

50376  
1988  
69

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES  
DE LILLE FLANDRES ARTOIS

50376  
1988  
69

ANNEE 1988



Numéro d'ordre : 217

DE L'UNIVERSITE

Diplôme présenté pour l'obtention du grade de  
DOCTEUR EN BIOCHIMIE

par

Véronique GOMES

soutenue le 7 avril 1988

**STRUCTURE ET PROPRIETES  
INTERACTIVES DE L'ANTIGENE VARIABLE DE  
*Trypanosoma brucei brucei***

**JURY**

Président : Professeur J. MONTREUIL  
Rapporteurs : Professeur B. FOURNET  
Professeur N. VAN MEIRVENNE  
Examineurs : Docteur G. HUET-DUVILLIER  
Professeur P. DEGAND

Nos recherches ont bénéficié d'une aide financière de la Fondation pour la Recherche Médicale Française, d'une aide de la Commission des Communautés Européennes (TSD-146-F(NR) ) et d'une aide de l'UER de Médecine de l'Université de Lille II.

Nous avons bénéficié d'une allocation de Recherche du Ministère de la Recherche et de la Technologie pendant la durée de ce travail.

Ce travail a été réalisé dans l'Unité des Protéines Normales et Pathologiques (Unité INSERM N°16) dirigée par Monsieur Le Professeur ROUSSEL à qui j'exprime toute ma reconnaissance pour m'avoir accueillie dans ce site.

Je tiens à remercier tout particulièrement :

- \* Monsieur Le Professeur DEGAND qui m'a apportée encouragements et conseils au cours de ces années de préparation de thèse dans son laboratoire,
- \* Monsieur Le Professeur MONTREUIL qui nous fait l'honneur de présider cette thèse,
- \* Toutes les personnalités de ce Jury d'avoir accepter de juger ce travail,
- \* Monsieur Le Professeur VAN MEIRVENNE ainsi que Monsieur VERVOORT (Laboratoire de sérologie de l'Institut de Médecine Tropicale de Anvers) pour leur étroite collaboration dans la préparation des immunserums spécifiques de l'antigène purifié,
- \* Madame HUET-DUVILLIER pour ses précieuses qualités scientifiques dispensées lors de ce mémoire,
- \* Monsieur AUBERT pour la réalisation des spectres de dichroïsme circulaire,
- \* Tous les membres de l'équipe pour leur aide technique et photographique permettant la réalisation de ce travail et qui, par leur sympathie, ont permis mon intégration dans l'équipe,
- \* Madame DIEU ainsi que Messieurs GRARD et DELEPAUD pour la préparation des lipoprotéines,
- \* Madame REZE pour sa compétence et sa patience dans la dactylographie de ce texte.

Ce travail a fait l'objet de publications et de communications :

## 1 - PUBLICATIONS

\* Trypanosoma brucei 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.

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

ARCH. BIOCH. BIOPHYS., 249, 427-436.

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

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

BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMM., 114, 1222-1228.

\* Trypanosoma brucei brucei : variability in the association of some variant surface glycoproteins.

G. HUET-DUVILLIER, V. GOMES, D. TETAERT, P. MATHON, A. BOERSMA and P. DEGAND (1988)

Article soumis à publication.

\* Trypanosoma brucei brucei : Evidence of sub-populations in Percoll gradient centrifugation.

BOUITIGNON, F., HUBLART, M., GOMES, V., MONCANY, M.L.J., HUET, G., and DEGAND, P.

Note soumise à publication.

\* Isolation of different membrane-bound variant surface glycoprotein forms from Trypanosoma brucei brucei by reverse phase high performance liquid chromatography.

D.TETAERT, M.HUBLART, V.GOMES, A. BOERSMA and P.DEGAND.

Article soumis à publication.

## 2) COMMUNICATIONS :

a) Colloque du groupement des Protistologues de langue française :

LA ROCHELLE - Mai 1985 -

\* Isolement de l'antigène de surface d'un variant antigénique (AnTat 1.1) de T.b.brucei.  
Composition chimique.

HUET-DUVILLIER, G., DIRAT, I., GOMES, V., TETAERT, D., RICHET, C., VERVOORT, T. et DEGAND, P.

\* Aspects conformationnels de l'antigène spécifique du variant AnTat 1.1 de T.b.brucei-  
comparaison d'une étude prédictive et des résultats obtenus par dichroïsme circulaire.

GOMES, V., HUET-DUVILLIER, G. AUBERT, J.P., RICHET, C., VERVOORT, T. et DEGAND, P.

\* HPLC et préparation d'antigène variable de Trypanosome maintenu sur milieu minimum (T.b.brucei : AnTat 1.1)

HUBLART, M., TETAERT, D., GOMES, V., VERVOORT, T. et DEGAND, P.

b) Colloque INSERM, Mont Saint Odile, OTTROT, Mai 1985.

\* Etude par RPHPLC du polymorphisme moléculaire de l'antigène variable de T.b.brucei AnTat 1.1

TETAERT, D., GOMES, V., DUVILLIER, G., BOUTIGNON, F., DEMEYER, D. et DEGAND, P.

c) Colloque du groupement des Protistologues de langue française

BARCELONE - Mai 1986

\* Libération séquencée de l'antigène variable d'un variant antigénique (AnTat 1.1) de T.b.brucei : Etude de différents agents déstabilisants de protéines membranaires.

GOMES, V., DUVILLIER, G., HUBLART, M., MONCANY, M.M.J., VERVOORT, T. et DEGAND, P.

\* Insertion membranaire de l'antigène variable de surface de T.b.brucei

HUBLART, M., BOUTIGNON, F., GOMES, V., RICHEL, C., VERVOORT, T., et DUVILLIER, G.

\* Mise en évidence de sous-populations de T.b.brucei par séparation directe sur gradients de Percoll.

MONCANY, M.L.J., HUBLART, M., GOMES, V., TETAERT, D., MATHON, P. et BOERSMA, A.

d) Forum des Jeunes chercheurs - TOULOUSE - Juillet 1986.

\* Physico-chimie et propriétés d'une glycoprotéine responsable de l'antigénicité de T.b.brucei.

GOMES, V., TETAERT, D., HUBLART, M., HUET, G., BOERSMA, A. et DEGAND, P.

e) IX<sup>e</sup> Symposium of glycoconjugates - LILLE- Juillet 1987.

\* Polymers of the surface glycoproteins of variants AnTat 1.1, 1.10 and 1.8 of T.b.brucei and variant BoTat-1 of T.equiperdum

V.GOMES, G.HUET, D.TETAERT, F.BOUTIGNON, D.DEMEYER, T.VERVOORT, A.BOERSMA

\* Organization, antigenicity and function of a variable antigen of T.b.brucei (variant AnTat 1.1)

G.HUET, V.GOMES, M.HUBLART, D.TETAERT, P.MATHON, E.PAYS, P.DEGAND.

\* Glycosylation of variant surface antigen from T.equiperdum and T.b.brucei

F.BOUTIGNON, V.GOMES, G.HUET, M.HUBLART, C.RICHET, B.FOURNET,  
A.BOERSMA.

Abréviations utilisées dans le texte

AnTat	Anvers Trypanozoon antigenic type
ARN	acide ribonucléique
AVS	antigène variable de surface
BSA	sérumalbumine bovine
BSTFA	bis- (triméthylsilyl) trifluoroacétamide
CRD	déterminant de réaction croisée
DAB	acide 2,2' -azinobis(3-éthyl benzothiazoline) sulfonique
DAF	decay accelerating factor
DEAE	diaminoéthyl cellulose
DNA	acide désoxyribonucléique
DSP	dithiobis (succinimidyl propionate)
EATRO	East African Trypanosomiasis Research Organization
EDTA	acide éthylène diamine tétraacétique
EGTA	acide éthylèneglycol bis (2-aminoéthyl ether)N,N-tétraacétique
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
FMSP	formylméthionine sulfone méthyl phosphate
HDL	high density lipoprotein (lipoprotéine de haute densité)
HPLC	chromatographie liquide haute performance
IFTC	isothiocyanate de fluoresceine
Ig G	immunoglobuline de type G
Ig M	immunoglobuline de type M
ITat	International laboratory for research on animal disease (ILRAD) trypanozoon antigenic type
ITMAS	Institute tropical Medicine Antwerp Stock
LCAT	lécithine : cholestérol acyltransférase
LDL	low density lipoprotein (lipoprotéine de faible densité)
LPG	lipophosphaglycane
MEM	milieu minimum Eagle's
mfVSG	forme membranaire de l'antigène
MiTat	Molteno Institute Trypanozoon antigenic type
NEM	N-ethylmaleimide
NIT	neutralization infectivity test
nOG	n-octylglucopyrannoside
PBS	tampon phosphate salin
pCMPSA	acide p-mercuriphénylsulfonique
pHi	point isoelectrique
PMSF	fluorure de phénylméthylsulfonyle
PNP	4 nitrophénylphosphate
PSG	tampon phosphate glucosé
RIA	radioimmuno assay
RMN	résonance magnétique nucléaire
RPSC	colonne de silice en phase inverse
SDS	dodécyl sulfate de sodium
s VSG	forme soluble de l'antigène
TCA	acide trichloracétique
TFA	acide trifluoroacétique
TLCK	N- $\alpha$ -p-tosyl-L-lysylchlorométhyl cétone
Tris	2-amino-2-(hydroxyméthyl) 1,3-propane diol
TxTat	Texas Trypanozoon antigenic type
VLDL	very low density lipoprotein (lipoprotéine de très faible densité)
WraTat	Walter Reed Army Trypanozoon antigenic type

## INTRODUCTION

La maladie du sommeil ou trypanosomiase africaine affecte aujourd'hui plusieurs dizaines de millions d'hommes et de femmes pour lesquels il est plus urgent que jamais d'améliorer les possibilités diagnostiques et de concevoir de nouvelles approches thérapeutiques.

Deux espèces sont connues pour leur pouvoir pathogène vis à vis de l'homme :

- T.b.gambiense, qui sévit en Afrique équatoriale, occidentale et centrale et qui se caractérise par une symptomatologie d'évolution chronique à réservoir de virus humain,

- T.b.rhodesiense, qui se localise en Afrique de l'est et du sud et qui est responsable d'une maladie d'évolution aigüe à réservoir de virus animal.

La pathologie humaine s'inscrit, on le sait aussi, dans un déséquilibre socio-économique profond où la trypanosomiase animale est encore un facteur déterminant et aggravant.

D'autres espèces, non pathogènes pour l'homme, sont en effet responsables de graves endémies qui, par la mortalité animale, aggrave le bilan déficitaire en protéines produites. On citera les souches principales responsables : T.congolense, T.vivax et T.b.brucei.

La raison fondamentale de la persistance de ce fléau repose sur un phénomène biologique : la variation antigénique.

Les trypanosomes africains sont en effet capables d'échapper au système immunitaire de l'hôte par changement successif de leur spécificité antigénique de surface, c'est à dire par l'expression séquencée de glycoprotéines analogues, de même fonctionnalité mais d'axe peptidique différent dans leur structure primaire.

Ce phénomène, de découverte relativement récente, permet au parasite de se protéger d'anticorps circulants mais aussi et surtout d'épuiser les réactions de défense du sujet infecté pour les utiliser à son profit.

Le nombre considérable d'antigènes exprimés successivement en surface parasitaire ainsi que la diversité importante des souches trypanosomales posent problème quant au résultat d'une vaccination. Les essais dans ce domaine ont d'ailleurs été décevants et une connaissance plus précise au plan structural du manteau de surface parasitaire et de son organisation devrait autoriser de nouvelles approches avec de meilleures chances de succès.

Le modèle d'étude que nous avons choisi est représenté par une souche non pathogène pour l'homme : T.b.brucei dont les caractéristiques générales tant morphologiques que biologiques sont très voisines de celles observées pour T.b.gambiense et T.b.rhodesiense. Adaptée sur rats, il nous a été possible de multiplier le parasite en quantité.

Nous avons étudié alors les méthodes de libération de l'antigène variable depuis la membrane parasitaire, mis au point des protocoles de purification et abordé des aspects structuraux. Nous avons enfin tenté d'en définir l'organisation moléculaire et le potentiel de polymérisation.

Les résultats qui sont présentés dans ce mémoire ont aussi trait à l'implication de l'antigène variable dans le phénomène de trypanocidie par lipoprotéines de haute densité (HDL) humaines.

CHAPITRE I  
GENERALITES

## I - BIOLOGIE PARASITAIRE

### 1 - Classification

Les trypanosomes sont des protozoaires flagellés appartenant à l'ordre kinetoplastida et à la famille des Trypanosomatidae (classification de HOARE (1972) (87) (tableau 1).

Le genre Trypanosoma est formé de deux sous-groupes qui diffèrent essentiellement sur les plans biologiques, épidémiologiques et pathologiques : le groupe STERCORARIA ou trypanosomes américains et le groupe SALIVARIA ou trypanosomes africains. Dans ce dernier groupe, deux sous espèces sont pathogènes pour l'homme, T.brucei gambiense et T. brucei rhodesiense.

Nous nous limiterons dans ce mémoire à l'étude des trypanosomes africains en utilisant un modèle non pathogène pour l'homme : T.b.brucei, modèle dont les caractéristiques biologiques sont très proches de T.b.gambiense et T.b.rhodesiense responsables de la trypanosomiase humaine ou maladie du sommeil.

### 2 - Biologie et morphologie

Les trypanosomes africains sont des parasites exclusivement extracellulaires, fusiformes (15 à 20  $\mu\text{m}$  de long sur 2 à 3  $\mu\text{m}$  de large), possédant un flagelle qui assure leur mobilité et aussi un manteau plasmique indispensable à la relation hôte-parasite.

Le cycle biologique parasitaire est caractérisé par un passage d'un hôte invertébré à un hôte définitif vertébré. Durant le cycle, il est possible de distinguer plusieurs stades de différenciation du parasite, stades spécifiques de l'évolution morphologique du protozoaire tant chez l'insecte que chez le mammifère hôte définitif [ figure 1 selon VICKERMAN et coll.(1969) (176) ]

#### A - Chez l'hôte définitif

Chez l'hôte définitif, les parasites sont inoculés par piqûre de l'insecte lors du repas sanguin et se multiplient après une phase d'adaptation courte.

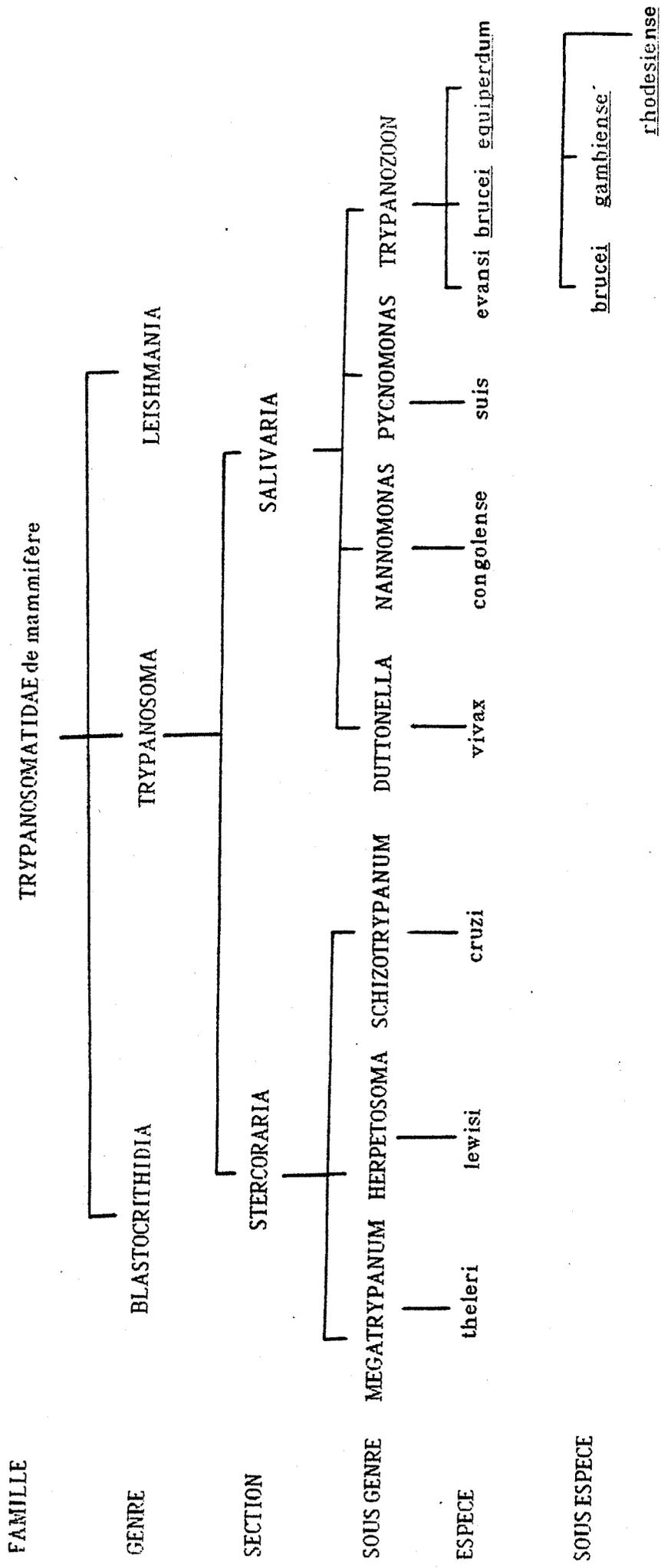


Schéma simplifié de la classification des Trypanosomatidae d'après HOARE (1972)

----- : parasites pour lesquels le phénomène de la variation antigénique a été démontré.

TABLEAU 1

CYCLE EVOLUTIF DE Trypanosoma brucei  
(VICKERMAN, 1969)

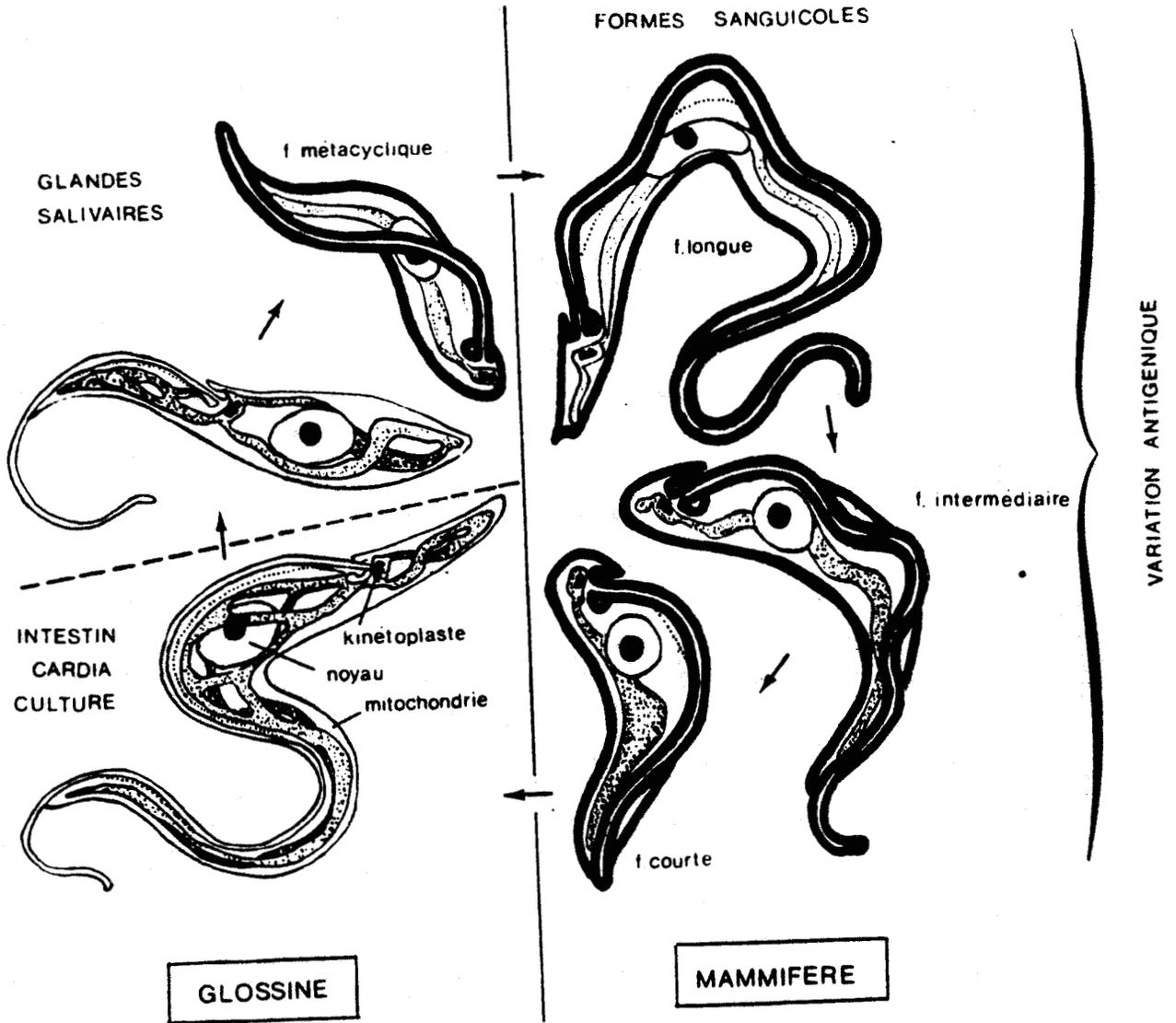


FIGURE 1

La maladie évolue en 2 phases successives : phase lymphatico-sanguine puis méningo-encéphalitique.

Les trypanosomes sanguicoles "trypomastigotes" peuvent se présenter sous différents types :

- forme allongée et élancée (type slender des anglosaxons), caractérisée par un flagelle libre et un mitochondrion peu développé.
- forme courte massive (type stumpy des anglosaxons) dépourvue de flagelle libre et possédant un réseau mitochondrial important.
- enfin, existent également des formes intermédiaires représentant des formes évolutives vers le stade ramassé, stade ultime qui correspond à des parasites ayant perdu la capacité de se multiplier.

Cet état particulier représente une "préadaptation" ou un "stade d'attente" à l'ingestion par l'insecte hôte intermédiaire. Ces formes sont les seules capables de se développer chez l'insecte et donc d'initier la phase intermédiaire du cycle.

A tous ces stades sanguicoles, on notera la permanence du manteau plasmique, interface indispensable sang-parasite et support de l'adaptation à l'hôte définitif.

### B-Chez l'hôte intermédiaire

L'insecte vecteur, mouche tsé-tsé ou glossine, se contamine lors d'un repas sanguin par absorption des formes massives, aboutissement de l'évolution sanguicole chez l'hôte définitif.

Les trypomastigotes ingérés se multiplient activement par scission binaire. Ils s'amincissent considérablement et perdent leur manteau de surface pour gagner, en 10 à 15 jours, l'intestin antérieur. Ces formes épimastigotes (ou procycliques) se fixent par leur flagelle à la paroi intestinale et se divisent tout en évoluant à nouveau sur le plan morphologique. Elles migrent bientôt vers le tube digestif haut de l'insecte, pénètrent dans les glandes salivaires et vont adopter une forme trypomastigote "métacyclique" recouverte à nouveau d'un manteau de surface.

Les trypanosomes s'engagent alors dans la trompe de la glossine et sont entraînés avec la salive lors de la piqûre de l'insecte.

Seulement 5 à 10% des mouches infestées seront infestantes. Ceci suppose que l'adaptation parasite-insecte n'est pas chose facile et que des inducteurs nombreux interviennent pour la favoriser. On insistera en particulier sur le ou les facteurs salivaires qui font réapparaître une biosynthèse du manteau.

La glossine n'est pas le seul insecte vecteur. Il peut également y avoir transmission par les tabanidés ,intermédiaires vecteurs de T.evansi et T.equinum.

Le passage par l'insecte peut aussi ne pas exister, c'est le cas pour T.equiperdum dont la transmission se fait lors d'un contact vénérien.

## **II - Variation antigénique, manteau de surface et populations parasitaires.**

### **1 - Définition du mécanisme biologique de la variation antigénique.**

Après infestation de l'hôte, les trypanosomes se multiplient en grand nombre et une majeure partie d'entre eux sera détruite par le système immunitaire du mammifère receveur. Seul un faible pourcentage, qui en surface membranaire a changé d'"enveloppe", de "manteau" donc de "spécificité antigénique de surface", aura échappé aux mécanismes de défense et pourra proliférer pour donner une nouvelle vague parasitémique.

Le mécanisme de "variation antigénique" est une propriété qui a été démontrée pour la plupart des espèces trypanosomales de la section Salivaria : T.b.brucei [ RITZ (1916) (157) ], T.b.rhodesiense [ LOURIE et O'CONNOR, (1937)(118) ], T.b.gambiense (OSAKI (1959)(138) ), T.vivax [ CLARKSON et AWAN (1967) (32) ], T.congolense [ (WILSON et CUNNINGHAM (1972) (183) ), T.equiperdum [ CAPBERN et coll.(1977)(23) ].

Au niveau du parasite lui-même, le phénomène de variation antigénique se rapporte essentiellement au manteau de surface des formes sanguicoles; VICKERMAN et LUCKINS(1969)(176) ont en effet pu montrer une localisation à ce niveau des épitopes spécifiques à l'aide d'anticorps spécifiques de variants. CROSS en 1975 (34) a montré que le "manteau de surface" des trypanosomes était principalement constitué d'un composant de nature glycoprotéique, recouvrant la surface cellulaire en une couche moléculaire uniforme. Ce manteau de surface est seul responsable de la spécificité immunologique de variants antigéniques. Les antigènes impliqués dans ce processus sont appelés antigènes variables ou antigènes spécifiques de variants(AVS).

### **2 - Mode d'apparition des antigènes variables**

Elucider le mécanisme biologique, comprendre la réalité moléculaire de la variation antigénique sont devenus des impératifs espérés pour tenter une vaccination dans le

cadre de la trypanosomiase. Cette multiplicité constatée de variants expliquerait en effet les échecs rencontrés par les auteurs dans les études préliminaires de mise au point d'un antigène à fin thérapeutique par immunisation.

Plusieurs observations importantes, en particulier les travaux de GRAY (1964)( 66 ), (1965a)( 67), (1965b) ( 68), (1967)( 69),(1972)( 70),(1975)( 71),(1976)( 72) ont permis de montrer :

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

\* qu'il y avait réversion à un type antigénique de base (antigène basique de la souche) après accomplissement du cycle de développement chez l'insecte vecteur, phénomène observé par JENNI (1977a)( 98)(1977b)( 99), et confirmé par HUDSON et coll. en 1980 ( 93).

\* qu'il existait 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'était plus toujours aussi rigoureusement identique et prévisible.

Pour GRAY, la nature réversible de la variation antigénique avec en particulier l'existence d'un type antigénique de base ainsi que le schéma évolutif relativement constant dans l'ordre d'apparition des variants au cours des premières étapes de la parasitose étaient en faveur d'un mécanisme adaptatif.

La synthèse par l'hôte d'anticorps contre ce type antigénique de base "déclencherait" le changement d'antigène pour un autre qui serait 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.

Dans le but de démontrer la nature et le mécanisme immunologiques du facteur de déclenchement de la variation, le modèle expérimental a été en un premier temps limité à l'étude du seul hôte définitif.

Pour simplifier en effet, le protocole d'étude, VAN MEIRVENNE et coll. (1975a)(173),(1975b)(174)(1977)(175) ont tout d'abord étudié la variation antigénique induite par inoculation expérimentale à la seringue d'un clone déterminé de T.b.brucei. Cette approche avait le mérite de simplifier le modèle en supprimant dans ces phénomènes complexes la participation de l'insecte dans l'évolution immunologique des populations parasitaires.

De ces travaux, on retiendra que lors de la première parasitémie, la population trypanosomale est homogène à 99% et constituée par un type antigénique majeur (homotype).

Puis après la destruction immunitaire de cet homotype, un ou plusieurs sérotypes (hétérotypes) prolifèrent. Les pics successifs de parasitémie peuvent donc contenir un ou plusieurs sérotypes majeurs, qui se verront pour certains rapidement éliminés, pour d'autres moins rapidement. La présence et l'importance relative de ces sérotypes sont aussi à considérer en fonction de la vitesse plus ou moins grande de multiplication des parasites en fonction des types.

Une même démarche expérimentale a été réalisée à la même époque chez T. equiperdum par CAPBERN et coll. (1977)(23) qui ont pu déduire que :

- \* le premier sérotype détecté correspond toujours à celui ayant servi à l'inoculation.
- \* quel que soit le clone choisi pour l'infestation, le premier sérotype qui lui succède est toujours le même, à savoir le "type de base de la souche".
- \* les types précoces apparaissent dans un ordre relativement stable
- \* plus de 100 sérotypes peuvent être isolés au cours de l'évolution des vagues de parasitémie et séparés en 3 catégories en fonction de leur délai d'apparition chez l'animal:
  - types "précoces", apparaissant dans les 3 premières semaines de la maladie
  - types "semi-tardifs" se développant au delà des 3 premières semaines
  - types "tardifs" caractérisés uniquement chez les lapins ayant survécu plus d'un mois

Ainsi, l'injection d'un clone unique de parasites permet de définir une succession relativement constante des variants antigéniques. Il existe cependant de légères variations dans la succession d'apparition des types antigéniques lors des différentes infections et ce potentiel d'irrégularité rend difficile, voire même impossible, une prévention par vaccination à partir des sérotypes les plus précoces.

Cette analyse des différentes populations trypanosomales apparaissant lors de la variation antigénique a été possible grâce au développement de techniques immunologiques décrites en particulier par VAN MEIRVENNE et coll. (1975)(173), à savoir :

- l'immunofluorescence : chaque population est caractérisée par la spécificité antigénique de son manteau de surface. La mise en évidence se fait par utilisation d'anticorps spécifiques du variant étudié sur frottis parasitaire. Un second anticorps portant un marqueur fluorescent permet la mise en évidence de la réaction antigène-anticorps et dans le cas de l'étude des populations de trypanosomes, permet d'identifier chacune d'entre elles et d'en estimer le pourcentage relatif. Ce test tout d'abord expérimental est devenu depuis la base même de diagnostic de trypanosomiase sur le terrain.

- l'immunolyse : les parasites vivants sont incubés dans un sérum de cobaye et soumis à l'effet lytique d'anticorps spécifiques de variants. A une dilution donnée, certains immunsérums provoquent en effet la lyse totale des parasites correspondants et cela permet au plan expérimental par exemple, d'éliminer une population trypanosomale présente dans un mélange de parasites prélevés au cours d'une vague de parasitémie. Ce moyen de "sélection" des parasites s'est généralisé et a autorisé le clonage, par exemple, de souche de T.brucei que nous utilisons dans ce travail.

En dehors de l'influence de l'hôte définitif sur l'apparition de vagues parasitaires et de leur type immunologique, le vecteur invertébré joue lui aussi un rôle dans la pérennisation des trypanosomes et de leur sérotype.

JENNI (1977)(98)(99) a pu montrer que les populations trypanosomales de la toute première parasitémie après transmission par l'insecte vecteur étaient antigéniquement hétérogènes. LE RAY et coll. (1977)(113) ont suggéré que cette hétérogénéité pouvait être préexistante chez l'hôte intermédiaire, notamment au niveau des glandes salivaires de la mouche. BARRY et coll. (1979)(12) ont confirmé l'existence de cette diversité des types antigéniques métacycliques tout en soulignant leur nombre relativement limité. Cette hétérogénéité pourrait être interprétée comme une possibilité accrue d'adaptation des parasites vis à vis de l'hôte receveur.

Plus récemment, HADJUK et coll. (1981)(75) puis BARRY et coll. (1983)(13) ont montré que pour chaque sérodème étudié, existait un répertoire distinct de types métacycliques et que dans chaque population métacyclique, une partie seulement du répertoire antigénique était exprimée.

L'exemple le plus représentatif a été décrit par CROWE et coll.(1983)(38) pour T.congolense pour lequel le répertoire métacyclique est composé uniquement de douze types antigéniques. On observe que :

\* quel que soit le type antigénique ingéré par la mouche, il se développe au niveau de ses glandes salivaires un "répertoire antigénique métacyclique".

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

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

### 3 - Mécanisme d'apparition des antigènes variables

Afin de définir les bases du mécanisme de la variation et comprendre le pourquoi et le comment d'un ordre d'apparition des variants antigéniques, plusieurs hypothèses ont été évoquées, qui font appel à la notion de :

\* sélection en fonction du taux de croissance relatif des populations parasitaires antigéniquement différentes; ces différences seraient dues à des effets de compétition intervenant entre les variants d'un même stock [SEED et coll.(1977)(163); SEED (1978)(164)]. Cette hypothèse n'a pas été confortée par les études mathématiques de KOSINSKI (1980)(104) qui s'est livré à un calcul portant sur un modèle de 90 variants possédant à priori des taux de croissance largement différents. Selon ces résultats, 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 de variation rapporté dans la littérature mais ceci n'élimine toutefois pas la notion d'un taux de croissance fonction du variant et de son hôte d'accueil.

\* notion de priorité statistique d'expression d'un variant.

MILLER et coll. (1981)(130) 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 apparemment 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.

Ainsi, chaque type antigénique nouveau serait exprimé selon un ordre de priorité statistiquement définissable, différent pour chaque variant initial, et les variants prédominants représentent un groupe de types antigéniques qui possèdent une forte probabilité d'expression à partir des autres types antigéniques. Il pourrait donc exister au niveau du changement de gène un mécanisme responsable d'une certaine programmation dans la succession des types antigéniques.

\* notion de sélection en fonction de la réponse immunologique de l'hôte :

Le processus de variation antigénique a été souvent décrit comme une réponse du parasite vis à vis des anticorps synthétisés par l'hôte afin d'échapper à la destruction immunitaire.

Toutefois, LE RAY et coll.(1978)(114) avaient 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, observation qui suggérait que les anticorps ne jouaient pas un rôle indispensable dans l'induction du processus. HIRUMI et coll.(1977a)(85)(1977b)(86) ainsi que DOYLE et coll.(1980)(45) mettaient en évidence, par culture de formes trypomastigotes sur support cellulaire, que la variation antigénique pouvait se produire "in vitro", obtenant à partir de populations clonées, des populations de rechute antigéniquement hétérogènes. Seule une différence dans les délais d'apparition pouvait distinguer le mécanisme "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.

Au total, ces résultats semblent donc indiquer 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 que les nouveaux variants deviendraient apparents dans les rechutes successives alors que les précédents seraient éliminés par les anticorps de l'hôte. Cette hypothèse a été confirmée par HAJDUK et coll. (1981)(75) qui ont montré l'existence du phénomène de variation antigénique chez l'animal en immuno dépression.

Il faut toutefois convenir que nous ne connaissons pas encore le mécanisme précis de ces variations et que le facteur d'induction intervenant au niveau du génome demeure encore à découvrir.

### III - RELATIONS HOTE-PARASITE

#### 1 - Facteur trypanocide : isolement, purification et caractérisation

L'observation de sujets résistant naturellement à des infections par différentes souches de trypanosomes fut à l'origine de nombreux travaux traitant des relations existant entre hôte et parasite. Nous envisageons successivement les facteurs sériques intervenant dans cette relation ainsi que le rôle de certains constituants parasitaires, par exemple dans la possibilité d'expression d'un parasite donné chez un hôte donné.

#### A - Mise en évidence et définition d'un facteur trypanocide

L'effet toxique du sérum normal humain sur l'espèce T.b.brucei, non pathogène pour l'homme, fut décrit dès 1902 par LAVERAN (110), ainsi que par LAVERAN et MESNIL (111). En effet, ils réussirent à guérir des souris infestées par l'espèce parasitaire T.b.brucei en leur injectant de faibles quantités de sérum humain. Cette observation mettait en évidence pour la première fois l'existence d'un principe actif trypanocide dans le sérum humain normal.

Dès lors, de nombreuses hypothèses sur la nature du facteur trypanocide et son mode d'action furent proposées. Pour certains auteurs, le facteur lytique était représenté par des anticorps "naturels" présents dans le sérum [ DESOWITZ (1970) (40) ]; pour d'autres, il y avait intervention du système du complément dans l'initiation de la lyse parasitaire [ LUMSDEN (1972) (121), HAWKING et coll. (1973) (83) ].

Les études de RIFKIN (1978b) (153) ont permis très vite d'éliminer deux hypothèses, à savoir l'intervention de la voie classique mais aussi de la voie alterne d'activation du complément dans l'effet cytotoxique du sérum humain normal sur T.brucei. En effet, l'activité du complément total, mesurée par hémolyse de globules rouges présensibilisés, ne peut en aucun cas être corrélée au pourcentage de lyse de T.brucei, et ceci quel que soit le nombre de sérums testés. De même, l'inactivation de ces deux voies par chauffage à 56°C ou par complexation par l'EDTA des ions  $Mg^{++}$  (indispensables au fonctionnement de la voie alterne) ou des ions  $Ca^{++}$  (indispensables à l'activation du complément de la voie classique) n'a pas ou peu d'effet sur le facteur trypanocide, ce qui écarte donc toute intervention du complément dans l'activité lytique.

D'autres études antérieures avaient évoquées l'importance des immunoglobulines de type IgM [ AARONOVITCH et TERRY (1972) (1) ], de l'  $\alpha 2$  macroglobuline [ HAWKING et coll. (1973) (83) ] et des  $\alpha$  lipoprotéines [ YAMAGUCHI (1960) (184) ] dans l'identification du facteur trypanocide.

Chacun de ces trois facteurs a été étudié [ RIFKIN (1978b) (153) ].

##### a - Immunoglobulines de type IgM

Différents résultats expérimentaux ont permis d'écarter l'intervention des anticorps et plus particulièrement des immunoglobulines de type IgM dans l'activité trypanocide. Nous ne décrivons que les études les plus significatives :

- Aucune agglutination de trypanosomes vivants n'a pu être observée quelle que soit la dilution du sérum utilisée et quel que soit le sérum humain étudié.

- L'élution du composé trypanocide actif sur une colonne Sépharose 6 B ne coïncide pas avec le profil d'élution des IgM, ou des autres classes d'immunoglobulines.

- L'activité trypanocide d'un sérum préalablement incubé avec des immunoglobulines de type IgG dirigées contre les IgM humaines est identique à celle d'un sérum humain préalablement incubé avec des IgG non spécifiques témoins.

Ainsi, la participation des IgM en tant que facteur trypanocide peut donc être définitivement rejetée.

#### b - $\alpha$ 2 macroglobuline

Le rôle d'  $\alpha$  2 macroglobuline a aussi été évoqué dans le phénomène de lyse par sérum humain des trypanosomes. Différentes approches expérimentales semblent infirmer cette hypothèse :

. l'activité estérasique du sérum n'est pas corrélée avec le pouvoir trypanocide de ces sérums

. l'  $\alpha$  2 macroglobuline sert de "porteur" pour de nombreuses protéases sériques telles que la thrombine et la plasmine [ PUTNAM (1975)(147) ]. L'éventualité d'une activité trypanocide par le biais de ces protéases semble aussi devoir être écartée puisque le traitement du sérum par des inhibiteurs protéasiques ne modifie pas l'activité trypanocide.

. Enfin, l'activité trypanocide est identique entre un sérum adsorbé soit avec un anticorps type IgG de lapin anti  $\alpha$  2 M humaine soit avec un anticorps IgG normal de lapin, ce protocole d'adsorption éliminant environ 75% de l'  $\alpha$  2 macroglobuline.

Ces quelques points expérimentaux permettent donc d'éliminer totalement la participation de l'  $\alpha$  2 macroglobuline dans la réaction trypanocide.

Pour localiser le facteur sérique responsable de la lyse parasitaire, RIFKIN (1978b)(153) a finalement réalisé un fractionnement du sérum humain par une série de précipitations en sulfate d'ammonium de saturation croissante (30% à 75%). Seule la fraction obtenue par précipitation à 75% possède l'activité trypanocide et résiste à un chauffage à 56°C pendant 30 minutes. Seuls 30% de l'activité lytique initiale étant toutefois retrouvés dans cette fraction. Cette diminution pouvant éventuellement s'expliquer par destruction de l'activité trypanocide par les concentrations élevées en sels

ou par subfractionnement du facteur actif, les fractions ont été réassociées sous toutes les combinaisons possibles. Seule l'association de toutes les fractions a permis de restaurer l'activité avec cependant une perte de 31 %.

Ainsi ces travaux, s'ils commencent à cerner les facteurs sériques lytiques et en montrent la complexité d'étude, ne donnent pas encore l'identité du ou des facteurs responsables de la lyse parasitaire. Ils avaient apparemment à l'époque le mérite d'orienter vers une autre direction dont l'abord biochimique est plus délicat, les lipoprotéines.

### c - $\alpha$ lipoprotéines

Les essais de caractérisation du facteur sérique trypanocide ont rapidement permis d'associer l'activité trypanocide à une protéine dont la taille moléculaire, estimée par chromatographie de gel filtration sur colonne de Sépharose 6 B, était d'environ 500 000. Le profil d'élution du facteur actif ne recouvrait pas totalement mais cependant coïncidait avec le comportement des  $\alpha$  lipoprotéines. Cependant, ces  $\alpha$  lipoprotéines étant caractérisées par une très grande hétérogénéité, il semblait possible que le facteur lytique soit associé à une des sous-classes regroupant les lipoprotéines. YAMAGUCHI (1960)(184) avait d'ailleurs décrit une activité trypanocide localisée essentiellement au niveau de la fraction IV - 1 de Cohn qui contient les  $\alpha$  lipoprotéines.

Bien qu'importants au plan biochimique, ces travaux préliminaires rendaient cohérent le fait d'associer activité trypanocide et  $\alpha$  lipoprotéines sériques et expliquaient aussi la fragilité du facteur responsable de la lyse.

### B - Propriétés trypanocides du sérum humain - Effet cellulaire - Effets membranaires

Le mécanisme de lyse parasitaire "in vivo" par le sérum humain a été étudié par RIFKIN (1984)(155). Pour cette étude, les parasites sont incubés en milieu minimum Eagle's (MEM) à 37°C avec du sérum normal humain à 25%. Au temps 0 de l'expérience, les cellules ont une morphologie normale et sont très mobiles. Lors de la phase prélytique, c'est à dire après 30 minutes d'incubation, les parasites s'arrondissent et le gonflement cellulaire se traduit par une augmentation de 1,5 à 2 fois le volume normal. Cependant, l'incorporation de leucine radiomarquée ne traduit aucune perturbation de la synthèse protéique ni de la mobilité des parasites. Après 30 minutes d'incubation, la lyse parasitaire débute et se caractérise par une perte totale de la mobilité des trypanosomes ainsi que par une diminution importante de leur capacité de synthèse protéique.

Des études de microscopie électronique ont été réalisées sur les parasites incubés dans les mêmes conditions afin d'observer les modifications apparaissant au niveau subcellulaire. Lors de la phase prélytique, il apparaît que le manteau de surface du parasite augmente en épaisseur de 3,5 à 4 fois pour atteindre 55 à 60 nm. Cette réaction de dépliement du manteau de surface se révèle être spécifique de l'action cytotoxique du sérum humain. Il s'agit en fait d'un dépliement moléculaire de la glycoprotéine de surface constituant le manteau plutôt que d'une adsorption d'autres protéines contenues dans le milieu d'incubation. Puis progressivement lors de la phase lytique, le réseau microtubulaire s'altère pour se désintégrer totalement en phase ultime; simultanément, on observe une perte totale du manteau de surface.

SEEMAN (1974)(165) a comparé ces lésions du trypanosome en cours de lyse à celles que l'on peut observer au niveau des membranes plasmiques d'érythrocytes soumises à l'action du système complémentaire. Aucune relation n'existe et ainsi se trouve confirmé le non-rôle du complément dans le mécanisme de lyse parasitaire par le sérum humain. Le réel mécanisme est membranaire affectant l'ion calcium  $Ca^{++}$ .

L'altération de la membrane plasmique se traduit, lors de la lyse parasitaire, par une perturbation au niveau des échanges ioniques  $Ca^{++} / K^{+}$ . Pour mesurer cette modification de perméabilité membranaire, l'ion  $K^{+}$  peut être remplacé par un analogue marqué représenté par l'ion  $86Rb$ . Il a ainsi été montré que lors de la phase prélytique, il y avait fuite de 82% de cet ion vers le milieu extracellulaire et qu'en fin de processus lytique, 95% de l'ion  $Rb$  avait traversé la membrane plasmique. L'addition de solutés non pénétrants tels le dextran [ SEARS et coll. (1964)(162), HENNEY (1974)(84), FERLUGA et ALLISON (1974)(55) ] ou surtout le sucrose [ JACOB et JANDL (1962)(95) ] dans le milieu extérieur empêche la lyse cellulaire par compensation de la pression osmotique intracellulaire et confirme l'hypothèse. Ainsi, l'addition de sucrose 0,25 M inhibe totalement le phénomène de lyse et cette inhibition par le sucrose peut être argumentée de deux façons : - soit le sucrose est un inhibiteur compétitif du facteur trypanocide

- soit le sucrose n'inhibe pas l'action du facteur trypanocide mais il agit au niveau de la membrane pour annuler les effets de ce dernier.

Les études menées par RIFKIN sont en faveur de la seconde hypothèse et il se dégage donc définitivement la notion importante d'une lyse parasitaire par perte de la régulation osmotique cellulaire.

### C - Purification et caractérisation du facteur trypanocide

Afin de caractériser le facteur trypanocide au sein des lipoprotéines, RIFKIN (1978a)(152) propose de séparer les différentes classes de lipoprotéines du sérum humain par une ultracentrifugation de flottaison selon le protocole décrit par LINDGREN (1975)(117), en utilisant des solutés de densité croissante.

Les principales caractéristiques des lipoprotéines seront brièvement rappelées pour une meilleure compréhension de l'étude du facteur trypanocide.

#### a - Caractéristiques générales des lipoprotéines

Les lipoprotéines représentent dans le plasma des édifices complexes hydrosolubles associant des lipides à des protéines spécifiques : les apolipoprotéines. La plupart des lipoprotéines circulantes ont une structure sphérique dans laquelle on distingue un centre plus ou moins volumineux formé de lipides apolaires (triglycérides et esters de cholestérol) et une zone périphérique constituée d'une couche moléculaire de phospholipides, de cholestérol et quelquefois de diglycérides. Les apolipoprotéines établissent dans cette région périphérique des interactions hydrophobes par leur face interne avec les lipides neutres et des liaisons ioniques avec les groupements polaires des phospholipides adjacents .

La répartition des lipoprotéines en quatre classes (tableau 2) en fonction de leur densité dépend du rapport entre les lipides neutres centraux et les composés superficiels.

- Les chylomicrons sont les plus grosses lipoprotéines (diamètre supérieur à 100 nm). Ils sont sécrétés par les entérocytes en période de digestion pour assurer l'absorption des triglycérides et du cholestérol.

Les chylomicrons naissants acquièrent rapidement dans la circulation lymphatique et plasmatique des apolipoprotéines C et E, synthétisées dans le foie. Ils sont ensuite très vite dégradés par les lipoprotéine-lipases, enzymes localisés à la surface des cellules endothéliales des capillaires irriguant les tissus musculaires et adipeux. Ces enzymes interagissent avec les apolipoprotéines C présentes à la surface des chylomicrons et hydrolysent les triglycérides en acides gras libres pénétrant dans les tissus sous-jacents. Le reste des triglycérides, non dégradés par ces lipases, constitue les chylomicrons "remnants", très appauvris en triglycérides mais riches en esters de cholestérol et ne possédant en surface que les apolipoprotéines B et E. Ils sont reconnus par des récepteurs hépatiques spécifiques des apolipoprotéines E et subissent l'endocytose [ Figure 2 ].

- les VLDL (very low density lipoprotein) de faible densité (inférieure à 1.006 g/ml) sont synthétisées dans le foie et transportent les triglycérides et le cholestérol du foie vers les différents tissus [ Figure 3 ].

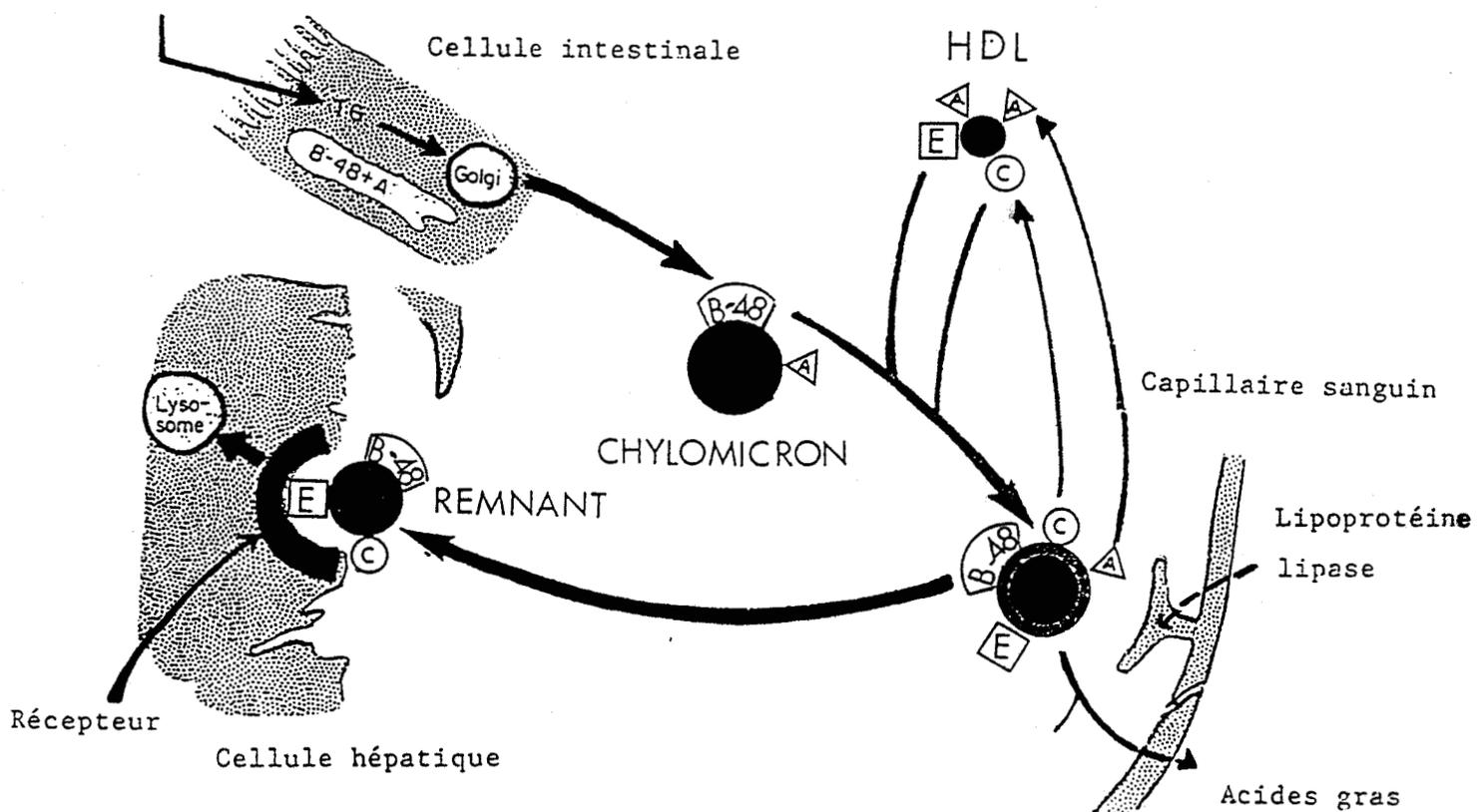
- les LDL (low density lipoprotein) de densité moyenne (comprise entre 1.019 et 1.063 g/ml) représentent le produit final du catabolisme des VLDL [ Figure 3 ] et sont les lipoprotéines essentielles dans le transport du cholestérol plasmatique. Ainsi, ces lipoprotéines sont presque exclusivement formées d'esters de cholestérol.

Principales propriétés physiques des lipoprotéines

	Densité hydratée (g/ml)	Masse molaire (moyenne)	% de protéines	% de lipides	Fraction lipidique dominante
Chylomicrons	< 0,99	$5 \cdot 10^9$	1	99	Triglycérides
VLDL	0,99-1,006	$7,5 \cdot 10^6$	10	90	Triglycérides
LDL	1,020-1,063	$2,5 \cdot 10^6$	25	75	Cholestérol
	1,063-1,085	-			
HDL	1,085-1,125	$3,9 \cdot 10^5$	50	50	Phospholipides
	1,125-1,21	$1,9 \cdot 10^5$			

Tableau 2

Acide gras + monoglycérides



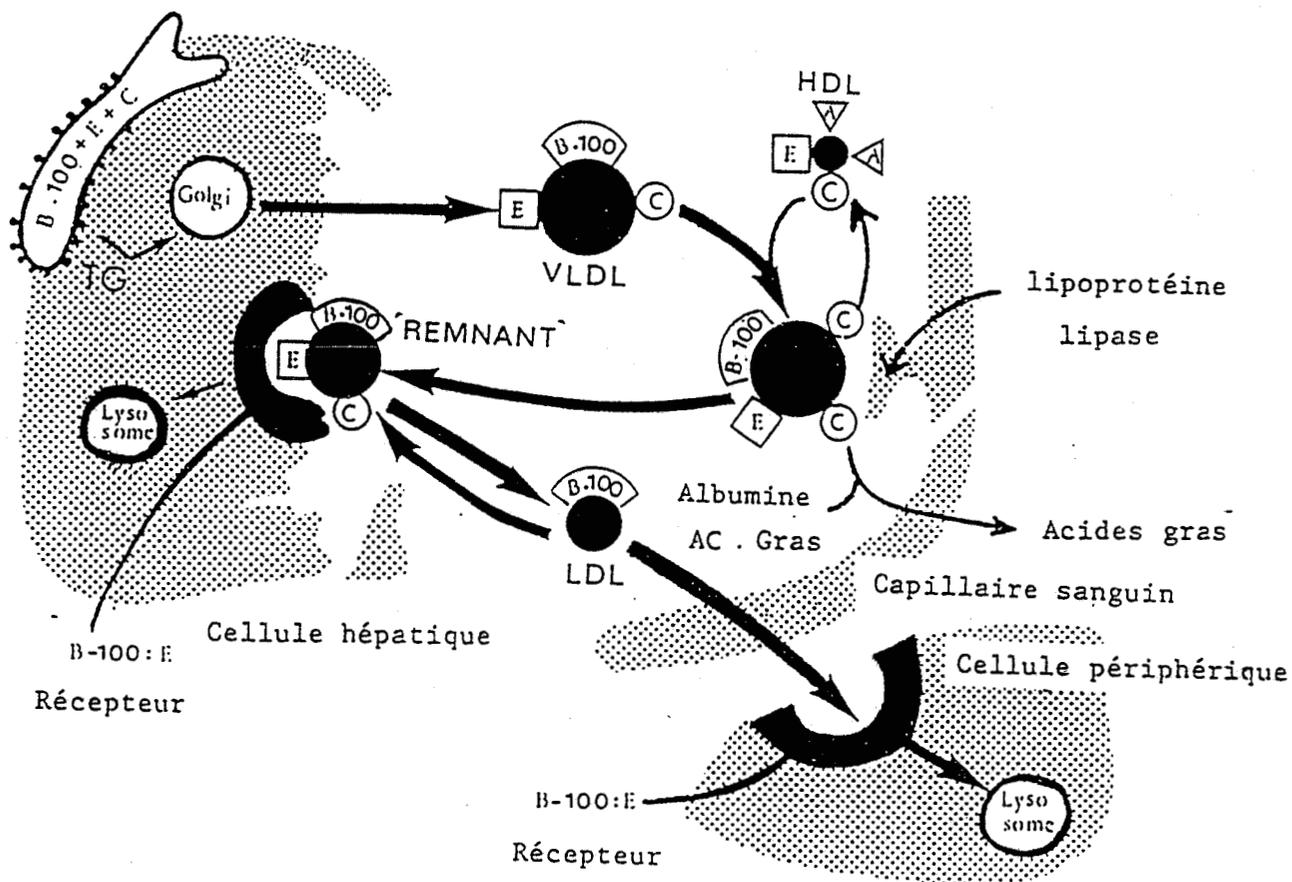
TG : triglycéride

HDL : lipoprotéine de forte densité

A, B-48, C, E = apolipoprotéines

Figure 2

Métabolisme des lipoprotéines



- TG : triglycéride
- VLDL : lipoprotéine de faible densité
- LDL : lipoprotéine de densité moyenne
- HDL : lipoprotéine de forte densité
- A, B-100, C, E : apolipoprotéines

Figure 3

- les HDL (high density lipoprotein) de forte densité (comprise entre 1.063 et 1.21 g/ml) sont synthétisées dans le foie et l'intestin. Elles assurent le transport du cholestérol des tissus périphériques vers le foie pour l'excrétion [Figure 3 ]. Le centre de ces lipoprotéines est très réduit puisqu'il représente moins d'un quart de l'édifice tandis que les composés superficiels sont prépondérants [ Figure 4 ].

Les apolipoprotéines, inégalement réparties dans les lipoprotéines, présentent des structures très différentes. Elles ont le rôle essentiel qui permet :

- \* de réguler le métabolisme lipoprotéique

- \* de participer au transport et à la redistribution des lipides parmi les différents tissus par reconnaissance spécifique des apolipoprotéines au niveau de récepteurs de surface cellulaire ( tel est le cas de l'apolipoprotéine E reconnue à la surface des chylomicrons par un récepteur hépatique).

- \* d'agir comme cofacteur pour les enzymes du métabolisme lipidique, notamment pour la lécithine : cholestérol acyltransférase (LCAT) responsable de la formation d'esters du cholestérol ; cette enzyme catalyse le transfert d'un acide gras de la position 2 de la lécithine à la position 3-hydroxylée du cholestérol . La réaction d'hydrolyse par la LCAT est activée par l'apolipoprotéine A I.

- \* Enfin, d'intervenir dans le maintien de la structure des lipoprotéines en stabilisant leur structure micellaire.

Représentation schématique de l'organisation moléculaire des H D L

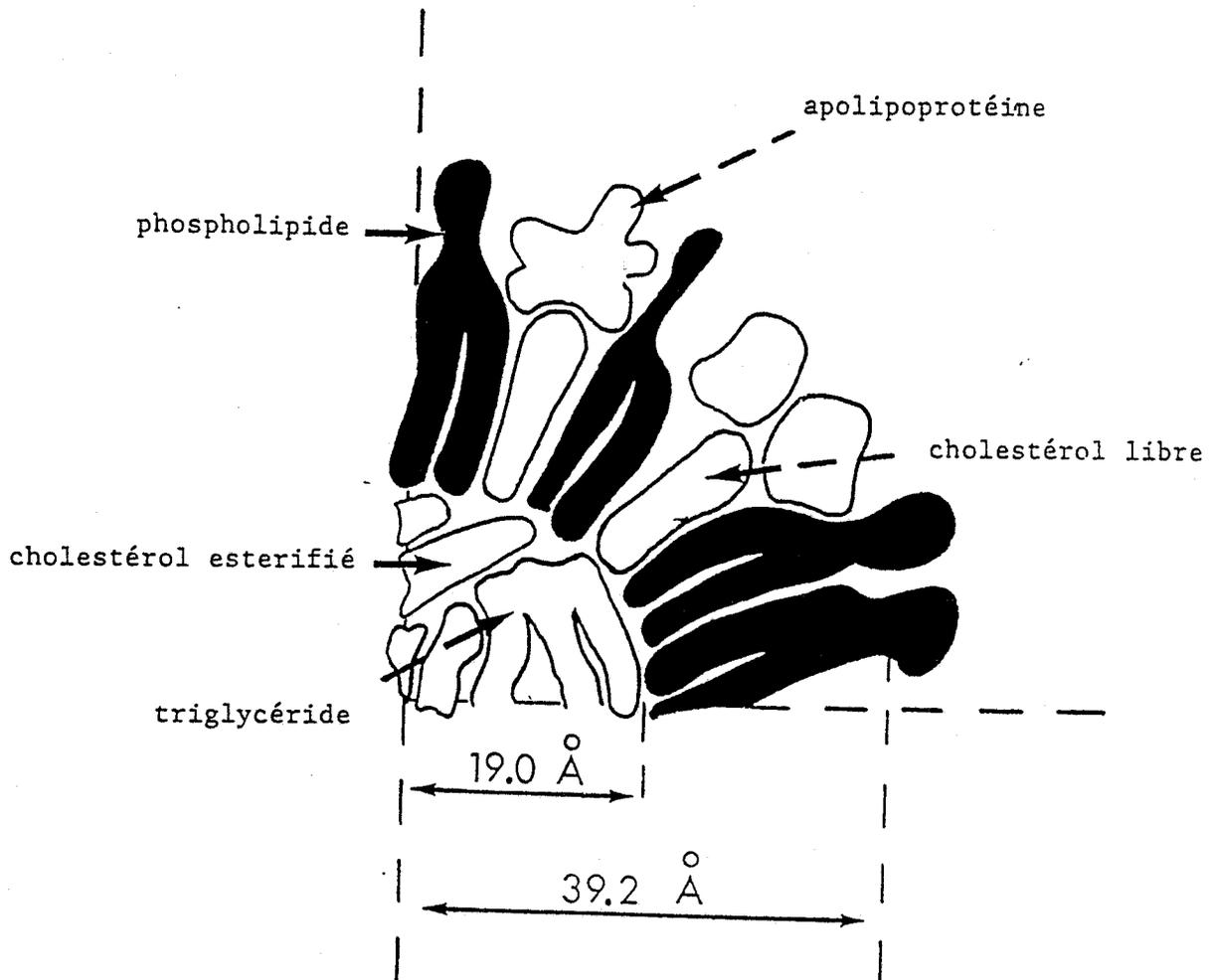


Figure 4

Les apolipoprotéines se distinguent entre elles par leur nombre d'acides-amino, leur point isoélectrique (plusieurs isoformes existent de surcroît pour chacune d'entre elles), leur taille moléculaire et leur concentration plasmatique. [ tableau 3] . La répartition quantitative des différentes apolipoprotéines dans les quatre classes de lipoprotéines est illustrée dans le tableau 4.

