

50376
1982
185

50376
1982
185

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET DES TECHNIQUES DE LILLE

T H È S E

présentée à l'université de LILLE I pour l'obtention du titre
de

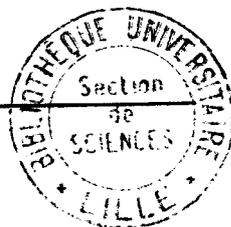
DOCTEUR DE TROISIEME CYCLE (Mention biochimie appliquée)

par

Philippe NIRDE¹

HORMONES DE SCHISTOSOMA MANSONI

ET INTERFACE HOTE - PARASITE



Soutenu le 16 décembre 1982 devant la commission d'examen

MM. J. MONTREUIL *président*
A. CAPRON *rapporteur*
M. DELAAGE *membres*
J.P. DESSAINT
M. DURCHON
G. TORPIER

Ce travail a été réalisé dans les laboratoires du
Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire
du Professeur André CAPRON .

(INSERM U 167 - CNRS- ERA 422)

Institut PASTEUR de LILLE.

Je dédie cette thèse à ma famille , en particulier à mon père, décédé des suites d'une bilharziose quelques mois après le début de ce travail.

Je remercie sincèrement les membres du jury ainsi que les chercheurs et techniciens qui ont, par leurs critiques et leurs conseils, participé à l'élaboration de ce travail.

TABLE DES MATIERES .

<u>INTRODUCTION .</u>	1
<u>CHAPITRE I: CONNAISSANCES ACTUELLES SUR LE PARASITE.</u>	6
<u>I.1 . LE CYCLE PARASITAIRE .</u>	8
<u>I.2 . HORMONES ET INTERFACES HÔTE-PARASITE.</u>	11
I.2.1. NATURE DE L'HOTE DEFINITIF ET DEVELOPPEMENT PARASITAIRE.	11
I.2.2. INFLUENCE DE LA PHYSIOLOGIE DE L'HOTE DEFINITIF.	12
I.2.2.1. <i>Effet de la castration.</i>	12
I.2.2.2. <i>Effet d'hormones exogènes.</i>	13
I.2.2.3. <i>Hormones exogènes métabolisées par <u>S.mansoni</u></i>	13
I.2.3. INFLUENCE DES PARASITES ENTRE EUX.	14
I.2.4. HORMONES DU PARASITE .	15
I.2.4.1. <i>Les amines biogènes.</i>	15
I.2.4.2. <i>Les estérases.</i>	16
<u>CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES .</u>	17
<u>II.1 . INFESTATION DES ANIMAUX DE LABORATOIRE</u>	19
<u>II.2. COLLECTE DES PARASITES.</u>	19
II.2.1. PREPARATION DE SCHISTOSOMULES MECANIQUES.	19
II.2.2. PREPARATION DE SCHISTOSOMES 11 JOURS.	21
II.2.3. PREPARATION DE SCHISTOSOMES 20 JOURS.	21
II.2.4. PREPARATION DE SCHISTOSOMES ADULTES.	22
II.2.4.1. <i>Par perfusion totale.</i>	22
II.2.4.2. <i>Par perfusion mésentérique et portale.</i>	22

II.2.5 PREPARATION D'OEUFs DE SCHISTOSOME.	23
<u>II.3 INJECTIONS D'HORMONES EXOGENES CHEZ L'ANIMAL</u>	23
<u>II.4. DOSAGES RADIO IMMUNOLOGIQUE DES ECDYSTEROIDES.</u>	24
II.4.1. PRINCIPES GENERAUX.	24
II.4.2. METHODOLOGIE GENERALE.	25
II.4.3. ADAPTATION DU DOSAGE AU MODELE SCHISTOSOME.	30
II.4.4. COURBE DE REFERENCE ET CALCULS.	33
<u>II.5. CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE.</u>	36
II.5.1. PRINCIPES GENERAUX.	36
II.5.2. METHODOLOGIE.	38
II.5.2.1. <i>Extraits parasitaires.</i>	38
II.5.2.2. <i>Extraits sériques ou urinaires.</i>	39
<u>CHAPITRE III : RESULTATS.</u>	40
<u>III.1. DOSAGES RADIOIMMUNOLOGIQUES DES ECDYSTEROIDES</u>	42
<u>A DIFFERENTS STADES PARASITAIRES.</u>	
III.1.1 SCHISTOSOMULES MECANIQUES	42
III.1.2 SCHISTOSOMES 11 JOURS.	42
III.1.3. SCHISTOSOMES 20 JOURS.	43
III.1.4. SCHISTOSOMES ADULTES (40 JOURS).	43
III.1.5. OEUFs DE SCHISTOSOMES.	47
III.1.6. CHEZ <i>Fasciola hepatica.</i>	47
<u>III.2. DOSAGES RADIOIMMUNOLOGIQUES DES ÉCDYSTÉROIDES</u>	50
<u>DANS LE SÉRUM OU LES URINES D'HOTES INFESTÉS.</u>	
III.2.1. CATABOLISME D ECDYSONE EXOGENE.	50
III.2.1.1. <i>Dans le sérum</i>	50

III.2.1.2. <i>Dans les urines.</i>	52
III.2.2. APPARITION D'ECDYSTEROIDES SERIQUES ENDOGENE.	55
III.2.2.1. <i>Animaux infestés par S.mansoni</i>	55
III.2.2.2. <i>Hamsters infestés par D.vitae</i>	57
<u>III.3. DOSAGES D'ÉCDYSTÉROIDES CHEZ LES PRIMATES INFESTÉS.</u>	57
III.3.1. CHEZ LE SINGE <i>Patas patas.</i>	57
III.3.2. CHEZ L'HOMME.	60
<u>CHAPITRE IV : DISCUSSION.</u>	65
<u>IV.1. DOSAGES DES ECDYSONES DANS LE PARASITE.</u>	67
IV.1.1. SCHISTOSOMULES MECANIQUES.	67
IV.1.2. SCHISTOSOMES 11 JOURS.	68
IV.1.3. SCHISTOSOMES 20 JOURS.	70
IV.1.4. SCHISTOSOMES ADULTES (40 JOURS).	70
IV.1.5. OEUFS DE SCHISTOSOMES.	
IV.1.6. CHEZ <i>Fasciola hepatica.</i>	72
<u>IV.2. DOSAGES DES ECDYSTÉROIDES DANS LE SÉRUM OU L'URINE</u>	73
<u>D'HÔTES VERTÉBRÉS INFESTÉS,</u>	
IV.2.1. CATABOLISME D'ECDYSONE EXOGENE.	73
IV.2.1.1. <i>Dans le sérum.</i>	73
IV.2.1.2. <i>Dans les urines.</i>	75
IV.2.2. EXISTANCE D'ECDYSTEROIDES SERIQUES CHEZ LES ANIMAUX	77
PARASITES.	

<u>IV.3. DOSAGES D'ECDYSTÉROIDES SÉRIQUES CHEZ LES PRIMATES.</u>	79
IV.3.1. CHEZ LE SINGE <i>Patas patas.</i>	79
IV.3.2. CHEZ L'HOMME.	80
<u>CHAPITRE V : CONCLUSIONS.</u>	83
<u>CHAPITRE VI : INFORMATIQUE.</u>	88
BIBLIOGRAPHIE.	102

RESUME.

Le dosage radio immunologique et la combinaison chromatographie liquide haute performance - dosage radio immunologique ont permis de mettre en évidence pour la première fois, la présence d'ecdysone et de 20 hydroxyecdysone chez le parasite humain *Schistosoma mansoni*. Ces hormones apparaissent :

- A J11 : période de transition entre la forme juvénile et le parasite adulte, caractérisée par des paramètres physiologiques précis du schistosome.

- A J40 : période de maturation du système reproducteur femelle, caractérisée par la ponte des oeufs.

Les schistosomes excrètent , dans le sang et les urines de leur hôte, ces ecdystéroïdes dès le 6 ème jour de l'infestation.

Alors qu'une rétention de ces hormones sériques est observée chez des animaux permissifs (hamsters , singes) et chez l'homme , on note une diminution de ces ecdystéroïdes parasites chez l'animal semi permissif (rats).

Le rôle possible de ces hormones parasites, ainsi que leurs applications sont discutés.

MOTS CLES : SCHISTOSOMIASE/TREMATODA - ECDYSTEROÏDES/HORMONES STEROÏDES -
DOSAGE . IMMUNOLOGIE - ANALYSE . CHROMATOGRAPHIE PHASE
LIQUIDE - SERUM . DEPISTAGE - URINE . DEPISTAGE .

INTRODUCTION

"La schistosomiase (ou Bilharziose) constitue un problème sérieux dans 73 pays tropicaux où le nombre de personnes infectées est estimé à plus de 200 millions" (note d'information de l'Organisation Mondiale de la Santé, Mai 1982).

Préoccupation majeure de l'Organisation Mondiale de la Santé, (O.M.S.), cette maladie gagne du terrain du fait de la mise en valeur des ressources hydriques dans la plupart des pays tropicaux en développement.

Découverte en 1851 par le chercheur allemand BILHARZ, la bilharziose est une parasitose des zones inter-tropicales dont les agents sont des vers gonochoriques du genre *Schistosoma* (Weinland), Trématodes Schistosomatidae de l'embranchement des Plathelminthes.

Il existe en fait cinq principales espèces de Schistosomes pathogènes pour l'homme :

Schistosoma mansoni (Sambon, 1907) : Agent de la bilharziose intestinale et hépatosplénique

Schistosoma haematobium (Bilharz, 1852) : Agent de la bilharziose urinaire

Schistosoma japonicum (Katsurada, 1904) : Agent de la bilharziose hépatosplénique d'Extrême-Orient

Schistosoma intercalatum (Fischer, 1934) : Agent de la bilharziose rectale.

Schistosoma mekongi (Voge, Bruckner et Bruce, 1978) : espèce nouvelle séparée de *S. japonicum*.

Comme beaucoup de parasites, les schistosomes présentent des adaptations étonnantes pour réussir leur cycle qui implique obligatoirement et successivement un mollusque d'eau douce (appelé hôte intermédiaire) et un vertébré (appelé hôte définitif).

Chez l'homme, les premiers signes cliniques vont apparaître 30 à 50 jours après l'infection, soit brusquement, soit très progressivement ou alors passer inaperçus. Généralement, les signes digestifs et intestinaux se situent au premier plan. Ces symptômes sont causés essentiellement par les lésions tissulaires provoquées par les réactions granulomateuses se développant autour des oeufs .

En dehors des variations des constantes biologiques comme l'hyperéosinophilie ou l'augmentation des transaminases, la détection des oeufs dans les selles (S. mansoni) ou dans les urines (S. haematobium) est capitale pour confirmer le diagnostic.

A ce stade seulement, une chimiothérapie faisant intervenir des composés mortels pour les parasites (anti-métaboliques) mais aussi toxiques pour l'homme, peut être mise en oeuvre. Même après guérison, les séquelles persistent chez le patient (granulomes, fibrose hépatique). Sachant qu'il n'existe aucune méthode préventive pour de telles maladies, la mise au point de techniques diagnostiques sensibles et de vaccins constitueraient de précieux outils de lutte.

Les recherches menées au Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire de Lille sont essentiellement axées vers l'étude des mécanismes effecteurs de l'immunité à Schistosoma mansoni. Des mécanismes très

efficaces faisant intervenir des phagocytes mononucléés et des éosinophiles en présence d'anticorps de classe IgE et de sous-classe IgG2a ont été clairement démontrés chez l'homme comme chez le rat. En effet, ces anticorps dirigés contre le parasite induisent l'activation, l'adhérence et la cytotoxicité des cellules effectrices vis-à-vis de jeunes schistosomules (formes larvaires infestantes de l'hôte définitif).

Malgré l'efficacité de ces systèmes, l'expérience indique que le parasite devient très vite insensible à ces attaques immunes.

A ce sujet, nous devons rappeler qu'en plus de la notion d'immunité concomitante introduite par Smithers et al. (1969), à savoir que le parasite stimule une réponse immunitaire dont il évite les conséquences, le parasite évolue et présente de nombreuses différenciations chez son hôte définitif.

Dans cet esprit, les recherches effectuées sur la différenciation du complexe membranaire délimitant le tégument externe du parasite ont apporté les prémices de phases critiques du développement de ce métazoaire (TORPIER et al.- 1982.)

C'est ainsi que l'étude structurale de remaniements des protéines intégrales de la membrane induits par anticorps ou naturellement observables a permis de détecter un phénomène de desquamation membranaire vers le 15ème jour de l'évolution du parasite (TORPIER et al.-1982). Un tel phénomène rappelait étrangement le processus de mue chez les arthropodes où ces métamorphoses sont induites par des hormones spécifiques : l'ecdysone et la 20 hydroxyecdysone.

La physiologie endocrine des trématodes présentant de nombreuses lacunes, il nous a paru essentiel de contribuer par un travail de recherche fondamentale à une meilleure connaissance des réactions endocrines essentielles dont dépendent le développement et la reproduction du parasite.

Des études préliminaires nous ont montrées qu'une telle étude était possible (TORPIER et al.-1982).

CHAPITRE I

CONNAISSANCES ACTUELLES SUR LE PARASITE

CHAPITRE I : CONNAISSANCES ACTUELLES SUR LE PARASITE.

I.1. LE CYCLE PARASITAIRE.

I.2. HORMONES ET INTERFACES HÔTE-PARASITE.

I.2.1. NATURE DE L'HÔTE DEFINITIF ET DEVELOPPEMENT PARASITAIRE.

I.2.2. INFLUENCE DE LA PHYSIOLOGIE DE L'HÔTE DEFINITIF.

I.2.2.1. Effet de la castration.

I.2.2.2. Effet d'hormones exogènes.

I.2.2.3. Hormones exogènes métabolisées par S. mansoni.

I.2.3. INFLUENCE DES PARASITES ENTRES EUX.

I.2.4. HORMONES DU PARASITE.

I.2.4.1. Les amines biogènes.

I.2.4.2. Les estérases.

I - 1. LE CYCLE PARASITAIRE

Les Schistosomes sont des invertébrés sexués. Le mâle et la femelle, dont la durée de vie peut atteindre une vingtaine d'années, vivent accouplés dans les veinules de la sous-muqueuse intestinale, ou de la vessie selon l'espèce parasitaire (Fig. 1.A).

La production d'oeufs et de sperme est continue. Ainsi, la femelle pond de 15 à 30 oeufs par jour.

Chaque oeuf pourvu d'un éperon latéral (S. mansoni) ou terminal (S. haematobium) diffuse des enzymes et provoque de graves lésions tissulaires pouvant même conduire à des tumeurs cancéreuses épithéliales (carcinomes).

Les oeufs s'accumulent dans les fins capillaires superficiels et provoquent leur congestion. L'éclatement de ces capillaires libère les oeufs dans la lumière de l'organe parasité (Fig. 1.B).

Ces derniers, rejetés à l'extérieur de l'organisme avec les fèces (S. mansoni), ou les urines (S. haematobium), éclosent au contact de l'eau douce et donnent naissance à un miracidium (Fig. 1.C).

A ce stade, le cycle évolutif nécessite obligatoirement l'intervention d'un hôte intermédiaire : un mollusque d'eau douce spécifique de chaque espèce de Schistosome (Fig. 1.D).

- *Bulinus contortus* pour *Schistosoma haematobium*
- *Biomphalaria glabrata* pour *Schistosoma mansoni*
- *Oncomelania nosophora* pour *Schistosoma japonicum*, race japonaise
- *Bulinus forsterlii* pour *Schistosoma intercalatum*, espèce du Zaïre
- *Lithoglyphopsis aperta* pour *Schistosoma mekongi*.

Le miracidium, large nageante ciliée, pénètre dans le mollusque au niveau des tentacules par un phénomène d'attraction miracidienne non totalement élucidé. Il subit des transformations pour devenir un sporocyste primaire produisant à son tour des sporocystes fils qui donnent naissance à des cercaires (Fig. 1.D.). Ces formes ultimes seront libérées par le mollusque parasité, de 30 à 40 jours après son infestation (Fig. 1.E) selon une chronobiologie précise.

Ce phénomène d'amplification par multiplication asexuée à l'état larvaire permet qu'un mollusque infesté par un seul miracidium puisse émettre plusieurs milliers de cercaires génotypement identiques.

La cercaire est une deuxième larve nageante, non ciliée, mais pourvue d'un appendice caudal fourchu (furcocercaire). Cette larve infeste activement l'homme par voie transcutanée (Fig. 1.F) et se transforme en ce que l'on appelle un schistosomule.

Cette nouvelle larve s'engage dans les veines et les vaisseaux lymphatiques, gagne le coeur par la circulation de retour (Fig. 1.G), puis les poumons (Fig. 1.H). Après retour au coeur, les parasites parviennent au foie par l'intermédiaire de la circulation veineuse du système porte (8 - 10ème jour). Dans le foie, les parasites deviennent adultes. Les vers adultes, après accouplement remontent le flux à contre-courant (Fig. 1.A) et par un tactisme particulier à chaque espèce, gagnent une ramification veineuse déterminée pour la ponte (Fig. 1.B).

Fig. 1 : LE CYCLE PARASITAIRE DE SCHISTOSOMA MANSONI.

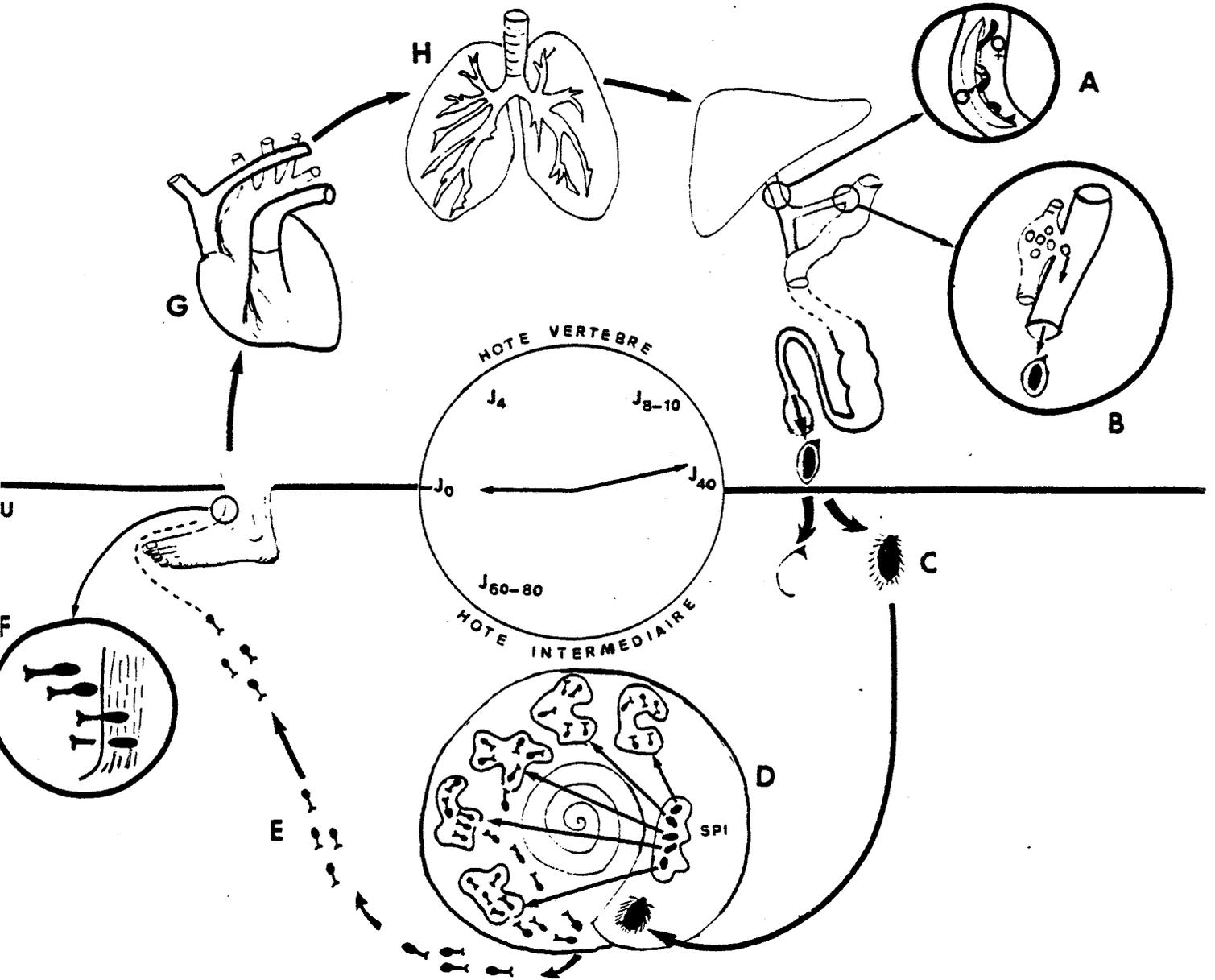


Fig. 1



I.2. HORMONES ET INTERFACES HÔTE-PARASITE

I.2.1. Nature de l'hôte définitif et développement parasitaire

Le contraste entre spécificité étroite au niveau Mollusque et spécificité large au niveau vertébré est particulièrement net chez les schistosomes, sauf pour S. haematobium. Cependant, l'évolution du parasite présente des variations selon l'hôte vertébré expérimental (BRUMPT - 1936).

Trois catégories d'hôtes peuvent être distinguées :

- les hôtes dits "permissifs", comme le hamster, la souris ou le cobaye assurent aux parasites un développement normal et présentent les symptômes de la maladie ;
- les hôtes dits "semi-permissifs" comme le rat, rejettent la population parasitaire avant la maturation complète des vers ;
- les hôtes "non permissifs" comme le porc ou le chien qui ne contractent pas la maladie.

Chez les hôtes permissifs :

- La souris est le modèle expérimental qui assure une évolution normale au parasite ainsi qu'une sexualité parfaite.
- Le hamster est d'un degré d'efficacité semblable à celui de la souris dans le cas d'infestation à deux sexes (parasites mâles et femelles). Par contre, en infestation unisexuée à cercaires mâles, une certaine labilité de la gonochorie des parasites peut atteindre 40 % des individus.
- Le cobaye est un modèle expérimental qui permet d'obtenir la féminisation des vers mâles dans une proportion pouvant atteindre 100 % de la population parasitaire mâle, même dans le cas d'infestation bisexuée (BUTTNER - 1950). L'une des illustrations les plus significatives est celle donnée par VOGEL (1947) qui infeste simultanément des cobayes et des souris avec des cercaires. Cet auteur constate chez le cobaye qu'environ 40 % des parasites mâles présentaient un ovaire à des degrés divers de développement et dans de rares cas un ovotestis.

Bien que ces expériences n'aient pas fait l'objet d'investigations plus poussées, on peut cependant en conclure que la gonochorie chez les schistosomes n'est pas déterminée de façon irrévocable et peut présenter une certaine labilité influencée par la nature de l'hôte expérimental.

Chez les hôtes semi-permissifs :

CIOLI montre la réversibilité du phénomène de croissance de S. mansoni chez le rat. En effet, les rares vers infestants de S. mansoni âgés de plus de 15 jours sont "chétifs". Ils restent dans le foie et les femelles pondent en faible quantité des oeufs non fertilisés.

Après un transfert chirurgical de ces parasites chez un hôte permissif comme le hamster, ils augmentent de taille, se localisent dans le mésentère, et les femelles se remettent à pondre des oeufs normaux.

Inversement, quand des parasites juveniles sont transplantés du hamster chez le rat, ils régressent en taille, restent localisés dans le foie et les femelles pondent des oeufs incomplètement formés (CIOLI et al., 1977).

1.2.2. Influence de la physiologie de l'hôte définitif

Selon l'état physiologique d'un même hôte, l'évolution du parasite sera différente, en particulier selon le taux en hormones sexuelles du vertébré. Expérimentalement, ces modifications hormonales sont obtenues soit par castration, soit par injection d'hormones exogènes à l'animal.

1.2.2.1. Effet de la castration

Les modèles expérimentaux utilisés pour ce genre d'étude sont le rat, le cobaye ou le hamster.

La mutilation apportée par la castration modifie la physiologie de l'animal, ce qui rend difficile ce genre d'approche et, par voie de conséquences, peut expliquer les résultats parfois contradictoires dans ce domaine. En général, la castration de l'hôte inhibe le développement du parasite mâle (BERG , 1953-ROBINSON- 1959)

L'injection de testostérone diminue davantage le nombre de vers femelles que de mâles. Par contre, la castration de l'hôte, associée à des injections de testostérone, diminue de façon égale le nombre de parasites mâles et femelles (BERG , 1957).

I.2.2.2. Effets d'hormones exogènes

On sait depuis longtemps que l'administration de testostérone à des souris infestées réduit le nombre d'oeufs émis par le parasite et induit la formation de vers hermaphrodites (ROBINSON - 1957).

