapper à la réponse immunitaire de leur hôte définitif par le Mécanisme de la variation antigénique. La spécificité antigénique de chaque variant est déterminée par la structure d'une glycoprotéine organisée en monocouche uniforme autour de la membrane plasmique du parasite et réalisant un manteau.

A partir de populations clonées de *Trypanosoma equiperdum* et de *Trypanosoma brucei brucei*, des antigènes variables ont été isolés et étudiés sur le plan physico-chimique.

Pour chaque espèce, un antigène variable a été retenu pour la préparation de fragments moléculaires en vue d'une étude structurale approfondie. Les résultats sont comparés sur les plans des sites de glycosylation et de l'organisation moléculaire. Les antigènes ont également été définis dans leurs états de polymérisation.

L'étude a mis en évidence un certain nombre de paramètres communs à savoir, la taille moléculaire apparente, la composition globale en acides aminés, en sucres et en phosphore, l'organisation en deux domaines moléculaires, et la présence de phénomènes interactifs. Il existe toutefois des différences essentielles dans leurs séquences amino-acides, ce qui explique la grande spécificité des anticorps de variant, dans la localisation des sites de glycosylation et dans la nature des mécanismes de dimérisation et polymérisation.