Certaines apolipoprotéines sont essentiellement représentatives d'une classe de lipoprotéine. Ainsi, l'apolipoprotéine

B 100 (96% des apolipoprotéines des L D L)

A I (92% des apolipoprotéines des H D L)

A IV et B 48 presque exclusivement trouvées dans les chylomicrons.

D'autres apolipoprotéines (C,E) sont caractéristiques de plusieurs classes de lipoprotéines (chylomicrons, VLDL, HDL) et des échanges se produisent au cours des étapes métaboliques.

#### b - caractérisation du facteur trypanocide au sein des différentes classes de lipoprotéines.

RIFKIN (1978)(153) a fractionné le sérum par ultracentrifugation de flottaison. Chaque fraction lipoprotéique purifiée est testée pour son activité trypanocide vis à vis de *T. brucei* : une suspension parasitaire ( $1-2 \cdot 10^7$  cellules par ml) est incubée à 37 °C pendant 2 heures en milieu minimum Eagle's, enrichie à 25% (v/v) en chacune des sous-fractions lipoprotéiques précédemment isolées. Le pourcentage de lyse cellulaire, donc l'activité trypanolytique, est déterminé en microscopie à contraste de phase par comptage du nombre de cellules lysées dans la population trypanosomale de départ.

Seule la fraction H D L , caractérisée par une densité comprise entre 1.067 et 1.216 g/ml, possède l'activité trypanocide.

Afin d'éliminer les protéines sériques encore contaminantes, la fraction H D L est purifiée par chromatographie de gel filtration sur Biogel A 5 m. Le test de lyse ne révèle plus alors que 10% seulement de l'activité initiale alors que le rendement en H D L est de 70%. Cette diminution d'activité biologique très significative est, pour l'auteur, le reflet d'une dénaturation des H D L lors de l'étape de purification . LEVY et FREDERICKSON (1965)(116) avaient déjà décrit une altération partielle des H D L par délipidation lors des premières étapes d'ultracentrifugation en présence de concentration élevée en sels.

Propriétés des apolipoprotéines majeures du plasma humain

Apolipoprotéine	Masse Moléculaire Apparente	Nombre d'amino acides	Concentration dans le plasma mg/l	Point isoléctrique del'isoforme majeure
A - I	27 000	243	1200	5.6
A-II	17 000	154	300	4.9
A-IV	46000	393	40	5.5
B-100	500 000	--	900	--
B-48	250 000	--	< 50	--
C-I	6 500	57	50	8.0
C-II	8 800	79	50	4.7
C-III	8 750	79	120	4.9
D	32 000	--	120	5.3
E	35 000	299	50	5.9
H	48 000	--	70	9.5

Tableau 3

Répartition des principales apolipoprotéines dans les lipoprotéines

VLDL	apo C	45%
	apo B	40%
	apo AI et A II	1%
LDL	apo B	90%
	apo CI, C II et A I	1%
HDL	apo A I	92%
	apo C I et C II	8%

Tableau 4

Pour établir encore la notion d'activité cytotoxique des HDL humaines, RIFKIN a réalisé les mêmes tests avec des sérums de sujets atteints de la maladie de Tangier, maladie caractérisée par un déficit en HDL (5% de HDL seulement). Avec ces sérums, l'auteur n'a noté aucune activité trypanocide vis à vis de T.b.brucei aussi bien in vivo que in vitro.

Enfin, RIFKIN étudiant des sérums humains à faible titre trypanocide suspecte l'existence d'un inhibiteur possible du facteur HDL et considère en toute hypothèse les lipoprotéines de basse densité (LDL) comme responsable de l'inhibition relative des propriétés des HDL. Il semblerait à le suivre, que le rapport HDL/LDL est davantage représentatif du facteur trypanocide d'un sérum humain que sa seule concentration en HDL.

Dans cette relation HDL - facteur trypanocide, l'intégrité de la lipoprotéine est sur le plan expérimental d'une grande exigence. On sait que l'assemblage interactif qui représente des HDL est déterminant. La variation d'un sérum à l'autre dans le comportement des HDL et leur structure peut rendre compte des différences existantes d'un sérum à l'autre, d'un sujet à l'autre dans l'intensité du pouvoir trypanocide.

En réalité, les "HDL" représentent une famille de molécules lipoprotéiques dont les individualités ne sont pas encore à ce jour parfaitement connues, dont certaines sont fugaces, dont certaines sont surtout plus fragiles que d'autres. Cette importance de la structuration des lipoprotéines dans la réponse est d'ailleurs confirmée s'il était besoin par l'inactivation du pouvoir trypanocide en fonction d'un chauffage à 65°C, en fonction de l'action d'agents dénaturants tels que le dithiothreitol ou l'urée ou même en fonction d'une attaque enzymatique par la trypsine. Ainsi l'exposition en surface de l'assemblage moléculaire des HDL dans un sérum est-elle déterminante pour le pouvoir trypanocide.

Le rôle privilégié de l'apolipoprotéine A<sub>I</sub> est démontré par le non pouvoir trypanocide de sérum de malade atteint de la maladie de Tangier, malades qui sont dépourvus d'apolipoprotéine A<sub>I</sub> et particulièrement d'HDL normales.

La nature du site interactif HDL-parasite n'est encore connue ni pour l'HDL ni pour le parasite. Différentes approches expérimentales ont étudié toutefois les interactions HDL-manteau de surface des trypanosomes.

#### D - Interaction HDL - manteau de surface parasitaire

Afin de mettre en évidence un éventuel rôle du manteau de surface en association avec le facteur trypanocide, RIFKIN (1983)(154) recherche l'existence de récepteurs à HDL en surface parasitaire. Par utilisation de HDL radiomarquées à l'iode 125, l'auteur peut montrer qu'une liaison HDL - parasite se produit immédiatement selon un système partiellement réversible à 4°C et totalement réversible à 37°C, non saturable, écartant

ainsi l'hypothèse de récepteurs spécifiques de surface.

In vitro, la notion de complexe intermoléculaire HDL - antigène variable a aussi été envisagée. Les HDL et l'antigène radiomarqué par la leucine tritiée ont été incubés séparément à 37°C pendant 1 heure dans un milieu minimum Eagle's puis chaque fraction a été chromatographiée sur séphacryl S 300. L'élution de l'antigène seul a révélé trois formes moléculaires : une forme tétramérique, une forme dimérique et une forme monomérique. Les HDL seules sont éluées dans les mêmes conditions expérimentales sous forme d'un seul pic très voisin de celui de la forme tétramérique mais légèrement décalé vers l'exclusion. Enfin le mélange HDL- antigène a été incubé et chromatographié. Bien que la formation d'un complexe stable n'ait pas pu être réellement démontrée, l'élution des HDL se trouvait plus étroitement associée à celle de la forme tétramérique.

De ces résultats concernant les interactions HDL-parasite et HDL-antigène variable, RIFKIN suggéra alors l'hypothèse d'une inhibition relative de l'interaction HDL-trypanosome par le manteau de surface. En effet, l'utilisation d'agents stabilisants soit la structuration moléculaire du manteau de surface comme le diméthylsubérimidate, soit la perméabilité membranaire comme les cytochalasines, les anesthésiques locaux (dibucaïne, tétracaïne, procaïne) induit une résistance particulièrement élevée des parasites vis à vis de la lyse provoquée par les HDL humaines. De plus, l'auteur remarqua que la fixation des HDL s'avère plus rapide si le parasite se trouve sous forme procyclique ou s'il a subi une trypsinisation en surface.

Il était donc possible de conclure que la glycoprotéine de surface joue un rôle de barrière empêchant l'interaction HDL-membrane plasmique et que chez un trypanosome résistant, le manteau de surface s'opposerait complètement à l'interaction HDL-membrane plasmique.

Cet effet pourrait être créé soit par une conformation différente de la glycoprotéine, soit par une densité plus conséquente de l'AVS en surface parasitaire.

L'interaction HDL-membrane plasmique pourrait se traduire, dans son rôle fonctionnel, par un échange de cholestérol et de phospholipides entre les deux intervenants, provoquant ainsi une modification de la perméabilité cellulaire et une lyse des trypanosomes par perturbations des échanges ioniques.

Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer les échanges entre lipoprotéine et cellule. Selon PHILIPS (1980)(145), l'échange se produirait lors de collisions transitoires entre les lipoprotéines et les membranes cellulaires. BRUCKDORFER (1967)(21), a proposé la théorie de la partition de phase par diffusion du

cholestérol et des phospholipides à partir d'un donneur (lipoprotéine) vers un accepteur (membrane plasmique), transfert rendu sélectif par des interactions spécifiques entre cellule et lipoprotéine.

En contradiction avec les conclusions de Rifkin, une publication récente de GILLETT et coll. (1987)(63) suggère pour les HDL une fixation sur T.b.brucei selon un système saturable impliquant les apolipoprotéines A. Pour ces auteurs, à des concentrations légèrement supérieures à celles trouvées dans le plasma, les HDL et les LDL se fixent sur le trypanosome mais seules les HDL ont une fixation saturable. De plus, après fractionnement des HDL, les auteurs ont observé un système saturable uniquement pour les HDL associées aux apolipoprotéines A, et ne concernant pas les HDL à apolipoprotéine E tout au moins dans les conditions expérimentales retenues (concentration supérieure à 5 mg/ml).

Ainsi des études complémentaires devraient déterminer la présence ou non d'un récepteur spécifique de l'apolipoprotéine A à la surface du parasite. La présence d'un tel récepteur a déjà été décrite à la surface des hépatocytes [RIFICI et coll. (1984)(156)] et des fibroblastes de la peau [ORAM et coll. (1983) (137)]. Serait alors mieux comprise l'interaction très affine entre HDL-apo A et membrane plasmique du trypanosome.

#### E - Rôle du calcium

Le rôle essentiel du calcium sous forme  $Ca^{++}$  a été envisagé par D'HONT et coll. (1979)(41). Les premières observations ont montré que lors de la dialyse du sérum humain normal, le pouvoir trypanocide sur le variant Antat 1.8 de T.b.brucei diminuait considérablement. Parallèlement, lorsque du  $Ca^{++}$  à des molarités allant de 7,6 M à 12,8 M était ajouté au sérum dialysé, l'activité du pouvoir trypanocide était retrouvée proportionnellement à la quantité de  $Ca^{++}$ . De plus, le  $Ca^{++}$  stimule le pouvoir trypanocide d'un sérum non dialysé. Cependant lorsque le sérum a été chauffé, le pouvoir trypanocide alors inactivé ne peut être restauré en présence de cet ion. Il semble donc que le  $Ca^{++}$  seul n'est pas suffisant mais agirait comme cofacteur dans la réaction trypanocide.

Le rôle de l' $\alpha 2$ -macroglobuline dans l'activité trypanocide a d'autre part été à nouveau évoqué, par ces mêmes auteurs qui ont pensé que cette globuline pouvait intervenir en association avec le cofacteur  $Ca^{++}$ . En effet, lorsque le sérum humain est épuisé par un antisérum anti  $\alpha 2$  - macroglobuline puis dialysé, le pouvoir trypanocide disparaît totalement et l'addition de  $Ca^{++}$  0,8 mM ne permet de restaurer que 70% de l'activité du sérum. Ces résultats montrent donc l'importance de l' $\alpha 2$ -macroglobuline intervenant comme transporteur de  $Ca^{++}$  dans l'activité trypanocide.

## F - Rôle des monosaccharides et du glycérol

Une diminution du pouvoir trypanocide a été observée si l'on enrichit l'environnement parasitaire de D-glucose, de D-mannose ou de D-fructose et cela de façon proportionnelle à la quantité de ces monosaccharides. Par contre, le glycérol augmente le pouvoir cytotoxique.

En conclusion générale, il semble donc que différents paramètres interviennent dans la réaction trypanocide, que le rôle de l'antigène de surface serait essentiellement d'interdire l'approche de la membrane pour l'HDL et que l'apolipoprotéine A I serait déterminante au niveau de la reconnaissance lipoprotéine - parasite.

## 2 - Rôle des immunoglobulines

Lors de l'évolution d'une trypanosomiase, différentes réponses immunologiques peuvent être observées et principalement la présence d'anticorps et d'immuns complexes représentatifs des mécanismes de défense du sujet. Ces éléments peuvent être mis à profit dans les tests à visée diagnostique. Les anticorps synthétisés le sont par reconnaissance du parasite et aussi de l'antigène variable, élément constitutif principal du manteau de surface du trypanosome libéré dans le sérum.

### A - Production d'immunoglobulines

Une des principales caractéristiques, sur le plan immunologique, de la trypanosomiase africaine semble être la production intense d'immunoglobulines non fonctionnelles, phénomène reflétant une activité polyclonale non spécifique des lymphocytes B. Il est important de souligner que les anticorps produits contre les antigènes trypanosomiaux ne représentent qu'une faible proportion des immunoglobulines totales synthétisées.

KAZYUMBA et coll. (1986)(103) ont étudié la réponse immunitaire chez des souris infestées par *T.b.brucei* et ont pu mesurer :

\* une augmentation rapide du nombre de cellules produisant des immunoglobulines du type IgM dans la rate de l'animal (taux d'IgM six fois plus élevé que chez un animal sain).

\* l'existence d'anticorps autologues vis à vis de DNA simple brin libéré chez l'hôte lors de la lyse parasitaire provoquée par la réponse immune.

\* une production d'autoanticorps, des anticorps étant dirigés contre des déterminants antigéniques présents à la surface des globules rouges et contre des antigènes présents à la surface des thymocytes; cette production d'autoanticorps semblait d'ailleurs être corrélée à un phénomène d'activation progressive de cellules polyclonales de type B.

Au total , le parasite provoque par sa multiplication :

- une synthèse peu efficace d'anticorps fonctionnels
- une synthèse d'anticorps inutilisables
- et enfin, une production d'anticorps dirigés contre des structures telles que globules rouges ou thymocytes qui laissent supposer une communauté antigénique possible entre la surface parasitaire et les composants plasmiques de ces cellules.

#### B - Formation de complexes immuns

Le suivi, à l'aide d'anticorps spécifiques, au cours de la trypanosomiase par LAMBERT et coll. (1977)(108) a permis la mise en évidence de la présence d'antigènes parasitaires solubles dès le quatrième jour de la parasitémie, avec un pic de concentration maximale entre le huitième et le douzième jour de l'infection. Ensuite ces antigènes disparaissent complètement ou sont en quantité circulante telle que non détectable.

Parallèlement, des complexes immuns sont décelés dans le sang circulant chez la souris dès le dixième jour de l'infestation. L'apparition de tels complexes semble être immédiatement postérieure au premier pic de parasitémie et coïnciderait avec une chute du taux plasmatique de complément de classe C 3 avec une persistance importante pendant plusieurs semaines.

Le plus souvent, des dépôts importants d'immunocomplexes ont été identifiés au niveau des glomérules rénaux.

En conclusion, la présence de parasites chez un hôte se traduit par 2 types de réactions :

- l'activation d'un facteur trypanocide permettant l'élimination totale du parasite chez les hôtes trypano-résistants
- la production d'anticorps et d'immunocomplexes représentant les premiers signes de défense de l'hôte infesté.

#### IV - Aspects biochimiques des antigènes variables

##### 1) le manteau de surface

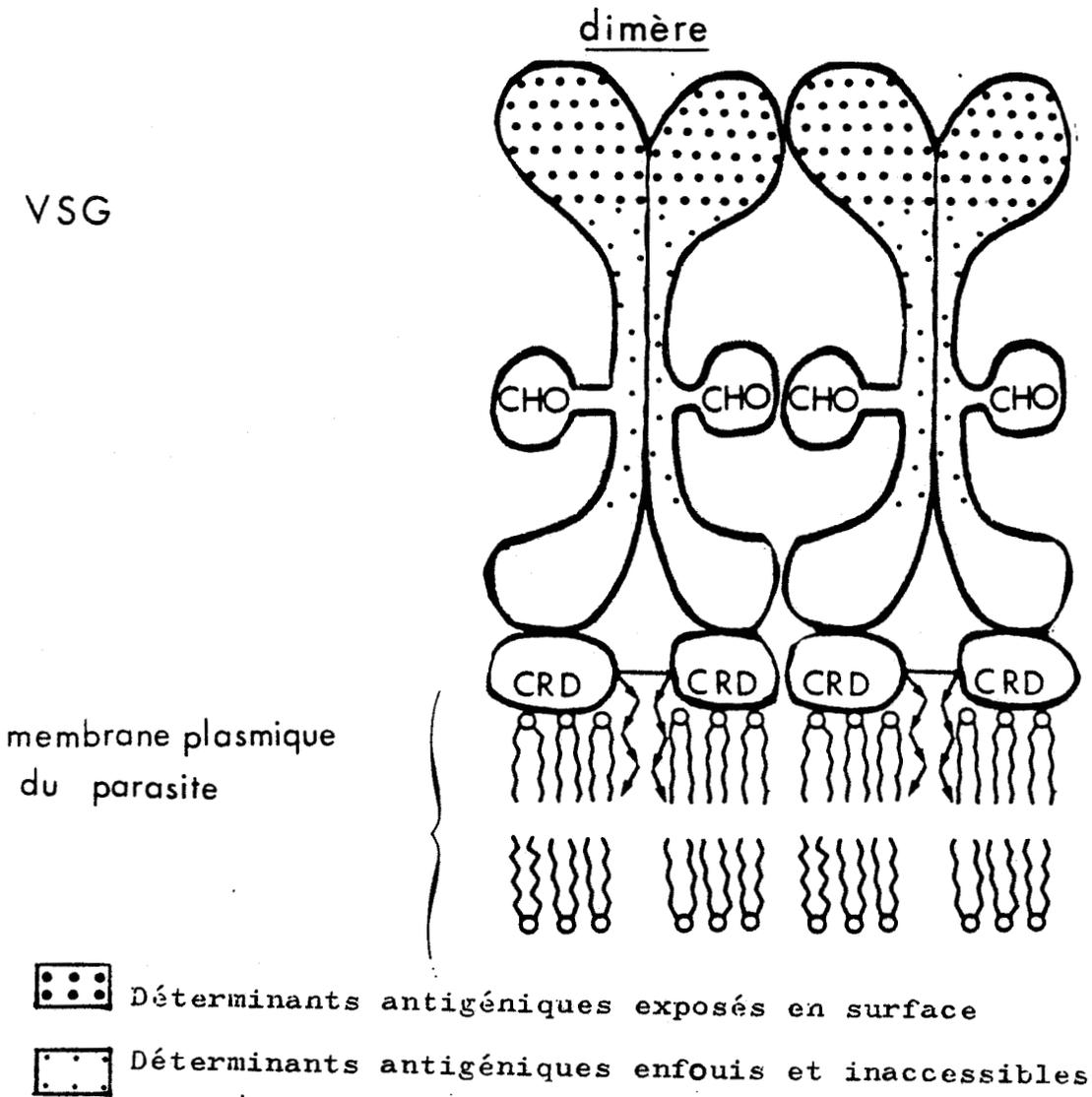
- Le manteau de surface est constitué par un assemblage d'environ  $10^7$  molécules de glycoprotéines toutes identiques et étroitement associées, formant une monocouche d'environ 12 à 15 nm d'épaisseur. [VICKERMAN (1984)(177), CROSS (1975)(34)] [figure 5] . Il pourrait avoir comme fonction essentielle d'assurer la relation hôte-parasite immédiate, à savoir la micro-physiologie de surface du parasite vis à vis de son environnement immédiat mais en réalité, il représente aussi une barrière protectrice vis à vis des immunoglobulines et d'autres systèmes de défense de l'hôte infesté. Au plan immunologique, ces glycoprotéines sont le support de l'antigénicité spécifique de variant. BARBET et coll. (1978)(11) , ont montré l'exposition "en surface" du manteau de ces épitopes spécifiques. Sur le plan biologique, la perte du manteau de surface, selon DIFFLEY (1985)(43), s'accompagne de la perte de l'infestivité de la souche étudiée, ce qui permet donc encore de souligner l'importance de cette structure dans l'adaptation du parasite chez l'hôte définitif.

VOORHEIS et coll. (1982)(178) assimilent le manteau de surface à une protéine membranaire. Ainsi, l'addition de calcium  $Ca^{++}$  et d'ionophore A-23187, agent classique de déstabilisation des membranes, à une préparation parasitaire libère 80% de la glycoprotéine de surface sans provoquer de rupture cellulaire.

Dans ce mécanisme de libération , le calcium apparait essentiel, l'addition d'EGTA 1mM, chélateur spécifique provoque une diminution d'environ 50% du rendement.

STRUCTURATION DU MANTEAU DE SURFACE DE *Trypanosoma b. brucei*.

( MODELISATION SELON TURNER, M.J. (1985)  
British Medical Bulletin, 41, 137-145.)



**Figure 5**

Ces auteurs ont aussi souligné la possibilité par choc osmotique de libérer le manteau. Cette libération est alors tout à fait complète atteignant 92% avec toutefois dans cette technique de lyse osmotique un inconvénient majeur celui de provoquer une activation d'enzymes intracellulaires et en particulier des protéases qui dégradent très vite les glycoprotéines constitutives du manteau.

Le protocole de libération par ionophore pourrait être d'ailleurs considéré comme un mécanisme proche d'un processus naturel de libération spontanée d'antigène par le parasite, antigène retrouvé libre dans le sérum de l'hôte infesté.

Expérimentalement ont été mis au point des conditions multiples de libération des antigènes variables, allant d'un simple lavage à des techniques physiques de déstabilisation des membranes sans omettre les traitements par dénaturation thermique avec ou sans addition de détergent. On reviendra sur ce sujet et on verra que ces différents procédés livrent des antigènes variables légèrement différents quant à leur comportement, la différence s'exprimant non au niveau de l'axe peptidique mais plus particulièrement dans la définition de la zone d'ancrage membranaire de l'AVS, différents enzymes venant après activation cliver l'ancrage et libérer la glycoprotéine.

C'est de ces observations que se sont trouvées déduites les notions de formes dites "solubles" ou de formes dites "membranaires" d'antigène variable sur lesquelles nous reviendrons tant au plan analytique que structural.

## 2) Isolement et purification de la glycoprotéine de surface

### A - Obtention des parasites

L'isolement des trypanosomes à partir du milieu sanguin peut s'effectuer essentiellement selon deux protocoles faisant appel à la chromatographie d'échange ionique ou à la centrifugation préparative en gradient de densité.

#### a) Chromatographie d'échange ionique

Les trypanosomes sont séparés des éléments figurés du sang par le protocole préconisé par LANHAM et GODFREY (1970)(109). La différence de charge en surface membranaire des parasites et des cellules sanguines permet en effet leur séparation sur échangeur d'ions dans une zone de pH comprise entre les valeurs de 6 et 9. Ce gradient est réalisé à température ambiante par passage du sang de rat infesté par T.b.brucei sur colonne échangeuse d'anions type DEAE-cellulose, équilibrée en tampon phosphate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.2M,  $\text{Na H}_2\text{PO}_4$  0.2M, NaCl 0.85% (w/v), glucose 2.5% (w/v)) de pH 8,0.

Dans ces conditions, les éléments figurés du sang sont retenus sur la colonne alors que les trypanosomes toujours vivants sont élués directement.

Une centrifugation de l'éluat rassemblé, à basse vitesse, 1630 g, pendant 20 minutes, livre les parasites sous forme d'un culot de centrifugation. Plusieurs cycles de lavage par le tampon phosphate de pH 8,0 assurent une préparation parasitaire satisfaisante respectant l'intégrité cellulaire et peu contaminée par les protéines sériques de rat.

L'échange ionique, au-delà du préparatif global, peut aussi être utilisé dans le but d'un sous-fractionnement des parasites.

Ainsi, EVANGELISTA et coll. (1986)(47) ont défini l'existence de sous-populations au sein d'une même lignée de T.cruzi. Les parasites déjà séparés des éléments sanguins sont repris en tampon PSG de pH 7,45 et de force ionique 0.145 et déposés sur une colonne de DEAE-cellulose. L'éluion s'effectue en tampon PSG de pH 7,45 et de force ionique croissante : 0.145, 0.181, 0.217, 0.253 et 0.289. Ainsi sont séparées et caractérisées des subfractions cellulaires parasitaires au sein d'une même souche trypanosomale.

#### b) Centrifugation

##### $\alpha$ - Centrifugation classique

Certains auteurs [ CROSS (1975)(34)] réalisent, préalablement à l'étape chromatographique sur DEAE-cellulose, une centrifugation à faible vitesse (1200g, 10 minutes) de la suspension parasitaire.

Cette étape permet une séparation encore imparfaite hématies-parasites puisque les trypanosomes forment dans ces conditions une couche cellulaire au-dessus des globules

rouges. L'avantage de cette étape préalable est toutefois non négligeable : elle rend en effet l'étape de chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose décrite plus haut, plus rapide et en améliore le rendement.

Elle s'avère indispensable si l'on fait appel à la centrifugation en gradient de densité.

### β - Centrifugation en gradient de densité

La seule alternative à l'échangeur d'ions pour la séparation des éléments figurés du sang et des parasites est la sédimentation sur un gradient de densité. Le milieu utilisé doit respecter l'intégrité cellulaire et être choisi en fonction de la densité des particules à séparer ainsi que de leur pH optimal. Plusieurs milieux peuvent être utilisés, les plus fréquemment rencontrés sont le percoll et le ficoll.

MORTATTI et coll. (1985)(134) ont utilisé la technique de centrifugation en gradient de densité en utilisant une solution de Ficoll. La suspension parasitaire est déposée sur ce gradient et centrifugée à 300 g pendant 15 minutes. Les cellules sanguines sédimentent alors que les parasites forment une bande bien individualisée à l'interface.

De même, GRAB et coll. (1984)(65) ont isolé les trypanosomes du sang de rat infesté par le variant MiTat 1.52 par centrifugation sur un gradient de percoll, suspension colloïdale de particules de silice recouvertes de polyvinylpyrrolidone.

### c) Centrifugation et échangeur d'ions

Récemment, EKEJINDU et coll. (1986)(48) dont le but était de préparer des trypanosomes à partir de tissus parasités (moelle épinière, cerveau, rate), ont aussi fait appel à une séparation sur gradient de densité en Ficoll tout en gardant l'échange ionique. Un échantillon sanguin ou la suspension de tissu sont déposés sur Ficoll et après centrifugation à 800 g, pendant 30 minutes, une séparation en quatre phases est obtenue. Dans le cas d'un sang parasité, la phase inférieure contient les globules rouges, les neutrophiles et les monocytes puis une couche de Ficoll dépourvue d'éléments cellulaires et enfin une interphase contenant les trypanosomes et les lymphocytes. La phase toute supérieure représente le tampon de dilution. Dans un deuxième temps, l'interphase trypanosomes-lymphocytes est récupérée, lavée trois fois par le tampon et déposée sur une colonne de DEAE-cellulose. Ainsi à partir de rat infesté par T.gambiense ou T.brucei, ce protocole permet de récupérer 80% des parasites dénombrés dans le sang et 65% des trypanosomes présents dans la rate de l'animal.

Cette double séparation présente divers avantages: un gain de temps, une moindre quantité de DE-52 utilisée; et aussi la préparation de trypanosomes du tissu cérébral, de la moelle épinière ou de la rate, situation où la chromatographie d'échange ionique seule n'est pas résolutive.

## B - Libération du manteau de surface

A partir de parasites obtenus par l'une ou l'autre méthode décrites, différents modes de libération du manteau de surface ont été proposés. Parmi ceux-ci, il faut distinguer les techniques permettant d'obtenir l'antigène variable de façon "spontanée" c'est à dire sous une forme dite "soluble", de celles qui libèrent une forme plus complète possédant encore l'extrémité responsable de l'ancrage membranaire de l'antigène variable et appelée pour cette raison "forme membranaire".

### a) Libération de la forme soluble

La libération de la forme soluble (sVSG) de l'antigène variable peut s'effectuer selon deux modalités : l'une fait appel à la rupture cellulaire tandis que la seconde tente de respecter l'intégrité du parasite.

#### α) Techniques faisant appel à la rupture cellulaire

Différents modes de rupture cellulaire ont été utilisés :

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

Le premier protocole de libération du manteau de surface de T.brucei a été décrit CROSS en 1975 (34). Les antigènes variables étaient préalablement marqués et cela avec une grande spécificité par un réactif N-acétylant, le formylméthionine <sup>35</sup>S sulfone méthyl phosphate (FMSP). Le marquage cellulaire est effectué à 30°C et à pH 9,3. Le

FMSP forme des liaisons covalentes avec les groupements aminés externes des protéines de surface sans provoquer de déstabilisation importante du manteau de surface. Ceci peut être vérifié par contrôle du maintien du pouvoir infestant des trypanosomes traités. La "libération" des AVS est alors obtenue par rupture des trypanosomes : les parasites en suspension dans un tampon Tris 50 mM, Kcl 50 mM, acétate de magnésium 5 mM de pH 7.6 étant lysés par une homogénéisation rapide en présence de billes de verre.

L'homogénat est ensuite soumis à une centrifugation à 15 000 g pendant 15 minutes. 70 à 80% du marqueur se retrouve alors dans le surnageant. Le culot obtenu est remis en suspension et recyclé. Après une nouvelle centrifugation, les surnageants réunis sont traités à 165 000 g pendant 2 heures, afin de sédimenter les particules ribosomales et les débris membranaires. Le surnageant résultant de cette dernière opération contient les protéines solubles de surface du trypanosome.

Ce même auteur (1984)(37) a également proposé un protocole de libération par lyse osmotique des parasites à 0°C soit en tampon phosphate de pH 8,0 soit en eau distillée enrichie en acétate de zinc.

ROVIS et coll. (1978)(159) utilisent une suspension de trypanosomes marqués soit par iodination, processus catalysé par la lactoperoxydase  $^{125}$  I selon HOWARD et coll. (1982)(92) et MARCHALONIS et coll. (1971)(125), soit par oxydation avec la galactose oxydase suivie d'une réduction par  $\text{NaBH}_4$ . Dans les deux cas, les enzymes sont incapables de pénétrer la double couche lipidique, et permettent de détecter spécifiquement des sites externes différents : acides aminés pour la première et sucres pour la seconde au niveau des protéines et/ou glycoprotéines constitutives du manteau de surface. Ainsi traitées, les cellules sont soumises à une série de congélation-décongélation puis centrifugées à 230.000 g pendant 1 heure. L'addition de N  $\alpha$ -p-tosyl-L-lysylchlorométhyl cétone (TLCK) à la concentration de 1 mM évite une dégradation protéolytique du matériel libéré. 60 à 80 % de la radioactivité sont récupérés dans le surnageant. Le culot 230 000 g est dans un deuxième temps traité par 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. Ce traitement du culot permet de récupérer le matériel radioactif resté en situation membranaire après choc thermique et de le comparer aux composants spontanément libérés.

ONODERA et coll. (1981)(136) sur l'espèce T. congolense partent d'une préparation initialement congelée de parasites. Après décongélation, les trypanosomes sont mis en suspension dans un tampon NaCl 0.05M, Kcl 0.05 M; acétate de magnésium 0.05M de pH 7.6 enrichi en antiprotéase (TLCK 0.001 M). Une "filtration" sur microseringue est réalisée et répétée (5 à 10 passages) jusqu'à ce que les parasites soient réduits à une suspension de petites vésicules dans un gel cellulaire. La qualité de la rupture cellulaire est vérifiée au microscope. Une centrifugation à 250 000 g pendant 1 heure à 4°C permet

alors d'obtenir dans le surnageant le "lysate" de trypanosomes qui contient les éléments constitutifs du manteau.

Autre type de rupture cellulaire utilisé pour T.b.brucei : la sonication [ STRICKLER et coll. (1978)(168) ] . Les trypanosomes en suspension dans un tampon Tris- HCl 50 mM, acétate de magnésium 5 mM, KCl 50 mM, de pH 7.6 , subissent une rupture par sonication. L'homogénat est ensuite soumis à une centrifugation à 12 100 g pendant 5 minutes; le surnageant est conservé et le culot après lavage dans le même tampon est centrifugé à 165 000 g pendant 1 heure 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.

Enfin , un dernier protocole mis au point par REINWALD et coll. (1981)(149) sur la souche T. congolense permet une libération du manteau par lyse partielle des parasites à l'aide d' un solvant hydrophobe, le dioxane à 5% (v/v). Les trypanosomes sont mis en suspension à température ambiante dans un tampon phosphate de sodium 0.06M, NaCl 0.044 M de pH 8,0 enrichi en antiprotéases [ fluorure de phénylméthylsulfonyl 100 mM (PMSF) et TLCK 2mM dans le dioxane].

En 30 à 90 minutes, les parasites ont perdu leur mobilité. Une centrifugation à 15 000 g du lysate cellulaire permet d'obtenir dans le surnageant le manteau de surface.

Au total , la forme soluble de l'antigène variable peut être obtenue après rupture cellulaire selon différents protocoles. La dégradation protéolytique inévitable est dans la mesure du possible minimisée par l'utilisation d'un "cocktail" antiprotéasique. Il est important de noter que le protocole doit être choisi en fonction de la souche étudiée afin d'obtenir des rendements optimisés et que la lyse osmotique et la congélation-décongélation demeurent actuellement les solutions les plus utilisées.

### β) Techniques sans rupture cellulaire

Plusieurs protocoles, qui veulent respecter au maximum l'intégrité du parasite, ont été décrits. Nous ne retiendrons ici que deux d'entre eux :

- l'action limitée en surface cellulaire de protéases
- l'utilisation d'un "tampon acide" isoosmotique.

CROSS (1975)(34) a étudié la libération du manteau de surface en traitant les trypanosomes de la souche T.b.brucei par des protéases. Après incubation des parasites à 37°C pendant 15 minutes dans un milieu de culture (Hx 25) enrichi en pronase

ou en trypsine à la concentration finale de 40 µg/ml, l'auteur a observé une conservation de la morphologie des parasites. avec "perte du manteau" Les cellules sont toutefois fragilisées et ne peuvent supporter plusieurs cycles de centrifugation sans être altérées.

Ce procédé décrit il y a plus de 10 ans a marqué une étape dans la recherche sur l'antigène de surface des trypanosomes. Très vite, son utilisation s'est trouvée limitée par la démonstration du fait que l'antigène variable, objet de l'étude, est amputé par l'attaque enzymatique.

BALTZ et coll. (1976)(9) ont adopté, sur le modèle T. equiperdum un protocole de libération du manteau de surface par mise en suspension de préparations de trypanosomes vivants dans un tampon phosphate 0,125 M de pH 5,5 contenant 1% de glucose. Les parasites sont laissés une nuit à +4°C sur agitateur de KLINE, cette étape élimine débris cellulaires et cellules intactes et correspond à la libération de l'antigène. Après une centrifugation à 3000 g pendant 15 minutes, le surnageant pH 5.5 est alors dialysé contre une solution de NaCl 0,5 M afin d'éliminer le glucose, puis ultracentrifugé à 50 000 g pendant 1 heure à +4°C. Le surnageant à ce stade contient l'extrait antigénique brut qui renferme, outre l'antigène variable, un certain nombre d'antigènes solubles communs aux différents variants. Ce protocole très efficace par le rendement de libération n'est pas encore élucidé quant à son mécanisme intime d'intervention au niveau de la membrane. Il offre l'avantage aussi d'éviter une rupture cellulaire en minimisant, autant qu'il est possible, l'intervention de protéases issues de cellules détruites.

Nous avons fait nôtre ce protocole pour la préparation en "quantité" de l'antigène variable de T.b.brucei. Selon les souches, les conditions opératoires ont été optimisées, le rendement de libération du protocole standard étant parfois différent d'un variant à l'autre au plan qualitatif et quantitatif.

#### b - Libération de la forme "membranaire"

Plusieurs protocoles d'isolement de la forme membranaire ont été publiés pour différents variants antigéniques de T.b.brucei. Ils peuvent être classés en 2 groupes principaux selon leur mode d'action :

- traitement des cellules par des détergents non ioniques ou ioniques (Triton x-100, déoxycholate de sodium, n-octylglucopyrannoside...)
- traitement des parasites par des acides (acide trichloracétique, acide trifluoroacétique).

### α) Traitement par les détergents

L'utilisation de détergents permet la solubilisation des protéines membranaires .

Le premier protocole permettant d'isoler cette forme complexe a été proposé par CARDOSO DE ALMEIDA et coll. (1983)(24) . A partir des variants MiTat 1.5 et Itat 1.25, la forme membranaire a été isolée par ébullition d'une suspension de trypanosomes en tampon phosphate salin (PBS) contenant du SDS à la concentration de 2%. Après refroidissement un détergent non ionique le Triton x-100 est ajouté au lysat à la même concentration (2%) . La forme obtenue, analysée en électrophorèse-SDS, a une masse moléculaire apparente inférieure d'environ 800 à 2000 daltons à celle observée pour la forme soluble de l'antigène obtenue de façon classique selon le protocole de purification de CROSS (1975)(34).

Cette forme obtenue par ébullition des parasites en présence de SDS, est biochimiquement et immunologiquement différente de la forme soluble et correspond à la définition de ce que l'ensemble des auteurs dénomme forme membranaire (mf AVS).

De plus, les auteurs (1984)(25) ont montré que, dans la libération de la glycoprotéine de surface, un processus enzymatique était impliqué : en effet, la forme membranaire, par incubation à 23°C avec un lysat parasitaire 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. Les auteurs ont étudié, pour un lysat préparé dans le détergent n-octylglucoside et incubé à 4°C ou à 37°C, la cinétique d'apparition de la forme membranaire. Au temps 0 de l'expérience, tous les AVS sont sous forme membranaire et au bout de 60 minutes, la majorité des AVS est sous forme soluble, avec un processus plus rapide lors de l'incubation à 37°C. Cette expérience confirme l'hypothèse de l'existence d'un enzyme responsable de cette conversion.

VOORHEIS et coll. (1982)(178) avaient montré que la libération du manteau de surface était inhibée en présence de zinc. A partir de ces observations, CARDOSO DE ALMEIDA et coll. ont confirmé l'absence de conversion de la forme membranaire dans un lysat parasitaire enrichi en zinc (10mM). Cependant, le zinc utilisé à forte concentration n'est pas 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 fournit les mêmes résultats, suggérant donc l'existence d'un substrat enzymatique possédant une structure commune à toutes les formes membranaires connues jusqu'à présent.

D'autres détergents ont été utilisés dans les protocoles d'isolement de la forme membranaire. Ainsi FERGUSON et coll. (1984)(50) ont solubilisé les trypanosomes dans le déoxycholate de sodium (DOC) à ébullition. Les cellules lavées en tampon HEPES salin de pH 7,4 sont rapidement transférées dans une solution de déoxycholate de sodium à 1% (w/v) enrichie en antiprotéases (TLCK 0,1 mM). La suspension est portée à ébullition pendant 5 minutes puis refroidie à 0°C, transférée dans un tampon NaCl 0,125 M et centrifugée à 100 000 g pendant 40 minutes. Le surnageant résultant contient les protéines membranaires totales de la surface parasitaire.

La solubilisation du manteau de surface en présence d'autres détergents a été étudié par GRAB et coll. (1984)(65) pour le variant MiTat 1.52. Seuls les détergents zwittergent TM 3-08 et TM 3-16 sont capables de libérer la forme membranaire de l'antigène.

GURNETT et coll. (1986)(73) 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'un inhibiteur d'activité lipasique : l'acide p-mercuriphenylsulfonique (pCMPSA) (v/v) 10 mM à 4°C pendant 30 minutes. L'étape lytique consiste en 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 50mM de pH 7.5 enrichi en antiprotéases (TLCK 1mM, PMSF, 0,1mM) contenant 1% de n-octylglucopyranoside (n O G). Après une nouvelle centrifugation, le surnageant contient à 95% la forme membranaire.

Quelques modifications ont été apportées par KRAKOW et coll. (1986)(105) pour l'étude du variant Itat 1.3 de T.brucei. Les trypanosomes sont lysés à 0°C en tampon Bicine-HCl 5 mM de pH 8,0 enrichi en pCMPSA 5mM et PMSF 1mM. Le lysat est alors centrifugé 5 minutes à 630 g et le surnageant résultant est soumis à une ultracentrifugation à 220 000 g pendant 20 minutes à 4°C. Le culot final est agité en présence de n-octylglucoside à 1% de PMSF 1mM et pCMPSA 5 mM. La suspension ainsi obtenue est à nouveau centrifugée à 220 000 g et le surnageant résultant contient à 90% la forme membranaire de l'AVS.

Finalement, de ces travaux représentant des protocoles qui relèvent de la même idéologie de départ, il ressort la notion de difficulté de mise en oeuvre d'un protocole fiable permettant d'obtenir la forme membranaire avec un rendement également constant. Il semble que qualitativement et quantitativement, il y ait des différences selon les souches, selon les variants. On peut noter aussi que dans les propositions successives, les auteurs recherchent des procédés visant à dénaturer le moins possible les molécules antigéniques.

### β ) Traitement par des acides

Outre la possibilité de déstabiliser la membrane plasmique, certains auteurs proposent des méthodes beaucoup plus sévères par traitement des parasites en

milieu acide afin de précipiter en une seule étape les protéines de surface. Ce processus présente aussi en théorie l'avantage d'éviter des phénomènes de dégradation enzymatique de l'antigène.

JACKSON et coll.(1985)(96) ont proposé une méthode rapide et quantitativement performante, permettant d'obtenir la forme liée à la membrane parasitaire. Une suspension de formes sanguicoles de *T.brucei* est soumise à une précipitation par l'acide trichloracétique à 10% (w/v) à 0°C. Après centrifugation 1 nuit à 5°C, le culot remis en suspension dans l'eau subit une extraction par le mélange organique chloroforme-méthanol (2;1, v/v) à raison de 20 volumes. Une séparation en phases est possible par addition de 0,2 volume d'une solution de NaCl à 0,9%. Après centrifugation à 12 000 g pendant 1 heure, la phase aqueuse contient 90% de la forme liée à la membrane, de masse moléculaire de 58 000 daltons.

Les auteurs pensent que le traitement préalable des cellules par l'acide trichloracétique 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.

Un autre protocole d'isolement de la forme membranaire du variant ViTat 1-1 a été décrit par CLARKE et coll.(1985)(30). Après obtention des trypanosomes par DEAE cellulose, les parasites sont marqués en surface par iodination et solubilisés dans une solution d'acide trifluoroacétique (TFA) à 0.1%. Les auteurs considèrent que la solubilisation de l'antigène dans le TFA à 0,1% est plus efficace que dans les détergents neutres ou zwitterioniques utilisés classiquement pour déstabiliser des membranes lipidiques et solubiliser des constituants membranaires. De plus, le traitement par le TFA permet d'éviter le phénomène d'hydrolyse spontanée de l'AVS. Enfin, la conversion d'une forme membranaire en forme soluble, souvent observée lors de la lyse des parasites vivants en présence de détergents non ioniques, n'intervient pas lors de ce traitement acide.

Ce dernier protocole a été amélioré récemment par HAMBREY et coll.(1986)(79) qui soumet les parasites de la souche *T.brucei* à un traitement par un mélange acétonitrile à 20%-acide trifluoroacétique à 0.1%. L'addition d'acétonitrile ayant l'avantage d'augmenter la possibilité de solubilisation de l'antigène de surface et aussi de permettre l'injection sur colonne HPLC de l'extrait membranaire sans traitement préalable de l'échantillon.

## C - Purification de l'antigène variable

Après l'étape de libération de la glycoprotéine, une étape de purification permet d'éliminer les antigènes communs présents dans la préparation afin d'obtenir des antigènes variables ayant un degré de pureté satisfaisant pour une approche biochimique et structurale.

### a - Purification de la forme soluble

Différentes techniques de purification ont été décrites faisant appel à la chromatographie classique (échange ionique, affinité) ou à la chromatographie liquide haute performance.

#### α) Chromatographie échangeuse d'ions. Isoélectrofocalisation

Selon la technique de CROSS (1975)(34), l'extrait antigénique brut préalablement marqué au soufre 35 et obtenu par homogénéisation des trypanosomes en présence de billes de verre 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 et lors de l'élution avec le tampon d'équilibre apparaît un pic étroit de matériel représentant environ 50% de la radioactivité initiale. La fraction retenue éluee par une solution de NaCl 0,3 M n'est pas radioactive et apparaît donc dépourvue d'AVS.

Le pic radioactif d'AVS non retenu sur l'échangeur est soumis à un fractionnement par isoélectrofocalisation dans une zone comprise entre les valeurs de pH 3 à 10. Une fraction majeure de point isoélectrique voisin de 6.9 et deux pics mineurs de points isoélectriques respectifs 5.9 et 6.2 sont individualisés pour l'AVS 427 de T.brucei.

Pour l'auteur, la fraction majeure (pHi 6.9) correspond à l'antigène variable dont la pureté peut être contrôlée en électrophorèse de tamisage moléculaire en présence de SDS.

#### β) Chromatographie d'affinité sur lectines

BALTZ et coll.(1976)(9) préconisent, pour l'isolement des AVS de T.equiperdum un protocole utilisant la chromatographie d'affinité sur colonne de concanavine A-Sépharose directement applicable sur l'extrait brut (surnageant de libération pH 5.5).

L'extrait antigénique, à la concentration de 5mg par ml, est déposé sur gel de conca-valine A-sépharose. Les fractions non retenues, à savoir les antigènes communs, sont recueillis dans l'éluat d'équilibre jusqu'à ce que l'absorbance, mesurée à la longueur d'onde de 280nm, soit devenue nulle. Dans un second temps, la colonne est traitée par une solution de NaCl 0,5 M contenant 10%(p/v) d' $\alpha$ -méthyl-D-mannoside. L'éluat correspond à l'AVS, fraction glycoprotéique spécifique, électrophorétiquement homogène en électrophorèse - SDS.

REINWALD et coll. (1981)(149) ont étudié la purification des AVS de T.congolense selon la même technique chromatographique d'affinité. Les auteurs ont constaté que l'élution par  $\alpha$ -méthyl-D-mannoside n'est pas totale et ont pensé que l'interaction AVS-colonne ne se réalise pas seulement en fonction des glycanes mais également au niveau d'adsorptions non spécifiques faisant intervenir l'axe peptidique de la glycoprotéine. Néanmoins l'élution de la colonne par de l'éthylèneglycol à 50% ou par du borate 0,1 M de pH 8,0 n'a modifié en rien le rendement chromatographique. L'augmentation des concentrations en  $\alpha$ -méthyl-D-mannoside n'a pas non plus permis d'améliorer un rendement préparatif faible.

Les auteurs ont finalement utilisé une désorption électrophorétique de ces protéines, procédé difficile de réalisation sur de grandes quantités de matériel.

### $\chi$ ) Chromatographie d'affinité sur anticorps

DIFFLEY et coll.(1982)( 42) proposent une méthode de purification de l'extrait antigénique brut par colonne d'affinité anticorps selon la technique décrite par AFCHAIN et coll. (1976)( 2) . Des immunoglobulines monospécifiques de lapin, préparées selon la méthode de STRICKLER et coll. (1978)(168) , sont couplées à une sépharose - 4 B activée au bromure de cyanogène.

L'extrait antigénique brut est déposé sur cette colonne ; les protéines non fixées sont éliminées par un tampon phosphate de sodium à 0,85% et l'antigène variable est élué par le même tampon enrichi en chlorure de guanidine 5 M.

Ce type de chromatographie est comparable à la chromatographie d'affinité sur lectines et permet d'obtenir 40% d'AVS dans un extrait brut total avec une pureté de 100%.

### δ) Chromatographie liquide haute performance

Une purification de l'antigène variable sous sa forme soluble par chromatographie liquide haute performance a été proposée par CLARKE et coll. (1984)(29). Afin de palier à la dégradation protéolytique de l'antigène, problème souvent rencontré dans les autres systèmes de purification, les auteurs préconisent une technique de chromatographie HPLC en phase inverse en une seule étape, ce qui permet une grande rapidité de préparation de l'AVS.

Après lyse osmotique à 0°C des parasites, le lysat parasitaire est repris par une solution d'acide trifluoroacétique (TFA) à 0,1% afin d'obtenir une concentration protéique de 1 à 5 mg par ml. Une agitation rapide et une centrifugation à 12 500 g pendant 5 minutes permet d'éliminer le matériel insoluble. Le surnageant contenant les protéines solubles dans le TFA est injecté sur une colonne RPSC ultrapore C-3. L'élution en gradient linéaire d'isopropanol de 0 à 60% est réalisée en une heure et permet d'obtenir une fraction contenant l'antigène variable.

### b) Purification de la forme membranaire

Plusieurs protocoles d'isolement de la forme membranaire ne nécessitent pas d'étapes ultérieures de purification puisque l'antigène membranaire est directement obtenu avec un rendement de pureté de 90 à 95%. Tel est le cas pour les protocoles d'ébullition des parasites en présence de SDS [ CARDOSO DE ALMEIDA et coll. (1983)(24)], de lyse hypotonique suivie d'extraction par le n-octylglucopyranoside [ GURNETT et coll. (1986)(73) et KRAKOW et coll. (1986)(105) ] ; de précipitation à l'acide trichloracétique [ JACKSON et coll. (1985)(96) ].

Pour les autres protocoles précédemment décrits, une étape de purification est nécessaire pour obtenir l'antigène membranaire. Celle-ci peut s'effectuer par chromatographie d'affinité, sur lectines, par centrifugation en gradient de densité, ou par chromatographie liquide haute performance.

### α) Chromatographie d'affinité sur lectines

La préparation membranaire obtenue par FERGUSON et coll. (1984) après ébullition des parasites en présence de déoxycholate de sodium est purifiée par chromatographie d'affinité sur colonne de concanavaline A-sépharose traitée préalablement par une solution de bicarbonate d'ammonium 20 mM-Nonidet NP-40 (v/v).

Les fractions retenues sur la colonne sont éluées par le tampon d'équilibre enrichi en urée 8 M. L'AVS sous forme membranaire est précipité par de l'éthanol.

### β) Chromatographie liquide haute performance

La purification du matériel libéré par le traitement acide avec le TFA à 0,1% [CLARKE et coll. (1985)(30)] s'effectue par chromatographie HPLC en phase inverse sur une colonne RP-SC ultrapore, de type C3 (3 chainons hydrocarbonés fixés sur la silice). Le pic majeur élué par le propanol en 60 minutes correspond à l'antigène variable.

FOX et coll. (1986)(57) ont également modifié le protocole de CLARKE. La première étape de lyse parasitaire du variant MiTat 1-4 est identique. Après extraction trifluoroacétique, la solution est filtrée sur un filtre de 0,45 µm et injectée sur une colonne préparative C 18 en phase inverse préalablement équilibrée en acide trifluoroacétique à 0,1%. L'élution s'effectue en isopropanol selon différentes étapes : 0 à 30%, 15 minutes ; 40%, 15 minutes ; 40%, 80 minutes. La forme membranaire est alors caractérisée par un temps de rétention de 54 minutes.

Enfin, l'extrait antigénique brut, obtenu après traitement des parasites par le mélange acétonitrile à 20% - Acide trifluoroacétique à 0,1%, est déposé pour purification sur une colonne TSK phényl pw en phase inverse. L'élution est réalisée par un gradient de 20 à 50% en acétonitrile. Le pic majeur exclu correspond à la forme "membranaire" de l'antigène dont la taille moléculaire en électrophorèse en présence de SDS est estimée à 66 000 daltons. Ces résultats s'opposent apparemment à ceux de FERGUSON et coll. (1984)(50) quant à la taille moléculaire apparente de l'antigène membranaire qu'ils situent à 58 000.

Qu'il s'agisse de la forme "soluble" ou "membranaire" de l'antigène variable, ce dernier a fait l'objet de nombreuses études analytiques et structurales afin d'en déterminer :

- la structure primaire
- la conformité moléculaire
- le mode de glycosylation de l'axe peptidique
- les modifications post-traductionnelles
- et enfin, la caractérisation précise d'un glycolipide C-terminal complexe responsable de l'ancrage membranaire de l'AVS.

### 3) Structure de la glycoprotéine de surface

#### A - Caractéristiques biochimiques

Les AVS de T.b. brucei isolés dès 1975 par CROSS (34) se caractérisent tous par une taille moléculaire d'environ 65 000 en gel de polyacrylyamide en présence de SDS. De grandes différences existent quant à leur point isoélectrique (variation de 5.8 à 8.3) à leur composition amino-acide, à leur séquence amino- acide N-terminale [ BRIDGEN et coll. (1976)(20) ] et à leur richesse relative en sucres (variation de 7 à 17% p/p). Toutefois, la définition qualitative de la copule glucidique est représentée par des résidus de mannose, de galactose et de N-acétylglucosamine [ JOHNSON et coll. (1977)(100) ]

#### B - Structure des AVS

##### a - Structure primaire

Deux approches différentes ont permis de définir la structure peptidique des antigènes de T.b. brucei : d'une part par étude de séquence nucléotidique du DNA complémentaire de l'ARN messager spécifique des antigènes et d'autre part, par étude de l'axe peptidique de l'antigène variable purifié.

##### \* Région C-terminale

Les résultats obtenus ont permis d'établir les points suivants :

$\alpha$ ) existence d'une extension C- terminale hydrophobe absente des glycoprotéines de surface isolées et purifiées

Les premiers travaux de biologie moléculaire ont été publiés par le groupe de BOOTHROYD et coll. (1980)(15) sur l'AVS 117 dont la séquence amino-acide avait été déterminée en particulier dans la région C-terminale. par approche peptidique.

Les auteurs ont identifié la séquence des 445 nucléotides de l'extrémité 3' de l'insertion plasmidique et par comparaison avec la séquence peptidique, ils ont montré que la glycoprotéine isolée était exempte de la séquence hydrophobe correspondant aux 23 codons précédant le codon stop du DNA. L'étude d'un autre AVS(221) par BOOTHROYD et coll. (1981) (16) confirma cette observation, les 2 extensions se terminant par les 3 mêmes

résidus LEU-LEU-PHE.

La présence de cette extension hydrophobe a pu être généralisée à d'autres variants [ MAJUMDER et coll. (1981)(122), MATTHYSSENS et coll. (1981)(124), RICE-FICHT et coll. (1981)(147) ], les 3 derniers résidus étant soit LEU-LEU-PHE soit LEU-LEU-LEU. Deux longueurs différentes : 17 résidus ou 23 résidus ont été caractérisées. Cette différence de longueur de l'extension est corrélée avec la nature de la séquence C-terminale de l'antigène variable et en particulier l'identité de l'acide aminé C-terminal.

### β) Nature de l'extrémité C-terminale des glycoprotéines isolées

Parallèlement à l'étude précédente, BOOTHROYD et coll. (1980)(15) ont mis en évidence l'existence d'une glycosylation au niveau de l'acide aspartique C-terminal. La même étude menée en parallèle sur d'autres AVS [ HOLDER et coll. (1981) (88), BOOTHROYD et coll. (1981)(16) MAJUMDER et coll. (1981)(124), MATHYSSENS et coll. (1981)(126) et RICE-FICHT et coll. (1981)(150) ] a permis ensuite de découvrir d'autres acides aminés C-terminaux : la sérine principalement, mais aussi pour un seul AVS (AVS 118), un résidu d'asparagine. Les AVS ont donc pu selon ce critère d'identité être classés en trois catégories selon la nature de l'acide aminé C-terminal (figure 6) et , en fonction de ce que nous avons vu au paragraphe précédent, et selon l'extension peptidique initiale avant processing C-terminal.

### χ) - Existence d'homologie au niveau de la région C-terminale

L'existence d'une grande similarité au niveau de la région C-terminale a d'abord été suspectée par MAJUMDER et coll. (1981)(124) puis par MATTHYSSENS et coll. (1981)(126) pour les AVS AnTat 1.1 et AnTat 1.8 (figure 7). Pour ces 2 variants, les 115 résidus amino-acides C-terminaux présentent une homologie globale de 50%, y compris dans l'extension hydrophobe au niveau de laquelle seuls 7 résidus diffèrent. De plus, les résidus de cystéine se retrouvent à des positions invariantes à l'exception des résidus 77 et 83 où le nombre d'acides aminés entre ces 2 cystéines peut être légèrement différent. Cette conservation tout à fait remarquable du positionnement des cystéines laissait donc prévoir une exigence conformationnelle stricte de la partie C-terminale de la molécule et cela à travers l'existence de ponts disulfure.

RICE-FICHT et coll. (1981)(150) ont pu confirmer ces premiers travaux et définir deux groupes d'AVS en fonction de leur séquence C-terminale :

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

AVS										
AVS 117	Trp	Glu	Asn	Asn	Ala	Cys	Lys	Asp	*	
AVS 121	Trp	Glu	Gly	Glu	Thr	Cys	Lys	Asp	*	
IITat 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	
IITat 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	*	

FIGURE 6



\* un premier groupe formé par les AVS ITat 1.2, ITat 1.3 et l'AVS 117 pour lequel une grande conservation des résidus se retrouve au niveau des 105 amino-acides C-terminaux. Sur la figure 8 sont indiqués par une flèche les 8 résidus de cystéine en position conservée . On peut également souligner dans cette région de l'AVS, l'existence d'une alternance de zones hydrophiles ( vvvvvvvvvv ) et de zones très hydrophobes( — )

\* un second groupe représenté par les AVS ITat 1.1 et ITat 1.4. Dans ces AVS, l'homologie C-terminale est beaucoup plus discutée. Des régions hydrophobes franches sont cependant encore visibles sur les 225 nucléotides C-terminaux. Seul les 4 résidus de cystéine sont absolument conservés entre les 2 AVS . [ figure 9 ].

En conclusion, il se dégage de ces travaux nombreux au plan structural l'existence d'une certaine conservation au niveau de la région C-terminale, conservation plus ou moins affichée mais stricte semble-t-il pour les résidus de cystéine dont on connaît à travers les ponts disulfure le rôle essentiel dans la structuration moléculaire.

#### \* Région N-terminale

L'homologie au niveau de la région N-terminale et l'existence d'une séquence "signal" ont été recherchées. Sans que les choses soient aussi nettes que pour la région C-terminale, un certain degré d'homologie a été mis en évidence entre des AVS issus de différentes espèces trypanosomales [ OLAFSON et coll. (1984)(135) , figure 10 ]

En fait la synthèse des AVS [ Mc CONNEL et coll. (1981)(120) et BOOTHROYD et coll.(1981)(16) (1982)( 17) est assimilable à celle de bon nombre de protéines membranaires , synthèse qui passe par un précurseur muni d'une extension N-terminale et qui dans le cas de T.b.brucei est longue de 25 résidus amino-acides.

#### \* - Axe peptidique général des antigènes variables

De nombreuses séquences nucléotidiques ont été décrites pour différents variants : AVS117 [BOOTHROYD et coll. (1982)(17), ALLEN et coll. (1982)(3)] AnTat 1.1 et 1.8 [ MATTHYSSENS et coll. (1981)( 126) , MICHIELS et coll. (1983)( 129) , PAYS et coll. (1983)(141) ], AnTat 1.10 [PAYS et coll. (1983) ( 142) ] ITat 1.1 [ RICE-FICHT et coll. (1981)(150) , (1982)(151) ] , ITat 1.2, 1.3 [ RICE-FICHT et coll. (1981)(150)].