Les anti-testostérones, comme l'éthylène Di Méthane Sulphonate (EDMS) conduit à la stérilité des vers par la disparition des testicules chez les parasites mâles et à l'involution des ovaires chez les parasites femelles (DAVIES & JACKSON , 1970).

L'action des oestrogènes, sous forme d'implant de 20 mg, est comparable à celle de la testostérone (BARRABES , DUONG & COMBESCOT , 1979). Certains auteurs pensent que cette action protectrice est sous la dépendance de la forme tridimensionnelle de la molécule.

I.2.2.3. Hormones exogènes métabolisées par S. mansoni

Toutes ces expériences sur l'influence d'hormones exogènes sur le parasite ont conduit les équipes de recherche à l'étude plus précise des interactions hormone-parasite. Si quelques travaux montrent la présence

de stéroïdes chez S. mansoni, il semble à peu près certain que la synthèse de ces hormones ne soit effectuée qu'à partir de précurseurs exogènes. Dans le cas de S. mansoni, seuls les adultes sont capables de convertir certains stéroïdes (Cholestérol, Cortisone, Estrone, Testostérone, 17 OH. progestérone) (BRIGGS , 1972).

De plus, les inhibiteurs de la conversion de certaines hormones stéroïdes ont également la possibilité lorsqu'ils sont injectés à un animal parasité, de diminuer la charge parasitaire et le nombre d'oeufs dans les fèces (BRIGGS , 1972).

1.2.3. Influence des parasites entre eux

Le troisième type de facteur ayant une action sur le développement parasitaire est la présence ou non du parasite de l'autre sexe. Dans le cas de S. mansoni et S. japonicum, l'absence du partenaire mâle entraîne le développement anormal du système reproducteur du parasite femelle. En général, dans les infestations unisexuées, le mâle se développe normalement et produit du sperme alors que la femelle ne peut atteindre sa maturité sexuelle.

La mise en présence en culture in vitro de parasites mâles et femelles provenant chacun d'infestations unisexuées, conduit en quelques heures à l'accouplement des parasites. L'analyse des femelles révèle une reprise du développement de leurs glandes vitellines. De même, la présence d'extraits acétone ou éther de mâles, dans une culture in vitro de femelles unisexuées, permet la reprise de la maturation du système reproducteur femelle (SHAW et al., 1977 ; CLOUGH, 1981). Par contre, les femelles de S. haematobium mûrent normalement lorsqu'elles sont en infestation unisexuée, mais les oeufs pondus dans le foie ne

contiennent pas de miracidium (SABHA et al.-1977). Bien qu'il a été démontré qu'une protéine de 66.000 daltons ,synthétisée par les schistosomes mâles était transférée à la femelle lors de l'accouplement (ATKINSON et al.-1980), nous ne connaissons pas actuellement la nature du,ou des, facteur(s) qui permet le développement normal du système reproducteur femelle (SHAW - 1977).

1.2.4. Hormones du parasite

L'étude des hormones propres aux parasites n'a jamais été, pour des raisons évidentes, un axe prioritaire de recherche. La priorité était portée sur la biologie du parasite (métabolisme ; formation des oeufs) et sur l'immunologie (antigénicité ; mécanismes effecteurs ; réponse parasitaire) en vue d'une prophylaxie efficace et à court terme.

Les études portant sur le système hormonal sont essentiellement axées sur les neurotransmetteurs et, en ce qui concerne S. mansoni, aucun travail n'est mentionné concernant d'autres types d'hormones.

1.2.4.1. Les amines biogènes

Le 5-Hydroxytryptamine et les catécholamines sont les principales amines biogènes étudiées chez le parasite humain S. mansoni. La 5-OH-tryptamine mise en évidence par le microscope à fluorescence est présente dans le parasite à des quantités dix fois supérieures à celle du cerveau des mammifères (BENNETT et al., 1969). Sa localisation est ganglionnaire et nerveuse (BENNETT & BUEDING , 1971). La voie anabolique est double : soit par décarboxylation du 5-OH tryptophane, soit par transport actif de la 5-OH tryptamine à l'intérieur du parasite (CATTO et al., 1979). Quant à la voie catabolique, elle conduit à l'acide 5 OH Indol acétique, grâce à la présence de la mono-amine-oxydase (NIMMO-SMITH et al., 1968). Son rôle est essentiellement axé sur la mobilité du parasite : la sérotonine

stimule la glycolyse de S. mansoni (MANSOUR , 1967) et de F. hepatica (HILLMAN et al., 1974) active l'adényl cyclase de S. mansoni (MANSOUR et al., 1960) et de F. hepatica (HIGASHI et al., 1973) stimule les mouvements rythmiques du ver. A noter, le parallélisme entre la localisation mésentérique du parasite S. mansoni et la production importante de sérotonine par le mésentère de l'homme, par exemple.

La catécholamines ont été mises en évidence par les méthodes histo-chimiques classiques (BENNETT , 1971). Sa localisation se situe dans le réseau nerveux du parenchyme, qui met en contact les troncs nerveux avec les terminaisons neuromusculaires sous-tégumentaires du parasite. Son rôle possible n'est pas encore élucidé.

1.2.4.2. Les estérases

Mise en évidence par les techniques histo-chimiques de BUEDING, elles sont présentes à tous les stades de développement de S. mansoni : dans les neurones et les terminaisons neuromusculaires. Sa présence suggère une activité motrice sensorielle (FRIPP , 1947).

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

CHAPITRE II. : MATERIEL ET METHODES.

II.1. INFESTATION DES ANIMAUX DE LABORATOIRE,

II.2. COLLECTE DES PARASITES,

II.2.1. PREPARATION DE SCHISTOSOMULES MECANIQUES.

II.2.2. PREPARATION DE SCHISTOSOMES 11 JOURS.

II.2.3. PREPARATION DE SCHISTOSOMES 20 JOURS.

II.2.4. PREPARATION DE SCHISTOSOMES ADULTES (40 JOURS).

II.2.4.1. Par perfusion totale.

II.2.4.2. Par perfusion mésentérique et portale.

II.2.5. PREPARATION DES ŒUFS DE SCHISTOSOME.

II.3. INJECTIONS D'HORMONES EXOGÈNES CHEZ L'ANIMAL.

II.4. DOSAGES RADIO IMMUNOLOGIQUES DES ECDYSTÉROÏDES.

II.4.1. PRINCIPES GÉNÉRAUX.

II.4.2. MÉTHODOLOGIE DE RÉFÉRENCE.

II.4.3. ADAPTATION DU DOSAGE AU MODÈLE SCHISTOSOME.

II.4.4. COURBE DE RÉFÉRENCE ET CALCULS.

II.5. CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE,

II.5.1. PRINCIPES GÉNÉRAUX.

II.5.2. MÉTHODOLOGIE.

II.5.2.1. Extraits parasitaires.

II.5.2.2. Extraits sériques ou urinaires.

II.1. INFESTATION DES ANIMAUX DE LABORATOIRE

La souche Porto-Ricaine du parasite Schistosoma mansoni est entretenue à Lille par passages successifs sur hamster (Mesocricetus auratus) et Biomphalaria glabrata. Les cercaires émises par ce mollusque sont concentrées par phototropisme jusqu'à une concentration de 500 cercaires/ml. Les animaux de laboratoire (souris, rat, hamster) sont anesthésiés à l'Imalgène^R100, puis leurs abdomens rasés. Des anneaux sont alors maintenus sur l'abdomen et ensuite remplis de 1 à 2 ml de suspension de cercaires selon l'importance de l'infestation désirée (SMITHERS & TERRY - 1965).

II.2. COLLECTE DES PARASITES

II.2.1. Préparation de Schistosomules mécaniques

La forme infestante du parasite est un organisme eucaryote : la cercaire, constituée d'une tête et d'une queue bifides. Lors de la pénétration dans un tégument d'animal hôte, seule la tête franchit cette barrière cutanée : la cercaire se transforme en schistosomule. Cette transformation est obtenue au laboratoire par deux techniques : (RAMALHO-PINTO et al.- 1974).

- 1ère technique : le passage des cercaires au travers d'une peau de souris préparée extemporanément
- 2ème technique : la rupture mécanique des parties constitutives de la cercaire.

Cette dernière méthode, aboutissant à ce qu'on appelle les schistosomules mécaniques, a été largement utilisée dans ce travail. Aussitôt après avoir réparti, dans les tubes en Pyrex de 25 ml, les cercaires fraîchement émises par les gastéropodes, la suspension est stockée

25 à 30 minutes dans la glace de façon à les engourdir. Ces dernières sont ensuite concentrées par centrifugation à basse vitesse ($100 \times g$) pendant 1 mn 30 - JOUAN E 36). Le surnageant est retiré avec une pipette en verre jusqu'à laisser 1 à 1.5 ml d'eau dans les tubes. La rupture mécanique des cercaires est obtenue alors par agitation forte des tubes (1 mn. Vortex Bioblock). Un contrôle sous loupe binoculaire permettra de s'assurer du bon rendement de la manipulation. Les schistosomules mécaniques (tête des cercaires) sont purifiés sur gradient de PERCOLL 54 % dans du M.E.M. (minimum essential medium, GIBCO) froid :

- 54 % PERCOLL (d = 1.131 g/ml)
- 10 % Suspension de cercaires
- 36 % M.E.M. 2.7 X
- volume final 18 ml

Une centrifugation de 10 mn à 1500 tours/mn - $350 \times g$ et à 4°C permet de séparer en une étape les schistosomules mécaniques de leurs queues, en fonction de leurs différences de densité (densité de la cercaire : 1.0473 ; densité de la tête : 1.0535 ; densité des queues : 1.04). Le surnageant est retiré par aspiration et le culot de schistosomules est lavé quatre fois avec du M.E.M. IX.

Les schistosomules mécaniques ainsi préparés sont transférés dans un tube "Eppendorf", centrifugés à nouveau (Janetski TH12 - 10.000 $\times g$) et lavés deux fois avec du sérum physiologique. Le maximum de surnageant sera alors enlevé avant de conserver la préparation à $- 20^{\circ}\text{C}$.

II.2.2. Préparation de schistosomes 11 jours

Les hamsters, infestés depuis 11 jours, sont tués par dislocation cervicale. Après nettoyage de l'animal à l'alcool à 90°, la cavité thoraco-abdominale est ouverte, les veines portes rénales et sus-hépatiques sont clampées et le foie extrait. Il est ensuite perfusé avec du M.E.M./Héparine/ Ca à 1% , 37°C.

Le perfusat recueilli dans des tubes de verre coniques de 25 ml est centrifugé pendant 3 mn (JOUAN E 96 - 80 x g). Le surnageant est retiré, le culot lavé au M.E.M. puis centrifugé 3 fois à 80 x g 3 mn. Le dernier culot est remis en suspension dans du sérum physiologique froid (4°C) et lavé 2 fois avec cette solution. La suspension de schistosomes est alors versée dans une boîte de Pétri de 4 cm de diamètre et les parasites triés sous loupe binoculaire (grossissement 10 x). Les vers sont transférés dans un tube eppendorf et centrifugés 1 mn à 1000 x g (Janetski TH12). Le maximum de surnageant est aspiré avant de conserver les parasites à -20°C.

II.2.3. Préparation de schistosomes 20 jours

La procédure expérimentale précédente est également utilisée pour la récolte de schistosomes de 20 jours. Deux lots de parasites sont faits en raison de l'hétérogénéité de la population parasitaire à ce stade du développement.

Le premier lot rassemble les parasites les plus grands (> 1 mm) susceptibles de présenter les premières apparences d'une différenciation. Le second lot rassemble le reste de la population parasitaire. Chaque lot est centrifugé pendant 30 secondes (Janetski TH 12) et le maximum

de surnageant aspiré avant de conserver les parasites à - 70°C.

II.2.4. Préparation de parasites adultes 40 jours

II.2.4.1. Par perfusion totale

Sur des hamsters préalablement tués par dislocation cervicale, la veine cave inférieure est dégraissée à l'aide de pinces "AA" puis incisée pour y introduire un trocart relié à un réservoir de sérum physiologique. La veine porte est alors coupée et un flux de sérum physiologique lave la totalité de l'appareil cardio-vasculaire de l'animal. Les parasites adultes sont récupérés puis rincés au sérum physiologique. Les mâles et les femelles encore accouplés sont séparés à l'aide d'un pinceau à dessin, afin d'éviter tout dommage au parasite lors de leur séparation. Les mâles et les femelles séparés sont centrifugés 1 mn (Beckman - Minifuge) ; le surnageant est aspiré et les parasites conservés à -70°C après 2 ou 3 lavages successifs en sérum physiologique.

II.2.4.2. Par perfusion mésentérique et portale

Après incision de la cavité thoraco-abdominale du hamster comme précédemment, une pipette Pasteur est introduite dans la veine porte et les parasites aspirés. De même, une pipette est introduite dans la partie distale de la veine porte et, par aspiration modérée, les parasites, localisés dans les veines mésentériques, sont collectés. Les parasites sont lavés avec du M.E.M. froid (4°C), transférés dans une boîte de Pétri en verre et les couples séparés à l'aide d'un pinceau à dessin. Chaque lot, mâle ou femelle, est ensuite lavé 3 fois avec du sérum physiologique et les parasites centrifugés 1 mn (Beckman-Minifuge).

Le dernier surnageant est totalement aspiré avant une conservation des vers adultes à - 70°C.

II.2.5. Préparation d'oeufs de schistosome

Les oeufs de schistosomes sont séparés à partir de foies de hamsters infestés depuis 40 jours. En routine, dix foies sont homogénéisés pendant 1 mn dans 17 % NaCl. L'homogénat est filtré sur une gaze médicale (1 mm) puis sur tamis (0.124 mm). Le filtrat est décanté deux heures à 4°C. Le surnageant est jeté et le culot déposé sur un gradient de PERCOLL 54 % dans du M.E.M. Après centrifugation 20 mn, 350 x g, les oeufs du culot sont récupérés et lavés abondamment en NaCl 17 %.

II.3. INJECTION D'HORMONES EXOGENES CHEZ L'ANIMAL DE LABORATOIRE

Les animaux sont anesthésiés par injection IM d'Imalgène^R100. Le mélange d'ecdysone 10^{-7} M et de 20 OH Ecdysone $1,7.10^{-7}$ M en solution dans le tampon citrate, est ensuite injecté par voie intraveineuse (intrapéniale).

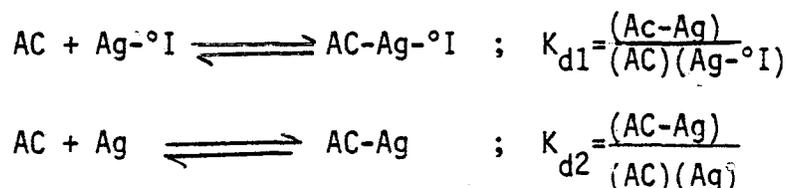
II . 4 . DOSAGES RADIOIMMUNOLOGIQUES DES ECDYSTEROIDES .

II . 4 . 1 . PRINCIPES GENERAUX.

Un dosage radioimmunologique fait intervenir trois réactifs :

- l'anticorps spécifique dirigé contre l'antigène à doser , en l'occurrence l'ecdysone.
- l'antigène radioactif à haute activité spécifique.
- l'antigène froid provenant de l'échantillon biologique à doser.

Il s'établit une compétition entre l'antigène radioactif et l'antigène froid pour l'anticorps spécifique dirigé contre ces deux antigènes selon l'équilibre :



comme les constantes de fixation sont identiques pour les deux antigènes il vient :

$$(AC-Ag^{°}) = (AC-Ag) \frac{(Ag^{°})}{(Ag)} \quad ; \quad \text{avec } (Ag^{°}) = \text{constante.}$$

En conséquence, toute augmentation de l'antigène froid (Ag) va diminuer la formation du complexe radioactif AC-Ag[°] au bénéfice du complexe froid AC-Ag .

Les qualités du dosage sont donc liées à deux facteurs :

- a) L'affinité de l'anticorps pour son antigène , c'est-à-dire l'aptitude qu'à l'AC de ne fixer spécifiquement qu'un seul ligand La spécificité absolue n'existant pas , par conséquent , pour un anticorps donné on aura toujours une famille moléculaire reconnue plus ou moins bien par l'anticorps.

L'affinité ira alors en décroissance au fur et à mesure que l'on s'éloignera de la molécule antigénique initiale.

Cette propriété physico chimique peut être mise à profit pour reconnaître des métabolites de l'antigène initial. Généralement, une bonne méthode radio immunologique à des anticorps dont les constantes d'association sont supérieures à 10^{-9} M.

b) La radioactivité spécifique de l'antigène marqué : de l'ordre de 10^6 Ci / mole.

II. 4. 2. METHODOLOGIE INITIALE .

Le dosage radioimmunologique de l'ecdysone (Fig. 2 a) et de la 20 Hydroxyecdysone (Fig. 2 b) mis au point à MARSEILLE par DE REGGI M., HIRN M. et DELAAGE M. a été adapté à notre laboratoire en respectant le protocole, détaillé dans la Thèse de Michel HIRN (HIRN , 1978 - Thèse de Doctorat d'Etat, Marseille). Pour mémoire, cette technique initiale fait intervenir 4 éléments.

. Production d'antigènes marqués : ces antigènes sont préparés à partir d'un dérivé de l'ecdysone : le succinyl ecdystérone. Ce produit est obtenu à partir d'un mélange d'ecdysone et d'anhydride succinique en solution dans le dioxane.

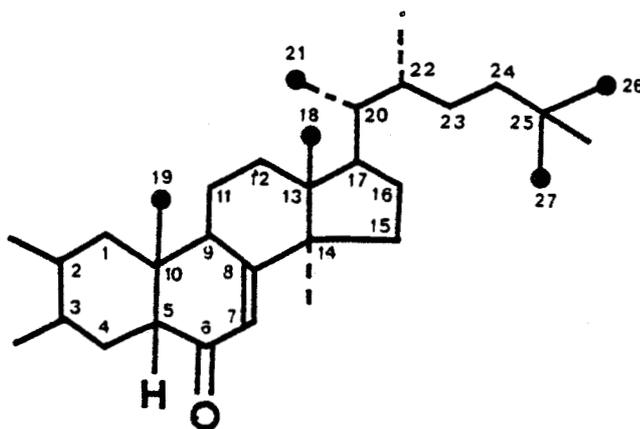
Après purification sur Gel Sephadex A 25 du succinylate d'ecdystérone, la synthèse organique du complexe succinyl-ecdystérone Tyrosine-méthyl-ester (S.E.T.M.E.) est effectuée. Ce complexe ensuite iodé à la chloramine T servira d'antigène marqué (Fig. 3) (activité spécifique supérieure à $1,6 \cdot 10^6$ Ci/mole.

Fig. 2 : Structure de la molécule d'ecdysone (a) et de la
20 hydroxyecdysone (b) . La numérotation conventionnelle
des atomes de carbone figure sur la molécule d'ecdysone.

ECDYSTEROIDES

PM = 464

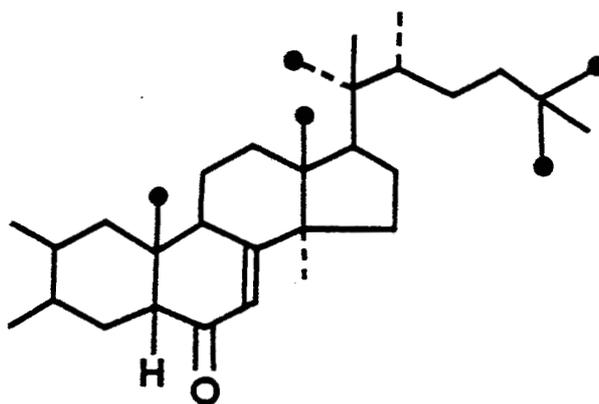
$\Sigma_{245}^M = 11600$



(a)

PM = 480

$\Sigma_{243}^M = 10300$



(b)



Fig.2

Fig. 3 : Formule de l'ecdystérone- tyrosine - méthyl- ester ^{125}I
utilisée comme antigène marqué dans le dosage radio
immunologique.

ECDYSONE IODÉE

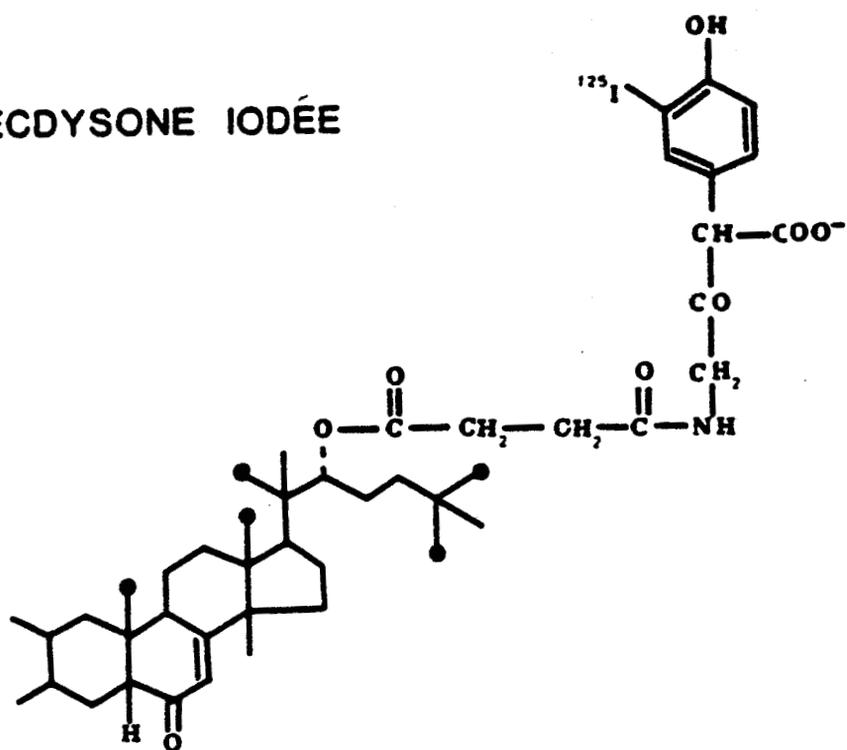


Fig.3



- Production d'anticorps : le couplage du succinyl ecdystérone à la Sérum Albumine Humaine permet d'obtenir un composé immunogène : le succinyl ecdystérone - Sérum Albumine Humaine.

L'immunisation de lapin avec ce composé, en présence d'Adjuvant Complet de Freund, aboutit à l'obtention d'anticorps anti ecdysone et anti 20 hydroxyecdysone.

- Extraction méthanolique : le tissu biologique contenant l'ecdysone à doser est broyé dans un potter en verre, en présence de méthanol à 60% dans l'eau. Le broyat est chauffé à 60°C puis centrifugé pendant 10 mn à 15.000 x g , le surnageant était récupéré et séché sous azote. Afin d'éviter une réaction croisée entre l'ecdysone à doser et les autres ecdystéroïdes, une purification en chromatographie sur gel de silice est effectuée dans le solvant Chloroforme/Méthanol 80/20, v/v. Après récupération des bandes de gel correspondant au standard, l'ecdysone est éluée par 3 lavages au méthanol. Cette dernière solution, reprise dans le tampon citrate 0,1M, pH 6,1 était incubé dans les dialyseurs pour le dosage radio immunologique.

- Le dialyseur : est constitué de deux plaques en pléxiglass symétriques, dans lesquelles sont usinés 10 cylindres de 250 μ l (Biologie Appliquée, 36 rue de la bibliothèque , 13001 MARSEILLE) (Fig.4 - Fig.5).

150 μ l d' anticorps sont incubés dans l'une des chambres du dialyseur. De l'autre côté, sont incubés 150 μ l d'un mélange équivolumentique d'antigène marqué et d'échantillon biologique à tester (CAILLA et al.-1973).

Après 24h d'incubation à 4°C, sous agitation de type va-et-vient, on prélève 100 μ l côté anticorps et côté antigène. Les dialysats sont comptés au spectromètre à scintillation pendant 4 mn pour obtenir une précision statistique de 68% avec une efficacité de 70%.

Fig. 4 : Coupe transversale d'un dialyseur en plexiglass.
La membrane cellulosique (SARTORIUS SM 115 33)
sépare les chambres de 200 μ l chacune.