La structure primaire de l'AVS 117 a été déterminée complètement par séquence amino-acide [ALLEN et coll. (1982)(3) ] . Les caractéristiques générales de cette molécule [ALLEN et GURNETT (1983)(4) ] peuvent être résumées en quelques points :

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

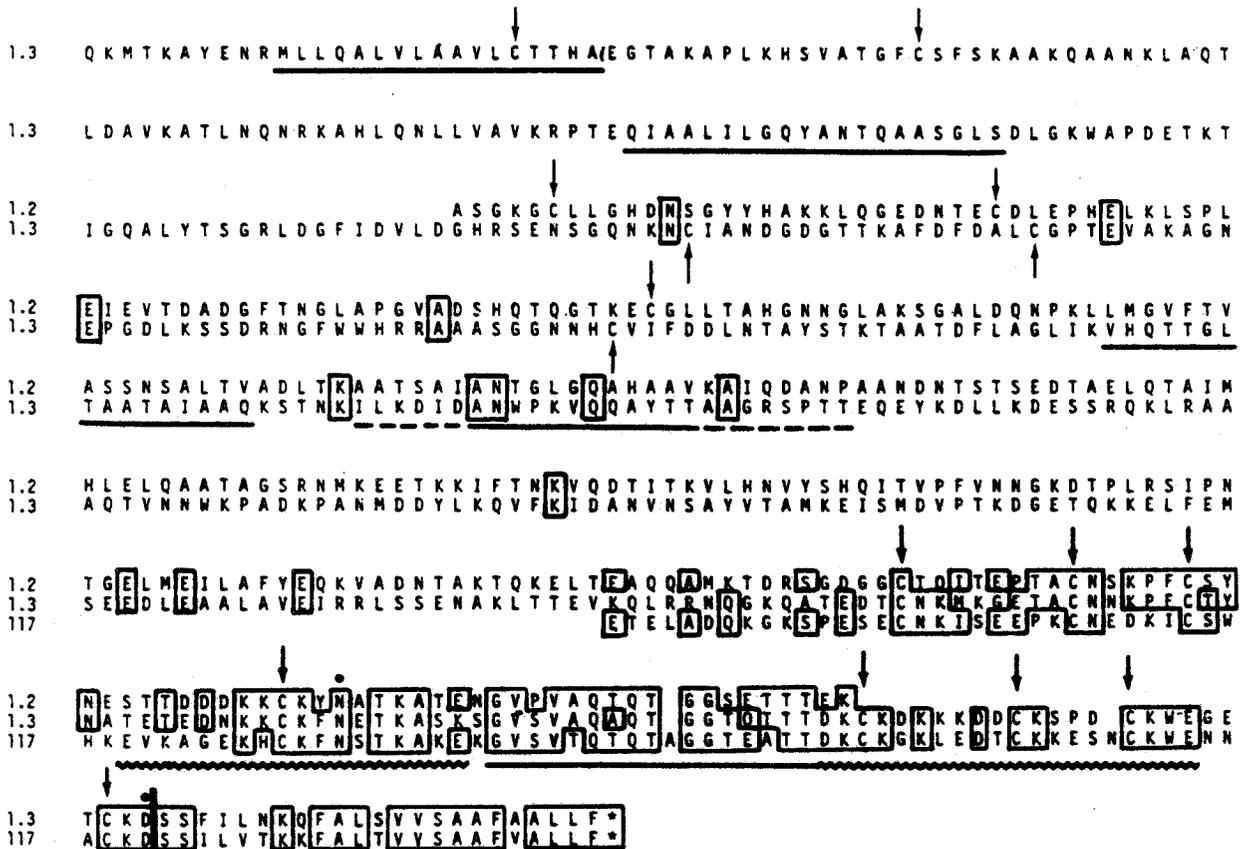


FIGURE 8

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

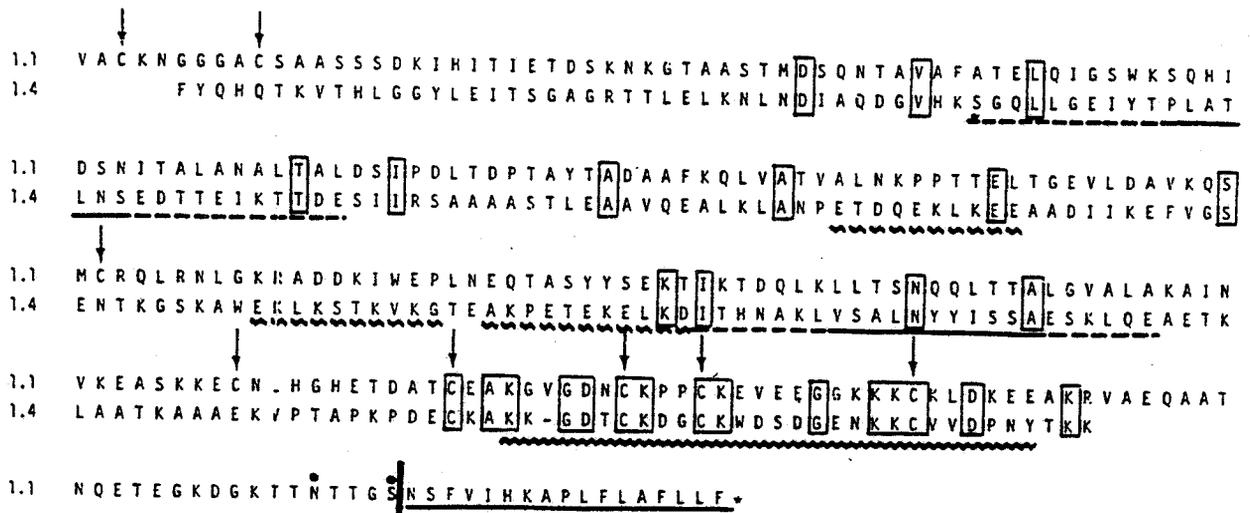


FIGURE 9

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

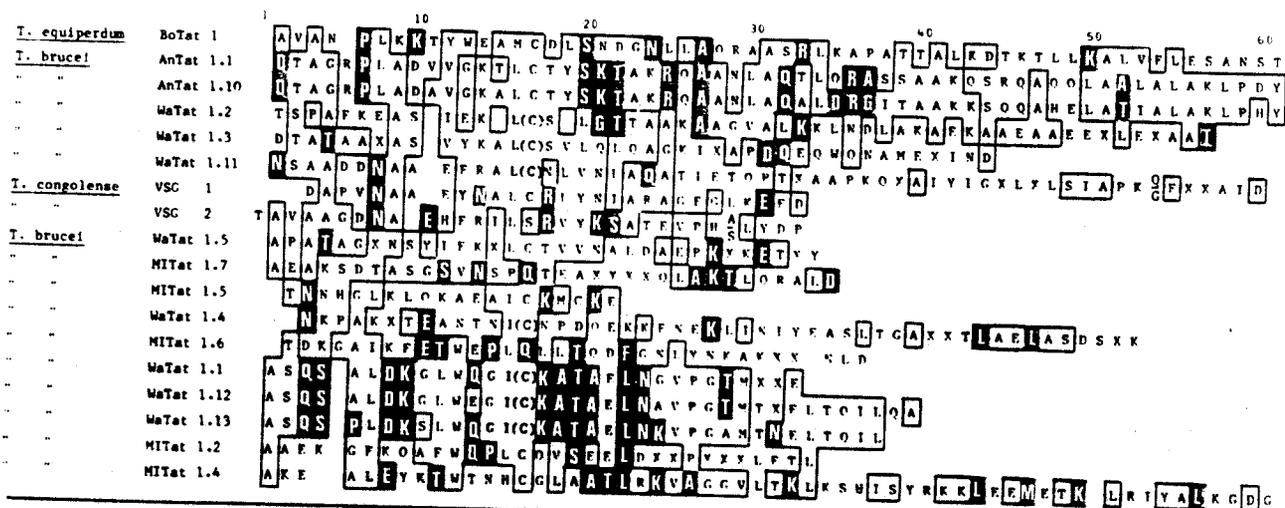


FIGURE 10

- La présence d'un segment N-terminal contenant de 8 à 10 résidus basiques et aucun résidu dicarboxylique.

- 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, associés entre eux dans la formation de deux groupes de ponts disulfure respectivement situés de part et d'autre d'une chaîne glycanique ( figure 11 ). Parmi ces résidus de cystéine, les 5 derniers sont toujours suivis par un résidu de lysine.

- L'existence de deux ponts disulfure dans la partie N-terminale et d'un unique groupement thiol libre au centre de la molécule en position 244.

- L'absence de segment hydrophobe C-terminal susceptible de pouvoir jouer un rôle d'insertion dans la double couche lipidique membranaire.

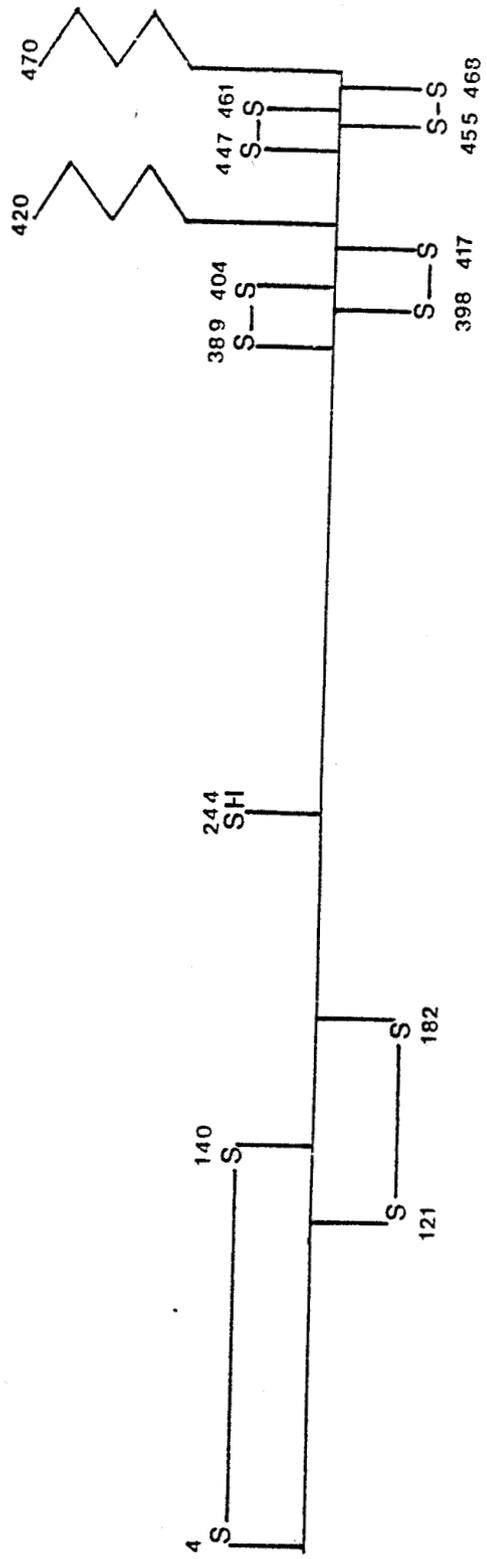
#### b ) Structure secondaire

##### α) Etudes prédictives

LALOR et coll. (1984)(107) ont utilisé les résultats de séquence de différents AVS et ont comparé les prédictions de structure secondaire obtenues selon les méthodes de GARNIER et coll. (1978)(61) et ROBSON et coll. (1974)(158) .

Pour tous les variants étudiés (ITat 1.1, 1.2, 1.3, 1.4 , AnTat 1.1, 1.8 et TxTat 5.28), existe une probabilité élevée pour une structure en hélice  $\alpha$  , au niveau de la région N-terminale de l'AVS. D'autre part, pour la région C-terminale, il peut être avancé que les variants possédant une grande homologie de séquence répondent à un même type de structuration secondaire qui apparait ainsi conservatrice dans sa définition générale.

Par contre, dans la région centrale des AVS, la répartition de structure hélicoïdale s'avère très différente selon l'AVS considéré et cette observation laisse entendre une "variabilité conformationnelle" à l'origine d'une structuration tertiaire différente.



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



FIGURE 11

D'autres études prédictives réalisées par COHEN et coll. (1984)(33) sur les variants 117, AnTat 1.1, ITat 1.1 et ITat 1.4 ont révélé la notion de séquences répétitives au sein de la région amino-terminale, séquences appelées par les auteurs "heptades" [ figure 12 ]. Ces zones sont constituées de 7 acides aminés ayant la caractéristique pour le 1<sup>er</sup> et le 4<sup>e</sup> résidu d'être apolaires, ce qui permet, selon PARRY et coll. (1979)(139), (1982)(140) de favoriser l'entrecroisement d'hélices  $\alpha$ . Cette configuration mène à une hélice superenroulée comme l'a décrite CRICK.

### $\beta$ ) Etudes expérimentales

FREYMANN et coll. (1984)(59) ont cristallisé, pour le variant MiTat 1.2, un fragment correspondant au dimère de la région amino-terminale de l'AVS. L'analyse cristallographique à une résolution de 6 Å a révélé que ce fragment se présente sous une conformation en faisceau d'hélices  $\alpha$ ; chaque monomère contenant 2 hélices  $\alpha$  réunies entre elles et d'une longueur de 80 Å. Cette structure sur environ 120 résidus amino-acides soit le 1/4 de l'AVS n'est interrompue que par une seule crevasse, dans le variant étudié.

Ce même AVS a également été observé en microscopie électronique par COHEN et coll. (1984)(33). Les résultats obtenus sont en accord avec l'étude cristallographique. La molécule apparaît caractérisée surtout par un important domaine allongé de 100 Å x 70 Å prolongé par une "queue fibreuse".

Pour le variant DiTat 1.3, la même étude révèle une morphologie sensiblement différente; en effet, la molécule est formée par une région globulaire ( $\approx$  60 Å de diamètre), attachée à un domaine de 100 Å de longueur et 30 Å d'épaisseur, elle-même reliée à une région globulaire plus petite ( $\approx$  40 Å de diamètre).

Récemment, METCALF et coll. (1987)(128) ont réussi à cristalliser un autre AVS (ITat 1.24), le cristal était d'une structure semblable à celle décrite pour MiTat 1.2.

Une telle communauté observée entre 2 AVS ayant des résidus C-terminaux différents (acide aspartique pour ITat 1.24 et sérine pour MiTat 1.2) permet selon les auteurs de prévoir une structure tertiaire très semblable pour tous les AVS.

### C) Glycosylation des antigènes variables de surface

Les compositions glucidiques réalisées sur divers AVS de T.b.brucei ont montré de grandes variations d'un point de vue quantitatif (7 à 17%, p/p), avec au contraire une constance remarquable dans la définition qualitative des glycanes. Sont en effet toujours

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

Résidu	a	b	c	d	e	f	g
<b>AVS 117 (MITat 1.4)</b>							
7 heptades	Leu	Cys	Gly	Leu	Ala	Ala	Thr
	Val	Arg	Lys	Val	Ala	Gly	Gly
	His	Leu	Thr	Lys	Leu	Lys	Ser
	Leu	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)
2 1/2 heptades	Ala	Glu	Ile	Leu	Ala	Thr	Thr
	Ala	Ala	Leu	Met	Arg	Gln	Lys
	Ala	Leu	Thr	(Pro	Glu	Glu	Ala Asn)
3 1/2 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)
<b>AnTat 1.1</b>							
6 heptades	Ala	Cys	Thr	Tyr	Ser	Lys	Thr
	Leu	Lys	Arg	Gln	Ala	Ala	Asn
	Ala	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
	Leu	(Pro	Asp)				
2 heptades	Tyr	Lys	Glu	Ala	Ala	Ala	Thr
	Leu	Leu	Ile	Tyr	Ala	Thr	His(Lys)
5 heptades	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)

FIGURE 12

retrouvés des résidus de mannose, de galactose et de N-acétylglucosamine [ JOHNSON et CROSS (1977)(100) ].

HOLDER et CROSS (1981)(88) , après isolement de glycopeptides tryptiques de plusieurs variants ont précisé des types très différents de glycosylation :

\* les glycopeptides "internes" pourvus d'une chaîne oligosaccharide branchée par l'intermédiaire d'un résidu d'asparagine, à l'axe peptidique, ces glycanes sont essentiellement constitués de mannose et de N-acétylglucosamine. Pour certains variants, du galactose peut être identifié. Leur position le long de l'axe peptidique se définit dans le dernier tiers C-terminal de la molécule. Toutefois, le glycopeptide préterminal peut changer dans son site d'expression.

\* un glycopeptide "C-terminal" qui d'ailleurs serait à l'origine de réactions immunologiques croisées entre les différents AVS (CRD).

Cet oligosaccharide original dans sa structure est branché sur l'acide aminé C-terminal de l'AVS. Si ce dernier est une sérine, on observe une double glycosylation, un second site oligosaccharidique subterminal étant situé au niveau d'un résidu d'asparagine distant de seulement 3 résidus acides aminés par rapport à l'acide aminé marquant l'extrémité de l'axe peptidique. Si l'acide aspartique représente le résidu C-terminal, le glycopeptide pré C-terminal semble plus internalisé au regard du nombre de résidus séparant l'asparagine de liaison de l'extrémité de l'axe peptidique.

Le glycanne branché sur l'acide aminé C-terminal est constitué de mannose, de galactose, de glucosamine, la présence d'un résidu de glucosamine non acétylée ayant été démontré par STRANG et coll. (1986)(167).

La liaison entre ce glycanne et l'axe peptidique (sérine ou acide aspartique) se définit par une liaison amide entre la fonction  $\alpha$ -carboxylique de l'acide aminé et un résidu d'éthanolamine [HOLDER (1983 a ) (89) ] .

ROVIS et DUBE (1981)( 160) ont étudié l'effet de la tunicamycine au niveau de la biosynthèse des AVS. Leurs résultats ont confirmé ceux de HOLDER et CROSS(1981)(88), à savoir la distinction de deux types de chaînes oligosaccharidiques :

- un premier type dont la biosynthèse est totalement inhibée par la tunicamycine.
- un second type dont la structure est impliquée dans des réactions immunologiques inter-AVS (CRD) et dont la synthèse n'est pas affectée par la tunicamycine.

Afin de déterminer un rôle potentiel des glycanes N-liés dans le transport de l'AVS vers la surface cellulaire ou dans l'interaction des AVS constitutifs du manteau de surface, STRICKLER et PATTON(1982)(169) ont utilisé un agent bifonctionnel, le dithiobis (succinimidyl propionate) (DSP) ] capable de former des

liaisons intermoléculaires en réagissant avec les fonctions aminées des protéines sans altérer la fonctionnalité des molécules. Les parasites sont incubés dans un milieu enrichi en sérine radiomarquée [ $^{14}\text{C}$ -sérine] pendant 60 minutes en présence ou en absence de tunicamycine puis le milieu d'incubation est traité pendant 30 minutes par l'agent bifonctionnel (DSP) puis analysé en électrophorèse SDS. En présence de tunicamycine, le dimère ne se constitue pas, contrairement à ce que l'on observe en l'absence de tunicamycine. Cette comparaison montre que les glycanes N-liés sont essentiels dans la dimérisation des AVS.

Ces résultats laissent aussi envisager une affinité de type lectinique. Ainsi, les auteurs se sont intéressés à étudier l'effet des monosaccharides sur cette interaction. Après une incubation des AVS en présence d'un monosaccharide en concentration variant de 0,1 M à 0,5 M, un traitement par l'agent bifonctionnel DSP puis une analyse électrophorétique ont été réalisés. Les résultats ont révélé que ni le galactose, ni le mannose, ni le glucose n'étaient capable d'empêcher la dimérisation.

#### D - Caractérisation immunologique

Au cours de la trypanosomiase africaine, la réponse immunitaire de l'hôte se traduit par une production d'anticorps dont certains sont synthétisés spécifiquement par reconnaissance du parasite. L'apparition de tels anticorps permet de contrôler la parasitémie et représente donc le mécanisme essentiel de défense de l'hôte.

L'étude des facteurs responsables de cette réponse immunitaire a très vite été centrée sur la détermination des épitopes présents au niveau du manteau de surface parasitaire et en particulier au niveau de l'AVS.

Plusieurs équipes se sont intéressées à la définition de ces épitopes par utilisation d'anticorps monoclonaux. Certains de ces anticorps réagissent avec l'antigène de surface en solution et ne réagissent pas avec le parasite vivant; cette observation soulève le problème de l'influence de l'agencement moléculaire de l'AVS dans la réaction immunologique.

Les anticorps réagissant avec les parasites vivants sont essentiels dans la protection de l'hôte. Deux équipes ont étudié, par utilisation d'anticorps monoclonaux, les épitopes exposés ou non à la surface des trypanosomes vivants :

\* HALL et ESSER (1984)(78) ont utilisé 30 anticorps monoclonaux obtenus à partir des parasites du clone WRATat 1 de T.b. rhodesiense. Ces anticorps ont été testés selon les techniques d'immunofluorescence en phase liquide sur parasites vivants et d'immunofluorescence sur parasites fixés à l'acétone, ils ont pu établir tout d'abord qu'il n'existait aucune corrélation entre la capacité neutralisante in vivo des monoclonaux et leur classe. En effet, parmi les anticorps étudiés, on remarque parmi les sous classes IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 et IgA une même répartition entre anticorps protectifs ou non protectifs.

De l'ensemble de leurs résultats, les auteurs ont conclu qu'il existe une étroite corrélation entre la capacité neutralisante d'un anticorps et le pouvoir de fixation de celui-ci à la surface des trypanosomes vivants en test d'immunofluorescence. En revanche, les 30 anticorps monoclonaux produisent une immunofluorescence similaire à la surface du trypanosome fixé à l'acétone.

Les anticorps monoclonaux ont été répartis en deux classes : les anticorps trypanolytiques (17) responsables d'une neutralisation des parasites in vivo et les anticorps non trypanolytiques (13) ne provoquant aucune lyse parasitaire.

Les études en immunofluorescence ont permis de définir les sites de fixation de ces anticorps :

- 14 anticorps trypanolytiques qui se fixent à la surface du parasite
- 7 anticorps qui se fixent au niveau de la poche flagellaire et parmi ceux-ci 3 sont trypanolytiques
- enfin, 9 anticorps qui caractérisent des épitopes enfouis non trypanolytiques.

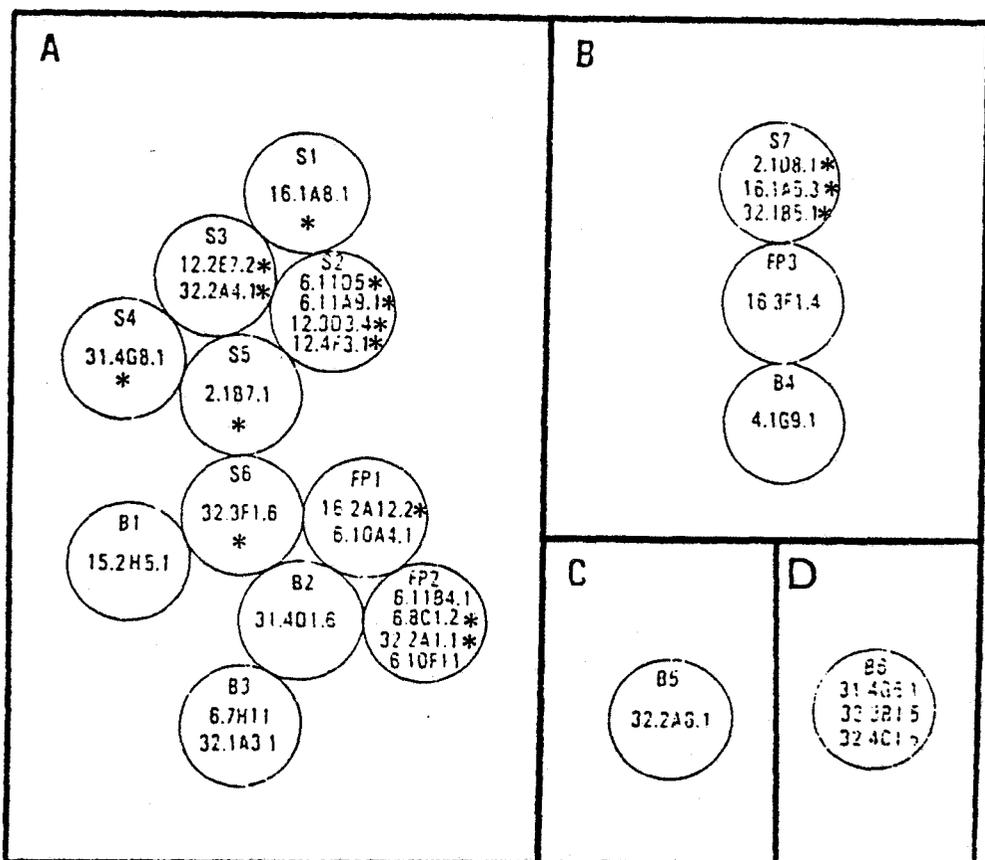
Afin d'établir une carte topologique des épitopes présents au niveau de la molécule antigénique de WRATat 1, la technique de fixation compétitive des anticorps monoclonaux a été utilisée sur l'AVS purifié : chaque anticorps a été successivement utilisé comme anticorps fluorescent et anticorps bloquant (par fixation sur l'antigène pour bloquer la fixation d'un autre anticorps fluorescent).

Au moins 16 épitopes distincts ont été définis et classés en quatre familles comprenant respectivement 11, 3, 1 et 1 épitopes [ figure 13].

La définition d'épitopes accessibles uniquement au niveau de la poche flagellaire et sur trypanosomes vivants, permet de souligner l'existence d'une différence dans l'agencement moléculaire au niveau de cette zone par rapport à l'ensemble de la surface parasitaire.

\* MILLER et coll. (1984) (131) ont également obtenu des anticorps monoclonaux (9) à partir de l'antigène de surface du clone MiTat 1.6 de T.b. brucei. Parmi ces anticorps, se fixant

Localisation des épitopes de l'antigène variable de surface du variant  
WRATat 1 de T.b.rhodesiense [ selon HALL et ESSER (1984) (77) ]



A : famille composée de 11 épitopes

B : famille composée de 3 épitopes

C,D : familles composées d'un seul épitope

Chaque cercle représente un épitope distinct caractérisé par

(S) - une accessibilité à la surface du trypanosome vivant

(FP) - une accessibilité au niveau de la poche flagellaire uniquement

(B) - une inaccessibilité à la surface du trypanosome vivant

\* Anticorps trypanolytiques.

**Figure 13**

tous sur les parasites fixés à l'acétone, seuls deux se sont révélés trypanolytiques.

Afin d'établir une carte topologique des épitopes présents au niveau de l'AVS MiTat 1.6, un test compétitif radioimmunologique a été réalisé entre ces différents anticorps et a permis de caractériser 5 régions immunogéniques distinctes ; parmi celles-ci, une seule région antigénique est exposée en surface parasitaire [ Figure 14].

Parallèlement, les 9 anticorps monoclonaux ont été testés en immunoblotting vis à vis de l'AVS purifié. Les anticorps caractéristiques de l'épitope exposé ne reconnaissent pas l'antigène purifié (en test RIA) alors que les 7 autres anticorps réagissent avec la glycoprotéine en immunoblotting. Ces résultats permettent de définir pour l'épitope de surface une labilité conformationnelle.

Les épitopes définis par les 7 autres anticorps monoclonaux ne sont exposés qu'après libération du manteau de surface en solution ou après rupture du manteau lors du séchage ou de la réhydratation pendant la préparation des lames d'immunofluorescence.

Des études ultérieures [MILLER et coll. (1984) (132)] ont permis de localiser ces régions antigéniques au sein du domaine N-terminal de l'antigène de surface.

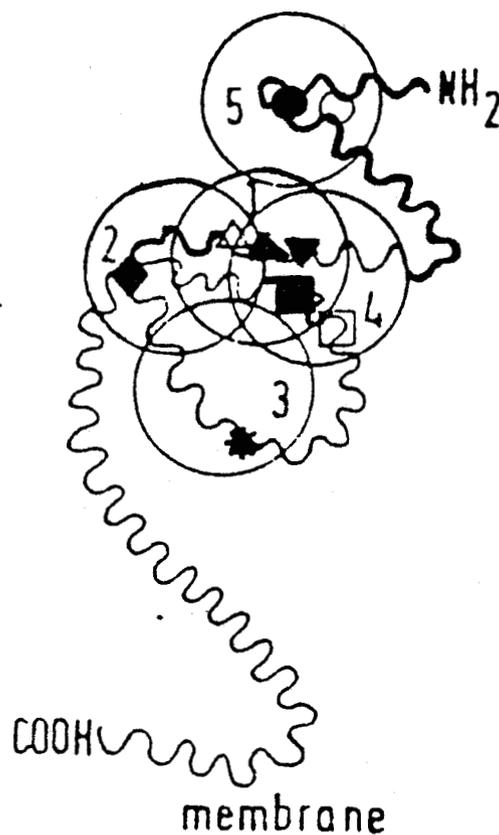
Les études sur des variants différents (WRATat1 de T.b.rhodesiense et MiTat 1.6 de T.b. brucei ) livrent des résultats différents sur le plan de la proportion des anticorps trypanolytiques obtenus.

Ces divergences peuvent s'expliquer par le mode différent de préparation des anticorps monoclonaux (à partir de trypanosomes dans le premier cas et à partir de la glycoprotéine de surface isolée dans le 2ème cas).

Dans le but d'établir également une carte topologique des épitopes protectifs, PINDER et coll. (1987)(146) ont préparé des anticorps monoclonaux à partir de parasites du clone DiTat 1.3 de T.brucei. Ce variant est en effet un modèle intéressant puisque , comme nous l'avons précédemment décrit dans le paragraphe sur la structure secondaire, cette molécule est formée par une région globulaire attachée à un domaine allongé alors que l'AVS MiTat 1.6 [ étudié par MILLER et coll. (1984)(131) ] possède une configuration légèrement différente caractérisée par un important domaine allongé et prolongé par une "queue fibreuse". Il semblait donc essentiel d'étudier les épitopes de surface sur deux molécules différentes au plan de la structure secondaire.

Tous les anticorps monoclonaux produits (au nombre de 20) se fixent sur les parasites fixés à l'éthanol.

Représentation schématique des régions immunodominantes de l'AVS MiTat 1.6 de *T.brucei* [selon MILLER et coll. (1984)(129)].



- 1 - 2 - 4 : épitopes de surface créés lors de modifications conformationnelles
- 3 - : épitope non exposé en surface
- 5 - : épitope de surface conformationnellement labile.

Figure 14

L'analyse de leur pouvoir trypanolytique (vis à vis des trypanosomes vivants) révèle qu'un seul de ces anticorps est trypanolytique avec aussi l'existence d'un autre anticorps partiellement neutralisant.

Ces mêmes anticorps ont été testés vis à vis de l'antigène purifié par compétition immunoenzymatique en phase solide (RIA) selon la technique proposée par MILLER. Tous les anticorps étudiés réagissent avec l'AVS à l'exception de 4 qui d'autre part ne se fixent pas à la glycoprotéine en solution. Les auteurs conclurent que ces anticorps étaient dirigés contre des sites conformationnels présents au niveau de l'antigène en situation membranaire et que ces derniers seraient perdus lors de la conversion de la forme membranaire en forme soluble, ou bien seraient dirigés contre des épitopes associés à l'ancrage membranaire. La première hypothèse peut être confortée par l'observation de WESTHOF et coll. (1984)(181) selon laquelle les anticorps monoclonaux fabriqués à partir d'une protéine sont souvent très spécifiques de la conformation de la protéine utilisée et que de nombreux facteurs sont capables d'induire des modifications conformationnelles ultérieures.

En conclusion de cette étude, PINDER et coll. (1987)(146) ont montré qu'il existait peu de sites antigéniques exposés à la surface de DiTat 1.3 et de surcroît, que ces épitopes semblaient de conformation labile. Ces observations sont en accord avec celles de MILLER et coll. (1984)(131) malgré une structure secondaire différente entre les deux variants étudiés.

Il est intéressant de souligner que malgré une hypervariabilité des acides aminés présents dans la séquence peptidique de l'AVS (environ 400 sur 500), le phénomène d'échappement à la réponse immunitaire semble impliquer vraisemblablement des modifications seulement au niveau de quelques résidus constituant le site antigénique exposé. Des changements conformationnels pourraient aussi représenter un facteur de variation; l'analyse de la structure secondaire  $\alpha$ -hélicoïdale de l'AVS montre en effet qu'un degré de variation peut être induit par de très légères différences au niveau de la séquence amino-acide, impliquant de profonds changements conformationnels [COHEN et coll. (1984)(33)].

En conclusion, il faut retenir que l'utilisation d'anticorps monoclonaux ne peut exclusivement permettre l'identification précise d'une région immunodominante et qu'une approche simultanée, par étude de la séquence amino-acide, par analyse de l'immunogénicité de peptides naturels ou synthétiques et encore par étude de la structure tridimensionnelle doit être réalisée afin d'appréhender de façon plus exacte la ou les régions impliquées dans la réponse immune de l'hôte.

### E - Analyse du glycolipide C-terminal

Nous avons précédemment décrit 3 types de modifications post-traductionnelles au niveau de l'AVS, à savoir :

- \* clivage du peptide signal N-terminal
- \* clivage de l'extension hydrophobe C-terminale
- \* addition de chaînes oligosaccharidiques internes de type N-asparaginyglucosaminidique.

La succession de ces modifications ainsi que leur rôle dans la fonctionnalité de la molécule ont fait l'objet de nombreuses études. Une quatrième modification est encore à l'étude, il s'agit de l'addition d'un glycolipide C-terminal.

En fonction du protocole de libération de l'antigène, il est possible en effet de distinguer deux formes de l'AVS (forme soluble et forme membranaire). Outre les caractéristiques précédemment décrites qui sont communes à ces deux formes, la forme membranaire possède un glycolipide complexe C-terminal dont le rôle essentiel est d'assurer l'ancrage de l'AVS dans la bicouche lipidique de la membrane plasmique parasitaire.

Différents éléments de structure ont déjà été proposés et permettent une approche de la complexité de cette molécule.

HOLDER et coll (1981)(88) ont mis en évidence une substitution de l'acide aminé en position C-terminale de la glycoprotéine. En effet, un résidu d'éthanolamine est lié par une liaison amide à la fonction carboxylique de l'acide aspartique ou de la sérine C-terminale.

La présence de phosphore [ BALTZ et coll. (1984)(10) ], de glycérol et d'acides gras [ DUVILLIER et coll (1983)(46) ] a été mise en évidence pour plusieurs antigènes de T.equiperdum suggérant l'existence d'une copule glycérophospholipidique.

CARDOSO DE ALMEIDA et TURNER (1983)(24) 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)(50) 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. (1985a)(51)] 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 d'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 A<sub>2</sub> libère 50% d'acide myristique et la phospholipase C libère 100% de 1,2-dimyristyl diglycéride, ce qui témoigne 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 révèlent inactives.

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

FERGUSON et coll ; (1985b) (52) se sont attachés à déterminer la structure du glycolipide 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)(90)] implique aussi, si le résidu de glucosamine est intégré dans une structure oligosaccharidique, un clivage au niveau de cette osamine [HORTON et PHILIPS (1973)(90) ; WILLIAMS (1979)(182)] et la libération du mono- ou du polysaccharide voisin. 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-<sup>3</sup>H] 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 phosphatidylinositol substituant 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 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.

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)(53) ] .

Une schématisation de la structure C-terminale de la forme membranaire de l'antigène a été proposée par LOW et coll. (1986)(119) [Figure 15 ] .

Récemment , FERGUSON (1987)(54) a proposé une structure du glycane reliant l'éthanolamine au résidu de glucosamine. Il est constitué de 7 résidus glucidiques dont 3 mannoses et 4 galactoses avec présence d'un résidu de phosphore reliant le groupement hydroxylé de l'éthanolamine à la fonction alcoolique en position 6 d'un résidu de mannose [figure 16].

La structure de l'oligosaccharide C-terminal a également été déterminée par SCHMITZ et coll. (1987)(161) pour un autre variant (MiTat 1.6). Les résultats obtenus sont légèrement différents. Pour ce variant, l'oligosaccharide C-terminal a été isolé par traitement acide (hydrolyse par l'acide fluorhydrique à 60% dont la spécificité est de cliver les liaisons phosphodiesters), ou par digestion pronasique de l'AVS.

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

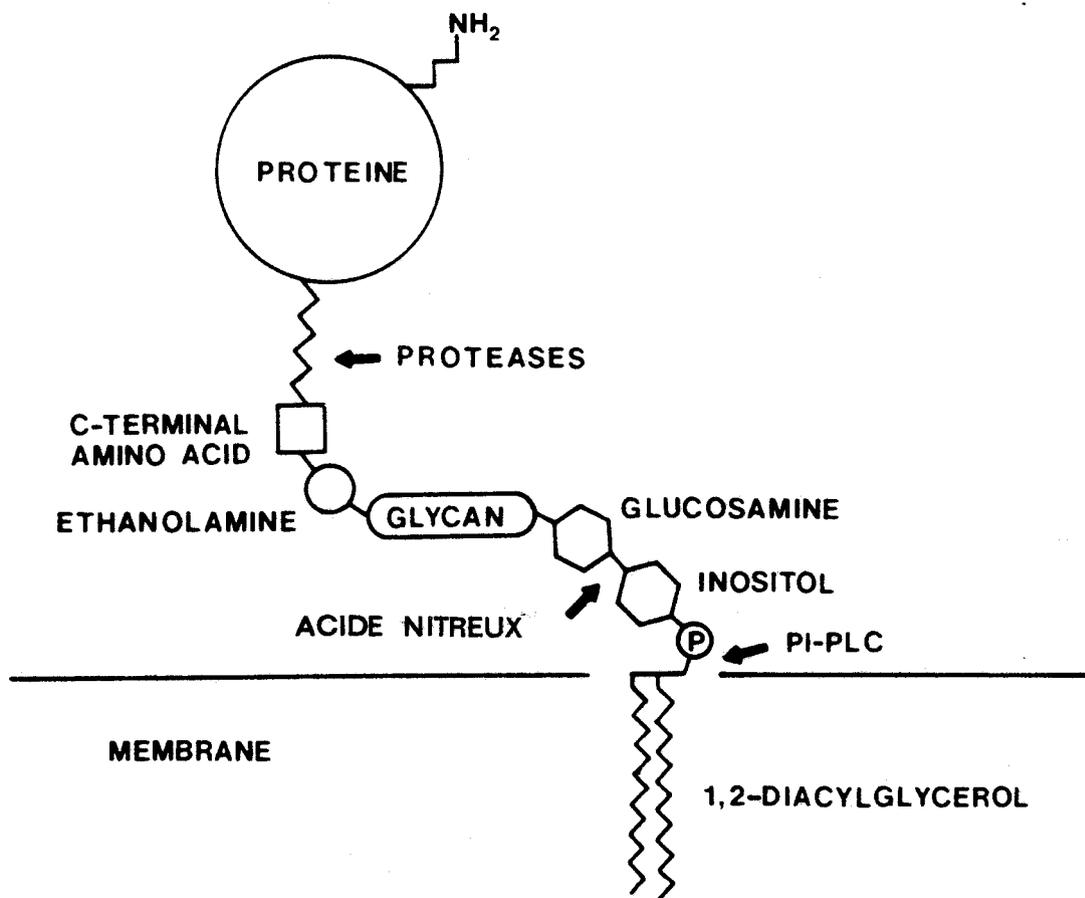


Figure 15

Structure de l'oligosaccharide C-terminal proposée par FERGUSON (1987)

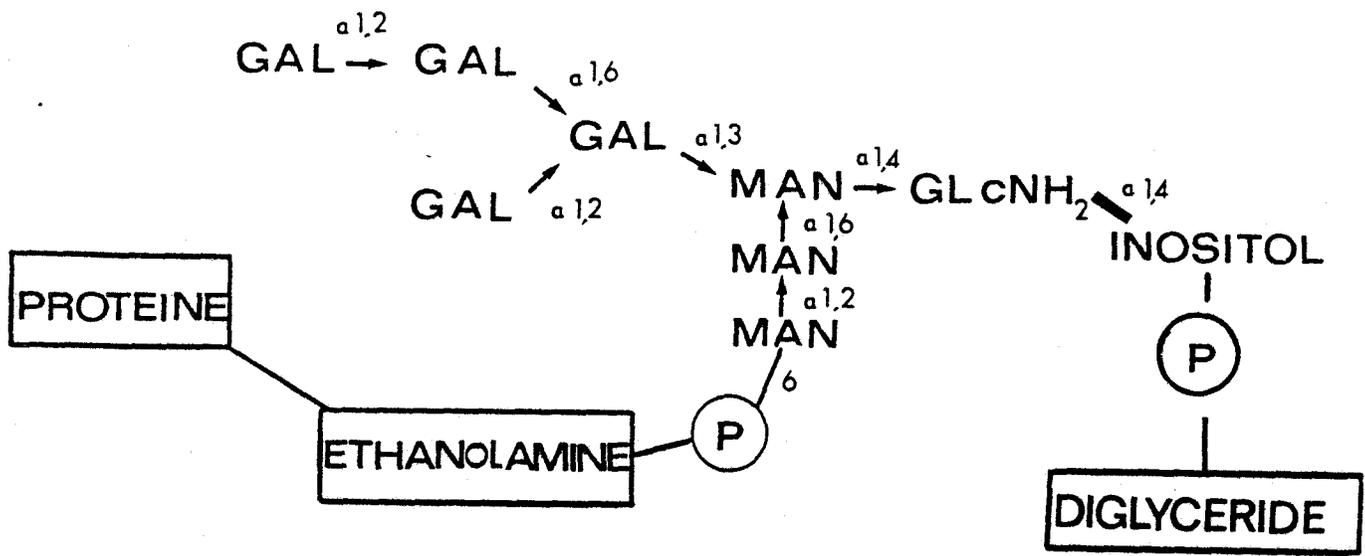


Figure 16

Après isolement et purification par électrophorèse et chromatographie d'affinité sur concanavaline A, le glycane a été analysé en spectrométrie de masse et en résonance paramagnétique nucléaire  $^1\text{H-RMN}$ .

Les ions caractéristiques obtenus ont permis de définir les points suivants :

- il existe un "noyau" formé de 2 résidus de mannose et d'un résidu de glucosamine non acétylée, avec substitution possible au niveau d'un mannose par 2 résidus de galactose.
- un résidu de mannose est impliqué dans une liaison phosphodiester (substitution en position 6) avec le résidu d'éthanolamine
- le résidu d'inositol est lié de façon glycosidique au résidu de glucosamine par la fonction alcoolique en position 4.
- Toutes les liaisons sont en position  $\alpha$ .

La figure 17 illustre la structure ainsi proposée pour l'oligosaccharide C-terminal représentant le déterminant antigénique croisé (CRD). Cette structure a été étudiée pour son activité CRD par test radioimmunoenzymatique. Sous cette forme, l'oligosaccharide possède une forte activité de réaction croisée alors que le traitement par l'hydrolyse fluorhydrique à 60% inhibe totalement cette activité. Ces résultats ont permis aux auteurs de suggérer une implication essentielle des résidus de phosphore (un seul ou les deux) dans le maintien de la structure responsable de l'activité de réaction croisée.

De plus, le traitement de l'oligosaccharide par l' $\alpha$ -galactosidase ne modifie absolument pas cette activité. La participation des résidus de galactose dans l'activité CRD peut ainsi être rejetée. Cependant, il faut rappeler que CROSS (1979)(36) avait montré que certains variants dépourvus de résidus de galactose possédaient une activité croisée moindre.

En conclusion, cette structure oligosaccharidique C-terminale, bien que globalement définie, demeure cependant très discutée quant au nombre et à l'agencement des résidus de galactose en fonction des variants étudiés.

La notion de spécificité de structure du glycolipide en relation avec le variant, la fonctionnalité de l'entité sont aussi des éléments importants qui restent à préciser.

L'existence de lipides liés de façon covalente est de plus en plus décrite au niveau de protéines ou de glycoprotéines. Différents exemples sont ici rapportés.

Structure de l'oligosaccharide C-terminal proposee par SCHMITZ et coll. (1987)

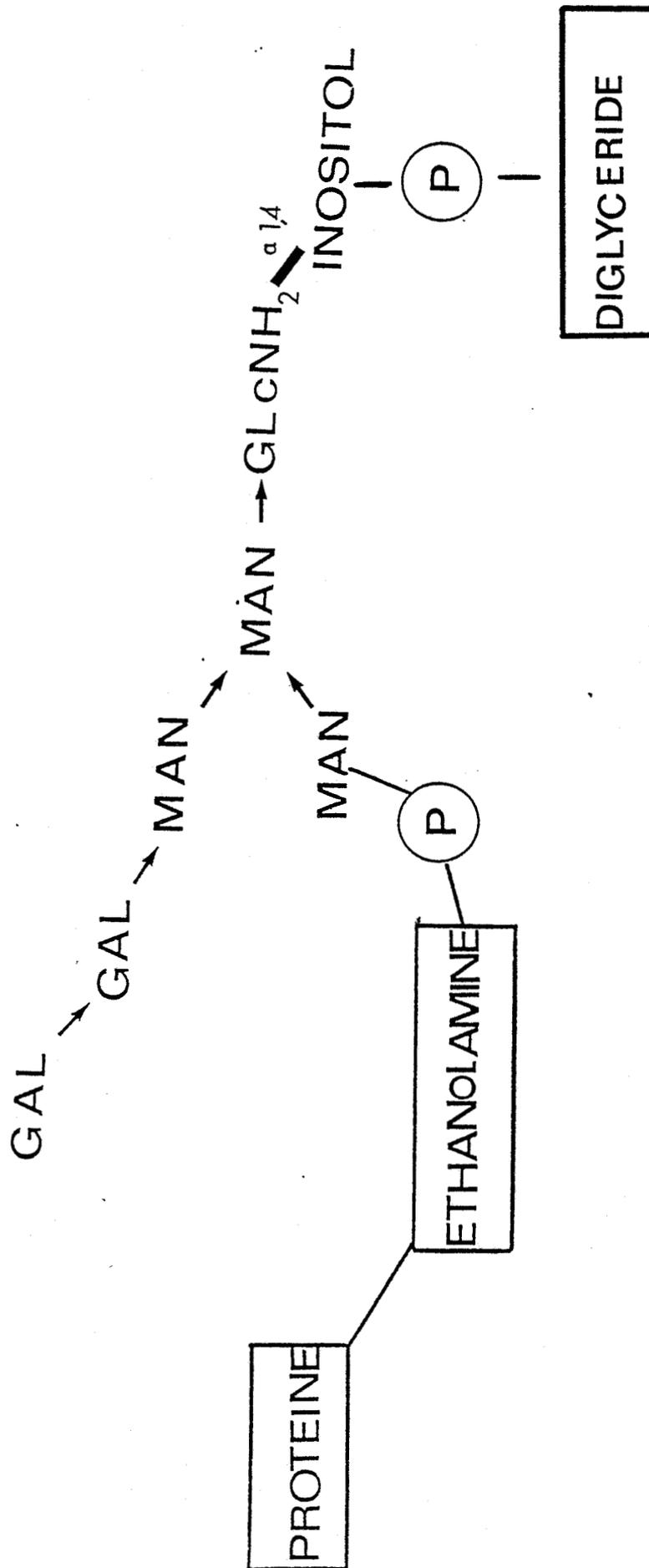


Figure 17

## F - Autres types d'acylation

\* D'autres protéines membranaires ont été identifiées comme sensibles à l'action de la phospholipase C spécifique du phosphatidylinositol. Certaines d'entre elles sont présentes chez l'homme, d'autres appartiennent au domaine parasitaire.

\* Protéines membranaires humaines.

Ainsi, TSE et coll. (1985)(170) a observé que la glycoprotéine Thy-1 de neurones et de thymocytes de rats possède dans sa forme mature un résidu de cystéine en position C-terminale sur lequel est branchée une structure glycophospholipidique. Par chromatographie en phase gazeuse et par fragmentation de masse, les auteurs ont montré que cette fraction C-terminale est constituée d'éthanolamine, de myo-inositol, d'acide stéarique, de phosphate, de glycérol et de mannose [ Tableau 5 ].

Cette structure complexe a été également mise en évidence pour l'acétylcholinestérase de Torpedo marmorata par STIEGER et coll.(1986) (166). Les auteurs ont montré que la forme amphiphile soluble dans les détergents pouvait être convertie en une forme hydrophile par action d'une phospholipase C isolée chez T.brucei. Par contre, l'acétylcholinestérase d'érythrocytes humains n'est pas sensible à cette phospholipase. Selon les auteurs, cette différence serait due à une spécificité sélective de la lipase vis à vis de la longueur des acides gras impliqués dans le glycolipide.

Par désamination nitreuse , LOW et coll. (1987)(120) ont souligné , pour l'acétylcholinestérase de Torpedo ainsi que pour la phosphatase alcaline isolée de l'intestin de boeuf ou du placenta humain, l'existence d'une structure glycolipidique d'ancrage membranaire identique à celle observée par FERGUSON et coll. (1986)( 53) pour T.brucei. De même, JEMMERSON et coll. (1987)(97) ont décrit pour la phosphatase alcaline isolée de cellule cancéreuse la présence d'une telle structure ancrée dans la membrane par un phosphatidylinositol. L'acylation du glycérol a été déterminée par radiomarquage :

l'acide myristique ainsi que l'acide palmitique sont incorporés au niveau de la phosphatase alcaline; un traitement par l'hydroxylamine à pH neutre n'entraîne aucune diminution de la quantité de radioactivité incorporée au niveau de l'extrémité C-terminale, ceci confirme donc que les acides gras ne sont pas liés par une liaison thiol-ester à la phosphatase alcaline comme cela a souvent été décrit pour des protéines acylées par l'acide palmitique [ MAGEE et coll. (1982) (123) ].

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

	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 endo-+ gène 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	?	+	?	+	

**TABLEAU 5**

MEDOF et coll. (1986)(127) ont montré pour le facteur DAF, qui est un inhibiteur des enzymes amplificateurs des compléments C3 et C5, une structure d'ancrage similaire à celle du glycolipide de T.brucei. En effet, par des techniques immunologiques, DAVITZ et coll. (1987)(38) ont mis en évidence une réactivité croisée entre la forme soluble de ce facteur DAF et l'anticorps dirigé contre le déterminant antigénique oligosaccharidique C-terminal de T.brucei.

D'autres exemples similaires ont été récemment décrits : pour la thréalase, la phosphodiesterase alcaline de type I, la protéine activatrice des cellules T et la 5'-nucléotidase.

#### \* Protéines membranaires parasitaires

Des structures complexes d'antigènes membranaires ont également été définies pour certains parasites autres que le trypanosome

HANDMAN et coll. (1984)(180) ont décrit un antigène membranaire amphiphile à la surface des formes promastigotes de Leishmania major qui est libéré dans le milieu de culture "in vitro". Par incorporation de marqueurs radioactifs, ils ont montré que cette molécule contient glucose, galactose, acide palmitique, phosphate et sulfate. En électrophorèse - SDS, cet antigène présente un profil polydispersé entre les tailles moléculaires 20 000 et 67 000 daltons. Par des études ultérieures [(1985)(81)], les auteurs ont montré que la nature amphiphile de ce glycoconjugué était due à la présence de lipides liés de façon covalente, permettant ainsi l'ancrage de l'antigène dans la membrane plasmique parasitaire.

Ce glycoconjugué représenterait le récepteur parasitaire vis à vis des macrophages.

BOUVIER et coll. (1985)(19) ont isolé une protéine amphiphile de surface des formes promastigotes de leishmanies. Cette protéine membranaire est obtenue par extraction en présence du détergent Triton X-114 et présente une taille moléculaire de 63 000 daltons en électrophorèse en présence de SDS. Par incorporation d'acide myristique [ 3 H ] ils ont confirmé l'analogie structurale étroite qui était suspectée entre cette forme amphiphile et la forme membranaire décrite pour l'AVS de T.brucei.

Chez Plasmodium falciparum [ HALDAR et coll. (1986)(77) ], la protéine de surface du mérozoïte de taille moléculaire 195 000 daltons est également acylée par une structure lipidique du type sn-1,2 diacylglycérol. Ce phosphodiglycéride ne semble pas estérifier directement un résidu amino-acide du squelette polypeptidique; cependant, la nature de l'intermédiaire n'est pas encore définie.

CHAPITRE I I  
TRAVAUX PERSONNELS

## Chapitre II - Travaux personnels

### **I - Préparation du matériel biologique**

#### **1 - Clonage des variants et préparation de stabilats**

Le matériel biologique expérimental provient, à l'origine, d'un prélèvement sanguin réalisé sur antilope (*Tragelaphus scriptus*) naturellement infestée par une population "sauvage" de *Trypanosoma brucei brucei*. [Figure 18].

Après adaptation sur souris (13 passages successifs), la population obtenue a été dénommée EATRO 1125 (East African Trypanosomiasis Research Organization). Le clone AnTat 1.1 (Antwerp Trypanozoon Antigenic type), encore désigné stock ITMAS 150372 B (Institute Tropical Medicine Antwerp stock) a été obtenu par sélection arbitraire d'un parasite élémentaire (après 10 passages sur souris) et multiplication en nombre important à nouveau chez la souris (7 passages successifs).

Ce stock est représenté à 99% par le type antigénique AnTat 1.1; cependant, il existe également 1% de parasites appartenant à des populations minoritaires. Après neutralisation de l'infection par des immunosérums spécifiques de clones (NIT), les populations minoritaires peuvent alors être clonées et amplifiées par plusieurs passages sur souris afin de donner naissance à de nouvelles populations stabilisées telles que AnTat 1.10 et 1.8.

Ces clones peuvent être conservés sous forme de stabilat : 3 volumes de sang parasité de souris sont additionnés à 1 volume de tampon phosphate glucosé (NaCl 44 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 57 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3mM, glucose 0,1%)(PSG) à 50% (V/V) dans du glycérol. Maintenus à - 70°C, les stocks parasitaires se conservent quelques années, peuvent être réactivés par passage sur souris et fournir à nouveau en nombre important des trypanosomes de même définition immunologique.

Clonage de différents variants de T.b.brucei

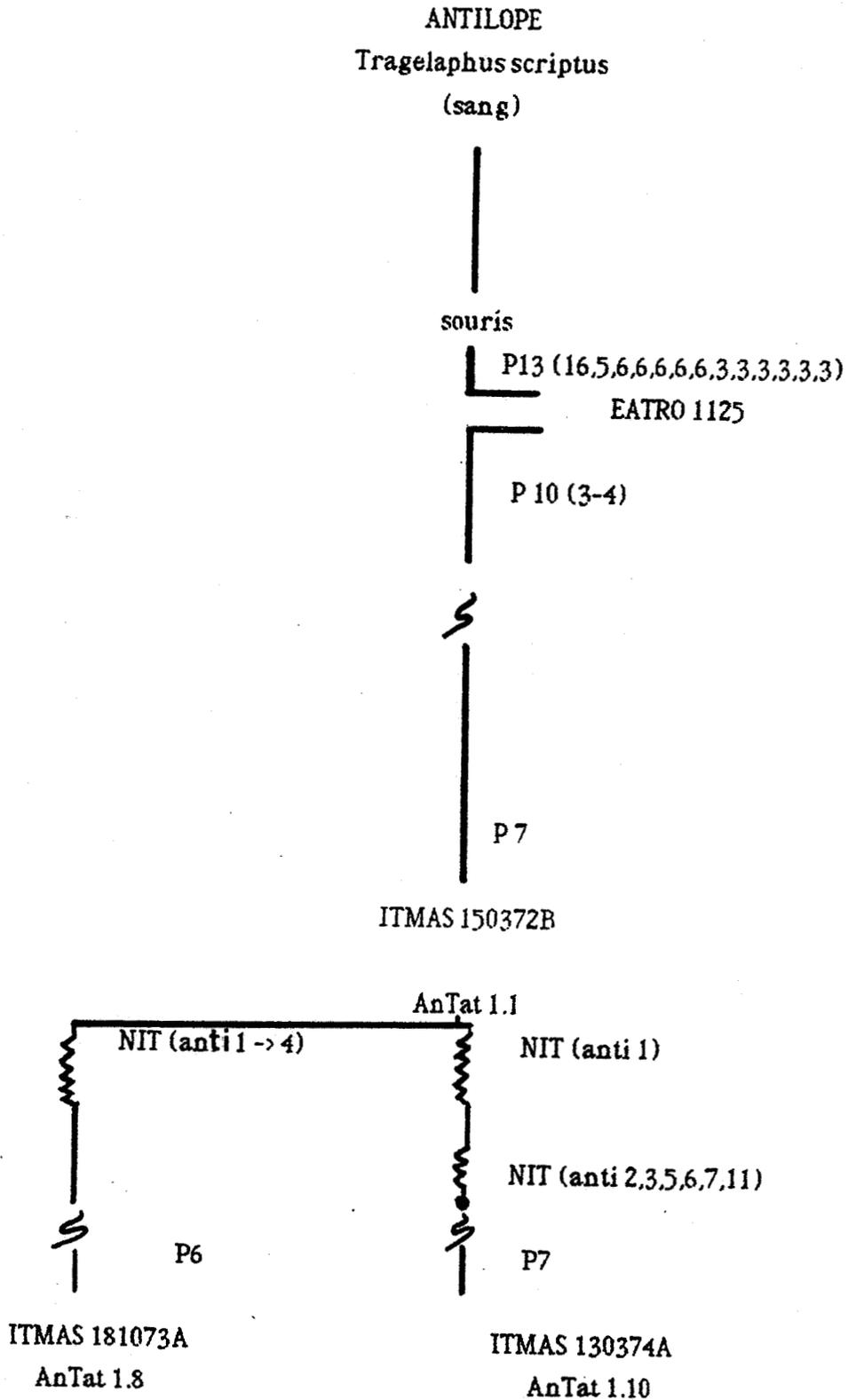


Figure 18

L'obtention des différentes préparations antigéniques purifiées nécessite plusieurs étapes :

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

## 2 - Isolement des trypanosomes

La préparation en quantité importante de parasites est réalisée en deux temps :

\* les stabilats parasitaires sont tout d'abord réactivés par passage chez des souris de type swiss. Lorsque la parasitémie, suivie par contrôle microscopique, atteint environ  $250 \cdot 10^6$  trypanosomes, le sang de souris prélevé par ponction cardiaque est dilué par 1 volume de tampon phosphate salin (NaCl 0.123M,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  12 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3mM) de pH 7.25 (PBS) afin d'obtenir une suspension équivalente à  $50 - 70 \cdot 10^6$  trypanosomes.

\* la suspension ainsi obtenue est injectée par voie intrapéritonéale à des rats ( Sprague Dawley) de poids compris entre 250 et 400 g. Après 3 jours, les animaux ont développé une parasitémie satisfaisante et reçoivent une administration d'héparine avant leur sacrifice.

Le sang obtenu par ponction cardiaque (15 ml en moyenne) est alors recueilli à 4°C dans un mélange de tampon phosphate glucosé (PSG) (7,5ml), d'héparine (0,3ml) et d'antiprotéases 0,02 mM [ N- $\alpha$ -p-Tosyl-L-lysyl Chlorométhyl cétone (TLCK) , N-éthylmaleimide (NEM), phénylméthylsulfonylfluorure (PMSF)] (0,25ml).

Pour la séparation trypanosomes-éléments sanguins, deux techniques ont été utilisées : la chromatographie sur DEAE-cellulose et la centrifugation.

### a - Chromatographie sur DEAE-cellulose

La chromatographie sur DEAE-cellulose a été la première méthode décrite dans la littérature pour l'isolement des parasites [LANHAM et GODFREY (1970)(109)]. Les trypanosomes sont séparés des éléments sanguins par chromatographie d'échange ionique sur une colonne de DEAE-cellulose équilibrée en tampon PSG. L'élution s'effectue selon un débit maximum de 100 ml par heure à + 25°C. L'éluat obtenu est centrifugé à 1500 g pendant 15 minutes et livre un culot parasitaire qui est ultérieurement soumis à deux lavages en tampon phosphate PSG.

Cette technique de séparation des parasites est celle que nous avons le plus souvent utilisée. Elle est restée la technique de base de notre protocole préparatif.

### b - Centrifugation

La centrifugation a aussi été utilisée pour la séparation sang-parasite car elle présente d'une part l'avantage d'être plus rapide que la précédente et d'autre part limite le coût de la technique d'isolement des trypanosomes. Elle a particulièrement été décrite pour la préparation de la forme membranaire de l'antigène variable.

Le sang de rat parasité obtenu par ponction cardiaque est recueilli à 4°C dans un mélange constitué de PSG, d'héparine et des seules antiprotéases TLCK et PMSF (1 mM). Le NEM, utilisé dans le protocole précédent, a en effet été décrit comme activateur de la conversion de la forme membranaire en forme soluble de l'antigène variable. Après centrifugation à basse vitesse (300 g pendant 10 minutes à 4°C), on obtient dans le tube trois zones :

- la zone inférieure qui est constituée par les globules rouges
- la zone intermédiaire qui correspond à la suspension parasitaire très concentrée
- la zone supérieure qui est représentée par le sérum.

Après récupération de la zone intermédiaire, la suspension parasitaire subit deux lavages en tampon PSG suivis de centrifugations. Le culot résultant contient les parasites.

Nous avons testé et utilisé cette technique de séparation des parasites à l'occasion de la préparation de l'antigène variable sous sa forme membranaire.

L'une ou l'autre des deux techniques rapportées, chromatographie sur DEAE-cellulose ou centrifugation, livre une population parasitaire satisfaisante pouvant servir à l'isolement de l'antigène variable. La première nous semble plus indiquée dans le cas de préparatifs importants, la seconde possède l'avantage de la rapidité. En fait, le choix définitif dépend de l'objectif de recherche : préparation en quantité d'antigène variable; préparation de parasites à maintenir en culture; préparation avec respect maximum de l'intégrité du manteau de surface.

### 3 - Libération du manteau de surface

La libération de l'antigène variable est obtenue selon deux protocoles différents, en fonction de la forme recherchée : forme soluble ou forme "membranaire".

#### a - forme soluble

Parmi les nombreux protocoles décrits, nous avons retenu un protocole de libération de l'antigène variable évitant la rupture cellulaire [BALTZ *et coll.* (1976)(9)].

Le culot de trypanosomes est mis en suspension dans un tampon phosphate 0,125M de pH 5.5 enrichi en glucose à la concentration de 1%.

La suspension est laissée une nuit à 4°C sur agitateur de KLINE. Au cours de ce traitement, l'antigène de surface est libéré sous sa forme soluble et les parasites encore intacts sont sédimentés par une centrifugation à 3000 g pendant 15 minutes. Le surnageant est

soumis à une ultracentrifugation (165 000 g 1 h 4°C) Ce deuxième surnageant correspond alors à l'extrait antigénique brut, contenant l'antigène variable mais aussi les antigènes communs. Il est soumis à une dialyse contre le tampon ultérieurement utilisé lors de la purification sur colonne d'affinité (tampon phosphate 0,01M enrichi en NaCl 0,5M, MgCl<sub>2</sub> 1mM et CaCl<sub>2</sub> 1mM, de pH 8,0). A ce stade, la préparation antigénique peut être conservée congelée avant l'étape finale de purification.