DIALYSE A L'EQUILIBRE

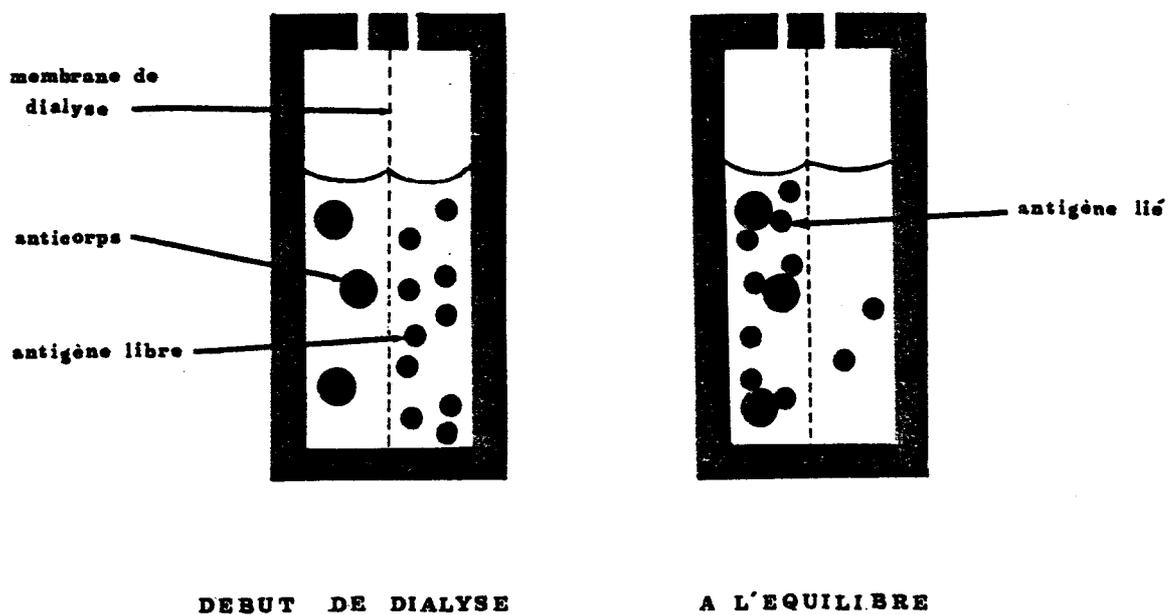


Fig.4



. Interprétation de l'équilibre de dialyse : le taux de liaison, lié/total (B/T) est donné par la relation :

$$B/T = \frac{\text{Nb de coups côté AC} - \text{Nb de coups côté Ag}}{\text{Nb de coups côté AC}}$$

Le calcul de la quantité d'ecdysone contenue dans l'échantillon biologique est effectué sur ordinateur, Hewlet-Packard 9825 A, par régression linéaire d'une courbe-étalon.

II.4.3. Adaptation du dosage au modèle schistosome

Les anticorps anti-ecdysone ainsi que les antigènes marqués sont aimablement fournis par Michel DELAAGE (Immunotech., Rte Léon LACAMP, campus de MARSEILLE Luminy).

Depuis sa mise au point, l'extraction au méthanol a été modifiée et utilisée selon le protocole suivant :

A titre d'exemple :

- 1500 Schistosomes mâles ou 2000 femelles sont homogénéisés dans un broyeur en verre contenant :

- 1500 μ l d'Hexane
- 500 μ l de Méthanol (MERCK)
- 200 μ l d'eau distillée.

L'homogénat est centrifugé 3 mn à 1000 x g (SORVALL RC 3. HL 8.. 1500 tours par minute).

Après centrifugation, l'épiphase lipidique est transférée avec une pipette en verre dans un tube à bouchon fileté.

Le culot est repris dans 1500 μ l d'Héxane, agité vigoureusement au vortex jusqu'à homogénéisation puis centrifugé 3 mn à 1000 x g. La deuxième épiphase est alors réunie avec la première. Sur le culot restant, on rajoute 1 ml de méthanol puis on homogénéise au vortex avant de centrifuger 5 mn à 1000 x g.

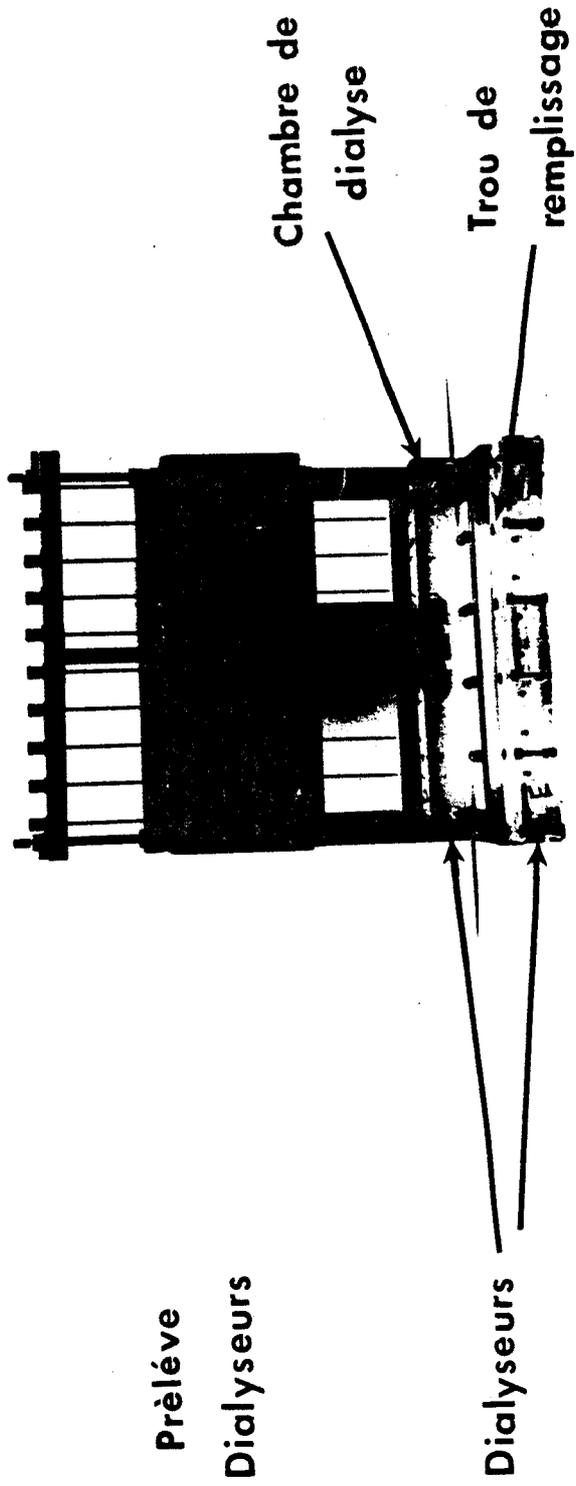
Le surnageant est transféré dans un tube de verre et séché sous azote avant d'être remis en suspension dans 250 μ l de tampon citrate pH 6,1, 0,1 M, filtré sur millipore 0,45 μ m.

150 μ l d'anticorps sont incubés dans une chambre du dialyseur contre 150 μ l d'un mélange équivolument d'antigène radioactif et d'échantillon biologique à tester. Après 24 h d'incubation à 4°C, sous agitation constante de type va-et-vient (130 cycles par minute), on prélève 100 μ l côté anticorps et côté antigène à l'aide du prélève-dialyseurs. Le prélève-dialyseurs est constitué par une batterie de 10 seringues de 100 μ l montées sur un support anodisé (Hamilton, 710 NS - pt 3). Les têtes de piston sont fixées à 1 cadre mobile réglable permettant le remplissage et la vidange de toutes les seringues à la fois (Appareil aimablement fabriqué par le Service Technique INSERM du Dr MOSCHETTO Y. SC N 4, Centre de technologie Biomédicale, 15-17, Rue Camille Guérin, 59000 LILLE.), contenue dans l'échantillon biologique est calculée graphiquement à partir d'une courbe-étalon (voir courbe de référence) ou mieux, calculée par ordinateur (voir le programme au Chapitre Informatique).

Le culot protéique provenant de l'extraction est séché sous flux d'azote, remis en suspension dans la soude 1N et incubé toute la nuit à 4°C. Le dosage protéique est effectué selon la méthode de LOWRY (LOWRY, 1951). Ce dosage est une méthode colorimétrique où la coloration bleu développée par les protéines est attribuée à l'action du réactif de

Fig. 5 : Le prélève dialyseur, constitué par une batterie de dix seringues hamilton de 100 μ l , permet de prélever toutes les chambres d'un même dialyseur. (Appareil aimablement fabriqué par le service Technique INSERM du Docteur MOSCHETTO).

APPAREILS A MICRODIALYSE



Prélève

Dialyseurs

Dialyseurs

Chambre de
dialyse

Trou de
remplissage



FOLIN principalement avec les groupes phénoliques (Tyrosine, phénylalanine, tryptophane) et à degré moindre avec l'histidine et la cystéine. L'intensité de la coloration diminue avec le sulfate d'ammonium et le TRIS.

. Extraction des ecdystéroïdes sériques

Deux types d'extraction peuvent être utilisés sur les échantillons sériques selon le type d'information recherchée.:

- soit une extraction à l'héxane-méthanol pour le dosage seul de l'ecdysone et de la 20 OH ecdysone, que nous venons de décrire ;
- soit une extraction globale des ecdystéroïdes au méthanol pour un dosage de tous les ecdystéroïdes présents dans l'extrait biologique.

Le mélange de 1 ml de sérum à 3 ml de méthanol est effectué au Vortex pendant 15 secondes puis incubé 15 mn à 50°C afin d'obtenir une meilleure précipitation des protéines dénaturées.

Cette suspension est centrifugée 5 mn (JOUAN E 96, 3000 x g). Le surnageant est séché sous flux d'Azote puis repris dans 250 μ l de tampon citrate 0,1 M, pH 6,1. Cette solution est dosée en R.I.A.

II.44 . COURBE DE REFERENCE ET CALCULS

L'hormone utilisée comme standard est la 20 OH ecdysone (Sigma) mise en solution dans le tampon citrate pour établir au spectrophotomètre une cascade de dilutions de 10^{-7} à 10^{-11} M. La courbe de référence de l'ecdysone représentée Figure 6 est de type sigmoïde avec un B/T maximum à 0,68. Cette courbe est obtenue pour une incubation standard : 24 h à

4°C sous agitation de type va-et-vient.

La quantité d'hormone contenue dans un échantillon biologique satisfait à la relation :

$Q_{pMol} = C. Homogenat. Dilution . 1/Poids;$ avec C concentration en M/l.

Ce calcul est effectué par ordinateur par régression linéaire de la courbe de référence stockée en mémoire (Cf. Chapitre Informatique).

La Figure 7 est une représentation de SCATCHARD effectuée à partir de la courbe de référence. La constante de dissociation est de $3,07.10^{-9}M$ pour les sites de hautes affinités.

Fig. 6 : COURBE DE REFERENCE DE L'ECDYSONE.

Etablie pour une cascade de dilution, de 10^{-7} M à 10^{-11} M, dans des conditions standards d'incubation : 24 heures à 4°C sous agitation de type va-et-vient de 130 cycles par minute. ORDONNEES : % de liaison ; ABSCISSES : logarithme de la concentration.

Fig. 7 : REPRESENTATION DE SCATCHARD .

Etablie à partir de la courbe de référence.
ORDONNEES : \bar{v}/L ; radioactivité liée/radioactivité totale. La pente de la droite donne la constante de dissociation. $K=3 \times 10^{-9}$ M.

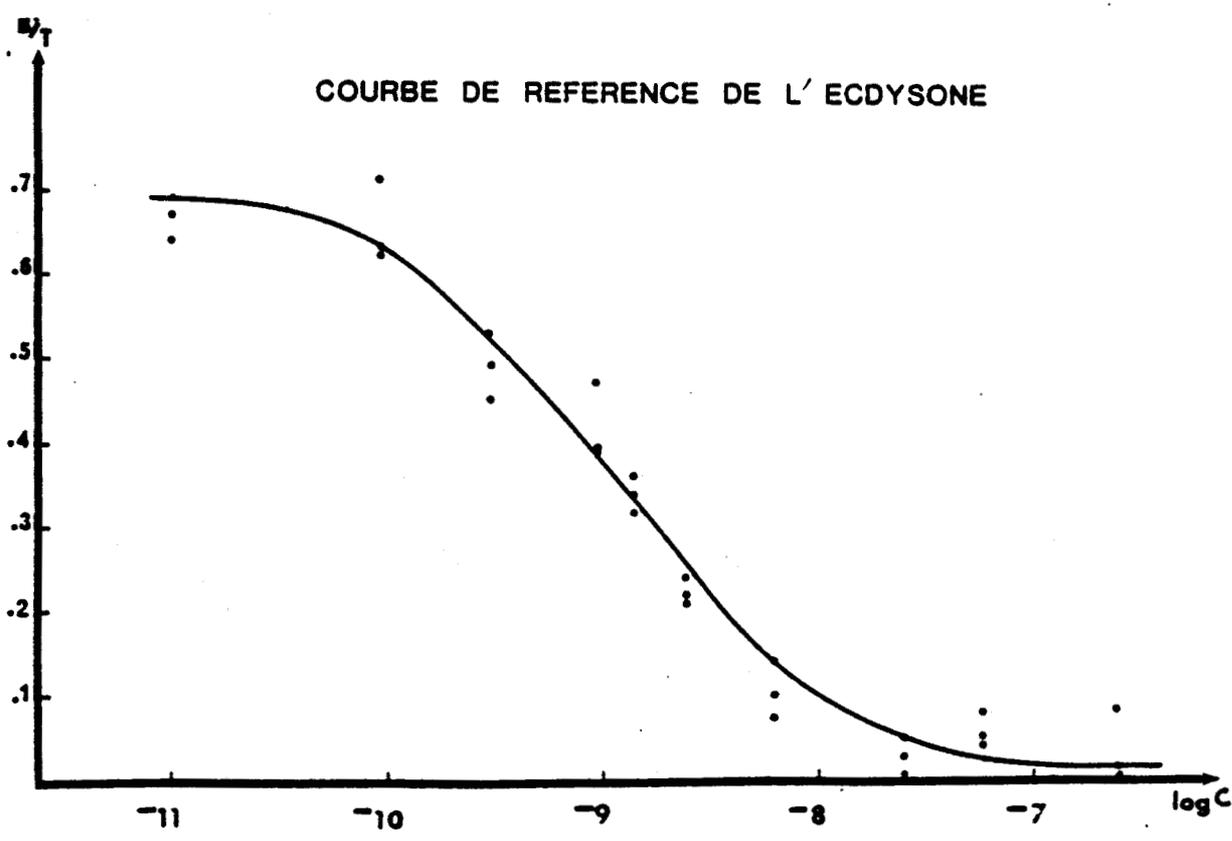
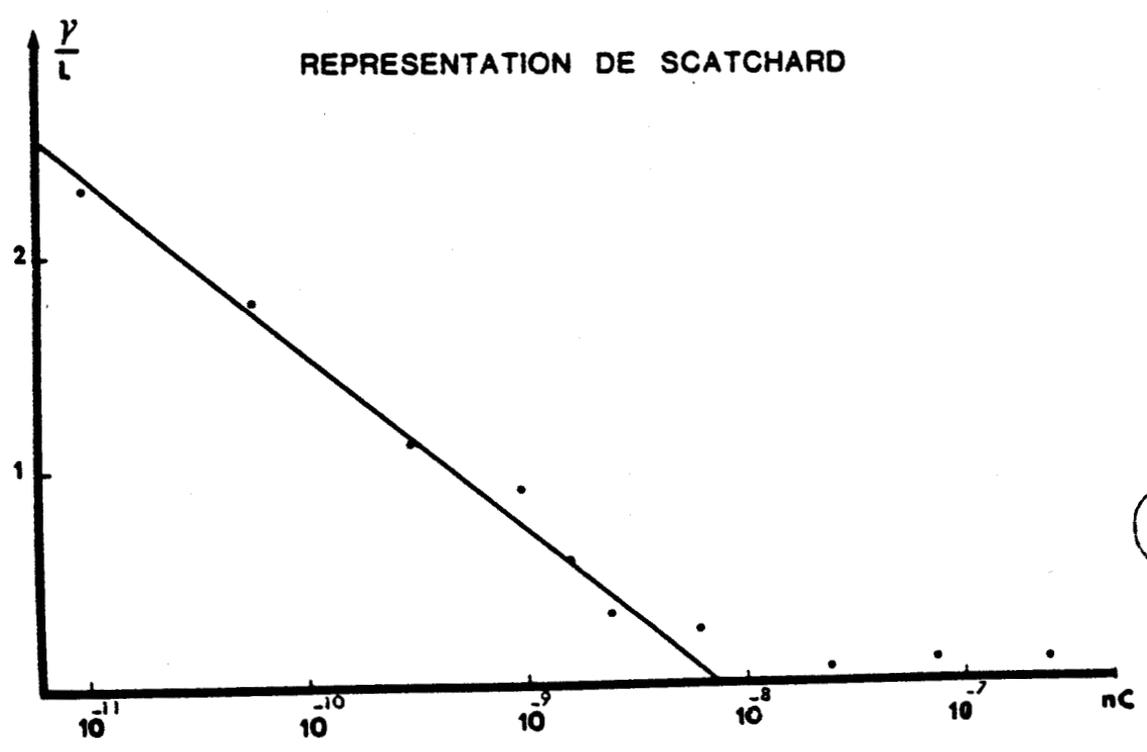


Fig. 6

Fig. 7



II.5. CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE

11. 5. 1. PRINCIPES GENERAUX

La chromatographie liquide haute performance (H.P.L.C.) est une méthode physico-chimique permettant de séparer des molécules chimiques différentes (Molécules hydrocarbonées ou protéiques) en fonction de leurs affinités entre deux phases : l'une d'elles est le solvant ou la phase mobile ; l'autre est un support solide de silice ou phase stationnaire. Lorsqu'un soluté se trouve dans un tel système, il aura une affinité préférentielle pour l'une des deux phases. Son temps d'élution sera alors pour une phase mobile donnée proportionnelle à son affinité pour la phase stationnaire. Deux types de chromatographie peuvent être distingués : la chromatographie dite "normale" et la chromatographie en phase inverse. La première utilise une phase stationnaire polaire et une phase mobile moins polaire ; la seconde, une phase mobile polaire et une phase stationnaire apolaire.

Cette technique est suffisamment fine pour séparer deux composés ne différant que par un groupement hydroxyle ; par exemple, l'Ecdysone et la 20 OH. Ecdysone (Figure 8). Le schéma de principe de l'appareil est le suivant :

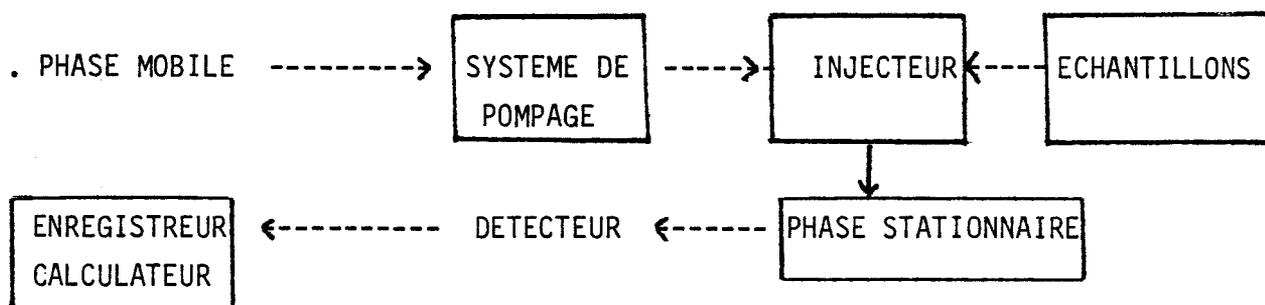


Fig. 8 : Spectre H.P.L.C. des standards ecdysone et 20 OH ecdysone.

colonne: microbondapack phényl

solvants: A- acétonitrile, eau (80/20 ; v/v).

B- eau

gradient: linéaire en 20 minutes , de 0 à 30 % de A
dans B.

débit: 1 millilitre par minute.

détection: Absorption Ultra Violette à 245 nano mètre.

$A_{245} = 2.000 \text{ A.U.F.S.}$

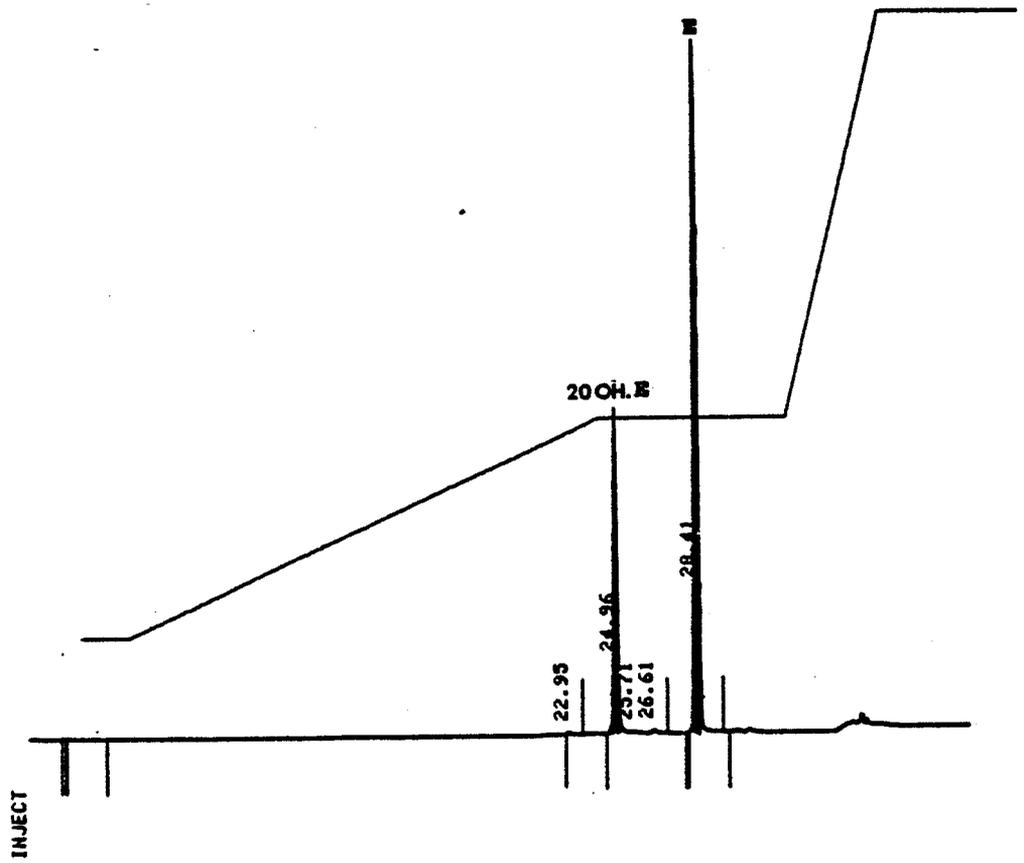


Fig. 8



On détermine un facteur de résolution R qui mesure la séparation de deux composés.

$$R = (\alpha - 1/\alpha) \sqrt{K'/(1+K')} \quad \sqrt{N}$$

où alpha est le facteur de séparation entre deux composés. Alpha représente la plus ou moins grande difficulté de séparation des composés ; et $\alpha - 1/\alpha$ est appelé le facteur de sélectivité.

K' : est le facteur de capacité ; c'est-à-dire mesure de l'interaction du soluté avec les phases stationnaires et mobiles.

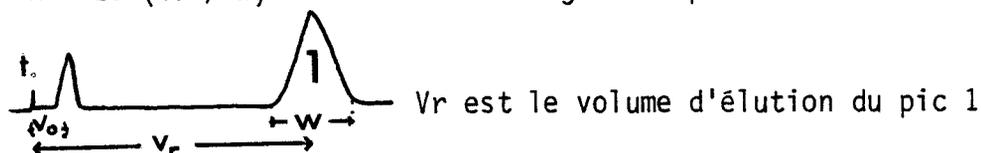
$$K' = V_r - V_0 / V_0 : V_r \text{ est le volume de rétention}$$

V_0 est le volume mort.

et $\sqrt{K' / (1+K')}$ est appelé capacité de rétention.

N : est le nombre de plateaux de la phase stationnaire ; donc caractéristique de la colonne.

$$N = 16 (V_r / W)^2 \quad W \text{ est la largeur du pic 1}$$



II.5.2. METHODOLOGIE

II.5.2.1. Extraits parasitaires

Les échantillons méthanol des extractions de parasite et contenant les ecdystéroïdes doivent être débarrassés de toutes contaminations protéique avant passage sur la colonne d'H.P.L.C. (WATERS ; microbondapack phényl ; 7 μ m). Chaque échantillon est donc chromatographié sur plaque de gel de silice (MERCK - F 254 - 0.5 mm) pendant 30 mn. dans le solvant Chloroforme-méthanol (80/20 ; v/v). La plaque est séchée puis les bandes correspondant aux standards Ecdysone et 20 OH. Ecdysone sont révélées sous U.V., grattées

à la lame de rasoir et le gel transféré dans des tubes en verre. L'élution est faite par trois lavages successifs au méthanol (1 ml). Les tubes sont centrifugés 10 mn à 2000 x g (SORVALL RC3 - HL 8) et les surnageants récupérés et séchés jusqu'à 100 μ l de méthanol sous flux d'azote. 10 à 25 μ l sont injectés dans le chromatographe. La séparation est faite par un gradient linéaire d'une solution d'acétonitrile (MERCK) dans 0.01 % de TFA dans l'eau en 20 minutes. Des fractions de 30 secondes sont collectées ; séchées à sec sous flux d'azote et reprises dans 250 μ l de tampon citrate 0.1 M ; pH 6.1. 150 μ l de cette solution sera ensuite dosée en RIA. (LAFONT et al. - 1980).