#### b - forme membranaire

Pour l'obtention de la forme membranaire, nous avons fait appel à la lyse des parasites selon des protocoles décrits par KRAKOW et coll. (1986)(105) et CARDOSO DE ALMEIDA et coll. (1983)(24).

Le culot parasitaire est traité par lyse hypotonique:

. soit en tampon phosphate 0,01M de pH 7,20 (PBS) enrichi d'une part en acide p-mercuriphénylesulfonique (pCMPSA), inhibiteur de l'activité lipasique, à la concentration de 5mM et d'autre part en inhibiteurs protéasiques PMSF et TLCK (1mM).

. soit en tampon phosphate 0,01M de pH 7,20 (PBS) enrichi en inhibiteurs PMSF et TLCK (1mM) et aussi en chlorure de zinc (5mM) qui inhibe la libération spontanée de l'antigène variable selon un mécanisme d'ailleurs encore mal défini.

L'étape lytique s'effectue par agitation de la suspension pendant 30 minutes à 4°C. Une centrifugation à 600 g (4°C, 10 minutes) livre un culot qui est soumis à deux étapes de lavage. Le culot membranaire est recueilli après ultracentrifugation (165 000 g, 20 minutes, à 4°C) et mis en suspension en tampon PBS, pCMPSA ou ZnCl<sub>2</sub> 5mM, PMSF 1 mM et TLCK 1 mM enrichi en n-octyl-β-D-glucopyrannoside (nOG) à 1% (p/v) dont le rôle est d' "extraire" la glycoprotéine de surface à partir de la membrane plasmique.

La libération de la forme membranaire s'effectue par agitation à 4°C pendant 10 minutes.

Une centrifugation à 165 000 g pendant 20 minutes à 4°C permet d'obtenir un surnageant essentiellement constitué par l'antigène sous forme membranaire purifiée, le degré de pureté étant estimé à 95% de la présence protéique et/ou glycoprotéique dans la littérature.

#### 4 - Purification de l'antigène variable

En ce qui concerne la forme membranaire, beaucoup d'auteurs l'ont étudié sans purification supplémentaire au delà de sa libération.

La forme membranaire obtenue par action du détergent n-octylglucoside sur la membrane plasmique parasitaire se révèle, nous l'avons vu, déjà pure à 95%. D'autre part, une étape ultérieure de purification pose problème pour plusieurs raisons :

- la faible solubilité de cette forme dans les tampons dépourvus de détergent.
- la persistance d'une faible quantité de n-octylglucoside dans la préparation antigénique malgré une étape de dialyse, ce qui limite les possibilités de recourir à des purifications par chromatographie d'affinité.

La forme soluble est purifiée selon un protocole décrit par BALTZ *et coll.* (1976)(9) à savoir essentiellement une chromatographie d'affinité sur colonne de Concanavoline A-Sépharose équilibrée en tampon phosphate 0,01 M NaCl 0,5M, MgCl<sub>2</sub> et CaCl<sub>2</sub> 1mM de pH 8,0.

Les conditions d'élution ont été légèrement modifiées par rapport à la description originale. Elles procèdent en plusieurs étapes selon un gradient discontinu utilisant dans un premier temps le méthyl- $\alpha$ -D-mannoside à la concentration de 10% dans le tampon d'équilibre, puis deux tampons supplémentaires contenant toujours le monosaccharide mais respectivement enrichis en agent réducteur ou/et en détergent.

Le tampon d'équilibre permet d'obtenir une fraction non retenue sur la colonne d'affinité (F1) représentant essentiellement les antigènes communs. Le gel de sépharose est ensuite successivement soumis (Protocole 1) :

- à une élution par ce même tampon enrichi en méthyl- $\alpha$ -D-mannoside à 10% : fraction F2
- à une élution par ce tampon enrichi en méthyl- $\alpha$ -D-mannoside à 10% et en  $\beta$ -mercaptoéthanol à 1% : fraction F3.
- à une élution par ce tampon enrichi en méthyl- $\alpha$ -D-mannoside à 10% ,  $\beta$ -mercaptoéthanol à 1% et en SDS à 0,1% : fraction F4.

Enfin , le gel de Concanavoline A-Sépharose est laissé en agitation dans le dernier tampon pendant 24 h à 37°C, ce qui nous permet d'obtenir une fraction F5.

Les différents éluats sont dialysés 1 semaine à 4°C et lyophilisés.

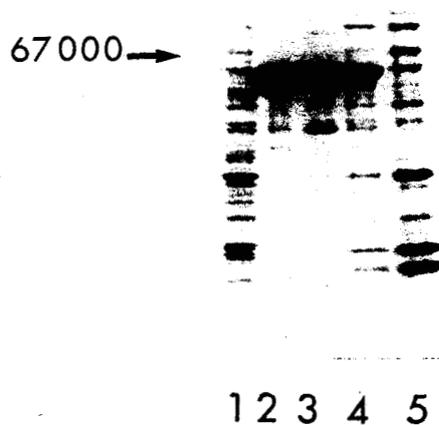
L'étude électrophorétique en présence de SDS et de  $\beta$ -mercaptoéthanol [figure 19] montre alors que les fractions F2, F3 et F4 sont caractérisées par une même bande de taille moléculaire apparente voisine de 60 000. En revanche, la fraction F5 comprend plusieurs bandes de taille moléculaire supérieure ou très inférieure.

L'immunoblotting (figure 20) de ces fractions vis à vis d'un immunsérum préparé à partir de la fraction F2 a révélé une réaction positive des bandes 60 000 des fractions F3 et F4, confirmant ainsi leur identité à savoir celle d'antigène variable au même titre que F2 éluat classique. Les fractions F2, F3 et F4 ont également été analysées par test immunoenzymatique (ELISA) vis à vis d'un immunsérum homologue total ou dressé à partir de fragments tryptiques de l'AVS AnTat 1.1. Cette quantification de la réaction immunologique n'a pas permis d'établir une différence significative de ces fractions au regard de leur réponse antigénique.

Pour la fraction F5, seule une bande de taille moléculaire 60 000 est révélée. Aucune des bandes de taille moléculaire inférieure ne réagit avec l'immunsérum anti-AVS AnTat 1.1; il semble donc que lors de la dernière étape de notre protocole la libération de matériel protéique corresponde à une libération de lectine et à une dégradation de celle-ci en ses sous-unités. On peut donc considérer cette fraction F5 comme un résiduel d'élution sans signification particulière et dont le rendement en antigène s'avère négligeable.

Profils électrophorétiques comparatifs des fractions antigéniques purifiées par chromatographie d'affinité.

Electrophorèse en gel de polyacrylamide à gradient 5-30% en présence de SDS; tampon de dissolution des échantillons : Tris-HCl 0,0625M, SDS 2%, glycérol 10%,  $\beta$ -mercaptoéthanol 5%, pH 6,8.



Fractions éluées par le tampon d'équilibre (1) puis par le même tampon enrichi en :

- (2) méthyl- $\alpha$ -D-mannoside à 10%
- (3) méthyl- $\alpha$ -D-mannoside à 10% +  $\beta$ -mercaptoéthanol à 1%
- (4) méthyl- $\alpha$ -D-mannoside à 10% +  $\beta$ -mercaptoéthanol à 1% + SDS à 0,1%
- (5) agitation du gel 24 h à 37°C dans le tampon 4

Figure 19

Révélation immunologique des fractions antigéniques purifiées F3, F4 et F5  
vis à vis d'un immunosérum dressé à partir de la fraction F2 (variant AnTat 1.1)

Immuno-transfert d'un gel de polyacrylamide (gradient 5.30% en présence de SDS)



- 1 - Fraction F3 )
- 2 - Fraction F4 ) élues de concanavaleine A-Sépharose
- 3 - Fraction F5 )

Figure 20

Cette technique de purification, l'addition d'un réducteur et d'un détergent, nous a permis aussi d'améliorer considérablement les rendements en antigène variable.

A partir d'un rat, il nous a été possible en effet d'obtenir pour les variants AnTat 1.1 et 1.8 :

- 1,3 mg de fraction F2
- 1,0 mg de fraction F3
- 3,0 mg de fraction F4

soit une quantité deux fois supérieure au moins à celle qui est décrite dans la littérature.

Ces rendements ne sont pas aussi importants pour le variant AnTat 1.10. Plusieurs facteurs sont à l'origine de cette différence :

- les trypanosomes de ce clone ont une moins grande aptitude à se multiplier chez le rat.
- il existe un fort pourcentage de mutation de ce variant en fonction du temps, ce qui nous oblige à limiter les délais de multiplication sur animal à 2 jours , 3 jours maximum.
- le variant antigénique semble être particulièrement fragile vis à vis de l'action des protéases, aussi bien au moment de l'isolement des parasites que lors de la purification de l'antigène variable.

Ainsi, le même protocole d'un variant à l'autre demande à être adapté tant sur le plan de la multiplication des trypanosomes qu'à celui du processus de libération du manteau de surface et même des conditions chromatographiques de purification.

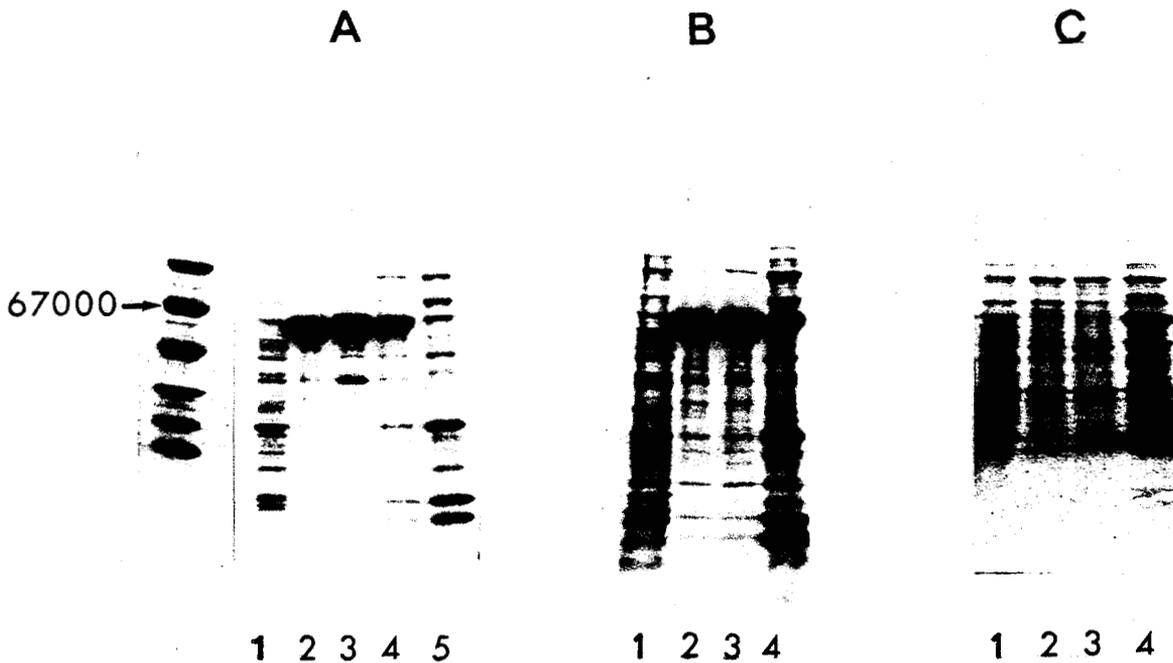
Afin d'apprécier de façon plus précise la spécificité d'élution des différentes fractions chromatographiques d'AVS, en particulier de connaître le rôle du  $\beta$ -mercaptoéthanol et du SDS, nous avons testé deux autres protocoles d'élution de la Concanavoline A-Sépharose en modifiant simplement la séquence d'utilisation des tampons d'élution déjà utilisés dans le protocole 1 :

- Protocole 2 : (figure 21 B)

- . tampon 1 : tampon d'équilibre
- . tampon 2 : tampon d'équilibre enrichi en  $\alpha$ -méthyl-D-mannoside à 10%
- . tampon 3 : tampon d'équilibre enrichi en  $\alpha$ -méthyl-D-mannoside à 10% et SDS à 0,1%
- . tampon 4: tampon d'équilibre enrichi en  $\alpha$ -méthyl-D-mannoside à 10% , SDS à 0,1% et  $\beta$ -mercaptoéthanol à 1%

Ce programme d'élution, appliqué à AnTat 1.1 permet l'obtention d'antigène dans les trois fractions F2, F3 et F4 avec des rendements globaux très voisins (pour 1 rat, F2 = 1 mg, F3 = 3 mg, F4 = 1,6 mg).

Profils électrophorétiques comparatifs des fractions antigéniques purifiées par chromatographie d'affinité



tampon de dissolution des échantillons : Tris-HCl 0,0625M, SDS 2%, glycérol 10%,  $\beta$ -mercaptoéthanol 5% pH 6,8

Fractions éluées par le tampon d'équilibre (1) puis par le tampon d'équilibre enrichi en :

- A) : - 2- méthyl- $\alpha$ -D-mannoside à 10% ( $F_2$ )  
Protocole 1 - 3- méthyl- $\alpha$ -D-mannoside à 10% +  $\beta$ -mercaptoéthanol à 1% ( $F_3$ )  
- 4- méthyl- $\alpha$ -D-mannoside à 10% +  $\beta$ -mercaptoéthanol à 1% + SDS à 0,1% ( $F_4$ )  
- 5- agitation du gel 24 h à 37°C dans le tampon (4)
- B) : - 2- méthyl- $\alpha$ -D-mannoside à 10%  
Protocole 2 - 3- méthyl- $\alpha$ -D-mannoside à 10% + SDS à 0,1%  
- 4- méthyl- $\alpha$ -D-mannoside à 10% + SDS à 0,1% +  $\beta$ -mercaptoéthanol à 1%
- C) : - 2- SDS à 0,1%  
Protocole 3 - 3- SDS à 0,1% +  $\beta$ -mercaptoéthanol à 1%  
- 4- SDS à 0,1% +  $\beta$ -mercaptoéthanol à 1% + méthyl- $\alpha$ -D-mannoside à 10%

Figure 21

D'autre part, l'antigène en F4 apparaît contaminé par des fractions pouvant correspondre à une dégradation de la Concanavaleine A. Ce profil est à rapprocher de la fraction F5 du premier protocole.

Toutefois, cet essai confirme l'action complémentaire du détergent et de l'agent réducteur dans leur capacité de favoriser l'élution de l'antigène variable.

- Protocole 3 : (figure 21 C) dans cette séquence deux solutions éluantes, le SDS puis le SDS associé à l'agent réducteur ont été utilisés préalablement au méthyl- $\alpha$ -D-mannoside. Ni le SDS, ni l'association SDS- $\beta$ -mercaptoéthanol n'ont à eux seuls permis l'élution d'antigène variable.

Cet essai montre donc que le complexe antigène-lectine reste stable en présence de détergent et que les fractions d'antigène, obtenues dans les fractions F3 et F4 lors des essais précédents, repose sur une variation conformationnelle de l'antigène.

Au total la technique de purification retenue dans ce travail permet l'élution en trois étapes discontinues de l'antigène de surface du trypanosome. Ce protocole s'est avéré reproductible au cours des différents préparatifs du point de vue qualitatif mais aussi quantitatif, ce qui accreditait l'existence d'une réelle hétérogénéité au niveau de l'antigène sous forme "soluble".

Cette hypothèse d'une hétérogénéité moléculaire nous a amené à rechercher d'éventuelles formes moléculaires de l'antigène variable en faisant appel à des critères analytiques mais aussi à des paramètres tels que hydrophobie/hydrophilie ou degré de polymérisation.

## **II - Hétérogénéité de définition des antigènes variables**

### **1 - Hétérogénéité vis à vis de l'affinité lectinique pour la Concanavaleine A-Sépharose**

#### **a - Forme soluble**

Nous avons établi que sur colonne d'affinité de Concanavaleine A-Sépharose, seul 40% de l'antigène variable pouvait être élué par le méthyl- $\alpha$ -D-mannoside utilisé seul. L'addition de  $\beta$ -mercapthoéthanol et de SDS permet une élution supplémentaire qui double le rendement préparatif.

Afin d'établir la raison de cette élution très progressive, nous avons réalisé une étude comparative de la composition glucidique de chaque fraction antigénique. Les résultats présentés dans le tableau 6 ne révèlent pas pour F2 et F3 de différences réellement significatives pouvant expliquer un degré d'affinité sur lectine supérieure pour F3 par rapport à F2.

Composition glucidique des fractions d'antigène  
purifié sur colonne de Concanavale A-Sépharose (forme "soluble" du  
variant AnTat 1.1, T.b.brucei)

	F2	F3	F4
Mannose	10.3	10.4	13.7
Galactose	3.8	4.3	2.9
Glucose	0.7	0.9	1.3
Glucosamine <sup>Δ</sup>	7.8	5.8	4.8

\* Résultats exprimés en nombre de résidus par mole de glycoprotéine

<sup>Δ</sup> dosage réalisé après hydrolyse HCl 5,6N, 110°C pendant 24 h sur autoanalyseur d'acides aminés. Cette valeur n'est pas corrigée.

Tableau 6

En effet, les fractions F2 et F3 se caractérisent par 10 résidus de mannose, 4 résidus de galactose, 1 résidu de glucose et 6 à 8 résidus de glucosamine. Peut être peut-on souligné une moindre quantité de glucosamine en F3. Par contre, la fraction F4 est différente des précédentes puisque l'on peut noter une sensible augmentation en résidus de mannose (13 à 14) et parallèlement une diminution nette de la teneur en galactose (3 résidus) et en glucosamine (5 résidus).

Ainsi, ces variations dans la composition glucidique, reflet d'une hétérogénéité possible de la copule glycanique ou encore d'une différence structurale pourraient expliquer le comportement de l'AVS sur la colonne d'affinité. Mais d'autres hypothèses peuvent aussi être soulevées : variabilité de la présentation du ou des glycannes en surface moléculaire, notion de polymérisation de l'antigène variable, biosynthèse incomplète...

#### b - Forme membranaire

La préparation antigénique membranaire (protocole  $ZnCl_2$ ) a été étudiée quant à son comportement sur la colonne d'affinité selon le protocole.

Aucune élution d'antigène n'a pu être obtenue de la colonne, ce qui souligne la possibilité dans le cas des formes membranaires d'une adsorption non spécifique sans rapport avec la copule glycanique de l'AVS.

### 2) Hétérogénéité de taille moléculaire des antigènes variables

La taille moléculaire des antigènes a été étudiée par électrophorèse et par chromatographie de gel filtration. Des conditions dénaturantes ou non dénaturantes (présence ou absence de détergent) ont été retenues.

#### a) Comportement moléculaire en présence de SDS

##### \* Electrophorèse

Les électrophorèses ont été réalisées en gel de polyacrylamide selon la méthode de LAEMLI (1970)(106), respectivement en l'absence et en présence d'un agent réducteur.

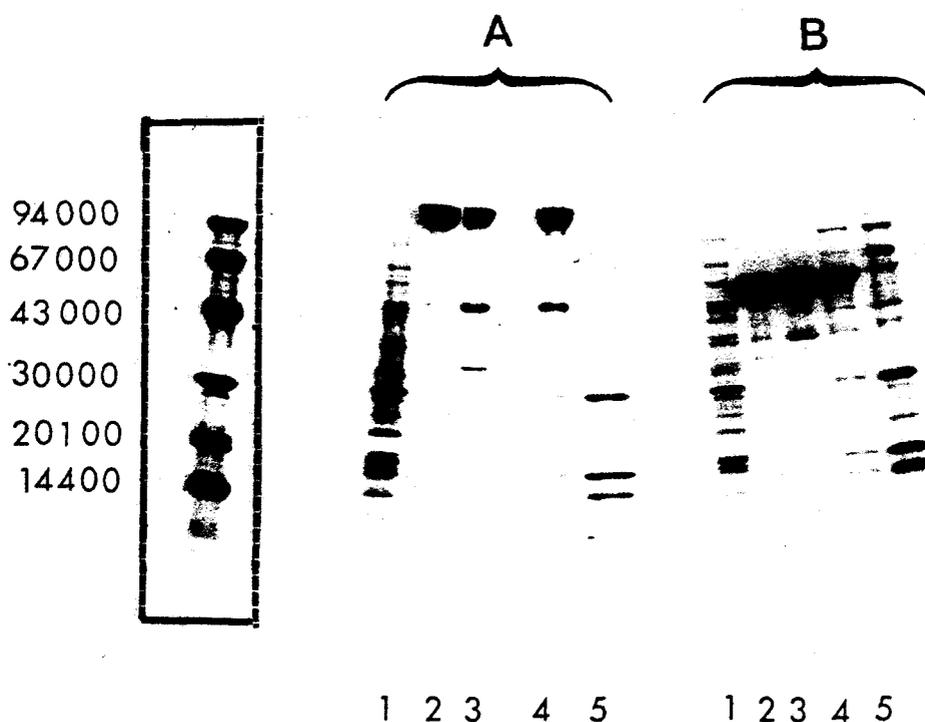
#### α) Forme soluble

L'analyse électrophorétique des fractions purifiées de la forme soluble est illustrée sur la figure 22.

En l'absence de traitement préalable des échantillons par le  $\beta$ -mercaptoéthanol, la fraction F1, non retenue sur la colonne d'affinité, présente une grande diversité de bandes affines pour le bleu Coomassie et dont la taille moléculaire s'étend de 67 000 à 14 400 daltons. Cette fraction représente les antigènes communs.

Profil électrophorétique des fractions antigéniques purifiées  
sur colonne de Concanavaleine A-Sépharose,

gel de polyacrylamide 5-30% respectivement en l'absence (A)  
et en présence (B) de  $\beta$ -mercaptoéthanol



Fractions éluées par le tampon d'équilibre (1) puis par le même tampon enrichi en :

-(2)- méthyl- $\alpha$ -D-mannoside à 10%

-(3)- méthyl- $\alpha$ -D-mannoside à 10% +  $\beta$ -mercaptoéthanol à 1%

-(4)- méthyl- $\alpha$ -D-mannoside à 10% +  $\beta$ -mercaptoéthanol à 1% + SDS à 0,1%

-(5)- agitation du gel 24 h à 37°C dans le tampon 4

A - Tampon de dissolution des échantillons : Tris-HCl 0,0625M, SDS 2%, glycérol 10%, pH 6.8

B - Tampon de dissolution des échantillons : Tris-HCl 0,0625 M, SDS 2%, glycérol 10%,  
 $\beta$ -mercaptoéthanol 5%, pH 6.8.

Figure 22

La fraction F2, obtenue par élution en présence de méthyl- $\alpha$ -D-mannoside à 10%, est essentiellement représentée par une bande de taille moléculaire apparente voisine de 120 000.

Les fractions F3 et F4, obtenues après élution de la colonne d'affinité par le tampon enrichi successivement en méthyl- $\alpha$ -D-mannoside,  $\beta$ -mercaptoéthanol et SDS, contiennent encore essentiellement la bande 120 000 avec une bande 60 000 non négligeable. Une intégration densitométrique des profils a été réalisée [figure 23]. Elle fait apparaître une proportion croissante de monomère 60 000 de la fraction F2 à la fraction F4, si l'on admet pour la forme monomère et la forme dimère une affinité tinctoriale identique vis à vis du bleu Coomassie.

Lorsque ces fractions subissent, préalablement à la migration électrophorétique, un traitement par le réducteur  $\beta$ -mercaptoéthanol, elles se présentent toutes sous la forme d'une bande homogène de taille moléculaire apparente voisine de 60 000 (Figure 22 B).

Au total, cette étude électrophorétique, avant et après réduction des échantillons, montre que les fractions F2, F3 et F4 se présentent essentiellement sous forme d'un dimère sensible à un agent réducteur et dont la structure impliquerait vraisemblablement un pont disulfure inter-antigène. L'existence d'un tel dimère par pont interchaîne a été signalée par CROSS dès 1977( 35) pour l'espèce T.evansi.

### $\beta$ ) Formes membranaires

Nous avons décrit précédemment les deux protocoles que nous avons appliqués pour la préparation de l'antigène variable sous "forme membranaire". Rappelons que l'une de ces préparations est obtenue par lyse parasitaire en présence d'acide p-chloromercurisulfonique (pCMPSA), inhibiteur des sulfhydrylprotéases et de la phospholipase endogène spécifique de l'antigène et l'autre en présence de chlorure de zinc, inhibiteur spécifique de phospholipase C endogène.

Les deux types de préparation de forme membranaire ont été analysés conjointement en gel de polyacrylamide en présence de SDS.

L'étude électrophorétique [figure 24] a été réalisée comparativement en l'absence et en présence d'agent réducteur. La forme membranaire obtenue à l'aide du pCMPSA se présente en l'absence de  $\beta$ -mercaptoéthanol sous forme d'une seule bande de taille moléculaire apparente 120 000. Après réduction par le  $\beta$ -mercaptoéthanol, on retrouve une bande dont la taille moléculaire est voisine de 60 000, mais de migration légèrement plus faible par rapport à celle de la forme soluble monomérique.

La forme membranaire obtenue avec le chlorure de zinc présente, en l'absence de  $\beta$ -mercaptoéthanol, deux bandes dont les tailles moléculaires sont très proches de 120 000.

Distribution relative des bandes de taille moléculaire 120 000 et 60 000  
dans les fractions F2, F3 et F4

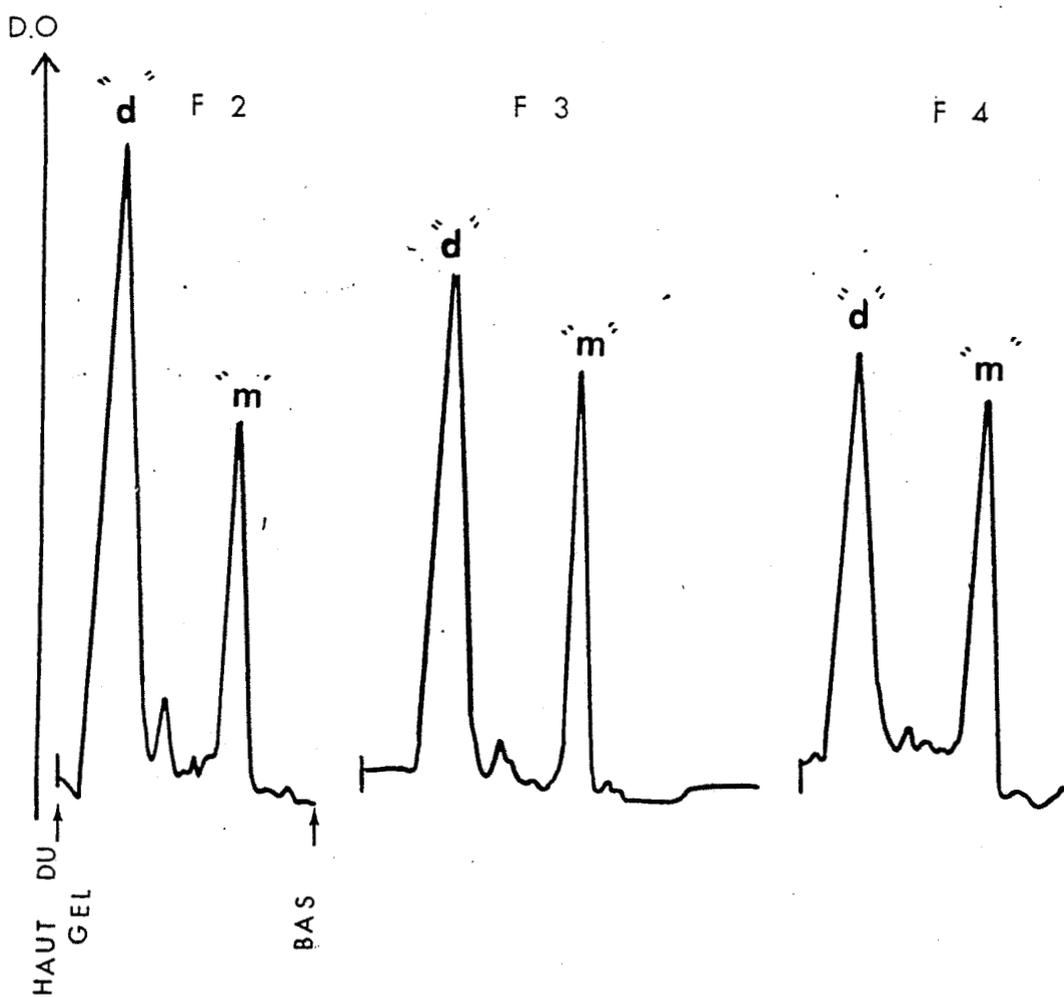
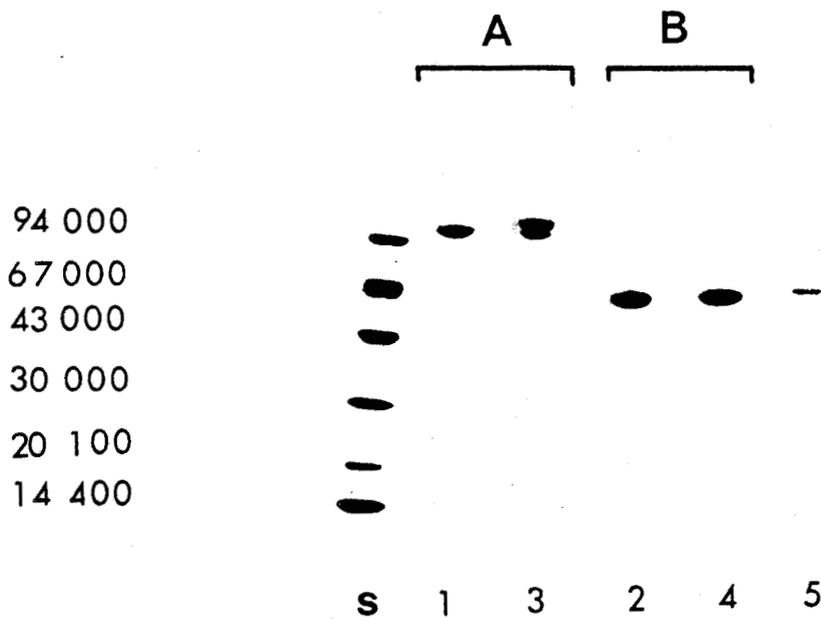


Figure 23

Profil électrophorétique des fractions  
antigéniques membranaires

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



S : Standard de poids moléculaire

1-2 : échantillons obtenus par lyse parasitaire en présence de pCMPSA 5 mM

3-4 : échantillons obtenus par lyse parasitaire en présence de ZnCl<sub>2</sub> 5mM

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%,  
 $\beta$ -mercaptoéthanol 5% pH6,8

5- Forme soluble

Figure 24

Un traitement préalable par le  $\beta$ -mercaptoéthanol génère une seule bande de taille moléculaire voisine de 60 000 [figure 24] et dont le comportement est tout à fait comparable à la bande monomère de la forme membranaire pCMPSA.

Pour le doublet "120 000" observée avec le protocole  $ZnCl_2$ , la bande de taille moléculaire apparente la plus faible possède une migration identique à celle obtenue lors du protocole pCMPSA.

Afin d'éliminer tout processus artéfactuel du chlorure de zinc dans la formation de la bande de taille moléculaire apparente supérieure, nous avons incubé préalablement à la migration électrophorétique d'une part la forme pCMPSA en présence de  $ZnCl_2$  5mM et d'autre part, la forme zinc en présence de pCMPSA 5mM [figure 25]. Ce contrôle expérimental ne fait apparaître aucune modification de l'une ou l'autre des 2 bandes 120 000.

Il semble donc que cette hétérogénéité observée spécifiquement pour la forme membranaire chlorure de zinc ne résulte pas d'un artéfact mais plutôt du mode d'action propre du sel utilisé lors du processus de libération de l'antigène et retenons que les différentes formes membranaires obtenues selon l'un ou l'autre protocole se présentent, tout comme la forme "soluble", selon un dimère sensible aux agents réducteurs.

#### \* Chromatographie de gel filtration

##### $\alpha$ ) Forme soluble

Le comportement de l'antigène en gel filtration a été analysé en chromatographie liquide de haute performance sur une colonne TSK SW G 4000 équilibrée en tampon phosphate de sodium 0,1M de pH 7,0 contenant 0,1% de SDS.

Les chromatogrammes des fractions F2, F3 et F4 sont représentées sur la figure 26 :

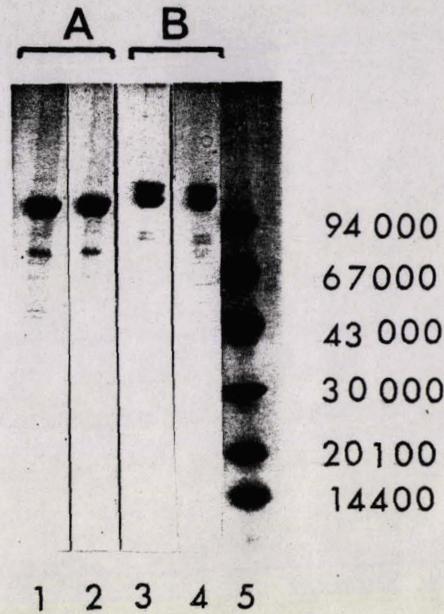
- la fraction F2 est essentiellement représentée par un pic dont le temps de rétention correspond à un dimère avec, en quantité plus faible, des pics caractéristiques de formes plus hautement polymérisées.
- la fraction F3 se distingue de la fraction précédente (F2) par la présence d'un pic supplémentaire dont le temps d'éluion est celui d'un monomère.
- la fraction F4 présente un pic majeur représentant une forme dimère. Elle se distingue néanmoins de la fraction F3 par une proportion très importante de formes hautement polymérisées et l'apparition d'éléments de faible taille ou très retardés.

##### $\beta$ ) Formes membranaires

Analysées dans les mêmes conditions chromatographiques, les formes membranaires obtenues selon les deux protocoles précédemment décrits n'ont pu être éluées de la colonne. Cet échec technique peut être expliqué soit par un problème de solubilité de la fraction dans

Profil électrophorétique comparé des formes antigéniques membranaires

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



échantillons obtenus par lyse parasitaire :

A - en présence de pCMPSA 5mM

B - en présence de  $ZnCl_2$  5mM

1-3 : échantillon natif

2- échantillon préincubé en présence de  $ZnCl_2$  5mM

4- échantillon préincubé en présence de pCMPSA 5 mM

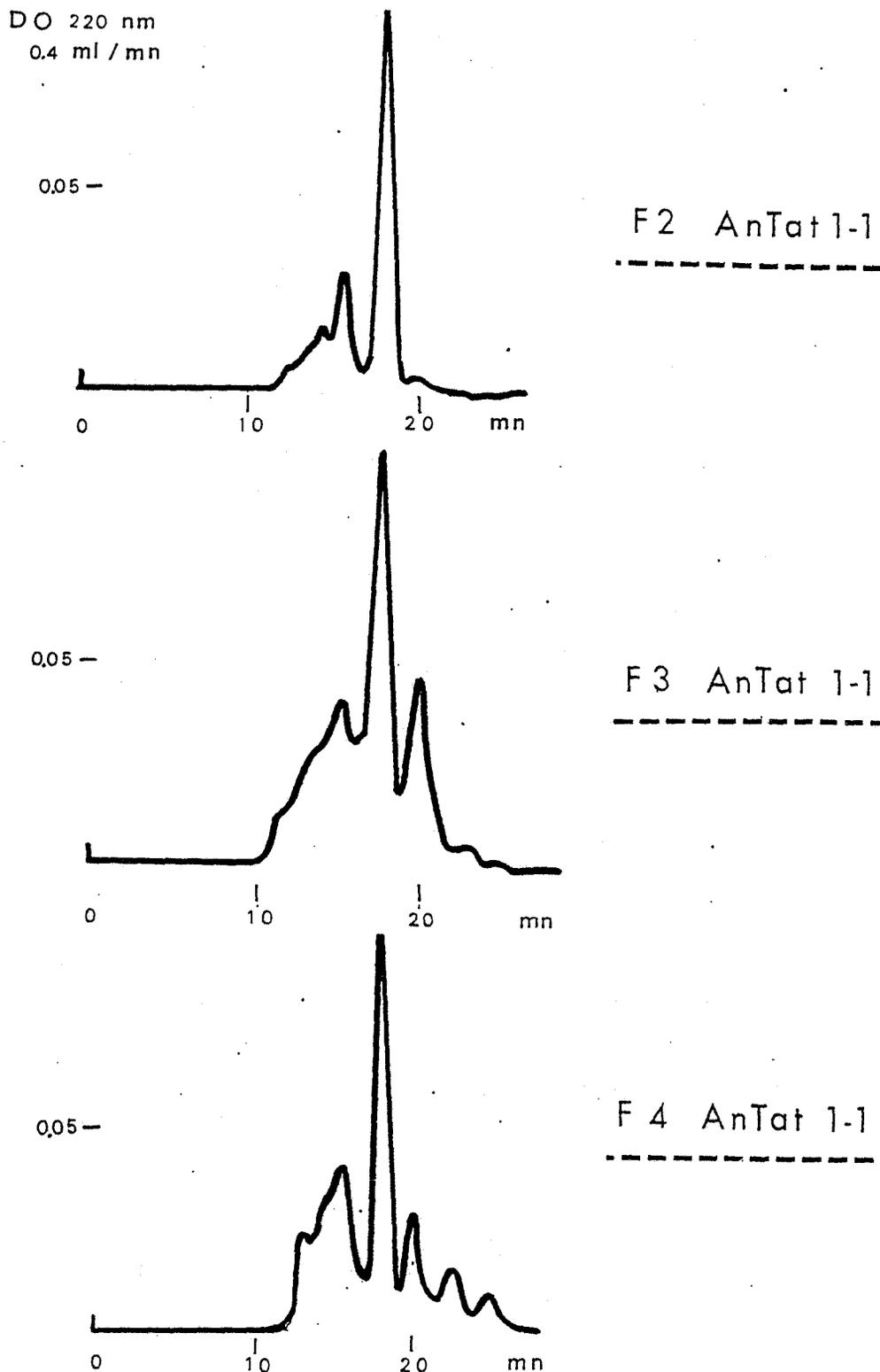
5 - standard de poids moleculaire

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

Figure 25

Chromatographie liquide haute performance de gel perméation

(colonne Beckman TSK SW G 4000)



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

Figure 26

le tampon d'équilibre de la colonne et soit surtout par une rétention aspécifique en fonction de leur composante lipidique.

Ainsi, ces différentes approches électrophorétiques et chromatographiques montrent sans ambiguïté une hétérogénéité de taille moléculaire de l'antigène soluble qui peut exister sous forme monomère ou dimère la forme monomère apparaissant en proportion différente selon les fractions d'antigène éluées de la Concanavoline A-Sépharose.

### b) Comportement moléculaire en l'absence de SDS

En l'absence de SDS, l'antigène migre difficilement en électrophorèse et les résultats sont difficiles à interpréter. Nous n'évoquerons uniquement que les résultats obtenus en chromatographie liquide de haute performance. La figure 27 illustre les chromatogrammes des fractions F2, F3 et F4.

L'étude des profils montrent que dans ces conditions, toutes les fractions se caractérisent par un pic majeur représentant une forme dimère avec pour la fraction F2 l'existence de formes hautement polymérisées, leur présence diminuant de F2 à F4. On pourrait s'interroger sur cette observation et évoquer la non-élution de très hauts polymères en F3 et/ou en F4.

Ce point demandera à être rediscuté en fonction des résultats obtenus sur colonne en phase inverse avec les mêmes préparations antigéniques, la colonne assurant une séparation en fonction d'un seul rapport hydrophilie/hydrophobie qui ne tient pas compte de la taille moléculaire.

### 3) Hétérogénéité moléculaire liée à l'hydrophilie relative des antigènes variables

Une étude de l'hétérogénéité moléculaire selon les critères d'hydrophobie/hydrophilie relative a été réalisée par chromatographie liquide de haute performance en phase inverse.

Cette partie de notre travail a fait l'objet d'une publication que nous insérons dans ce mémoire.

Le résultat essentiel obtenu a été de démontrer que la fraction F2 est retrouvée polydispersée en 9 sous-fractions sur colonne RPSC. Ces sous-fractions sont très nettement réparties en deux groupes : sous-fractions 1 et 2 d'une part, sous-fractions 3 à 9 d'autre part (figure 1 de l'article).

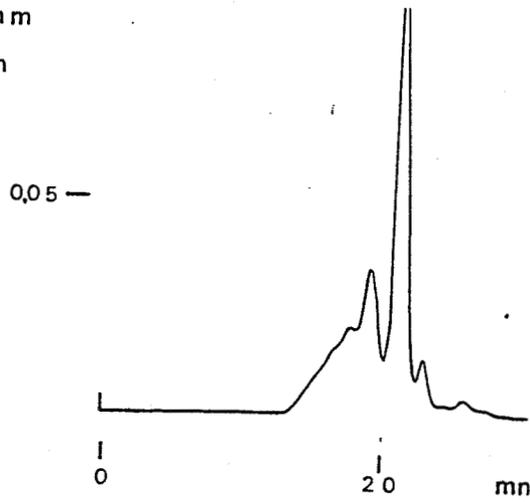
Ce comportement chromatographique ne peut être considéré comme artificiel. Nous avons en effet vérifié que les résultats étaient tout à fait comparables sur une préparation directement obtenue après élution sur Concanavoline A-Sépharose ou sur la même préparation après dialyse ou enfin sur la même préparation dialysée et lyophilisée.

Les sous-fractions en électrophorèse - SDS en présence d'agent réducteur se

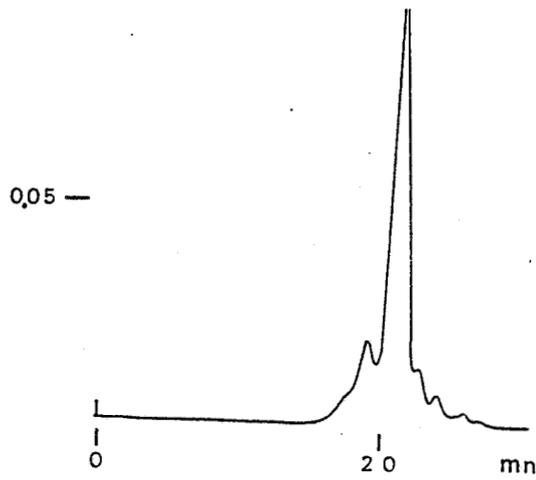
Chromatographie liquide haute performance de gel perméation

(colonne Beckman TSK SW G4000)

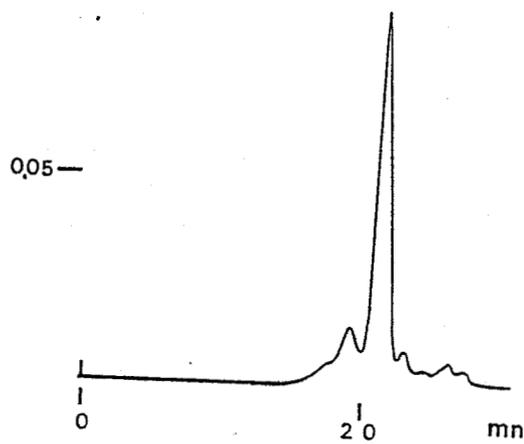
DO 220nm  
0.4 ml/mn



F 2 AnTat 1-1



F 3 AnTat 1-1



F 4 AnTat 1-1

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

Figure 27

HETEROGENEITY IN HIGH PERFORMANCE LIQUID  
CHROMATOGRAPHY OF A VARIANT SURFACE GLYCOPROTEIN  
OF TRYPANOSOMA BRUCEI<sup>1</sup>

Daniel TETAERT, Véronique GOMES, Guillemette HUET-DUVILLIER

Dominique DEMEYER, Marylène HUBLART, Arnold BOERSMA and Pierre DEGAND\*  
Unité INSERM, N°16 Place de Verdun, 59045 LILLE CEDEX (France)

Received March 2, 1987

---

High performance liquid chromatography (HPLC) procedures have been used to analyze a preparation of the variant surface glycoprotein AnTat 1.1A of Trypanosoma brucei. The native preparation gives several peaks with a high reproducibility both by reverse-phase (RP-) and gel permeation (GP-) HPLC. Under RP-HPLC conditions, nine fractions are fully resolved. The RP-HPLC fractions migrate with the same molecular weight VSG band on polyacrylamide slab gel electrophoresis and no significant differences are observed in amino acid composition among these fractions. The RP-HPLC resolution is found to be related to the ability of the VSG to polymerize as shown using GP-HPLC. These results suggest the existence of a microheterogeneity of the AnTat 1.1A VSG preparation in relation to post-translational modification of the VSG molecule. © 1987 Academic Press, Inc.

---

The parasitic protozoan Trypanosoma brucei evades the mammalian host immune system by antigenic variation. The molecular basis of antigenic variation is the sequential expression of separate genes, encoding immunologically distinct variant surface glycoproteins (VSG) which form a dense coat covering the entire surface of the parasite (1,2). Two forms have been characterized: the membrane form VSG (mf VSG) and the soluble form (sVSG) (3). The mf VSG contains fatty acids which are released as diglyceride at the time of the conversion to sVSG (4). The release of the sVSG, which occurs spontaneously during the cell disruption, is due to the action of an endogeneous enzyme (3).

Several methods have been described for purification of VSG: lectin chromatography (5), immunoaffinity chromatography (6), reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) (7). Particularly, the procedure of RP-HPLC on C<sub>3</sub> column has proven to be fast for VSG purification. Further-

---

\* To whom correspondence should be sent.

Abbreviations: VSG, variant surface glycoprotein; sVSG, soluble form VSG; mf VSG, membrane form VSG; AnTat, Antwerpen Trypanozoon-antigenic-type; RP-HPLC, reverse phase high performance liquid chromatography; GP-HPLC, gel permeation high performance liquid chromatography; TFA, trifluoroacetic acid. SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis.

<sup>1</sup>This work was supported by grants from the Commission of the European Communities (TSD-146-F (MR)), the U.E.R. de Médecine, Université de Lille II and the Fondation pour la Recherche Médicale Française.

more, VSG is obtained in high yield and purity, in the absence of detectable proteolysis.

In the present work, the combination of RP-HPLC and gel permeation HPLC (GP-HPLC) has been developed to investigate the chromatographic behaviour of the AnTat 1.1A VSG purified according to the conditions of Baltz et al (5).

#### MATERIAL AND METHODS

Growth and isolation of the bloodstream forms of Trypanosoma brucei brucei AnTat 1.1A and purification by Concanavalin A-Sepharose affinity chromatography were essentially as described previously (8).

HPLC methods were developed using Varian 5000 and Waters 660 systems. For RP-HPLC, a Beckman RPSC-Ultrapore C<sub>3</sub> (300 Å pore size, 4.6 x 75 mm) column was used. Eluates were detected with an UV absorbance detector LKB 2238 Uvicord S II and measurements were made at 206 nm in the sensitivity of 0.2 absorption unit full scale. The samples (100-150 µg) were introduced into RP-HPLC column and eluted at a flow rate of 1 ml/min. The following gradient systems were employed:

- (i) conditions described according to Clarke et al (7) : 0.0013 M TFA in water (solvent A) to 60 % 2-propanol (solvent B) ; 0-30%B, 10 min ; 30%B, 5 min ; 30-45%B, 40 min ; 45%B, 10 min ; 45-100%B, 10 min,
- (ii) in the same gradient elution conditions, but the solvent B is replaced by 1-propanol ;
- (iii) ammonium formate in water (solvent C) as described by Grandier-Vazeille and Tetaert (9) to 60 % 1-propanol (solvent D) : 33%D, 10 min ; 33-45%D, 40 min ; 45%D, 10 min ; 45 -100%D, 10 min.

The buffers were RS for HPLC (Farmitalia Carlo Erba) and were filtered through a 0.22 µm Millipore membrane, before the use.

For GP-HPLC, a LKB G 4000 TSK SW column (75 x 600 mm) was used. The samples (20 µg) were eluted with 0.1 M phosphate buffer pH 7.0 containing 0.1 % SDS at a flow rate of 0.7 ml/min and the effluent was monitored at 220 nm (LDC Spectro Monitor III model 1204 A). The separation characteristics of GP-HPLC was determined with marker proteins : thyroglobulin (670 K) ; ferritin (440 K) ; catalase (232 K) ; lactate dehydrogenase (140 K) ; bovine serum albumin (67 K) and ovalbumin (44 K).

Analytical methods, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) with samples previously reduced in presence of 2-mercaptoethanol followed by western blotting using rabbit serum anti VSG AnTat 1.1A and amino acid compositions were performed as previously described (8).

#### RESULTS

##### Reverse phase HPLC (RP-HPLC)

The procedure of Clarke et al (7) was used with slight modifications for better resolution of the VSG preparation. Nine fractions are isolated (Fig. 1). The elution profile indicated two clusters of fractions respectively 1-2 and 3-9. This profile was faithfully obtained whatever the VSG preparation applied onto the column, and also with VSG preparations directly obtained from Concanavalin A column ("native" form) as well as dialyzed and/or lyophilized.

Several experiments advised us in the choice of our elution conditions.

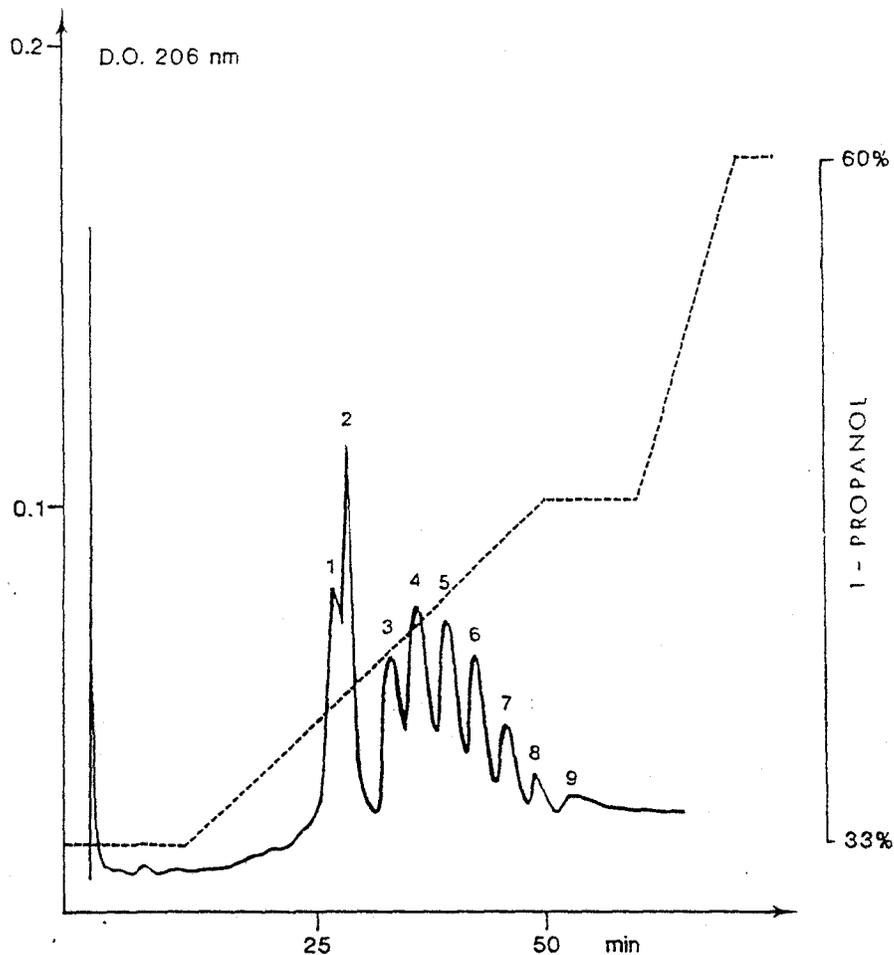


Figure 1 . Profile of AnTat 1.1 A VSG preparation on RP-HPLC  $C_{18}$  column using 33 to 60 % ammonium formate-1-propanol gradient system (solvent C and D).

Firstly, using TFA and 2-propanol, we only obtained a major peak with shoulders. The replacement of 2-propanol by 1-propanol (more apolar solvent) enabled better resolution : three peaks and shoulders were detected. Nevertheless, no reproducibility was obtained because of VSG is degraded in the 0.0013 M TFA solution. This observation led us to use the neutral counterion, ammonium formate : the AnTat 1.1A VSG was resolved into nine peaks with a similar gradient system (Fig. 1).

The different RP-HPLC fractions (1-9) were analyzed by SDS-PAGE, under reducing conditions. Each fraction showed a single band with an apparent molecular weight of 60 K as determined by comparison with standards of known protein molecular weight. However, in the absence of reducing agent the sVSG AnTat 1.1A gave a band with an apparent molecular weight of 120 K, suggesting the existence of a dimer with a disulfide bridge linkage (manuscript in preparation).

The western blots were also fairly similar for the different RP-HPLC fractions. In addition to the 60 K band, higher molecular weight components

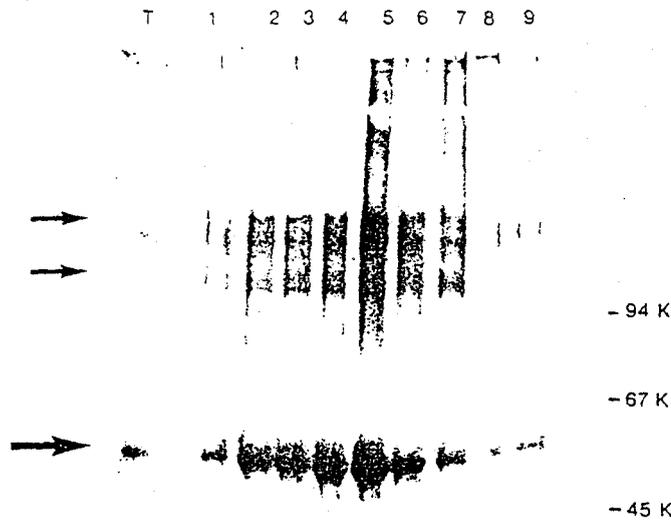


Figure 2 . Western blotting with rabbit antiserum anti AnTat 1.1 A VSG of the different RP-HPLC fractions 1 to 9 obtained from the VSG preparation (T). Scale indicating molecular weights, has been determined by Coomassie blue staining of reference proteins. Arrows indicate position at which VSG typically appears (◀) and the high polymerized forms (▶).

slightly immunoreacted with the antiserum anti-VSG AnTat 1.1A indicating the existence of VSG-polymers (Fig. 2).

The results of amino acid composition revealed the presence of ethanolamine, characteristic for VSG, in each RP-HPLC fraction and only very small difference could be really found among the fractions with a careful examination of the glucosamine content.

#### Gel permeation HPLC (GP-HPLC)

The calibration of the GP-HPLC column was performed using protein markers of molecular weight between 670 K and 44 K. In our conditions, the native VSG was characterized by a major peak (M.W. 120 K) and by three minor peaks corresponding to higher molecular sizes (240 K ; 480 K and M.W. above 700 K). These molecular weight components compared to the apparent M.W. of monomer (60 K by SDS-PAGE) indicated the existence of different polymers : dimer, in large amount (d) ; tetramer (c) ; octamer (b) and higher polymer (a) (Fig. 3A).

We have checked that the presence of high polymers rather than dimer was not potential source of artifacts from purification procedure, because the VSG released from intact trypanosomes, with the pH 5.5 buffer, was directly applied onto the GP-HPLC column and the high polymers were formerly present.

Therefore, the main RP-HPLC fractions (1 to 7) were analyzed in GP-HPLC system (Fig. 3B). The chromatograms evidenced significant variations in the VSG-polymer repartition. Table I gave the relative amount of the different

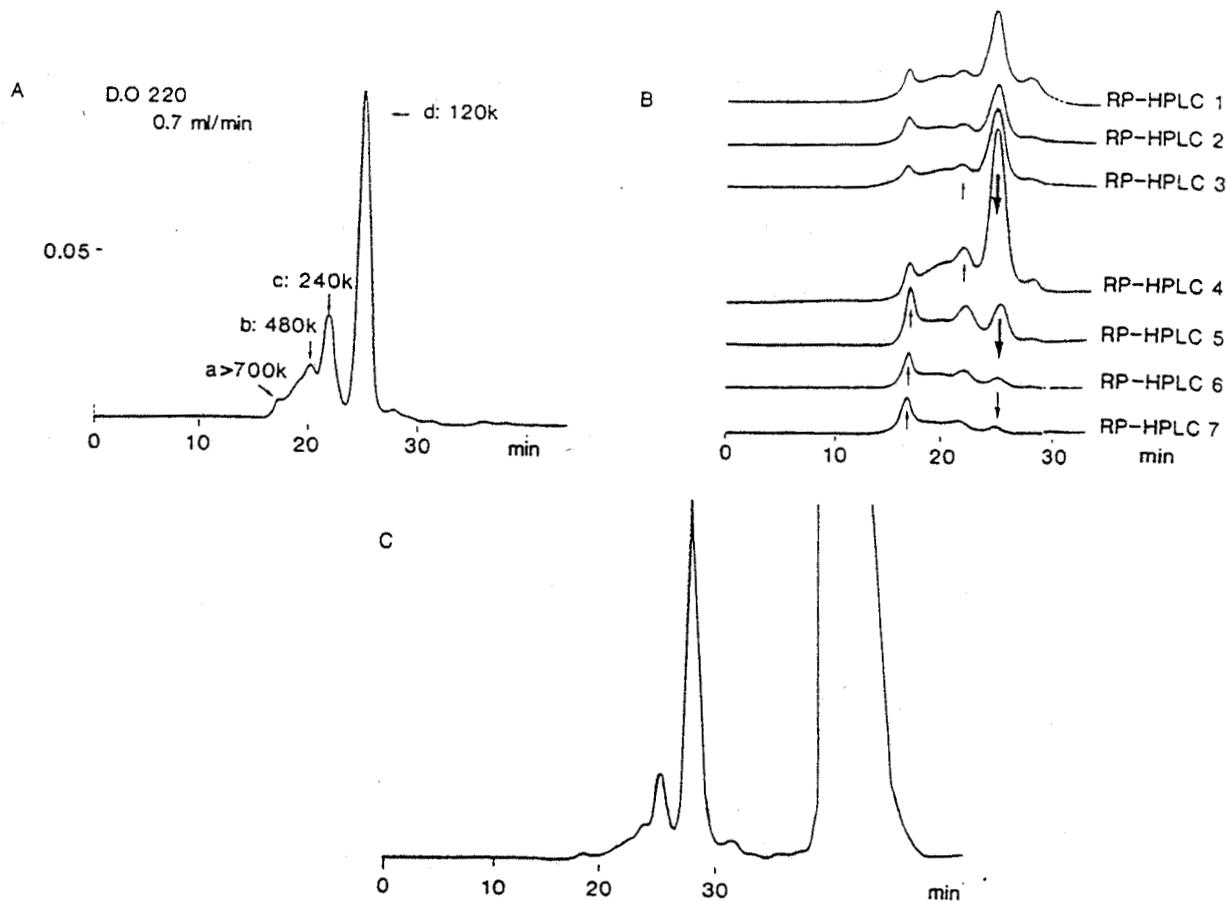


Figure 3 . GP-HPLC on G-4000 TSK column profiles of the AnTat.1.1 A VSG :  
 (A) "native" VSG ; (B) VSG reduced by 2-mercaptoethanol ; (C) the  
 different RP-HPLC fractions (1 to 7).

TABLE I  
 Percentage of reverse HPLC fractions (1-7) distributed in gel  
 permeation chromatography (a, b, c, d,)

	1	2	3	4	5	6	7
a	16 ± 3	21 ± 2	17 ± 2	13 ± 1	31 ± 5	44 ± 5	48 ± 5
b	11 ± 1	10 ± 2	10 ± 1	10 ± 1	15	16 ± 1	17 ± 1
c	16 ± 1	15 ± 1	15 ± 1	16 ± 2	23 ± 1	24 ± 3	21 ± 3
d	58 ± 4	53 ± 4	57 ± 1	60 ± 1	31 ± 6	19 ± 8	19 ± 8

oligomers (fractions a-d) for each RP-HPLC fraction. We observed that the percentage of VSG dimer was predominant in the fractions 1 to 4 whereas the high polymerized-forms were essentially found in fractions 5 to 7. The small amount of fractions 8 and 9 did not allow a quantification but the high polymerized sVSG-forms were still detected by GP-HPLC.

The GP-HPLC profile of a reduced VSG preparation was in agreement with the SDS-PAGE and western blotting results : essentially, a monomer VSG-form with 60 K M.W. was eluted from the column coming with slight amount of polymerized VSG-forms (Fig. 3C).

### DISCUSSION

There is good evidence from many laboratories that VSG from African trypanosomes shows biochemical diversity (1,10,13). Firstly, a charge microheterogeneity has been detected using isoelectric focusing for Trypanosoma equiperdum (12) and Trypanosoma congolense (13). It was also shown that a molecular polymorphism may result from various degree of glycosylation : MITat 1.7 VSG and ILTat 1.21 VSG produced multiple SDS-PAGE bands, which arise, on both antigens studied, from heterogeneity in the non-immunogenic carbohydrate whose addition is tunicamycin-sensitive (10). Furthermore, Presper and Heath (14) have reported that the mature VSG IaTat 1.2 may comprise a heterogeneous population of protein molecules containing one or two asparagine-linked oligosaccharide chains. As well as documented the hydrophobic nature of VSG can also cause the polymerization (8,11).

Our aim has been to examine the nature of a VSG preparation (AnTat 1.1A) obtained using Concanavalin A-Sepharose affinity chromatography. The combination of RP- and GP-HPLC has been quite useful because : (i) the integrity of the VSG remains unaltered by RP-HPLC ; (ii) the molecular weights are measured with high resolution by GP-HPLC and ; (iii) a small amount of sample is required in the two methods.

Nine VSG fractions were identified according to different hydrophobic properties and it has been shown that the hydrophobic behaviour of the VSG is related to the degree of polymerization in our GP-HPLC conditions. The western blotting affords to gain in sensitivity compared to the SDS-PAGE analyzes and confirms the results which are discerned by GP-HPLC : existence of high-polymerized VSG forms.

Heterogeneity and polymerization properties of VSG may be useful in understanding the organization of the trypanosome surface coat. At present, the precise identity of the various VSG components remains to be established. We can suggest an heterogeneity of the oligosaccharides chains which could be involved in the formation of polymers. The hydrophobic interactions could

presumably influence the polymerization (8). These different aspects are currently under investigation.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Doctor T. Vervoort for the preparation of anti Antat 1.1A VSG antiserum. We thank Dr L. Mendonça Previato for helpful comments and critical reading of the manuscript.

#### REFERENCES

1. Cross, G.A.M. (1984) *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 307, 3-12.
2. Turner, M.J. (1985) *British Medical Bulletin* 41, 137-143.
3. Cardoso de Almeida, M.L. and Turner, M.J. (1983) *Nature* 302, 349-352.
4. Ferguson, M.A.J., Haldar, K. and Cross, G.A.M. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 4963-4968.
5. Baltz, T., Baltz, D. and Pautrizel, R. (1976) *Ann. Immunol. (Institut Pasteur)* 127C, 761-774.
6. Pearson, T.W. and Anderson, N.L. (1980) *Anal. Biochem.* 142, 360-368.
7. Clarke, M.W., Olafson, R.W. and Pearson, T.W. (1985) *Mol. Biochem. Parasitol.* 17, 19-34.
8. Gomès, V., Huet-Duvillier, G., Aubert, J.P., Dirat, J., Tetaert, D., Moncany, M.L.J., Richet, C., Vervoort, T., Pays, E. and Degand, P. (1986) *Arch. Biochem. Biophys.* 249, 427-436.
9. Grandier-Vazeille, X. and Tetaert, D. (1984) *J. of Chromatogr.* 296, 301-308.
10. McConnel, J., Turner, M.J. and Rovis, L. (1983) *Mol. Biochem. Parasitol.* 8, 119-135.
11. Auffret, C.A. and Turner, M.J. (1981) *Biochem. J.* 193, 643-650.
12. Duvillier, G., Aubert, J.P., Baltz, T., Richet, C. and Degand, P. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 110, 491-498.
13. Onedera, M., Rosen, N.L., Lifter, J., Hotez, P.J., Boguki, M.S., Davis, G., Patton, C.L., Konigsberg, W.H. and Richards, F.F. (1981) *Exp. Parasitol.* 52, 427-439.
14. Presper, K.A. and Heath, E.C. (1986) *Arch. Biochem. Biophys.* 246, 460-468.

comportent toutes de la même manière, à savoir une bande de taille moléculaire voisine de 60 000. Leurs compositions en acides aminés ne sont pas significativement différentes par rapport à la composition du matériel avant sous-fractionnement.

Les sous-fractions 1 à 7, obtenues en quantité suffisante, ont été ensuite analysées en chromatographie HPLC de gel filtration en présence de SDS à 0,1%. Les résultats obtenus, illustrés sur la figure 3 B de l'article, ont permis la mise en évidence d'un degré de polymérisation croissant, fonction du caractère hydrophobe des sous-fractions.

En effet, les formes représentatives de dimères (d) diminuent progressivement des fractions 1 à 7 au profit de formes plus hautement polymérisées et plus hydrophobes [Table I de l'article].

Cette hétérogénéité de la fraction F2 observée par chromatographie HPLC en phase inverse pourrait s'expliquer par une hétérogénéité des chaînes oligosaccharidiques impliquées dans la formation des polymères, les faibles rendements ne nous ayant pas permis de confirmer cette hypothèse par la réalisation de composition en sucres de chaque sous-fraction.

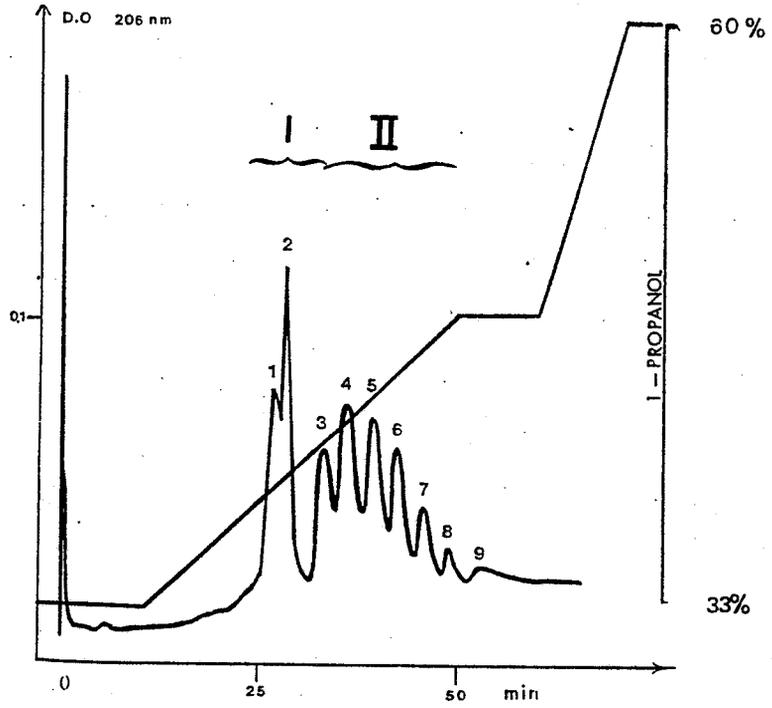
L'étude de la fraction F3 du variant AnTat 1.1 a été réalisée selon les mêmes conditions expérimentales que la fraction F2. En plus des 9 sous-fractions précédentes, le profil d'éluion révèle un pic supplémentaire dans le front d'éluion du premier massif [figure 28]. Ce pic rapidement élué, donc le plus hydrophile, pourrait représenter la forme monomère de l'AVS, dont la présence dans la fraction F3 a déjà été évoquée lors des études électrophorétiques ou chromatographiques de gel filtration par HPLC. Ainsi, F3 apparaît-elle plus hydrophile que F2, cette tendance s'affirme encore dans le rapport groupe 1/ groupe 2 des sous-fractions (figure 28).

La fraction F4 n'a pas pu être étudiée dans ce système chromatographique en raison de la présence de SDS résiduel après dialyse, l'utilisation de ce détergent étant incompatible avec la colonne en phase inverse.

Parallèlement à cette étude de la forme soluble, nous avons tenté de chromatographier les deux préparations de forme membranaire. Dans les conditions d'éluion décrites, aucune des deux formes n'a pu être élue. Cet échec en HPLC pourrait s'expliquer par une rétention irréversible du matériel, fonction de la présence d'une structure glycophospholipidique C-terminale.

Profils d'élution comparés des fractions  
F2 et F3 en RP-HPLC

F 2



F 3

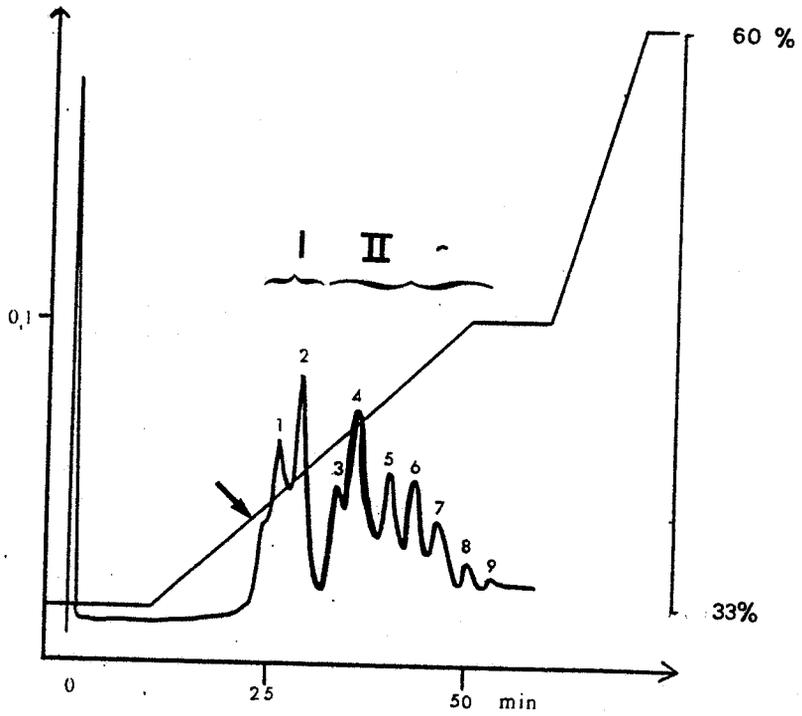


Figure 28

Au total, cette étude en chromatographie HPLC en phase inverse a montré le rôle de l'organisation polymérique de l'antigène dans son comportement, et de l'ensemble de ces études électrophorétiques et chromatographiques, il résulte et s'impose la notion d'une grande diversité d'agencement de l'antigène, monomérique après réduction mais dimérique ou polymérique à l'état natif. Cette observation peut sans conteste représenter un élément d'explication de l'hétérogénéité de l'antigène sur Concanavaleine A-Sépharose et partant de ces conditions très particulières d'élution.

On note enfin la difficulté de manipulation de la ou des formes membranaires qui elles aussi sont retrouvées sous forme dimère parfois multiples ( $ZnCl_2$ ) et dont pour l'instant, il n'est pas possible d'établir les éléments de leur organisation.

Ces résultats affirment les diversités possibles d'agencement au sein du manteau de surface des trypanosomes, l'hétérogénéité ici mise en évidence pouvant représenter une hétérogénéité à l'échelon cellulaire ou à l'échelon de la population parasitaire.

Ces faits sont d'une importance très grande si l'on veut préciser la microphysiologie de surface du parasite et son rôle dans l'interface hôte-parasite.

### **III - Etude biochimique comparative des formes solubles et membranaires**

Nous avons vu précédemment que l'antigène variable peut être obtenu, en fonction des conditions de libération, sous une forme dite "soluble" et sous une forme dite "membranaire".

L'étude électrophorétique nous ayant confirmé la pureté des préparations, nous avons envisagé une étude biochimique comparative des deux formes sur le plan de leur composition amino-acide, de leur composition glucidique, de leur teneur en phosphore et en acides gras.

#### **1 - Composition amino-acide**

Pour la détermination de la composition amino-acide, les échantillons ont été hydrolysés et analysés selon les conditions décrites dans l'appendice technique.

Les compositions amino-acides des fractions antigéniques solubles (F2, F3, F4) et membranaires (mf pCMPSA, mf  $ZnCl_2$ ) sont présentées dans le tableau 7. Les résultats sont exprimés en nombre de résidus pour 100 résidus dosés. La composition amino-acide de la fraction F2 révèle une prédominance de résidus d'acide aspartique et/ou asparagine, de thréonine, d'acide glutamique et/ou glutamine, d'alanine et de lysine. Les compositions des fractions F3 et F4 ne montrent aucune différence significative dans la répartition quantitative des acides aminés majeurs. En ce qui concerne les formes membranaires, les mêmes remarques générales concernant l'axe peptidique s'appliquent et l'on peut retenir que leur composition est tout à fait comparable à celle des formes solubles.

Compositions amino-acide des formes solubles (F2,F3 et F4)  
et des formes membranaires de l'antigène variable (AnTat 1.1)

	Forme soluble			Forme membranaire	
	F 2	F 3	F 4	pCMPSA	ZnCl2
ASX	10,5	10,6	11,1	9,8	10,1
THR	8,9	9,0	8,7	7,7	8,6
SER	6,3	6,9	6,4	6,8	6,7
GLU	12,5	12,4	12,0	12,1	12,1
PRO	3,6	3,7	3,8	4,3	3,7
GLY	8,1	8,4	8,1	8,4	8,4
ALA	15,4	14,7	14,4	12,9	14,9
VAL	2,7	2,8	3,2	4,1	2,9
1/2 CYS	2,4	1,9	1,7	1,1	1,6
MET	0,6	0,7	0,9	-	-
ILE	3,4	3,4	3,8	3,8	3,5
LEU	8,5	8,4	8,8	8,8	8,2
TYR	2,3	2,2	2,3	2,6	2,2
PHE	1,5	1,5	1,9	2,6	1,9
LYS	9,3	9,3	8,5	8,1	8,9
HIS	1,9	1,9	1,9	1,8	1,8
TRP	ND	ND	ND	ND	ND
ARG	2,2	2,2	2,5	3,6	2,3

\* résultats exprimés en nombre de résidus pour 100 résidus dosés.

ND = non dosé

Tableau 7

## 2 - Composition glucidique

La composition glucidique des fractions antigéniques est illustrée dans le tableau 8.

Qualitativement, les compositions sont identiques, montrant la présence de mannose, de galactose, de glucose et de glucosamine. Quantitativement, on peut noter parmi les fractions solubles, une légère différence pour F4 par rapport à F2 et F3 : cette fraction s'individualise par une augmentation des résidus de mannose et une diminution relative de la teneur en galactose et en glucosamine.

On retrouve au niveau des formes membranaires les mêmes hexoses que pour les formes solubles. Le rapport mannose/galactose est de 2,1 pour la forme pCMP SA et de 2,08 pour la forme ZnCl<sub>2</sub>. Ces rapports sont très proches de ceux trouvés lors de l'étude des fractions solubles F2 et F3.

## 3 - Teneur en phosphore

La glycoprotéine de surface est insérée dans la membrane plasmique par l'intermédiaire d'une structure complexe dont a été démontré le caractère phosphorylé. Contrairement aux sites classiques de phosphorylation des axes peptidiques, le résidu de phosphore n'est pas lié à un résidu acide aminé mais est partie intégrante d'une structure complexe glycolipidique substituant l'acide aminé C-terminal [HOLDER (1983)a (88)].

Pour la mise en évidence et pour le dosage du phosphore, nous avons choisi une méthode déjà utilisée pour d'autres modèles en particulier *T. equiperdum*, [BALTZ et coll. (1982)(10)]. La quantification fait suite à une série de précipitations par l'acide trichloracétique suivie d'une étape de chauffage du précipité à 80°C pendant 20 minutes en milieu acide trichloracétique 1.2 N, les étapes de précipitation acide permettant d'éliminer toute contamination éventuelle de l'antigène dosé par du phosphore inorganique, l'étape de chauffage à 80°C permettant d'éliminer la présence éventuelle d'acides nucléiques.

L'estimation de phosphore a également été réalisé sur un précipité trichloracétique n'ayant pas subi l'étape de chauffage en milieu acide.

Quel que soit le prétraitement de l'échantillon, le phosphore est finalement dosé selon la technique colorimétrique préconisée par ITAYA et MICHIO (1966)(94).

Les résultats sont présentés dans le tableau 9 où l'on considère forme soluble et formes membranaires de l'antigène variable AnTat 1.1.

Composition glucidique des formes solubles (fractions F2, F3 et F4) :  
de l'antigène variable AnTat 1.1, T.b. brucei.

	Forme soluble		
	F2	F3	F4
Mannose	10,3	10,4	13,7
Galactose	3,8	4,3	2,9
Glucose	0,7	0,9	1,3
Glucosamine <sup>Δ</sup>	7,8	5,8	4,8

\* Résultats exprimés en nombre de résidus par mole de glycoprotéine

<sup>Δ</sup> dosage réalisé après hydrolyse HCl 5,6N ; 24 h à 110°C sur autoanalyseur d'acides aminés.

Tableau 8

**Teneur en phosphore de l'antigène variable AnTat 1.1 de la forme soluble (fractions F2, F3 et F4) après purification et des formes membranaires natives (pCMPSA et ZnCl<sub>2</sub>)**

Prétraitement de l'échantillon	Forme soluble			Formes membranaires	
	F2	F3	F4	pCMPSA	ZnCl <sub>2</sub>
Précipitation par l'acide trichloracétique et chauffage du précipité à 80°C pendant 20 minutes	1.2	1.2	1.1	7.0	7.3
Précipitation par l'acide trichloracétique	2.0	1.8	2.0	12	12

\* selon la méthode de ITAYA et MICHIO (1966)( 94).

\* résultats exprimés en nombre de mole de phosphore /mole d'AVS

Δ valeurs moyennées sur 4 dosages

**Tableau 9**

a - Forme soluble

Sur les formes solubles d'antigène variable, un ou deux résidus de phosphore peuvent être dosés. L'étape de chauffage en milieu acide semble à cet effet être déterminante :

\* Après précipitation par l'acide trichloracétique et chauffage du précipité en milieu acide à 80°C, un résidu de phosphore est en effet dosé dans les fractions F2, F3 et F4 .

\* En l'absence de l'étape de chauffage en milieu acide à 80°C, près de 2 moles de phosphore par mole d'antigène sont dosés sur ces mêmes fractions.

De ces résultats, l'on peut conclure que les fractions F2, F3 et F4 possèdent, à l'état natif, 2 résidus de phosphore dont l'un est acido-labile dans nos conditions expérimentales.

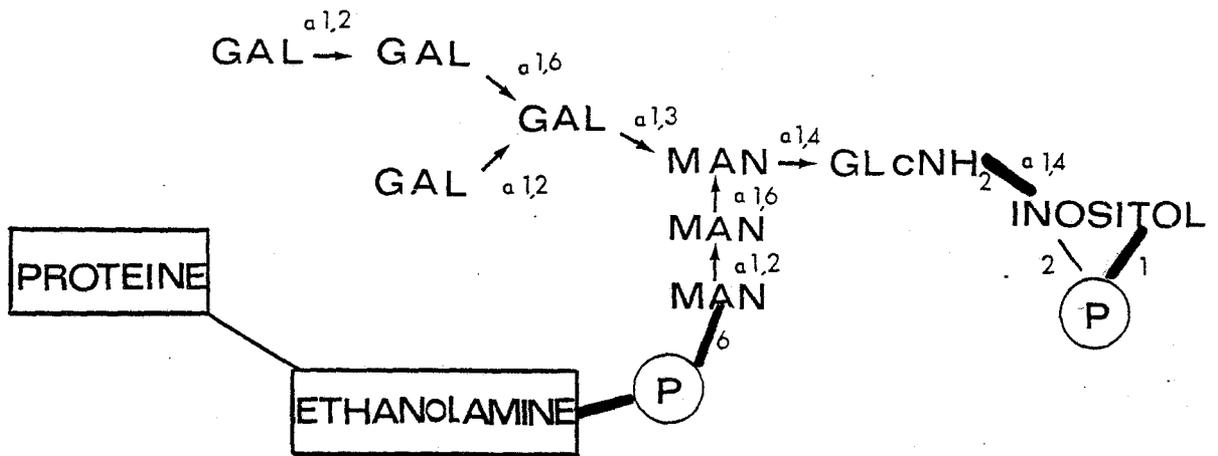
Il nous a paru intéressant de rapprocher ces résultats personnels de la structure C-terminale proposée récemment par FERGUSON (1987)( 54) [Figure 29]. Dans la structure de la forme soluble du variant MiTat 1.4, il existe un premier résidu de phosphore impliqué dans une liaison phosphodiester entre la fonction alcoolique d'un résidu d'éthanolamine et la fonction alcoolique en position 6 d'un résidu de mannose. L'autre résidu de phosphore est impliqué dans une structure inositol 1,2 phosphate cyclique.

Nous avons recherché les conditions de labilité-stabilité en milieu acide de ces différentes liaisons ester-phosphate en utilisant les conditions d'hydrolyse acide préconisées par LELOIR et CARDINI (1957)(112) : hydrolyse HCl 1N, 100°C, 7 minutes. Dans ces conditions, les hexoses-6-phosphate, l'inositol phosphate, la phosphoryléthanolamine et le glycérolphosphate sont stables et sur lesquels une hydrolyse de 15 heures est nécessaire pour obtenir 50% de clivage du phosphore.

Ainsi , si l'on admet pour le variant AnTat 1.1 de T.b. brucei une structure C-terminale identique ou voisine de celle décrite pour MiTat 1.4, les deux résidus de phosphore devraient être retrouvés après hydrolyse acide.

Le résultat enregistré, à savoir la libération d'un phosphore, laisse entendre si l'on considère toujours le schéma structural (figure 29) que la perte de phosphore que nous observons soit due à un clivage entre glucosamine et inositol phosphate cyclique or FERGUSON et coll. (1985)( 51) ont montré la stabilité importante en milieu acide de la liaison glycosidique ( $\alpha$  1->4) entre la glucosamine non acétylée et l'inositol [stabilité déjà décrite par ASPINALL (1982)(6)].

Structure C-terminale de la forme soluble du variant MiTat 1.4 (*T. brucei*) \*



— liaison acido-stable

\* selon FERGUSON (1987)(54)

Figure 29

Aussi, en considérant ces différentes données, il semble que la perte d'un phosphore, après l'étape de chauffage à 80°C résulte d'un clivage au niveau de liaisons glycosidiques à l'intérieur du noyau glycanique C-terminal. Le phosphore acido-stable serait alors, dans le schéma de Ferguson, le phosphore intermédiaire entre éthanolamine et glycanne.

b - Formes membranaires natives

Le même protocole expérimental (précipitation trichloracétique avec ou sans chauffage) a été appliqué aux formes membranaires pCMPSA et ZnCl<sub>2</sub>.

En l'absence de chauffage à 80°C, 10/12 résidus de phosphore sont dosés sur le précipité trichloracétique tant de la forme pCMPSA que de la forme ZnCl<sub>2</sub>.

Le dosage réalisé sur ces mêmes échantillons précipités par l'acide trichloracétique et chauffés à 80°C pendant 20 minutes ont livré des valeurs de 7,0 et 7,3 phosphores respectivement pour les formes pCMPSA et ZnCl<sub>2</sub>.

Ces nombres considérables de phosphore dosés sur les deux préparations de forme membranaire nous ont évoqué la possibilité d'une contamination importante de ces antigènes membranaires par des phospholipides :

. rappelons que cette forme d'antigène est extraite de son site membranaire par action d'un détergent (n-octylglucoside)

. rappelons aussi que cette forme n'a pas subi de protocole de purification au delà de son obtention.

Au regard de ces résultats, deux éléments intéressants sont d'ailleurs à souligner :

- le nombre constant de phosphore coentraîné quelle que soit la préparation membranaire (forme pCMPSA ou ZnCl<sub>2</sub>).

- l'existence d'un nombre constant de résidus de phosphore non clivable après traitement acide quelque soit la préparation membranaire.

Cette observation nous a conduit alors à ajouter à notre protocole de dosage du phosphore une étape de délipidation initiale, sur matériel lyophilisé, à l'aide d'un mélange éther-alcool (3:1, v/v) dans le but d'extraire et d'éliminer les phospholipides.

c - Forme soluble et formes membranaires après délipidation

Les résultats de dosage du phosphore sur échantillons préalablement délipidés sont présentés dans le tableau 10.

α - Dosage du phosphore sur préparation délipidée

Pour la forme soluble, les résultats obtenus après délipidation sont identiques à ceux que nous avons observés sur les formes natives, à savoir 2 résidus de phosphore dont l'un est acido-labile.

Pour la forme membranaire, après délipidation, le dosage des échantillons précipités et chauffés à 80°C, révèle 2,8 moles de phosphore par mole d'antigène pour chaque type de forme membranaire. Sur échantillons seulement précipités, il existe une légère différence entre les deux préparations : 4,3 moles de phosphore par mole pour la forme ZnCl<sub>2</sub> et 5,5 moles par mole pour la forme pCMPSA.

Ces résultats amènent à considérer :

1 - l'existence dans les formes membranaires de trois résidus de phosphore acido stable donc deux de plus que pour les formes solubles correspondantes.

2 - la présence de résidus de phosphore acido labiles en nombre différent selon le mode de préparation de l'antigène membranaire : un phosphore pour la forme ZnCl<sub>2</sub>; deux à trois pour la forme pCMPSA .

Ils amènent également à plusieurs interrogations au regard des travaux de FERGUSON :

- le mode de libération de l'antigène utilisé, différent des nôtres, est-il responsable des deux seuls résidus de phosphore dosés par l'auteur ?

- nos conditions d'élimination des phospholipides sont-elles suffisantes ?

- avons-nous dans nos préparations d'antigènes membranaires la présence d'une structure récemment décrite par TURCO et coll. (1987)(171) sur l'espèce Leishmania donovani. En effet, les auteurs ont mis en évidence l'existence d'un lipophosphoglycane (LPG) dont la situation en membrane est localisée au voisinage d'une protéine complexe dont la définition biologique générale semble en l'état actuel des connaissances très voisine de celle de l'AVS chez le trypanosome [Figure 30].

Ce LPG est en effet ancré dans la membrane par l'intermédiaire d'un lysophosphatidyl-inositol dont l'acide gras substituant est vraisemblablement un acide gras saturé à longue chaîne (C<sub>24</sub> ou C<sub>26</sub>), l'élément le plus original de la structure étant la

Teneur en phosphore de la forme soluble (F2, F3 et F4) et des formes membranaires (pCMPSA et ZnCl<sub>2</sub>) après délipidation

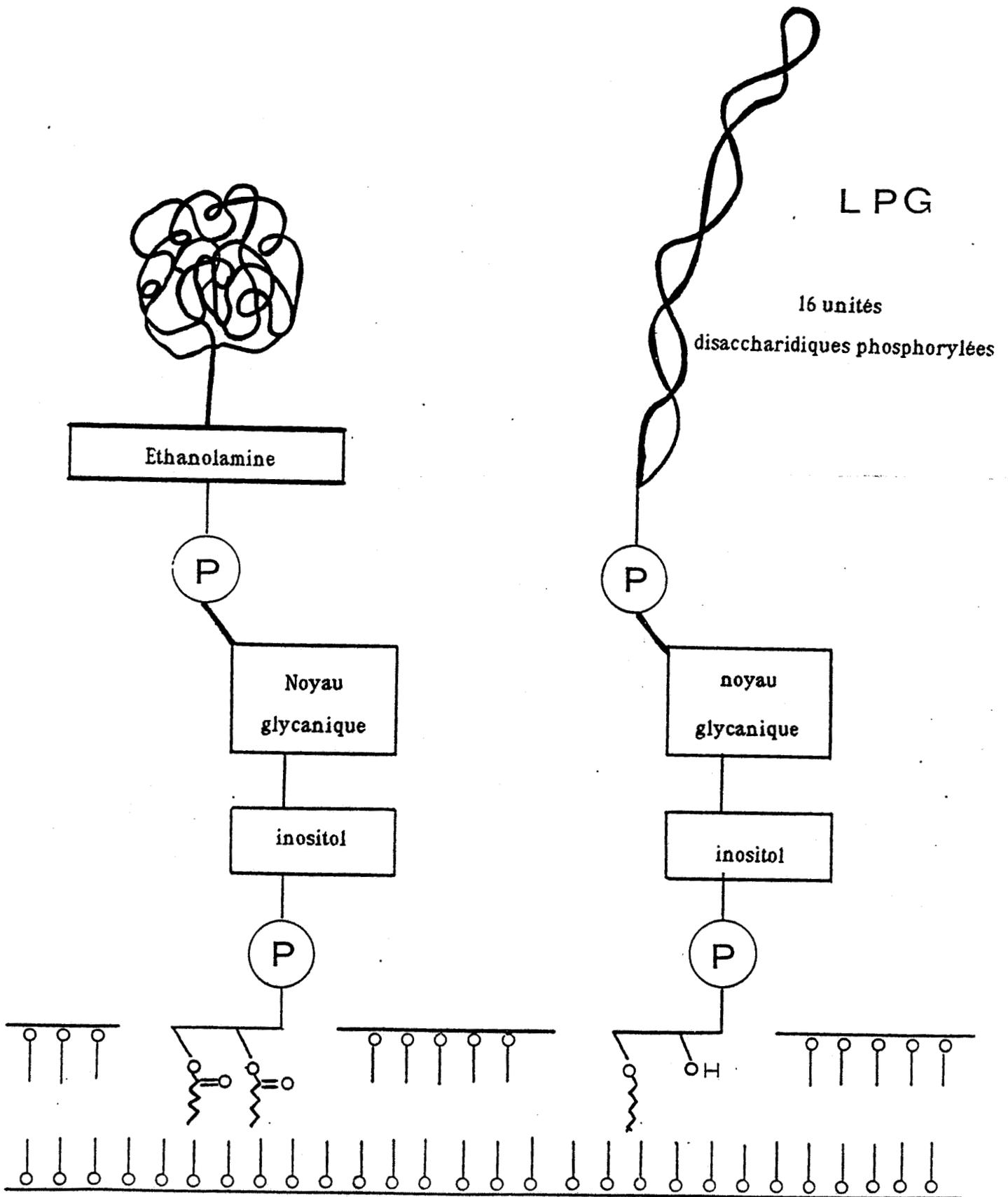
	Forme soluble (phase aqueuse)			Forme membranaire			
				Phase aqueuse		Phase organique	
	F2	F3	F4	pCMPSA	ZnCl <sub>2</sub>	pCMPSA	ZnCl <sub>2</sub>
Précipitation par l'acide trichloracétique et chauffage du précipité à 80°C en milieu acide	0,9	0,9	0,93	2,8	2,8	ND	ND
Précipitation par l'acide trichloracétique	2	1,8	1,95	5,5	4,3	7,5	8,0

\* résultats exprimés en nombre de mole de phosphore /mole d'AVS délipidé

▲ valeurs moyennées sur trois dosages.

Tableau 10

Représentation schématique d'une protéine de L. donovani et d'un lipophosphoglycane (LPG)\*



\*Selon TURCO et coll. (1987)(171)

Figure 30

partie osidique constituée d'une part d'un noyau de 16 unités disaccharidiques phosphorylées (enchainement répétitif du tétrasaccharide [GAL(b1->4)MAN a1-PO4->6 GAL (β 1->4)MAN] et d'autre part, d'un noyau glycanique constitué par un heptasaccharide non encore identifié.

Au total, la forme membranaire comparée à la forme soluble pourrait aussi apparaitre comme un complexe moléculaire AVS-LPG ? , cette structure n'ayant pas encore été constatée chez T.b.brucei

### β - Analyse des phospholipides extraits au cours de la délipidation

Nous avons étudié les phases organiques de délipidation et pu vérifier que 7,5/8 moles de phosphore /mole d'antigène membranaire étaient bien retrouvées que l'on parte d'une forme membranaire pCMPSA ou ZnCl<sub>2</sub> (tableau 10).

Nous avons tenté, à partir de ces mêmes extraits organiques de caractériser les phospholipides et surtout de les identifier en faisant appel à la chromatographie HPLC sur colonne de silice Si 60 et en utilisant les conditions de séparation décrites dans l'appendice technique, nous obtenons une excellente séparation des phospholipides suivants : phosphatidylglycérol (PG), phosphatidylinositol (PI) , phosphatidylsérine (PS) , phosphatidyléthanolamine (PE), phosphatidylcholine (PC) et sphingomyéline (S) [Figure 31] .

Les extraits organiques des formes membranaires ont été étudiés dans les mêmes conditions. Les résultats sont illustrés sur la figure 32 et révèlent que deux pics correspondant au temps de rétention de la phosphatidylcholine et de la sphingomyéline peuvent être identifiés sans ambiguïté ( figure 32). Le rapport PC/S , établi d'après la densité optique à 206 nm, était toutefois différent selon les préparations.

Par ailleurs, des traces d'autres phospholipides ont été détectées; la présence de phosphatidylinositol ou / et de phosphatidylglycérol et de lysophosphatidylglycérol étant évoqué particulièrement pour la préparation pCMPSA (pics de temps de rétention respectifs 9.07, 6.79 et 7.43 minutes).

Au regard de ces résultats, nous avons soumis les fractions antigéniques solubles F2,F3 et F4 au même traitement de délipidation afin de déceler l'éventuelle présence de phospholipides. Les extraits organiques des fractions F2,F3 et F4 se caractérisent par l'existence d'un pic plus ou moins homogène dont le temps de rétention est proche de celui du standard phosphatidylglycérol . Pour la fraction F4 un pic supplémentaire correspondant à celui de la sphingomyéline est aussi individualisé. Notons que sur le plan

Profil chromatographique HPLC  
des phospholipides standards

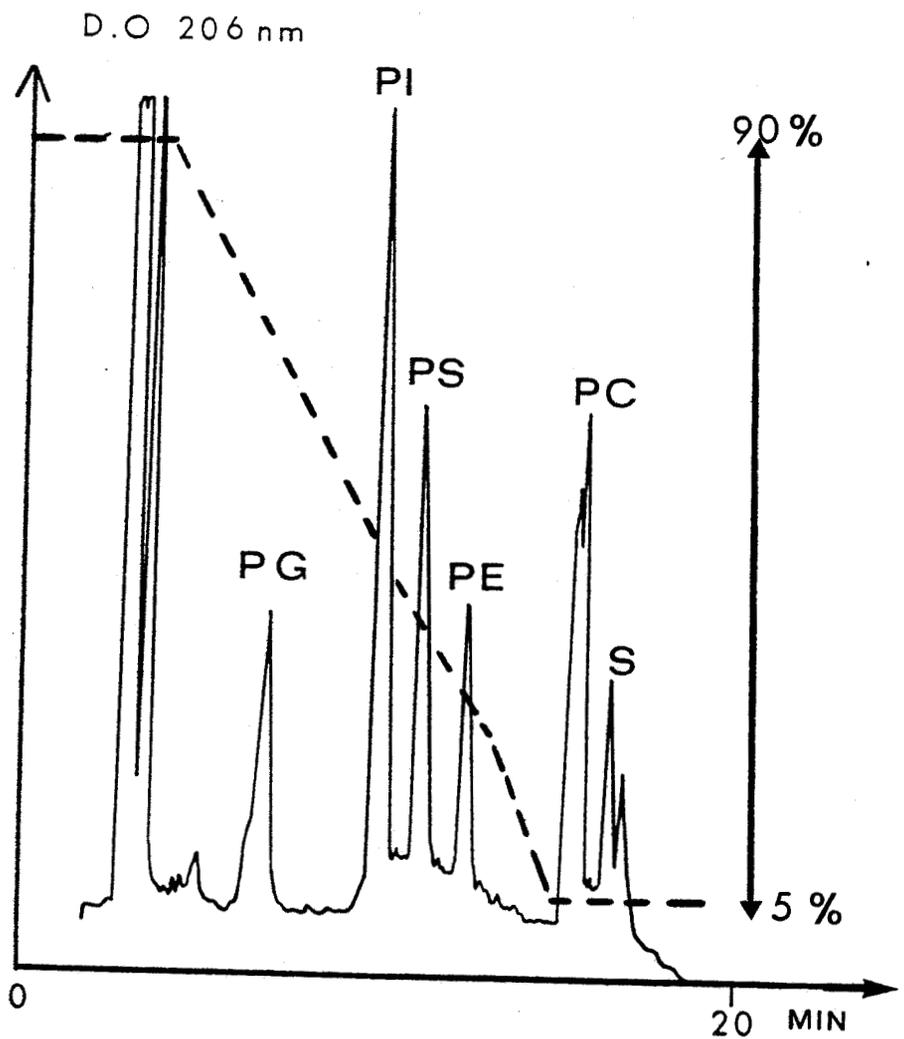


Figure 31

Répartition qualitative des phospholipides présents dans la phase organique de délipidation des formes membranaires ( pCMPSA et  $ZnCl_2$  ) de l'antigène (AnTat 1-1)

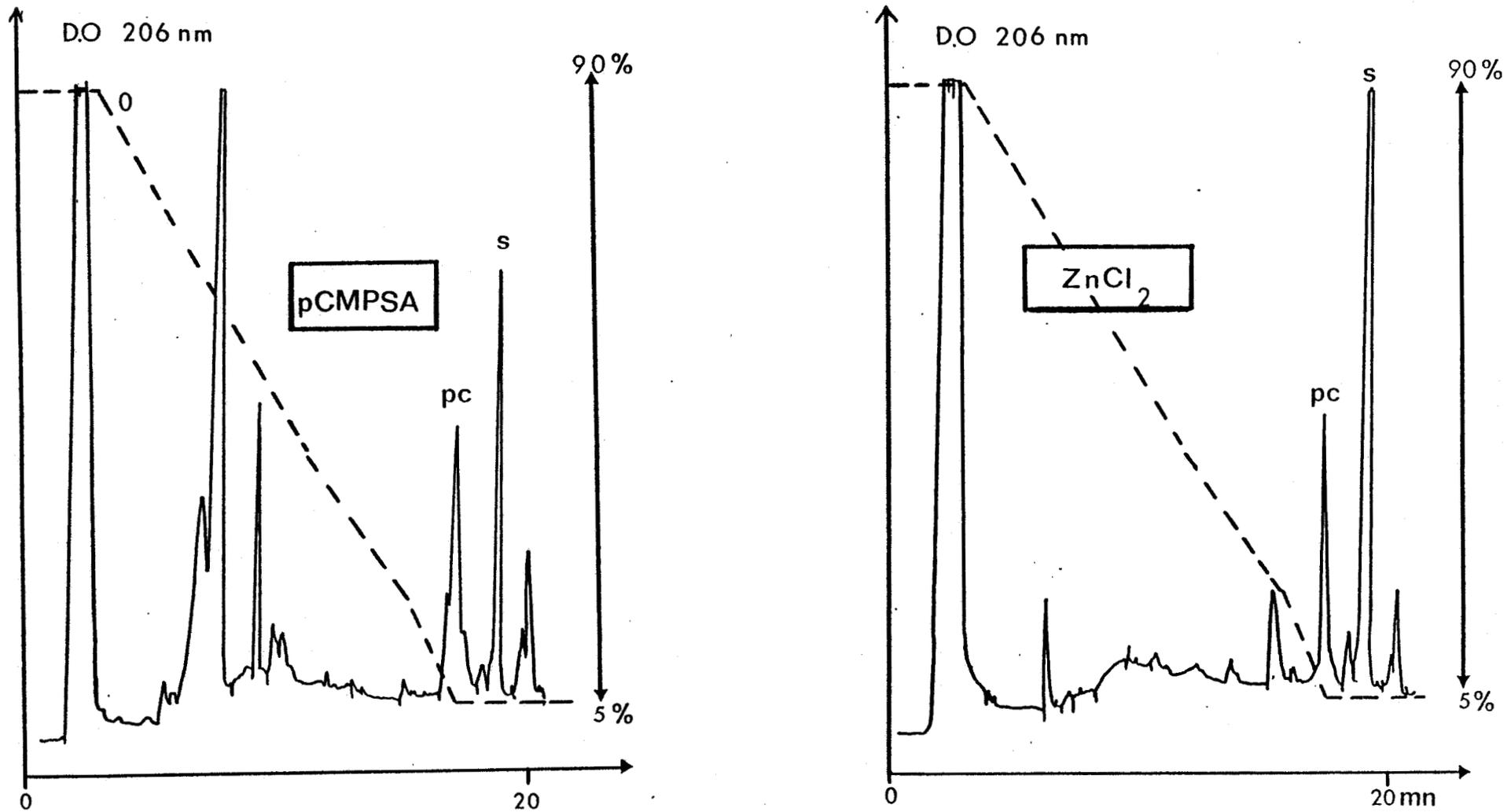


Figure 32

quantitatif, ces phospholipides sont à la limite négligeables au regard de ce qui est caractérisé à partir des formes membranaires.

#### 4- Analyse des acides gras

L'analyse globale des acides gras tant au plan qualitatif qu'au plan quantitatif a été réalisée sur les fractions de forme soluble de l'antigène (F2, F3 et F4) et sur les formes membranaires pCMPSA et ZnCl<sub>2</sub>.

La quantité dosée dans les fractions de la forme soluble ne s'est pas avérée suffisante pour être significative et cela sur plusieurs préparations différentes.

L'analyse des acides gras des formes pCMPSA et ZnCl<sub>2</sub> a mis en évidence les mêmes acides gras majeurs : C 16:0, C 18:2 et C 18:0. Il existe toutefois entre les deux formes membranaires une différence dans les pourcentages relatifs du C 16:0 et du C 18:2, la teneur en C 18:0 restant sensiblement équivalente [Tableau 11 A]. Notons la présence à l'état de traces, de C 14:0 et C 18:1 et aussi 2 pics d'acides gras à très longue chaîne C 20:4n-6 et C 22:6n-3.

Concernant plus particulièrement la quantification du C 14:0, nous avons dû enregistrer un rendement en acide myristique ne correspondant qu'à 25% de la quantité attendue en fonction de la littérature, à savoir deux résidus d'acide myristique par mole d'antigène. Ceci est-il en rapport avec le protocole analytique?, ceci est-il en rapport avec le protocole d'extraction?, questions qui méritent d'être discutées et complétées.

Nous avons vérifié que les extraits organiques des formes membranaires ne contenaient pas l'acide myristique manquant. (tableau 11 B).

Dans la littérature, une variante structurale à la proposition de FERGUSON a été décrite pour un autre variant, II Tat 1.25, de T.b. brucei [GURNETT et coll. (1986)(72)], ce qui laisse entrevoir la difficulté d'extrapolation d'un variant à l'autre pour une même espèce de trypanosome. Dans le cas de II Tat 1.25, une mole d'acide myristique est dosée par mole d'antigène membranaire.

En réalité, ne peut-on évoquer l'existence d'autres ancrages pourvus d'autres acides gras et différents du modèle structural admis? L'absence dans les extraits organiques d'acides gras à longue chaîne nous encourage à rechercher dans cette voie.

#### IV - Organisation moléculaire

Dans le cadre de notre étude, l'organisation moléculaire de l'antigène variable de T.b. brucei (variant An Tat 1.1) était importante à connaître pour mieux situer l'épitope lié à l'antigénicité spécifique du variant mais aussi était indispensable pour étudier les interactions entre AVS et sérum.

**Répartition relative des acides gras dans les antigènes  
obtenus avec les protocoles utilisant le pCMPSA ou le chlorure de zinc  
(AnTat 1.1, T.b.brucei)**

A.gras essentiels	mf pCMPSA		mf ZnCl <sub>2</sub>		extrait organique	
	mf pCMPSA	mf ZnCl <sub>2</sub>	mf pCMPSA	mf ZnCl <sub>2</sub>	mf pCMPSA	mf ZnCl <sub>2</sub>
14 : 0	2,2	3,3	0,7	0,7		
16 : 0	28,6	40,8 *	37	47		
18 : 2	30,9	11,0 *	24,9	7,0		
18 : 1	3,2	4,5	2,7	3,0		
18 : 0	27,4	23,2	32	36		
20 : 4n-6	4,1	1,9				
22 : 6n-3	3,6	1,0				



**A**



**B**

Δ valeurs exprimées en % dans l'échantillon dosé

\* différences essentielles

Tableau 11

L'ensemble des résultats est consigné dans un article paru dans "Archives of Biochemistry and Biophysics" et inséré pages suivantes dans ce mémoire.

### 1 - Définition de domaines moléculaires au sein de l'AVS

Une étape dans l'étude de l'organisation moléculaire de l'antigène a consisté en une étude des points de clivage spécifique de la molécule par coupure enzymatique, l'approche par l'enzyme de tel ou tel point de l'axe peptidique étant autorisée ou interdite en fonction de la conformation générale moléculaire de l'antigène.

#### a) Utilisation d'enzymes protéolytiques

La sensibilité de l'AVS AnTat 1.1 (fraction F2) vis à vis de divers enzymes protéolytiques a tout d'abord été envisagée. Nous avons successivement utilisé la trypsine, la protéase de *Staphylococcus aureus*, la chymotrypsine et la thermolysine.

Une étude cinétique réalisée pour chaque enzyme sur l'AVS a permis de mettre en évidence une attaque identique, quelque soit l'enzyme testée (Figure 1 de l'article). Dès 1 heure d'hydrolyse, la molécule se scinde en 2 fragments de tailles moléculaires apparentes 55 000 et 43 000. Après 24 h d'hydrolyse, l'antigène se stabilise sous forme d'un fragment de 43 000. A ce stade, un protocole de purification de l'hydrolysate tryptique de 24 h a été effectué par chromatographie de gel filtration sur biogel P 30 équilibré en bicarbonate d'ammonium 0,1M. Le profil d'élution est illustré sur la figure 33. Les deux fractions majeures obtenues ont été analysées en électrophorèse en présence de SDS et de  $\beta$ -mercaptoéthanol (figure 2 de l'article). La fraction 1 s'identifie au fragment de taille moléculaire 43 000. La fraction 2 correspond à une bande diffuse de taille moléculaire apparente 20 000 qui présente une faible affinité tinctoriale pour le bleu Coomassie, ce qui explique son absence de visualisation dans les conditions électrophorétiques des études cinétiques d'hydrolyse.

Chaque fragment ainsi purifié a fait l'objet d'une étude structurale.

#### b) Etude structurale des fragments tryptiques purifiés

##### $\alpha$ - Localisation des fragments

Les fragments 1 et 2 obtenus après chromatographie de gel filtration de l'hydrolysate tryptique ont été étudiés en composition amino-acide, séquence N-terminale et composition glucidique.

## Physical and Immunological Analysis of the Two Domains Isolated from a Variant Surface Glycoprotein of *Trypanosoma brucei*<sup>1</sup>

V. GOMES, G. HUET-DUVILLIER, J. P. AUBERT,\* I. DIRAT, D. TETAERT,  
M. L. J. MONCANY,† C. RICHEL, T. VERVOORT,‡ E. PAYS,§ AND P. DEGAND<sup>2</sup>

Unité INSERM N° 16, \*Unité INSERM N° 124, †Unité INSERM N° 233, Place de Verdun, 59045 Lille Cédex, France, ‡Laboratorium voor Serologie, Instituut voor Tropische Geneeskunde, Antwerp, and §Département de Biologie Moléculaire, Université Libre de Bruxelles, 67, rue des Chevaux, B1640, Rhode St Genèse, Belgium

Received December 23, 1985, and in revised form May 2, 1986

A specific surface glycoprotein of a variant of *Trypanosoma brucei* was cleaved with trypsin and the two major domains of the molecule have been purified. We have studied the chemical composition of each domain and compared the data to published results of the specific cDNA sequence. Circular dichroism measurements show that the amino-terminal domain includes preferentially  $\alpha$ -helical or  $\beta$ -sheet structure. The physico-chemical analyses are supplemented by a prediction of secondary structure and a statistical pattern of hydrophilicity-hydrophobicity. The results are discussed in light of the internal limits that were described in the process of partial gene conversion occurring between the variant gene sequence and related members of the same gene family. Immunoblots with homologous antiserum indicate that the amino-terminal domain is implicated in antigenicity. In addition, immunoblotting with heterologous antiserum on native antigen, tryptic hydrolysates, or purified domains suggests a site of interaction supported by the two domains. © 1986 Academic Press, Inc.

African trypanosomiasis is characterized by a complex phenomenon of antigenic variation which allows the parasite to survive in the mammalian host despite the immune response. The specific antigenicity of each variant is supported by the structure of the trypanosome surface coat [for a review see Refs (1, 2)]. Different procedures have been applied to isolate the mature surface coat molecules (3-11). For *Trypanosoma brucei*, antigens obtained

following mechanical cell disruption were characterized as glycoproteins (VSGs)<sup>3</sup> exhibiting an apparent molecular weight of roughly 65,000 (12) and containing 7-17% carbohydrate (13). Two types of oligosaccharide side chains were found: internal and asparagine-linked or attached to the carboxy-terminal end of the protein through an ethanolamine residue amide-linked to the  $\alpha$ -carboxyl group (14). Cardoso de Almeida and Turner (15) have iso-

<sup>1</sup> This work was supported by grants from the Commission of the European Communities [TSD-146-F (MR)], the U.E.R. de Médecine, Université de Lille II, and the Fondation pour la Recherche Médicale Française.

<sup>2</sup> To whom correspondence should be addressed.

<sup>3</sup> Abbreviations used: VSG, variant surface glycoprotein; mf VSG, membrane form of VSG; s VSG, soluble form of VSG; SDS, sodium dodecyl sulfate; CRD, cross-reacting determinant; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; PTH, phenylthiohydantoin; AnTat, Antwerp trypanozoon antigenic type.

lated a different antigenic form, called the membrane form (mf) of VSG, after lysis of living trypanosomes by boiling in the presence of detergent. The main differences with the water soluble form (s VSG) are the lower apparent molecular weight on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), the behavior as an amphiphilic protein in charge shift electrophoresis, and the slight affinity for anti-cross-reacting determinant (CRD) antibody (15). The mf VSG of a variant of *T. brucei* was also shown to contain myristic acid bound through an ester linkage (8). Other procedures were described for isolation of membrane forms, including the use of zwittergent (9) or the treatment of trypanosomes by 10% (w/v) trichloroacetic acid at 0°C followed by an extraction process (10). The conversion of the membrane form to the released form is an enzymatic process (15). Jackson and Voorheis (16) have shown that this involves the cleavage of a phosphodiester bond linking the protein and a phospholipid, leaving the phosphate on the VSG. Ferguson *et al.* also reported that the lipid moiety of mf VSG consisted of *sn*-1,2-dimyristylglycerol (17) present as phosphatidylinositol (18).

The s VSG in solution appears as a dimer with an approximate molecular weight of 125,000 (19). The tryptic cleavage of s VSG distinguished an amino-terminal domain and a carboxy-terminal domain that respectively represent about two-thirds and one-third of the complete polypeptide (20). The dimer of the amino-terminal domain of MITat 1.2 VSG has been crystallized for X-ray analysis (21). Intact MITat 1.2 and DITat 1.3 VSGs were also examined by electron microscopy (22). On the other hand, the cDNA sequence of Antwerp trypanozoon antigenic type (AnTat) 1.1 VSG as well as other VSGs were analyzed by Lalor *et al.* (23) for a comparison of predicted secondary structure on the basis of the method of Garnier *et al.* (24) and that of Robson and Pain (25-27). Cohen *et al.* (22) examined four VSG sequences including AnTat 1.1 for analysis of heptad repeats according to Parry (28, 29). Monoclonal antibodies produced for MITat 1.6 VSG were found to recognize five antigenic

determinants all included in the amino-terminal two-thirds of the molecule, and among these antigenic determinants only one appeared to be exposed at the surface of the living trypanosome (30, 31).

We studied the isolated domains of AnTat 1.1A VSG from a trypsin hydrolysis. The two major domains were located on the cDNA sequence (32) by results of amino acid composition, ethanolamine content, and N-terminal amino acid sequence. The two domains were also examined for carbohydrates, secondary structure by circular dichroism, and Western immunoblotting with homologous and heterologous polyclonal anti-VSG sera. The gene conversion limits of three different AnTat 1.1 clones (AnTat 1.1B, 1.1C, and 1.1H) (33) were studied in relation to molecular patterns of hydrophilicity-hydrophobicity and predictions of secondary structure.

#### MATERIALS AND METHODS

*Isolation of AnTat 1.1A VSG.* AnTat 1.1A VSG was purified by affinity chromatography on concanavalin A-Sepharose (34) of a lysate of cloned trypanosomes obtained by osmotic rupture (6) or by following the protocol of Baltz *et al.* (34).

*SDS-PAGE.* SDS-PAGE was performed in the presence of 2-mercaptoethanol (35). The gel was stained with Coomassie brilliant blue R250. Molecular weights were estimated by comparison with molecules of known molecular weight.

*Trypsin digestion of isolated AnTat 1.1A VSG.* The hydrolysis of VSG (1 mg/ml) by trypsin (EC 3.4.21.4, Sigma) was performed in 0.01 M ammonium bicarbonate buffer, pH 8.0, for 24 h at 37°C with a final enzyme:substrate molar ratio of 1:100. The enzyme was added at times 0 and 12 h.

*Purification of the released fragments.* The enzymatic hydrolysate was passed through a Bio-Gel P30 column (50-100 mesh; 170 × 2 cm) equilibrated in 0.1 M ammonium bicarbonate. The effluent was monitored at 210 nm. Fractions of 2.5 ml were collected and absorbance peaks were pooled and concentrated by lyophilization.

*Amino acid composition.* The samples were hydrolysed in sealed tubes for 24 h in 5.6 N HCl at 105°C under vacuum. The hydrolysate was passed through a single column of DC.6.A resin (Dionex Corp., Sunnyvale, Calif.) on a Beckman 119 Cl amino acid analyzer according to the buffer system described by Fauconnet and Rochemont (36).

*Automated Edman degradation.* Automated Edman degradation was performed on a Beckman 890 C se-

quencer using the Beckman 1 M quadrol program (122974). Phenylthiohydantoin (PTH) amino acids obtained after conversion at each cycle were identified and quantified by high-performance liquid chromatography on a Hewlett-Packard 1084 apparatus with a C 18  $\mu$ Bondapak column (Waters Associates) (37). PTH-homocitrulline was used as internal standard.

**Carbohydrate composition.** Gas-liquid-chromatographic analysis of neutral hexoses was performed according to Lamblin *et al.* (38) by using a Hewlett-Packard gas chromatograph equipped with a dual flame ionization detector. 2-Amino-2-deoxyhexoses were determined from conditions described for amino acid composition.

**Circular dichroism.** CD spectra were recorded with a dichrograph Jobin Yvon RJ Mark III. The samples were dissolved in water at about 1 mg/ml. The dichrograph was monitored by an Apple 2 computer. The results were given as ellipticity ( $\Theta$ ) expressed in degrees  $\text{dmole}^{-1} \cdot \text{cm}^2$ , taking 111 as mean residue weight. CD spectra were converted into Gaussian curves with negative maxima at 207, 214, and 222 nm.  $\alpha$ -Helical and  $\beta$ -sheet structure contents were estimated by using, respectively, the bands at 222 and 214 nm and by referencing the  $\alpha$  standard at  $-30.000$  and the  $\beta$ -standard at  $-9.200$ .

**Calculations.** The relative hydrophilicity or hydrophobicity of the protein along its amino acid sequence was evaluated according to the method of Kyte and Doolittle (39). The secondary structure of the protein was determined according to the method of Chou and Fasman (40). All computations were performed on an Apple 2 computer.

**Antisera.** Anti-VSG sera were made in rabbits by subcutaneous injections of purified glycoproteins mixed with Freund's adjuvant: the first injection was given at two sites on the back of the rabbit and consisted of approximately 40  $\mu\text{g}$  of VSG protein in 1 ml of physiological sodium chloride solution mixed thoroughly with 1 ml of complete Freund's adjuvant. The same injection was given 4 weeks later. The third injection was performed with the same amount of antigen mixed with 1 ml of incomplete Freund's adjuvant. The rabbits were bled 1 week after the third injection and the sera tested in immunotrypanolysis and immunofluorescent antibody tests. Sera were freeze-dried or stored at  $-30^\circ\text{C}$ .

**Western blotting.** Western blotting was performed according to the method described by Burnette (41). Proteins electrophoresed in polyacrylamide gels were transferred to nylon (Biodyn transfer membrane 0.2- $\mu\text{m}$  pore size by PALL Ultrafine Filtration Corporation) according to Vaessen *et al.* (42). The membrane was then treated with rabbit serum anti-VSGs used at a dilution of 1/500. Antigen-antibody complexes were revealed by a second peroxidase-conjugated anti-rabbit Ig-antibody (Institut Pasteur, Paris) treated by 3,3'-diaminobenzidind tetrahydrochloride (Fluka A.G., Switzerland) or by 4-chloro-1-naphthol (Sigma).

## RESULTS

### Chemical Characterization of Isolated AnTat 1.1A VSG

AnTat 1.1A VSG was checked by SDS-PAGE for the absence of degradation during the isolation procedure (see Material and Methods). The gel pattern (Fig. 1, lane 1) revealed only one band with an apparent molecular weight of about 60,000. The molecule was analyzed for carbohydrates (Table I). The results showed mainly the presence of mannose, galactose, and glucosamine, and a trace amount of glucose. Similar data were previously observed in a variant of *T. equiperdum* (43).

### Enzymatic Cleavage

Native AnTat 1.1A VSG was subjected to trypsin digestion. Aliquots of hydrolysate were taken at different incubation times and analyzed by SDS-PAGE (Fig. 1). A fragment of apparent molecular weight 55,000 was initially detected which sequentially degraded to a fragment of molecular weight 43,000 that was resistant to further proteolysis.

### Purification of Tryptic Hydrolysates and Chemical Analysis of the Fractions

In order to localize the cleavage products in the molecule, we purified several 24-h tryptic hydrolysates by gel filtration chromatography on a Bio-Gel P30 column. The collected fractions were analyzed by SDS-PAGE, amino acid composition, and eth-

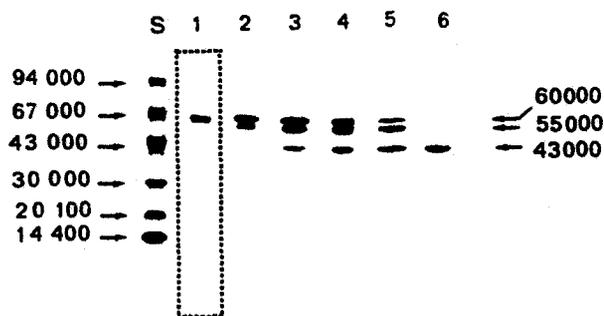


FIG. 1. Trypsin hydrolysis of native AnTat 1.1A VSG. S, proteins of known molecular weight for calibration. 1, native VSG AnTat 1.1A. 2-6, VSG hydrolysate at different incubation times: 2, 1 h; 3, 2 h; 4, 4 h; 5, 8 h; 6, 24 h.

TABLE I

CARBOHYDRATE COMPOSITION OF NATIVE VSG AnTat 1.1 AND OF ITS TRYPTIC C-TERMINAL FRACTION

Carbohydrate	Native VSG	Tryptic C-terminal fraction
Mannose	10.3 <sup>a</sup>	11.3 <sup>a</sup>
Galactose	3.8	6.0
Glucose	0.7	1
Glucosamine	7.8	6.3

<sup>a</sup> Results expressed in number of carbohydrate residues per mole of protein.

anolamine content. The results suggested that the first two fractions collected corresponded to the amino-terminal domain and the carboxy-terminal domain, respectively, and these were further investigated.

A fragment of apparent molecular weight 43,000 could be isolated (Fig. 2, lane 1) and was analyzed in automated Edman degradation. With regard to the known cDNA sequence (32), the fifteen residues that were identified corresponded to the amino-terminal end of the mature protein (Gln-Thr-Ala-Gly-Arg-Pro-Leu-Ala-Asp-Val-Val-Gly-Lys-Thr-Leu). Amino acid composition showed that the fragment did not extend farther than the lysyl residue at position 293 [locations were previously detailed by Pays *et al.* (33)]. Analysis also revealed that the fragment was devoid of carbohydrate residues.

The collected fractions containing ethanolamine corresponded in the electrophoresis pattern to a diffuse band weakly stained with Coomassie blue. The poor affinity for Coomassie blue was the reason for the absence of detection of this carboxy-terminal part in the SDS-PAGE of tryptic hydrolysate. The apparent molecular weight was estimated to be 20,000 (Fig. 2, lane 2). The results of amino acid composition and automated Edman degradation of the isolated carboxy-terminal fractions in comparison to the cDNA sequence (32) indicated a major cleavage site at position 335-336 and minor cleavage sites at positions 362-363 and 422-423. Assuming that the eight cysteine residues are linked in two separated groups of disulfide

bridges, as described for VSG 117 (44), the observed minor cleavage sites correspond to the trypsin sites located outside the blocks of four cysteine residues and also distant from a potential glycosylation site in the sequence Asn (403)-Ala (404)-Thr (405). With regard to the low yield of the minor cleavages, it is likely that the amino-terminal limit of the carboxy-terminal domain of AnTat 1.1A VSG lies between the amino acids 336 and 362. Carbohydrate composition compared with that of intact VSG (Table I) revealed that all the sugars were contained in that carboxy-terminal domain. A low yield in galactose measurements was always observed with native VSG prepared.

These results allowed us to locate the amino-terminal and carboxy-terminal domain of the AnTat 1.1A VSG on its amino acid sequence and to show the absence of glycosylation in the amino-terminal domain.

#### Secondary Structure and Hydrophilicity-Hydrophobicity

The CD spectrum of the native antigen was drawn from 190 to 250 nm (Fig. 3A) and analyzed to assess the different types of secondary structure. AnTat 1.1A VSG contained on average 43% of  $\alpha$ -helix and 8% of  $\beta$ -sheet. According to the rules of Chou and Fasman, AnTat 1.1A VSG is predicted to be 36%  $\alpha$ -helix and 7%  $\beta$ -sheet. This result is in good agreement with the circular dichroism data. The prediction along the protein is presented in Fig. 4A

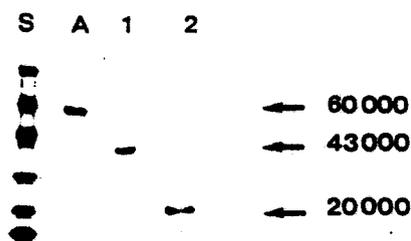


FIG. 2. SDS gel pattern of the tryptic purified amino-terminal and carboxy-terminal fractions in comparison to the native VSG. S, proteins of known molecular weight for calibration. A, native VSG AnTat 1.1A (5  $\mu$ g). 1, amino-terminal fraction (10  $\mu$ g). 2, carboxy-terminal fraction (130  $\mu$ g).