II.5.2.2. Extraits sériques ou urinaires

20 à 50 μ l d'extraits méthanol, sérique ou urinaire, sont injectés dans le chromatographe sans purification préalable de l'échantillon sur plaque de silice. Un gradient linéaire d'une solution d'Acétonitrile/eau 20 % dans l'eau en 10 minutes est suivie d'un plateau de 10 minutes à 19 % d'Acétonitrile. Succédant à ce plateau, un autre gradient linéaire jusqu'à 30 % d'Acétonitrile dans l'eau. Les fractions de 30 secondes sont dosées en RIA après séchage et remise en suspension dans 250 μ l de tampon citrate.

CHAPITRE III

RESULTATS

CHAPITRE III : RESULTATS.

III.1. DOSAGES RADIOIMMUNOLOGIQUES DES ECDYSTÉROIDES

A DIFFÉRENTS STADES PARASITAIRES.

III.1.1. SCHISTOSOMULES MECANIQUES.

III.1.2. SCHISTOSOMES 11 JOURS.

III.1.3. SCHISTOSOMES 20 JOURS.

III.1.4. SCHISTOSOMES ADULTES (40 JOURS).

III.1.5. OEUFS DE SCHISTOSOMES.

III.1.6. CHEZ *Fasciola hepatica*.

III.2. DOSAGES RADIOIMMUNOLOGIQUES DES ECDYSTÉROIDES

DANS LE SÉRUM OU LES URINES D'HÔTES INFESTÉS.

III.2.1. CATABOLISME D'ECDYSONE EXOGENE.

III.2.1.1. Dans le sérum.

III.2.1.2. Dans les urines.

III.2.2 APPARITION D'ECDYSTEROIDES SERIQUES ENDOGENE.

III.2.2.1. Animaux infestés par *S.mansonii*.

III.2.2.2. Animaux infestés par *D.vitae*.

III.3. DOSAGES D'ECDYSTÉROIDES CHEZ LES PRIMATES INFESTÉS.

III.3.1. CHEZ LE SINGE *Patas-patas*.

III.3.2. CHEZ L'HOMME.

III. DOSAGE RADIOIMMUNOLOGIQUE DE L'ECDYSONE PENDANT LE DEVELOPPEMENT PARASITAIRE

III.1. DOSAGE RADIOIMMUNOLOGIQUE DES ECDYSTEROIDES A DIFFERENTS STADES PARASITAIRES

Le but de ces dosages est d'étudier les variations d'ecdystéroïdes pendant le développement de S. mansoni et de corrélérer la production hormonale aux différentes étapes-clés du développement du parasite. Quatre stades ont été étudiés : les schistosomules mécaniques, les schistosomes 11 jours, 20 jours, les parasites adultes collectés par perfusion d'animaux infestés et les oeufs du parasite.

III.1.1. Schistosomules mécaniques

La Figure 9 A montre la quantité d'ecdysone équivalente pour 100 mg de schistosomules mécaniques. Ce taux à 4,3 pMoles d'ecdysone/100 mg de protéine est une quantité importante par rapport aux autres stades parasitaires étudiés.

III.1.2. Schistosomules 11 jours

La quantité très importante d'ecdysone dosée à ce stade est montrée Figure 9 B. Ce taux est supérieur à 25 pMoles/100 mg protéine. Après purification sur plaque de silice, l'analyse HPLC-RIA ne révèle que la présence de la forme ecdysone, c'est-à-dire le type moléculaire qui est synthétisé, chez l'insecte, *de novo*. De plus, les quantités dosées après passage en HPLC, donc après purification, sont toujours supérieures aux quantités dosées avant purification : 33 pMoles après l'HPLC contre 25 pMoles avant l'HPLC.

III.1.3. SCHISTOSOMES 20 JOURS

La Figure 9 C donne la quantité d'ecdystéroïdes chez le parasite âgé de 20 jours. Dans la population de taille supérieure à 1,5 mm (1C.L), le taux est de 1 pMole d'ecdysone/100 mg protéine. Par contre, ce taux chute à 0,6 pMole/100 mg protéine pour les parasites de taille inférieure à 1 mm (1C.S). C'est à ce stade que l'on dose dans le parasite la plus faible quantité d'hormone. Néanmoins, ce taux est nettement supérieur au bruit de fond de la méthode (0,01 pMole/100 mg protéine) ou aux témoins négatifs : tissus de hamsters sains (0,05 pMole/100 mg protéine).

III.1.4. SCHISTOSOMES ADULTES (40 JOURS)

Les parasites adultes recueillis par perfusion totale du hamster au M.E.M. renferme globalement 1,6 pMole/100 mg protéine. Les femelles renferment plus d'ecdystéroïdes que les mâles (1,90 pMole contre 1,35 pMole pour les mâles) (Fig. 9 D). Il faut souligner que l'analyse HPLC-RIA révèle une proportion plus grande de 20 OH ecdysone que d'ecdysone quel que soit le sexe du parasite ($E/E + 20\text{ OH }E = 0,32$ pour les femelles et $0,38$ pour les mâles ; Fig. 10). A l'opposé, chez les adultes issus des perfusions mésentériques et portales seulement, une différence quantitative nette apparaît selon le sexe du parasite. En effet, les femelles renferment 2,5 pMole d'ecdysone équivalent pour 100 mg de protéine alors que les mâles n'en renferment que 0,9 pMole, soit près de 3 fois moins que les femelles (Figure 9E). L'analyse HPLC-RIA montre que ces adultes présentent un rapport $E/20\text{ OH }E$ inversé par rapport à la situation de perfusion totale : $\frac{E}{E + 20\text{ OH }E} = 0,60$ pour les mâles et $0,76$ pour les femelles (Figure 11).

Fig. 9 : DOSAGE RADIOIMMUNOLOGIQUE DES ECDSTEROIDES A DIFFERENTS STADES DU DEVELOPPEMENT DE SCHISTOSOMA MANSONI.

A : Schistosomules mécaniques ; B : schistosomes 11 jours
C : Schistosomes âgés de 20 jours. (S) représente les
jeunes parasites $<$ à 1 millimètre , (L) représente le
reste de la population parasitaire. D : parasites âgés
de 40 jours, recueillis par perfusion totale de hamsters.
E : Parasites âgés de 40 jours , recueillis par perfusion
des veines mésentériques et portale. F : œufs de schisto-
somes . G : Tissus de hamsters non infestés.

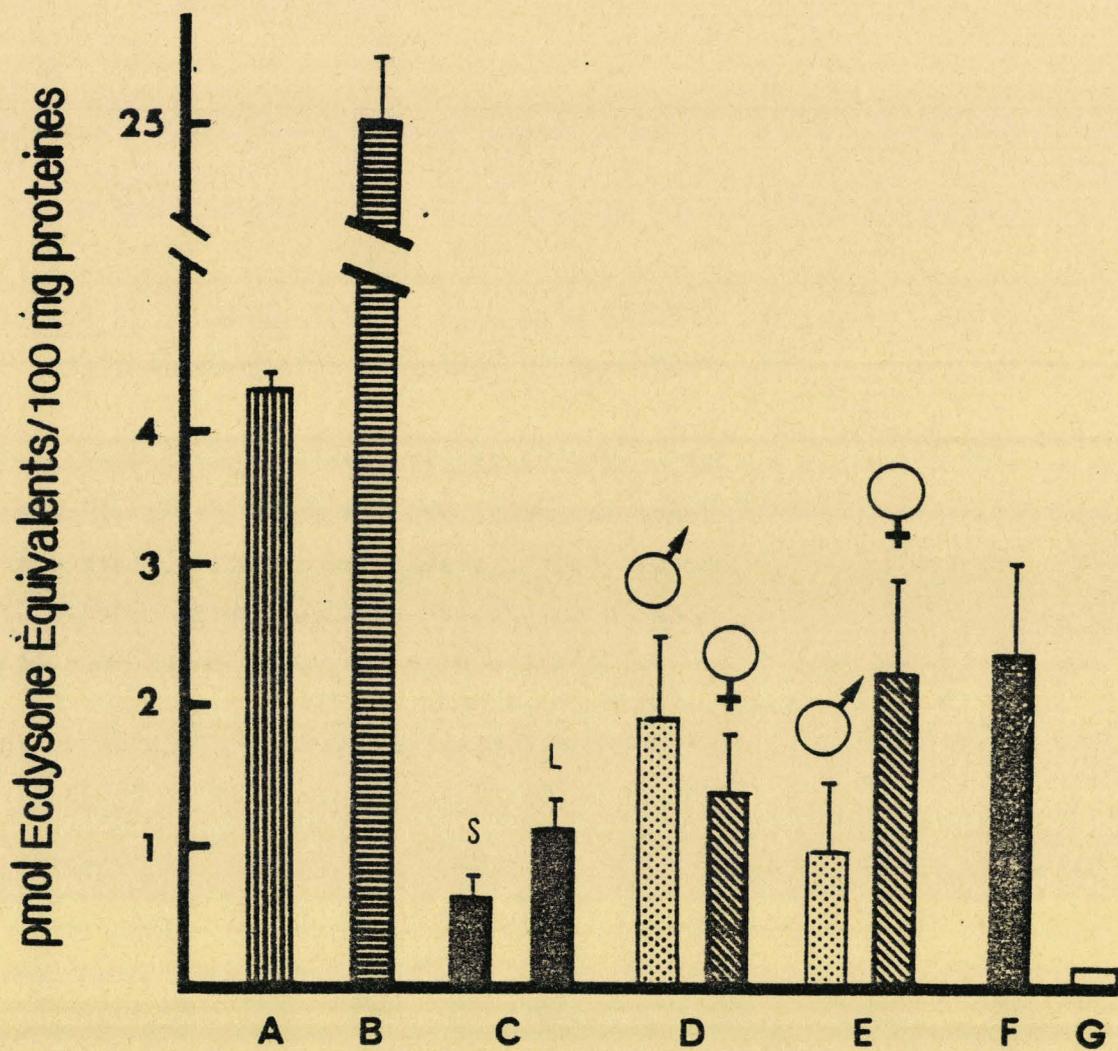


Fig.9



Fig. 10 : SPECTRE HPLC D'UN EXTRAIT METHANOL DE S.mansoni
PROVENANT DE PERFUSION TOTALE DE HAMSTERS.

25 μ l d'extrait parasitaire sont injectés dans le chromatographe. Des fractions de 30 secondes sont recueillies, séchées sous flux d'azote puis remises en suspension dans le tampon citrate 0,1 M ; pH 6,1 avant d'être dosées en radioimmunologie.

(A) : Femelles de *S. mansoni* âgées de 40 jours.

(B) : Mâles de *S. mansoni* âgés de 40 jours.

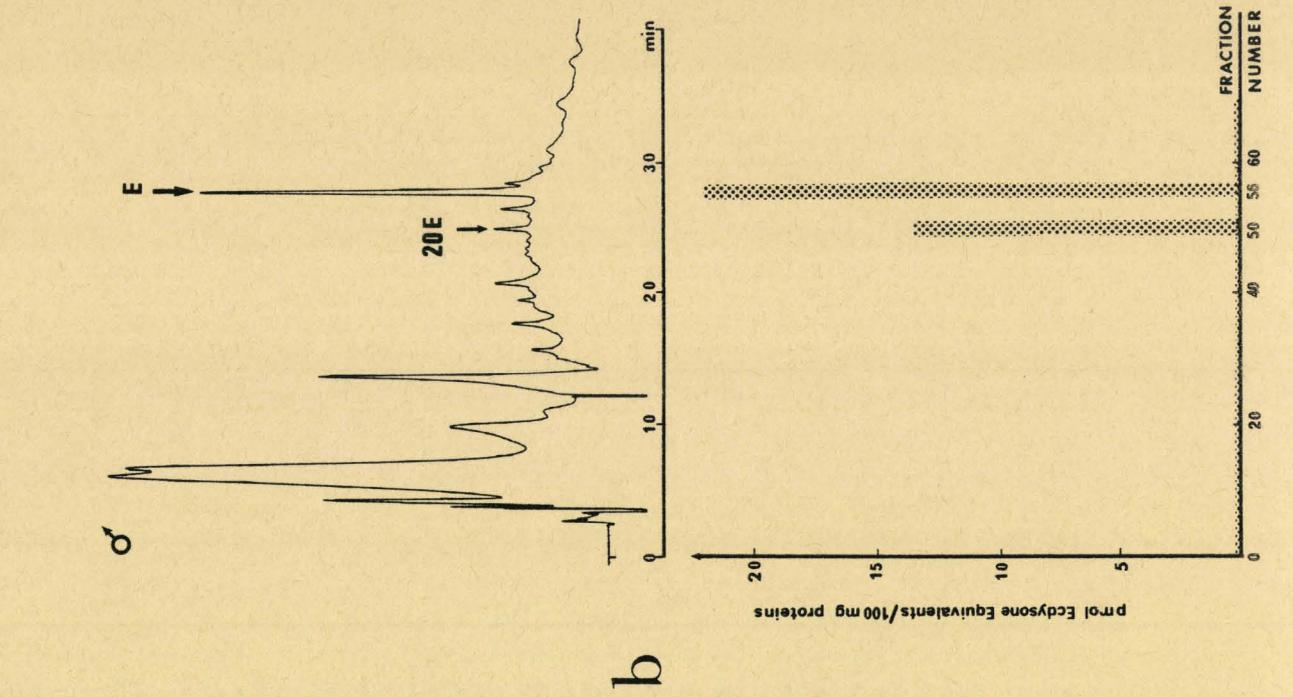


Fig. 10

LIBRARY
LILLE

Fig. 11 : SPECTRE H.P.L.C. DE SCHISTOSOMES ADULTES (40 jours)
PROVENANT DES VEINES MESENTERIQUES ET PORTALE.

(A) : Femelles adultes

(B) : Mâles adultes.

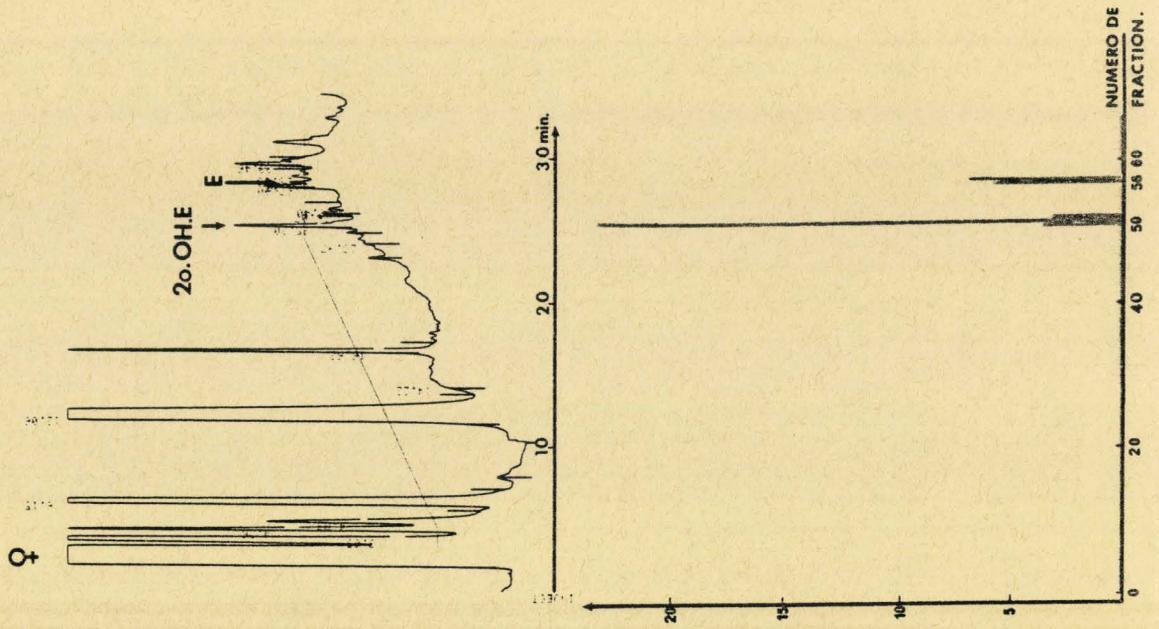
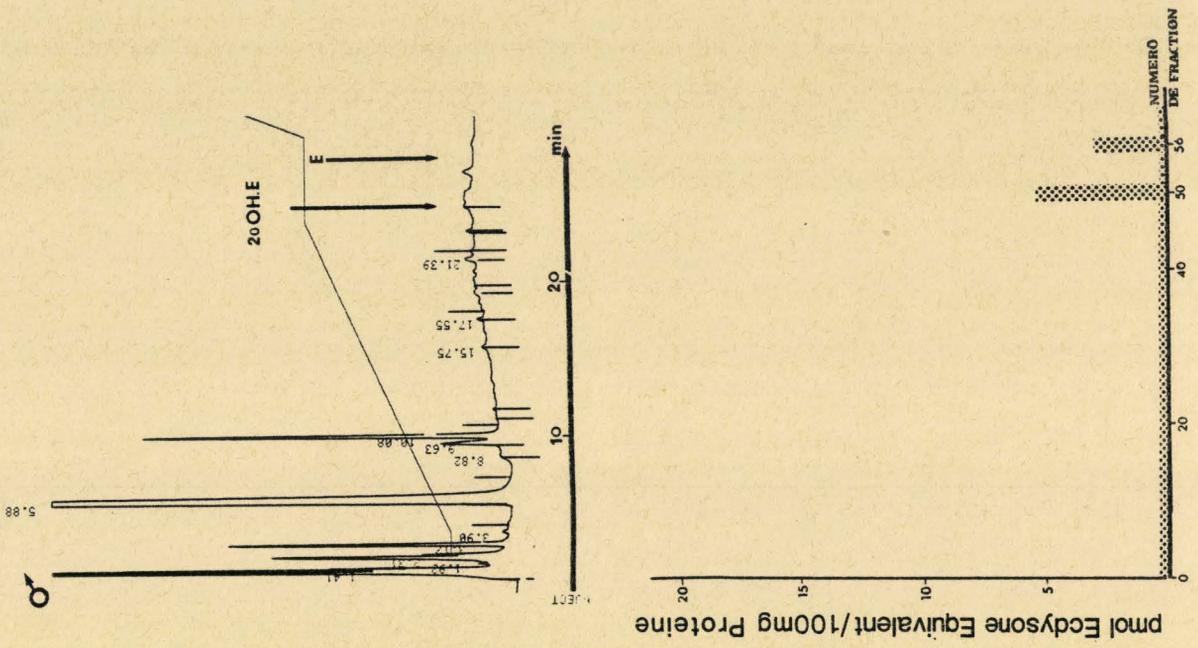


Fig. 11



Aucune forme moléculaire réagissant avec le RIA n'est détectable en dehors de la migration des standards ecdysone et 20 OH Ecdysone.

III.1.5. OEUFS DE SCHISTOSOMES

La Figure 9 F montre la quantité globale en ecdystéroïdes contenue dans les oeufs de schistosome. Cette quantité est comparable à celle trouvée chez les femelles "mésentériques" ; 2,6 pMole d'ecdysone équivalent/100 mg Protéine. De même, l'analyse HPLC-RIA donne un rapport $E/(20E+E)$ identique à celui des femelles issues de perfusion mésentérique $E/(20 E + E) = 0,76$.

A ce stade d'étude, il était intéressant de savoir si les ecdystéroïdes étaient produites par d'autres trématodes, en particulier chez le plathelminthe hermaphrodite Fasciola hepatica appartenant au même phylum que Schistosoma mansoni.

III.1.6. CHEZ FASCIOLA HEPATICA

Le Tableau 1 montre la quantité d'ecdystéroïdes renfermée chez le parasite Fasciola hepatica. Ce parasite contient 3,4 pMole d'ecdysone équivalents/100 mg protéine.

L'analyse HPLC-RIA montre une proportion presque équivalente des hormones ecdysone et 20 OH ecdysone ($\frac{E}{E + 20 OH E} = 0,56$; Fig. 12).

De plus, on note un pic immunoréactif non identifié à 23 mn, ne correspondant ni au standard 20 OH Ecdysone (25 mn), ni au standard ecdysone (28 mn). Ce pic correspond à une quantité d'ecdystéroïde de 1,8 pM d'ecdysone équivalent/100 mg protéines et pourrait être spécifique de ce Nématode hermaphrodite Fasciola hepatica.

TABLEAU 1 : Dosage d'ecdystéroïdes chez le parasite
Fasciola hepatica.

TABLEAU 1.

Fasciola hepatica

DOSAGE AVANT HPLC*	DOSAGE GLOBAL APRES HPLC* ⁺		
3,4 ± 1,6	44,47		
	Ecdysone	20 OH écdysone	non identifié
	23,83	18,82	1,8

* pMol. d'écdysone équivalent / 100 mg protéine.

N = 6

+ Ecart type non calculé.



Fig. 12 : SPECTRE H.P.L.C. DU TREMATODE *Fasciola hepatica*.

25 μ l d'extrait parasitaire sont chromatographiés dans le solvant acétonitrile/eau (v/v ; 80/20). Des fractions de 30 secondes sont recueillies puis analysées en RIA. Les flèches correspondent à l'élu-tion des standards écdysone et 20 OH écdysone.

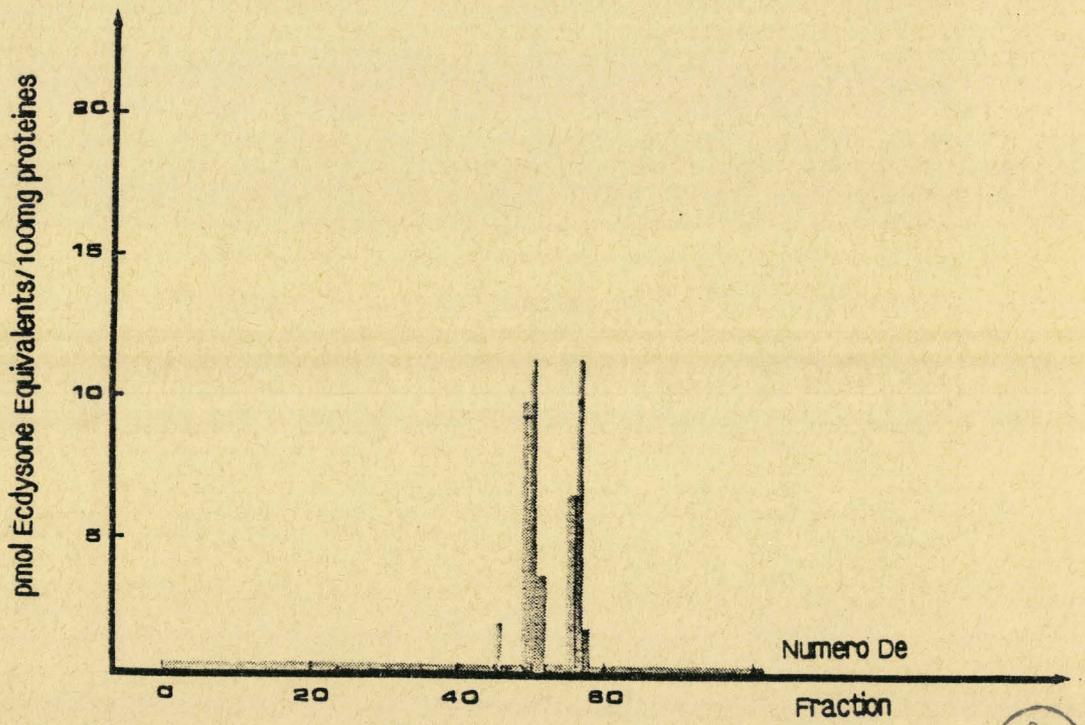
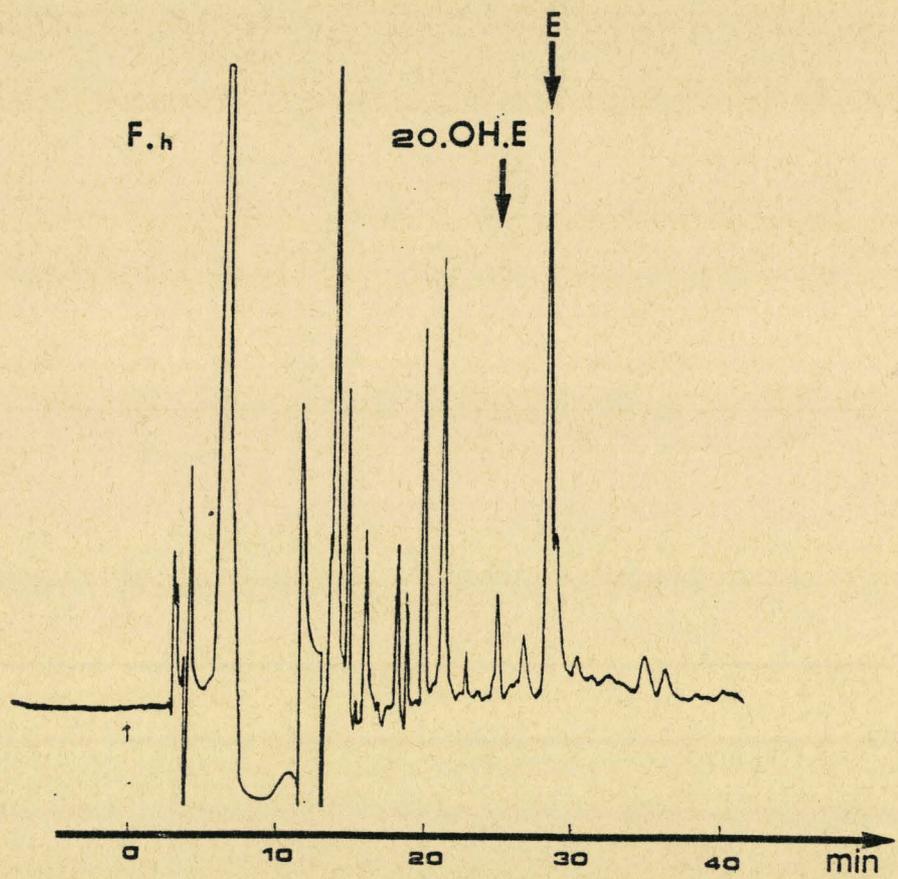


Fig. 12



Ces études sur la production endogène d'ecdystéroïdes par les plathelminthes trématodes ne donnent qu'un "instantané". Elles ne préjugent en rien de la cinétique de production de ces hormones, ni d'une éventuelle excrétion dans le milieu extérieur de ces molécules et en particulier dans le sang ou les urines de l'hôte infesté.