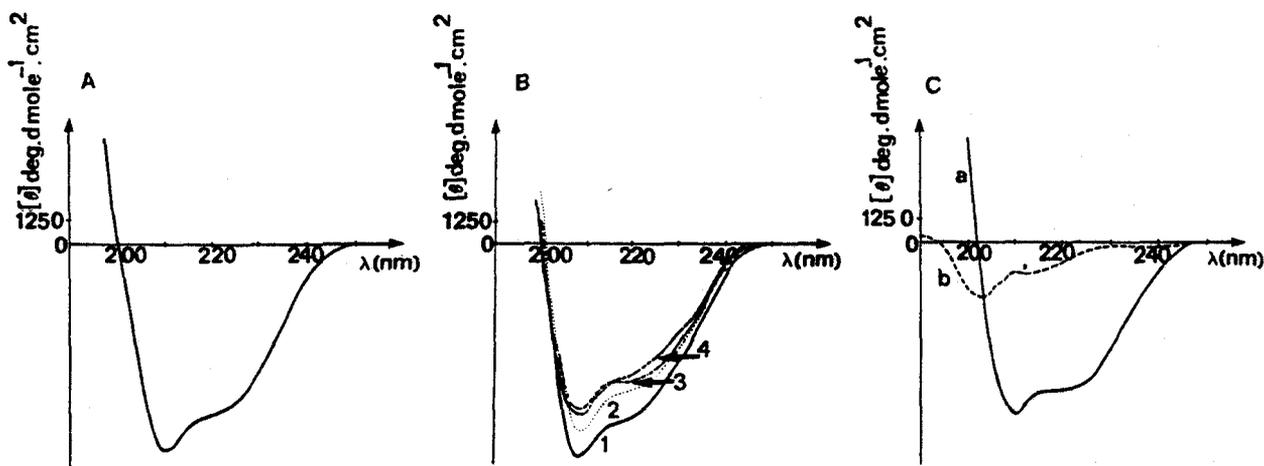


FIG. 3. Circular dichroism spectra of (A) native VSG AnTat 1.1A, (B) trypsin hydrolysis at different incubation times (1, 0 h; 2, 2 h; 3, 8 h; 4, 24 h), (Ca) amino-terminal fraction, and (Cb) carboxy-terminal fraction.

together with the pattern of the relative hydrophilicity or hydrophobicity. The major cleavage site for trypsin was found at the end of a hydrophilic break (318-333) flanked by  $\alpha$ -helices. In the scheme, we have also indicated a further tryptic cleavage site (position 293) implicated in the release of the amino-terminal domain (apparent  $M_r$  43,000) of AnTat 1.1A. As a consequence, the part between these two cleavage sites could be considered as a hinge sequence between the two domains of the molecule.

CD analysis was also performed on the purified amino-terminal and carboxy-terminal parts of the molecule. As shown in Fig. 3C, the CD spectrum of the amino-terminal fraction was quite similar to that of native antigen. On the contrary, the CD spectrum of the carboxy-terminal fraction, devoid of ellipticity at 214 and 222 nm, was indicative of the absence of  $\beta$ -sheet or  $\alpha$ -helical structure. The CD analysis of tryptic hydrolysis up to 24 h also supported this distinction between the domains: as shown in Fig. 3B, no subsequent modification of the CD spectrum occurred during the enzymatic hydrolysis.

In Fig. 4B is the prediction for related member of the same gene family, AnTat 1.10 VSG, which shares more than 70% homology with AnTat 1.1A VSG (32). Nevertheless, the specific antigenicity of the corresponding variants is different (32).

AnTat 1.1A and 1.10 VSG sequences show very similar profiles and it was possible to divide each amino-terminal domain into four regions according to their common features.

We have presented in Fig. 4C the organization of the specific antigen found in two different clones (AnTat 1.1C and 1.1H) both generated by interaction between the two gene sequences previously examined (33). The resulting mature protein contains an amino-terminal part derived from the sequence of AnTat 1.1A and a carboxy-terminal part derived from the sequence of AnTat 1.10 (33). The conversion limits of AnTat 1.1C and 1.1H cover the sequences 291-293 and 294-298, respectively (33).

The specific protein of a third clone (AnTat 1.1B) is studied in Fig. 4D. The gene conversion leading to the change of the amino-terminal part (i.e., 1-291/293) involves, in addition to the interaction with the AnTat 1.1A gene sequence for residues 1-243/246, an interaction with another member of the gene family for residues 243/246-291/293 (33). In this latter gene conversion, the sequence appeared to cover the whole of region 4 and also to be mainly hydrophilic.

The II<sub>T</sub>at 1.3 cDNA sequence (45) has been analyzed (Fig. 4E) in comparison to these related VSGs. Nevertheless, as a general feature for trypanosome VSGs, there is high conservation of the C-ter-

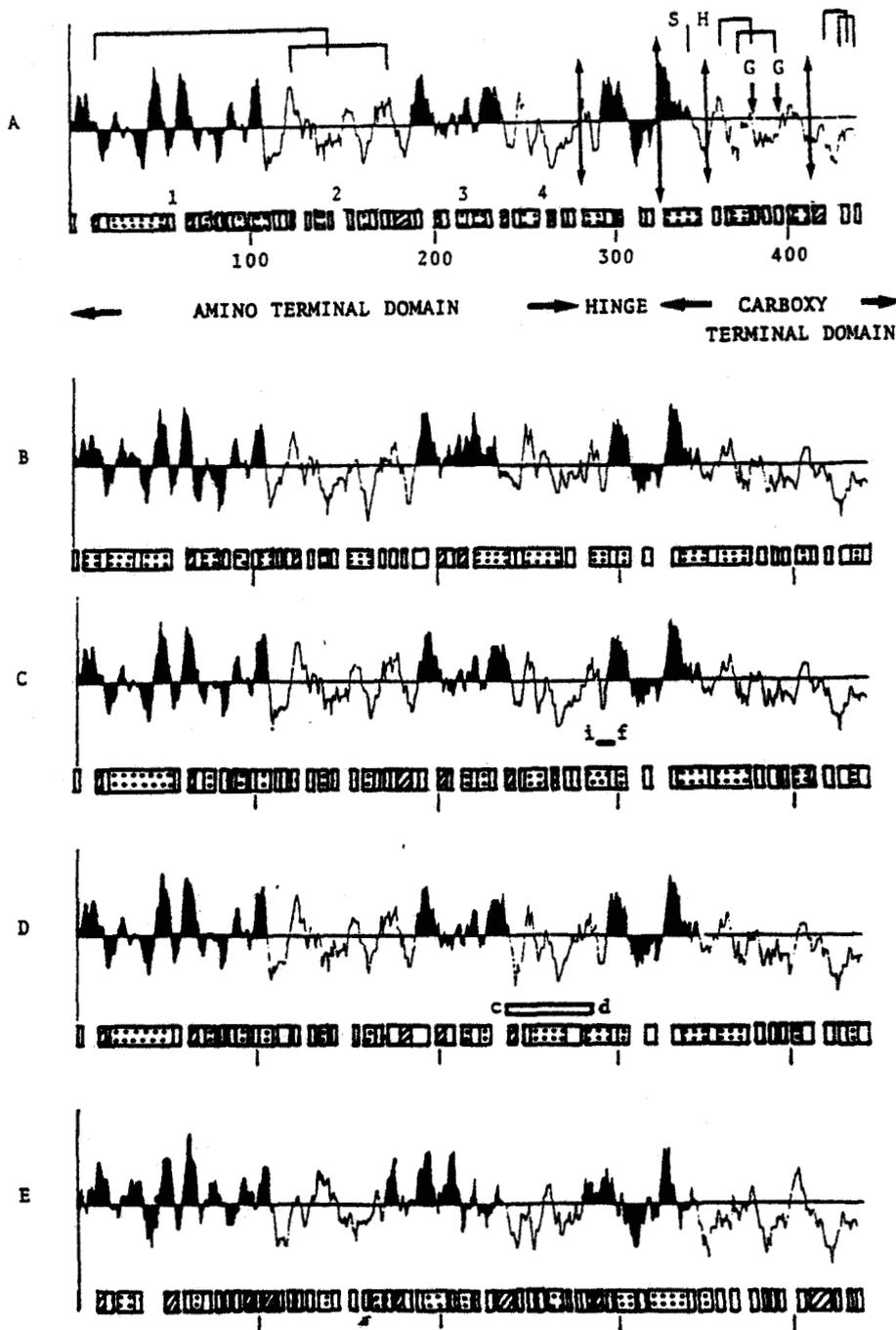


FIG. 4. Representation of the calculations derived from the cDNA sequences (32, 33, 45) of several specific antigens: AnTat 1.1A (A), AnTat 1.10 (B), AnTat 1.1C or H (C), AnTat 1.1B (D), and ITat 1.3 (E). The curves represent the relative hydrophilicity (below) or hydrophobicity (above) of the proteins along the amino acid sequence. The molecular average is illustrated by a line. The predictions for  $\alpha$ -helix,  $\beta$ -sheet, and  $\beta$ -turn are respectively represented by dotted, shaded, and open areas. The 3' conversion limits d, i, and f of AnTat 1.1B, 1.1H, and 1.1C clones and the 5' limit c of the short converted sequence in AnTat 1.1B are indicated. In (A), for AnTat 1.1A VSG, the disulfide bridges are associated as described for VSG 117 (44), the cleavage sites with trypsin are shown by arrows, and the possible glycosylation sites are designated G.

minal 100 amino acids (45). The profile appeared very similar to others. In particular, a hydrophilic break within a helical region was also observed around residue 320.

However, the amino-terminal region 1 seemed to be rather different by the absence of large  $\alpha$ -helices (2% of the whole protein instead of 16% for the AnTat 1.1A

VSG). The overall  $\alpha$ -helicity of 23% predicted for the II<sub>Tat</sub> 1.3 VSG is much lower than the 36% found for An<sub>Tat</sub> 1.1A VSG, and this appears to result from differences in region 1.

### Immunoblotting

Native An<sub>Tat</sub> 1.1A VSG as well as its amino-terminal and carboxy-terminal fractions were analyzed by immunoblotting with homologous anti-VSG serum (Fig. 5a). The native VSG and its amino-terminal fraction specifically bound the antiserum on the immunoblot while no reaction could be detected with the carboxy-terminal fraction. Aliquots of the samples

were also examined under the same conditions with two different heterologous antisera raised respectively against An<sub>Tat</sub> 1.10 and An<sub>Tat</sub> 1.8 VSGs (Figs. 5b and c). A positive reaction was detected with native VSG for each heterologous antiserum but only the amino-terminal fraction interacted with the Anti-An<sub>Tat</sub> 1.10 VSG serum. As the interaction site observed with Anti-An<sub>Tat</sub> 1.8 VSG serum was not found in any purified domain, we followed a trypsin hydrolysis in immunoblotting (Fig. 5f). We observed that the enzymatic cleavage of An<sub>Tat</sub> 1.1A VSG resulted in complete disappearance of the interaction site. On the contrary, the positive reaction with anti-An<sub>Tat</sub> 1.1A or An<sub>Tat</sub> 1.10 VSG serum was conserved in fragment 55,000 and in fragment 43,000 and also weakly in a low molecular weight fragment which is thought to come from the cleavage 55,000 to 43,000 (Figs. 5d and e).

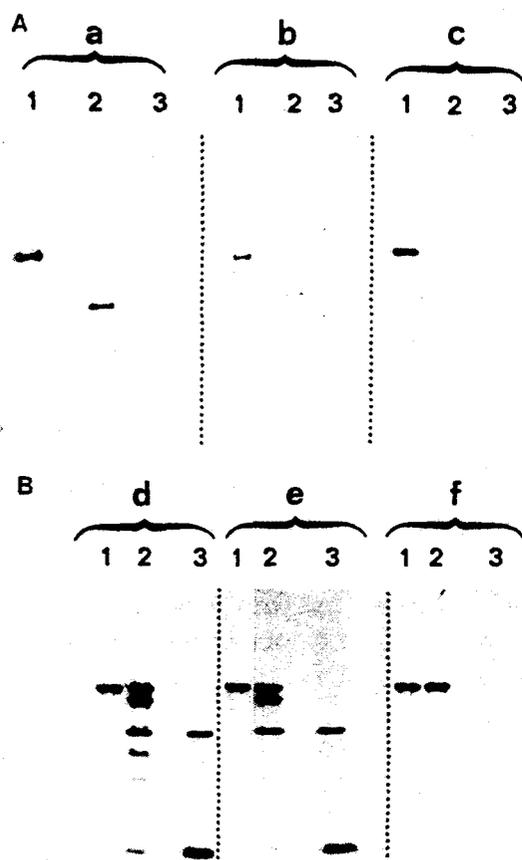


FIG. 5. Immunoblot (A) of native VSG (lane 1) and of its tryptic purified amino-terminal and carboxy-terminal fractions (lanes 2 and 3, respectively) with anti-An<sub>Tat</sub> 1.1A VSG serum (a), anti-An<sub>Tat</sub> 1.10 VSG serum (b), and anti-An<sub>Tat</sub> 1.8 VSG serum (c); (B) of native VSG (lane 1) and of its tryptic hydrolysates at two different incubation times [4 h (lane 2) and 24 h (lane 3)] with anti-An<sub>Tat</sub> 1.1A VSG serum (d), anti-An<sub>Tat</sub> 1.10 VSG serum (e), and anti-An<sub>Tat</sub> 1.8 VSG serum (f).

### DISCUSSION

Using tryptic hydrolysis, we have isolated the two major domains of An<sub>Tat</sub> 1.1A VSG by gel filtration chromatography.

As previously described for other *T. brucei* VSGs (20-21), the amino-terminal domain of the An<sub>Tat</sub> 1.1A VSG was obtained in a fraction exhibiting an apparent molecular weight of 43,000 by SDS-PAGE. The polypeptide length was found to be of 293 amino acid residues. The fraction was devoid of sugars despite the existence of a potential sequence for N-glycosylation <sup>84</sup>Asn-Trp-Ser<sup>86</sup>, although a tryptophan residue has never been described, to our knowledge, in a glycosylation site.

The carboxy-terminal domain was obtained in a fraction migrating as a diffuse band of molecular weight 20,000 and weakly stained by Coomassie blue. The fraction was composed essentially of a fragment resulting from cleavage at the link 335-336. The carboxy-terminal domain was also shown to include the whole sugar content of the molecule: 10-11 mannose residues, 4-6 galactose residues, 1 glucose residue and 7 glucosamine residues. In addition to the C-terminal glycosylation of *T. brucei* VSGs (14), the cDNA sequence (32)

identifies the location of two asparaginy residues, at the positions 390 and 403, respectively, in a specific sequence for *N*-glycosidic substitution (46). Further work is in progress to elucidate the number and the type of oligosaccharide side chains in this fraction. The high sugar content compared to the small length of the polypeptide probably explains the poor affinity of the fraction for Coomassie blue.

Calculations from the CD spectrum of intact VSG revealed an ordered structure in amounts of 43% for  $\alpha$ -helix and 8% for  $\beta$ -sheet. Circular dichroism studies performed on other trypanosome variants have shown strong differences in  $\alpha$ -helical or  $\beta$ -sheet content of VSGs. In a series of *T. equiperdum* variants isolated at various stages of the infection, the percentages of  $\alpha$ -helix and  $\beta$ -sheet, respectively, extended from 28 to 49% and from 25 to 49% (47). Two *T. congolense* VSGs were reported to contain 60–80%  $\alpha$ -helix (23).

The comparison between the CD spectrum of the amino-terminal and carboxy-terminal fractions and that of native AnTat 1.1A VSG indicates that the most ordered structure is contained in the amino-terminal domain whereas the carboxy-terminal domain appears nearly devoid of  $\alpha$ -helices or  $\beta$ -sheets. In order to confirm this data, we have followed a tryptic hydrolysis by circular dichroism and observed that the enzymatic cleavage did not significantly modify the CD spectrum. Conformational differences between *T. brucei* antigen domains have also been described by X-ray and electron microscopy investigations (21–22). Freyman *et al.* (21) have determined the crystal structure of the dimer of the amino-terminal domain derived from MITat 1.2 VSG. The X-ray analysis revealed that the dimer appears as a rod (approximate dimensions  $40 \times 40 \times 90$  Å) composed of a bundle of  $\alpha$ -helices: each monomer presents two connected  $\alpha$ -helices extending over approximately 80 Å. The authors also specified that the latter configuration was indicative of an helical region covering about 120 residues and containing only one break. Moreover, the molecular shape of intact MITat 1.2 VSG observed by electron microscopy (22) con-

sisted of a large domain of about  $100 \times 70$  Å with a short tail assumed to be the carboxy-terminal domain. Another VSG examined, DITat 1.3 VSG (22), showed a different conformation comprising three parts: a globular head with a diameter of 60 Å, a "stem" of dimensions  $100 \times 30$  Å, and a smaller globular region.

Our prediction may be related to the one reported by Lalor *et al.* (23). We have found a high  $\alpha$ -helical potential in region 1 of the molecule and surrounding the hinge region. On the other hand, Cohen *et al.* (22) have calculated that the AnTat 1.1 VSG contained a predicted  $\alpha$ -helical structure near 50%. The authors (22) also calculated the predicted level of  $\alpha$ -helical coiled-coil structure: the amino-terminal domains of the AnTat 1.1 and 1.10 VSGs as well as of other VSGs examined were found to contain a large stretch of heptad repeats and consequently predicted to include a high proportion of  $\alpha$ -helical coiled-coil structure. In particular for AnTat 1.1 VSG, the amino acid sequence between the cysteine residues at positions 16 and 125, respectively, presented a succession of 6, 2, and 5 heptads (22).

The scheme presented in Fig. 4 illustrates the different functional regions in the VSGs examined: the carboxy-terminal domain, which is very hydrophilic and whose conformation is maintained by four disulfide bridges, a hinge region very sensitive to proteases, and an amino-terminal domain shared by four regions. The distinction in regions correlates well with the regions involved in the partial gene conversion events. For AnTat 1.1B, 1.1C, and 1.1H clones, all the 3' limits coincide with the inversion of polarity at the end of the amino-terminal domain, suggesting that the recombination process should only concern the amino-terminal domain. The latter is, indeed, the support of the AnTat 1.1 specific antigenicity (33). AnTat 1.1C and 1.1H display the same VSG sequence and their amino-terminal domain is the same as that of the AnTat 1.1A VSG. In contrast, AnTat 1.1B involves an additional donor for region 4. The 5' limit again coincides with a junction between regions. For the AnTat 1.1B VSG, in comparison to

other AnTat 1.1 VSGs, seven amino acid residues are altered (33) in region 4 and they are in positions 247 (Ser → Ala), 249 (Ala → Arg), 252 (Ser → Asn), 256 (Leu → Phe), 264 (Gly → Ala), 274 (Asp → Glu), and 286 (Glu → Ala). These changes do not alter the AnTat 1.1 specific antigenicity. The part of the molecule flanking the hinge is indeed very likely to be buried within the folded VSG at the surface of the parasite.

The amino-terminal domain of AnTat 1.1A VSG seems to be essential in the immune response, as revealed by anti-VSG serum in immunoblot experiments. This observation may be related to the results obtained by Miller *et al.* (30, 31) with monoclonal antibodies for MITat 1.6 VSG. The nine monoclonal antibodies they obtained reacted with five antigenic determinants all found in the N-terminal two-thirds of the molecule.

The cross-reaction between the amino-terminal domain and the antiserum against AnTat 1.10 VSG may be explained by the high percentage of homology characterizing AnTat 1.1A and 1.10 VSGs (32). The interaction observed between native AnTat 1.1A VSG and anti-AnTat 1.8 VSG serum in immunoblot analysis could not be detected in any enzymatic cleavage product. The first release of the component 55,000 resulted in complete disappearance of a reaction on the immunoblot. We consequently concluded that the interaction site is generated by the combination of the two domains.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank C. Denis, G. Lecocq, C. Vandepierre, and P. Mathon for excellent technical assistance, V. Delecroy for typing of the manuscript, and Dr. N. Murphy (University of Brussels) for comments on the manuscript.

#### REFERENCES

- CROSS, G. A. M. (1984) *Philos. Trans. R. Soc. London* 307, 3-12.
- TURNER, M. J. (1985) *Brit. Med. Bull.* 41, 137-143.
- TURNER, M. J. (1982) *Adv. Parasitol.* 21, 69-153.
- DIFFLEY, P., AND JAYAWARDENA, A. N. (1982) *J. Parasitol.* 68, 532-537.
- VOORHEIS, H. P., BOWLES, D. J., AND SMITH, G. A. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 2300-2304.
- CROSS, G. A. M. (1984) *J. Cell. Biochem.* 24, 79-90.
- CARDOSO DE ALMEIDA, M. L., ALLAN, L. M., AND TURNER, M. J. (1984) *J. Protozool.* 31, 53-60.
- FERGUSON, M. A. J., AND CROSS, G. A. M. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 3011-3015.
- GRAB, D. J., WEBSTER, P., AND VERJEE, Y. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 7703-7707.
- JACKSON, D. G., OWEN, M. J., AND VOORHEIS, H. P. (1985) *Biochem. J.* 230, 195-202.
- CLARKE, M. W., OLAFSON, R. W., AND PEARSON, T. W. (1985) *Mol. Biochem. Parasitol.* 17, 19-34.
- CROSS, G. A. M. (1975) *Parasitology* 71, 393-417.
- JOHNSON, J. G., AND CROSS, G. A. M. (1977) *J. Protozool.* 24, 587-591.
- HOLDER, A. A. (1983) *Biochem. J.* 209, 261-262.
- CARDOSO DE ALMEIDA, M. L., AND TURNER, M. J. (1983) *Nature (London)* 302, 349-352.
- JACKSON, D. G., AND VOORHEIS, H. P. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 5179-5188.
- FERGUSON, M. A. J., HALDAR, K., AND CROSS, G. A. M. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 4963-4968.
- FERGUSON, M. A. J., LOW, M. G., AND CROSS, G. A. M. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 14,547-14,555.
- AUFFRET, C. A., AND TURNER, M. J. (1981) *Biochem. J.* 193, 647-650.
- JOHNSON, J. G., AND CROSS, G. A. M. (1979) *Biochem. J.* 178, 689-697.
- FREYMAN, D. M., METCALF, P., TURNER, M., AND WILEY, D. C. (1984) *Nature (London)* 311, 167-169.
- COHEN, C., REINHARDT, B., PARRY, D. A. D., ROELANTS, G. E., HIRSCH, W., AND KANWE, B. (1984) *Nature (London)* 311, 169-171.
- LALOR, T. M., KJELDGAARD, M., SHIMAMOTO, G. T., STRICKLER, J. E., KONISBERG, W. H., AND RICHARDS, F. F. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 998-1002.
- GARNIER, J., OSGUTHORPE, D. J., AND ROBSON, B. (1978) *J. Mol. Biol.* 120, 97-120.
- ROBSON, B., AND PAIN, R. H. (1974) *Biochem. J.* 141, 869-882.
- ROBSON, B., AND PAIN, R. H. (1974) *Biochem. J.* 141, 883-897.
- ROBSON, B., AND PAIN, R. H. (1974) *Biochem. J.* 141, 899-904.
- PARRY, D. A. D. (1979) in *Fibrous Proteins: Scientific, Industrial and Medical Aspects* (Parry D. A. D., and Creamer, L. K., eds.), Vol. 1, pp. 393-427, Academic Press, London.
- PARRY, D. A. D. (1982) *Biosci. Rep.* 2, 1017-1024.
- MILLER, E. N., ALLAN, L. M., AND TURNER, M. J. (1984) *Mol. Biochem. Parasitol.* 13, 67-81.
- MILLER, E. N., ALLAN, L. M., AND TURNER, M. J. (1984) *Mol. Biochem. Parasitol.* 13, 309-322.
- PAYS, E., VAN ASSEL, S., LAURENT, M., DARVILLE,

- M., VERVOORT, T., VAN MEIRVENNE, N., AND STEINERT, M. (1983) *Cell* 34, 371-381.
33. 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.
34. BALTZ, T., BALTZ, D., AND PAUTRIZEL, R. (1976) *Ann. Immunol. (Paris)* 127C, 761-774.
35. LAEMMLI, U. K. (1970) *Nature (London)* 227, 680-681.
36. FAUCONNET, H., AND ROCHEMONT, J. (1978) *Anal. Biochem.* 91, 403-409.
37. HERMAN, J., TITANI, K., ERICSSON, L. H., WADE, R. D., NAVATH, H., AND WALSH, K. A. (1978) *Biochemistry* 17, 5672-5679.
38. LAMBLIN, G., BOERSMA, A., KLEIN, A., ROUSSEL, P., VAN HALBEEK, M., AND VLIEGENHART, J. F. G. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 9051-9058.
39. KYTE, J., AND DOOLITTLE, R. F. (1982) *J. Mol. Biol.* 157, 105-132.
40. CHOU, P. Y., AND FASMAN, G. D. (1978) *Annu. Rev. Biochem.* 47, 251-276.
41. BURNETTE, N. W. (1981) *Anal. Biochem.* 112, 195-203.
42. VAESSEN, R. T. M. J., KREIKE, J., AND GROOT, G. S. P. (1981) *FEBS Lett.* 124, 193-196.
43. DUVILLIER, G., RICHEL, C., BRIAND, G., BALTZ, T., AND DEGAND, P. (1983) *Mol. Biochem. Parasitol.* 8, 17-30.
44. ALLEN, G., AND GURNETT, L. P. (1983) *Biochem. J.* 209, 481-487.
45. RICE-FICHT, A. C., CHEN, K. K., AND DONELSON, J. E. (1981) *Nature (London)* 294, 53-57.
46. MARSHALL, R. D. (1974) *Biochem. Soc. Symp.* 40, 17-26.
47. DUVILLIER, G., AUBERT, J. P., BALTZ, T., RICHEL, C., AND DEGAND, P. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 110, 491-498.

Chromatographie de gel filtration de l'hydrolysat trypsique  
de l'AVS AnTat 1.1

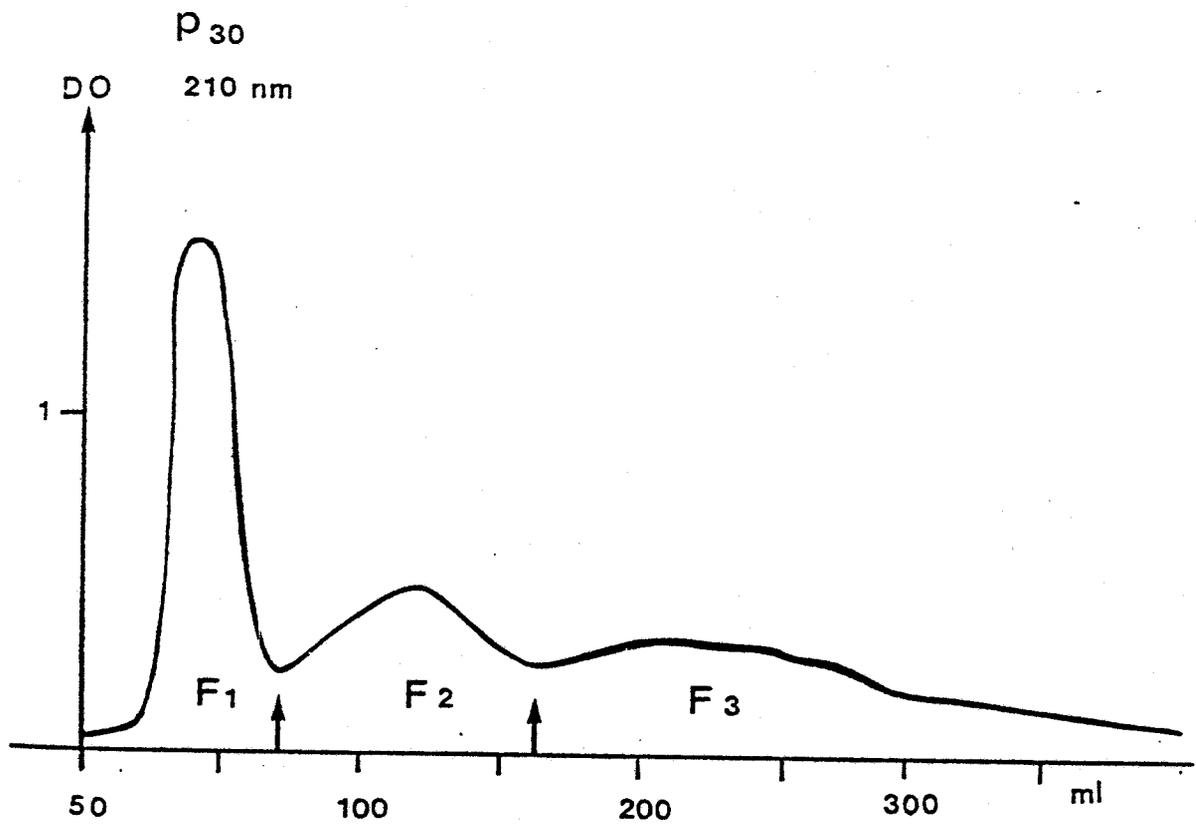


Figure 33

De ces analyses, nous avons pu noter que :

- la fraction 1 (de taille moléculaire 43 000) correspond au fragment amino-terminal de l'antigène jusqu'au résidu de lysine en position 293 [figure 34]. Une absence totale de glycanne a été établie malgré l'existence d'une séquence potentielle pour une glycosylation (<sup>84</sup>Asn-Trp-Thr<sup>86</sup>). Le résidu de tryptophane en position intermédiaire est généralement considéré comme un "empêchement" à la glycosylation.

- la fraction 2 (de taille moléculaire 20 000) correspond à un fragment C-terminal, débutant au niveau du résidu d'acide aspartique en position 336, avec cependant possibilité de clivages tryptiques mineurs en position 362-363 et 433-434 (figure 34). Ce fragment C-terminal est le support de la glycosylation de l'AVS [Tableau I de l'article] représentée par 11 à 12 résidus de mannose, 6 résidus de galactose, 6 résidus de glucosamine et 1 résidu de glucose par mole de glycoprotéine.

### β) Etude physico-chimique de l'AVS

L'obtention de ces fragments purifiés a permis une meilleure compréhension de l'organisation moléculaire de l'antigène par dichroïsme circulaire. Nous avons réalisé les spectres dichroïques de la fraction native et des fragments tryptiques.

Pour la molécule native, (figure 35 A) la structure secondaire est caractérisée par un pourcentage en hélice  $\alpha$  de 43% et une teneur en feuillets plissés de 8%.

L'étude des fragments purifiés a permis de définir l'importance de chacun d'entre eux dans l'élaboration de la structure secondaire de l'antigène. Ainsi, nous avons pu constater que:

- le fragment N-terminal (environ 2/3 de la molécule) possède un spectre dichroïque sensiblement identique à celui de la molécule native, particulièrement riche en hélice  $\alpha$  (figure 35 B a)
- le fragment C-terminal (environ 1/3 de la molécule) est très inorganisé (figure 35 B b).

L'analyse en dichroïsme circulaire d'hydrolysats tryptiques à différents temps d'incubation est également en faveur de cette distinction en domaines. En effet, aucune modification du spectre dichroïque n'est observé pendant le clivage enzymatique de l'AVS (figure 35 C).

L'organisation moléculaire de la fraction antigénique purifiée peut donc être caractérisée par l'existence de deux domaines :

- un domaine N-terminal, représentant les 2/3 de la molécule, non glycosylé et support de la structure en hélice  $\alpha$  et feuillets plissés  $\beta$ .

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

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

ASP

\* Site potentiel de glycosylation

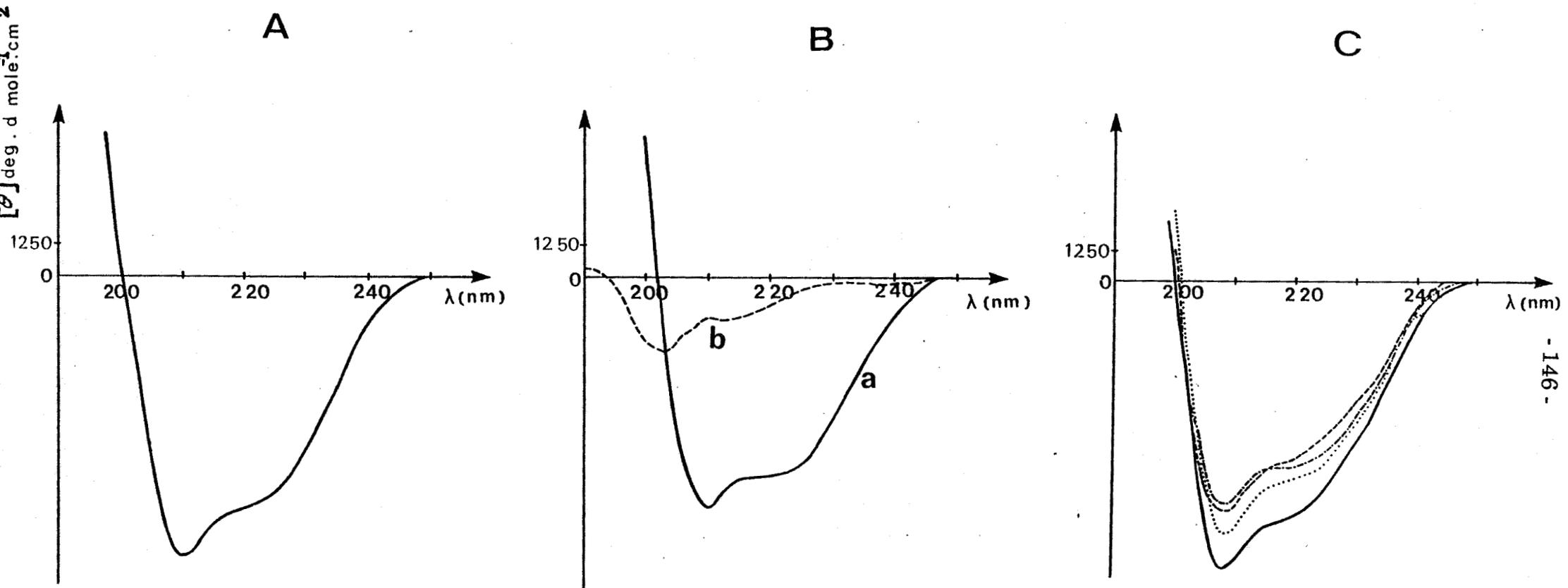
↑ Sites de clivage mineur par la trypsine

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 34

SPECTRES DICHROIQUES



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:

t=0; ..... t=2 heures; - · - · t=8 heures; --- t=24 heures ———

FIGURE 35

- un domaine C-terminal, représentant le tiers de la molécule, inorganisé et support de la glycosylation.

Il existe donc entre ces deux domaines une zone "charnière", site privilégié de l'attaque enzymatique.

## 2 - Identification de séquences potentielles de fixation de l'ion calcium ( $\text{Ca}^{++}$ ) et phospholipides

La connaissance de la séquence cDNA du variant AnTat 1.1 [PAYS *et coll.* (1983)(141)] permettait de rechercher l'existence éventuelle de séquences potentielles de fixation à la fois pour l'ion calcium  $\text{Ca}^{++}$  et aussi pour des phospholipides en fonction de nos résultats analytiques. De telles séquences ont été identifiées lors de l'étude comparative de plusieurs protéines telles la lipocortine, la calelectrine, l'endonexine [GEISOW *et WALKER* (1986)(62)].

La séquence de base identifiée dans ces protéines comme étant spécifique de la fixation des phospholipides et de l'ion calcium ( $\text{Ca}^{++}$ ) est formée par l'association de deux séquences respectivement de 16 et de 12 résidus amino-acides, espacées entre eux par 29 résidus. La nature des acides aminés impliqués dans cet assemblage est illustrée sur la figure 36.

La recherche d'analogie entre cette séquence de base et la séquence du variant AnTat 1.1 a permis de suspecter 4 régions potentielles d'interaction:

- la région 1 (acides aminés 87-102 et 132-143) avec 54% d'analogie [figure 37].
- la région 2 (acides aminés 118-133 et 163-174) avec 64% d'analogie [figure 37]
- la région 3 (acides aminés 185-200 et 230-241) avec 79% d'analogie [figure 38].
- et enfin la région 4 (acides aminés 299-314 et 344-355) avec aussi 79% d'analogie [figure 38].

De ces 4 régions ce sont surtout les régions 3 et 4 (79% d'identité avec la séquence type) qui présentent la plus forte probabilité d'interaction.

Cette étude ne présente jusqu'ici qu'un caractère prédictif et ne préjuge pas de la relation effective AVS-phospholipides, AVS-calcium. Cependant, il est intéressant de noter que les régions 3 et 4 (79% d'identité) sont situées de part et d'autre de la région charnière interdomaines moléculaires de l'AVS et une interaction protéine-phospholipide, protéine-calcium permettrait donc une stabilisation de la structure ternaire de l'AVS, exposant ainsi certaines régions de la molécule pour la production de sites épitopiques.

De plus, nous avons largement exposé dans les chapitres précédents, l'évidence d'interaction phospholipides-AVS à travers :

- leur caractérisation et leur étude analytique après traitement par solvants organiques de



Séquences potentielles de reconnaissance des phospholipides

	10	20	30
	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-		
	40	50	60
	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-		
	70	80	90
	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-		
Région 1	100	110	120
	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-		
	130	140	150
	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-		
	160	170	180
Région 2	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-		
	190	200	210
	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-		
	220	230	240
	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-		
	250	260	270
	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-		
	280	290	300
	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-		
	310	320	330
	GLY-LYS-ASP-SER-ALA-TYR-ALA-ILE-ALA-LEU-GLU-GLY-ILE-SER-ILE-GLU-VAL-PRO-LEU-GLY-GLY-GLN-THR-GLN-ASN-LYS-GLN-LEU-TYR-		
	340	350	360
	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-		
	370	380	390
	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-		
	400	410	420
	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-		
	430	440	450
	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-		

Séquences ayant respectivement 54% (  ) et 64% ( --- ) d'analogie avec les séquences affines pour la fixation des phospholipides et des ions calcium.

Figure 37

Séquences potentielles de reconnaissance des phospholipides et des ions calcium (Ca<sup>2+</sup>).

	10	20	30
	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-		
	40	50	60
	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-		
	70	80	90
	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-		
	100	110	120
	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-		
	130	140	150
	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-		
	160	170	180
	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-		
Région 3	190	200	210
	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-		
	220	230	240
	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-		
	250	260	270
	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-		
	280	290	300
	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-		
	310	320	330
Région 4	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-		
	340	350	360
	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-		
	370	380	390
	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-		
	400	410	420
	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-		
	430	440	450
	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-		

-150-

ASP



séquences affines pour la fixation de l'ion calcium.



Séquence possédant un fort pourcentage d'analogie ( 79%) avec les séquences affines pour la fixation des phospholipides

Figure 38

l'antigène purifié.

- leur existence également suspectée lors de l'étude de la phosphorylation des formes solubles et membranaires de l'antigène.

## **V - Polymérisation des AVS et relation avec la réponse immunologique**

### **1 - Polymérisation des antigènes**

L'étude électrophorétique comparative de trois variants de T.b.brucei (variants AnTat 1.1, 1.10 et 1.8) nous a permis d'observer des différences importantes dans la structuration des antigènes.

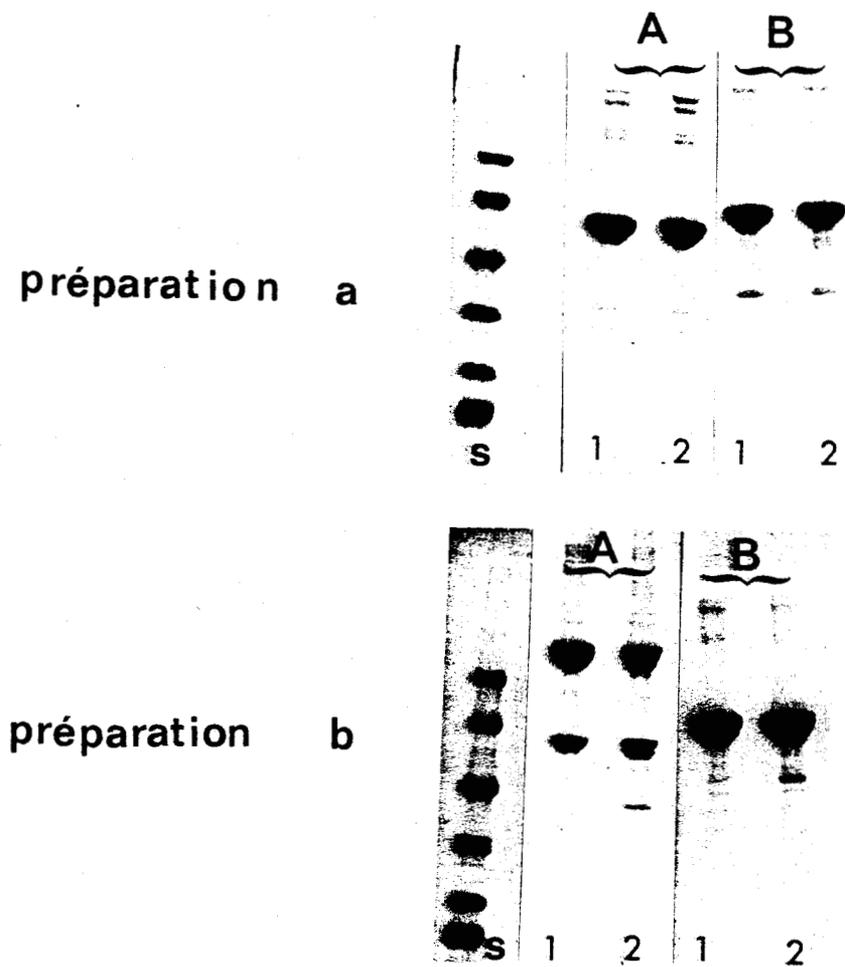
Dans le chapitre traitant de l'hétérogénéité moléculaire, nous avons signalé que les fractions antigéniques purifiées à partir du variant AnTat 1.1 se présentent sous forme d'un mélange en majorité constitué d'une molécule dimère. Les fractions F2, F3 et F4 du variant AnTat 1.10 se sont révélées très similaires à celles du variant AnTat 1.1 [figure 19]. Pour le variant AnTat 1.8, le comportement électrophorétique des fractions purifiées est différent et de surcroît, l'aspect moléculaire de l'antigène apparaît particulièrement sensible aux facteurs environnants. En effet, en fonction du lot préparatif utilisé, les fractions F2 et F3 en l'absence de réducteur, se présentent soit sous forme monomère (préparation a), soit sous forme d'un mélange de monomère et de dimère (préparation b) [figure 39]. En conséquence, les antigènes variables que nous étudions semblent capables de former des dimères par liaison disulfure mais cependant l'association en dimère n'est pas toujours retrouvée dans la même proportion selon le variant.

La confirmation d'une liaison disulfure dans la dimérisation des antigènes a été apportée par un marquage des fractions antigéniques par l'iodo[1 <sup>14</sup>C] acétamide. Les fractions F2 et F3 de chaque variant (AnTat 1.1, 1.10, 1.8 préparation a et 1.8 préparation b) ont fait l'objet de cette étude. Après le marquage, les échantillons ont été analysés en électrophorèse en présence de SDS dans des conditions natives ou réductrices. La figure 40 illustre la révélation après coloration au bleu Coomassie (40 A) et après autoradiographie (40 B).

L'analyse, dans des conditions natives, montre que seuls les monomères sont marqués et ceci au prorata de leur présence dans l'échantillon. Si les fractions sont, préalablement à l'électrophorèse, réduites par le  $\beta$ -mercaptoéthanol, une radioactivité importante est mise en évidence au niveau des fractions F2 et F3 de la préparation a (forme monomère) du variant AnTat 1.8 tandis que les autres fractions ne sont que faiblement marquées.

Ces résultats permettent la mise en évidence d'un thiol libre dans les formes

Variant AnTat 1.8 : Profil électrophorétique des fractions antigéniques purifiées par affinité sur Concanavalline A-sépharose



S - standard de taille moléculaire

1 - fraction F2

2 - fraction F3

gel de polyacrylamide 5-30% en présence de SDS, respectivement en l'absence (A) et en présence de mercaptoéthanol (B)

tampons de dissolution des échantillons

A : Tris - HCl 0,0625 M, SDS 2%, glycérol 10% pH 6,8

B : Tris - HCl 0,0625 M, SDS 2%, glycéro 10%,  $\beta$ - mercaptoéthanol 5% pH 6,8

Figure 39

Marquage par l'iodo ( $^{14}\text{C}$ ) 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

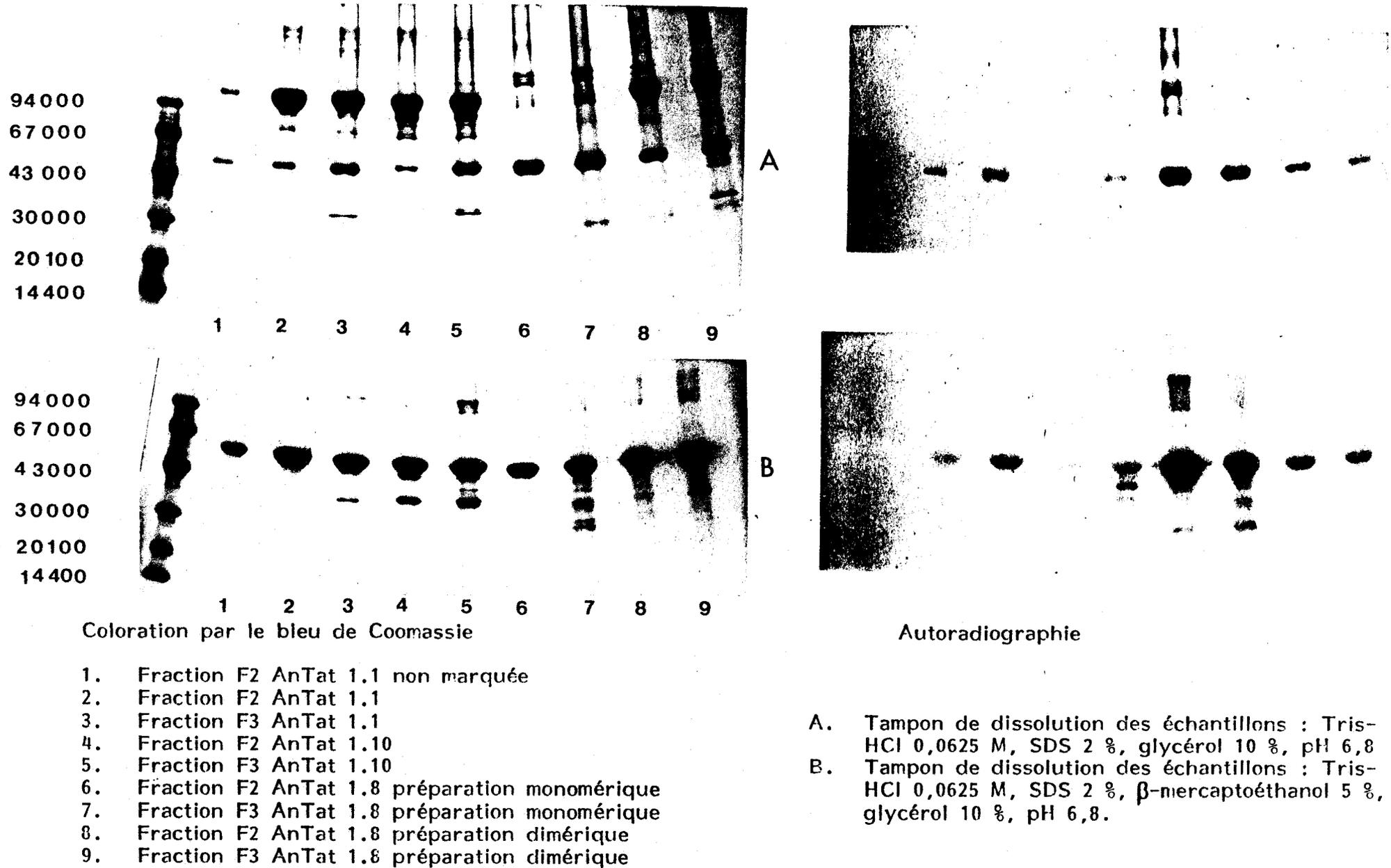


FIGURE 40

monomères des AVS et l'absence de ce thiol dans les formes dimères. Ce résidu-SH pourrait donc être impliqué dans la formation d'un pont disulfure inter-AVS selon un haut rendement pour les variants AnTat 1.1 et AnTat 1.10 et un rendement aléatoire pour le variant AnTat 1.8 pour lequel nous observons une proportion de dimère variant de 0 à 50% seulement. Il nous est apparu intéressant de rapprocher ces observations expérimentales de la répartition des résidus de cystéine dans les séquences cDNA de chaque variant antigénique.

Un seul AVS est connu quant à l'organisation des ponts disulfure, il s'agit de l'AVS 117 de T.b.brucei [ALLEN et GURNETT (1983)(4)] qui se trouve être justement un isotype de l'AVS AnTat 1.8 [MATTHYSSENS et coll. (1981)(126)]. Pour cet antigène, les ponts disulfure sont seulement intrachainés : deux sont localisés dans la partie amino-terminale (<sup>14</sup>CYS - CYS<sup>140</sup>, <sup>120</sup>CYS-CYS<sup>182</sup>) et 4 dans la partie carboxyterminale (<sup>390</sup>CYS - CYS<sup>405</sup>, <sup>398</sup>CYS-CYS<sup>415</sup>, <sup>447</sup>CYS-CYS<sup>461</sup>, <sup>455</sup>CYS-CYS<sup>468</sup>) et il existe un résidu de cystéine libre en position 244 [ figure 41 ] .

Nous savons en fonction des séquences cDNA [PAYS et coll. (1983)(141)] que les antigènes variables 1.1 et 1.10 sont constitués de 13 résidus de cystéine tout comme l'AVS 117. La localisation de ces résidus est tout à fait semblable à celle décrite pour l'AVS 117 à l'exception du 5ème résidu thiol. Cette observation nous permettait de préjuger pour AnTat 1.1 et 1.10 d'une organisation parallèle des ponts disulfure dans les parties amino- et carboxy-terminales. Dans cette hypothèse, le résidu de cystéine supplémentaire serait localisé en position 358 c'est à dire dans la région charnière interdomaine [GOMES et coll. (1986)(64)]. Pour le variant AnTat 1.8, qui est, rappelons-le, isotype de l'AVS 117, la localisation du 5ème résidu de cystéine n'a pas encore été définitivement établie mais l'on peut supposer une situation similaire à celle décrite pour le variant 117 qui possède une homologie presque totale au niveau des 92 derniers résidus C-terminaux.

En conclusion, les résultats spécialement pour AnTat 1.1 et 1.10 suggèraient l'existence d'un pont disulfure au niveau du manteau de surface.

L'analyse de la préparation antigénique avant l'étape chromatographique sur Concanavale-A sépharose nous a signalé l'existence déjà à ce stade d'une forme dimère de l'AVS. En conséquence, nous nous sommes intéressés à l'étude des formes moléculaires de l'antigène au cours du protocole de libération. Rappelons que dans nos conditions usuelles, les trypanosomes sont mis en agitation en tampon phosphate 0,125 M de pH 5,5 enrichi en glucose à la concentration finale de 1% pendant une nuit à 4°C. Nous avons choisi le variant AnTat 1.1 et retenu trois temps pour l'analyse du milieu de solubilisation du manteau de surface : 30 minutes, 2 heures et 20 heures. Le surnageant de centrifugation de chaque échantillon de la suspension parasitaire a été marqué par l'acide iodo [ 2-<sup>14</sup>C ] acétique puis analysé par électrophorèse en présence de SDS. La visualisation par coloration au bleu

Position des résidus de cystéine dans l' AVS 117  
et organisation des ponts disulfure [selon ALLEN et GURNETT (1983)]

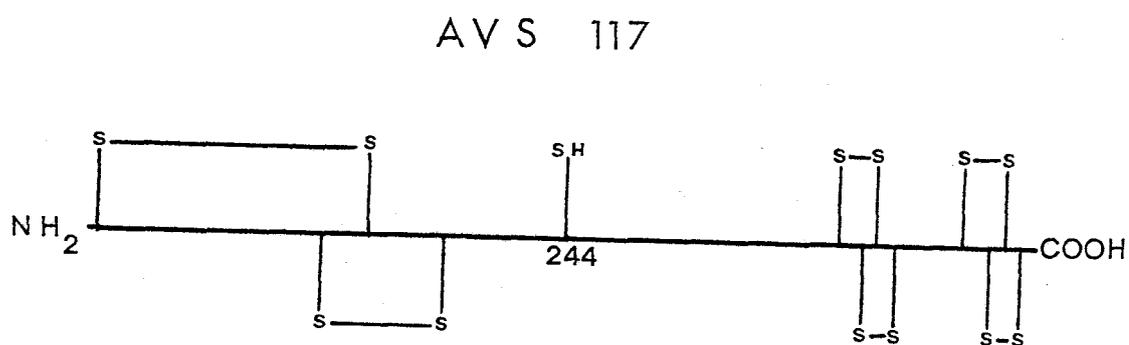
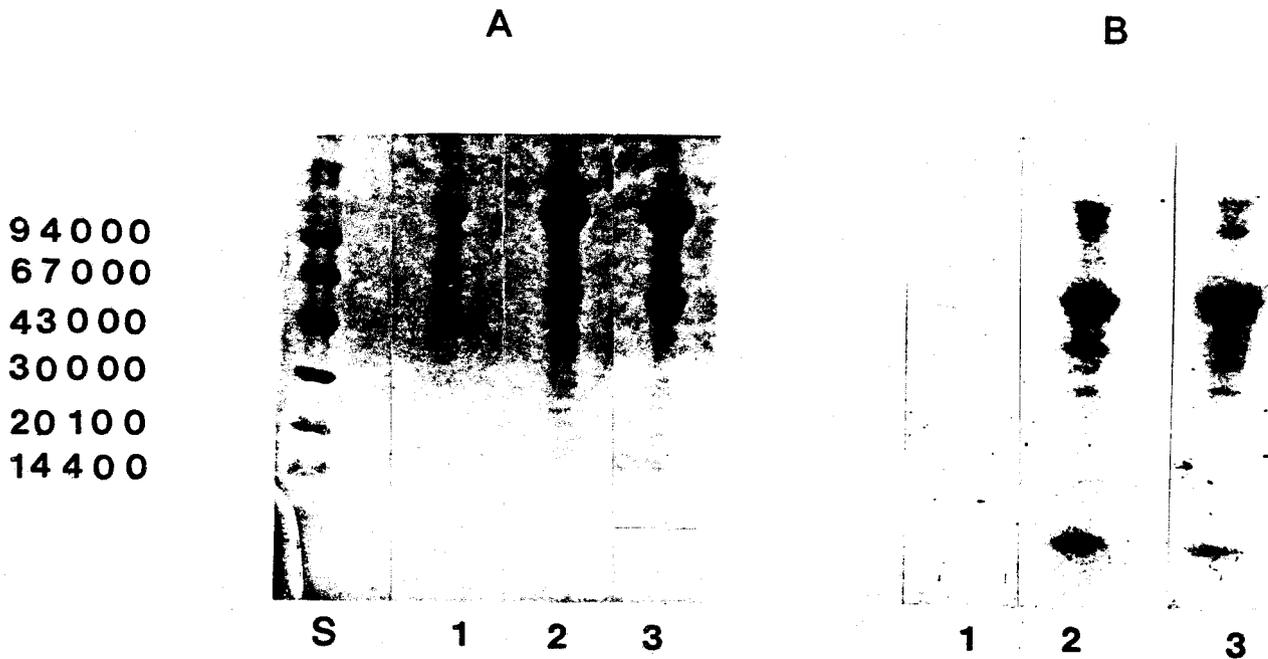


Figure 41

Marquage par l'acide iodo(2-<sup>14</sup>C)acétique d'un surnageant pH 5.5 d'une suspension parasitaire à différents temps d'incubation.



- A - Coloration au Bleu Coomassie
- B - Autoradiographie
- S - Standard de taille moléculaire
- 1 - 30 minutes
- 2 - 2 heures
- 3 - 20 heures

Figure 42

Coomassie [figure 42 A] ou autoradiographie [figure 42 B] montre que dès 30 minutes de libération, on observe essentiellement une bande de poids moléculaire 120 000. A ce stade, il n'y a aucune trace de radioactivité détectée. Après 2 h et 20 heures de libération de l'AVS, on observe en bleu Coomassie une quantité plus importante de la bande 120 000. après 20 heures, la présence de la bande 60 000 devient plus significative par rapport à la fraction 120 000. En autoradiographie, seule la bande 60 000 est révélée. Enfin, par immunoblot vis à vis d'un anticorps homologue anti AVS AnTat 1.1, une réaction positive a pu être notée au niveau des bandes de poids moléculaire 60 000 et 120 000 mais en intensité beaucoup plus élevée pour la bande 120 000.

Ces résultats montrent donc que dès le premier stade de libération, l'antigène se présente sous une forme dimère et que cette forme reste prépondérante par rapport à la forme monomère, l'évolution vers le monomère devient significative par des incubations prolongées.

En conclusion, il semble qu'une liaison disulfure intermoléculaire existe au niveau du manteau de surface du variant AnTat 1.1 et représente vraisemblablement un élément essentiel dans l'antigénicité spécifique de variant.

CLARKE et coll. (1987)(31) ont étudié la fixation d'anticorps mono- et polyclonaux sur des parasites vivants ou sur des fragments de la glycoprotéine de surface (clones WaTat 1.1 et WaTat 1.12) afin d'établir la carte des sites antigéniques exposés en surface. Leurs observations ont montré que les épitopes exposés à la surface de l'AVS représentent des assemblages moléculaires dont l'agencement est dépendant de la structure tertiaire native de la molécule. Là encore, la présence de phospholipides doit être soulignée comme facteur de structuration du manteau.

L'étude de l'organisation moléculaire des antigènes dans la structuration du manteau de surface représente donc un point essentiel dans l'approche des relations hôte-parasite.

## 2) Relation entre la polymérisation des antigènes et la réponse immunologique

Afin d'apprécier l'importance de l'état de polymérisation de l'antigène dans la réaction immunologique, nous avons comparé en première approche des préparations antigéniques monomère (a) et dimère (b) du variant AnTat 1.8 en faisant appel à la technique immunoenzymatique E.L.I.S.A., la réaction immunologique avec l'antigène étant envisagée vis à vis d'un immunosérum homologue (anti-AVS AnTat 1.8) et d'un immunosérum hétérologue (anti-AVS AnTat 1.1). \*

---

\* Nous remercions le Docteur Vervoort (Institut de Médecine Tropicale de Anvers) pour la préparation des différents immunosérums.

L'antigène sous forme monomère ou sous forme dimère est adsorbé sur la plaque de microtitration puis les différents immunosérums sont incubés à 37°C pendant 1 heure. Le complexe antigène-anticorps formé est mis en évidence par un second anticorps couplé à une enzyme (la phosphatase alcaline). Les détails techniques de ce protocole sont exposés dans l'appendice technique.

Les résultats obtenus sont illustrés figure 43 et montrent que :

- vis à vis de l'immunosérum homologue, la réponse est similaire pour la forme monomère ou dimère de l'AVS.
- vis à vis de l'immunosérum hétérologue, on note une réactivité légèrement plus faible mais significative pour la forme monomère.

On sait que la technique E.L.I.S.A. présente l'avantage de caractériser et de doser des épitopes conformationnels, chose impossible par l'immunoblotting.

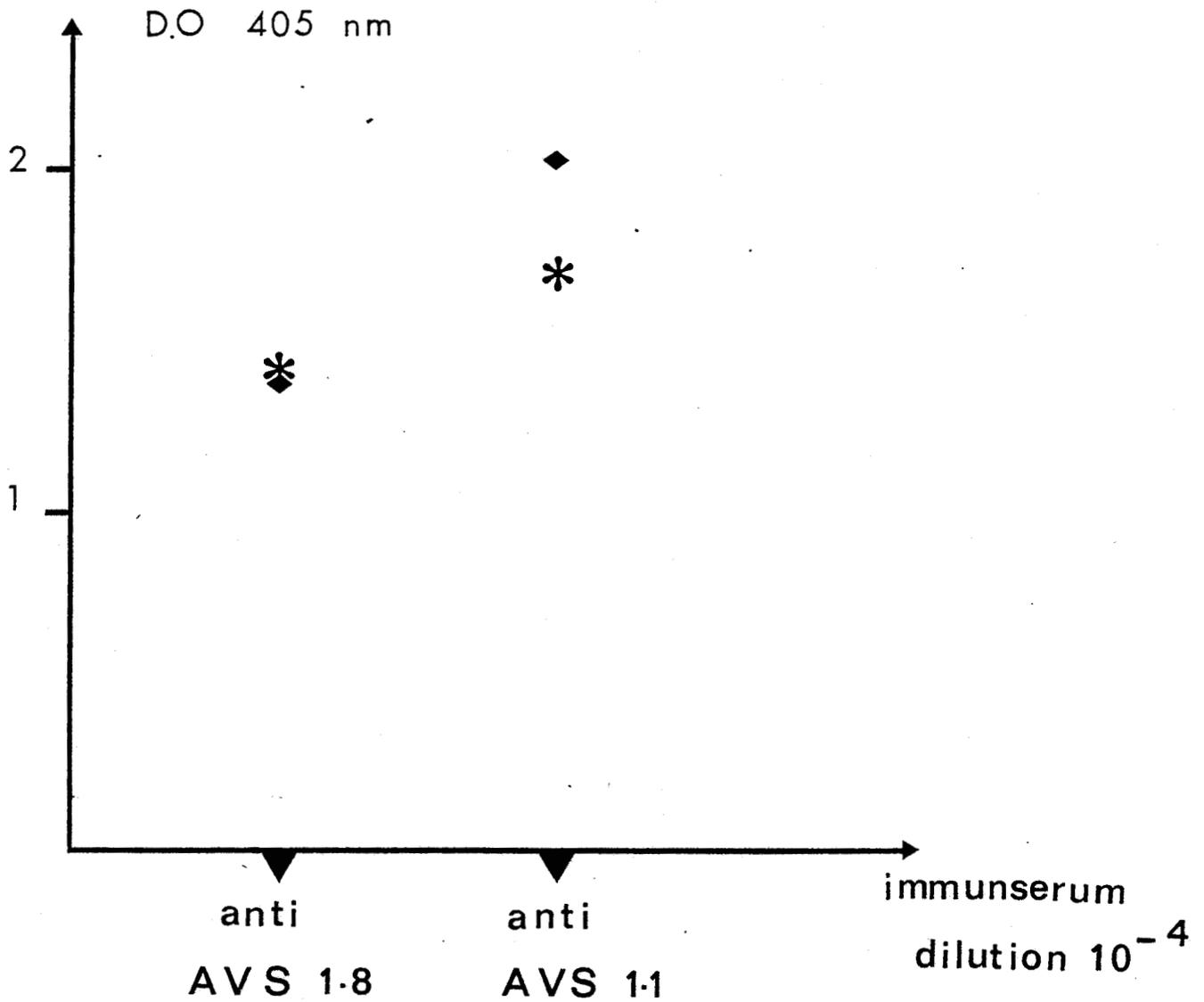
Les mêmes préparations antigéniques ont été testées par immunoblotting vis à vis des immunosérums précédemment utilisés. A l'aide de cette technique, il nous a été possible d'observer que seul l'AVS AnTat 1.8 sous forme monomère présente une réactivité immunologique vis à vis de l'immunosérum hétérologue alors que la réponse avec l'anti-AVS homologue est positive tant pour la préparation monomère que dimère.