III.2. DOSAGES RADIOIMMUNOLOGIQUES DES ECDYSTEROÏDES DANS LE SÉRUM OU L'URINE D'HOTES

Avant d'étudier toute apparition d'ecdystéroïdes dans le sérum ou l'urine d'animaux infestés, il était nécessaire de connaître le temps de demi-vie de la molécule d'ecdysone commerciale dans ces compartiments biologiques. Ces études préliminaires ont été menées sur des hamsters sains.

III.2.1. CATABOLISME D'ECDYSONE EXOGENE

III.2.1.1. Dans les sérums d'animaux

La molécule d'ecdysone étant propre aux arthropodes, il était *à priori* possible que l'hôte vertébré ne possède pas la batterie enzymatique nécessaire à la dégradation d'une telle molécule et qu'une accumulation sérique soit envisageable. Dans un premier type d'expériences menées sur 18 jours, aucun ecdystéroïde n'est détectable malgré les fortes quantités d'hormones injectées (Figure 13).

Fig. 13 : CINETIQUE D'APPARITION D'ECDYSONE EXOGENE DANS LE
SERUM D'HOTE APRES INJECTION DE 10^{-6} M D'HORMONE.

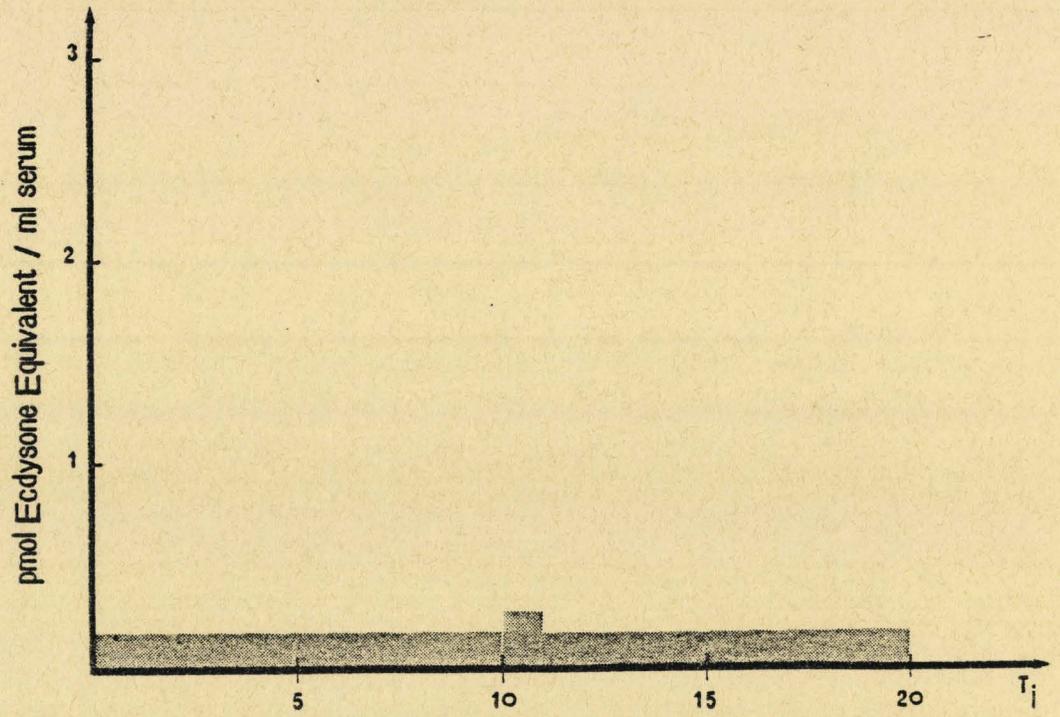


Fig. 13



Deux hypothèses peuvent expliquer de tels résultats :

- soit un catabolisme rapide de la molécule d'ecdysone
- soit la formation d'un complexe ecdysone-ligand qui stabilise et protège l'ecdysone contre une dégradation sérique.

Pour vérifier la première hypothèse, une cinétique de dégradation de l'ecdysone sur quelques heures a été entreprise sur 5 hamsters. Dans cette expérience dite "de charge", les courbes représentatives de la disparition d'ecdysone sérique sont de type exponentielle décroissante (Figure 14). Les contraintes expérimentales ne permettent pas d'obtenir plus de trois points expérimentaux, néanmoins, une représentation linéaire $\text{Log}(\text{ecd}) = f(t)$ donne un faisceau de droites parallèles d'équation $Y = Ax + B$ (Figure 15). Ceci permet d'obtenir l'équation de l'exponentielle initiale .

$$C = C_0 \exp(-1,058 t) ; \quad t \text{ en heures}$$

avec pour $C = C_0/2$ un temps $T_{1/2}$ appelé demi-vie de la molécule. Ce $T_{1/2}$ de l'ecdysone sérique chez l'hôte vertébré est de 0,66 h soit 40 minutes.

III.2.1.2. Dans les urines.

Chez le hamster sain ayant reçu par voie I.V. un mélange d'ecdysone et de 20 OH ecdysone ($2 \cdot 10^{-6}$ M final) ; il est possible de doser dans les urines des ecdystéroïdes (Fig. 16). La courbe représentative de l'apparition d'ecdysone exogène dans les urines est de type exponentielle composée. Une représentation linéaire ; $\log(\text{ecd}) = f(t)$ (Figure 17) permet de dénombrer 2 segments de droite. L'une d'équation qui donne pour l'exponentielle correspondante $(\text{Ecd}) = (\text{Ecd})_0 \cdot \exp(-0,635 t)$ avec $t_{1/2} : 16$ h et l'autre d'équation $\text{Log}(C) = -0,049 t + B_0$ donnant pour l'exponentielle correspondante : $(\text{Ecd}) = (\text{Ecd})_0 \cdot \exp(-0,049 t)$ avec $t_{1/2} = 260$ h. La forme de la courbe $\log(\text{Ecd}) = f(t)$

Fig. 14 : Courbes représentatives de la disparition d'ecdysone exogène dans le sérum de hamster.

Abscisses : Temps en heures ; Ordonnées : quantité d'ecdysone en pMol / ml de sérum.

Fig. 15 : Représentation linéaire , $\text{Log}(\text{ecd}) = f(t)$, de la disparition d'ecdysone dans le sérum.

Abscisses : Temps en heures ; Ordonnées : $\text{Log}(\text{ecd})_{\text{sérique}}$.

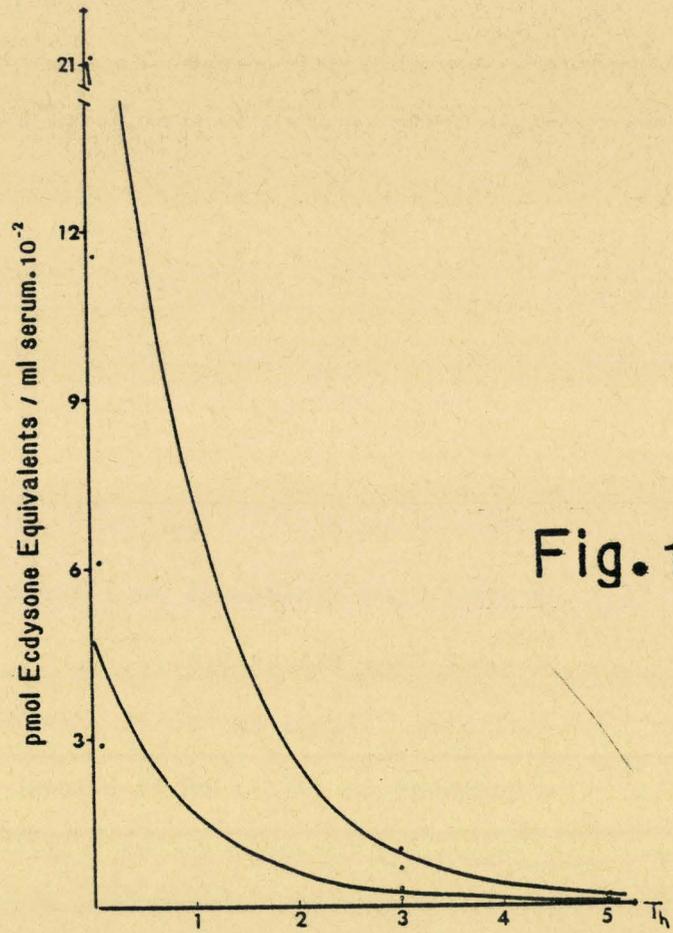


Fig. 14

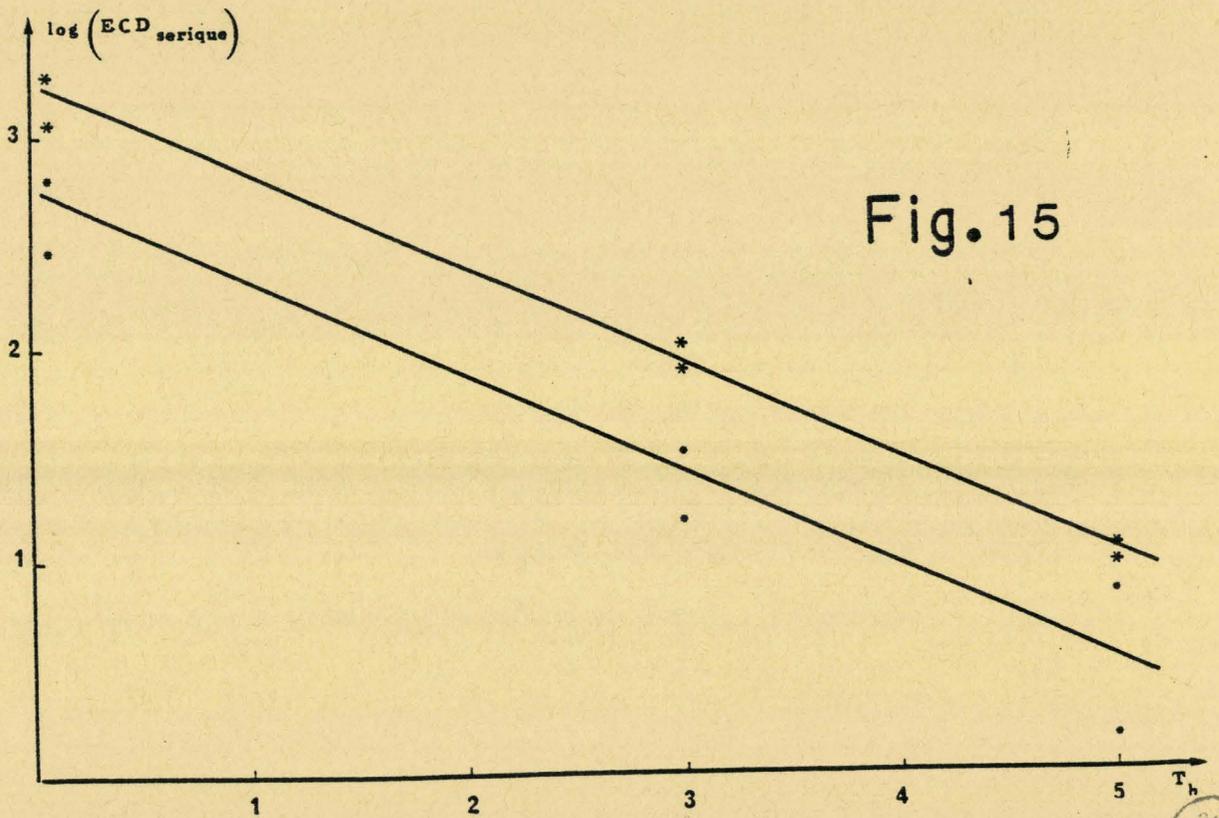


Fig. 15



Fig. 16 : Courbes représentatives de l'apparition de l'ecdysone exogène dans les urines.

Abscisses : Temps en heures ; Ordonnées : quantité d'ecdysone en pMol / ml de sérum.

Fig. 17 : Représentation linéaire, $\text{Log}(\text{ecd}) = f(t)$, de l'apparition d'ecdysone dans les urines.

Abscisses : temps en heures ; Ordonnées : $\text{Log}(\text{ecd})_{\text{urinaire}}$.

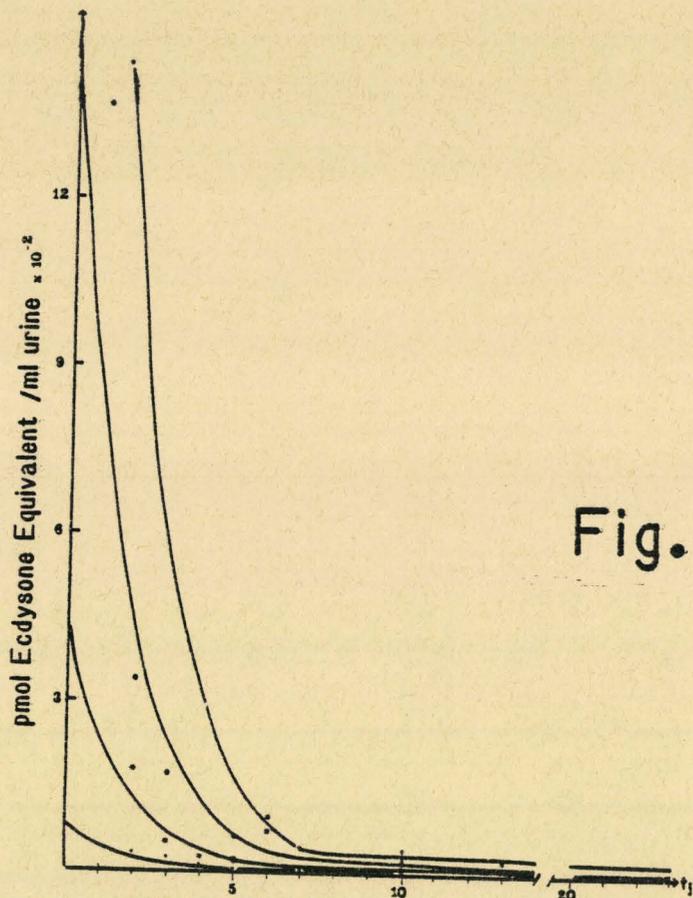


Fig. 16

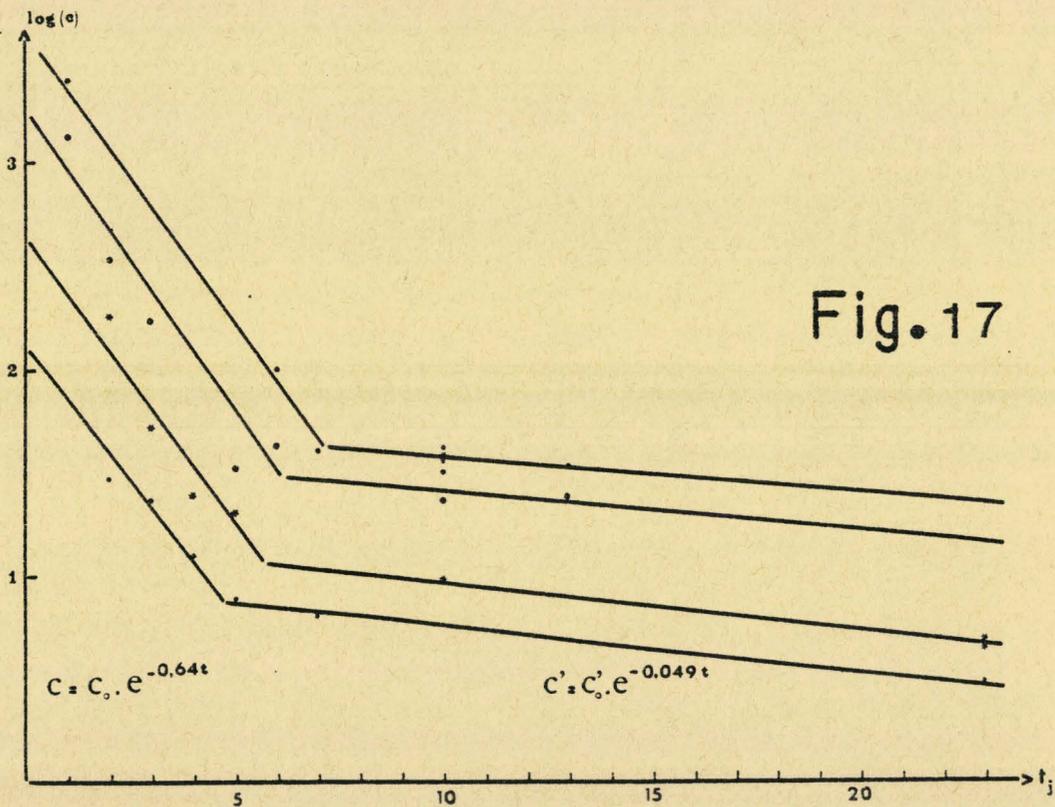


Fig. 17



dénote la présence de deux destinées par l'ecdysone urinaire. L'une où la molécule est vite dégradée ; l'autre à demi-vie plus longue de l'ordre de 10 jours.

III.2.2. APPARITION D'ECDYSONE SÉRIQUE ENDOGENE.

Cette étude a pour but de vérifier que les parasites excrètent dans le sérum les ecdystéroïdes qu'ils produisent. Elle sera menée sur des hamsters ou des rats infestés par *S. mansoni*, mais aussi sur d'autres types de parasites comme les filaires afin d'élargir le domaine d'investigation.

III.2.2.1. Animaux infestés par *S.mansoni*.

Chez des hamsters infestés par *S.mansoni*, apparaissent dès le 6^{ème} jour après l'infestation des ecdystéroïdes sériques (Fig. 18a). La quantité d'hormone mesurée à cette époque est faible (0,20 pMol /ml) mais le B/T correspondant à cette valeur est significatif par rapport au B/T du témoin non infesté (0,642 pour l'échantillon contre 0,748 pour le témoin négatif).

La courbe représentative de l'apparition de l'ecdysone sérique endogène est une courbe ascendante avec une branche asymptotique positive ($dy/dx > 0$). A J12, la quantité détectée représente 85% de la quantité présente à J24. (Au moment de la rédaction de cette thèse, la relation charge parasitaire et taux d'ecdysone sérique n'est pas établie dans ce modèle).

Chez un animal semi-permissif comme le rat, les ecdystéroïdes produits par le parasite sont également présents et détectables dans le sérum par R.I.A. La courbe représentative de l'apparition d'ecdystéroïdes est une courbe présentant un maximum entre J6 et J12 et une branche asymptotique négative ($dy/dx < 0$). Le maximum est plus important pour une infestation à 2000 furcocercaires qu'à 500 (Fig. 18b, 18c).

Fig. 18 : APPARITION D'ECDYSTEROIDES SERIQUES DANS
DIFFERENTS MODELES EXPERIMENTAUX.

- (a) : Chez le hamster infesté à 2000 furcocercaires.
- (b) : Chez le rat infesté à 2000 furcocercaires.
- (c) : Chez le rat infesté à 500 furcocercaires.

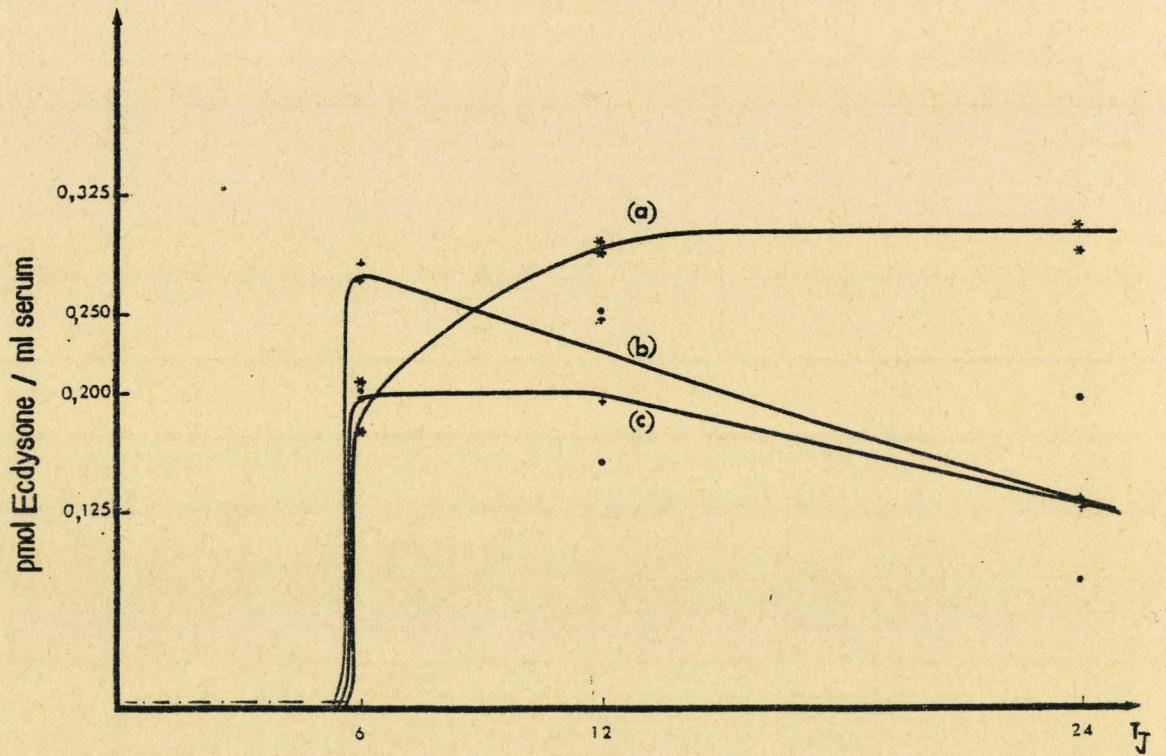


Fig. 18



III.2.2.2. Hamster infesté par *Dipetalonema viteae*

D. viteae est un endoparasite larvipare appartenant au groupe des Nématodes agent d'une fibrose expérimentale des rongeurs. A J 63, période où les filaires commencent la ponte des microfilaires, stade larvaire 1, des ecdystéroïdes apparaissent dans le sérum des animaux infestés. Le taux d'ecdystéroïdes dosé à cette période (23 pMol/ml sérum) correspond à une concentration de 23 nMol/l de sérum (Tableau 2). Par contre, à J 40, stade adulte des filaires où les femelles contiennent des oeufs fertilisés et à J 70, aucun ecdystéroïde n'est détectable en R.I.A. (Tableau 2).

III.3. SERUM DE PRIMATES

A ce stade d'étude, l'ecdysone sérique revêt un caractère particulièrement intéressant quant à son domaine d'application en vue d'un éventuel diagnostic d'infection par les helminthes. Aussi, le modèle primate, mieux adapté que celui des rongeurs dans l'optique d'une transposition des résultats, est utilisé.

III.3.1. Chez le singe

Sur des extraits méthanol de sérum de singe *Patas patas* infesté par *S.mansoní* (550 furcocercaires) des ecdystéroïdes sont détectables jusqu'à 535 jours après l'infestation (Fig. 19). Chez le singe A, on note une rétention d'ecdystéroïdes (Fig. 19; A1,A2,A3). Ce singe héberge des parasites non stériles puisque des oeufs sont dosés dans les fécès (180 et 10 oeufs / g de fécès). Chez le singe B, une rétention d'ecdystéroïdes est également observée même en absence d'oeufs dans les selles aux stades J499 (Fig. 19 B2) et J535 (Fig. 19 B3).

TABLEAU 2 : Quantité d'ecdystéroïdes à différentes époques du cycle de D. vitæ.

Tableau 2

STADE	QTÉ. D'ÉCDYSTÉROIDES	N
J 43	0.18 ± .08	2
J 63	23.00 ± .13	2
J 70	0.30 ± .01	2

* EN PICOMOLES D'ÉCDYSONE EQUIVALENT / ML DE SÉRUM.



Fig : 19 : DOSAGE D'ECDYSTEROÏDES DANS LE SÉRUM DE SINGE.

deux singes sont infestés par 550 *furcocercaires*.

(T) : sérum de primate sain

(A₁), (B₁) : singe infesté depuis 235 jours.

(A₂) : sérum du singe A à J499. Ce singe "emet"
180 œufs par gramme de fèces.

(A₃) : sérum du singe A à 535 jours après l'infestation.
émission de 10 œufs par gramme de fèces.

(B₂), (B₃) : sérum du singe B ne présentant aucun
œuf de parasite dans les selles.

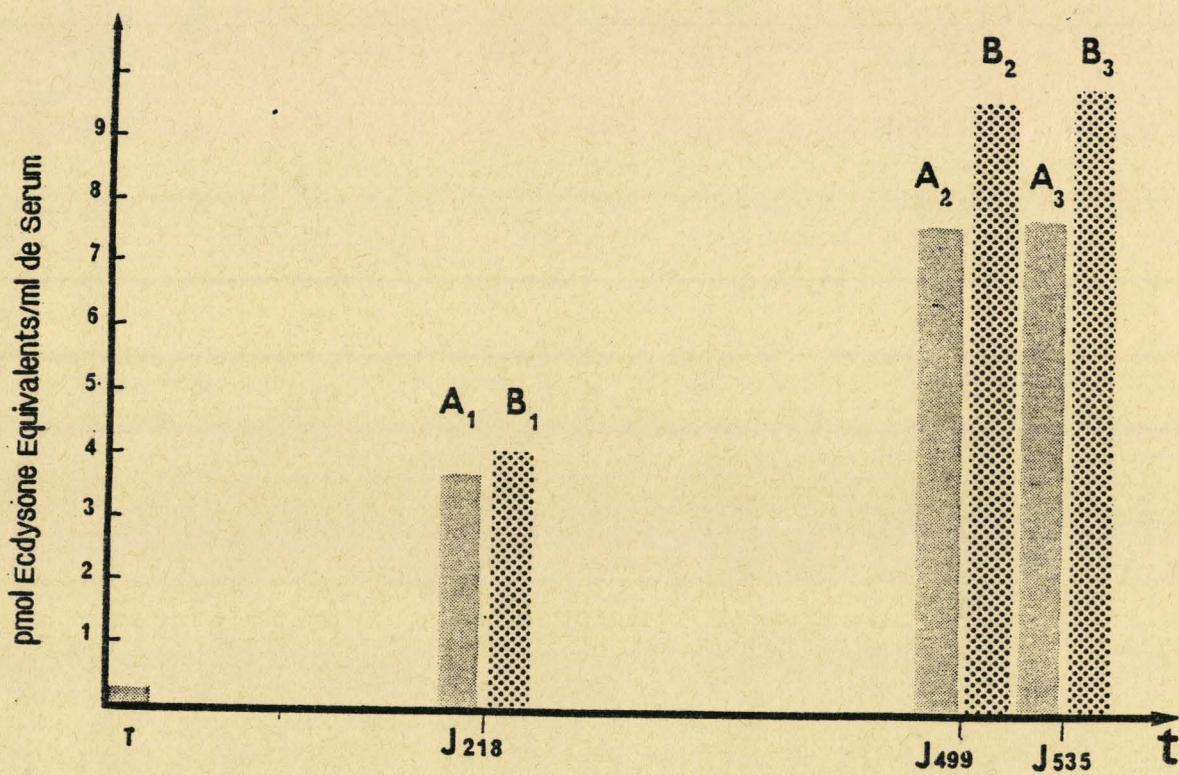


Fig. 19

III.3.2. Chez l'homme

Plusieurs sérums de malades ont été dosés en R.I.A. Ces malades ont été infestés par S. mansoni ou par S. mansoni + S. haematobium. Seul, le dossier médical du malade P.N.06 est connu avec exactitude depuis la date de son infestation.

Ce malade, atteint d'une bilharziose à S. mansoni, présentait un sérodiagnostic bilharzien positif (Fig.20) avec les arcs caractéristiques. Ce malade traité à J 1460 par l'ambilhar présente à J 5845 un taux global en ecdystéroïdes de 23.3 pMol/ml sérum ; soit une concentration molaire en ecdystéroïdes sériques de 23.3 nanomoles. Après traitement par le VANSYL (Oxaminiquine - prise unique de 15 mg/kg), le taux d'ecdystéroïdes a chuté à 2.39 pMol/ml de sérum (Tableau 3). L'analyse combinée HPLC-RIA de l'extrait méthanol indique la présence de la forme ecdysone. De plus, cet échantillon sérique montrait la présence d'IgE spécifiques de S. mansoni. Pour mémoire, les helminthes et *S.mansoni* en particulier, induisent la synthèse des immunoglobulines Ig E, c'est-à-dire, des anticorps qui sont normalement synthétisés dans les phénomènes allergiques (SADUN et al.-1970). Des Ig E anti-schistosomule et des Ig E anti schistosome adulte sont présents chez ce malade, mais absence d'Ig E anti-oeuf de schistosome. Une biopsie rectale a donné un résultat négatif (oeuf=0) (Tableaux 4 et 5). Ce malade ne présentait aucune autre parasitose.

Le malade B.K.70 présente également une bilharziose à *S.mansoni*. Des extraits hexane et méthanol sont effectués sur le sérum et les urines du malade. Ces extraits sont analysés par combinaison plaque de silice-RIA. Le sérum contient 397 pMol d'ecdysone équivalent / ml sérum (Fig 21a)

Les molécules dosées ont une plus grande affinité pour les solvants apolaires comme l'hexane que pour les solvants polaires ; tout en restant immunoréactives vis-à-vis d'immunsérums anti-ecdysone (Figure 21 a , b). Dans les urines de ce malade , c'est le phénomène inverse qui est observé: les molécules immunoréactives ont plus d'affinité pour le méthanol que pour l'hexane (Figure 21 c , d). De plus , la migration sur plaque de silice du pic 2 correspond à la migration du standard 20 OH.ecdysone.

Fig. 20 : Séro diagnostic de la bilharziose chez le malade P.N.06.

Ag de S.mansoni



Serum du malade

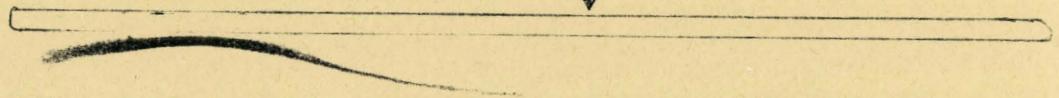


Fig.20

TABLEAU 3 : Dosage des ecdystéroïdes dans le sérum du malade P.N.06 avant, et après, une chimiothérapie anti helminthique (VANSYL^R, 15 mg / kg).

TABLEAU 4 : Anti- corps circulants, spécifiques de *Schistosoma mansoni*, chez le malade P.N.06.

TABLEAU 5 : Anticorps anti *Schistosoma mansoni* dans le sérum du malade P.N.06.

Tableau 3

DOSAGE AVANT TRAITEMENT *	DOSAGE APRES TRAITEMENT PAR L'OXAMNINIQUINE *
23,30	2,39

* en pico-mole d'éclydysone équivalent par milli-litre de sérum

Tableau 4

SPÉCIFICITÉ I _G E	SUJETS SAINS	MALADE Ph.N	CONCLUSIONS
ANTI -SOMULE	599 - 957	2171 - 2426	POSITIF
ANTI ADULTE	399 - 431	2674 - 5643	POSITIF
ANTI OEUF	513 - 587	550 - 551	NÉGATIF

* Résultats exprimés en coups par minute.

Tableau 5

ANTI CORPS UTILISÉ ,	COUPE DE SCHISTOSOMULE	ANTI CORPS UTILISÉ ,	COUPE D'ADULTE
I _G . G	1/80	I _G .G	1/160
I _G . E	0	I _G .E	0
I _G . M	1/80	I _G .M	0

505
LILLE

Fig. 21 : POLARITE DES ECDYSTEROÏDES ENDOGENES.

Après une extraction dans le couple de solvants hêxane/mêthanol, les êchantillons sêriques ou urinaires sont analysês sur plaque de silice, puis par R.I.A.

(a) : Ecdystêroïdes sêriques ayant plus d'affinitê pour l'hêxane que pour le mêthanol.

(b) : Ecdystêroïdes sêriques ayant plus d'affinitê pour le mêthanol que pour l'hêxane.

(c) : Ecdystêroïdes urinaires ayant plus d'affinitê pour l'hêxane que pour le mêthanol.

(d) : Ecdystêroïdes urinaires ayant plus d'affinitê pour le mêthanol que pour l'hêxane.

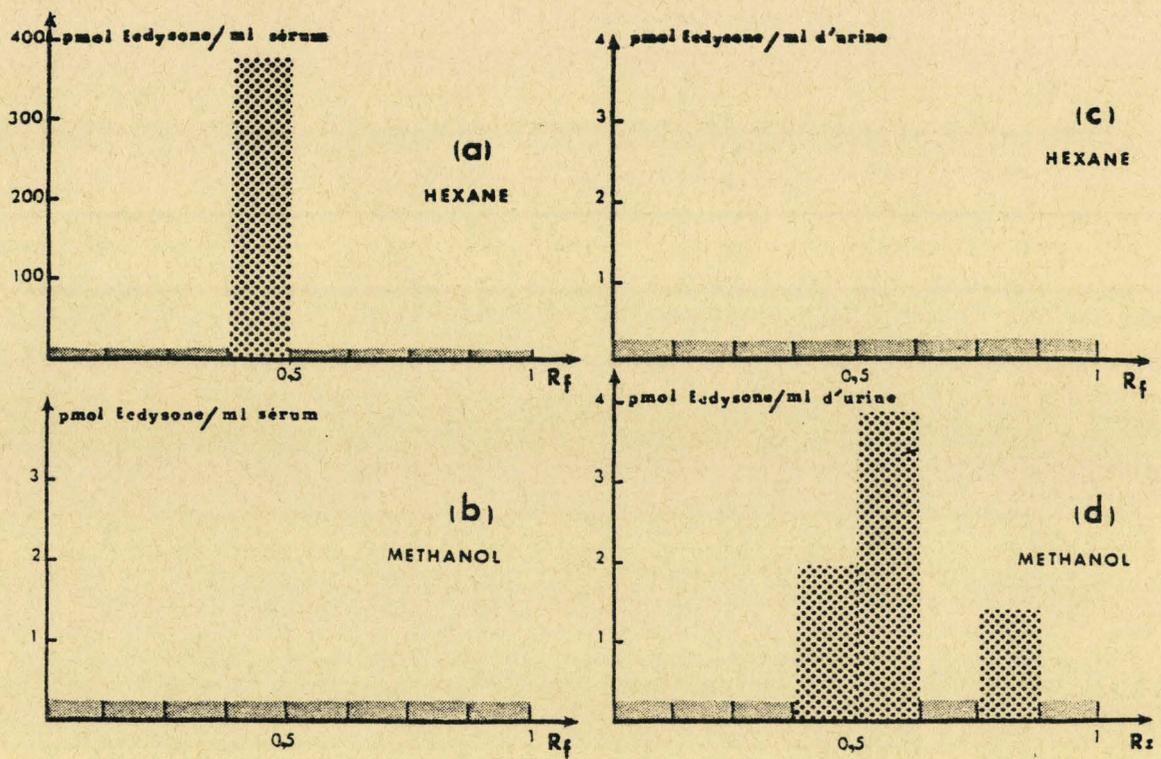


Fig.21



CHAPITRE IV

DISCUSSION

CHAPITRE IV : DISCUSSION.

IV.1. DOSAGES DES ECDYSONES DANS LE PARASITE,

IV.1.1. SCHISTOSOMULES MECANIQUES

IV.1.2. SCHISTOSOMES 11 JOURS .

IV.1.3. SCHISTOSOMES 20 JOURS.

IV.1.4. SCHISTOSOMES ADULTES (40 JOURS).

IV.1.5. OEUFS DE SCHISTOSOMES.

IV.1.6. CHEZ *Fasciola hepatica*.

IV.2. DOSAGES DES ECDYSTÉROIDES DANS LE SÉRUM OU LES URINES D'HÔTES VERTÉBRÉS INFESTÉS.

IV.2.1. CATABOLISME D'ECDYSONE EXOGENE.

IV.2.1.1. Dans le sérum.

IV.2.1.2. Dans les urines.

IV.2.2. EXISTANCE D'ECDYSTEROIDES SÉRIQUES CHEZ LES ANIMAUX
PARARISTES.

IV.3. DOSAGES D'ECDYSTÉROIDES SÉRIQUES CHEZ LES PRIMATES,

IV.3.1. CHEZ LE SINGE *Patas-patas*.

IV.3.2. CHEZ L'HOMME.

IV.1 DOSAGE DES ECDYSTEROIDES DANS LE PARASITE.

IV.1.1. Les schistosomules mécaniques.

Les quantités importantes d'ecdystéroïdes , renfermées dans la forme infestante du parasite S.mansoni, doivent être imputées à une production par l'hôte intermédiaire plutôt qu'à une synthèse endogène du parasite lui même (schéma 1).

D'une part, les schistosomules mécaniques ne sont âgés que de deux heures et d'autre part, les expériences se déroulent à 4°C, c'est-à-dire à des températures où presque toutes les activités biologiques sont en "sommeil". Dans de telles conditions, il est peut probable qu'il existe chez la forme primaire du parasite des mécanismes permettant la synthèse endogène de telles quantités hormonales.

Par ailleurs, la phylogénie de l'hôte intermédiaire laisse à penser qu'il peut produire des ecdystéroïdes pour la constitution de ses tissus riches en chitine.

L'hypothèse la plus vraisemblable serait que cette réserve d'hormones servirait au parasite pour son développement dans les premiers jours d'infestation. Aucune expérience n'ayant été entreprise afin de vérifier une telle hypothèse, le rôle des hormones à ce stade reste totalement inconnu.

IV.1.2. Schistosomes 11 jours.

Il est généralement admis par les parasitologues que la migration des parasites, du poumon vers le foie, se situe dans une période de 11 jours après l'infestation. Ces dernières années, l'étude plus approfondie de ce mode de migration a montré que si quelques vers empruntaient la voie artérielle la majorité de la population parasitaire utilisait la circulation veineuse ou capillaire (MILLER, - 1976).

A ce stade appelé J11, la concentration très importante en écdystéroïdes, par rapport aux autres stades, dénote une production endogène par le parasite lui-même puisque l'hôte définitif qui l'héberge n'en synthétise pas. Par conséquent, on peut exclure une accumulation active ou passive d'écdystéroïdes d'hôte dans le parasite.

D'autre part, l'analyse combinée HPLC-RIA permet de ne déceler que la forme ecdysone, c'est-à-dire celle qui est synthétisée *de novo* et inactive (si l'analogie avec les insectes est vraie).

La présence d'ecdysone à ce stade crucial du développement du parasite peut être reliée à trois événements biologiques :

- Migration et développement de la forme juvénile. Pendant la migration du parasite des poumons vers le foie les travaux de WILSON(1978) ont montré que le processus de transformation était caractérisé par des changements des fonctions biologiques et morphologiques telles la réduction

en taille et degré de torsion du parasite ainsi qu'une réduction de l'amplitude des mouvements d'élongation et de contraction des vers. Ces modifications entraînent chez le schistosome installé dans le foie la perte de sa capacité à migrer dans d'autres organes (WILSON & al.-1978).

- Modification de paramètres métaboliques du parasite qui arrive dans le foie (LAWSON & WILSON - 1980).

La mesure des quantités d'azote contenues dans le jeune schistosome, par la méthode de JACOB, de la consommation d'oxygène, par la technique du respiromètre, de l'activité lactate deshydrogénase, par la méthode de BERGMAYER et BERNT, montre une augmentation rapide de tous ces paramètres dès que le parasite atteint le système porte-hépatique. De plus, ces événements, dont les auteurs ne peuvent expliquer l'origine sur des critères biologiques, sont initiés entre le 10^{ème} et le 11^{ème} jour après l'infestation.

- Modifications des membranes de *S.mansoní*. La technique de cryodécapage a permis de révéler que la membrane du schistosome de 11 jours présente des caractéristiques précises, associées à un phénomène assimilable à une mue (TORPIER, et al.-1982).

Ces trois observations, se déroulant à une même période dans le développement du parasite, se situent au moment même où apparaît un pic d'écdysone chez le parasite. Parallèlement, il est maintenant bien établi que chez les insectes l'écdysone a un rôle morphologique et qu'un pic d'écdysone précède toujours une mue de l'insecte (TRUMAN et al. 1981.)

IV.1.3. Schistosomes 20 jours.

Du fait que les parasites migrent des poumons vers le foie de J8-J10 jusqu'à J20 (MILLER, -1976), la population parasitaire est très hétérogène. Hétérogénéité en forme, en taille et en physiologie puisque certains parasites présentent déjà des ébauches d'une différenciation sexuelle. Dans une telle population, l'interprétation des résultats obtenus reste délicate et difficile.

IV.1.4. Schistosomes adultes (40 jours).

Le stade adulte est défini comme étant la période à laquelle les vers femelles commencent la ponte. Généralement, ce phénomène de ponte est initié vers le 35^{ème} jour après l'infestation. A J40, la proportion de femelles capables de pondre est très importante et concerne presque toute la population femelle.

Les adultes, mâles et femelles, synthétisent des ecdystéroïdes dont le taux varie en fonction de leur localisation anatomique.

Les adultes recueillis par perfusion totale de hamster, présentent une concentration hormonale comparable pour les deux sexes. Dans ce cas, la séparation par H.P.L.C. permet de discerner les deux formes d'ecdystéroïdes : l'ecdysone et la 20 OH.ecdysone avec une prédominance de la forme écdysone.

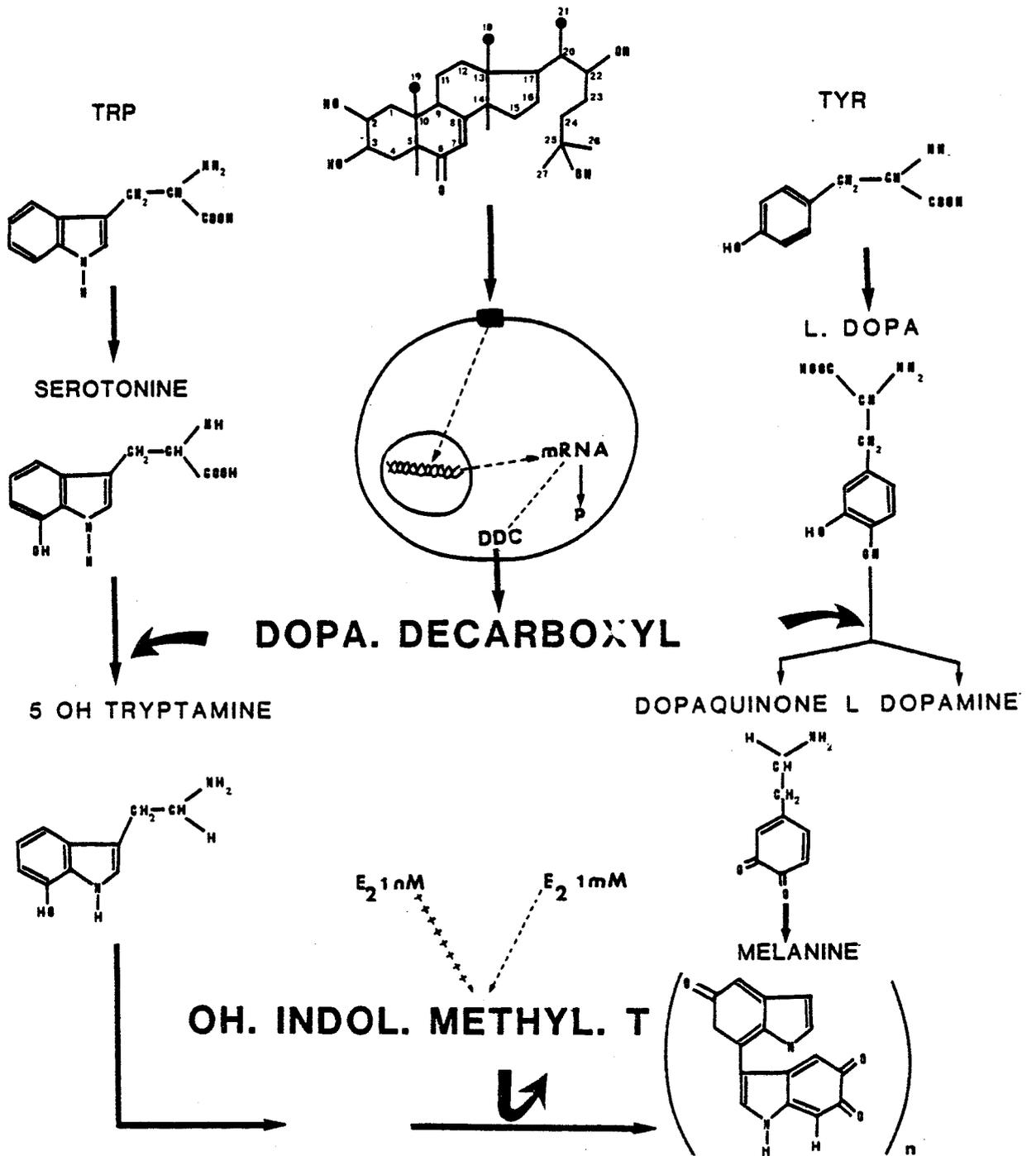
D'autre part, il est généralement admis que le lieu physiologique de la ponte et de l'accouplement des vers est le système porto - mésentérique. Les adultes, collectés exclusivement dans cette région anatomique, présentent une différence sexuelle significative en taux global d'ecdystéroïdes. De plus, les rapports des formes

ecdysone et 20 OH. ecdysone mesurés par combinaison HPLC - RIA, sont inversés par rapport à ceux obtenus par perfusion totale, il est donc analogue à celui observé dans les oeufs du parasite. Chez les insectes, nous savons depuis 1975, grâce notamment aux travaux de l'équipe de J.A. HOFFMAN sur *Locusta migratoria*, que les femelles en vitellogénèse produisent de fortes quantités d'ecdystéroïdes (10^{-6} - 10^{-5} M) avant la ponte. En effet, sous stimulation d'une neuro-hormone (CHARLET et al.-1979), l'épithélium folliculaire de l'ovaire synthétise l'ecdysone à partir du complexe cholestérol-lipoprotéine (LAGUEUX et al.- 1978). Cette hormone stimule la synthèse de vitellogénine, ou protéine femelle, par le corps gras (FALLON et al.- 1974 ; HAGEDORN et al.-1975 ; JOWETT et al.-1981). L'ecdysone néosynthétisée se complexe à la vitellogénine produite (LAGUEUX et al.-1981) transformant ainsi l'ovaire en "réservoir" d'ecdysone. En fait, la presque totalité de ces ecdystéroïdes complexés sont présents dans l'oeuf. La conversion en hormone active (20 OH.ecdysone) par les ovarioles permet ainsi le développement de l'oeuf et des premiers stades embryonnaires.

Il a été d'ailleurs démontré que des extraits acétone ou éther de schistosomes mâles, provenant de perfusions des veines mésentériques, initient le développement des glandes vitellines de femelles sexuellement immatures (SHAW et al.-1977). Ceci suggère de façon indirecte le rôle potentiel important de l'ecdysone dans l'induction de la maturation du système reproducteur femelle de *Schistosoma mansoni*.

Chez les insectes, la L. DOPA DECARBOXYLASE (aromatique L amino acide carboxylase E.C. 4.1.1.28 , une enzyme essentielle dans la formation de cuticule (MARSH et al.-1980; KARLSON et al.-1966) , en particulier, de l'oeuf) semble être sous le contrôle de l'hormone ecdysone (KRAMINSKY et al.-1980). Cette enzyme catalyse la réaction

ECDYSONE



BUS
LILLE

SCHÈMA 2

de décarboxylation de la L.DOPA en dopamine et de la 5OH.TRYPTOPHANE en 5OH.TRYPTAMINE. La présence d'une telle enzyme a été démontrée aussi bien chez des cercaires de schistosomes que chez des schistosomes adultes (CATTO - 1980).

L'ensemble de tous ces travaux nous amène à réaliser l'un des schémas réactionnels hypothétiques dans lequel l'ecdysone pourrait stimuler chez *S.mansoni*, la synthèse de mélanine qui est un composé intervenant dans la constitution de l'oeuf (Schéma 2).