Ces deux approches techniques permettent donc d'envisager l'existence d'un "épitope de réaction croisée" porté par la forme monomère, épitope masqué lorsque l'antigène se présente sous une conformation dimère. Cette hypothèse pourrait suggérer aussi une localisation de ce déterminant dans une région proche du pont disulfure inter-AVS.

Pour préciser plus avant s'il était possible de situer la localisation moléculaire des sites responsables de l'antigénicité croisée observée, la réponse des deux formes monomère et dimère de AnTat 1.8 a été étudiée vis à vis d'immunosérums obtenus à partir de fragments tryptiques purifiés de l'AVS AnTat 1.1 (fragments anti-domaine 2/3 N-terminal ou anti-domaine 1/3 C-terminal).

Les résultats sont présentés dans la figure 44. On observe une réponse assez constante de la forme dimère vis à vis de l'immunosérum hétérologue anti-AVS AnTat 1.1 ou des immunosérums anti-domaines N- et C- terminaux de ce même AVS. A l'opposé, la forme monomère qui présente une réactivité significative vis à vis de l'immunosérum hétérologue

Représentation graphique de la réactivité immunologique des préparations antigéniques  
(fraction F2) du variant AnTat 1.8 par test ELISA



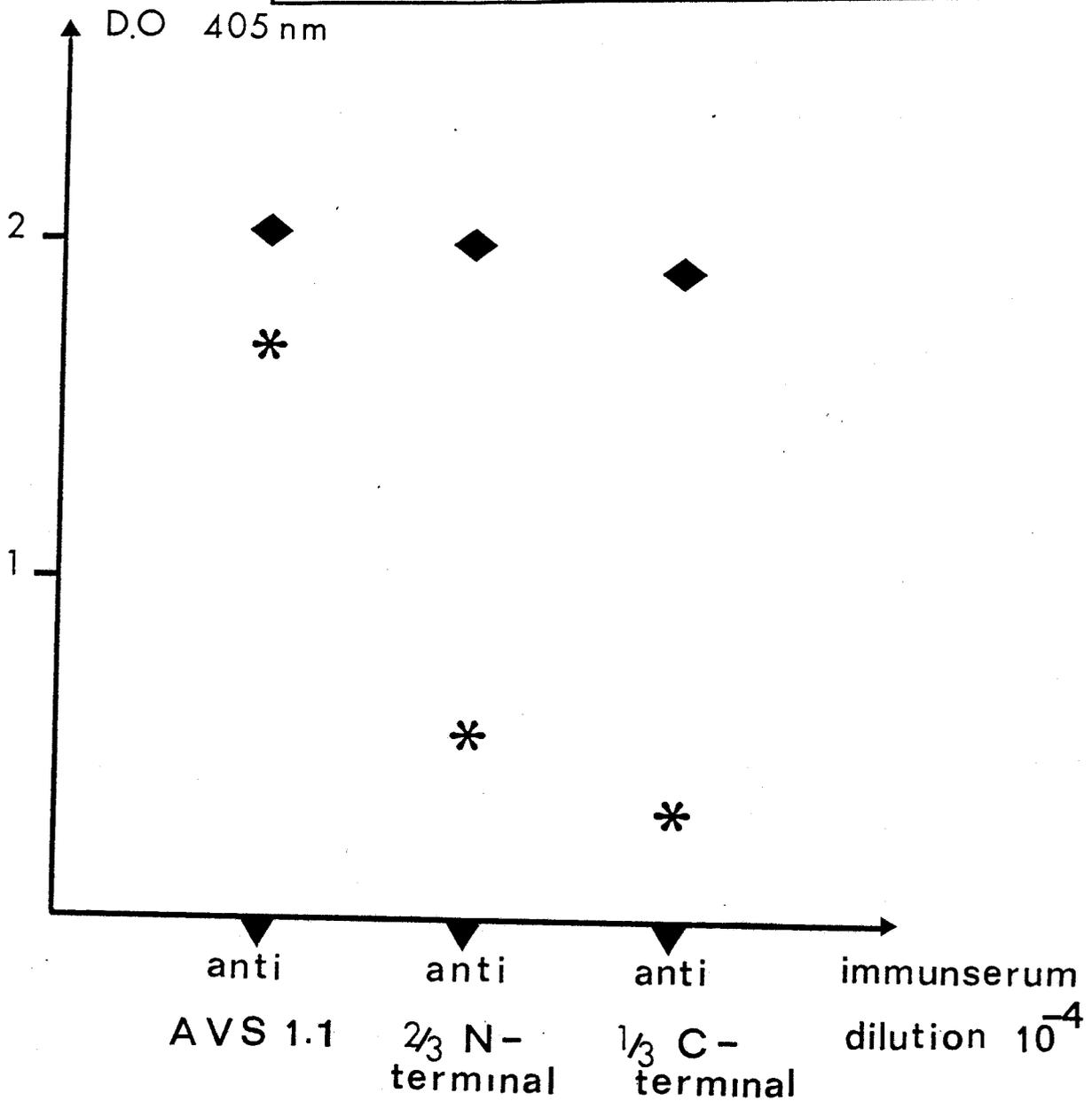
- l'antigène est fixé sur la plaque de microtitration à la concentration de  $5\mu\text{g/ml}$

\* - F2 AnTat 1.8 préparation a (monomère)

◆ - F2 AnTat 1.8 préparation b (dimère)

Figure 43

Représentation graphique de la réactivité immunologique des préparations antigéniques AnTat 1-8 ( fraction F<sub>2</sub> ) vis à vis d'immunsérums hétérologues en test E.L.I.S.A.



l'antigène est fixé sur la plaque de microtitration à la concentration de 5 µg/ml

- \* F<sub>2</sub> AnTat 1-8 préparation a ( monomère )
- ◆ F<sub>2</sub> AnTat 1-8 préparation b ( dimère )

Figure 44

donne une réponse nettement moindre vis à vis de l'immunsérum anti-fragment N-terminal et presque négligeable vis à vis de l'immunsérum anti-fragment C-terminal.

La polymérisation des AVS sous forme dimère serait donc à l'origine de l'expression d'épitopes conformationnels communs à plusieurs antigènes variables.

Notre travail expérimental montre également sans ambiguïté la notion d'un profond changement d'architecture moléculaire au niveau des 2 régions majeures de l'antigène lorsque celui-ci est réduit à l'état de monomère.

Au total, l'ensemble des données acquises est intéressant dans la mesure :

1) où nos expériences de suivi conformationnel en rapport avec le protocole de libération de l'antigène adopté ont permis de montrer que la conformation dimère est la conformation "naturelle" en surface du parasite.

2) où la définition "antigénique" de l'AVS ne peut se concevoir qu'en rapport étroit avec l'organisation en manteau du dimère : élément base de la structure.

Il est établi que la spécificité antigénique du variant AnTat 1.8 est très "conservée", et retrouvée au niveau des espèces de trypanosomes et en particulier des espèces pathogènes pour l'homme (T.b. rhodesiense et T.b. gambiense). Des tests diagnostiques sont actuellement utilisés et reposent sur cette propriété. Ils ont été en Afrique les premiers tests à véritablement apporter un argument biologique sur le terrain.

Leur amélioration devrait, en fonction de nos observations posées, pouvoir être obtenue en tenant compte de l'organisation moléculaire des AVS et en optimisant l'utilisation d'épitopes conformationnels.

La seconde partie de ce travail est orientée vers l'étude des facteurs trypanocides sériques.

## **VI - Etude de l'interaction parasite - lipoprotéine**

T.b.brucei est non pathogène pour l'homme et plusieurs auteurs [ RIFKIN 1978a)(152), GILLET (1987) (63)] ont décrit l'existence d'un facteur trypanocide pour cette espèce, facteur localisé dans le sérum humain au niveau des lipoprotéines de haute densité (HDL) . Ce facteur est responsable de la lyse parasitaire, lyse dont le mécanisme exact et spécifique est encore inconnu. L'hypothèse retenue en général est celle proposée par RIFKIN (1978a) (152) : les HDL humaines "prélèveraient" le cholestérol de la membrane plasmique parasitaire et en conséquence viendraient en altérer les caractéristiques de perméabilité. Selon Rifkin, le manteau de surface constituerait un obstacle à l'interaction HDL/trypanosome et apparait ici encore comme un élément fondamental de protection du parasite.

Aussi, nous avons envisagé une étude des interactions entre les HDL et les trypanosomes entiers ou partiellement débarrassés de leur manteau de surface. Nous avons aussi recherché les interactions entre les HDL et les antigènes de surface purifiés et même entre les HDL et des fragments représentatifs des domaines moléculaires constituant l'antigène variable.

La première étape du travail, délicate sur le plan technique, consistait en la préparation des lipoprotéines. Nous avons ainsi préparé des HDL de sérum humain et des HDL de sérum de boeuf, animal pour lequel T.b.brucei est pathogène.

### **1 - Préparation des lipoprotéines**

#### **a - Ultracentrifugation de flottaison**

La préparation de lipoprotéines a été réalisée à partir de pools de sérum : sérum humain et sérum bovin. Chaque sérum a été préalablement étudié dans ses paramètres

lipidiques. Le tableau 12 illustre les valeurs moyennes obtenues. On note que de très faibles différences sont observées entre sérum humain et sérum bovin en ce qui concerne cholestérol, phospholipides et triglycérides.

Pour la séparation des lipoprotéines, nous avons utilisé l'ultracentrifugation de flottaison selon la méthode décrite par HAVEL et coll. (1955)(82), protocole détaillé dans l'appendice technique.

Les lipoprotéines sont isolées à des densités caractéristiques :

\*  $d = 1,006$  : VLDL (very low density lipoprotein)

\*  $d = 1,063$  : LDL (low density lipoprotein)

\*  $d = 1,21$  : HDL (high density lipoprotein)

Après avoir testé différents protocoles (congélation, lyophilisation...), toutes les précautions sont prises avant séparation et après séparation pour conserver les lipoprotéines dans leur état natif : les fractions lipoprotéiques isolées ou dessalées par chromatographie ont été conservées à 4°C et utilisées le plus rapidement possible afin de minimiser les problèmes de dénaturation.

#### b - Etudes électrophorétiques

La pureté de chacune des préparations de lipoprotéines a été vérifiée sur lipidogramme. L'étude électrophorétique en présence de SDS des mêmes préparations a permis d'étudier le contenu apolipoprotéinique de chacune des lipoprotéines isolées.

Pour la fraction des VLDL (figure 45), le profil électrophorétique montre une bande de haut poids moléculaire représentative de l'apolipoprotéine B, ainsi que deux bandes de faible taille moléculaire correspondant respectivement aux apolipoprotéines E (poids moléculaire de 35 000) et aux apolipoprotéines C (poids moléculaire inférieure à 10 000).

La fraction LDL (figure 45) est essentiellement représentée par une bande majeure correspondant à l'apolipoprotéine B<sub>100</sub> avec présence en faible quantité des apolipoprotéines B<sub>74</sub>, B<sub>26</sub>, E et C.

Le profil électrophorétique des HDL (figure 46) révèle une bande majeure de poids moléculaire apparent 28 000, correspondant à l'apolipoprotéine A<sub>I</sub>, avec également présence en plus faible quantité d'apolipoprotéines A<sub>II</sub> et C.

Principales caractéristiques  
des sérums humain et bovin

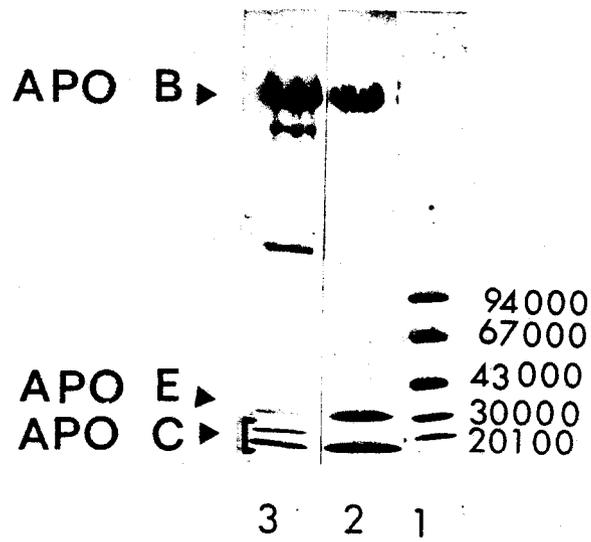
	Sérum humain	Sérum bovin
Cholestérol total	1,72	1,22
estérifié	1,30	0,94
libre	0,42	0,31
Phospholipides	1,78	1,11
Triglycérides	1,21	0,93
Apolipoprotéines ( A <sub>totales</sub>	2,10	
( A <sub>I</sub>	1,52	ND
( B	0,82	

\* Valeurs exprimées en gramme par litre

ND : non déterminé

Profil électrophorétique des lipoprotéines humaines VLDL et LDL

gel de polyacrylamide en gradient 2-10% en présence de SDS

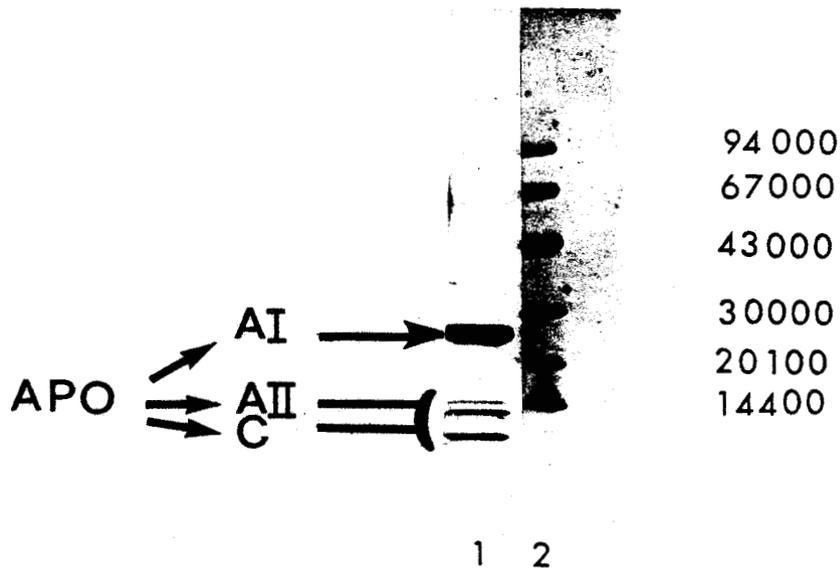


- 1 - standard
- 2 - fraction VLDL purifiée
- 3 - fraction LDL purifiée

Figure 45

Profil électrophorétique des lipoprotéines humaines HDL

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



1 - fraction HDL purifiée

2 - standard de poids moléculaire

Figure 46

Les fractions VLDL et HDL ont également été analysées en isoélectrofocalisation en gel d'acrylamide à 5% en présence d'urée 6 M selon un gradient de pH variant de 4,0 à 6,5 unités pH. La figure 47 illustre les profils obtenus pour ces deux lipoprotéines :

- cette technique met en évidence , dans les VLDL humaines, les différentes isoformes des apolipoprotéines E et C.

- pour les HDL humaines, il existe une hétérogénéité dans une zone de pHi comprise entre 5,64 et 5,40 avec une bande majeure de pHi 5,60 caractéristique de l'apolipoprotéine A<sub>I</sub>.

Ainsi préparées, caractérisées, les lipoprotéines ont été testées pour leur capacité d'interaction avec les trypanosomes.

## 2 - Interaction lipoprotéines-parasites

### a - Principe d'étude

L'étude de l'interaction entre lipoprotéines, apolipoprotéines et trypanosomes a été envisagée par test immunocytochimique avec 2 types de révélation : l'immunofluorescence [ BAILEY et coll. (1967) (8) ] ou la révélation enzymatique (péroxydase de Raifort).

Les tests d'immunocytochimie (révélation par fluorescence ou par enzyme) sont réalisés sur un frottis sanguin fixé à l'acétone. Puis successivement vont être déposées sur le frottis, des solutions diluées de lipoprotéines ou d'apolipoprotéines purifiées, des solutions d'anticorps anti-apolipoprotéine humaine spécifique obtenus chez la chèvre et enfin des solutions d'immunoglobulines de type IgG de lapin anti IgG de chèvre.

La révélation de l'interaction lipoprotéine ou apolipoprotéine-parasite s'effectue :

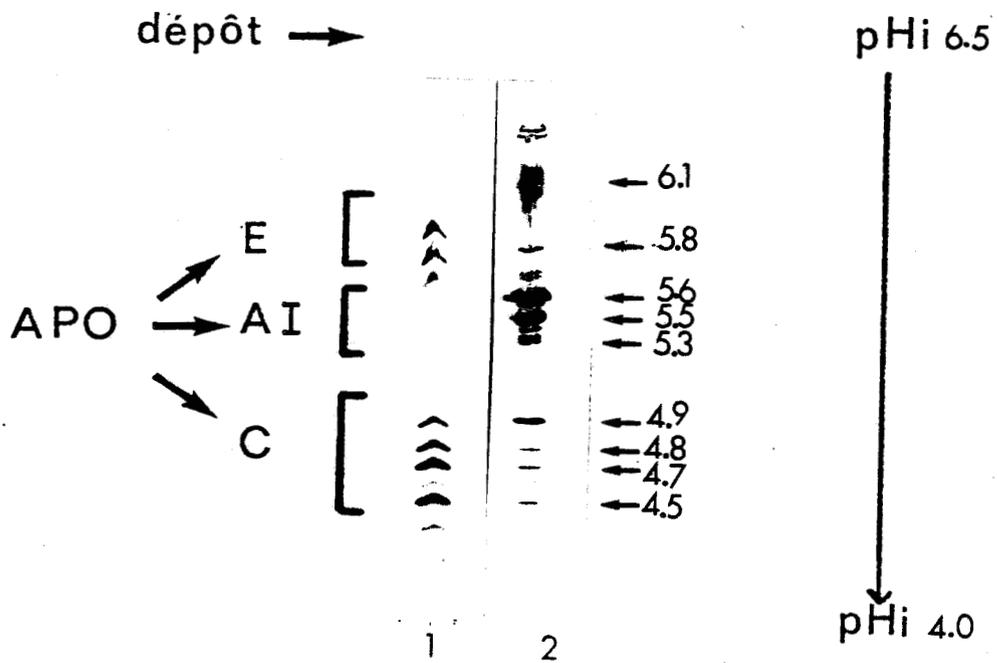
. dans le cas de l'immunofluorescence à l'aide d'un chromophore (FITC) fixé au dernier anticorps utilisé

. dans le cas du marquage enzymatique, par une réaction enzyme-substrat [système peroxydase de Raifort - 3,3'-diaminobenzidine tétra-HCl (DAB)] .

Isoélectrofocalisation des lipoprotéines

\* gel d'acrylamide en 5% en présence d'urée 6M

\* gradient de pHi variant de 4 à 6,5



1 - fraction VLDL purifiée )  
2 - fraction HDL purifiée ) humaines

Figure 47

L'étude de l'interaction entre lipoprotéine HDL, apolipoprotéine A<sub>I</sub> et antigène variable a été envisagée :

- \* par test immunoenzymatique E.L.I.S.A.
- \* par dichroïsme circulaire.

Le modèle Trypanosome retenu pour cette étude est le clone AnTat 1.1 dont nous possédons l'antigène en quantité suffisante sous forme "native" dimère.

#### b - Fixation des HDL

##### α - Sur parasites entiers

Lors des études immunocytochimiques qui ont pour but la mise en évidence d'interaction HDL-parasite, l'appréciation qualitative et quantitative de la réponse est estimée au regard d'un test référence. Ce test témoin positif est une reconnaissance du parasite par l'immunsérum homologue de la souche étudiée (immunsérum recueilli au 6ème jour de l'évolution d'une trypanosomiase chez le lapin), l'utilisation d'un anticorps anti-IgG de lapin étant le révélateur final. Les deux types de marquage (fluorescence puis peroxydase) ont été retenus quand l'interprétation était délicate (influence des sels dans les préparations testées sur la qualité de la fluorescence).

Nous ne présentons dans ce mémoire que l'étude menée avec les HDL puisque cette classe de lipoprotéines est la seule à être active sans ambiguïté sur parasite.

Cette interaction entre les parasites et les HDL humaines a été recherchée :

- sur HDL isolées, utilisées directement après ultracentrifugation (elles sont alors encore contaminées par les sels (NaCl et KBr) ayant servi à la préparation du gradient).
- sur HDL isolées par ultracentrifugation et ayant subi une étape supplémentaire de chromatographie de gel filtration sur Sephadex G<sub>25</sub> (protocole décrit dans l'appendice technique) en vue d'éliminer les sels.

En utilisant :

- des trypanosomes intacts
- des trypanosomes débarrassés partiellement de leur manteau de surface (action d'un tampon phosphate de pH 5.5 pendant 30 minutes)
- des parasites ayant perdu leur manteau de surface par incubation une nuit en tampon phosphate glucosé de pH 8.0

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 13. On note les points suivants :

- les HDL sont capables de se fixer sur les parasites intacts ou débarrassés partiellement de leur revêtement de surface. En revanche, aucune interaction n'est observée lorsque les

**Etude de l'interaction lipoprotéine-parasite  
par tests immunocytochimiques**

	<b>Antisérum homologue anti-AVS1.1</b>	<b>fraction HDL isolée par ultracentrifugation</b>	<b>fraction HDL isolée par ultra- centrifugation et purifiée par chro- matographie de gel filtration</b>
<b>Parasites intacts</b>	+	+	++
<b>Parasites partiellement débarassés du manteau de surface</b>	+	+	++
<b>Parasites ayant perdu leur manteau de surface</b>	-	-	-

+ : fluorescence et coloration intense au niveau du manteau de surface

- : pas de fluorescence ni de coloration en surface parasitaire

Tableau 13

parasites ont été soumis à un traitement prolongé permettant la libération complète des antigènes de surface.

Signalons aussi que le potentiel interactif des HDL est nettement augmenté après élimination des sels par chromatographie de gel filtration.

Au total, ce premier résultat laisse entendre une participation plutôt active du manteau de surface dans l'interaction HDL-trypanosome.

### β - Sur l'antigène variable purifié

Le manteau de surface étant essentiellement constitué par l'antigène variable, nous avons étudié la fixation des HDL sur la molécule antigénique purifiée sous forme dimère native.

Cette étude a été menée selon deux protocoles :

- par test immunoenzymatique E.L.I.S.A.
- par dichroïsme circulaire

#### \* Par test immunoenzymatique E.L.I.S.A.

Pour réaliser ce test, une solution de fraction antigénique purifiée (F 2 ConA-Sephrose en concentration finale de 0,05 µg/ml) est adsorbée au niveau des puits d'une plaque de microtitration. Les HDL, préalablement diluées en tampon phosphate de sodium 0,01M de pH 7.20, sont mises en contact avec l'antigène adsorbé. La révélation du complexe éventuel est effectué par incubation successive d'un anticorps anti-apolipoprotéine humaine fabriqué chez la chèvre puis d'un anticorps anti-immunoglobulines de chèvre obtenu chez le lapin et marqué à la peroxydase. Enfin, le substrat spécifique [ acide 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline) sulfonique (ABTS)-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] est ajouté. Après incubation, l'intensité de la coloration verte est observée [ les conditions opératoires sont détaillées dans l'appendice technique] .

Les résultats ont permis de montrer qu'il y a fixation des HDL humaines sur l'antigène variable selon un système saturable (figure 48).

Ce résultat laisse donc entendre l'existence de récepteurs spécifiques pour les HDL humaines au niveau de l'AVS.

C'est une donnée qu'il est important de souligner en fonction des résultats contradictoires publiés dans ce domaine sur parasites étudiés in vivo et utilisés pour établir la notion de fixation limite et donc de saturation. Citons deux exemples :

1) Celle de Rifkin (1983)(154) qui a étudié la fixation des HDL sur parasites vivants. L'incubation de trypanosomes (à la concentration de 3 à 5 . 10<sup>7</sup> cellules / ml ) et de HDL radiomarquées à l'iode <sup>125</sup> I est réalisée à 4 ° C pendant 2 heures. Des aliquotes

Etude de la fixation des HDL humaines sur l'antigène variable purifié par test ELISA

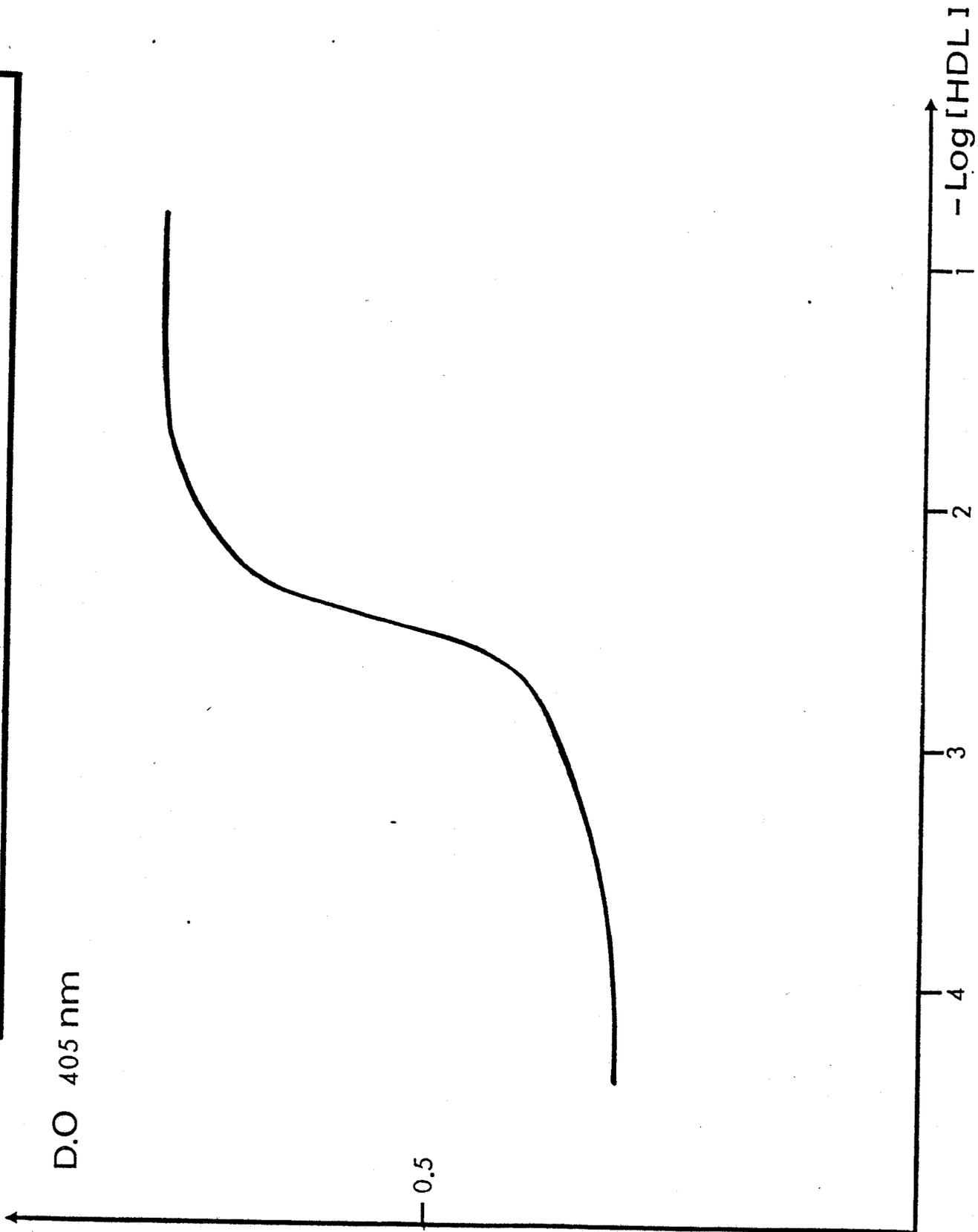


Figure 48

régulièrement prélevées de ce milieu d'incubation sont centrifugées à basse vitesse ; le culot parasitaire ainsi obtenu est alors compté afin de déterminer la radioactivité associée aux parasites, celle-ci étant significative d'une interaction HDL-trypanosomes.

Ce protocole a permis la mise en évidence d'une association immédiate à 4°C. La quantification révèle que  $10^3$  à  $2.2 \cdot 10^4$  molécules de HDL sont fixés par trypanosome. Cette fixation se révèle être réversible et non saturable malgré l'utilisation d'une concentration élevée en HDL (supérieure à 1,22 mg/ml soit  $15 \cdot 10^4$  molécules / ml).

Ces résultats dans leur ensemble sont donc en opposition avec la notion de récepteurs spécifiques à HDL en surface parasitaire.

2) Plus récemment, celle de GILLETT et coll. (1987)(63) qui ont étudié également le mode de fixation des lipoprotéines au niveau des parasites vivants, et en particulier l'interaction potentielle des HDL et des LDL.

Une suspension de  $5 \cdot 10^7$  trypanosomes/ml est incubée pendant 30 minutes à 0°C en présence de quantités croissantes de HDL à apolipoprotéine A ou HDL à apolipoprotéine E marquées à l'iode  $^{125}$  I [le fractionnement de ces deux classes de HDL étant obtenu par chromatographie d'affinité sur héparine-sépharose selon le protocole décrit par WEISGRABER et coll. (1980) (179)] Des aliquotes sont prélevées et centrifugées à basse vitesse afin d'obtenir un culot parasitaire. La quantification de la radioactivité associée aux parasites a permis de définir une fixation saturable pour les HDL à apolipoprotéine A alors que les HDL à apolipoprotéine E ainsi que les LDL se fixent sur le parasite selon un schéma non saturable.

Deux hypothèses à la lumière de ces articles pourraient être soulevées pour commenter nos résultats personnels :

1 - Les variations évoquées pourraient résulter d'une différence dans la qualité des HDL étudiées tenant au mode de préparation et de conservation.

2 - Nos préparations correspondent essentiellement à des HDL "à apolipoprotéine A".

\* par dichroïsme circulaire

L'interaction entre les HDL humaines et l'antigène variable a également été étudiée par dichroïsme circulaire afin de visualiser par cette technique un éventuel changement de structure secondaire au moment de la reconnaissance intermoléculaire.

Un spectre dichroïque de 180 à 250 nm est enregistré pour chaque fraction avant de procéder à leur mélange dans les proportions molaires AVS-HDL suivantes : 1/10, 2/10 et 5/10. L'informatisation du dichrographe permet le calcul et le tracé de la différence de spectre entre le spectre théorique calculé des deux molécules en mélange et le spectre expérimental réellement obtenu après la mise en contact des HDL et de l'AVS.

Lorsqu'il n'y a pas d'interaction, les effets dichroïques étant purement additifs, le spectre différentiel est nul.

Dans le cas HDL humaines/AVS AnTat 1.1, le spectre différentiel enregistré montre qu'il y a perte d'hélicité lorsque l'on met en présence ces deux molécules, ce qui traduit le phénomène interactif.

Nous avons recherché, à travers l'étude des fragments moléculaires représentatifs des principaux domaines caractérisant l'antigène, une localisation du phénomène interactif et avons fait appel à nouveau au test ELISA ou au dichroïsme circulaire.

χ) Sur les fragments antigéniques purifiés

Afin de préciser la localisation du ou des zones de réception des HDL au sein de l'AVS, nous avons analysé l'interaction des HDL avec les fragments tryptiques purifiés représentatifs des 2/3 N-terminal et 1/3 C-terminal de l'AVS.

L'approche expérimentale s'est faite :

\* par test immunoenzymatique ELISA

Ce test a été réalisé selon le protocole précédemment décrit. Dans nos conditions expérimentales, une réaction positive a été obtenue uniquement avec le fragment N-terminal de l'AVS [figure 49]. Aucune densité optique significative n'a été obtenue avec le fragment C-terminal.

\* par dichroïsme circulaire

Le même protocole d'étude par dichroïsme circulaire a été appliqué afin d'apprécier l'interaction éventuelle entre les HDL et le fragment moléculaire 2/3 N-terminal de l'AVS.

Le spectre différentiel observé sur le mélange lipoprotéine-domaine N-terminal montre une perte d'hélicité équivalente à celle observée précédemment avec l'AVS natif.

Il y a donc bien interaction entre les HDL et très vraisemblablement la toute extrémité N-terminale de l'AVS dont on a vu le caractère fortement hélicoïdal (cf chapitre IV).

Par contre, le spectre différentiel observé pour le mélange HDL-fragment 1/3 C-terminal de l'AVS s'est révélé peu significatif.

Nous avons voulu apprécier la participation relative de la copule lipidique ou protéique des HDL dans le phénomène d'interaction. Dans ce but, nous avons préparé, à partir de HDL purifiées, l'apolipoprotéine majeure A I.

Etude de la fixation des lipoprotéines sur l'antigène variable  
(fraction F2 ou fragment N-terminal)  
par test ELISA

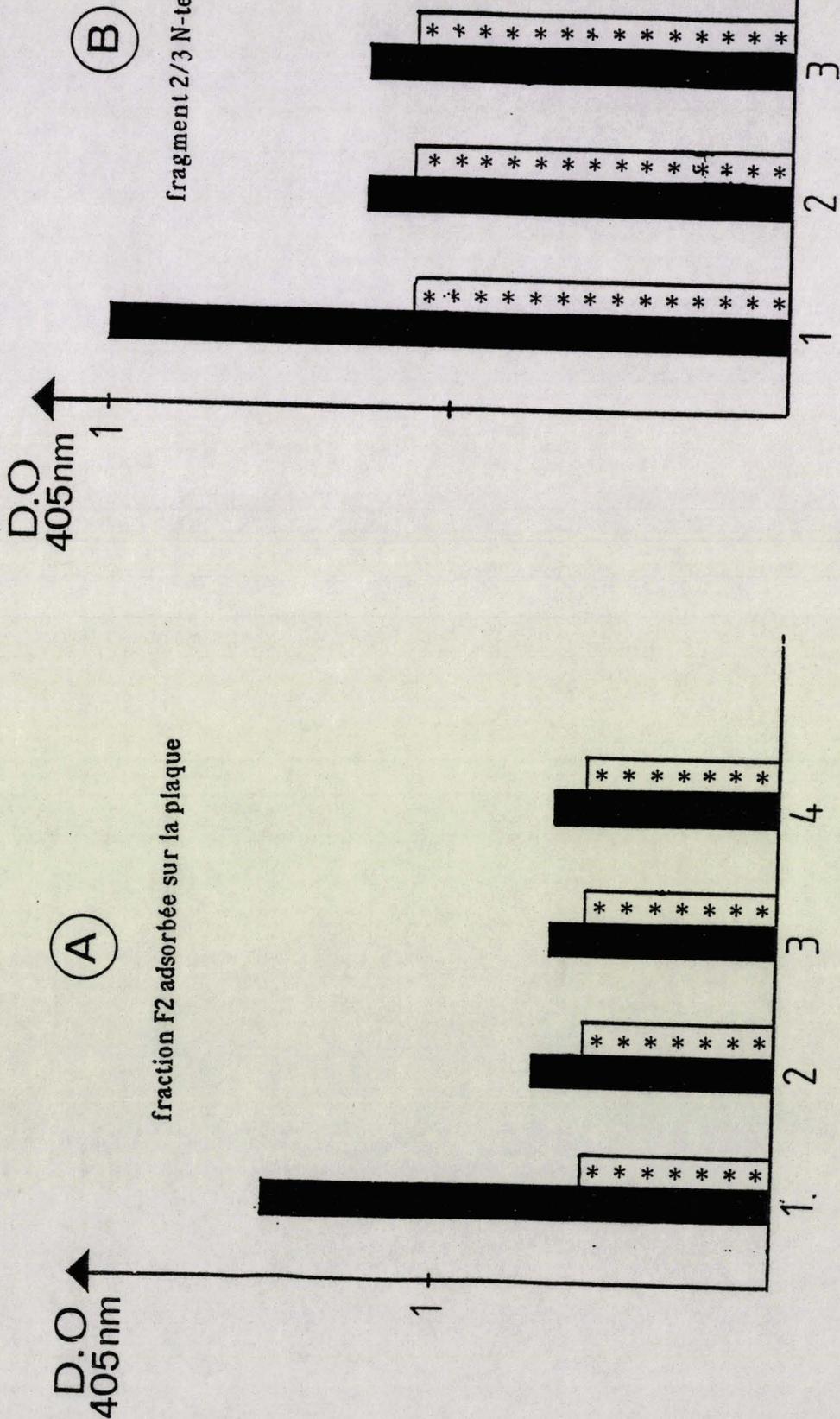


Figure 49

### c) Fixation de l'apolipoprotéine A I

#### $\alpha$ - Purification de l'apolipoprotéine A I

La fraction HDL purifiée par ultracentrifugation et lyophilisée est soumise à une délipidation par extraction organique dans un mélange chloroforme-méthanol (2 : 1, v/v).

Les apolipoprotéines ainsi obtenues dans la phase aqueuse sont alors solubilisées en tampon Tris 0.1M, urée 6M de pH 8.2 puis déposées sur une colonne de Séphacryl S-200 équilibrée dans ce même tampon.

Le profil d'éluion, suivie par lecture de la densité optique à 220 nm, livre 4 fractions [ figure 50]. Pour éviter les recouvrements, les fractions ont été poolées en éliminant les débuts et traînées de pics.

Chacune de ces fractions a ensuite été analysée en gel de polyacrylamide en présence de SDS pour en apprécier le degré de pureté [figure 51] :

- la fraction 1 ne contient qu'une faible quantité de protéine telle que l'atteste l'absence de bande colorée par le bleu Coomassie.
- la fraction 2 est essentiellement constituée par une bande de taille moléculaire apparente 28 000 qui représente l'apolipoprotéine A I.
- la fraction 3 contient une bande majeure de taille moléculaire apparente 17 000, cette bande correspondant à l'apolipoprotéine A II.
- la fraction 4 contient, à l'état de traces, des constituants de faible poids moléculaire.

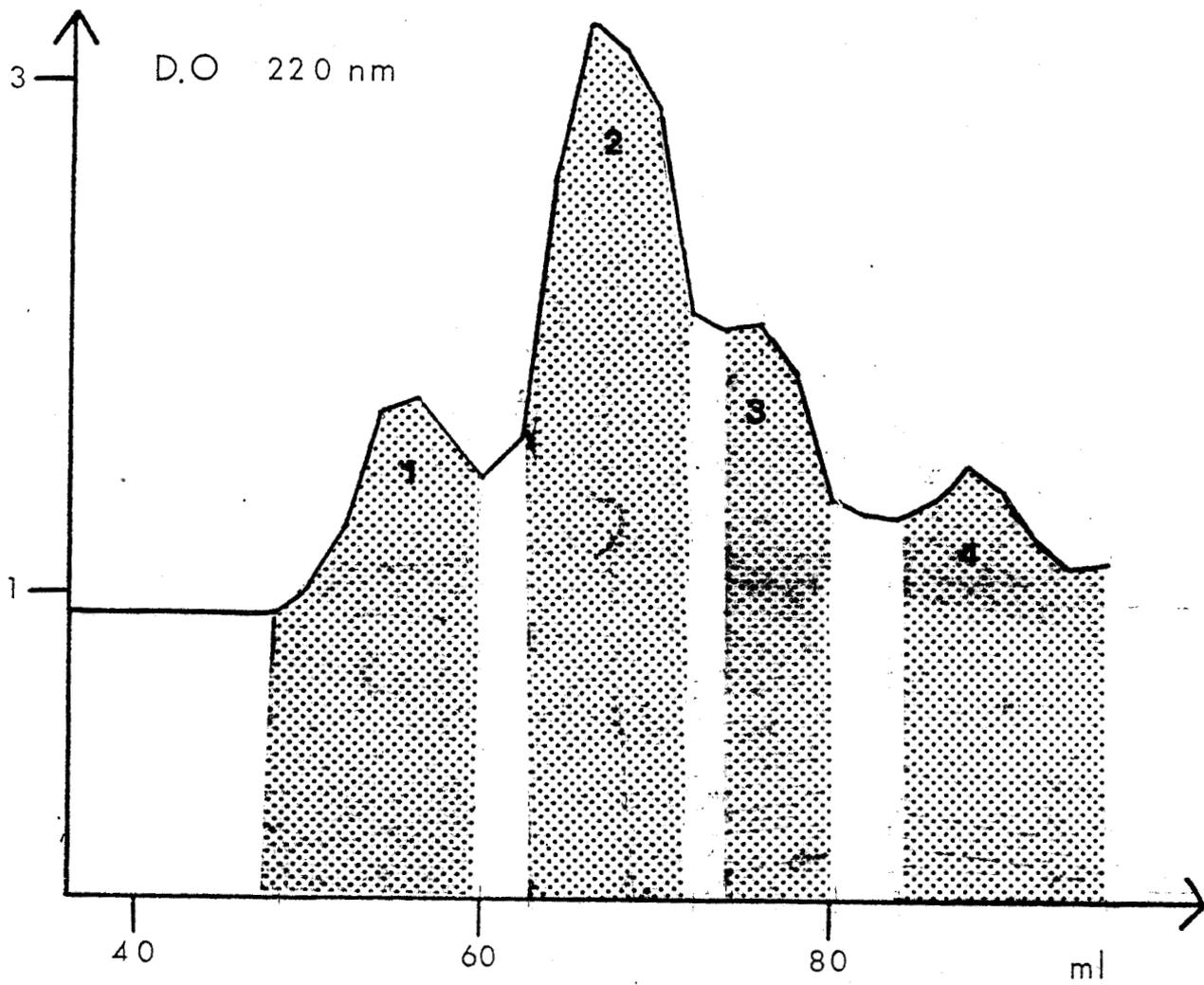
Ainsi purifiée, l'apolipoprotéine A I a été utilisée afin de déterminer son éventuelle fixation sur le parasite entier ou son potentiel interactif avec l'antigène variable.

#### $\beta$ - Interaction de l'apolipoprotéine A I avec les parasites entiers

Par les techniques immunocytochimiques déjà utilisées, nous avons étudié la fixation éventuelle de l'apolipoprotéine A I sur parasites.

Nous avons pu observer que les trypanosomes étaient marqués en surface très intensément et d'une manière plus diffuse que pour les HDL où le marquage apparaît sous l'aspect d'un liseré membranaire fin, continu et homogène.

Profil chromatographique de gel filtration de la fraction HDL humaine délipidée

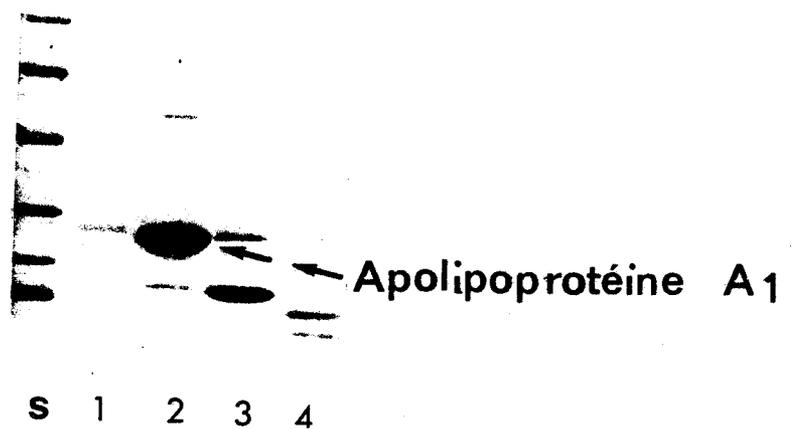


Séparation sur gel de sephacryl S 200 superfine  
tampon d'élution : urée 6 M, Tris 0,1 M pH 8,2

Figure 50

Profil électrophorétique des fractions purifiées sur Sephacryl S 200

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



- S - standard
- 1 - fraction 1
- 2 - fraction 2
- 3 - fraction 3
- 4 - fraction 4

Figure 51

$\chi$  - Fixation de l'apolipoprotéine A I sur antigène variable purifié et sur fragments purifiés

Pour cette étude, la technique immunoenzymatique ELISA a été retenue et réalisée dans les mêmes conditions que lors de l'étude de l'interaction HDL-AVS c'est-à-dire en choisissant le même rapport molaire apolipoprotéine-antigène.

Aucune interaction significative apolipoprotéine A I-AVS n'a été décelée [figure 49].

Dans des conditions techniques similaires, aucune fixation de l'apolipoprotéine A I n'a été aussi mise en évidence sur fragment représentatif des domaines N- ou C-terminal de l'antigène [ figure 49] et ceci malgré l'utilisation de concentrations jusqu'à 100 fois supérieures à celle choisie pour l'interaction HDL-antigène ou HDL-fragment N-terminal.

Ces derniers résultats sont assez surprenants dans la mesure où nous avons observé, sur parasites entiers fixés, une fixation très positive de l'apolipoprotéine A I.

Cette différence de fixation de l'apolipoprotéine A I vis à vis du parasite entier par rapport à l'antigène purifié permet de soulever deux hypothèses :

1 - L'affinité de l'apolipoprotéine A I n'est possible que sur l'antigène organisé en manteau à la surface du parasite, la dimérisation de l'AVS n'étant pas suffisante.

2 - La fixation de l'apolipoprotéine A I sur l'antigène nécessiterait la participation de certains constituants lipidiques, présents exclusivement au niveau du parasite entier. Cette hypothèse est possible dans la mesure où un complexe apolipoprotéine A I - dimyristoylphosphatidylcholine a été mis en évidence par JONAS (1977) lors de tentatives expérimentales de reconstitution de lipoprotéine à partir d'éléments base.

Signalons aussi que dans certaines conditions de traitement des parasites [action d'un tampon phosphate de sodium 0.06M glucosé à 0,1% de pH 8.0 (PSG)], conditions très voisines de celles adoptées pour l'élimination totale du manteau, nous obtenons un parasite :

- encore pourvu de manteau puisque réagissant encore en surface avec un anticorps anti-trypanosome 6<sup>ème</sup> jour.

- mais ayant perdu ses propriétés affines pour les HDL.

d) - Comparaison avec la fixation des lipoprotéines de boeuf

Le sérum de boeuf n'étant pas trypanocide pour le modèle T.b.brucei, nous avons étudié la fixation de lipoprotéines HDL et d'apolipoprotéines A I de boeuf sur le parasite entier ainsi que sur l'antigène variable ou ses fragments tryptiques purifiés.

Malgré une grande homologie de séquence peptidique et d'organisation moléculaire entre les apolipoprotéines A I humaine et bovine [ CHAPMAN (1980)(26) ], nous n'avons enregistré que peu de fixation d'HDL en surface parasitaire.

Signalons que nous avons utilisé dans nos révélations un anticorps anti-apolipoprotéine A I humaine.

Par test ELISA, aucune interaction n'a été mise en évidence entre HDL bovine ou apolipoprotéine A I bovine et antigène variable ou fragment N-terminal (figure 49) malgré la zone de concentration utilisée (variation relative de 1 à 100).

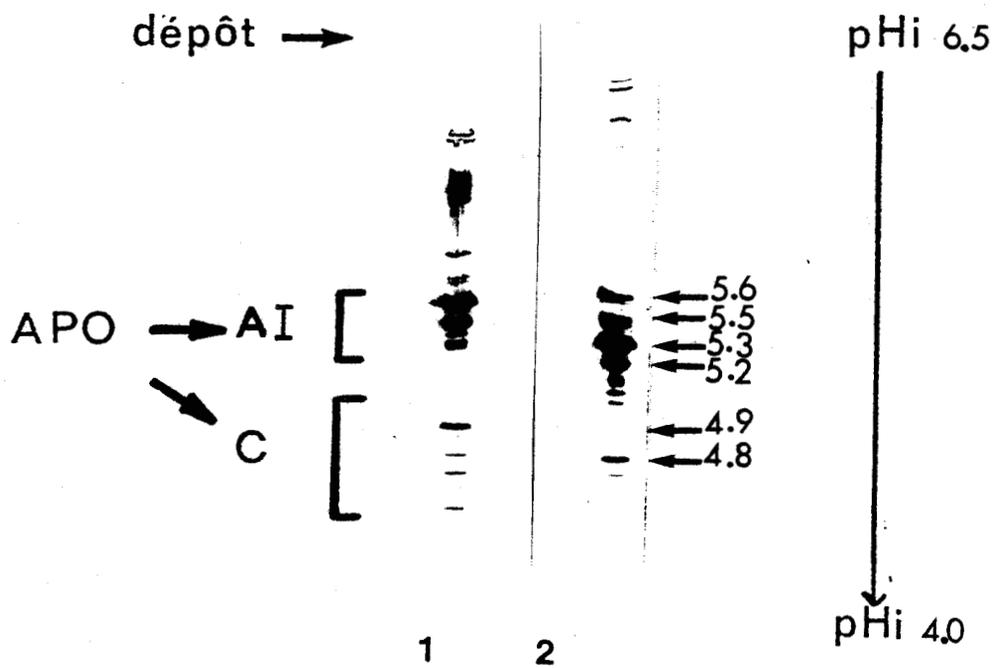
Aucun élément donc ne permet pour l'instant d'expliquer ces résultats. Rappelons que notre étude par isoélectrofocalisation des apolipoprotéines bovines a permis d'observer une différence nette dans la répartition des pHi par rapport à l'apolipoprotéine A I humaine (figure 52). Cette répartition différente de charge est-elle en relation avec nos résultats ?

De plus, au plan lipidique existent aussi des variations faibles au plan quantitatif mais à préciser en terme d'acides gras, de phospholipides, etc.....

Isoélectrofoc alisation des lipoprotéines

\* gel d'acrylamide en 5% en présence d'urée 6M

\* gradient de pHi variant de 4 à 6,5



1 - fraction HDL purifiée humaine

2 - fraction HDL purifiée bovine

Figure 52

## CONCLUSION

Depuis plus de dix ans, la recherche en matière de trypanosomiase a été orientée principalement vers l'étude du manteau de surface du trypanosome. On sait en effet que ce manteau est déterminant dans la relation hôte-parasite et, sur le plan biochimique, on en connaît maintenant l'élément constitutif essentiel représenté par une glycoprotéine de surface dont la finalité fonctionnelle n'est pas entièrement connue en dehors d'un rôle premier dans le cadre immunologique. De ces acquis sont venus des tests diagnostiques simples utilisables sur le terrain et qui rendent actuellement les plus grands services tant au plan individuel qu'au plan épidémiologique.

Dans une première partie de ce mémoire, nous avons voulu situer en terme de biologie parasitaire ce qu'est la notion de variation antigénique et introduit aussi celle de populations parasitaires.

Les connaissances précises biochimiques des antigènes variables ont été présentées tant en ce qui concerne les méthodes d'isolement et de purification de l'antigène variable qu'en ce qui concerne les éléments de structure primaire et secondaire. L'accent a été mis sur l'existence en position C-terminale de la glycoprotéine d'un glycolipide particulier pour lequel le rôle d'ancrage membranaire est très largement établi. La terminologie de forme membranaire ou de forme soluble est maintenant devenue classique.

Notre travail qui a débuté en 1983 s'inscrit dans la description biochimique d'un antigène variable. Notre participation, à l'aide du modèle T.b.brucei (variants AnTat 1.1, AnTat 1.8 et AnTat 1.10) a permis en particulier :

- de définir l'agencement moléculaire de l'AVS, son organisation en deux domaines N- et C- terminaux et en une zone charnière à potentialité fonctionnelle,
- de définir, à l'aide d'une série de gènes codant pour des variants de séquence peptidique connue, une zone de conversion qui a été située dans la zone charnière,
- de mettre en évidence de manière définitive, à l'aide de la chromatographie liquide haute performance, l'existence d'une "hétérogénéité" des antigènes purifiés liée à leur degré d'hydrophobie relative qui semble en relation avec un potentiel de polymérisation,

- de démontrer l'existence d'interactions fortes entre antigène variable et phospholipides,

- et enfin, de préciser les relations existant entre polymérisation des antigènes et réponse immunologique.

Au total, cette somme de résultats nous aide à mieux connaître l'organisation de l'antigène, son agencement polymérique et sa place dans la constitution du manteau de surface parasitaire.

Notre recherche a été tournée aussi vers une approche biologique. La notion de spécificité hôte-parasite en terme de pouvoir pathogène commence en effet à recevoir un début d'explication. Ainsi, la non-pathogénicité de T.b.brucei pour l'homme peut-elle s'expliquer à travers un facteur trypanocide sérique que nous avons étudié et qui peut être identifié aux lipoprotéines de haute densité.

Ainsi, T.b.brucei pathogène pour la race bovine est-il inopérant chez l'homme. De plus, chez l'homme, commence à se dégager la notion de trypanotolérance relative. Là encore, des facteurs sériques peuvent intervenir. Ils sont encore mal connus mais peuvent être à l'origine de voies thérapeutiques nouvelles.

La trypanosomiase est devenue une préoccupation première de la recherche en parasitologie. Elle exige maintenant la compréhension de mécanismes complexes tant au plan cellulaire que général pour apporter une solution à une pathologie affectant la quasi-totalité du continent africain.

## 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 - AFCHAIN, D.J., FRUIT, A., PETITPREZ, N., VAN MEIRVENNE, N., LE RAY, D., BOUT, and CAPRON, A., (1976)

Antigenic analysis of a variant specific component of *T. brucei brucei* - I - Immunological purification by affinity chromatography

Pathologie et Biologie, 24, 615-617.

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 - ASPINALL, G.O. (1982) in the Polysaccharides (Aspinall, G.O., ed.) vol.1, pp 35-131, Academic Press, New York.

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 - BAILEY, N.M., CUNNINGHAM, M.P. and KIMER, C.D. (1967)

The indirect fluorescent antibody technique applied to dried blood for use as a screening test in the diagnosis of human trypanosomiasis in Africa.

Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 61, 696-700.

9 - 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), 127 C, 761-774.

10 - BALTZ, T., GIROUD, C., BALTZ, D., DUVILLIER, G., DEGAND, P., DEMAILLE J., and PAUTRIZEL, R. (1984)

The variable surface glycoproteins of *Trypanosoma equiperdum* are phosphorylated

EMBO J., 1, 1393-1398.

11 - 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.

12 - 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.

13 - BARRY, J.D., CROWE, J.S. , and VICKERMAN, K. (1983)

Instability of the *trypanosoma brucei rhodesiense* metacyclic variable antigen repertoire.

Nature, 306, 699-701.

14 - BRIAND, R.L. (1981)

High-performance liquid chromatographic determination of the lecithin/sphingomyelin ratio in amniotic fluid.

J. chromatography, 223, 277-284.

15 - BOOTHROYD, J.C., CROSS, G.A.M., HOELJMAKERS, 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.

16 - 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.

17 - 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.

18 - BORST, P., & CROSS G.A.M.(1982).

Molecular basis for trypanosome antigenic variation.

Cell. 29, 291-303.

19 - 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. Bio. Chem. 260, 15504-15509.

20 - 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.

21 - 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.

22 - 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.

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

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

Exp. Parasit. 42, 6-13.

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

The membrane form of variant surface glycoproteins of *Trypanosoma brucei*.

Nature, 302, 349-352.

25 - CARDOSO DE ALMEIDA, M.L., ALLAN, L.M. and TURNER, M.J. (1984)

Purification and properties of the membrane form of variant surface glycoproteins from *T.brucei*.

J. Protozool., 31, 53-60.

26 - CHAPMAN, M.J. (1980)

Animal lipoproteins : chemistry, structure and comparative aspects

J. Lipid Research, 21, 789-853.

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

Determination of the helix and  $\beta$ - form of proteins in aqueous solution by circular dichroism.

Biochemistry, 113, 3350-3359.

28 - CHOU, P.Y., and FASMAN, G.D. (1978)

Empirical predictions of protein conformation

Ann. Rev. Biochem. , 47, 251-276.

29 - 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.

30 - CLARKE, M.W., OLAFSON, R.W. , and PEARSON, T.W. (1985)

Rapid preparative scale purification of myristylated variant surface glycoprotein from african trypanosomes.

Mol. Biochem. Parasitol., 17, 19-34.

31 - CLARKE, M.W. , BARBET, A.F. and PEARSON, T.W. (1987)

Structural features of antigenic determinant on variant surface glycoproteins from *Trypanosoma brucei*

Mol. Immunol., 24, 707-713.

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

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

33 - COHEN, C., REINHARDT, B., PARRY, D.A.D., ROELANTS, G.T., HIRSCH, W., and KANWE, B. (1984)  $\alpha$ - helical coiled-coil structures of *trypanosoma brucei* variable surface glycoproteins.

Nature, 311, 169-171.

34 - 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.

35 - CROSS, G.A.M. (1977)

Isolation, structure and function of variant-specific surface antigens

Ann. Soc. Belg. Med. Trop., 57, 389-399.

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

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

Nature, 277, 310-312.

37 - CROSS, G.A.M. (1984)

Release and purification of *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein.

J. Cell. Bioch., 24, 79-90.

38 - 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.

39 - DAVITZ, M.A., GURNETT, A.M., LOW, M.G., TURNER, M.J. and NUSSENZWEIG, V. (1987)

Decay-accelerating factor (DAF) shares a common carbohydrate determinant with the variant surface glycoprotein(VSG) of the African *Trypanosoma brucei*.

J. Immunol., 138, 520-523.

40 - DESOWITZ, R.S. (1970)

In "Immunity to parasitic Animals" (G.J. Jackson, R.Herman, and I. Singer, eds), Vol. 2, pp.551-596. Appleton century-Crofts, New York).

41 - D'HONDT, J., VAN MEIRVENNE, N., MOENS, et KONDO, M. (1979)

Ca<sup>2+</sup> is essential cofactor for trypanocidal activity of normal human serum.

Nature, 282, 613-615.

42 - DIFFLEY, P., and JAYAWARDENA, N. (1982)

Comparative analysis of procedures used to isolate variant antigen from *Trypanosoma brucei rhodesiense*.

J. Parasitol., 68, 532-537.

43 - DIFFLEY, P. (1985)

*Trypanosoma brucei* : Immunogenicity of the variant surface coat glycoprotein of virulent and avirulent subspecies.

Exp. Parasitol., 59, 98-107.

44 - DONELSON, J.E. and RICE-FICHT, A.C. (1985)

Molecular Biology of Trypanosome antigenic variation.

Microbiol. Rev., 49, 107-125.

45 - 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.

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

Présence 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.

47 - EVANGELISTA, E.A., CHIARI, E., BOGLIOLO, A.R. and SILVA PEREIRA, A.A. (1986)

Elution characteristics of bloodstream forms of three strains of *Trypanosoma cruzi* during isolation on DEAE-cellulose

Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 80, 995-996.

48 - EKEJINDU, G.O.C., MAIKAJE, D.B. and EKEJINDU, I.M. (1986)

The combined procedures of Ficoll-Paque centrifugation and anion exchange separation for the recovery of trypanosomes from blood and other tissues.

Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 80, 879-882.

49 - 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.

50 - 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.

51 - 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.

52 - 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.

53 - 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.

54 - FERGUSON, M.A.J.(1987)

Glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchors : structure, function and biosynthesis IX<sup>th</sup> international symposium - LILLE - FRANCE

55 - FERLUGA, J., and ALLISON, A.C. (1974)

Observations on the mechanism by which T- lymphocytes exert cytotoxic effects.

Nature (London), 250, 673-675.

56 - FOLCH, J., LEES, M. and STANLEY, G.H.S. (1957)

Isolation and purification of total lipids from tissues.

J. Biol. Chem., 226, 497-509.

57 - FOX, J.A., DUSZENKO, M., FERGUSON, M.A.J., LOW, M.G. and CROSS, G.A.M. (1986)

Purification and characterization of a novel glycan-phosphatidylinositol-specific phospholipase C from Trypanosoma brucei.

J. Biol. Chem., 261, 15767-15771.

58 - FOX, J.A., SOLIZ, N.M. and SALTIEL, A.R. (1987)

Purification of a phosphatidylinositol-glycan-specific phospholipase C from liver plasma membranes : A possible target of insulin action

Proc. Natl. Acad. Sci. 84,, 2663-2667.

59 - 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.

60 - 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.

61 - 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.

62 - GEISOW, M.J. and WALKER, J.H. (1986)

New proteins involved in cell regulation by Ca<sup>2+</sup> and phospholipids

T.I.B.S., 11, 420-422.

63 - GILLETT, M.P. and OWEN, J.S. (1987)

Binding of human plasma lipoproteins by *Trypanosoma brucei brucei*.

Bioch. Soc. trans., 15, 135.

64 - 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)

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

Arch. Bioch. Biophys., 249, 427-436.

65 - 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.

66 - GRAY, A.R. (1964)

Immunology, 4, 253-261.

67- 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.

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

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

Ann. Trop. Med. Parasit., 59, 27-36.

69 - GRAY, A.R. (1967)

Some principles of the immunology of trypanosomiasis

Bull. Org. Mond. Santé. 37, 177-193.

70 - 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.

71 - 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.

72 - 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.

73 - 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.

74 - HAGENFELDT, L. (1966)

A gas chromatographic method for determination of individual free fatty acids in plasma

Clin. Chim. Acta. 13, 266-268.

75 - 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, 33, 595-607.

76 - HAJDUK, S.L., and VICKERMAN, K. (1981)

Antigenic variation in cyclically transmitted *Trypanosoma brucei*. Antigen type composition of the first parasitemia in mice bitten by trypanosome-infected *Glossina morsitans*.

Parasitology, 83, 609-621.

77 - HALDAR, K., FERGUSON, M.A.J. and CROSS, G.A.M. (1986)

Acylation of a *Plasmodium falciparum* Merozoite surface antigen via Sn-1,2-diacylglycerol

J. Biol. Chem., 260, 4969-4974.

78 - HALL, T. and ESSER, K. (1984)

Topologic mapping of protective and non-protective epitopes on the variant surface glycoproteins of the WrATat 1 clone of *Trypanosoma brucei rhodesiense*.

J. Immunol. 132, 2059-2063.

79- HAMBREY, P.N., FORSBERG, C.M., MELLORS, A. (1986)

The phospholipase A 1 of *trypanosoma brucei* does not release myristate from the variant surface glycoprotein.

J. Biol. Chem. , 261, 3229-3232.

80 - HANDMAN, E., GREENBLATT, C.L. , and GODING, J.W. (1984)

An amphipathic sulphated glycoconjugate of *Leishmania* : characterization with monoclonal antibodies.

EMBO J., 3, 2301-2306.

81 - HANDMAN, E., and GODING, J.W. (1985)

The leishmania receptor for macrophages is a lipid containing glycoconjugate.

EMBO J., 4, 329-336.

82 - HAVEL, R.J. EDER, H.A. and BRAGDON, J.H. (1955)

The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum.

J. Clin. Invest. , 34, 1345-1353.

83- HAWKING, F., RAMSDEN, D.B. and WHYTOCK, S. (1973)

The trypanocidal action of human serum and of baboon plasma.

Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 67, 510-516.

- 84 - HENNEY, C.S. (1974)  
Estimation of the size of a T. cell induced lytic lesion.  
Nature (London), 249, 456-458.
- 85 - HIRUMI, H., DOYLE, J.J., and HIRUMI, K., (1977)a  
African trypanosomes : cultivation of animal infective *Trypanosoma brucei* in vitro.  
Science, 196, 992-994.
- 86 - HIRUMI, H., DOYLE, J.J. and HIRUMI, K. (1977)b  
Cultivation of bloodstream *Trypanosoma brucei*  
Bull. Org. Mond. Santé, 55, 405-409.
- 87 - HOARE, C.A. (1972)  
The trypanosomes of mammals. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- 88 - 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.
- 89 - 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.
- 90 - 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.
- 91 - HOUMARD, J. AND DRAPEAU, G. (1972)  
Staphylococcal protease : a proteolytic enzyme specific for glutamyl bonds,  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 3506-3509.
- 92 - HOWARD, R.J., KAUSHAL, D.C. and CARTER, R. (1982)  
Radioiodination of parasite antigens with 1,3,4,6-tetrachloro-3a-6a-diphenylglycolyl  
(IODOGEN): studies with zygotes of *Plasmodium gallinaceum*.  
J. Protozool., 29, 114.

93 - 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.

94 - ITAYA, K. and MICHIO, U. (1966)

A new micromethod for the colorimetric determination of inorganic phosphate  
Clin. Chim. Acta. **14**, 361-366.

95 - 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.

96 - 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.

97 - JEMMERSON, R. and LOW, M. (1987)

Phosphatidylinositol anchor of Hela cell alkaline phosphatase.  
Biochemistry **26**, 5703-5709.

98- JENNI, L. (1977)a

Antigenic variants in cyclically transmitted strains of the *T.brucei* complex.  
Ann. Soc. Belge Med. Trop. **57**, 383-386.

99 - JENNI, L. (1977)b

Comparisons of antigenic types of *Trypanosoma brucei* strains transmitted by *Glossina morsitans*.  
Acta tropica **34**, 35-39.

100 - 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.

101 - JOHNSON, J.G., and CROSS, G.A.M. (1979)

Selective cleavage of variant surface glycoproteins from *Trypanosoma brucei*.  
Biochem. J. **178**, 689-697.

102 - KAMERLING, J.P., GERWIG, G.J. and VLIEGENTHART, J.F.G. (1975)

Characterization by Gas-Liquid chromatography-Mass Spectrometry and Proton-Magnetic-Resonance Spectroscopy of Pertrimethylsilyl methylglycosides obtained in the methanolysis of glycoproteins and glycopeptides.

Biochem. J., 151, 491-495

103 - KAZYUMBA, G., BERNEY, M., BRIGHOUSE, G., CRUCHAUD, A. and LAMBERT, P.H. (1986)

Expression of the B cell repertoire and autoantibodies in human African trypanosomiasis.

Clin. Exp. Immunol., 65, 10-18.

104 - KOSINSKI, R.J. (1980)

Antigenic variation in trypanosomes : a computer analysis of variant order.

Parasitology, 80, 343-357.

105 - KRAKOW, J.L., HERELD, D., BANGS, J.D., HART, G.W. and ENGLUND, P.T. (1986)

Identification of a glycolipid precursor of the *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein.

J. Biol. Chem., 261, 12147-12153.

106 - LAEMMLI, U.K. (1970)

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>.

Nature, 227, 680-681.

107 - 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.

108 - LAMBERT, P.H., GALVAO CASTRO, B. (1977)

Rôle de la réponse immune dans la pathologie de la trypanosomiase humaine.

Ann. Soc. Belge Med. Trop., 57, 267-269.

109 - 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.

110- 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.

111 - LAVERAN, A., et MESNIL, F. (1902)

Recherches sur le traitement et la prévention du nagana.  
Annales de l'Institut Pasteur, 16, 785-817.

112 - LELOIR, L.F. and CARDINI, C.E. (1957)

Characterization of phosphorus compounds by acid lability  
Methods in Enz., III, 840-850.

113 - 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.

114- LE RAY, D., BARRY, J.D., and VICKERMAN, K. (1978)

Antigenic heterogeneity of metacyclic forms of *Trypanosoma brucei*.  
Nature, 273, 300-302.

115 - LEVY, M., FISCHMAN, L. and SCHENKEIN, I. (1970)

Mouse submaxillary gland proteases  
Methods Enzymol., 19, 672-681.

116 - LEVY, R.I., and FREDERICKSON, D.S. (1965)

Heterogeneity of plasma high density lipoproteins  
J. Clin. Inv., 44, 426-441.

117 - LINDGREN, F.T. (1975)

in "Analysis of lipids and lipoproteins" ed., Perkins, E.G. (American Oil Chemists Society, Champaign, IL), pp. 204-224.

118 - LOURIE, E.N. and O'CONNOR, R.J. (1937)

Ann. Trop. Med. Parasit., 31, 319-340.

119 - 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.

120 - LOW, M.G. (1987)

Biochemistry of the glycosyl-phosphatidylinositol membrane protein anchors  
Biochem. J., 244, 1-13.

121 - LUMDSEN, W.H.R. (1972)

In "Immunity to Animal Parasites"

(E.J.L. Soulsby, ed.), pp 287-299. Academic Press, New York.

122 - 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.

123 - MAGEE, A.I. and SCHLESINGER, M.J. ( 1982)

Fatty acid acylation of Eukaryotic cell membrane proteins.

Biochim. Biophys. Acta. 694, 279-289.



124 - MAJUMDER, H.J., BOOTHROYD, J.C. and WEBER, H. (1981)

Homologous 3' terminal of mRNAs for surface antigens of different antigenic variants of  
*Trypanosoma brucei*.

Nucl. Acids.Res., 9, 4745-4753.

125 - MARCHALONIS, J.J., CONE, R.E. and SANTER, V. (1971)

Enzymic iodination - A probe for accessible surface proteins of normal and neoplastic  
lymphocytes.

Biochem. J., 124, 921-927.

126 - 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.

127 - MEDOF, M.E., WALTER, E.I., ROBERTS, W.L., HAAS, R. and ROSENBERY, T.L.  
(1986)

Decay-accelerating factor of complement is anchored to cells by a C-terminal  
glycolipid.

Biochemistry. 25, 6740-6747.

128 - METCALF, P., BLUM, M., FREYMAN, D., TURNER, M. and WILEY, D.C. (1987)

Two variant surface glycoproteins of *Trypanosoma brucei* of different sequence classes have similar 6 Å resolution x-ray structures.

Nature, 325, 84-87.

129 - MICHELS, P.A.M., LIU, A.Y.C., BERNARDS, A., SLOOF, P., VAN DER BIJL, M.M.W., SHINKIEL, 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.

130 - 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.

131 - 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.

132 - 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.

133 - MONTREUIL, J., BOUQUELET, S., DEBRAY, H., FOURNET, B., SPICK, G. and STRECKER, G. (1986)

in carbohydrate analysis Practical approach - Champlin, M.S., N. Kennedy J.S., Eds, IRL, Press

Oxford, 143-204.

134 - MORTATTI, R.C. (1985)

Separation of bloodstream trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* by density gradient centrifugation.

J. Parasitol., 71, 520-521.

135 - 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.

136 - 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.

137 - ORAM, J.F., BRINTON, E.A., and BIERMAN, E.L. (1983)

Regulation of High Density lipoprotein receptor activity in cultured human skin fibroblasts and human arterial smooth muscle cells.

J. Clin. Invest., 72, 1611-1621.

138 - OSAKI, I. (1959)

Studies on the immunological variation in *Trypanosoma gambiense* (serotypes on the mode of relapse)

Biken's J., 2, 113,127.

139 - 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, pp 393-427.

140 - PARRY, D.A.D. (1982)

Biosci. Rep., 2, 1017-1024.

141 - 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.

142 - 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.

143 - 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.

144 - 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.

145 - PHILIPS, M.C., Mc LEAN, L.R., STOU DL, G.W., ROTHBLAT, G.H. (1980)

Atherosclerosis, 36, 409.

146 - PINDER, M., VAN MELICK, A. and VERNET, G. (1987)

Analysis of protective epitopes on the variant surface glycoprotein of a *Trypanosoma brucei brucei* (DiTat 1-3) using monoclonal antibodies.

Parasite Immunol., 9, 395-400.

147 - PUTNAM, F.W. (1975)

In "Plasma proteins" (F.W. Putman, ed.), Vol. 1, pp 57-131. Academic Press, New York.

148 - REINHOLD, V.N., (1972)

Gas-liquid chromatographic analysis of constituent carbohydrate in glycoproteins.

Methods Enzymol., 25, 244-249.

149 - 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.

150 - 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.

151 - 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.

152 - 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.

153 - RIFKIN (1978)b

Trypanosoma brucei. Some properties of the cytotoxic reaction induced by normal human serum.

Exp. Parasitol., 46,189-206

154 - RIFKIN , M.R. (1983)

Interaction of high-density lipoprotein with trypanosoma brucei : Effect of membrane stabilizers.

J. Cell. Biochem., 23, 57-70.

155 - RIFKIN, M.R.(1984)

Trypanosoma brucei : biochemical and morphological studies of cytotoxicity caused by normal human serum.

Exp. Parasitol., 58, 81-93.

156 - RIFICI, V., and EDER, H.A. (1984)

A hepatocyte receptor for high-density lipoproteins specific for Apolipoprotein A-I.

J. Biol. Chem., 259, 13814-13818.

157 - RITZ, M.(1916)

Mitteilung arch. F. Schiffs. U. Trop. Hyg., 20, 387-420.

158 - ROBSON, B., and PAIN, R.H. (1974)

Analysis of the code relating sequence to conformation in globular proteins.

Biochem. J. 141, 869-904.

159 - ROVIS, L., BARBET, A.F., WILLIAMS, R.O. (1978)

Characterization of the surface coat of trypanosoma congolense.

Nature. 271, 654-656.

160 - ROVIS, L., and DUBE, D.K. (1981)

Studies on the biosynthesis of the variant surface glycoprotein of T.brucei : sequence of glycosylation.

Mol. Biochem. Parastiol. 4, 77-93.

161 - SCHMITZ, B. , KLEIN, R.A., DUNCAN, IA., EGGE, H., GUNAWAN, J. PETERKATALINIC, J. (1987)

MS and NMR analysis of the cross-reacting determinant glycan from Trypanosoma brucei brucei MiTat 1-6 variant specific glycoprotein

Biochem. Biophys. Res. Comm. 146, 1055-1063.

162 - 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.

163 - 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, pp 1-13.

164 - SEED, J.R. (1978)

Competition among serologically different clones of *Trypanosoma brucei gambiense* in vivo.

J. Protozool., 25, 526-529.

165 - SEEMAN, P.(1974)

Ultrastructure of membrane lesions in immune lysis, osmotic lysis and drug-induced lysis.

Federation Proceedings, 33, 2116-2124.

166 - STIEGER, A., CARDOSO DE ALMEIDA, M.L., BLATTER, M.C., BRODBECK, U. and BORDIER, C. (1986)

The membrane-anchoring systems of vertebrate acetylcholinesterase and variant surface glycoproteins of African trypanosomes share a common antigenic determinant.

FEBS Lett., 199, 182-186.

167 - 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.

168- 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.

169 - 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.

170 - 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.

171 - TURCO, S.J., HULL, S.R., ORLANDI, P.A. and SHEPHERD, S.D. (1987)

Structure of the major carbohydrate fragment of the leishmania donovani lipophosphoglycan.

Biochemistry, 26, 6233-6238.

172 - VAESSEN, R.T.M.J., KREIKE, J., GROOT, G.S.P. (1981)

Protein transfer to nitrocellulose filters.

FEBS Lett. 124, 193-196.

173 - 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.

174 - VAN MEIRVENNE, N., JANSSENS, P.G. and 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.

175 - VAN MEIRVENNE, N., MAGNUS, E. and VERVOORT, T. (1977)

Comparisons of variable antigenic types produced by Trypanosome strains of the subgenus trypanozoon.

Ann. Soc. Belge. Med. Trop. 57, 409-423.

176 - 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.

177 - VICKERMAN, K. (1984)

On the surface coat and flagellar adhesion in trypanosomes.

J. Cell. Sci. 5, 163-193.

178 - 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.

179 - WEISGRABER, K.H. and MAHLEY, R.W. (1980)

Subfractionation of human high density lipoproteins by heparin-sepharose affinity chromatography.

J. Lipid. Research, 21, 316-325

180 - WEINTRAUB, H. and GROUDINE, M. (1976)

Chromosomal subunit in active genes have an altered conformation.

Science, 193, 848-856.

181 - WESTHOF, E., ALTSCHUM, D., MORAS, D., BLOOMER, A.C., MONDRAGON, A., KLUG, A. and VANRENMORTEL, M.H.V. (1984)

Correlation between segmental mobility and the location of antigenic determinants in proteins

Nature, 311, 123-

182 - 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.

183 - 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.

184 - YAMAGUCHI, Y. (1960)

Nihon Univ. J. Med., 2, 59-72.

**APPENDICE TECHNIQUE**

## I - Méthodes d'étude physico-chimique.

### A ) Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS.

#### 1 - Principe

Le dodécyl sulfate de sodium (SDS) possède la propriété de se fixer dans certaines conditions sur l'enchaînement peptidique d'une protéine lui conférant ainsi des charges négatives en nombre tel 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) (104) :

Un gel de gradient d'acrylamide (5 à 30% ou 2 à 10%) de 1,5 mm d'épaisseur est coulé entre deux plaques de verre. Un gel supérieur (à 5% ou 2% selon les cas) 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. 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

solution d'acrylamide pour le gel à 2% : G

- acrylamide 8 g

- N-N'méthylènebisacrylamide 2 g

- eau distillée q.s.p. 100 ml

Composition du gel à gradient 5-30%

	Solution à 5%	Solution à 30%
A	1.40 ml	8.40 ml
B	1.75 ml	1.75 ml
SDS à 2%	0.70 ml	0.70 ml
eau distillée	10.00 ml	3.00 ml
saccharose	-	2.80 g
riboflavine 4ml/100ml	0.20 ml	0.20 ml
TEMED	15 µl	10 µl
persulfate d'ammonium 10%	25 µl	10 µl

Composition du gel supérieur 5%

A	1.00 ml
C	1.25 ml
SDS à 2%	0.50 ml
eau distillée	7.10 ml
riboflavine	0.20 ml
TEMED	40 µl
persulfate	60 µl

Composition du gel à gradient 2-10%

	Solution à 2%	Solution à 10%
A	0.56 ml	2.8 ml
B	1.75 ml	1.75 ml
SDS à 2%	0.70 ml	0.70 ml
eau distillée	10.9 ml	8.60 ml
riboflavine	0.10 ml	0.10 ml
TEMED	25 µl	15 µl
persulfate d'ammonium	35 µl	25 µl

Composition du gel supérieur à 10%

C	2.0 ml
G	2.0 ml
SDS à 2%	0.3 ml
eau distillée	3.5 ml
riboflavine	0.2 ml
TEMED	40 µl
persulfate	80 µl

TEMED : N, N, N', N' Tétraméthylènediamine

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	0.025M
- Glycocolle	0.192M
- SDS	0.1%

Colorant

- Bleu Coomassie R 250	1.25 g
- Ethanol	1.22 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

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  $\log MM = f(R_f)$ .

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

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

## B ) 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

#### a - Etude de la polymérisation de l'antigène

Pour l'étude de la polymérisation de l'antigène, nous avons utilisé une colonne LKB type TSK SW G4000 (75 x 600 mm).

Les échantillons sont déposés en quantité de 20  $\mu$ g.

L'élution est réalisée en tampon phosphate de sodium 0.1 M de pH 7.0 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 :

Thyroglobuline (670 000), ferritine (440 000), catalase (232 000), lactate déshydrogénase (140 000), sérumalbumine (67 000), ovalbumine (44 000).

#### b - Séparation des phospholipides.

Pour la séparation des phospholipides, nous avons utilisé une technique modifiée à partir des travaux de BRIAND et coll. (1981)( 14).

Dans ce système chromatographique, nous avons utilisé une colonne Lichrosorb Si (60,7  $\mu$ m) munie d'une précolonne Si 60 (10  $\mu$ m). L'élution est réalisée selon un gradient de solvants (acidifiés par l'acide orthophosphorique afin d'éviter la plupart des formes salines des phospholipides) :

#### Composition des solvants

ml	acétonitrile	eau	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 1N
solvant A	75	24.8	0.2
solvant B	99	0.8	0.2

Composition de la phase mobile (gradient d'élution)

temps mn	% solvant A	% solvant B
0-3	10	90
12	60	40
16	80	20
18	95	5
19.5	95	5
20.5	10	90

L'élution est réalisée à un débit de 2 ml/mn et suivie par mesure de l'absorbance à 203 nm.

Les témoins choisis pour l'étalonnage de la colonne sont le phosphatidylglycerol, le phosphatidylinositol, phosphatidyléthanolamine, phosphatidylcholine et la sphingomyéline (concentration de 5 µg/ml).

2 - Chromatographie HPLC de phase inverse.

Nous avons utilisé une colonne Beckman type Ultrapore RPSC-C<sub>3</sub> (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 formiate d'ammonium 0.03 M(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/minute et suivie par mesure de l'absorbance à 206 nm.

C) Composition amino-acide.

1 - Hydrolyse

L'échantillon (soit 60 à 100 nanomoles) est hydrolysé pendant 24 heures par l'acide chlorhydrique 5.6N à 110°C en tube scellé sous vide. L'hydrolysate est ensuite évaporé sous vide à basse température (Evapo Mix Buchler).

## 2 - 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 ROCHEMONT (1978(49) ) 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 (Touzard et Matignon) 75 g, chlorure stanneux (Merck) 1.5 g, tampon acétate de sodium pH 5.5 (Merck) 1250 ml , méthylcellosolve 3750 ml. Le réactif est maintenu sous atmosphère d'azote.

Le tryptophane détruit par l'hydrolyse acide HCl 5.6N est dosé par la méthode de PENKE et coll. (1974)(144) :

1 mg d'échantillon est hydrolysé 24 heures sous vide à 110°C par 1 ml d'acide  $\beta$ -mercaptosulfonique en présence de 500 nanomoles de norleucine. Le pH de l'hydrolysat est ensuite ajusté à pH 2.2 par de la soude 2N et le volume est ajusté à 5 ml avec un tampon pH 2.2 utilisé habituellement pour le dépôt des échantillons sur l'autoanalyseur . L'analyse s'effectue ensuite selon les conditions précédemment décrites.

## D ) Composition glucidique.

La composition en oses neutres et en osamines est déterminée, après méthanolyse, par chromatographie en phase gazeuse selon la méthode de KAMERLING (1975) (102) modifiée par MONTREUIL et coll. (1986)(133).

### 1 - Méthanolyse

La méthanolyse est effectuée dans une solution de méthanol-HCl 0.5 M à 80°C pendant 24 heures. La réaction est neutralisée par addition de carbonate d'argent (Prolabo) et la solution est ensuite séchée sous courant d'azote.

### 2 - N-acétylation et dé-O-acétylation

#### \* N-acétylation

Les échantillons sont N-acétylés par addition de 20  $\mu$ l d'anhydride acétique et laissés en contact une nuit à l'obscurité. Puis 0.7 ml d'heptane (Sequanal grade, PIERCE) sont ajoutés afin d'obtenir un déphasage. La phase heptanique supérieure est alors évaporée sous azote puis additionnée de 30  $\mu$ l de pyridine.

Après 3 minutes à température ambiante, les échantillons sont 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 1.5M pendant 1 heure à 65°C. Le méthanol est ensuite évaporé sous courant d'azote.

3 - Triméthylsilylation

La silylation est effectuée par addition de 100 µl de BSTFA (Pierce) pendant 2 heures à température ambiante et à l'obscurité. Après séchage sous azote, 100 ml d'heptane sont ajoutés. Un délai de 30 minutes est fixé avant l'injection de 1 à 2 ml de la phase heptanique.

4 - Chromatographie en phase gazeuse.

L'analyse est effectuée sur appareil Girdel équipé d'un détecteur à ionisation de flamme sur colonne capillaire.

La température initiale du four est de 120°C, elle augmente de 8°C par minute jusqu'à 240°C. La surface des pics et le temps de rétention sont déterminés au moyen de l'intégrateur digital couplé à l'appareil.

E ) 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 aliquotes de solution correspondant à 5 nmoles et 10 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 0.1N 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  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5M, 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)(94)

- 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 4N, et 60 mg de vert Malachite dans 30 ml d'eau. Les deux solutions sont ensuite mélangées et laissées sous agitation 30 minutes. Le mélange est centrifugé juste avant l'emploi.

- Les cendres sont dissoutes dans 375  $\mu\text{l}$  d'HCl 1.2N et l'on ajoute 125  $\mu\text{l}$  de réactif; après 5 minutes, sont ajoutés 12,5  $\mu\text{l}$  de Tween 20 à 1.5%. La lecture se fait à 660 nm.

F ) Délipidation.

Préalablement au dosage du phosphore, certains échantillons sont traités en milieu organique afin d'éliminer d'éventuels phospholipides contaminants. Chaque préparation lyophilisée est mise en contact du mélange organique éthanol-éther (3:1, v/v) pendant 16 heures à 4°C. Après centrifugation pour décantation des phases, le précipité résultant est lavé à deux reprises par le même mélange organique (éthanol-éther) et laissé en contact pendant 4 heures. Enfin, après une nouvelle centrifugation, la protéine est rincée 2 fois à l'éther et séchée sous jet d'azote.

G ) Composition lipidique.

Les acides gras sont libérés par hydrolyse HCl 5.6N 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)(56). On ajoute 50  $\mu\text{l}$  d'HCl 2N, 100  $\mu\text{l}$  d'eau, 200  $\mu\text{l}$  de méthanol et 400  $\mu\text{l}$  de chloroforme. Après agitation et centrifugation, la phase organique est récupérée et lavée trois fois avec 200  $\mu\text{l}$  d'un mélange chloroforme/méthanol/eau (1/10/10).

Les acides gras sont convertis en esters méthyliques par transesterification (HAGENFELDT (1966) (74). Après extraction à l'heptane, les esters méthyliques sont séparés par chromatographique en phase gazeuse sur colonne capillaire. Pour identification des acides gras insaturés, on utilise la méthode des longueurs équivalentes de chaîne.

## H ) Etude en dichroïsme circulaire.

Les études ont été réalisées sur 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 ordonné). L'épaisseur des cellules de mesure varie de 0.01 cm à 2 cm. L'ellipticité molaire ( $\Theta$ ) a été calculée pour la région du spectre correspondant au chromophore amide (entre 180 et 240 nm), en prenant la moyenne à partir de 3 à 5 spectres réalisés à deux sensibilités différentes. La vitesse de déroulement du papier est de 2 mm/mn. La constante de temps est 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.

## II - Méthodes d'étude structurale

### a) Conditions d'utilisation des différents enzymes protéolytiques.

#### 1 - Enzymes utilisés

\* trypsine (Sigma type XI n° 1005) débarrassée de son activité chymotrypsique par le chlorure de diphénylcarbamy (DPCC)

\* protéase de Straphylococcus aureus (Miles n° 36900).

\* chymotrypsine (Sigma N°C-7762)

\* thermolysine (Sigma)

#### 2 - Tampons d'incubation

Les hydrolyses trypsiques et chymotrypsiques sont effectuées en tampon bicarbonate d'ammonium 0.05M ajusté à pH 8.5.

L'hydrolyse par la protéase de S.aureus est menée en tampon acétate d'ammonium 0.05M de pH 4.0 (HOUMARD et DRAPEAU (1972) (91) ).

L'hydrolyse par la thermolysine est réalisée en tampon bicarbonate d'ammonium 0.05M de pH 8.0 enrichi en carbonate de calcium 1 mM.

### 3 - Protocole d'hydrolyse

Les concentrations en échantillons sont de 1 mg/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 et 37°C).

#### B ) S-carboxamidométhylation

\* La S-carboxamidométhylation est effectuée selon la technique de GALL et coll. (1968) (60). La glycoprotéine est dissoute dans un tampon EDTA 0.003 M, urée 8 M, Tris 1.5M de pH 8.5 et l'iodo(1 - <sup>14</sup>C) acétamide (activité spécifique 6 mCi/mmole) est ajouté selon un excès de 10 moles par mole de glycoprotéine. La réaction est effectuée pendant 1 heure à 37°C et à l'obscurité. Le réactif en excès est éliminé par dialyse contre eau désionisée pendant 5 jours. La glycoprotéine est ensuite lyophilisée.

\* Le marquage des antigènes par l'acide iodo(2 - <sup>14</sup>C) acétique est effectué directement sur le surnageant pH 5.5 de la suspension parasitaire de trypanosomes. Des aliquotes de cette suspension sont régulièrement prélevées après 30 minutes, 2 heures et 24 heures de libération de l'antigène.

L'acide iodoacétique (activité spécifique 5.5 mCi/mmole) est ajoutée selon un excès de 10 moles par mole de glycoprotéine; la réaction est effectuée pendant 1 heure à température ambiante et à l'obscurité. Après dialyse prolongée contre de l'eau désionisée pour éliminer l'acide iodoacétique en excès, les échantillons sont lyophilisés.

### III - Méthodes d'étude immunologique

#### A ) Immunoblotting

##### 1 - Principe

Après électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS, les protéines sont transférées sur membrane de nitro-cellulose selon la méthode de VAESSEN et coll. (1981) (172).

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 4chloro-1-naphtol

## 2 - Conditions opératoires

Après migration électrophorétique des échantillons, le gel est rincé en tampon Tris 0.025M-glycocolle 0.192M afin d'éliminer le SDS. Les bandes sont transférées sur nitrocellulose pendant une 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 de pH 7.4-NaCl 0.9% pendant 15 minutes puis incubée dans ce même tampon enrichi en sérumalbumine 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 1/500<sup>e</sup> en tampon Tris 10mM pH 7.4-NaCl 0.9%-serumalbumine bovine 3%-serum de veau 10%. Après contact une nuit à 20°C, plusieurs rinçages sont réalisés en tampon Tris 10mM pH 7.4-NaCl 0.9% puis dans le même tampon enrichi en Tween 0.1%.

Le traitement à la peroxydase s'effectue par incubation de la membrane de nitrocellulose 2 heures à 37°C en tampon Tris 10mM pH 7.4-NaCl 0.9%-BSA 3% contenant l'anticorps anti-IgG marqué à la peroxydase en dilution finale 1/500<sup>e</sup>.

Après une nouvelle série de rinçages, la révélation est effectuée par une incubation de une minute dans la solution suivante :

- Tris 50 mM pH 7.6    200 ml
- 4-chloro-1-naphtol    100 mg (Sigma N°C-8890)
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>    50 µl

La réaction est arrêtée par lavage abondant en eau.

### B ) Méthode immunoenzymatique en phase hétérogène (E.L.I.S.A.)

0.3 ml d'antigène variable purifié dilué à 0.05 mg/ml en tampon carbonate de sodium 0.1M de pH 9.6 sont répartis dans les cupules de la plaque de microtitration et laissés en contact pendant une nuit à 4°C. Les cupules sont ensuite vidées et lavées trois fois à l'aide d'un jet de tampon phosphate 0.01M de pH 7.2 (PBS)- Tween 20 à 0.1% puis saturées pendant une heure en tampon PBS-BSA à 3%. Après une nouvelle série de rinçage, 0.3 ml de la solution d'anticorps fabriqués chez le lapin à partir d'une fraction antigénique purifiée (dilution au 1/10 000) est ajouté dans la cupule et laissé en contact une heure à 37°C.

Après une série de lavages en tampon PBS-Tween 0.1%, 0.3 ml de conjugué anti-immunoglobulines de lapin marquées à la phosphatase alcaline, dilué au 1/800, est ajouté et laissé en contact une heure à 37°C. Les plaques sont lavées et le substrat (PNP) est

ajouté dans la cupule pendant une heure à 37°C. La réaction est arrêtée par addition de soude 2N (0.05 ml) . L'intensité de la réaction est appréciée par lecture de la densité optique à 405 nm directement dans les cupules de microtitration.

### Réactifs

- microplaques à fond plat pour test ELISA, Dynatech M 129B
- conjugué anti-immunoglobulines de lapin fabriqué chez la chèvre (IgG 7S, Nordic Imm. , Netherlands)
- phosphatase alcaline (Boehringer)
- 4-nitrophénylphosphate (PNP) (Boehringer) dilué en tampon carbonate de sodium 0.5 M- MgCl<sub>2</sub> 0.001M pH 10.4 , à 1 mg/ml

## IV - Etude de l'interaction parasite-lipoprotéines

### A ) Préparation des lipoprotéines

#### 1 - Isolement

A partir de serum normal humain ou bovin, la préparation des lipoprotéines est réalisée par ultracentrifugation de flottation selon la méthode de HAVEL et coll. (1955) (82). Cette technique nécessite plusieurs ultracentrifugations réalisées à des densités progressivement croissantes, ajustées par addition de sels (NaCl et KBr).

Une solution initiale de même densité que le sérum humain (d = 1,006 ) est d'abord utilisée, nous l'appellerons solution A :

solution A : NaCl	8.77g	
EDTA	10.00g	q.s.p. 11 pH 7.0

Puis une solution B de densité 1,336 sera progressivement ajoutée lors des étapes d'ultracentrifugation ultérieures afin d'ajuster la densité de la solution

solution B :	NaCl	152.00g	
	KBr	354.00g	
	EDTA	10.00g	q.s.p. 11

Dans ces solutions, l'EDTA permet de chélater des ions métalliques contaminants qui pourraient catalyser la peroxydation par l'oxygène moléculaire mais permet également de piéger la thrombine qui peut cliver certaines apolipoprotéines.

a - Isolement des lipoprotéines de très faible densité (VLDL)

5 ml de sérum normal sont mélangés en tube à 3 ml de la solution saline A de densité 1,006.

Après centrifugation à 120 000g pendant 24 heures en rotor Ti 50, les VLDL atteignent leur position d'équilibre et sont concentrées à la surface du tube. Après récupération à la pipette Pasteur, elles subissent 2 lavages par la même solution par ultracentrifugation puis une dialyse de 24 heures contre de l'eau distillée.

b - Isolement des lipoprotéines de faible densité (LDL)

Après élimination des VLDL, la solution est ajustée à une densité de 1,063 avec la solution B. Puis une ultracentrifugation à 120 000g pendant 28 heures en rotor Ti 50 permet de récupérer en surface les LDL.

c - Isolement des lipoprotéines de forte densité (HDL)

Après récupération des LDL, la solution est ajustée à une densité de 1,21 avec la solution B. Une nouvelle centrifugation à 120 000g pendant 24 heures en rotor Ti 50 permet d'obtenir les HDL dans la phase supérieure, ultérieurement lavées avec la solution de densité 1.21 pendant 24 heures à 120 000g.

## 2 - Purification

a - Dessalage des HDL

Les HDL sont déssalées par gel filtration sur une colonne de 50 cm de long sur 1 cm de diamètre. La filtration s'effectue sur un gel Sephadex G<sub>25</sub> (qualité fine, Pharmacia) et l'élution est réalisée en eau distillée, les fractions collectées sont de 2 ml.

b - Délipidation des HDL

Les HDL déssalées sont lyophilisées puis délipidées selon la méthode de FOLCH (1957)(56) par un mélange chloroforme-méthanol-eau (10:10:3, v/v/v). Le mélange HDL-solvant s'effectue pendant 1 heure à 4°C avec une agitation intermittente puis une centrifugation à basse vitesse (800 g, 15 minutes) permet d'éliminer la phase lipidique par aspiration du surnageant.

Cette opération est répétée 4 fois afin d'assurer une délipidation maximale.

c - Préparation des apolipoprotéines

A partir des HDL préalablement délipidées, les apolipoprotéines sont isolées par chromatographie de gel perméation.

Les HDL délipidées sont reprises en tampon urée 6M, Tris 0.1M de pH 8.2 puis déposées (3,7mg) sur une colonne (140x1) de Séphacryl S-200 (qualité Superfine, Pharmacia) équilibrée dans le même tampon.

L'élution s'effectue à raison de 12 ml/heure à température ambiante et les fractions collectées de 2 ml sont ensuite homogénéisées et dialysées en tampon bicarbonate d'ammonium 0.01M puis stockées à - 20°C.

B ) Mise en évidence de l'interaction parasite-lipoprotéine par technique immunocytochimique.

L'interaction parasite-lipoprotéine est mise en évidence par technique immunocytochimique indirecte utilisant des sérums marqués.

Un frottis réalisé à partir d'une préparation parasitaire est séché sous courant d'air froid pendant une heure puis fixé 15 minutes dans l'acétone. La lame est recouverte durant 15 minutes par une solution de la lipoprotéine ou apolipoprotéine [ préalablement diluée dans le tampon phosphate de sodium 0.125M de pH 7.25 (PBS) ]. Un rinçage de 10 minutes dans le PBS précède un nouveau séchage.

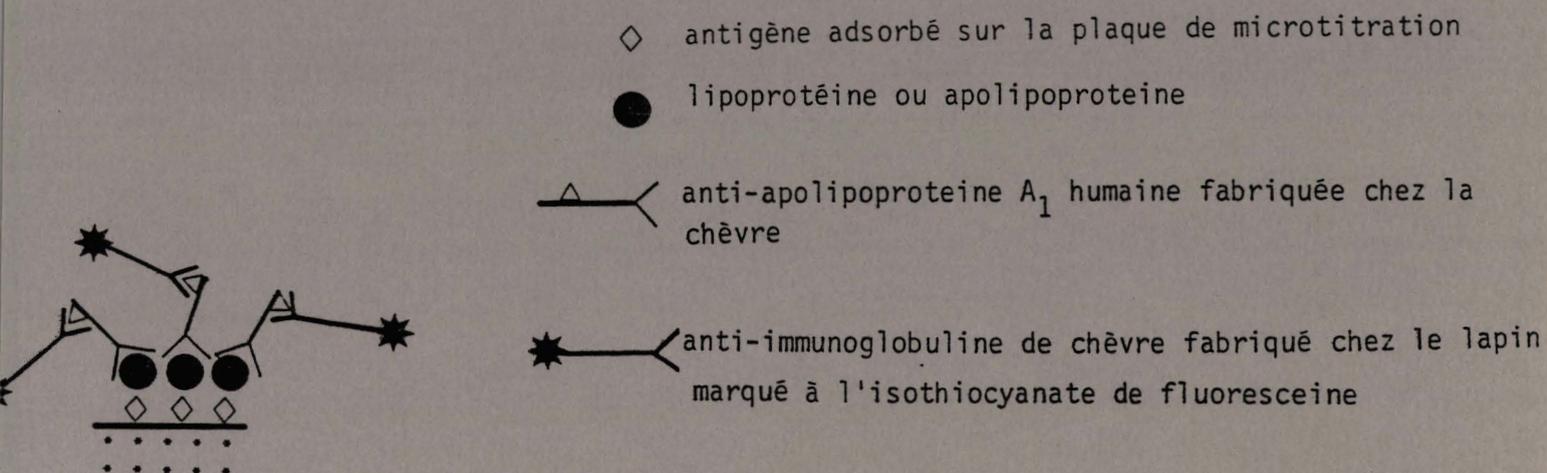
La mise en évidence de l'interaction AVS-lipoprotéine s'effectue en un premier temps selon le schéma suivant :

20 ml d'une solution d'anticorps spécifique de la lipoprotéine et fabriqués chez la chèvre sont

déposés sur la lame pendant 15 minutes. Puis, après rinçages, deux méthodes de révélation ont été envisagées :

1 - Sérum marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine (IFTC) : Immunofluorescence

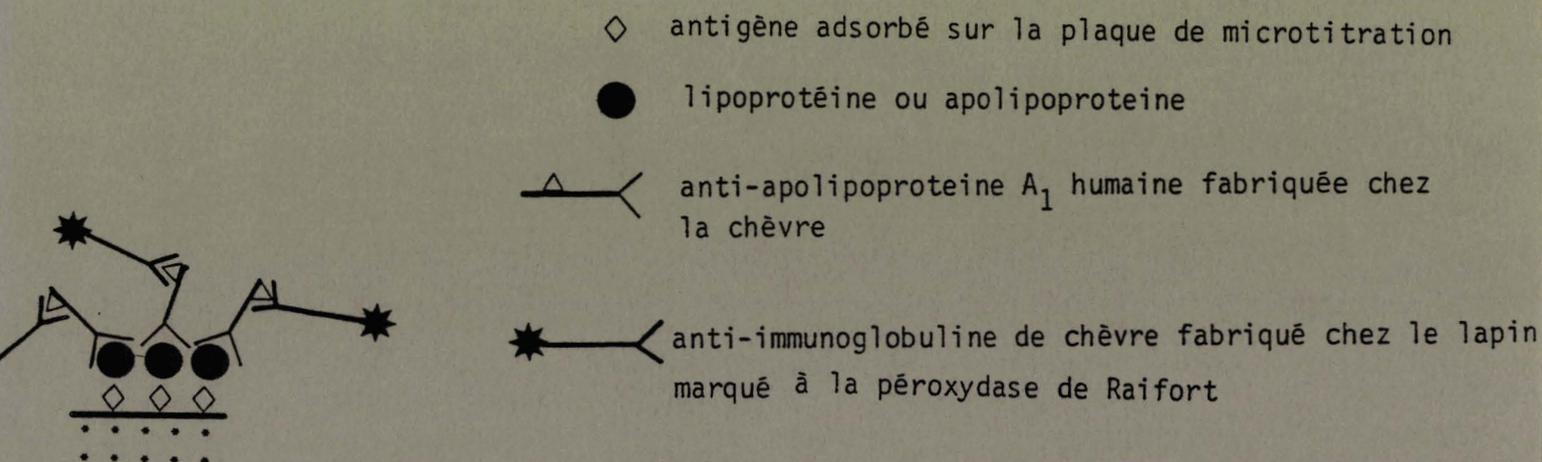
La lame est recouverte de 20 µl d'une solution d'anti-immunoglobulines de chèvre fabriquées chez le lapin et marquées par l'isothiocyanate de fluorescéine (Institut Pasteur) diluées au préalable dans 5 ml d'une solution de PBS contenant 1/10 000 de bleu Evans. Un dernier rinçage de 10 minutes par le PBS est effectué avant le montage entre lame et lamelle par un mélange PBS/glycérol (1, : 1, v/v).



## 2 - Sérum marqué à la peroxydase de Raifort

La lame est alors recouverte par 20 µl d'une solution d'anti-immunoglobuline de chèvre fabriquées chez le lapin et couplées à la peroxydase de Raifort (ICN Immunobiologicals) diluées en tampon PBS de pH 7.20 pendant 45 minutes. Après rinçage dans le même tampon puis dans l'eau distillée, l'activité peroxydasique est révélée par le chromogène 3-3 diami-nobenzidine tétra-HCl (Sigma, ST Louis Mo, USA), (solution à 0.5 mg/ml en tampon Tris 0.1 M pH 7.6), produisant un précipité brun en présence de substrat H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 0.03%°.

Après une minute de contact, l'apparition du précipité brun est apprécié par contrôle microscopique et la révélation est stoppée par immersion de la lame dans l'eau distillée. Les préparations sont alors déshydratées et montées avec une lamelle dans l'Eukitt (KINDER, RFA).



C) Mise en évidence de l'interaction AVS-lipoprotéine par test immunoenzymatique (E.L.I.S.A.).

0.2 ml d'antigène variable purifié à 0.05 g/ml en tampon carbonate de sodium 0.1 M de pH 9.6 sont répartis dans les cupules de la plaque de microtitration et laissés en contact pendant une nuit à 4°C. Les cupules sont alors vidées et lavées 5 fois à l'aide d'un jet de PBS-Tween 20 à 0.01 % puis saturées pendant une heure en tampon PBS-BSA à 3%. Après une nouvelle série de rinçages, 0.2 ml d'une solution de lipoprotéine (dilution en tampon PBS-BSA à 1%) est ajouté dans les cupules et laissé en contact pendant une heure à 37°C. Dans les puits témoins anticorps, cette solution est remplacée par 0.2 ml de PBS-BSA 1%.

Après une série de lavages, 0.2 ml d'une solution d'anticorps anti-apolipoprotéines humaines spécifiques fabriqués chez la chèvre (Tago Inc., USA) est ajoutée et laissée en contact une heure à 37°C. Les cupules sont lavées puis remplies par 0.2 ml d'une solution d'anticorps de lapin anti-immunoglobulines de chèvre marqués par la peroxydase de Raifort (ICN Immuno-biologicals). Après une heure d'incubation et rinçages, les puits sont remplis par 0.2 ml d'une solution d'acide 2-2'-Azinobis (3-éthylbenzothiazoline) sulfonique (solution à 1.09 ml/ml en tampon acétate de sodium 0.1 M,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.05 M de pH 4.2 contenant 2.5 nmoles / l d' $\text{H}_2\text{O}_2$  à 30%).

Après 30 minutes d'incubation, la réaction est stoppée par 0.05 ml d'acide de sodium (0.005 M). La lecture à 405 nm révèle l'interaction AVS-lipoprotéine.

TABLE DES MATIERES

CHAPITRE I - GENERALITES	10
I - Biologie parasitaire	11
1 - Classification	11
2 - Biologie et morphologie	11
A - Chez l'hôte définitif	11
B - Chez l'hôte intermédiaire	14
II - Variation antigénique, manteau de surface et populations parasitaires	15
1 - Définition du mécanisme biologique de la variation antigénique	15
2 - Mode d'apparition des antigènes variables	15
3 - Mécanisme d'apparition des antigènes variables	19
III - Relations hôte-parasite	20
1 - Facteur trypanocide: isolement, purification et caractérisation	20
A - Mise en évidence et définition d'un facteur trypanocide	21
a - Immunoglobuline de type IgM	21
b - $\alpha_2$ -macroglobuline	22
c - $\alpha$ -lipoprotéines	23
B - Propriétés trypanocides du sérum humain-Effet cellulaire - Effets membranaires	23
C - Purification et caractérisation du facteur trypanocide	24
a - Caractéristiques générales de lipoprotéines	25
b - Caractérisation du facteur trypanocide au sein des différentes classes de lipoprotéines	31
D - Interaction HDL-manteau de surface parasitaire	34
E - Rôle du calcium	36
F - Rôle des monosaccharides et du glycérol	37
2 - Rôle des immunoglobulines	37
A - Production d'immunoglobulines	37
B - Formation de complexes immuns	38
IV - Aspects biochimiques des antigènes variables	39
1 - Le manteau de surface	39
2 - Isolement et purification de la glycoprotéine de surface	42

A - Obtention des parasites	42
a - Chromatographie d'échange ionique	42
b - Centrifugation	42
- Centrifugation classique	42
- Centrifugation en gradient de densité	43
c - Centrifugation et échangeur d'ions	43
B - Libération du manteau de surface	44
a - Libération de la forme soluble	44
$\alpha$ - Techniques faisant appel à la rupture cellulaire	44
$\beta$ - Techniques sans rupture cellulaire	46
b - Libération de la forme "membranaire"	47
$\alpha$ - Traitement par les détergents	48
$\beta$ - Traitement par des acides	49
C - Purification de l'antigène variable	51
a - Purification de la forme soluble	51
$\alpha$ - Chromatographie échangeuse d'ions Isoélectrofocalisation	51
$\beta$ - Chromatographie d'affinité sur lectines	51
$\chi$ - Chromatographie d'affinité sur anticorps	52
$\delta$ - Chromatographie liquide haute performance	53
b - Purification de la forme membranaire	53
$\alpha$ - Chromatographie d'affinité sur lectines	53
$\beta$ - Chromatographie liquide haute performance	54
3 - Structure de la glycoprotéine de surface	55
A - Caractéristiques biochimiques	55
B - Structure des AVS	55
a - Structure primaire	55
* Région C-terminale	55

α-Existence d'une extension C-terminale hydrophobe absente des glycoprotéines de surface isolées et purifiées	55
β-Nature de l'extrémité C-terminale des glycoprotéines isolées	56
χ-Existence d'homologie au niveau de la région C-terminale	56
* Région N-terminale	59
* Axe peptidique général des antigènes variables	59
b- Structure secondaire	63
α-Etudes prédictives	63
β-Etudes expérimentales	65
C - Glycosylation des antigènes variables de surface	65
D - Caractérisation immunologique	68
E - Analyse du glycolipide C-terminal	74
F - Autres types d'acylation	81
<b>CHAPITRE 2 - TRAVAUX PERSONNELS</b>	<b>84</b>
<b>I - Préparation du matériel biologique</b>	<b>85</b>
1 - Clonage des variants et préparation des stabilats	85
2 - Isolement des trypanosomes	87
a - Chromatographie sur DEAE-Cellulose	87
b- Centrifugation	88
3 - Libération du manteau de surface	88
a - Forme soluble	88
b - Forme membranaire	89
4 - Purification de l'antigène variable	89
<b>II - Hétérogénéité de définition des antigènes variables</b>	<b>95</b>
1 - Hétérogénéité vis à vis de l'affinité lectinique pour la Concanavaline	
A-Sépharose	95
a - Forme soluble	95
b - Forme membranaire	97

2 - Hétérogénéité de taille moléculaire des antigènes variables	97
a - Comportement moléculaire en présence de SDS	97
* Electrophorèse	97
$\alpha$ - forme soluble	97
$\beta$ - formes membranaires	99
* Chromatographie de gel filtration	102
$\alpha$ - forme soluble	102
$\beta$ - formes membranaires	102
b - Comportement moléculaire en l'absence de SDS	105
3 - Hétérogénéité moléculaire liée à l'hydrophilie relative des antigènes variables	105
III - Etude biochimique comparative des formes solubles et membranaires	116
1 - Composition amino-acide	116
2 - Composition glucidique	118
3 - Teneur en phosphore	118
a - forme soluble	121
b - formes membranaires natives	123
c - forme soluble et formes membranaires après délipidation	
$\alpha$ - dosage du phosphore sur préparation délipidée	
$\beta$ - analyse des phospholipides extraits au cours de la délipidation	127
4 - Analyse des acides gras	130
IV - Organisation moléculaire	130
1 - Définition de domaines moléculaires au sein de l'AVS	132
a - Utilisation d'enzymes protéolytiques	132
b - Etude structurale des fragments tryptiques purifiés	
$\alpha$ - Localisation des fragments	132
$\beta$ - Etude physico-chimique de l'AVS	144
2 - Identification de séquences potentielles de fixation de l'ion calcium et de phospholipides	147
V - Polymérisation des AVS et relation avec la réponse immunologique	151
1 - Polymérisation des antigènes	151
2 - Relation entre la polymérisation des antigènes et la réponse immunologique	157

VI - Etude de l'interaction parasite-lipoprotéine	162
1 - Préparation des lipoprotéines	162
a - Ultracentrifugation de flottation	162
b - Etudes électrophorétiques	163
2 - Interaction lipoprotéines-parasites	167
a - Principe d'étude	167
b - Fixation des HDL	169
$\alpha$ - sur parasites entiers	169
$\beta$ - sur l'antigène variable purifié	171
* par test immunoenzymatique ELISA	171
* par dichroïsme circulaire	174
$\chi$ - sur les fragments antigéniques purifiés	175
* par test ELISA	175
* par dichroïsme circulaire	175
c - Fixation de l'apolipoprotéine A <sub>1</sub>	177
$\alpha$ - purification de l'apolipoprotéine A I	177
$\beta$ - fixation de l'apolipoprotéine A I sur parasites entiers	177
$\chi$ - fixation de l'apolipoprotéine A I sur l'antigène variable et sur les fragments antigéniques purifiés	180
d - Comparaison avec la fixation de lipoprotéines de boeuf	181
Conclusion	183
Bibliographie	185
Appendice technique	207

## FIGURES

=====

- 1 - Cycle évolutif de Trypanosoma brucei
- 2 - Métabolisme des chylomicrons
- 3 - Métabolisme des lipoprotéines
- 4 - Représentation schématique de l'organisation moléculaire des HDL
- 5 - Structuration du manteau de surface de *Trypanosoma brucei*
- 6 - Répartition des AVS en fonction du résidu C-terminal
- 7 - Séquences nucléotidiques identifiées (avec correspondance amino-acide) pour les AVS AnTat 1.1 et AnTat 1.8
- 8 - Séquences amino-acides des AVS 117, ITat 1.2 et 1.3
- 9 - Comparaison des régions C-terminales des AVS ITat 1.1 et ITat 1.4
- 10- Comparaison des régions N-terminales des AVS issus de différentes espèces de trypanosomes
- 11- Localisation de la position des ponts disulfure et de l'unique groupement thiol dans l'AVS 117
- 12- Représentation des "heptades" dans les AVS 117 et AnTat 1.1
- 13- Localisation des épitopes de l'antigène variable de surface du variant WraTat-1 de *T.b.rhodesiense*
- 14- Représentation schématique des régions immunodominantes de l'AVS MiTat 1.6 de *T.b.brucei*
- 15- Schématisation de la structure C-terminale de l'AVS MiTat 1.4 (117)
- 16- Structure de l'oligosaccharide C-terminal proposée par Ferguson
- 17- Structure de l'oligosaccharide C-terminal proposée par Schmitz
- 18- Clonage des différents variants de *T.b.brucei*
- 19- Profils électrophorétiques comparatifs des fractions antigéniques purifiées par chromatographie d'affinité
- 20- Révélation immunologique des fractions antigéniques purifiées F2, F3 et F4 vis à vis d'un immunserum dressé à partir de la fraction F2 (AnTat 1.1)
- 21- Profils électrophorétiques comparatifs des fractions antigéniques purifiées par chromatographie d'affinité
- 22- Profil électrophorétique des fractions antigéniques purifiées sur colonne de Concanavale A-sépharose

- 23- Distribution relative des bandes de taille moléculaire 120 000 et 60 000 dans les fractions F2, F3 et F4
- 24- Profil électrophorétique des fractions antigéniques membranaires
- 25- Profil électrophorétique comparé des formes antigéniques membranaires
- 26- Chromatographie liquide haute performance de gel perméation
- 27- Chromatographie liquide haute performance de gel perméation
- 28- Profils délution comparés des fractions F2 et F3 en RP-HPLC
- 29- Structure C-terminale de la forme soluble du variant MiTat 1.4 (T.b.brucei)
- 30- Représentation schématique d'une protéine de L.donovani et d'un lipophosphoglycane (LPG)
- 31- Profil chromatographique HPLC des phospholipides standards
- 32- Répartition qualitative des phospholipides présents dans la phase organique de délipidation des formes membranaires (pCMPSA et ZnCl<sub>2</sub>) de l'antigène
- 33- Chromatographie de gel filtration de l'hydrolysate tryptique de l'AVS AnTat 1.1
- 34- Localisation des fractions tryptiques dans l'AVS AnTat 1.1 de T.b.brucei
- 35- Spectres dichroïques
- 36- Séquence protéique de reconnaissance des phospholipides
- 37- Séquences potentielles de reconnaissance des phospholipides
- 38- Séquences potentielles de reconnaissance des phospholipides et des ions calcium
- 39- Variante AnTat 1.8 : profil électrophorétique des fractions antigéniques purifiées par affinité sur Concanavalline A-sépharose
- 40- Marquage par l'iodo (1-<sup>14</sup>C) acétamide 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
- 41- Position des résidus de cystéine dans l'AVS 117 et organisation des ponts disulfure
- 42- Marquage par l'acide iodo (2-<sup>14</sup>C) acétique d'un surnageant pH 5.5 d'une suspension parasitaire à différents temps d'incubation
- 43- Représentation graphique de la réactivité immunologique des préparations antigéniques (fraction F2) du variant AnTat 1.8 par test ELISA
- 44- Représentation graphique de la réactivité immunologique croisée des préparations antigéniques AnTat 1.8 (fraction F2) vis à vis d'immunoserums hétérologues par test ELISA

45- Profil électrophorétique des lipoprotéines humaines VLDL et LDL

46- Profil électrophorétique des lipoprotéines humaines HDL

47- Isoélectrofocalisation des lipoprotéines

48- Etude de la fixation des HDL humaines sur l'antigène variable purifié par test ELISA

49- Etude de la fixation des lipoprotéines sur l'antigène variable purifié (fraction F2 ou fragment N-terminal) par test ELISA

50- Profil chromatographique de gel filtration de la fraction HDL humaine délipidée

51- Profil électrophorétique des fractions purifiées sur Sephacryl S-200

52- Isoélectrofocalisation des lipoprotéines

TABLEAUX

=====

- 1 - Classification des Trypanosomatidae
- 2 - Principales propriétés physiques des lipoprotéines
- 3 - Propriétés des apolipoprotéines majeures du plasma humain
- 4 - Répartition des principales apolipoprotéines dans les lipoprotéines
- 5 - Données actuelles sur les structures C-terminales proches de celle de l'AVS
- 6 - Composition glucidique des fractions d'antigène purifié sur colonne de Concanavalline A-Sépharose
- 7 - Compositions amino-acide des formes solubles (F2,F3 et F4) et des formes membranaires de l'antigène variable
- 8 - Composition glucidique des formes solubles de l'antigène variable AnTat 1.1, T.b.brucei
- 9 - Teneur en phosphore de l'antigène variable AnTat 1.1 de la forme soluble (fractions F2,F3 et F4) après purification et des formes membranaires natives (pCMPSA et ZnCl<sub>2</sub>)
- 10- Teneur en phosphore de la forme soluble ( F2,F3 et F4)et des formes membranaires (pCMPSA et ZnCl<sub>2</sub>) après délipidation
- 11- Répartition relative des acides gras dans les antigènes obtenus avec les protocoles utilisant le pCMPSA ou le chlorure de zinc (AnTat 1.1, T.b.brucei)
- 12- Principales caractéristiques des sérums humain et bovin
- 13- Etude de l'interaction lipoprotéine-parasite par tests immunocytochimiques

TABLE DES MATIERES DE L'APPENDICE TECHNIQUE

I - Méthodes d'étude physico-chimique

A - Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS

1 - Principe

2 - Technique

3 - Conditions opératoires

4 - Détermination de la masse moléculaire apparente

B - Chromatographie liquide haute performance (HPLC)

1 - Chromatographie HPLC de gel perméation

a - étude de la polymérisation de l'antigène

b - séparation des phospholipides

2 - Chromatographie HPLC en phase inverse

C - Composition amino-acide

1 - Hydrolyse

2 - Analyse des acides aminés sur auto-analyseur

D - Composition glucidique

1 - Méthanolyse

2 - N-acétylation et dé-O-acétylation

3 - Tri méthylsilylation

4 - Chromatographie en phase gazeuse

E - Dosage du phosphore

F - Délipidation

G - Composition lipidique

H - Etude en dichroïsme circulaire

II - Méthodes d'étude structurale

A - Conditions d'utilisation des différents enzymes protéolytiques

1 - Enzymes utilisés

2 - Tampons d'incubation

3 - Protocoles d'hydrolyse

B - S-carboxamidométhylation

III - Méthodes d'étude immunologique

A - Immunoblotting

1 - Principe

2 - Conditions opératoires

B - Méthode immunoenzymatique en phase hétérogène (ELISA)

IV - Etude de l'interaction lipoprotéines-parasites

A - Préparation des lipoprotéines

1 - Isolement

2 - Purification

B - Mise en évidence de l'interaction parasite-lipoprotéine par technique immunocytochimique

1 - Sérum marqué à l'isothiocyanate de fluoréscéine (FITC):

immunofluorescence

2 - Sérum marqué à la peroxydase de Raifort

C - Mise en évidence de l'interaction AVS-lipoprotéine par test immunoenzymatique (ELISA)



GOMES Véronique

**STRUCTURE ET PROPRIETES INTERACTIVES  
DE L'ANTIGENE VARIABLE DE *Trypanosoma brucei brucei***

**STRUCTURE AND INTERACTION PROPERTIES OF THE VARIABLE  
SURFACE ANTIGEN OF *Trypanosoma brucei brucei***

Thèse de Doctorat en Biochimie - Lille Flandres Artois - 1988

Mots-clés : Trypanosomes africains  
Trypanosoma brucei brucei  
Glycoprotéine de surface  
Facteur trypanocide  
Lipoprotéine de haute densité

---

**RÉSUMÉ DE LA THÈSE :**

Les trypanosomes africains sont des protozoaires flagellés qui ont la particularité d'échapper à la réponse immunitaire de l'hôte par un mécanisme biologique complexe appelé "variation antigénique". Ce phénomène est caractérisé par la production séquencée de glycoprotéines de surface, chacune ayant une spécificité immunologique distincte.

Ces antigènes variables forment, en surface parasitaire, une monocouche dense recouvrant totalement la membrane plasmique.

A partir de populations clonées de trois variants de *Trypanosoma brucei brucei* (variants AnTat 1.1, AnTat 1.8 et AnTat 1.10), des antigènes variables ont été isolés et purifiés selon différents protocoles.

L'analyse physico-chimique de ces antigènes a permis de définir des éléments structuraux communs entre les antigènes : taille moléculaire apparente, composition amino acide, teneur en sucres et en phosphore. Une étude approfondie de l'antigène du variant AnTat 1.1 a été envisagée sur les plans :

- de l'hétérogénéité moléculaire en rapport avec les critères d'affinité pour la Concanavale A, de taille moléculaire et d'hydrophilie/hydrophobie relative,
- de l'organisation moléculaire : l'antigène variable s'organise en deux domaines N- et C-terminaux reliés par une zone charnière.

L'étude de l'agencement du manteau de surface parasitaire montre qu'il existe, en fonction du variant étudié, des différences dans le degré de polymérisation de l'antigène variable.

Parallèlement à la réponse immunologique de l'hôte, existent dans le sérum humain normal des facteurs responsables d'une trypanocidie spécifique pour la sous-espèce *T.b. brucei* dont le support est représenté par les lipoprotéines de haute densité (HDL). Une étude des interactions HDL-trypanosomes et HDL-antigène variable purifié a été réalisée en utilisant respectivement les techniques immunocytochimiques, immunoenzymatiques et le dichroïsme circulaire. Dans ces conditions, a été mise en évidence une affinité entre les HDL et l'antigène organisé en manteau autour du parasite ou purifié. Enfin, le fragment N-terminal de l'antigène variable est responsable de cette interaction.

---

**JURY**

Président : Professeur J. MONTREUIL  
Rapporteurs : Professeur B. FOURNET  
Professeur N. VAN MEIRVENNE  
Examineurs : Docteur G. HUET-DUVILLIER  
Professeur P. DEGAND