Deux arguments viennent étayer ce schéma :

- D'une part, la sérotonine qui entre dans l'une des voies anaboliques de la mélanine, est présente en quantité importante dans le mésentère de l'homme. Ce mésentère est aussi le lieu où les parasites montrent une différence sexuelle en ecdysone. C'est également, avec le système porte leur lieu d'accouplement et de ponte.

- D'autre part, l'enzyme Hydroxy indol O méthyl transférase intervenant dans la voie anabolique de la mélanine est inhibée par de forte quantité d'estradiol (CARDINALI et al.-1981). C'est précisément le cas avec les implants d'estradiol (BARRABES et al.-1979) qui diminuent la parasitémie et le nombre d'oeufs dans les fèces d'animaux infestés.

IV.1.6. Chez *Fasciola hepatica*.

Ce parasite appartient à la classe des TREMATODES digéniques comme *S.mansoni*. Par contre, ce vers est hermaphrodite comme la plupart des TREMATODES.

Il contient également les deux hormones d'insectes détectées chez *S.mansoni* : l'ecdysone et la 20 OH. ecdysone.

Il faut cependant noter que, le parasite *Fasciola hepatica* contient une autre hormone de structure semblable à l'éclydysone, reconnue par les anti-corps anti éclydysone. Il pourrait s'agir ici d'une molécule propre à ce parasite.

IV.2. DOSAGE DES ÉCDYSTÉROÏDES DANS LE SÉRUM OU LES URINES D'HÔTES VERTÉBRÉS PARASITÉS

IV.2.1. CATABOLISME D'ECDYSONE EXOGENE.

IV.2.1.1. Dans le sérum.

La courbe de disparition du mélange éclydysone et 20 OH éclydysone injecté à des hamsters sains est une exponentielle d'équation générale:

$$(\text{Ecdysone})_t = (\text{Ecdysone})_{t_0} \times e^{-1,058 t}$$

Ces résultats sont confirmés par la présence de droites parallèles en représentation inverse (log C en fonction du temps), indiquant ainsi qu'un mélange d'éclydystéroïdes est catabolisé selon un seul processus.

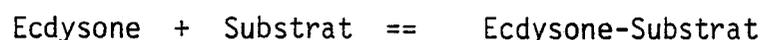
En fait, le terme catabolisé doit être pris dans le sens d'une élimination de l'entité moléculaire plutôt que dans le sens d'une dégradation biochimique. En effet, le devenir biochimique de ce mélange est actuellement inconnu, l'expérimentation ne permet pas d'accéder à ce paramètre.

Pour répondre à une telle question, il serait nécessaire de posséder de l'écdysone marquée au ^{14}C sur le squelette même de la molécule, et de suivre la radioactivité dans les différents organes et compartiments liquidiens de l'animal. (

Un simple marquage au ^3H sur l'une des fonctions hydroxyles serait insuffisant car il pourrait subir une oxydation active ou passive, et par conséquent, l'écdystéroïde redeviendrait "froid".) De plus, la présence de fractions ^{14}C non immunoréactives dénoterait une modification de la structure de l'écdystérone initial.

Dans le sérum, le temps de demi-vie de l'écdysone est sensiblement identique à celui observé chez les arthropodes, 30 minutes, contrairement aux stéroïdes humains qui ont généralement des temps de demi-vie de l'ordre de 6 à 8 heures.

L'écdysone exogène, ne se lie pas à un substrat sérique pour former un complexe stable, à demi-vie plus longue, selon le schéma :



$$\text{avec } K = \frac{(\text{Ecdysone-Substrat})}{(\text{Ecdysone}) \times (\text{substrat})}$$

$$\text{et } (\text{Ecdysone}) + (\text{Ecdysone-Substrat}) = \text{Constante}$$

Dans notre RIA, le complexe ecdysone-substrat est dissocié par l'incubation méthanolique à chaud. Par suite, nous dosons l'ecdysone libre plus l'ecdysone qui était liée. Si le complexe existait, cette quantité dosée devrait être constante pour des temps courts de l'ordre de quelques heures en raison de la stabilité du complexe ecdysone-substrat. Ce n'est pas notre cas, puisque les

quantités dosées diminuent exponentiellement avec le temps, même pour des périodes courtes de quelques heures.

De plus, les cinétiques effectuées sur 24 jours auraient pu mettre en évidence la présence de tels complexes.

Bien que ces expériences dont le principal but était d'apprécier le temps de demi-vie d'un écdystéroïde dans le sang soient significatives, il ne faut pas oublier qu'à chaque saignée 20 % des protéines plasmatiques sont retirées, (en particulier, la sérum albumine dont le "turn over" est d'une dizaine de jour). Le rôle important de la sérum albumine dans le transport non spécifique d'hydrocarbure de faible poids moléculaire comme les stéroïdes doit être considéré.

IV.2.1.2. Dans les urines.

Après la disparition de l'écdysone sérique exogène, l'urine est le compartiment naturel pour l'élimination de molécules. L'écdysone est effectivement, après injection intra-veineuse, retrouvée dans les urines de hamsters traités. La courbe représentative de l'élimination par les urines de l'hormone ecdysone est la résultante de deux exponentielles décroissantes.

Cette technique suggère deux "compartiments" pour l'ecdysone : le premier serait une absorption et le second une désorption de la molécule. Deux hypothèses au moins peuvent expliquer de tels résultats :

- un cycle entéro-hépatique : la première cinétique correspondrait à la rétention de l'ecdysone dans les muqueuses intestinales et le foie, et la deuxième partie de la courbe au "relarguage" de l'ecdysone par ces organes. Ce relarguage devrait normalement conduire l'ecdysone du foie au rein via le sang. Un tel schéma devrait ainsi mettre en évidence dans le sérum une courbe biphasique. Cette deuxième cinétique sérique n'ayant pu être appréhendée dans nos délais d'observations, une tentative d'explication pourrait être son masquage par la première courbe observée si la méthode utilisée est correcte.

- un effet néphrotoxique de l'ecdysone : dans ce cas, la première partie de la cinétique correspondrait à la rétention de l'ecdysone par les cellules rénales, des glomérules ou des tubules. Cette concentration infestante d'ecdysone conduirait à la mort de la cellule qui relarguerait alors son contenu.

Actuellement, on ne peut exclure aucune des deux hypothèses, d'une part parce que nous effectuons une expérience dite "de charge", c'est-à-dire utilisant des doses non physiologiques d'ecdysone. Tout produit ayant son seuil de cytotoxicité, il n'est pas exclu que dans la méthode utilisée ce seuil n'ait pas été atteint. D'autre part, nous avons observé que des injections à $10^{-4}M$ et $10^{-3}M$ d'ecdysone provoquent la mort des hamsters par anurie.

Actuellement, nous recherchons les organes susceptibles de stocker l'ecdysone. Les résultats ne sont pas encore connus au moment de la rédaction de cette thèse.

IV.2.1.3. Détection d'ecdysone sérique chez les animaux parasités

a) Infestation par *S. mansoni*

Des hamsters infestés par le parasite *S. mansoni*, présentent dès le 6ème jour de l'infestation des molécules sériques immunoréactives avec des anti corps anti ecdysone.

Les jeunes schistosomes synthétisent de l'ecdysone et de la 20 OH ecdysone. Ces molécules sont vraisemblablement excrétées par le parasite et subissent dans le sang des modifications moléculaires. Ces ecdystéroïdes seront appelées Ecdystéroïdes Sériques Endogènes ou E.S.E. Chez l'animal permissif, les quantités d'E.S.E. atteignent dès le 12ème jour un plateau (mg/l). Ces quantités sont tout à fait comparables à celles d'hormones stéroïdes plasmatiques de l'homme : de 0,20 à 7,10 mg/ml pour la Testostérone ; de 0,23 à 178 mg/ml pour la progestérone et 13 µg/ml pour l'aldostérone par exemple (BAYARD et al., 1970). La présence d'E.S.E. semble être un marqueur biologique d'une infestation par *S. mansoni* qui traduirait en plus un développement normal du parasite. La aussi, l'analogie avec le modèle insecte peut expliquer ce résultat en apparence paradoxal puisqu'à partir de faibles quantités d'hormone dosées dans le parasite, des ecdystéroïdes sont détectables dans le sérum. En effet, Chez *Locusta migratoria* par exemple, la synthèse de l'ecdysone est effectuée dans une glande spécialisée, la glande

de mue ou glande prothoracique (KOOLMAN et al.- 1974), a partir d'un précurseur Cholestérol-lipoprotéine. L'ecdysone néosynthétisée est directement "excrétée" dans le sang de *Locusta migratoria* contrairement à la situation précédemment décrite pour l'ecdysone ovarienne (HIRN et al.-1979).

Le rat est un animal semi permissif, chez lequel des E.S.E. peuvent être également détectés à un stade précoce de l'infestation. Cet hôte semi permissif est connu pour mettre en place vers le 10^{ème} jour après l'infestation une réponse immunologique dont certains anticorps sont bien caractérisés et étudiés dans les phénomènes de cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante d'anticorps (ADCC). Ces mécanismes effecteurs du rat permettent ainsi le rejet de la quasi totalité de la population parasitaire dans une situation de réinfection.

Chez un tel hôte, les quantités d'E.S.E. dosées diminuent progressivement dès la période 6 - 10 jours après l'infestation, quel que soit la charge parasitaire. Ceci suggère donc que les parasites se développent anormalement et que leurs fonctions physiologiques sont altérées.

b) Infestation par *Dipetalonema vitae*

L'apparition d'E.S.E. ne semble pas restreinte au seul groupe des Trématodes mais aussi au groupe des nématodes comme *Dipetalonema vitae*.

Les études préliminaires montrent l'apparition d'un taux d'E.S.E. juste au moment de la microfilarémie, c'est-à-dire le début de la "ponte" des microfilaires à J63. Ce résultat n'est pas surprenant, compte-tenu des travaux de ROGERS (1973) qui montre que des extraits de nématodes comme *Panagrellus redivivus* peuvent induire une mue chez l'insecte.

Réciproquement, l'ecdysone et l'hormone juvénile agissent sur le développement du système reproducteur des nématodes (ROGERS, 1973).

IV.3. DOSAGES D'ECDYSONE SERIQUES ENDOGENES CHEZ LES PRIMATES INFESTES.

IV.3.1. Chez le singe *Patas patas*.

Par sa physiologie plus proche de celle de l'homme que celle des rongeurs et pour des raisons d'éthique, le singe représente un modèle expérimental très intéressant.

Nos observations précédentes concernant l'E.S.E. observées chez les rongeurs sont transposables aux primates Patas-Patas.

Le type de courbe d'apparition d'E.S.E. est de même type que celle observée chez les rongeurs "permissifs", c'est-à-dire une courbe en plateau avec une rétention des ecdystéroïdes. Cependant, le plateau semble être atteint plus tardivement.

De plus, des quantités importantes d'E.S.E. sont détectables même en l'absence d'oeufs dans les fécès. Bien que le rôle des ecdystéroïdes dans la vitellogénèse ne soit pas expérimentalement démontré, cette dernière observation pourrait suggérer que l'ecdysone, au-delà d'une certaine concentration, exercerait un effet rétro-actif négatif sur la vitellogénèse des femelles.

En faveur de cette hypothèse , il faut citer les travaux de CHEEVER et POWER (1972) qui ont montré chez le singe Rhésus qu'une forte infestation par 500 à 600 cercaires provoquait une diminution dans le temps du nombre d'oeufs dans les fécès comparativement à des animaux infestés seulement avec 100 cercaires. Les ecdystéroïdes apparaissent donc comme un marqueur biologique d'une infestation par *S.mansoní* en particulier, même dans des cas où la détection d'oeufs spécifiques dans les fécès est négative.

IV.3.2. Chez l'homme.

L'une des applications de notre travail est principalement orientée vers l'amélioration des techniques de diagnostic chez l'homme. Même si les paramètres deviennent de plus en plus complexes du modèle rongeur à l'homme, il est presque toujours possible de répondre à une question précise. Dans le cadre de ce travail, la question posée est: "l'ecdysone et les ecdystéroïdes sériques peuvent - ils servir au diagnostic d'une infestation par helminthe ? ".

Plusieurs dizaines de sérums humains ont été étudiés mais quatre seulement ont fait l'objet d'une étude plus approfondie, d'une part en raison des volumes de sérum disponible et d'autre part en raison des quantités d'ecdystéroïdes dosées. Ces sérums étaient toujours accompagnés des urines correspondantes.

Ce modèle a permis de mettre en évidence des ecdystéroïdes sériques ne correspondant ni à de l'ecdysone, ni à de la 20 OH ecdysone (sauf chez un malade où l'analyse R.I.A.- H.P.L.C. a permis de mettre en évidence un pic d'ecdysone). Cette (ou ces) molécule(s) ont des comportements en solution tout à fait particuliers, notamment leur affinité pour des solvants apolaires comme l'hexane. L'ecdysone et la 20 OH.ecdysone n'ayant aucune affinité pour de tels solvants.

L'analyse combinée R.I.A.- H.P.L.C. ne permet pas de trancher sur la polarité de ces nouvelles molécules. En effet, le comportement de ces ecdystéroïdes est apolaires lorsqu'on utilise des colonnes polaires comme les "Diols" et polaires lorsqu'on utilise des colonnes apolaires comme les "Phényl". L'optimisation de nos conditions H.P.L.C. et un meilleur choix des colonnes nous permettrons peut être de lever cette difficulté. De plus, les couples de solvants utilisés devront vraisemblablement être réévalués pour cette nouvelle famille de molécules. Ce phénomène n'est observable que dans les sérums étudiés, alors que dans les urines tous les ecdystéroïdes sont solubles dans le méthanol, même en présence d'hexane. De plus, les ecdystéroïdes ont été identifiés sur gel de silice comme étant un mélange d'ecdystéroïdes dont l'ecdysone.

Vraisemblablement, le sérum de malades infestés véhicule des métabolites de l'ecdysone ou de la 20 OH.ecdysone alors que les urines contiennent essentiellement de l'ecdysone.

Quant aux sujets sains, le dosage effectué sur plus de 150 échantillons de sérums n'a jamais révélé plus de 50 femtomoles d'ecdysone équivalent par ml de sérum.

En conclusion, les ecdystéroïdes sériques endogènes semblent bien être les révélateurs biologiques d'une infestation par helminthes.

CHAPITRE V.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS.

L'ensemble de ces travaux montrent pour la première fois qu'un trématode est capable de synthétiser ses propres hormones.

Ces molécules parasitaires, analysées par l' H.P.L.C. et le R.I.A, semblent analogues aux hormones d'insectes impliquées soit dans leurs processus morphogénétiques (mue larvaire, mue larvo-pupale, mue pupo-imaginale) soit dans leurs processus de différenciation cellulaire (ovogénèse, développement de l'oocyte): l'ecdysone et la 20 OH. ecdysone.

La production hormonale par *Schistosoma mansoni* est détectée à deux périodes critiques de son développement :

- A J11 , période de transition entre la forme juvénile et les vers adultes , caractérisée par de brusques variations des paramètres physiologiques et biologiques du parasite.
- A J40 , période de la maturation du système reproducteur femelle, caractérisée par la ponte des oeufs . A ce stade du développement parasitaire, les quantités hormonales varient avec le sexe du Schistosome et sa localisation anatomique chez l'hôte infesté. En particulier, la balance entre les formes ecdysone et 20 OH ecdysone est inversée lorsque le parasite passe d'un site quelconque de l'organisme vers son lieu physiologique de ponte : Le mésentère riche en sérotonine.

Le rôle des ecdystéroïdes chez les insectes est lié à la stimulation des synthèses protéiques intervenant dans les phénomènes morphologiques (mue) ou de différenciation cellulaire.

Par analogie, les hormones parasitaires pourraient jouer un rôle biologique à trois niveaux :

- Au niveau du développement de la forme juvénile, permettant ainsi le passage vers la forme adulte différenciée et sexuée.
- Au niveau de la stimulation de la vitellogénèse du système reproducteur femelle, où interviendraient très vraisemblablement des facteurs d'origine mâle.
- Au niveau de la stimulation de la mélanine de l'œuf avec l'intervention de la L.DOPA DECARBOXYLASE et de la 5 OH TRYPTAMINE.

Le modèle bisexué Schistosome n'est pas unique puisque de telles hormones ont également été mises en évidence chez un autre trématode : *Fasciola hepatica*. Ce parasite hermaphrodite possède en plus des deux hormones décrites chez *Schistosoma mansoni* un ecdystéroïde non identifié, en quantité mineure. Ainsi, semble se dessiner un "tableau hormonal" des trématodes, où, sous un dénominateur commun appelé "ecdystéroïdes", une certaine spécificité apparaît soit dans des formes particulières d'ecdystéroïdes, soit dans le rapport des formes ecdysone et 20 OH. ecdysone.

De telles molécules sont synthétisées et excrétées par le parasite dans le milieu biologique environnant et en particulier, dans le plasma ou l'urine de l'hôte infesté.

Ces écdystéroïdes sériques endogènes (E.S.E) sont détectables dès le 6^{ème} jour après l'infestation, aussi bien chez des animaux permissifs que non permissifs, de plus ces molécules sont de polarité très différente de l'ecdysone ou de la 20 OH ecdysone. Nous pensons actuellement que ces produits de dégradation des écdystéroïdes d'invertébrés sont très prometteurs dans le cadre des études des interactions du couple hôte-parasite.

En effet, si la disparition d'écdystéroïdes sériques endogènes chez le rat est en parfait accord avec le modèle expérimental d'infection abortive, il sera très important de vérifier si la présence d'écdystéroïdes sériques peut dysréguler les mécanismes immunitaires de cet animal non permissif.

Dans l'attente d'une telle vérification, nous pouvons avancer sans trop d'erreurs que la détection des écdystéroïdes sériques endogènes s'avère être, dans l'immédiat, très utile à l'amélioration des techniques de diagnostic de maladies parasitaires.

En effet, ces molécules biologiques semblent être de bons marqueurs de la charge parasitaire, même en absence d'œufs dans les selles, élément indispensable dans un but de dépistage précoce et dans le cas d'une chimiothérapie.

Nous pensons que ces résultats de base, présentés dans ce mémoire permettront une approche plus rationnelle d'un projet plus vaste

défini par cinq grands objectifs :

- 1 - Rôle de ces ecdystéroïdes chez le parasite *Schistosoma mansoni*.
- 2 - La poursuite de notre recherche fondamentale sur des bases moléculaires des voies métaboliques propres aux stéroïdes de *Schistosoma mansoni*.
- 3 - L'étude des composés pouvant interférer avec ce métabolisme et provoquer la mort du parasite.
- 4 - L'étude de l'interférence des hormones parasitaires au niveau de l'hôte définitif, tant sur le plan immunologique que sur le plan endocrinien.
- 5 - La mise en évidence de marqueurs biochimiques spécifiques de la parasitose pour un diagnostic précoce.

CHAPITRE VI
INFORMATIQUE

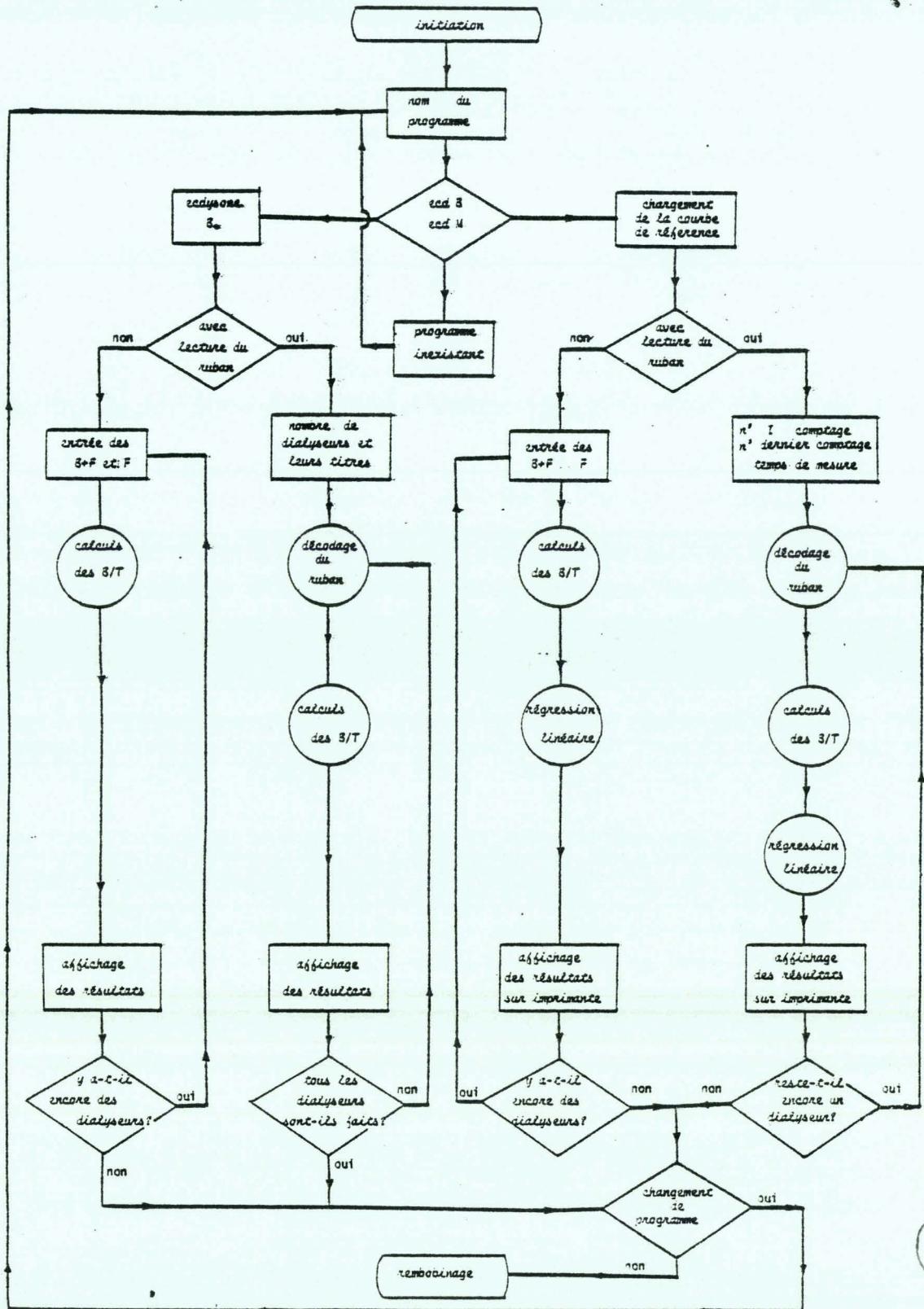
INFORMATIQUE.

L'organigramme de ce programme est inspiré de celui du centre d'immunologie de MARSEILLE - LUMINY réalisé par M.L. DE REGGI sur un micro-ordinateur HEWLET PACKARD HP 9825 A (schéma 2).

Le programme , établi en langage basic fonctionne actuellement sur un micro-ordinateur WANG 2200 S.

Il permet :

- de gérer la courbe d'étalonnage de l'ecdysone .
- de calculer automatiquement les B/T de dix dialyseurs à partir d'un ruban perforé obtenu par un compteur de radioactivité 'gamma'.
- de calculer les quantités hormonales contenues dans un échantillon biologique par régression linéaire de la courbe étalon.



INITIALISATION DES PROGRAMMES . (Lignes 5 à 55).

Les lignes 5 et 10 gardent dans la mémoire active de l'ordinateur un espace réservés aux différentes variables du programme.

L'attribution des variables utilisées est le suivant :

A\$: nom du programme appelé par l'opérateur.

T\$(10) : titre du dialyseur compté.

P\$(10) : variable expérimentale concernant le poids , la dilution de l'échantillon biologique.

T1\$: comptage lu sur le ruban perforé.

X1\$: réponse de l'opérateur (oui ou non) à une question posée par l'ordinateur.

M\$: permet le chargement ou la lecture de la courbe de référence.

H\$(20) : variable expérimentale

D\$(30) : date d'incubation des dialyseurs.

G\$: permet l'inscription du signe " " ou " " dans les résultats.

U(20) : nombre de coups dans la fraction libre.

T(20) : nombre de coups dans la fraction liée.

R(155) : matrice à une ligne et à 155 colonnes pour la courbe d'étalonnage et les B/T.

P(3,20) : matrice à 3 lignes et 20 colonnes réservée à l'identification d'une chambre de dialyseur.

Aucun code n'est requis pour l'appel d'un programme . En cas d'incompréhension de la part de l'ordinateur , le nom des programmes disponibles sera affiché (ligne 40).

INITIALISATION DES PROGRAMMES .

```
5 COM A#30,T#(10)52,P#(10)10,T1#56,X1#,M#,C#,X#,H#(20),D#(30),G#
(20),U(20),T(20),G(5),A(25),R(155),P(3,20),Q(20),O
10 COM T3#64,T#64
15 PRINT HEX(030A0A0A0A03090309):INPUT "NOM DU PROGRAMME",A#:PRINT
HEX(03)
20 IF POS(A#="L") >= 3 THEN 365
25 IF POS(A#="F") >=1 THEN 235
30 C=1:IF POS(A#="O") >= 1 THEN 60
35 PRINT "ERREUR ! ! !";" " ;"PROGRAMME " ;A#;" INEXISTANT"
:PRINT HEX(0A)
40 PRINT TAB(15);"Programmes possibles":PRINT HEX(0A0A),"ECDYSON
E REFERENCE ";TAB(30);"ou";TAB(40);"ECD REF"
45 PRINT "ECDYSONE BO";TAB(30);"ou";TAB(40);"ECD BO":PRINT "ECDY
SONE MANUEL";TAB(30);"ou";TAB(40);"ECD MANL"
50 PRINT "JH REFERENCE";TAB(30);"ou";TAB(40);"JH REF":PRINT "JH
BO":PRINT "JH MANUEL";TAB(30);"ou";TAB(40);"JH MANL":PRINT HEX(0
A)
55 INPUT " D . K ",X1#:GOTO 15
```



DIALYSEURS EN B° . (Lignes 60 à 230).

Cette partie de programme sert à calculer les B/T pour chaque couple de chambre d'un dialyseur.

Dans le cas où les comptages sont introduits par l'intermédiaire du ruban perforé "INTERTECHNIQUE", le traitement des dialyseurs (jusqu'à concurrence de 10) se fera sans intervention de l'opérateur.

Les résultats obtenus permettront de vérifier le bon état des membranes après l'incubation d'échantillon biologique.

La variable "H" (ligne 85 , 90 , 100 , 105) ne peut prendre que les valeurs '0' ou '1' :

-Pour $H=0$, le comptage est attribué au nombre de coups totaux libre + lié : $T(J)$.

-Pour $H=1$, au nombre de coups libres : $U(J)$.

La variable H est appelée dans ce cas un 'flag'.

Les lignes 135 à 190 permettent l'impression des résultats sous forme de tableau.

Les lignes 200 à 230 permettent :

- soit de recommencer un cycle de calculs.
- soit le branchement à un autre programme.
- soit la fin de l'interrogation .

GESTION DE LA COURBE D'ETALONNAGE (Lignes 235 à 360).

La courbe d'étalonnage est découpée en douze segments égaux, de 10^{-11} à 10^{-7} M.

Sur chaque segment nous considérons qu'une variation du B/T est proportionnelle à un accroissement de la concentration.

A chaque borne de ces segments correspond donc un B/T qui est alors mise dans une matrice (1,1) : R() (Ligne 310).

La courbe de référence de l'éclydysone est ensuite enregistrée sur K7 sous le label "REF" (Ligne 350).

GESTION DE LA COURBE D'ETALONNAGE .

```
235 REM GESTION DE LA COURBE D'ETALONNAGE
240 REM Courbe 'ECDYSONE ' et 'HORMONES JUVENILES'
245 INPUT "Lecture de la courbe(L);chargement(C) ",M#
250 IF STR(A#,1,1)="J" THEN 275
255 IF M#="L" THEN 265
260 IF M#="C" THEN 305
265 PRINT HEX(030A0A);TAB(16);"Je charge la courbe de reference"
:PRINT TAB(25);"De l'ecdysone":DATA LOAD "REF": DATA LOAD R():BA
CKSPACE 1F
270 GOTO 280
275 IF M#="C" THEN 305: PRINT HEX(030A0A0A0A0A);TAB(14);"Je cha
rge la courbe de reference":PRINT TAB(22);"De l'horm. Juvenile":
DATA LOAD "J.H.":DATA LOAD R():BACKSPACE 2F
280 GOSUB '2:PRINT HEX(03),"Courbe de reference du prog. ";A#:PR
INT HEX(0A0A):FOR F=13 TO 25
285 PRINTUSING 290,R(F),F
290% * * *      Valeur=####      * *      Point=##      * * *
295 NEXT F
300 SELECT PRINT 005(64):GOTO 220
305 FOR F=13 TO 25 : PRINT F-12;"eme Point de la courbe " : INPU
T " ",A
310 R(F)=A
315 NEXT F
320 SELECT PRINT 005(64)
325 FOR F=13 TO 25: PRINTUSING 330,F-12,R(F),F
330%** ##eme POINT COURBE * * VALEUR=#### * * Abscisse=## * *
335 NEXT F
340 INPUT "CONFIRMATION",C#: IF H=2 THEN 405
345 IF POS(C#="N") <> 0 THEN 305
350 IF STR(A#,1,1)="J" THEN 355:DATA RESAVE OPEN "REF":DATA RESA
VE R():DATA SAVE END :BACKSPACE 1F:GOTO 360
355 DATA RESAVE OPEN "J.H.":DATA RESAVE R():DATA SAVE END :BACKS
PACE 2F
360 SELECT PRINT 005(64):GOTO 220
```



CALCULS DE LA QUANTITE D'HORMONE (Lignes 365 à 1210).

Après recherche sur la K7 et chargement en mémoire centrale de la courbe de référence (Ligne 380), les comptages peuvent être introduit soit manuellement (lignes 410 à 440), soit automatiquement à partir du ruban perforé (lignes 620 à 715).

- Pour le programme en manuel :

Le calcul du B/T est alors effectué (Ligne 425), puis les différentes données expérimentales sont introduites (lignes 445 à 465).

Le sous programme 5 est recherché. Il correspond à la régression linéaire de la courbe de référence (Lignes 965 à 1040) ainsi qu'à l'impression des résultats (lignes 1060 à 1140).

Après l'affichage des résultats, un nouveau cycle de calculs peut être fait (lignes 475 à 485) ou bien on peut changer de programme (lignes 495 à 500).

- Pour le programme en automatique :

Le sous programme 4 est appelé (ligne 635) après avoir lu les données sur le ruban (ligne 630).

Ce sous programme 4 permet de détecter un code binaire ASCII I.B.M incompatible avec le langage 'WANG' et de le transformer en code binaire ASCII compatible (lignes 915 à 960).

Le calcul du B/T est ensuite effectué (ligne 710) avant l'appel du programme de régression linéaire (ligne 725).

CALCULS DE LA QUANTITE D'HORMONE

```
365 REM CALCULS DE LA Qte D'HORMONE
370 IF STR(A#,1,1)="E" THEN 380:IF R(15) <>0 THEN 400
375 DATA LOAD "J.H.":DATA LOAD R():BACKSPACE 2F:GOTO 400
380 IF R(15) <> 0 THEN 400:DATA LOAD "REF":DATA LOAD R():BACKSP
ACE 1F
385 GOTO 400
390 GOSUB '2:PRINT HEX(03),"COURBE DU PROG. ";A#:FOR F=13 TO 25:
PRINT R(F);:NEXT F
395 INPUT "CONFIRMATION",C#
400 H=2: IF POS(C#="N")>=1 THEN 305
405 SELECT PRINT 005(64):J1=1:PRINT HEX(030A0A0A0A):TAB(22);"Pro
gramme
";A#:PRINT HEX(0A0A):INPUT "Avec ruban (1) ou SANS
ruban (2)",V: ON V GOTO 510,410
410 FOR L=1 TO 10
415 PRINT L; :INPUT "Coups Tx",T(L):INPUT "Libre",U(L)
420 IF T(L)=0 THEN 435
425 R(L)=1000*(T(L)-U(L))/T(L)
430 GOTO 440
435 R(L)=0
440 NEXT L
445 INPUT "REPLICATE",G:INPUT "Titre",T#(J1):INPUT "Incubation d
u ",D#
450 H#(1)="2.50*": H#(2),H#(3)="1.00*"
455 K=1:L=1:P#(J1)="HOMOGENAT":GOSUB '1
460 K=2:L=1:P#(J1)="DILUTION":GOSUB '1
465 K=3:L=1:P#(J1)="POIDS":GOSUB '1:PRINT HEX(030A0A0A0A):PRINT
TAB(20);"JE CALCULE"
470 GOSUB '5
475 SELECT PRINT 005:PRINT HEX(0A0A0A):PRINT "Dialyseur";H;"?":I
NPUT " ",X#
480 H=H+1
485 IF POS(X#="N") <> 0 THEN 495
490 GOTO 410
495 INPUT "Voulez vous changer de programme",X1#
500 IF POS(X1#="0") <=1 THEN 15
505 STOP "FIN":END
```



LECTURE DU RUBAN PERFORE .

```

510 REM PROGRAMME LECTURE DU RUBAN
515 INPUT "Avez vous allume le lecteur",X1$
520 IF POS(X1$="N")>=1 THEN 515
525 INPUT "No DE GROUPE" "G:02=0
530 INPUT "No du PREMIER COMPTAGE" "C1
535 INPUT "No DU DERNIER COMPTAGE" "C2
540 INPUT "Temps de mesure en minutes" "T1
545 INPUT "Nature du code : 'FF' (1) ou '8D' (2) "B
550 P1=20-100*(C1-INT(C1)) : P2=100*(C2-INT(C2)) : P3=((INT(C2)-
INT(C1))-1)*19
555 P = (P1+P2+P3) / 2
560 PRINT HEX(03):PRINT TAB(15);"Lecture de ruban avec le code
";B:PRINT HEX(0A0A),TAB(20);"de :";TAB(35);C1:PRINT TAB(20);"A
:";TAB(35);C2:PRINT HEX(0A),"Comptage des tubes sur :";TAB(35);
T1;" min."
565 PRINT HEX(0A),"Nbr total de tubes a compter : ";TAB(35);INT(
2*P)
570 PRINT HEX(0A):INPUT "CONFIRMATION ",X1$: IF POS(X1$="N") <>
0 THEN 530
575 PRINT HEX(03)
580 SELECT PRINT 005(64):INPUT "Replicate",G:INPUT "Date",D$
585 H$(1)="2.50*" : H$(2),H$(3)="1.00*":J1=1
590 INPUT "Titre",T$(J1)
595 K=1:L=1:P$(J1)="HOMOGENAT":GOSUB '1
600 K=2:L=1:P$(J1)="DILUTION":GOSUB '1
605 K=3:L=1:P$(J1)="POIDS":GOSUB '1
610 INPUT "Confirmation",X1$:IF POS(X1$="N")>=1 THEN 590
615 J=0 : IF P <= 0 THEN 1145
620 FOR J=1 TO 10
625 H=0
630 IF B=2 THEN 1150:GOSUB '3: DATA LOAD BT(N=56,L=FF)/618,T1$:S
ELECT PRINT 005:PRINT T1$:PRINT HEX(010A0A0A0A0A0A0A0A0A)
635 K,N=4 :M,A=9:GOSUB '4
640 CONVERT STR(T1$,K,M) TO D : IF D <C1 THEN 630: IF D >C2 THEN
630
645 K,N=15 : M,A = 8 :GOSUB '4
650 CONVERT STR(T1$,K,M) TO T:IF T <> T1 THEN 630
655 K,N=24 : M,A=11 :GOSUB '4: IF H=1 THEN 675
660 CONVERT STR(T1$,K,M) TO T(J):H=H+1
665 IF T(J)=0 THEN 695
670 IF H=1THEN 630
675 CONVERT STR(T1$,24,11) TO U(J)
680 IF U(J)=0 THEN 695
685 NEXT J
690 GOTO 700
695 R(J)=0:NEXT J
700 IF J=10 THEN 710
705 GOTO 630
710 FOR J=1 TO 10 : R(J)=1000*(T(J)-U(J))/T(J)
715 NEXT J
720 J1=1:PRINT "STOP
JE. CALCULE"
725 GOSUB '5
730 IF D +.01= C2 THEN 1145
735 P = P-10:GOTO 580

```



SOUS PROGRAMMES .

```
740 REM GESTION DES CONTANTES
745 DEFFN'1
750 PRINT P$(J1); "="; H$(K); "?": INPUT " ", H$(K)
755 IF H$(K)="*" THEN 810
760 IF POS(H$(K)="*") <> 0 THEN 795
765 FOR J=L TO L+G-1
770 CONVERT STR(H$(K),1,NUM(H$(K))) TO P(K,J)
775 NEXT J
780 L=L+G
785 IF L<= 1 THEN 750:IF L=11 THEN 810
790 GOTO 750
795 FOR J=L TO 10
800 CONVERT STR(H$(K),1,NUM(H$(K))) TO P(K,J)
805 NEXT J
810 RETURN
815 REM CHOIX DE L'IMPRIMANTE
820 DEFFN'2: INPUT "No D'ADRESSE DE L'IMPRIMANTE",K
825 IF K=211 THEN 840
830 IF K=215 THEN 845
835 IF K < 200 THEN 850
840 SELECT PRINT 211(80):GOTO 855
845 SELECT PRINT 215(80):GOTO 855
850 SELECT PRINT 005(64)
855 RETURN
860 REM POSITIONNEMENT DU RUBAN
865 DEFFN'3
870 IF STR(T1$,1,1)=HEX(FF) THEN 895
875 DATA LOAD BTR(N=5)/618,T1$
880 IF STR(T1$,1,1)=HEX(FF) THEN 895
885 DATA LOAD BT(N=1,S=FF)/618,T1$
890 IF STR(T1$,1,1) <> HEX(FF) THEN 885
895 DATA LOAD BT(N=1,S=FF)/618,T1$
900 IF STR(T1$,1,1)=HEX(FF) THEN 895
905 DATA LOAD BTR(N=1)/618,T1$
910 RETURN
915 REM CONVERSION ASCII
920 DEFFN'4
925 FOR S=K TO (K+M)
930 IF STR(T1$,N,1)=HEX(2E) THEN 950
935 IF NUM(STR(T1$,N,M))>=A THEN 955
940 IF NUM(STR(T1$,N,1)) >=1 THEN 950
945 ADDC(STR(T1$,N,1),80)
950 A=A-1:N=N+1
955 NEXT S
960 RETURN
```



BIBLIOGRAPHIE

- ATKINSON K.H. & ATKINSON J. (1980) Biochemical basis for the continuous copulation of the female *Schistosoma mansoni*.
NATURE , 283 , 478 - 479.
- BARRABES A., THANH HAI DUONG & COMBESCOT C. (1979) Effet de l'administration d'implants de testostérone ou de progestérone sur l'intensité de la parasitose expérimentale à S. mansoni du hamster doré femelle.
C.R. Soc. Biol., 173, 153-156.
- BAYARD F., BEITINS I.Z., KOWARSKI A. & MIGEON C.J. (1970) Measurement of plasma aldosterone by radioImmuno assay.
J. Clin. Endocrinol. Metabolic, 31, 1-
- BENNETT J., BUEDING E., TIMMS A.R. & EMGSTROM R.G. (1969) Occurrence and levels of 5-OH tryptamine in Schistosoma mansoni.
Molec. Pharmacol., 5 (5), 542-545.
- BENNETT J. & BUEDING E. (1971) Localization of biogenic amines in S. mansoni.
Comp. Biochem. Physiol., 39A (4), 857-867.
- BERG E. (1953) Effect of castration in male mice on S. mansoni.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 80, 83-85.
- BERG E. (1957) Effect of castration and testostérone in male mice on S. mansoni. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 51 (4), 353-358.
- BRIGGS M.H. (1972) Metabolism of steroid hormones by schistosomes.
Biochim. Biophys. Acta, 280, 481-485.
- BRUMPT E. (1936) Action des hôtes définitifs sur l'évolution et sur la sélection des sexes de certaines helminthes hébergés par eux : Expériences sur des schistosomes. Ann. Parasitologie, XIV, n°6, 341-351.
- BUTTNER A. (1950) Labilité particulière du sexe chez S. mansoni (Plathelminthe, Trématode). Essai d'interprétation.
Ann. Parasitologie, XXV, n°4, 297-307.

- CAILLA H.L., GROS G.S., JOLU E.P.T., DELAAGE M.A. & DEPIEDS R. (1973)
Comparison between Rat and Rabbit Anticyclic AMP - Antibodies
specificity Towards derivatives of cAMP.
Ann. Biochemistry, 56, 383-393.
- CARDINALI D.P., VACAS M.I. & RITTA A.M. (1981) A biphasic effect of
estradiol on serotonin metabolism in rat pineal organ culture.
Experientia, 37, 203-204.
- CATTO B.A. & OTTESEN E.A. (1979) Serotonin uptake in schistosomules of
Schistosoma mansoni. Comp. Biochem. Physiol., 63 (6), 235-242.
- CATTO B.A. (1981) Schistosoma mansoni. Decarboxylation of 5-OH TRYPTOPHAN,
L. DOPA and L. HISTIDINE in adult and larval Schistosomes.
Exp. Parasitol., 51, 152-157.
- CHARLET, M. ; GOLTZENE F. & HOFFMAN J.A. (1979). Experimental evidence
for a neuroendocrine control of ecdysone biosynthesis in adult
females of *Locusta migratoria*.
J. Insect Physiol. 25 , 463 - 466.
- CHEEVER A.W. & POWERS K.G. (1972) Schistosoma mansoni infection in Rhesus
monkeys : Comparison of the course of heavy and light infections.
Bull. World Health Organization, 46, 301-309.
- CIOLI D., KNOPT P.M. & SENFT A.W. (1977) A study of S. mansoni trans-
ferred into permissive and non-permissive hosts.
Int. J. Parasitol., 7, 293-297.
- CLOUGH E.R. (1981) Morphology of reproductive organs and oogenesis in
bisexual and unisexual transplants of mature Schistosoma mansoni
females. J. Parasitol., 67 (4), 535-539.
- DAVIES P. & JACKSON H. (1970) Experimental studies on the chemosteri-
lization of S. mansoni. Parasitology, 61, 167-176.
- DE REGGI M.L., HIRN M.H. & DELAAGE M.A. (1975) RadioImmunoAssay of ecdysone
An application to *Arosophila* Larvae and pupae.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 66, 1307-1315.

- FALLON A.M., HAGEDORN H.H., WYATT G.R. & LAUFER M. (1974) Activation of vitellogenin synthesis in the mosquito *Aedes aegypti* by ecdysone. J. Ins. Physiol., 20, 1815-1823.
- FRIPP P.I. (1947) Histochemical localisation of esterase activity in Schistosomes. Exp. Parasitol., 21, 380-390.
- HAGEDORN H.H., O'CONNOR J.D., FUCHS M.S., SAGE B., SCHLAEGER D.A., BOHM M.K. (1975) The ovary as a source of ecdysone in an adult mosquito. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 3255-3259.
- HIGASHI G.I., KREINER P.W., KEIRNS J.J. & BITENSKY M.W. (1973) Adenosine 3'-5' cyclic monophosphate in *Schistosoma mansoni*. Life Sci., 13, 1211.
- HILLMAN G.R., OLSEN N.J. & SENFT A.W. (1974) J. Pharmacol. Exp. Ther., 188, 529.
- HIRN M.H.; LAGUEUX M.; HETRU C. & HOFFMAN J.A. (1979). Prothoracic gland activity and blood titers of ecdysone and ecdysterone during the last larval instar of *L. migratoria*. J. Insect Physiol., 25, 255 - 261.
- HORN D.H.S., WILKIE J.S. & THOMSON J.A. (1974) Isolation of ecdysone from the parasitic nematode *Ascaris lumbricoïdes*. Experientia, 30, 1109-1110.
- JOWETT T. & POSTLETHWAIT J.H. (1981) Hormonal regulation of synthesis of yolk proteins and a larval serum protein (LSP2) in drosophila. Nature, 292, 633-635.
- KARLSON P. & SEKERIS C.E. (1966) Ecdysone, insect steroid hormone and its mode of action. Rec. Prog. Hormone Res., 22, 473-502.

- KOOLMAN J. & HOFFMAN J.A. (1974). Role of the prothoracic glands in the regulation of the moulting hormone titer and the metabolic fate of injected labelled ecdysone in *Locusta migratoria*. J. Insect Physiol. ; 20 , 1593 - 1612.
- KRAMINSKY G.P., CLARK W.C., ESTELLE M.A., GIETZ R.D., SAGE B.A., O'CONNOR J.D. & HODGETTS R.B. (1980) Induction of translatable mRNA for dopa decarboxylase in *Drosophila* : an early response to ecdysterone. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77 (7), 4175-4179.
- LAFONT R., SOMME-MARTIN G., MAUCHAMP B., MAUME B.F. & DELBECQUE J.P. (1980) Analysis of ecdysteroids by high performance liquid chromatography and coupled gas-liquid chromatography-mass spectrometry. Progress in ecdysone Res., 45-68.
- LAGUEUX M, HIRN M., DE REGGI M.L. & HOFFMAN J.A. (1976). Taux des ecdystéroïdes et développement ovarien chez les femelles de *Locusta migratoria*. C. R. Acad. Sc. PARIS , 282 , 1187-1190.
- LAGUEUX M. , GOLTZENE F. & HOFFMAN J.A (1978). The follicle cell epithelium of maturing ovaries of *Locusta migratoria* : A new biosynthetic tissue for ecdysone. Hoppe Seyler's Zeitsch. Physiol. Chemie , 359 , 1427-1434.
- LAGUEUX M.; HARRY P.& HOFFMAN J.A. (1981). Ecdysteroids are bound to vitellin in newly laid eggs of Locusta. Mol. Cell. Endocrinol., 24(3) , 325-328.
- MANSOUR T.E.; SUTHERLAND E.W.; RALL T.W. & BUEDING E. (1959). The effect of serotonin (5-hydroxytryptamine) on the formation of Adenosine 3',5' Phosphate by tissue particles from the liver fluke *Fasciola hepatica*. J. Biol. Chem. , 235(2) , 466-470.
- MANSOUR Tag E. (1967). Effect of hormones on carbohydrate metabolism of invertebrates. Fed. Proceed. , 26(4) , 1179-1185.

- MILLER P. (1976) Migration of the human blood fluke *Schistosoma mansoni* and its subsequent development in the mammalian host. Doc. Phil. Thesis , University of York.
- NIMMO-SMITH R.H. & RAISON G.G. (1968) Mono-Amine oxidase activity of *Schistosoma mansoni*. Comp. Biochem. Physiol., 24, 403-416.
- RAMALHO-PINTO F.J., GAZZINELLI G., HOWELLS R.E., MOTA-SANTOS T.A., FIGUEIRERO E.A. & PELLEGRINO J. (1974) *Schistosoma mansoni* : Defined system for stepwise transformation of cercariae to schistosomule in vitro Exp. Parasitol., 36, 360-363.
- ROBINSON E.J. (1959) Further studies on the effect of abnormal host metabolism on *S. mansoni*. J. Parasitol., 45, 295-299.
- ROBINSON E.J. (1957) A possible effect of testosterone on the development of *Schistosoma mansoni*. J. Parasitol., 43, 59.
- ROGERS W.P. (1962) The nature of parasitism. Academic Press, London & New York.
- ROGERS W.P. (1973) Juvenile and moulting hormones from nematodes. Parasitology, 67, 105-113.
- SAHBA G.H. & MALEK E.A. (1977) Unisexual infection with *S. haematobium* in the white mouse. Am. J. Trop. Med. Hyg., 26 (2), 331-333.
- SHAW J.R. (1977) *S. mansoni* : Pairing in vitro and development of females from single sex infections. Exp. Parasitol., 41, 54-65.
- SHAW J.R., MARSHALL I. & ERASMUS D.A. (1977) *S. mansoni* : In vitro stimulation of Vitelline cell development by extracts of mole worms. Exp. Parasitol., 42, 14-20.
- SMITHERS S.R. & TERRY R.J. (1965) The infection of laboratory hosts with cercariae of *S. mansoni* and the recovery of the adult worms. Parasitology, 55, 695.
- SMITHERS S.R. & TERRY R.G. (1969) Immunity in Schistosomiasis. Ann. N.Y. Acad. Sci., 160, 826-840.

SADUN E.H. & GORE R.W. (1970) *S.mansoni* & *S.haematobium* : homocytotropic reagin-like antibodies in infections of man and experimental animals. Exp. Parasitol. 78 , 435.

TORPIER G., CAPRON M. & CAPRON A. (1977) Structural changes of the tegumental membrane complex in relation to developmental stages of *S. mansoni*. J. Ultrastr. Res., 61 , 309 - 324.

TORPIER G., HIRN M.H., NIRDE P.H., DE REGGI M.L. & CAPRON A. (1982) Detection of ecdysteroids in the human Trematode, *S. mansoni*. Parasitology, 84 (1), 123-130.

TRUMAN J.W., TAGHERT P.H., COPENHAVER P.F., TUBLITZ N.J. & SCHWARTZ L.M. (1981) Eclosion hormone may control all ecdyses in insects. Nature, 291, 70-71.

VOGEL H. (1947) Hermaphrodites of *Schistosoma mansoni*. Ann. Trop. Med. Parasitol., 41, 266-277.

WILSON R.A., DRASKAU T., MILLER P. & LAWSON J.R. (1978) *Schistosoma mansoni* : the activity and development of the schistosomulum during migration from the skin to the hepatic portal system. Parasitology, 77, 57-73.

